

УДК 66.047.3.049.6, 577.11

Т. Н. Сомов\*, Ю. С. Юсупова, А. Е. Галазина, М. Г. Гордиенко

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия  
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1

\* e-mail: timofeysomov@gmail.com

## ПОЛУЧЕНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СФЕРИЧЕСКИХ МИКРОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА, ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ, ЖЕЛАТИНА, КОЛЛАГЕНА

В ходе данной работы были получены биodeградируемые микрочастицы сферической и вытянутой формы. В качестве основных компонентов были использованы хитозан, полимолочная кислота, коллаген и желатин. Для сушки микрочастиц была применена лиофильная сушилка. Полученные микрочастицы могут быть использованы в косметологии и в области регенеративной медицины.

**Ключевые слова:** сферические микрочастицы, микрочастицы, биodeградируемость, регенеративная медицина, хитозан, полимолочная кислота, коллаген

Медицина вынуждена постоянно эволюционировать, так как с каждым новым поколением количество различных заболеваний увеличивается, что обусловлено ухудшением генетического материала и усложнением уже имеющихся форм заболеваний, приспособляющихся к современным методам лечения, таким образом количество неизлечимых болезней возрастает [1].

Одной из новых форм медицины является регенеративная медицина, в свою очередь являющаяся совокупностью физики, химии, молекулярной биологии, биохимии, тканевой инженерии, цитологии. Регенеративная медицина ставит перед собой широкий круг задач, в который входит создание новых органов, создание тканей, позволяющих ускорять процесс заживления, создание тканей, способных полностью заменять функции поврежденной поверхности, замедление процессов старения (изнашивания) тканей, создание клеток, способных уничтожать дефектные клетки организма, программирование клеток, а также, диагностирование различных заболеваний, доставка лекарственного вещества [2]. Материалы, создаваемые для использования в регенеративной медицине должны четко соответствовать всем требованиям безопасности, а именно:

- не токсичность,
- хорошая совместимость с организмом,
- биodeградируемость,
- относительная химическая нейтральность.

В своей работе получены частицы из хитозана, желатина и полимолочной кислоты по разным методикам для дальнейших исследований, в каких частицах клетки будут лучше приживаться, а, следовательно, какой материал более эффективный для использования в регенеративной медицине.

### Материалы и оборудование

В качестве основных материалов в ходе эксперимента были использованы коллаген, водорастворимый хитозан, полимолочная кислота, желатин. Коллаген – фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани организма и обеспечивающий её прочность и эластичность. Продуктом денатурации коллагена является желатин. Желатин – белковое желеобразующее вещество, содержащееся в костях, хрящах, коже, жилах животных [3].

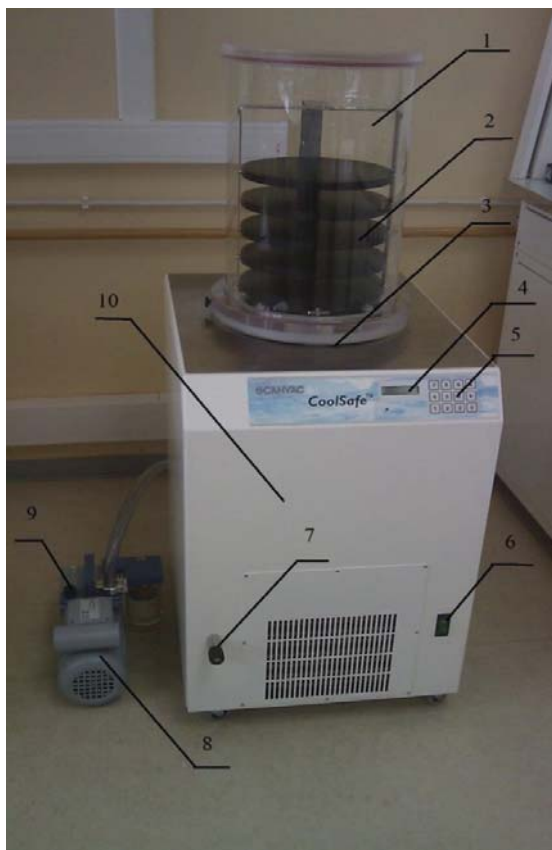
Хитозан – аминсахар, производное линейного полисахарида, макромолекулы состоят из случайно-связанных  $\beta(1-4)$ D-глюкозаминных звеньев и N-ацетил-D-глюкозамин [4].

Полимолочная кислота (PLA) представляет собой термопластичный сложный полиэфир, который является одним из самых широко применяемых полимеров для создания микроносителей лекарственных средств [6].

В качестве дополнительных веществ были использованы растворители и связующие компоненты. В качестве связующего был выбран глутаровый альдегид. В условиях щелочного катализа глутаровый альдегид способен полимеризоваться по механизму альдольной конденсации с образованием полиглутарового альдегида, который дает необходимые химические сшивки [5]. Основными растворителями были дихлорметан, изопропанол, вода.

При проведении эксперимента были использованы центрифуга, верхнеприводная мешалка, ультразвуковая ванна. Завершающая и основная стадия всех экспериментов была проведена в лиофильной сушилке.

Стадия лиофильной сушки была проведена на установке CoolSafe 100-9. Сушилка представлена на рисунке 1.



**Рис. 1.** Лиофильная сушилка CoolSafe 100-9:  
 1 – вакуумная камера; 2 – полки с подогревом;  
 3 – конденсор; 4 – информативный экран;  
 5 – устройство ввода; 6 – выключатель;  
 7 – спускной кран; 8 – вакуумный насос;  
 9 – газобалластный клапан;  
 10 – холодильная установка

### Методики проведения эксперимента

В ходе экспериментальных исследований были проведены эксперименты по 4 различным методикам получения микрочастиц, содержащих биополимеры. Формирование микрочастиц происходит путём отвердевания капель эмульсии. Для разделения частиц использовалась центрифуга. Полученные частицы промывались водой и подвергались лиофильной сушке. В каждой методике есть точные значения времени проведения процесса, скорости вращения мешалок и центрифуг, температуры проведения процесса. Методики получения микрочастиц представлены ниже.

#### *Желатиновые частицы* [7]

Готовится 18% раствор желатина в воде, нагревается до 50 °С, затем в него добавляют 2 мл глутарового альдегида. Полученный раствор прокапывают с помощью шприца в масло, разогретое до 50 °С, содержащее ПАВ и перемешивают с целью формирования эмульсии (800 об/мин, 30 минут). Полученную эмульсию охлаждают мгновенно, поставив в ёмкость со льдом при перемешивании. В охлажденную эмульсию медленно вливают воду и перемешивают. Частицы переходят в водную фазу, масло сливают. Частицы 3 раза промывают

водой. Полученные частицы промывают водой и помещают в 100 мл водного раствора глицина на 30 минут для блокировки свободных альдегидных групп, снова промывают водой. Частицы высушивают в лиофильной сушилке.

#### *Желатиновые частицы, покрытые коллагеном* [7]

Готовится 18% раствор желатина в воде, нагревается до 50 °С, и затем в него добавляют 2 мл глутарового альдегида. Полученный раствор прокапывают с помощью шприца в масло, разогретое до 50 °С, содержащее ПАВ (1,5% от общего объёма) и перемешивают с целью формирования эмульсии (800 об/мин, 30 минут). Полученную эмульсию охлаждают мгновенно, поставив в ёмкость со льдом при перемешивании. В охлажденную эмульсию медленно при перемешивании вливают воду, частицы переходят в водную фазу, масло сливают. Частицы промывают водой. Готовят раствор коллагена 2 мг на мл 1% раствора аскорбиновой кислоты. Раствор разводят в 5 раз и смешивают с частицами в соотношении 3:1. Образец перемешивают на ледяной бане и промывают водой. Частицы погружают в 500 мл щелочного буфера (рН 9) и 100 мл NaBH<sub>4</sub>. Полученные частицы промывают 3 раза водой и 2 раза фосфатным буфером. Частицы высушивают в лиофильной сушилке.

#### *Микросферы полимолочной кислоты*

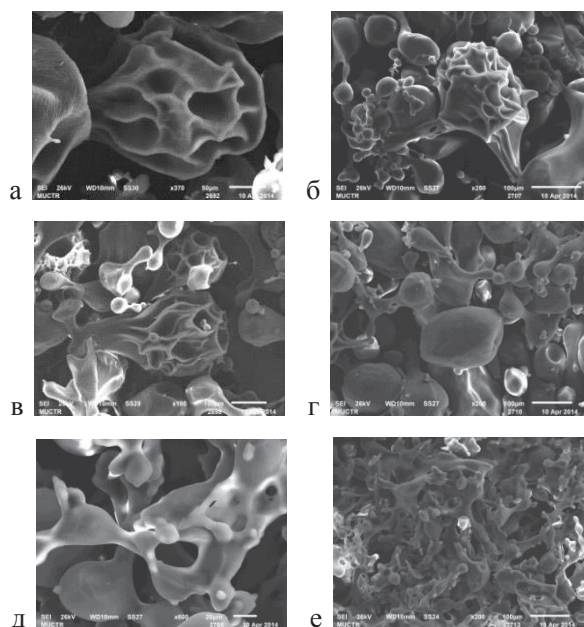
2 г полимолочной кислоты растворяют в 40 мл метилхлорида. Готовят 2% раствор поливинилового спирта (ПВС) в воде, вливают в него ранее приготовленный раствор при перемешивании и оставляют в течение 24 часов для удаления растворителя. Частицы фильтруют, промывают водой. Готовятся 3% и 6% растворы гександамина, растворы подогревают и в них добавляются частицы. Оставляют на 6 минут, затем фильтруют и несколько раз промывают водой. Полученные частицы на 10 минут помещают в 1% раствор глутарового альдегида. Далее частицы фильтруют и промывают водой. Затем частицы погружают в 5% раствор коллагена и желатина, выдерживают сутки при низкой температуре, периодически встряхивают для того чтобы частицы не слипались при продолжительном выдерживании. После выдержки полученные частицы фильтруют, несколько раз промывают водой и подвергают лиофильной сушке.

#### *Хитозановые частицы*

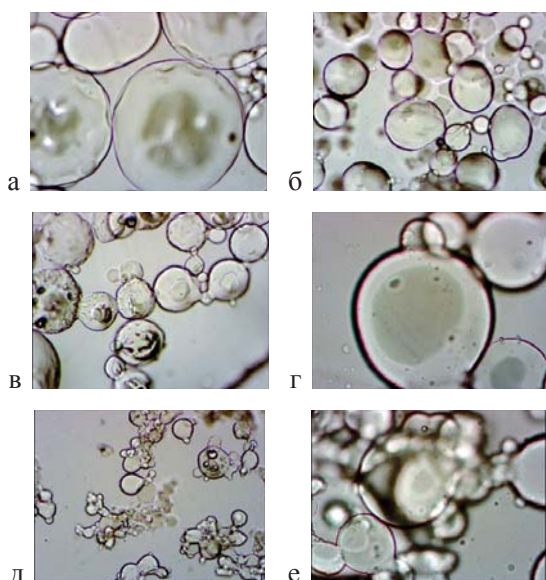
Готовится 2% раствор уксусной кислоты и 100 мл 2,5% раствора хитозана. Готовят 1М растворы солей Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*3H<sub>2</sub>O. Раствор хитозана в уксусной кислоте делится на три части и в каждый образец вливается по 25 мл различной соли при перемешивании. После полученные растворы разливают по пробиркам и промывают водой на центрифуге. Частицы подвергаются лиофильной сушке.

**Результаты эксперимента**

По итогам эксперимента было определено, что желатиновые частицы с меньшим содержанием глутарового альдегида более сферичны, чем частицы с большим содержанием глутарового альдегида. С увеличением количества сшивающего агента частицы принимают гантелеобразную форму (рис. 2).



**Рис. 2. Желатиновые частицы:**  
а, в, д – желатиновые частицы (0.5 мл GA, 1мл GA, 2 мл GA, соответственно);  
б, г, е - желатиновые частицы, покрытые коллагеном (0.5 мл GA, 1мл GA, 2 мл GA, соответственно)

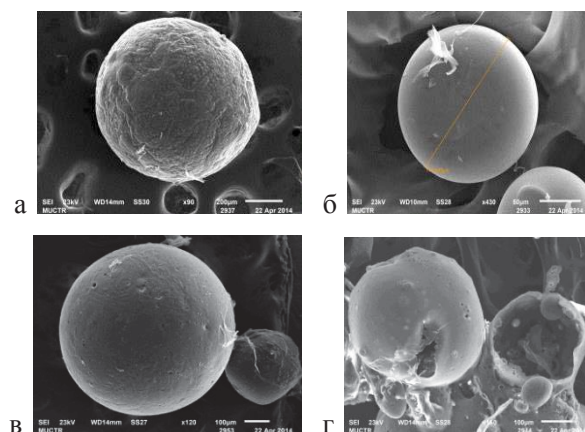


**Рис. 3. Желатиновые частицы:**  
а, в, д – желатиновые частицы при контакте с водой (0.5 мл GA, 1мл GA, 2 мл GA, соответственно);  
б, г, е – желатиновые частицы, покрытые коллагеном, при контакте с водой (0.5 мл GA, 1мл GA, 2 мл GA)

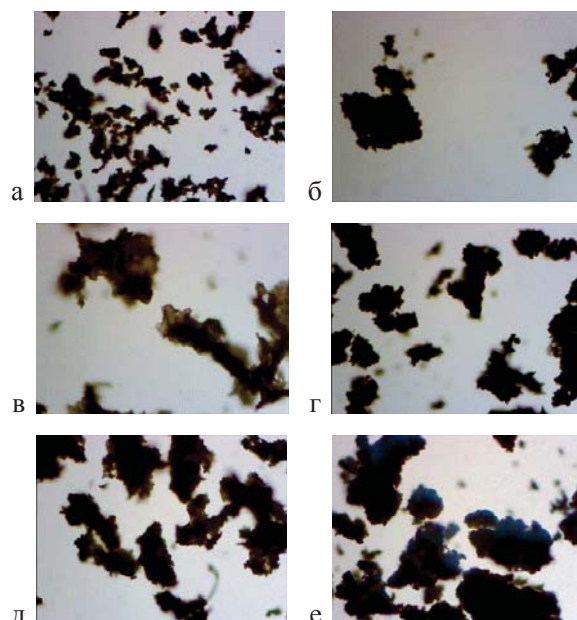
При контакте с водой желатиновые частицы не растворялись, что может свидетельствовать о

полном протекании реакции сшивки с глутаровым альдегидом. Желатиновые частицы, покрытые коллагеном, также оставались стабильными при контакте с водной фазой. На рисунке 3 приведены образцы при контакте с водой.

Из всех частиц наиболее актуальными для выращивания клеток являются частицы полимолочной кислоты, поскольку они имеют сферическую форму, что наибольшим образом способствует прикреплению клеток. Полученные частицы ПМК были покрыты коллагеном и желатином с различным содержанием гександиамина. На рисунке 4 приведены фотографии частиц ПМК.



**Рис. 4. Изображения образцов:**  
а, б – частицы ПМК, покрытые коллагеном (3% и 6% раствор гександиамина, соответственно);  
в, г – частицы ПМК, покрытые желатином (3% и 6% раствор гександиамина, соответственно)



**Рис. 5. Изображения образцов:**  
а, в, д – хитозановые частицы, полученные при взаимодействии с солями  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , соответственно;  
б, г, е – хитозановые частицы, полученные при взаимодействии с солями  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , соответственно (сшивающий агент – глутаровый альдегид)

Частицы полимолочной кислоты получились сферической формы, слегка шероховатые. При контакте с водой не растворялись, механически прочные.

Поверхность частиц хитозана представляет собой неровную структуру. После сублимационной сушки получился белый мелкодисперсный порошок. При контакте с водой частицы слегка растворялись. Хитозановые частицы представлены на рисунке 5.

Исследование на цитотоксичность и на прикрепление и рост клеток будет проводиться в Институте биологии развития им Н.К. Кольцова

РАН. Для исследования будут использоваться клетки постнатального фибробласта человека (ПФЧ). Они являются клетками соединительной ткани человека и активно размножаются в культуральных флаконах, что делает их доступными для исследований. Клетки подкрашиваются нетоксичной флуоресцентной краской, которая даёт возможность увидеть клетки под специальным микроскопом. Суть исследования заключается в высаживании клеток на полученные микроносители и дальнейшем анализе полученных под микроскопом изображений.

*Сомов Тимофей Николаевич, аспирант кафедры кибернетики химико-технологических процессов, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Россия, Москва*

*Юсупова Юлия Салаватовна, студентка факультета информационных технологий и управления РХТУ им. Д. И. Менделеева, Россия, Москва*

*Галазина Александра Евгеньевна, студентка факультета информационных технологий и управления РХТУ им. Д. И. Менделеева, Россия, Москва*

*Гордиенко Мария Геннадиевна, к.т.н., старший преподаватель кафедры кибернетики химико-технологических процессов, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Россия, Москва*

#### Литература

1. Zheng Zhang, Ophir Ortiz, Ritu Goyal and Joachim Kohn. Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices. – 2014. – V.20. – P. 303 – 335.
2. Minabe M., Takeuchi K., Tamura K., Hori T., Umemoto T. Subgingival administration of tetracycline on a collagen film // Journal of Periodontology. – 1989. – V. 60. – P. 552 – 556.
3. Chan O. C. M., So K. F., Chan B. P. Fabrication of nano-fibrous collagen microspheres for protein delivery and effects of photochemical crosslinking on release kinetics // Journal of Controlled Release. – 2008. – V. 129. – P. 135 – 143.
4. Saito K., Fujieda T., Yoshioka H. Feasibility of simple chitosan sheet as drug delivery carrier // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2006. – V. 64 (2). – P. 161-166.
5. Биохимия: Учебник / Под ред. Е.С. Северина. – 2-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 784 с.
6. Mascarenhas W.J., Akay H.U., Pikal M.J. A computational model for finite element analysis of freeze-drying process // Computer methods in applied mechanics and engineering. – 1997. – V. 148. – P. 105 – 124.
7. Стариков Д.Г., Сомов Т.Н. Получение сферических микрочастиц на основе коллагена и желатина // Успехи в химии и химической технологии. Том XXVII. 2013. №1. – 2013 – P. 74-79.

*Somov Timofey Nikolaevich \*, Yusupova Yuliya Salavatovna, Galazina Alexandra Evgenевна, Gordienko Mariya Gennadievna*

D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia.

\* e-mail: timofeysomov@gmail.com

#### **GETTING BIODEGRADABLE SPHERICAL MICROCARRIERS OF CHITOSAN, POLYLACTIC ACID, GELATIN, COLLAGEN**

##### **Abstract**

In the course of this work were obtained biodegradable microparticles of spherical and elongated. As the basic components used were chitosan, polylactic acid, collagen and gelatin. For drying the microparticles was used freeze dryer. The resulting microparticles may be used in cosmetics and in the field of regenerative medicine.

**Key words:** spherical microcarriers, microparticles biodegradability, regenerative medicine, chitosan, polylactic acid, collagen.