

УДК 547.458

DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-2-21-25

**БАКТЕРИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА  
ДЛЯ ЗАЩИТЫ ИМПЛАНТАТОВ**

© М.А. Гусейнова, Е.В. Саломатина, Л.А. Смирнова, О.Н. Смирнова

В связи с повышенным травматизмом и возможным инфицированием раны в последнее время актуальной задачей является создание на поверхности имплантата биосовместимой защитной оболочки с антибактериальными свойствами. Одним из наиболее перспективных материалов в этой области представляется хитозан. В данном исследовании разработаны композиции на основе хитозана, обладающие бактерицидными свойствами, для использования их в качестве защиты титановых имплантатов от биообрастания. Проведена модификация хитозана антибиотиками, ионами и наночастицами серебра. Исследован процесс формирования защитной оболочки модифицированного хитозана на поверхности титановых пластин и ее свойства в зависимости от среднемолекулярной массы  $M_w$  хитозана, природы и концентрации кислоты. Методом решетчатого надреза изучена адгезионная прочность защитной оболочки к поверхности титановых пластин. Исследованы антибактериальные свойства покрытий по отношению к *Staphylococcus Aureus*. Покрытия на основе хитозана и его производных, содержащие ионы или наночастицы серебра, обладают более ярко выраженными бактерицидными свойствами по сравнению с композициями, содержащими антибиотики.

Ключевые слова: хитозан, имплантаты, ионы и наночастицы серебра, адгезионная прочность.

**Введение.** Травматизм был и остается одной из самых распространенных проблем нарушения костной ткани. В настоящее время ведутся интенсивные исследования по разработке имплантатов на основе биодеградируемых полимерных материалов как синтетических, так и природных. Однако на практике, особенно при объемных нарушениях костной ткани, широко используются имплантаты на основе титана и его сплавов благодаря их чрезвычайной легкости. При этом имеет место риск инфицирования и образования на поверхности имплантата биопленки. Это предполагает повторное хирургическое вмешательство по извлечению имплантата. Для лечения этих инфекций разрабатываются активные покрытия на поверхности имплантата, что является эффективной стратегией защиты ее от биообрастания, при этом необходимо длительное высвобождение антибактериальных препаратов.

В этой связи актуальной является задача создания защитной оболочки с антибактериальными свойствами на поверхности имплантата. Для ее создания наиболее широко используются защитные клеи на основе полиметилметакрилата с включением в его матрицу препарата гентамицина [1]. Однако полиметилметакрилат представляет собой синтетический небиодеградируемый полимер.

В матрицу необходимо преимущественно включать не синтетические материалы, а природные. Среди большого многообразия биополимеров особое место занимает природный полимер хитозан (ХТЗ). ХТЗ – один из наиболее перспективных природных биополимеров для тканевой инженерии, биосовместимых покрытий и доставки лекарственных препаратов.

Уникальность ХТЗ обусловлена широким спектром проявляемых им свойств, среди которых следует особо выделить биологическую активность, биосовместимость

ГУСЕЙНОВА Мария Арифовна, Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: MashaGuseinova@mail.ru  
САЛОМАТИНА Евгения Владимировна к.х.н., Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: salomatina\_ev@mail.ru  
СМИРНОВА Лариса Александровна – д.х.н., Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: smirnova\_la@mail.ru  
СМИРНОВА Ольга Николаевна – к.б.н., Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: biodeg@mail.ru

и биоразлагаемость, что исключает возможность его накопления в организме человека и окружающей среде. Это позволяет использовать ХТЗ в фармацевтической и пищевой промышленности, в медицине и косметологии [2–3].

ХТЗ не растворим в воде, но хорошо растворяется в водных растворах соляной и органических кислот (уксусной, аскорбиновой, а также дву- и трикарбонных кислот: лимонной, щавелевой и янтарной). Это связано с тем, что в кислых средах происходит протонирование первичных аминогрупп мономерного звена глюкозамина, в результате их диссоциации макромолекулы приобретают положительный заряд, одноименные заряды отталкиваются, конкурируя с взаимодействием между звеньями за счет водородных связей, что и обеспечивает растворимость ХТЗ.

Учитывая биологическую активность, биосовместимость и нетоксичность ХТЗ, основным стратегическим направлением его использования является фармация и медицина, которая предъявляет определенные требования по величине молекулярной массы (ММ) полимера [4]. Небольшие различия в молекулярном строении и дисперсности могут влиять на химические, физические и биологические свойства ХТЗ, и, следовательно, на эффективность его применения. Природное многообразие ХТЗ определяет необходимость контроля таких важных параметров, как молекулярный вес, степень деацетилирования и степень агрегации в растворах [5].

ХТЗ является мощным сорбентом природного происхождения, сорбирующая основа которого – хитин ракообразных. Кроме того, он способен связывать катионы, что особенно актуально в свете поставленной задачи создания бактерицидных покрытий. В качестве таковых могут быть использованы ионы серебра и золота, бактерицидные свойства которых известны с древнейших времен [6].

В настоящее время в лабораториях всего мира разрабатываются костные имплантаты на основе гидроксиапатита и органической составляющей, в качестве которой чаще всего используют полилактид – синтетический биоразлагаемый полимер [7–8]. Он не вызывает отторжение при имплантации, но продукты его ферментативного распада (молочная кислота,  $\text{CO}_2$ ) приводят к закислению в тканях организма и, как следствие, развитию локальных воспалительных процессов. Для преодоления этой

проблемы разрабатываются имплантаты на основе ХТЗ.

Разработка трансплантного средства по доставке лекарственных форм с пролонгированным действием является актуальной задачей. Благодаря антибактериальным свойствам ХТЗ, в настоящее время используется ХТЗ с внедренным в его матрицу гентамицином за счет комплексообразования [9].

Целью работы явилось создание защитных покрытий ХТЗ с бактерицидными свойствами на основе ионов или наночастиц серебра или антибиотиков. Обязательной составляющей исследования было изучение адгезионной прочности пленок ХТЗ к поверхности титановых пластин.

**Материалы и методы.** В работе использовали:

- ХТЗ марки пищевой (кислоторастворимый) ООО «Биопрогресс» г. Щелково Московской области: светло-кремовый порошок, без запаха, среднemasовая ММ –  $2.0 \cdot 10^5$ , СД – 85%, массовая доля влаги – 6.09%, массовая доля минеральных веществ 0.6%, массовая доля нерастворимых веществ – 0.08%, сорбционная активность по ионам меди – 58.7 мг/г, содержание основного вещества – 93.9%;

- ХТЗ марки пищевой ООО «Биопрогресс» г. Щелково Московской области: ММ –  $8.3 \cdot 10^4$ , СД – 82%, массовая доля влаги – 6%, массовая доля нерастворимых веществ – 0.1%, содержание основного вещества – 94%;

- уксусная кислота (УК) марки ХЧ АО «Химреактив» г. Нижний Новгород;

- титановые пластины;

- азотнокислое серебро марки ХЧ;

- антибиотик гентамицин.

**Результаты и их обсуждение. Влияние концентрации ХТЗ**

Пленки формировали из растворов ХТЗ в водных растворах УК формованием на поверхности титановых пластин с равномерным испарением растворителя.

Установлено, что при использовании 3% ХТЗ в водном растворе УК формование приводит к образованию хитозановой пленки на поверхности титановой пластины, которая после высушивания образца была неоднородной и с дефектами.

Провели серию опытов по формованию на титановых пластинах ХТЗ с концентрацией его

в интервале 1–3% в водном растворе УК. С уменьшением концентрации ХТЗ качество пленок только ухудшалось.

#### **Влияние среднemasовой молекулярной массы $M_w$ на качество покрытий**

Во всех описанных исследованиях использовали ХТЗ с ММ  $2.0 \cdot 10^5$ . При формовании 3% ХТЗ с ММ  $8.3 \cdot 10^4$  в водном растворе УК выявлено, что качество покрытий на титановых пластинах резко ухудшилось, на них были видны явные дефекты.

#### **Изучение адгезионной прочности покрытий**

Методом решетчатого надреза изучили адгезионную прочность покрытий. Помещали испытуемые титановые пластины на твердую поверхность, чтобы не допустить их деформации во время испытаний. Выполняли надрезы вручную. Наносили на покрытие несколько надрезов, после повторили указанную операцию под углом  $90^\circ$  к первоначальным надрезам для получения решетки с четко выраженными точками пересечения. Удалили кисточкой отслоившиеся покрытия с площади надрезов. Идентифицировали адгезионную прочность в соответствии с ГОСТ 31149-2014. Наилучшие показатели адгезионной прочности были выявлены в случае покрытий на титановых пластинах с ММ ХТЗ  $2.0 \cdot 10^5$ . Для этих образцов адгезионная прочность составила 0 баллов: края надрезов полностью гладкие, ни один из квадратов в решетке не отслоился. Увеличенная картина под микроскопом испытания адгезионной прочности представлена на рис. 1.

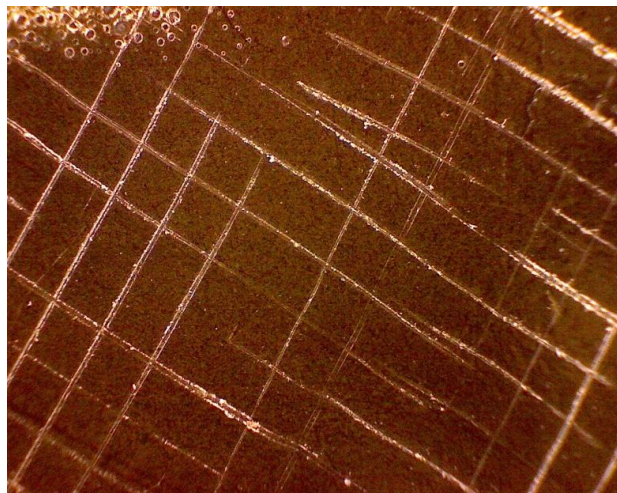


Рис. 1. Типичная картина представления адгезионной прочности под микроскопом

#### **Изучение антибактериальных свойств.**

Титановые пластины с ионами и наночастицами серебра, а также с антибиотиком были исследованы на бактерицидные свойства на примере бактерий *Staphylococcus Aureus*. Установлена высокая антибактериальная активность покрытия – радиус зоны ингибирования составлял 15 мм.

Наночастицы серебра формировали двумя подходами. Первый заключался в том, что наночастицы получали восстановлением ионов серебра из раствора, содержащего в качестве прекурсора азотнокислое серебро. После высыхания пленки подвергали механическому воздействию, в результате чего они отделялись. Второй подход основан на том, что титановые пластины с однородным покрытием на основе 3% ХТЗ в водном растворе УК с добавлением ионов серебра, которые по качеству и однородности значительно превышали пленки, полученные формованием из 3% ХТЗ в водном растворе УК с добавлением наночастиц серебра, были подвержены УФ-излучению для формирования наночастиц серебра. Подтверждением формирования наночастиц является полоса, обусловленная плазмонным поглощением наночастиц, в интервале 363–469 нанометров с максимумом поглощения 428 нанометров, представленная на рис. 2.

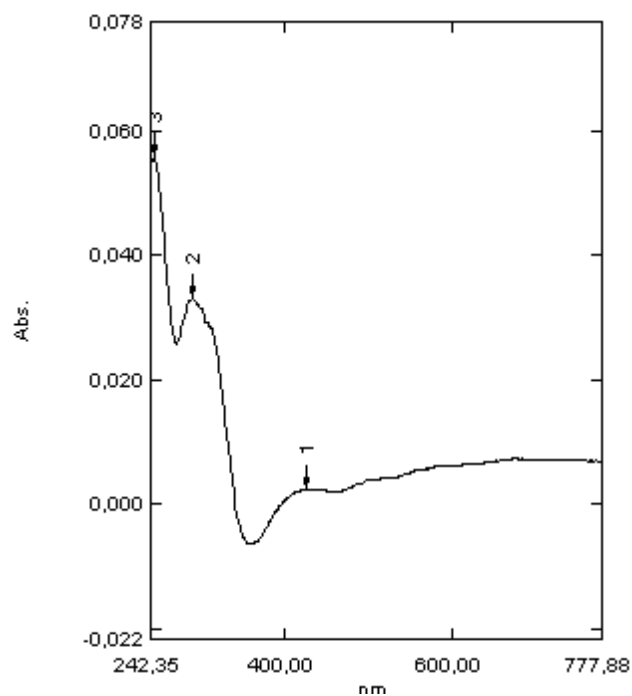


Рис. 2. Спектр поглощения наночастиц серебра

**Заключение.** Качество покрытий, полученных формированием ХТЗ на титановые пластины, зависит от концентрации макромолекул ХТЗ в растворе и ММ ХТЗ. Качественное покрытие с высокой однородностью и лучшая адгезионная прочность (0 баллов по ГОСТ 31149-2014) выявлены при ММ  $2.0 \cdot 10^5$ .

Пленки ХТЗ на титановых пластинах, содержащие как ионы серебра, так и наночастицы серебра, проявляют бактерицидные свойства. В случае ионов серебра – сильнобактерицидные свойства, наночастиц серебра – ингибирование составляет 90%. Покрытия на основе ХТЗ и его производных, содержащие ионы или наночастицы серебра, обладают более ярко выраженными бактерицидными свойствами по сравнению с композициями, содержащими антибиотики.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Науки и Высшего образования РФ в рамках проектной части государственного задания (№ 4.3760.2017/ПЧ).*

#### Литература

1. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И., Миронов П.В. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии: электрон. учеб. пособие. Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
2. Болгов А.А. Получение гомологов хитозана и его полимераналогичные превращения: автореф. дис. ... канд. хим. наук. М., 2009.
3. Simchi A., Pishbin F., Boccaccini A.R. Electro-phoretic deposition of chitosan // *Materials Letters*. 2009. V. 63, № 26. P. 2253–2256.
4. Ваел Шехта Метвалли Эльсайед. Наночастицы хитозана как носители биологически активных веществ: автореф. дис. ... канд. хим. наук. М., 2012.
5. Скрябин К.Г., Михайлов С.Н., Варламов В.П. Хитозан. М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 2013. 593 с.
6. Некрасов Б.В. Основы общей химии. М., 1973. Т. 3. С. 44, 52.
7. Фомин А.С., Комлев В.С., Баринов С.М., Фадеева И.В., Ренгини К. Синтез нанопорошков гидроксиапатита для медицинских применений // *Перспективные материалы*. 2006. № 2. С. 51.
8. Хэнч Л., Джонс Дж. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. М.: Техносфера, 2007. С. 304.
9. Кулиш Е.И., Мурзагильдина А.С., Мударисова Р.Х., Кузина Л.Г., Колесов С.В. Об особенностях

взаимодействия хитозана с антибиотиком гентамицином в уксусно-кислых растворах // *Вестник Башкирского университета*. 2012. Т. 17, № 1. С. 25–28.

10. Morris G.A., Castile J., Smith A., Adams G.G., Harding S.E. Macromolecular conformation of chitosan in dilute solution: A new global hydrodynamic approach // *Carbohydrate Polymers*. 2009. V. 76, № 4. P. 616–621.

11. Kozo O., Toshifumi Y., Kenji O. Three D structures of chitosan // *Int. J. Biol. Macromol.* 2004. V. 34, № 1–2. P. 1–8.

#### References

1. Volova T.G., Shishatskaya E.I., Mironov P.V. Materials for medicine, cellular and tissue engineering. Elektronnoe uchebnoe posobie. Krasnoyarsk, IPK SFU, 2009.
2. Bolgov A.A. Preparation of chitosan homologues and its polymer analogous conversions: PhD Thesis in Chemistry. M., 2009.
3. Simchi A., Pishbin F., Boccaccini A.R. Electro-phoretic deposition of chitosan. *Materials Letters*, 2009, vol. 63, no. 26, pp. 2253–2256.
4. Shehta Metwally El-Sayed. Chitosan nanoparticles as carriers for biologically active substances. PhD Thesis in Chemistry. Moscow, 2012.
5. Skryabin K.G., Mikhaylov S.N., Varlamov V.P. Chitosan. Moscow, Tsentr Bioinzheneriya RAN, 2013. 593 p.
6. Nekrasov B.V. Principles of general chemistry. Moscow, 1973, vol. 3, pp. 44, 52.
7. Fomin A.S., Komlev V.S., Barinov S.M., Fadeeva I.V., Rengini K. Synthesis of hydroxyapatite nanopowders for medicinal applications. *Perspektivnye materialy*, 2006, no. 2. 51 p.
8. Hench L., Jones J. Biomaterials, artificial organs and tissue engineering. Russian edition. Moscow, Tekhnosfera, 2007. 304 p.
9. Kulish E.I., Murzagildina A.S., Mudarisova R.Kh., Kuzina L.G., Kolesov S.N. On the features of chitosan interaction with heptamycin antibiotic in acetous solutions. *Vestnik Bashkirskogo universiteta*, 2012, vol. 17, no. 1, pp. 25–28
10. Morris G.A., Castile J., Smith A., Adams G.G., Harding S.E. Macromolecular conformation of chitosan in dilute solution: A new global hydrodynamic approach. *Carbohydrate Polymers*, 2009, vol. 76, no. 4, pp. 616–621.
11. Kozo O., Toshifumi Y., Kenji O. Three D structures of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2004, vol. 34, no. 1–2, pp. 1–8.



## THE BACTERICIDAL PROPERTIES OF CHITOSAN DERIVATIVES TO PROTECT IMPLANTS

© M.A. Guseinova, E.V. Salomatina, L.A. Smirnova, O.N. Smirnova

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,  
23, prospekt Gagarina, 603950, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Due to greater risks of injury and possible wound infection, an urgent task today is to create a biocompatible protective 'shell' layer with antibacterial properties for the application on the implant surface. One of the most promising materials in this respect is chitosan. In this study we have developed chitosan-based coatings with antibacterial properties to protect titanium implants from biofouling. Chitosan was modified with antibiotics, silver ions and silver nanoparticles. The research was focused on the formation process of the protective 'shell' layer made of modified chitosan on the surface of titanium plates and the coating properties depending on the average molecular weight ( $M_w$ ) of chitosan, and the nature and concentration of acid in aqueous solutions. The adhesion strength of the protective coatings on the surface of titanium plates was studied using the lattice incision method. Antibacterial properties of the coatings against *Staphylococcus aureus* were investigated. Coatings based on chitosan and its derivatives that contain silver ions or nanoparticles have more pronounced bactericidal properties as compared to compounds containing antibiotics.

Key words: chitosan, implants, silver ions and nanoparticles, adhesion strength.