

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра материаловедения,
технологии и управления качеством

**ПОЛУЧЕНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ МИКРОННЫХ БИОНОСИТЕЛЕЙ,
ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К УФ-ИЗЛУЧЕНИЮ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента магистратуры 2 года обучения 2295 группы
направления 22.04.01 «Материаловедение и технологии материалов»,
профиль «Материаловедение фармацевтического и медицинского назначения»
института физики

Кирсанова Дмитрия Васильевича

Научный руководитель,
доцент кафедры физики
полупроводников, к.ф.-м.н.

должность, уч. степень, уч. звание

М.В. Ломова

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой,
д.ф.-м.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание

С.Б. Вениг

подпись, дата

Саратов 2021

Введение. Биохимический анализ – один из наиболее популярных методов исследования для пациентов и врачей. Данное исследование проводится в лабораторных условиях и позволяет получить сведения о функциональном состоянии не только организма в целом, но и органов в отдельности.

Если четко знать, что показывает биохимический анализ, можно на ранних стадиях выявлять ряд серьезных недугов [1]. Раннее выявление таких патологий дает возможность применить правильное лечение и излечить их. Именно поэтому актуальность развития методов биохимического анализа так важна на сегодняшний день.

Поскольку УФ-излучение является основной частью протоколов проведения аналитических и биохимических реакций, то получение 3D платформ, показывающих чувствительность к УФ-излучению, является приоритетным направлением сенсорики в химии.

Цель настоящей работы: изучение воздействия УФ-излучения на минеральные пористые носители с оболочками на основе бычьего сывороточного альбумина и таниновой кислоты.

Задачи настоящей работы:

- анализ литературных данных и источников,
- изучение протокола получения минеральных твердых микронных пористых ядер;
- последовательное покрытие полученных микроструктур оболочками таниновой кислоты и бычьего сывороточного альбумина для создания УФ-чувствительного покрытия на поверхности сферических частиц;
- облучение полученных носителей УФ-излучением на протяжении 15, 30, 45 и 60 минут;
- анализ изменения распределения по размерам носителей до и после УФ-излучения.

Дипломная работа занимает 78 страниц, имеет 44 рисунка и 1 таблицу.

Обзор составлен по 48 информационным источникам.

Во введении рассматривается актуальность работы, устанавливается цель и выдвигаются задачи для достижения поставленной цели.

Первый раздел представляет собой обзор литературных данных и источников.

Во втором разделе работы описывается экспериментальная часть и анализ.

Основное содержание работы

Создание растворимых частиц для получения микрокапсул. В качестве растворимых микрочастиц для получения микрокапсул используют разнообразные коллоидные частицы органической и неорганической природы [2]. Сюда входят частицы на основе меламинаформальдегидных смол и полистирольного латекса, кристаллов органических красителей, а также частицы на основе неорганических соединений, таких как карбонаты металлов, диоксида кремния, белковые агрегаты, клеточные структуры. Основное требование, предъявляемое к материалу ядер – простота растворения и выведения из объема капсулы.

Для образования капсул необходимо выполнение двух основных условий. Во-первых, удаление коллоидного ядра, не должно приводить к растворению образовавшейся оболочки. Во-вторых, продукты разрушения коллоидного ядра должны свободно проникать через оболочку. Так, *карбонат кальция*, может быть растворен при изменении pH среды (в кислой среде).

Карбонатные микрочастицы получают смешиванием двух солей – соли соответствующего металла и растворимых карбонатов и гидрокарбонатов. Полученные частицы имеют специфическую шероховатую поверхность из-за пористой структуры и сферическую форму [1]. При этом для частиц карбоната кальция характерна высокая степень полидисперсности (распределение частиц по размерам составляет от 3 до 18 микрон).

Включение белков в полиэлектролитные микрокапсулы методами соосаждения и адсорбции. Полиэлектролитные микрокапсулы (ПЭМК) синтезируют путем поочередной адсорбции разнозаряженных полиэлектролитов

на заряженные коллоидные частицы нано- и микроразмеров, используемых в качестве каркасов – ядер, которые в дальнейшем подлежат удалению из системы [3]. Результатом адсорбции могут выступать полые полиэлектролитные микрокапсулы матриксного типа, включающие в себя полиэлектролитный комплекс, структура которого повторяет структуру каркасных частиц.

Оболочка микрокапсул может быть сформирована из синтетических полиэлектролитов (ПЭ): недеградируемых или биодеградируемых. Микрокапсулы, сформированные из биополимеров, нашли свое применение в биомедицине в области адресной доставки к тканям и клеткам биологически активных компонентов, высвобождение которых на месте обеспечивает создание пролонгированных лекарственных препаратов.

Используя метод соосаждения, подвергается инкапсулированию более 60% включаемого белка, оставшиеся 40% составляют потери, которых возможно практически полностью избежать, прибегая к методу адсорбции [4]. Основным моментом адсорбции является применение кальций-карбонатной микрочастицы с развитой пористой поверхностью, которая способствует образованию разветвленного интерполиэлектролитного матрикса, в совокупности с архитектурой и строением полиэлектролитов, лежащих в основе микрокапсул, из которых формируются слои и внешняя оболочка.

Кроме того, метод адсорбции дает возможность рассчитать емкость микрокапсул, используя подбор архитектуры оболочки и природу происхождения полиэлектролитов под конкретный случай инкапсулирования.

Влияние двухвалентных катионов металлов на взаимодействие бычьего сывороточного альбумина (BSA) и таниновой кислоты (ТА). Танины – это группа водорастворимых полифенольных соединений, которые встречаются в основном в растительных кормах, пищевых зернах и фруктах [5]. Танины хорошо известны тем, что они взаимодействуют с белками и металлами. Взаимодействие белка и танина может влиять на некоторые свойства белков, такие как переваримость, ферментативная активность, вяжущая способность, белковая структура и стабильность. Образование сильных хелатов и комплексов

полифенолов с микроэлементами и макроэлементами могут снижать их всасывание, образуя нерастворимые комплексы в желудочно-кишечном тракте. Кроме того, металл может заставить полифенол действовать как прооксидант. Однако известно множество способов применения танинов или материалов, содержащих их в своем составе, в качестве комплексообразователя с ионами металлов.

Часто наблюдается присутствие как белков, металлов, так и танинов в пище и живых организмах [6]. Таким образом, знание взаимодействия между этими веществами необходимо для понимания многих процессов.

Двухвалентные катионы увеличивают сродство и влияют на энталпию и энтропию связи между BSA и таниновой кислотой. При этом влияние на связывание различно в зависимости от металла. Этот должно быть связано с взаимодействием солей в различных областях белка и различиями в их структуре. Кроме того, каждая соль взаимодействует по-разному с таниновой кислотой [7]. В присутствии Mg^{2+} характер взаимодействия таниновой кислоты с BSA остается прежним. В присутствии Ca^{2+} и Mn^{2+} , механизм взаимодействия меняется, так как ΔS переходит от отрицательного к положительному значению. Присутствие Mg^{2+} и Ca^{2+} снижает уровень IVPD комплекса BSA и таниновой кислоты, а после гидролиза электрофорезом наблюдается наличие более крупного комплекса, BSA в нативном состоянии и пептидов размером 45-48 КДА. Содержание Mn^{2+} способствует повышению IVPD (перевариваемости).

Влияние УФ-облучения на хитозан, модифицированный таниновой кислотой. Хитозан – производное хитина, является биосовместимым, биоразлагаемым и нетоксичным для человеческого организма соединением [8]. Обычно используется как компонент широко применяемых в медицине структур, которые могут иметь различные формы, такие как пленки, трехмерные каркасы или гидрогели. Биоматериалы, полученные в форме пленки, можно использовать для подготовки оболочек или покрытий структур, которые необходимо встроить в человеческое тело. Свойства полимерных сеток могут быть изменены с помощью сшивания. Дополнение сшивающим агентом – самый

простой способ произвести какие-либо модификации свойств материала. Таниновая кислота – это природное соединение, не обладающее токсичным воздействием на организм человека, которое представляется возможным использовать в процессе сшивания хитозановых материалов благодаря взаимодействию между полимером и кислотой, вследствие чего возможно изменение свойств хитозана [9]. Таниновая кислота имеет способность нековалентно взаимодействовать с биополимерами, такими как коллаген, хитозан, желатин, альбумин, образуя посредством ионных, гидрофобных и водородных связей. Добавление таниновой кислоты, действующей как сивающий агент, позволяет получить более жесткие каркасы матриц хитозана, что позволяет при разрушительном воздействии увеличить прочность на растяжение и уменьшить удлинение при разрыве. Вопрос в том, может ли добавление таниновой кислоты изменить фотохимическую стабильность хитозана.

Известно, что УФ-свет разрушает матрицу хитозана за счет высокой энергии излучения. Процесс фотодеградации происходит на поверхностной пленке и во внутреннем объеме. Основной механизм фотодеградации включает образование карбоксильных, гидроксильных групп и образование карбоксильных групп в присутствии кислорода. С увеличением времени облучения степень деградации увеличивается, что можно наблюдать при анализе FTIR-спектроскопии или изучении механических свойств [10]. Нековалентные взаимодействия нарушаются в первую очередь по причине того, что они слабее ковалентных, тем не менее, ковалентные связи также разрушаются после длительного облучения. Это приводит к ухудшению свойств биоматериалов, изготовленных из хитозана. УФ-излучение с длинами волн 100-280 нм обычно используется в биоцидных лампах. По этой причине определение влияние УФ-облучения на биоматериалы является важной задачей, поскольку часто их приходится облучать УФ-светом, чтобы стерилизовать перед использованием в медицинских целях.

Добавление таниновой кислоты к хитозану и ультрафиолетовое облучение

образцов может изменить свойства пленок хитозана [11]. После добавления таниновой кислоты к хитозану происходит процесс сшивания, и, благодаря наличию взаимодействий между этими двумя компонентами, получается комплекс таниновой кислоты и хитозана. Ультрафиолетовое облучение вызывало как деградацию образца, так и его сшивку. Прочность на растяжение и относительное удлинение при разрыве снижались с увеличением времени УФ-облучения. Это говорит о том, что пленки становятся более хрупкими в результате воздействия ультрафиолетового излучения. Термическая стабильность хитозана повышается за счет процесса сшивания. После длительного облучения хитозана, модифицированного добавлением таниновой кислоты, наблюдалось увеличение полярного компонента и падение дисперсионного компонента, что свидетельствует о повышении гидрофильности за счет фотохимической реакции, особенно фотоокисления. Эксперименты доказали, что как ультрафиолетовое облучение, так и добавление таниновой кислоты могут модифицировать материалы хитозана для потенциальных биомедицинских применений.

Динамическое сшивание таниновой кислотой в качестве укрепляющего компонента полипропилена. С повышением внимания к экологической осведомленности были предприняты значительные усилия по разработке композитов, содержащих некоторую долю устойчивых биополимеров благодаря их возобновляемости, биоразлагаемости, химической реакционной способности и физико-химическим свойствам [12]. Среди этих композитов полипропилен (ПП) является одной из наиболее важных и широко используемых композитных матриц из-за его низкой стоимости производства, гибкости конструкции, низкой плотности и возможности вторичной переработки. Сочетание ПП и биополимеров демонстрирует множество преимуществ, включая низкую стоимость, доступность возобновляемых природных ресурсов, биоразлагаемость и достойные механические свойства. Хорошо известно, что ПП обладает высокой чувствительностью к ультрафиолетовому излучению и кислороду по сравнению с другими

полиолефинами. Ультрафиолетовое воздействие приводит к фоторазложению, вызывая изменение цвета, растрескивание поверхности и, в конечном счете, снижение механических свойств.

Композит на основе полипропилена в сочетании с танином был успешно получен методом динамической экструзии [13]. В этом процессе танин был сшит с гексамином в различных пропорциях. Морфологическое исследование показало, что мелкие частицы сшитого танина хорошо диспергированы в матрице ПП. Судя по модулю Юнга и реологическим характеристикам испытанных образцов, сшитый танин выполняет роль наполнителя жесткости и укрепляет матрицу ПП. Кроме того, сшитый танин положительно влияет на кристалличность ПП и термостабильность [14]. Также, под влиянием УФ-ускоренного выветривания, композиты ПП/ТН демонстрируют гораздо лучшие характеристики стойкости к фоторазрушению, характеризующиеся меньшим количеством поверхностных трещин, более низким карбонильным индексом и меньшим снижением кристалличности, что замедляет разрывы цепи ПП.

Получение минеральных пористых микронных частиц карбоната кальция. Создание частиц происходило следующим образом:

К 2,5 мл деионизированной воды при активном перемешивании с помощью магнитной мешалки быстро приливается одновременно по 0,615 мл 1М растворов хлорида кальция и карбоната натрия (формула 1).



Смесь перемешивается, затем суспензия образовавшихся частиц оставляется до полной кристаллизации карбоната кальция. Далее осадок карбоната кальция промывается деионизированной водой, центрифугируется и удаляется жидккая фаза. Далее качество полученных микрочастиц проверяется на микроскопе. После частицы подвергаются сушке, хранятся в сухом месте, чтобы избежать перекристаллизации ватеритной формы CaCO_3 в более термодинамически выгодную форму кальцита.

При непосредственном слиянии эквимолярных растворов хлорида кальция и карбоната натрия при перемешивании происходит кристаллизация

карбоната кальция. На первой стадии образуются наночастицы аморфного карбоната кальция. Далее из агрегатов этих наночастиц в местах образования центров роста начинается формирование микрочастиц карбоната кальция.

Образующиеся в результате микрочастицы имеют пористую структуру, обусловленную специфическим процессом роста частиц, сферическую форму и размер порядка нескольких микрон. Диаметр полученных частиц зависит от концентрации исходных солей, скорости и времени перемешивания. Так, чем быстрее оба раствора будут гомогенно распределены в рабочем объеме, тем больше образуется центров роста первичных аморфных образований, с которых начинается рост микрочастиц. С увеличением числа центров роста увеличивается число растущих микрочастиц и, соответственно, уменьшается средний размер микрочастиц. С увеличением концентрации исходных солей скорость роста так же увеличивается. При уменьшении интенсивности и времени перемешивания, снижении концентрации исходных солей, образуется меньшее число центров роста, что ведет к формированию более крупных микрочастиц.

Формирование оболочек таниновой кислоты и бычьего сывороточного альбумина. Облучение при помощи УФ-излучения полученных носителей. Полученные образцы после заморозки помещались в центрифугу на 60 секунд при частоте вращения 5000 об./мин. Далее образцы промывались дистиллированной водой с последующим центрифугированием с вышеизложенными параметрами три раза.

Нанесение слоя таниновой кислоты

Схематичное представление синтезируемых микроструктур представлено на рисунке 1.



Рисунок 1 – Схематичное представление синтезируемых микроструктур

К образцам приливалась таниновая кислота, за чем следовало активное перемешивание на стенде в течение 10 минут. Полученные образцы промывались дистиллированной водой с последующим центрифугированием в течение 60 секунд при частоте вращения 3000 об./мин. три раза.

Нанесение слоя бычьего сывороточного альбумина

К образцам приливался бычий сывороточный альбумин, за чем следовало активное перемешивание на стенде в течение 10 минут. Полученные образцы промывались дистиллированной водой с последующим центрифугированием в течение 60 секунд при частоте вращения 3500 об./мин. три раза.

Нанесение слоя таниновой кислоты

К образцам приливалась таниновая кислота, за чем следовало активное перемешивание на стенде в течение 10 минут. Полученные образцы (рисунок 2) промывались дистиллированной водой с последующим центрифугированием в течение 60 секунд при частоте вращения 3500 об./мин. три раза.



Рисунок 2 – Внешний вид полученных микроструктур

Облучение УФ-светом

Воздействие ультрафиолета производилось УФ-лампой Phi в течение 15, 30, 45 и 60 минут. Так же были сохранены образцы, не подвергшиеся воздействию.

Исследование распределения по размерам твердых минеральных носителей с оболочками до и после воздействия УФ-излучения. Полученный образец (2 мл) после заморозки доводился до комнатной температуры и

подвергался воздействию ультразвука в течение 2 минут.

Обработка полученных данных производилась на ПО: Zetasizer Software v.8.01.4906. Построение графиков осуществлялось на ПО: OriginLab Origin 2021.

Измерения проводились на анализаторе дзета-потенциала Zetasizer Nano ZS. Результаты в графическом виде представлены на рисунке 3. В таблице 1 представлены значения среднего размера частиц и индекса полидисперсности полученные в зависимости от продолжительности УФ-облучения.

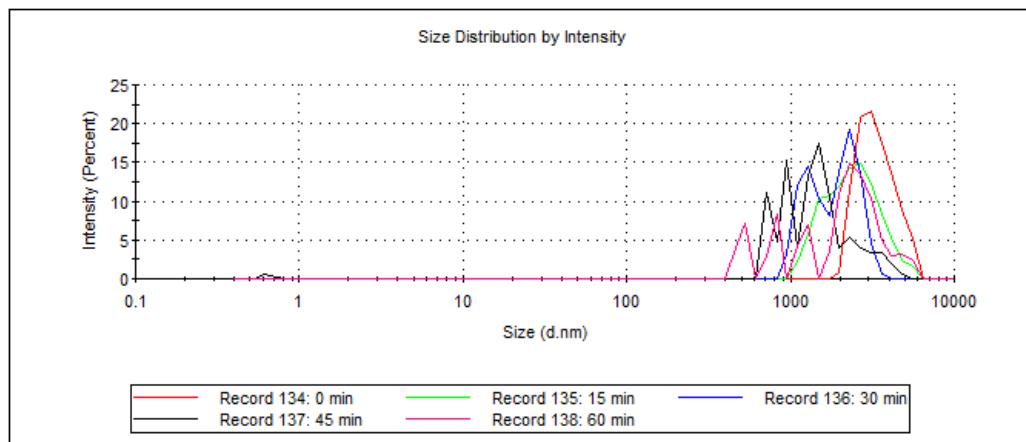


Рисунок 3 – График интенсивности распределения частиц по размерам для образцов с воздействием УФ-излучения 15, 30, 45 и 60 минут и без воздействия
Таблица 1 – Зависимость среднего размера частиц и индекса полидисперсности от продолжительности УФ-облучения

№	Продолжительность УФ-облучения, мин	Средний размер частиц, нм	Индекс полидисперсности
1	0	4077	0,382
2	15	4597	0,370
3	30	4798	0,394
4	45	5569	0,471
5	60	5740	0,443

Исходя из проанализированных данных о влиянии продолжительности УФ-облучения на средний размер частиц и индекс полидисперсности можно сделать вывод, что с увеличением времени воздействия агрегация частиц

возрастает.

Максимальные скачки размера частиц (таблица 1) происходят при первичном облучении и при преодолении рубежа в 45 мин и составляют 11,31% и 13,84% соответственно от предыдущего значения. При переходах от 15 минут к 30 и от 45 минут к 60 показатели растут на 4,19% и 2,98% соответственно. Тенденция изменений представлена на рисунке 4.

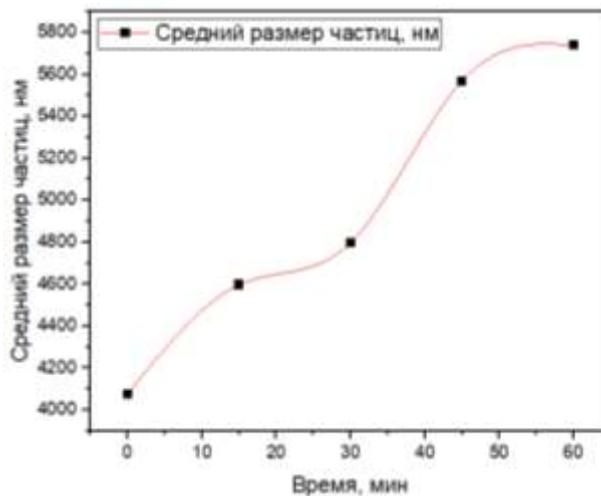


Рисунок 4 – Кривая зависимости среднего размера частиц (нм) от времени воздействия УФ-облучения (мин)

Индекс полидисперсности возрастал на промежутке от 15 минут до 45 минут и падал на первом этапе облучения – 15 минут, и на последнем – 60 минут. Тенденция изменений представлена на рисунке 5.

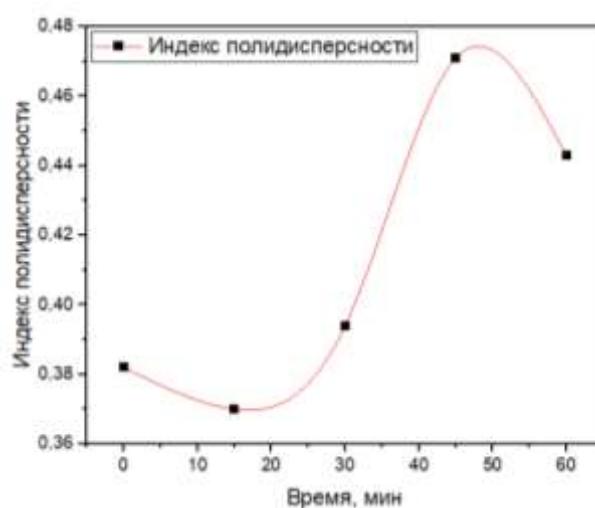


Рисунок 5 – Кривая зависимости индекса полидисперсности от времени воздействия УФ-облучения (мин)

Заключение. В ходе дипломной работы было проведено исследование воздействия УФ-облучения на полиэлектролитные микрокапсулы на основе ядра из неорганического соединения – карбоната кальция и последовательно нанесенных оболочек бычьего сывороточного альбумина и активного вещества – таниновой кислоты.

В ходе дипломной работы были выполнены следующие задачи:

- произведен анализ литературных данных и источников;
- изучен протокол получения минеральных твердых микронных пористых ядер;
- проведено последовательное покрытие полученных микроструктур оболочками таниновой кислоты и бычьего сывороточного альбумина для создания УФ-чувствительного покрытия на поверхности сферических частиц;
- произведено облучение полученных носителей УФ-излучением на протяжении 15, 30, 45 и 60 минут;
- выполнен анализ изменения распределения по размерам носителей до и после УФ-излучения.

В результате анализа была выявлена зависимость времени облучения от степени агрегации частиц, из которых последовали следующие выводы:

- наиболее эффективными оказались воздействия на протяжении 15 минут (11,31% от первоначального значения) и 45 минут (13,84% от предыдущего значения);
- наибольший рост индекса полидисперсности наблюдался во временном промежутке от 15 до 45 минут;
- по результатам произведенной работы и анализа полученных данных можно сделать вывод, что наиболее эффективным является воздействие УФ-облучением на протяжении 45 минут. При этом его возможно коррелировать в зависимости от конечных целей и ожидаемых результатов.

Знание аспектов внешних воздействий на полиэлектролитные микрокапсулы, в том числе УФ-излучения, очень важно. Исследования, направленные на это, могут помочь в понимании некоторых физиологических

процессов, проводить наблюдения, диагностику, что дает возможность выявлять на ранних стадиях различные патологии для дальнейшей своевременной терапии.

Список использованных источников

- 1 Бобина, А. В. Диагностика кислотно-основного состояния организма / А. В. Бобина, В. С. Хибатова, Н. А. Белоконова // Материалы 66-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием : сборник трудов конференции. – 2011. – Ч. 2. – С.76-78.
- 2 Бунева, В. Н. Биохимия / В. Н. Бунева. – Новосибирск : НГУ, 2005. – 130 с.
- 3 Бородина, Т. Н. Включение экстрактов лекарственных растений в биодеградируемые капсулы / Т. Н. Бородина, Л. Д. Румш, С. М. Кунижев, Г. Б. Сухоруков, Г. Н. Ворожцов, Б. М. Фельдман, А. В. Русанова, Т. В. Васильева, С. М. Струкова, Е. А. Маркевича // Биомедецинская химия. – 2007. – Т. 53. – С. 662-671.
- 4 Бородина, Т. Н. Полиэлектролитные микрокапсулы как системы доставки биологически активных веществ / Т. Н. Бородина, Л. Д. Румш, С. М. Кунижев, Г. Б. Сухоруков, Г. Н. Ворожцов, Б. М. Фельдман, Е. А. Маркевича // Биомедецинская химия. – 2007. – Т. 53. – С. 557-565.
- 5 Авдонин, П. В. Рецепторы и внутриклеточный кальций / П. В. Авдонин, В. А. Ткачук. – М. : Наука, 1994. – 288 с.
- 6 Вишневская, Т. М. Колориметрическое определение содержания кальция в сыворотке крови с помощью мурексид-кальциевого комплекса, фиксированного глицерином / Т. М. Вишневская, Т. И. Ляшевская // Лабораторное дело. – 1976. – № 7. – С. 144.
- 7 Канюков, В. Н. Методы исследований в биологии и медицине. / В. Н. Канюков, А. А. Стадников, О. М. Трубина, А. Д. Стрекаловская. – Оренбург : Б. и., 2013. – 192 с.

8 Sionkowska, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: review / A. Sionkowska // Progr. Polym. Sci. – 2011. – V. 36. – P. 1254-1276.

9 Kong, L. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds / L. Kong, Y. Gao, W. Cao, Y. Gong, N. Zhao, X. J. Zhang, // Biomed. Mater. Res. – 2005. – V. 75. – P. 275-282.

10 Ji, J. Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid / J. Ji, S. Hao, D. Wu, R. Huang, Y. Xu // Carbohydr. Polym. – 2011. – V. 85. – P. 803-808.

11 Madihally, S. V. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering / S. V. Madihally // Biomaterials. – 1999. – V. 20. – P. 1133-1142.

12 Kiechel, M. A. Non-covalent crosslinkers for electrospun chitosan fibers / M. A. Kiechel, C. L. Schauer // Carbohydr. Polym. – 2013. – V. 95. – P. 123-133.

13 Cowen, S. DRIFTS studies on the photodegradation of tannic acid as a model for HULIS in atmospheric aerosols / S. Cowen, H. A. Al-Abadleh // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2009. – V.11. – P. 7838-7847.

14 Fischbach, C. Does UV irradiation affect polymer properties relevant to tissue engineering / J. Tessmar, A. Lucke, E. Schnell, G. Schmeer, T. Blunk, A. Göpferich // Surf. Sci. – 2001. – V. 491. – P. 333-345.