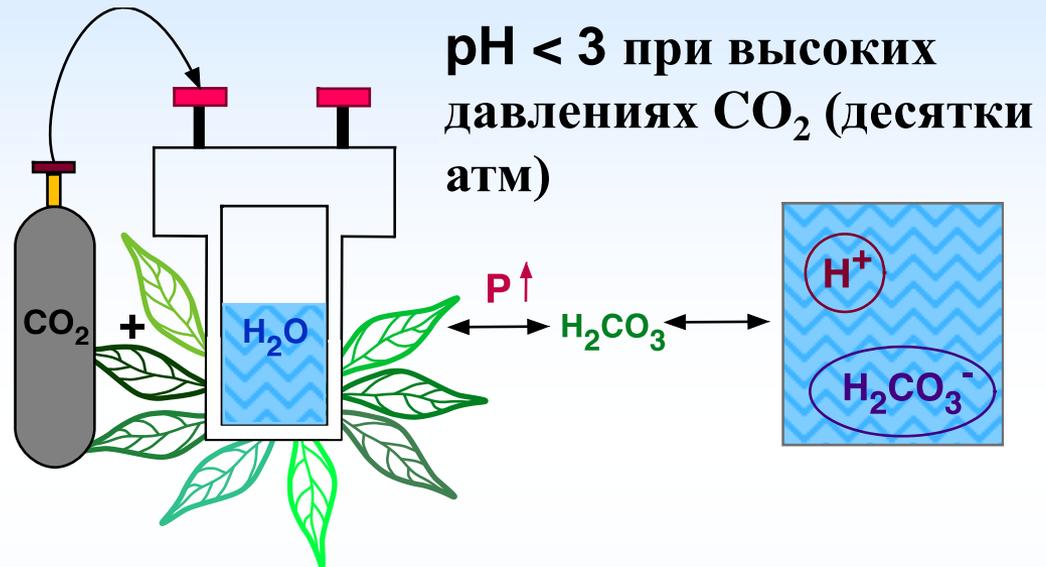
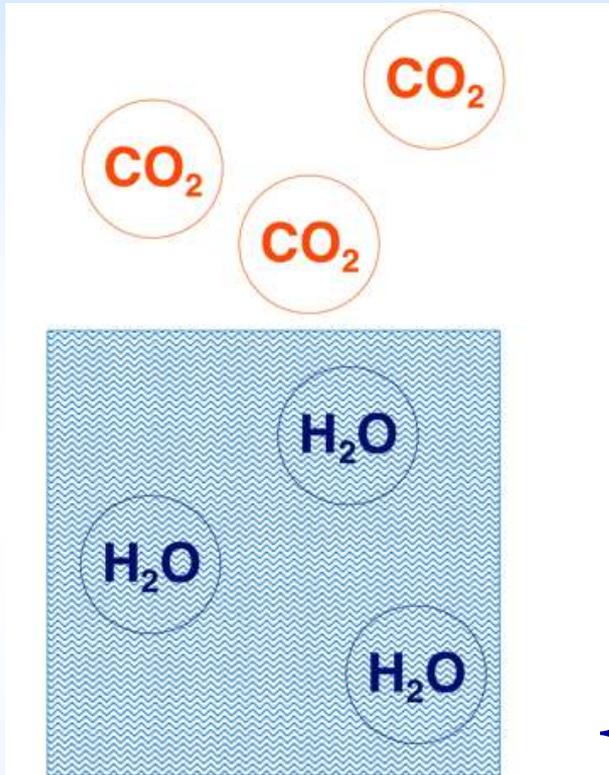


Бифазные системы с диоксидом углерода под давлением

Бифазные системы $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ под давлением



$\text{pH} < 3$ при высоких давлениях CO_2 (десятки атм)

- Биомедицинские приложения:
- ✧ Антимикробная активность
 - ✧ Абсолютная биосовместимость

Присутствие **угольной кислоты** в водной фазе такой системы позволяет растворять в ней некоторые полимеры, приобретающие свойства **поликатионов** в кислых средах

Бифазные системы $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ под давлением

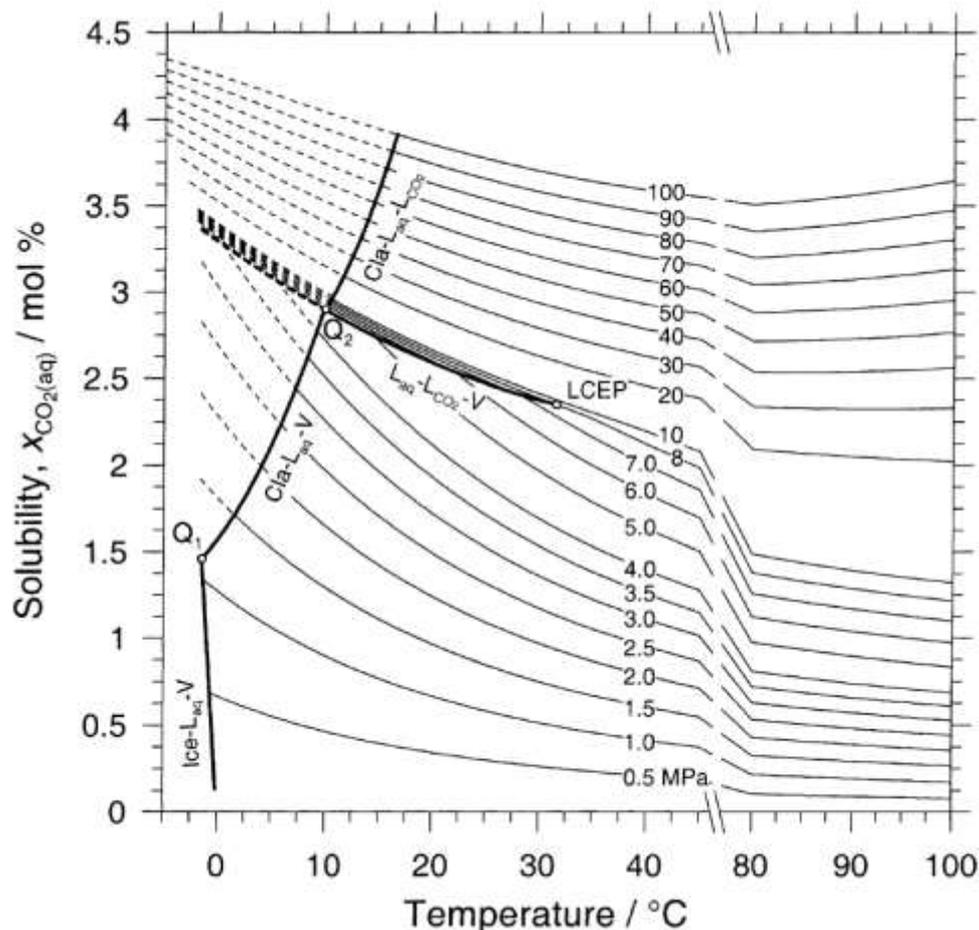
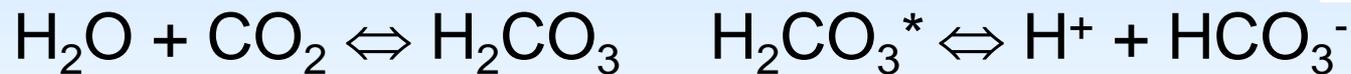
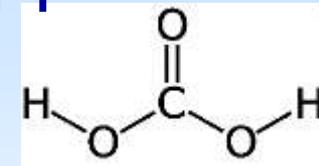
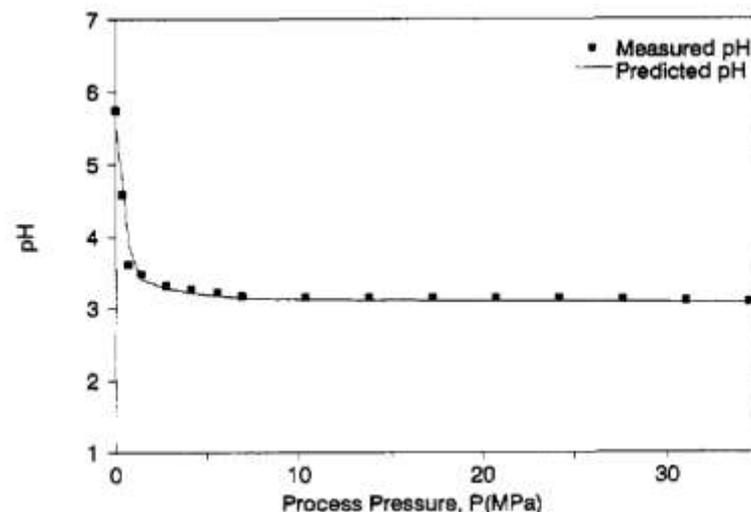
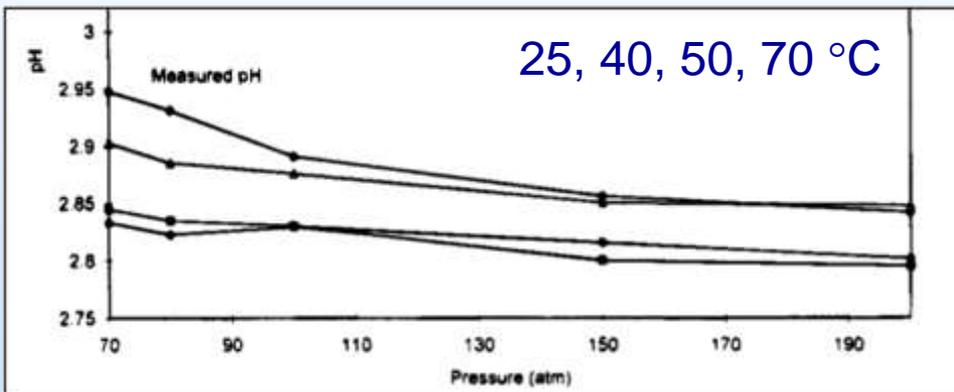
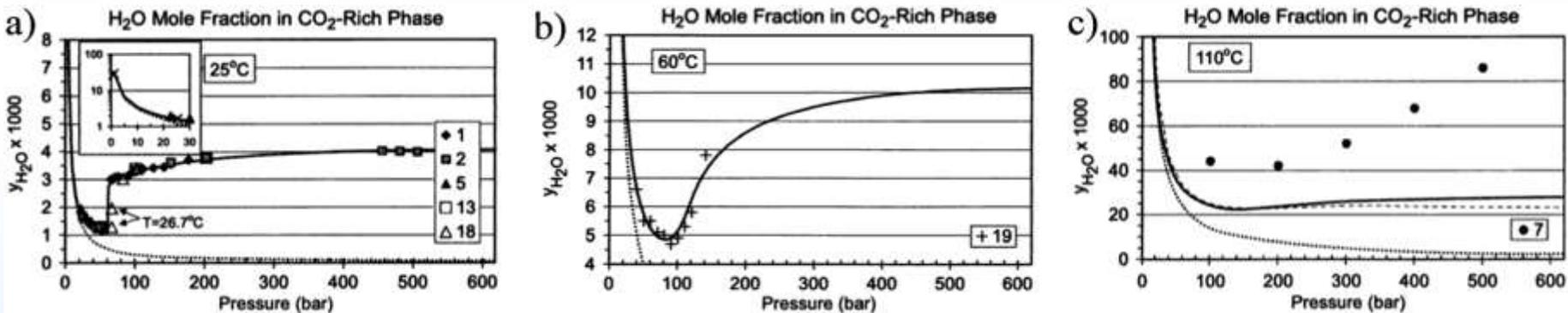
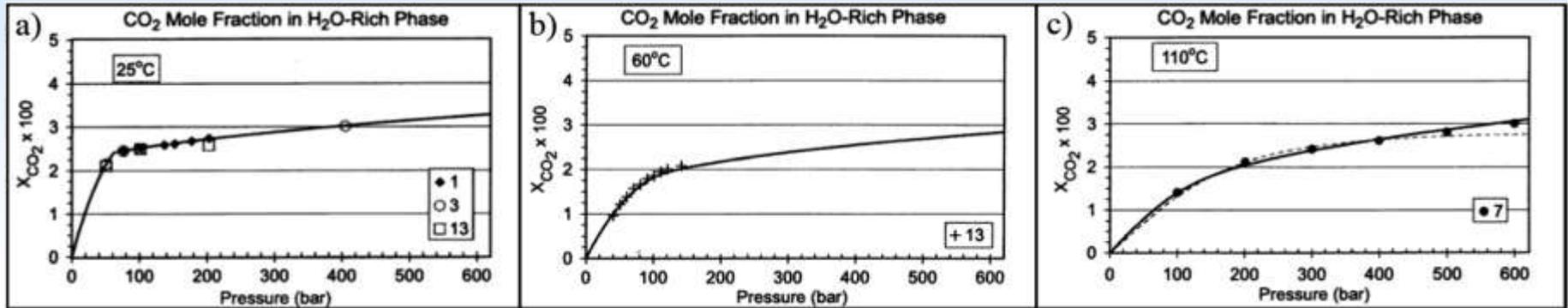


Table IV. Measured pH Values of the Water- CO_2 System at Different Process Temperatures

process pressure (P), MPa	measured pH at 32 $^\circ\text{C}$	measured pH at 37 $^\circ\text{C}$	measured pH at 42 $^\circ\text{C}$
0	5.68 \pm 0.04	5.70 \pm 0.14	5.80 \pm 0.00
0.690	3.55 \pm 0.01	3.57 \pm 0.01	3.66 \pm 0.01
1.379	3.42 \pm 0.00	3.44 \pm 0.00	3.51 \pm 0.01
2.069	3.35 \pm 0.01	3.36 \pm 0.01	3.42 \pm 0.00
2.758	3.30 \pm 0.01	3.29 \pm 0.01	3.33 \pm 0.01
4.137	3.23 \pm 0.00	3.23 \pm 0.01	3.26 \pm 0.00
5.516	3.19 \pm 0.00	3.20 \pm 0.01	3.24 \pm 0.01

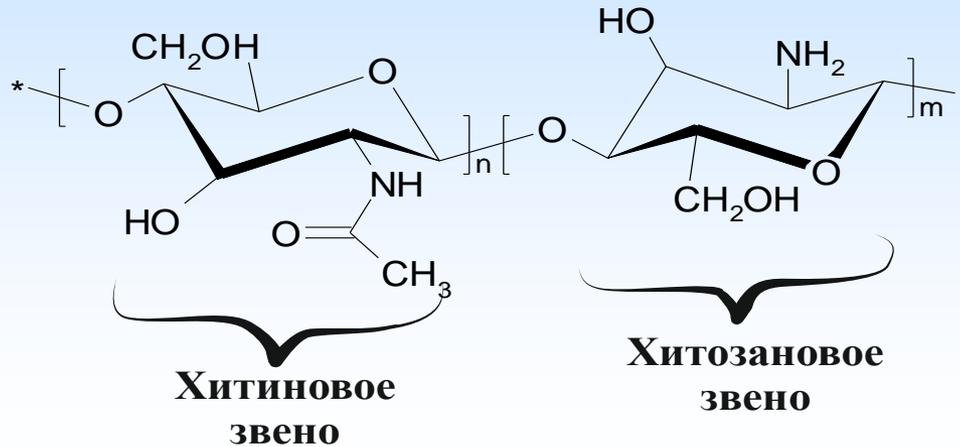


Бифазные системы $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ под давлением

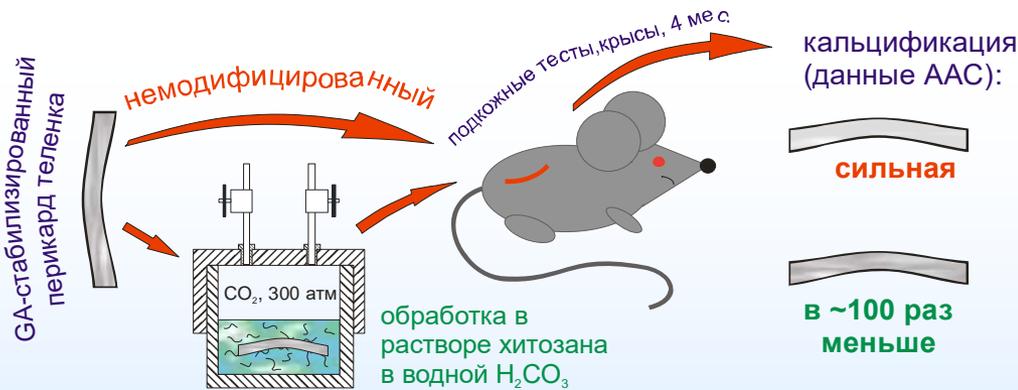


Водная фаза такой системы:
самонейтрализующаяся
кислая реакционная среда

Хитозан: растворимый поликатион в кислых водных средах (угольная кислота)



- ✓ Нетоксичен
- ✓ Биосовместим
- ✓ Антимикробная активность



х Агрегация в водных растворах обычных кислот

- ✓ Композиции из хитозана, приготовленные в присутствии угольной кислоты, перспективны для биомедицинских приложений

Протезы клапанов сердца



Центр сердечно-сосудистой хирургии
имени А.Н. Бакулева РАМН

- **Механические протезы**

- + Прочность
- + Долговечность
- Пожизненная антикоагулянтная терапия
- Влияние на трансклапанный поток крови
- Тромбоз, образование фистул, нарастание паннуса, сужение просвета, эндокардит,...

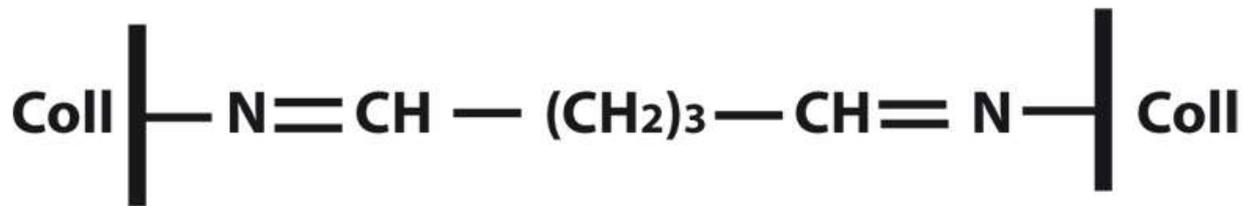
- **Протезы из биологических тканей (биопротезы)**

- + Не требуется антикоагулянтная терапия
- + По гемодинамическим характеристикам близки нативным
- Развитие тканевой дегенерации
- Кальцификация
- Срок службы 10–12 лет

ИЗ КАКОЙ БИОТКАНИ ИЗГОТАВЛИВАЮТ БИОПРОТЕЗЫ?

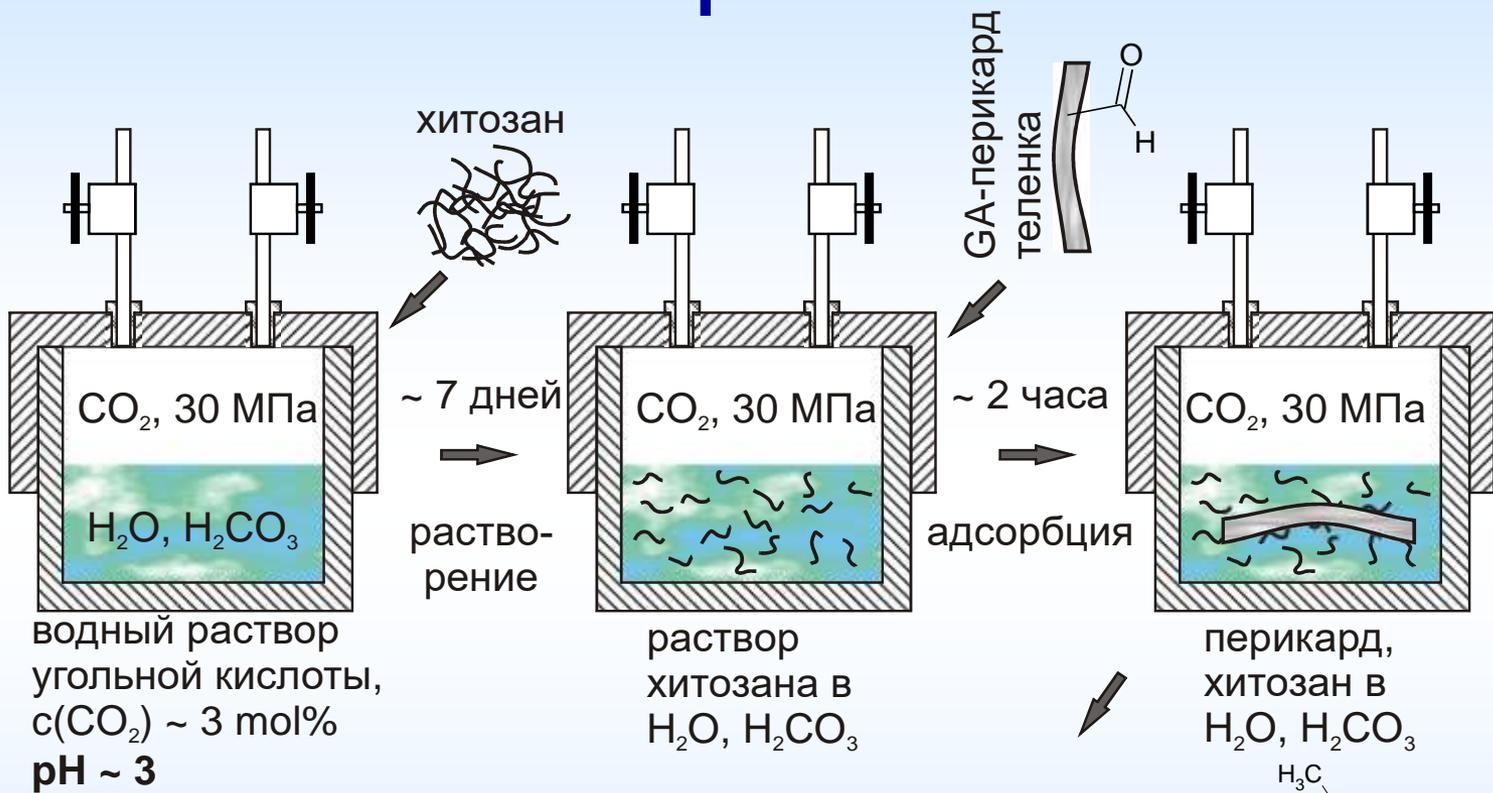
КСЕНОТКАНЬ: ТКАНЬ ЧУЖЕРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

- **Перикард** теленка/свиньи;
- Клапаны свиньи (аортальный, легочный, митральный)
- Ксеноткань обрабатывают химическими агентами, образующими ковалентные сшивки между белковыми макромолекулами внеклеточного матрикса – **коллагеном**, эластином и др.
- В качестве стабилизирующего сшивающего агента наиболее часто применяют глутаровый альдегид (ГА), достигая хороших **механических характеристик** ткани.

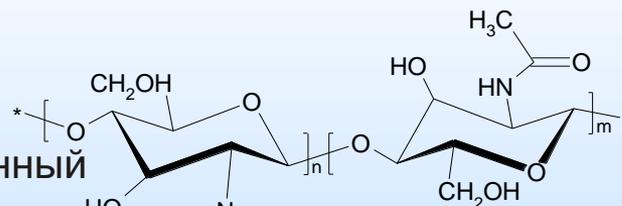


- НО! Такая обработка приводит к образованию на поверхности биоткани свободных альдегидных групп, потенцирующих **кальциноз и цитотоксичность**

Формирование хитозанового покрытия

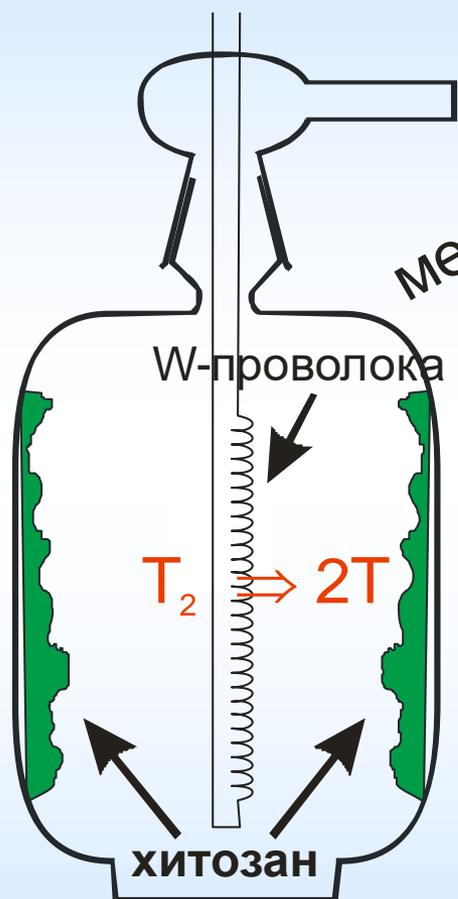


покрытый хитозаном
 GA-стабилизированный перикард телянка



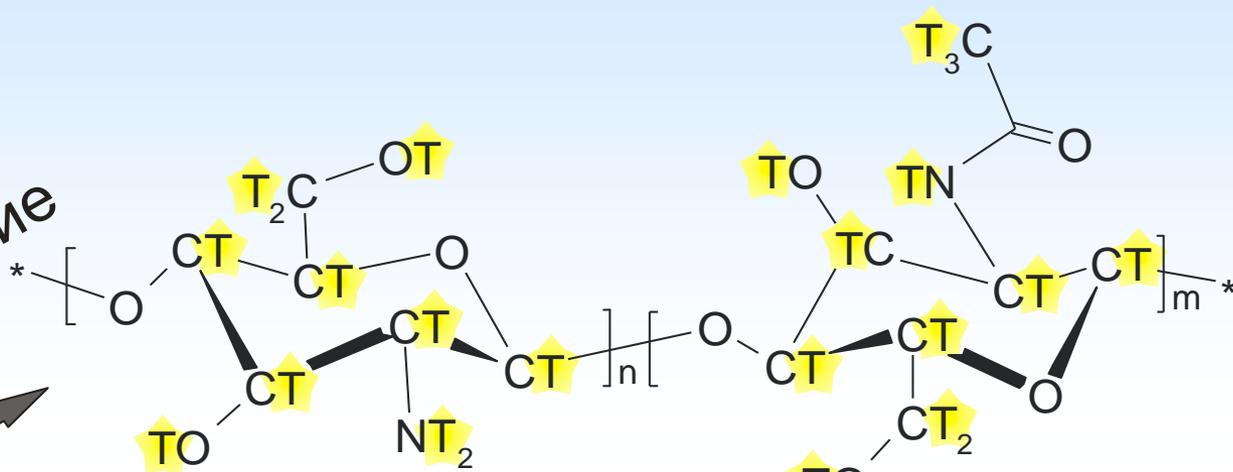
количество связанного хитозана ~ 1.0 wt%

Формирование тритиевой метки

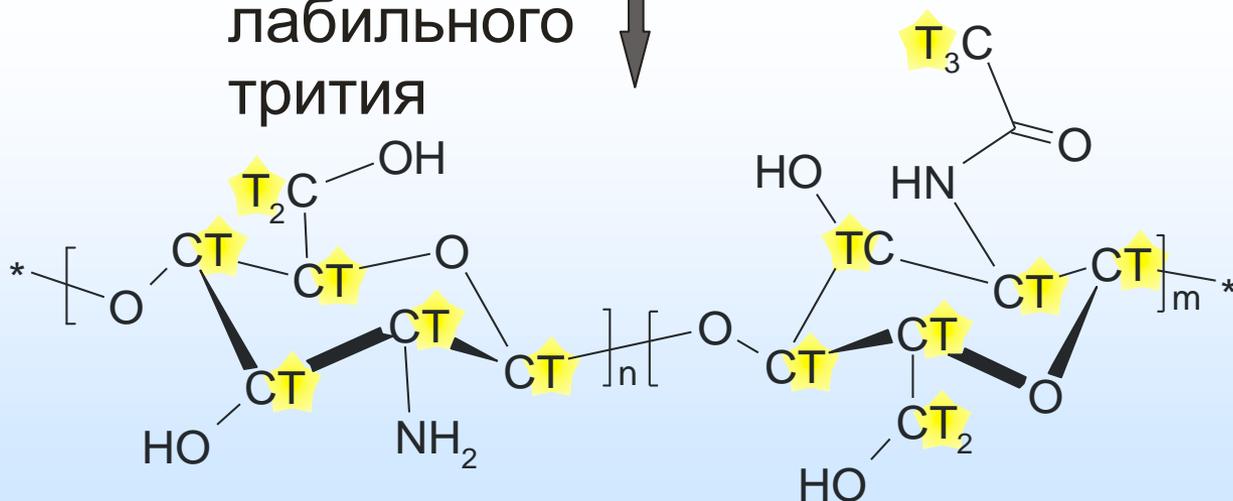


$$T(W) = 1940 \text{ K}$$

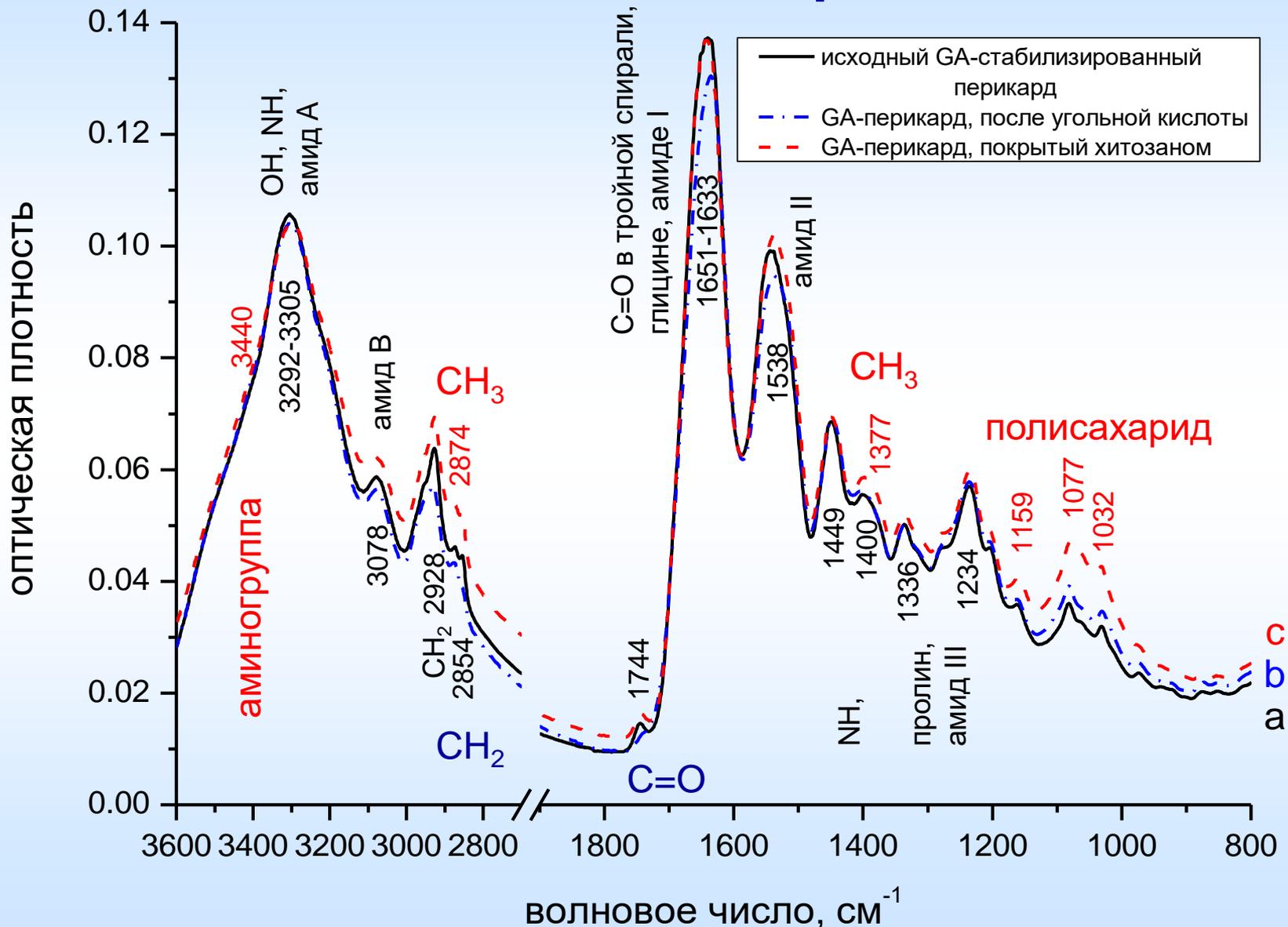
мечение



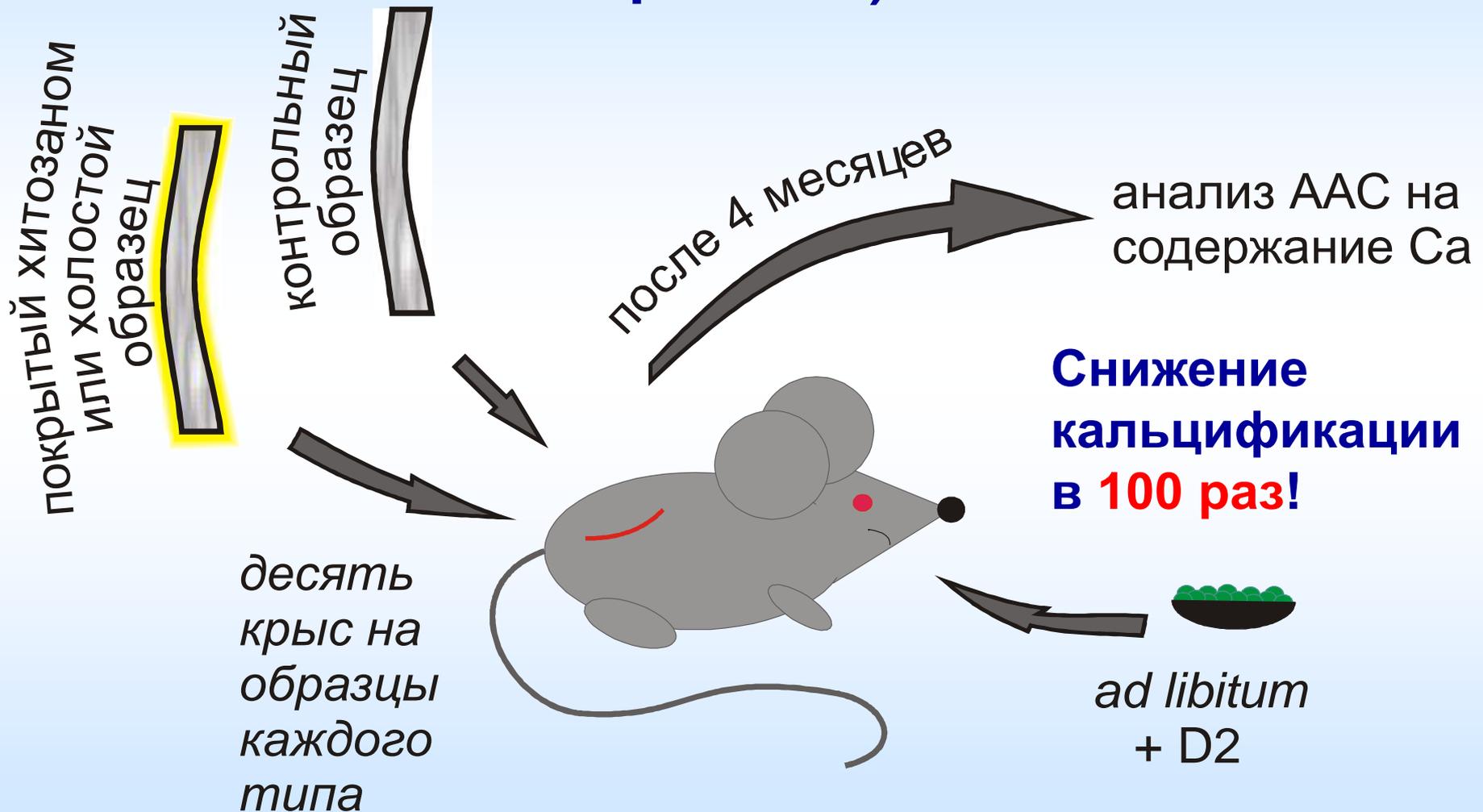
удаление
лабильного
трития



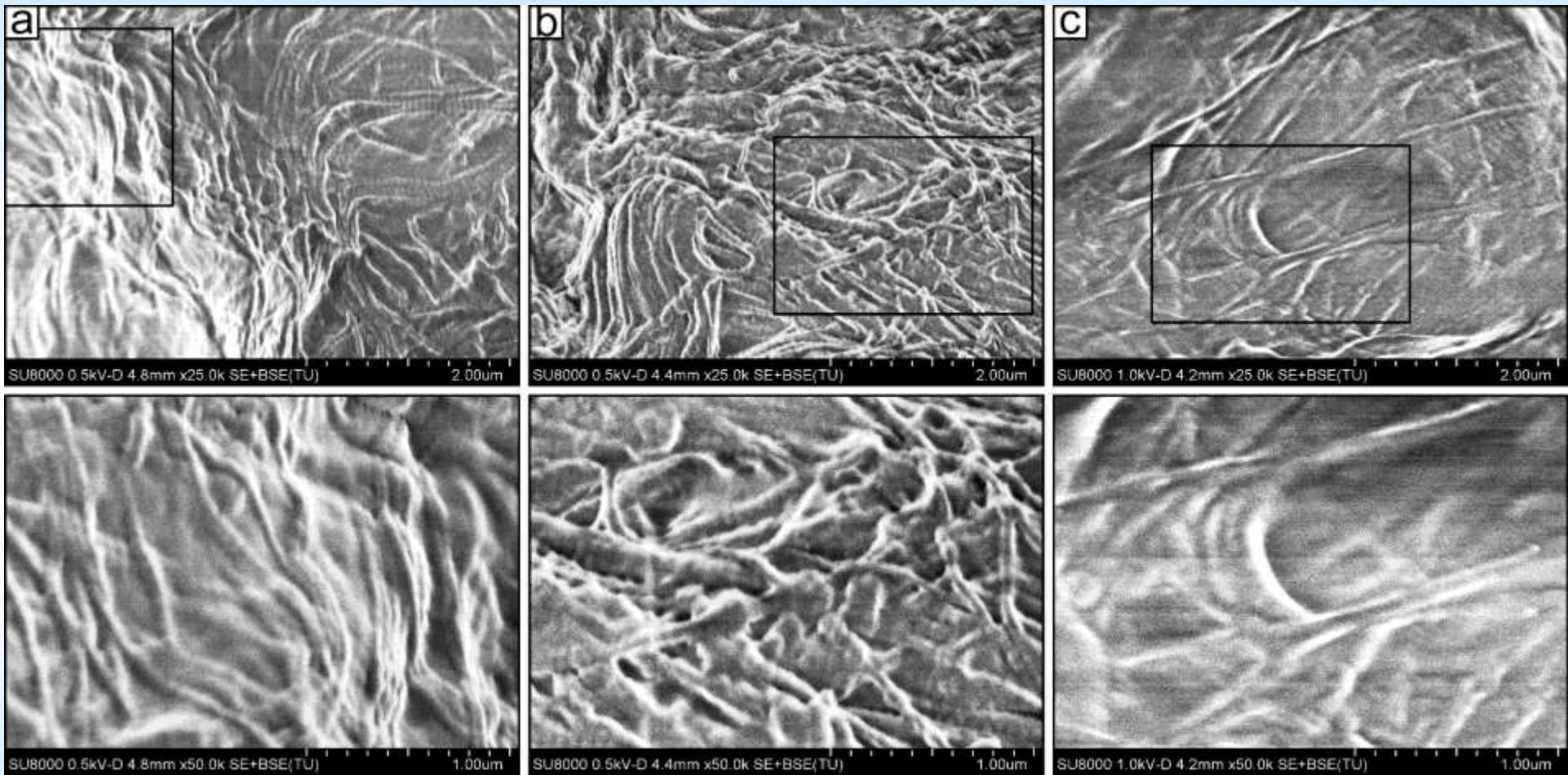
ИК НПВО спектроскопия



Тестирование *in vivo* (подкожно, крысы)



Морфология перикарда: анализ СЭМ



исходный, GA-стабилизированный

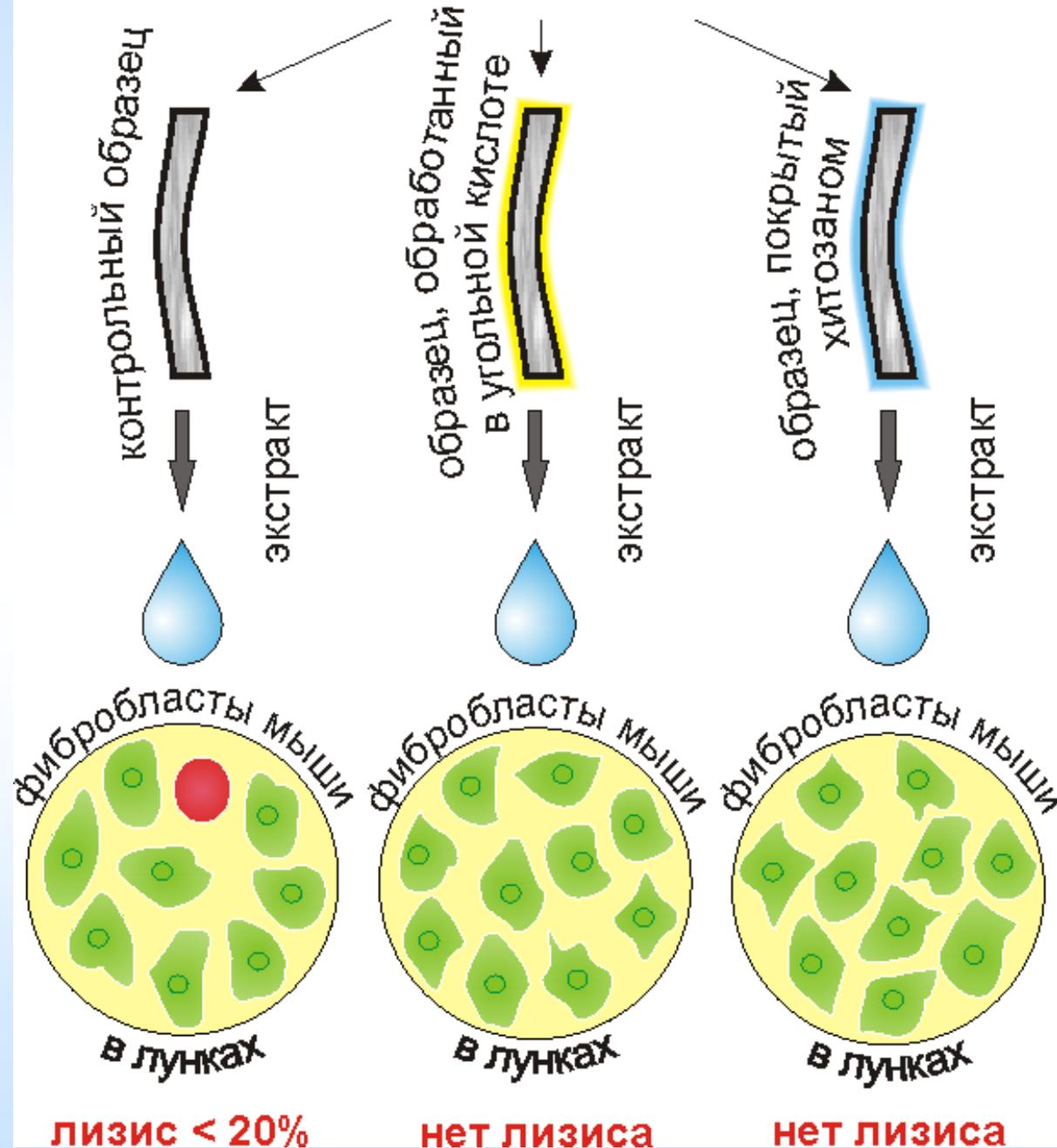
экспонир. в угольной к-те без хитозана

экспонир. в угольной к-те с хитозаном

Механические свойства перикарда

число образцов	предел прочности, σ_{ts} , МПа	деформация при разрыве, ε , %	модуль Юнга (нач.), E_{low} , МПа	модуль Юнга (кон.), E_{high} , МПа
<i>исходный перикард</i>				
40	: 15.1 ± 0.7	: 41 ± 2	: 5.7 ± 0.3	: 71 ± 1
40	⊥: 7.3 ± 0.4	⊥: 41 ± 1	⊥: 4.6 ± 0.2	⊥: 37 ± 1
<i>после угольной кислоты без хитозана</i>				
16	: 17 ± 3	: 46 ± 2	: 3.6 ± 1.2	: 57 ± 3
18	⊥: 9 ± 3	⊥: 41 ± 2	⊥: 2.9 ± 1.3	⊥: 33 ± 3
<i>после угольной кислоты с хитозаном</i>				
18	: 17 ± 3	: 62 ± 2	: 6.0 ± 1.2	: 41 ± 2
48	⊥: 7 ± 3	⊥: 42 ± 2	⊥: 4.7 ± 0.7	⊥: 23 ± 2

GA-стабилизированный перикард теленка

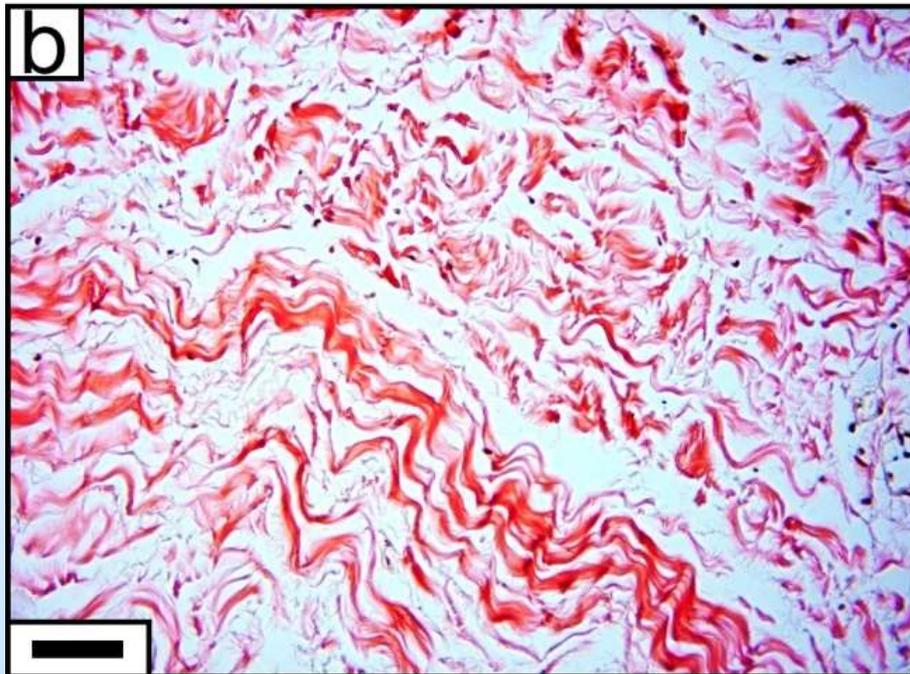
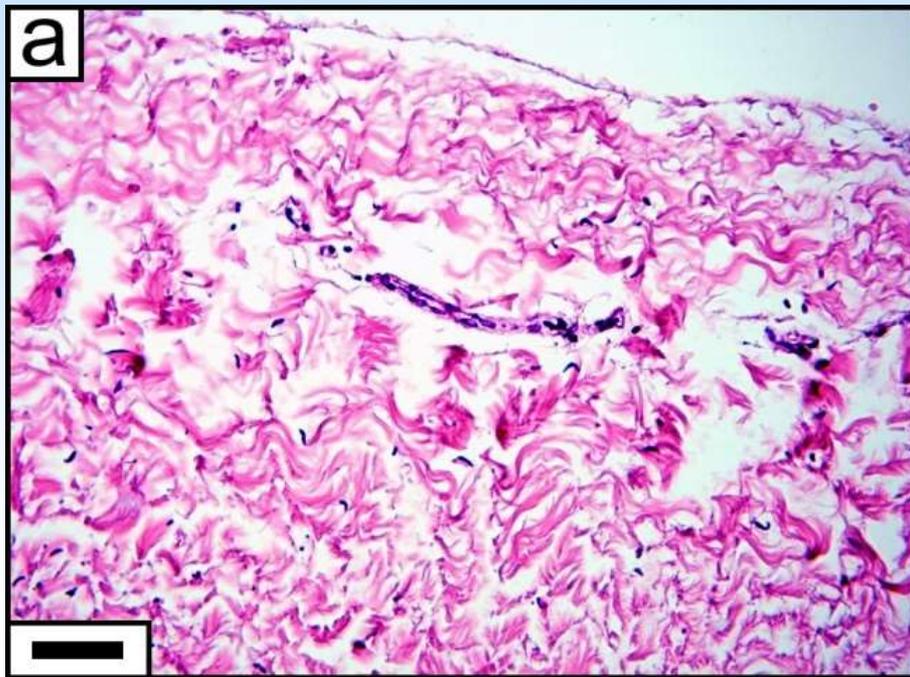


Тестирование на биосовместимость

экстракция / связывание остаточного ГА

Бактерицидные свойства (log КОЕ)

	грамположительные				грамотрицательные			
после	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>перикард с хитозаном, нанесенным из угольной кислоты</i>								
инокуляции	нет КОЕ	нет КОЕ	2.92 ± 0.02	2.85 ± 0.01	1.67 ± 0.05	3.46 ± 0.01	2.68 ± 0.01	1.70 ± 0.06
инкубации	нет КОЕ	нет КОЕ	2.93 ± 0.02	1.64 ± 0.03	0.95 ± 0.05	0.30 ± 0.04	нет КОЕ	нет КОЕ
<i>перикард, обработанный в угольной кислоте без хитозана</i>								
инокуляции	3.18 ± 0.01	3.74 ± 0.01	2.56 ± 0.03	2.53 ± 0.02	2.25 ± 0.03	1.92 ± 0.01	3.23 ± 0.01	1.40 ± 0.06
инкубации			2.59 ± 0.08			нет КОЕ	2.34 ± 0.04	нет КОЕ
<i>контроль: биосовместимая аллогенная ткань</i>								
инокуляции	~ 5	~ 5	~ 5	~ 5	~ 5	~ 5	~ 5	~ 5
инкубации	~ 5	~ 5	~ 5	~ 5	~ 5	~ 5	~ 5	~ 5



Гистологические исследования

Окраска гематоксилином/эозином (а) и по Ван Гизону (фуксин/пикрин. к-та) (b), оптическое увеличение 400×, размер кадра 500 × 376 мкм², масштабная линия 50 мкм

Организация коллагеновых фибрилл несущественно нарушена экспозицией в угольной кислоте и нанесением хитозана (о присутствии последнего может свидетельствовать несколько уменьшенная фуксинофилия)

Стабильность хитозанового покрытия *in vivo* (подкожно, крысы)

молекулярная масса хитозана, кДа	степень деацетилирования, %	растворимость в угольной кислоте, мг/мл	масса хитозана в матрице перикарда, мг	
			до <i>in vivo</i> эксперимента	после <i>in vivo</i> эксперимента
50	95	8 ± 2	0.047 ± 0.001	0.046 ± 0.014
100	97	3 ± 1	0.032 ± 0.002	0.033 ± 0.006
210	84	10 ± 2	0.109 ± 0.008	0.085 ± 0.011

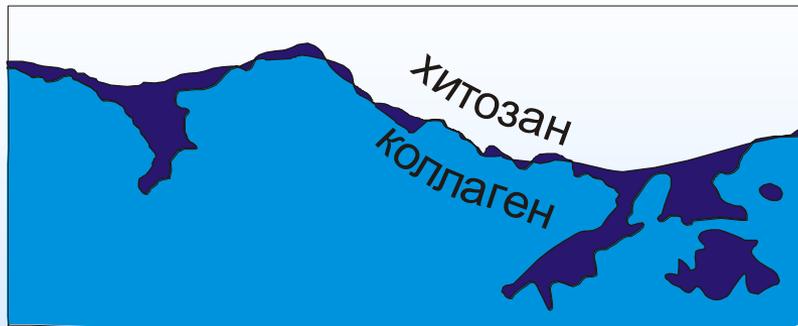
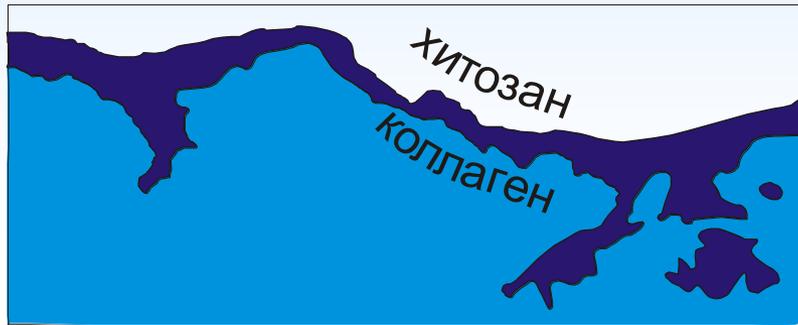
масса матрицы ~ 10.6 ± 1.4 мг

Детектировано методом тритиевой метки.

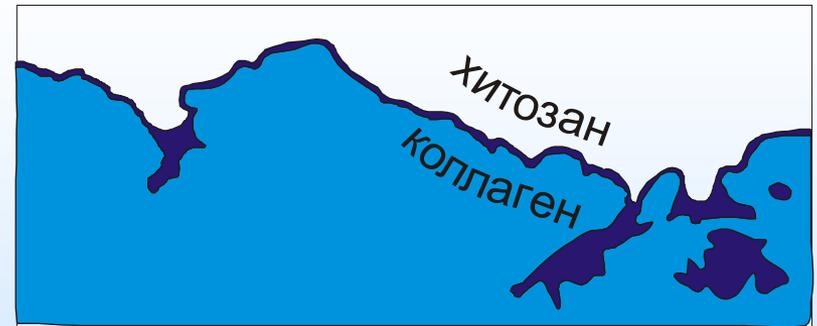
ANOVA: для хитозана-50 и хитозана-100 до и после *in vivo* эксперимента разница в количестве хитозана незначительна, для хитозана-210 – значительна (уменьшение)

Возможные сценарии резорбции хитозана

сценарий I

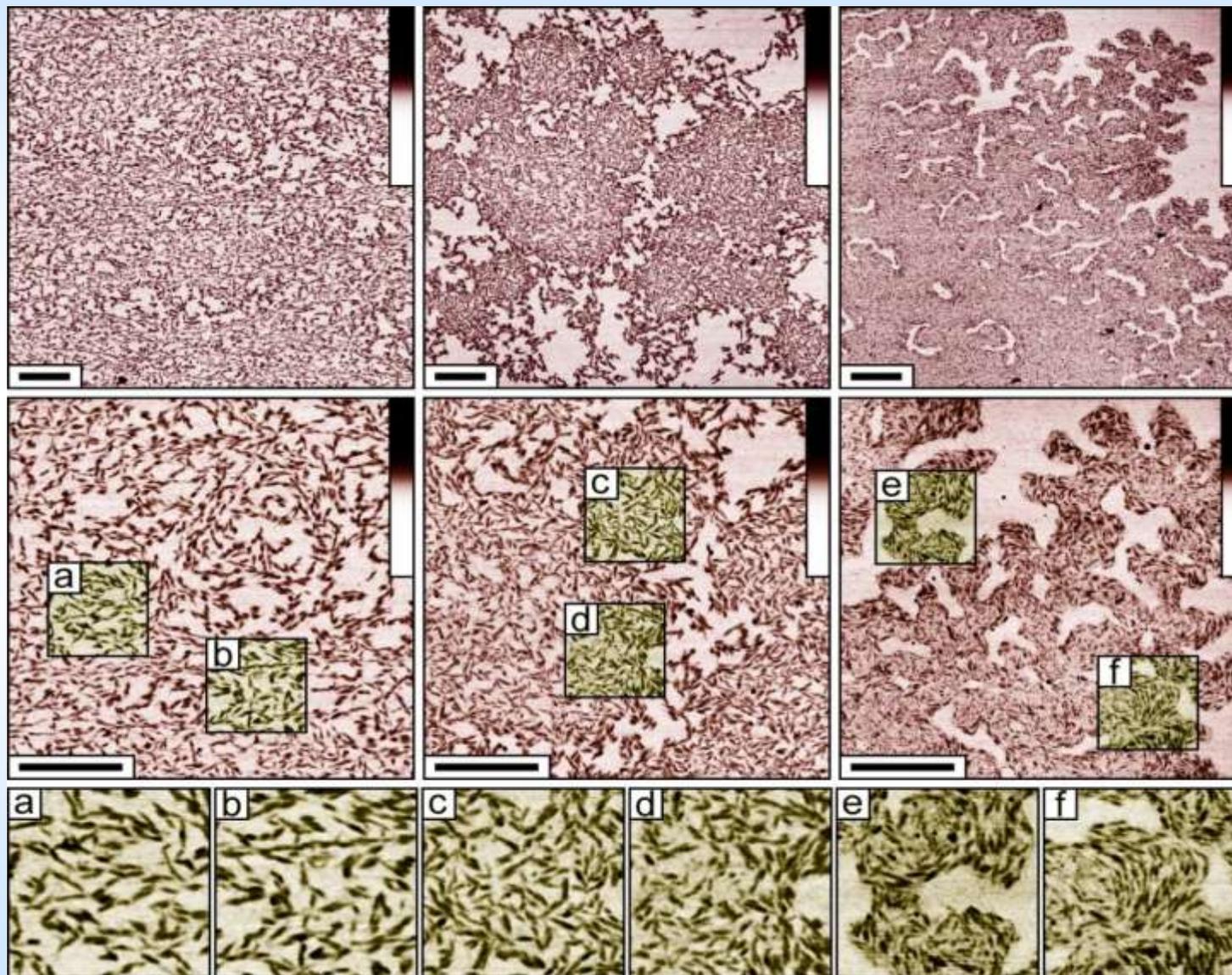


сценарий II



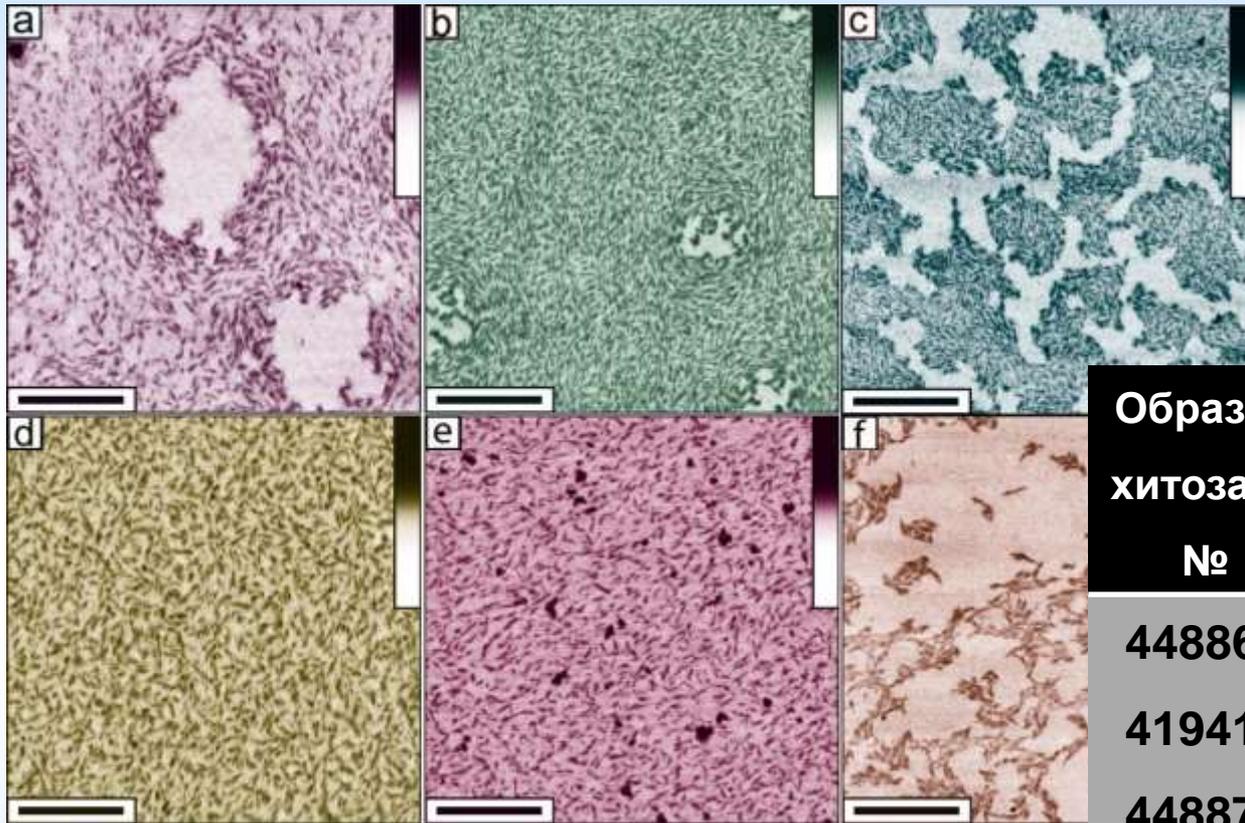
*вероятно, не подвергается резорбции хитозан,
ковалентно связанный (ГА) и/или находящийся в порах*

Морфология макромолекул хитозана в растворах угольной кислоты



АСМ изображения хитозановых наноструктур (степень деацетилирования 85%, молекулярная масса 194 кг/моль) на поверхности слюды, адсорбированных из растворов в угольной кислоте ($p(\text{CO}_2) = 300$ атм, $T = 24$ °С, C (хитозана) = 0,2 мг/мл). Размер кадра: верхний ряд: 4×4 мкм², средний ряд: 2×2 мкм², нижний ряд (a–f) – дополнительно увеличенные выделенные области, шкала высот: 10 нм, масштабная линия: 500 нм

Гипотеза о мономолекулярности хитозановых наноструктур



АСМ изображения **хитозановых наноструктур** на поверхности слюды, адсорбированных из раствора в **угольной кислоте** ($p(\text{CO}_2) = 300 \text{ атм}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $C(\text{хитозана}) = 0,2 \text{ мг/мл}$). Образцы различаются по молекулярной массе M_n и степени деацетилирования DD : а) 80 кг/моль, 84%, б) 130 кг/моль, 70%, с) 210 кг/моль, 70%, д) 240 кг/моль, 74%, е) 380 кг/моль, 67%, ф) 680 кг/моль, 74%. Размер кадра $2 \times 2 \text{ мкм}$, шкала высот: 10 нм, масштабная линия: 500 нм

Образец хитозана №	M_n , кг/моль	I , нМ	H , нМ	DD , %
448869	80	45	0,8	84
419419	150	35	0,6	70
448877	270	50	0,9	74
417963	320	35	0,7	70
с3646	320	35	0,7	67
48165	790	45	0,9	74

Возможная причина организации макромолекул хитозана в наноразмерные агрегаты в растворах угольной кислоты

$$\frac{(\varepsilon - 1)(2\varepsilon + 1)}{9\varepsilon} = \rho \frac{P_1 x_1 + P_2 x_2}{M_1 x_1 + M_2 x_2} \longrightarrow \varepsilon_{\text{H}_2\text{O}+\text{CO}_2} = 72$$

Уравнение Кирквуда

$$l_B = \frac{e^2}{\varepsilon_{\text{H}_2\text{O}+\text{CO}_2} k_B T}$$

Маннинговская конденсация противоионов:

$$\xi = \frac{l_B f}{b} > 1$$

l_B (в угольной кислоте) = 7.8 Å – длина Бьеррума, b – длина мономерного звена макромолекулы хитозана, f – доля заряженных звеньев



В нашем случае: $\xi \approx 1.4$

Предлагаемая схема «сигарообразного» наноагрегата, состоящего из нескольких макромолекул хитозана, в растворах угольной кислоты.

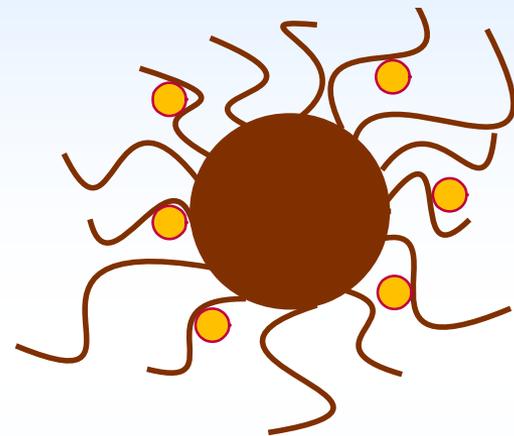
Использование описанных выше систем для стабилизации металлических наночастиц

- Стабилизация с помощью:



Полимеров
(**хитозан**)

✓ МЕДИЦИНА

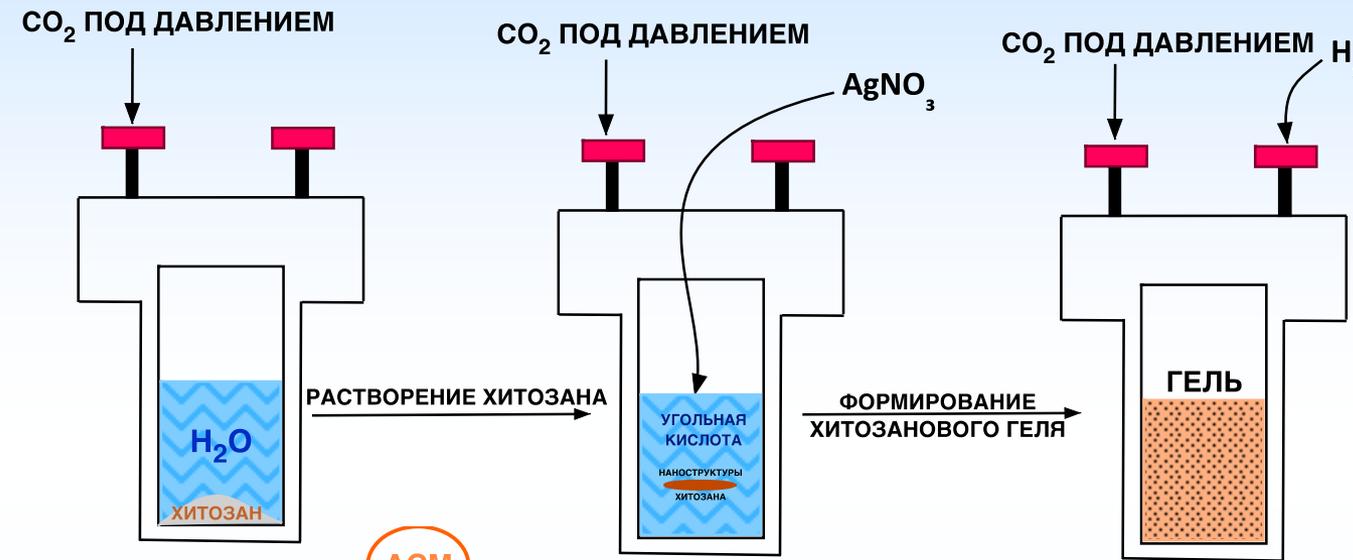


Сополимеров
(**ПС-блок-П4ВП**)

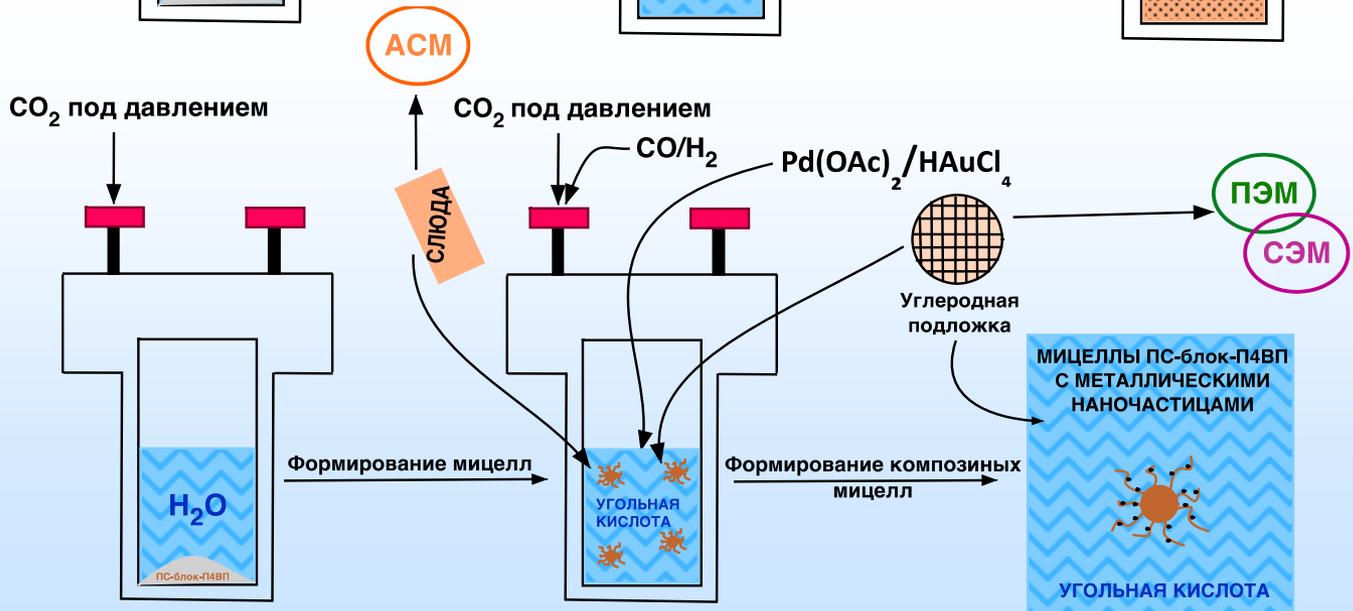
✓ КАТАЛИЗ

✓ Стабилизация металлических **наночастиц** с помощью поликатионов в растворах **угольной кислоты**

Растворение полимеров в угольной кислоте и стабилизация металлических наночастиц

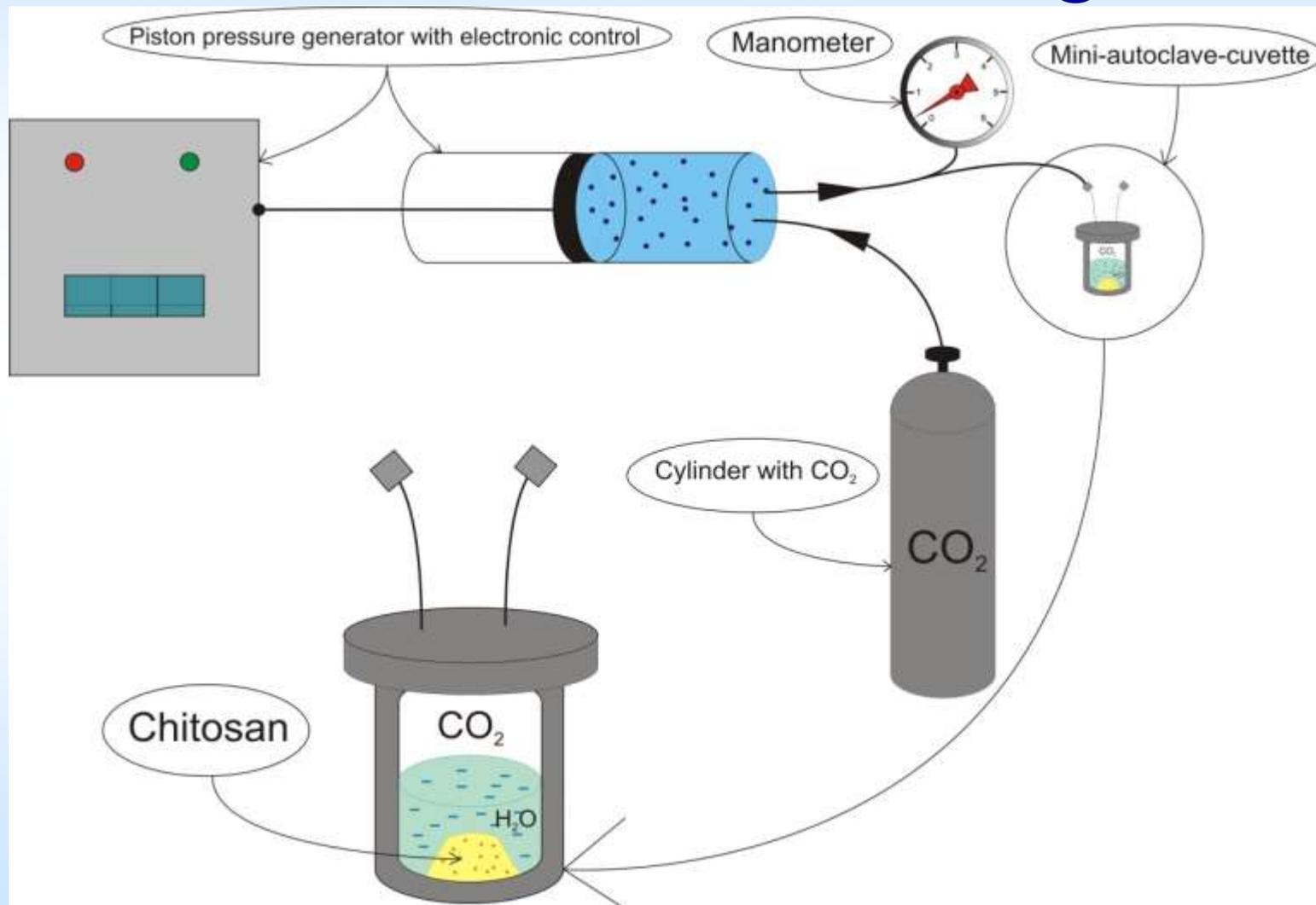


Хитозан, H_2O ,
 300 атм CO_2 , 25
 $^\circ\text{C}$,
 + AgNO_3
 + 10 атм H_2

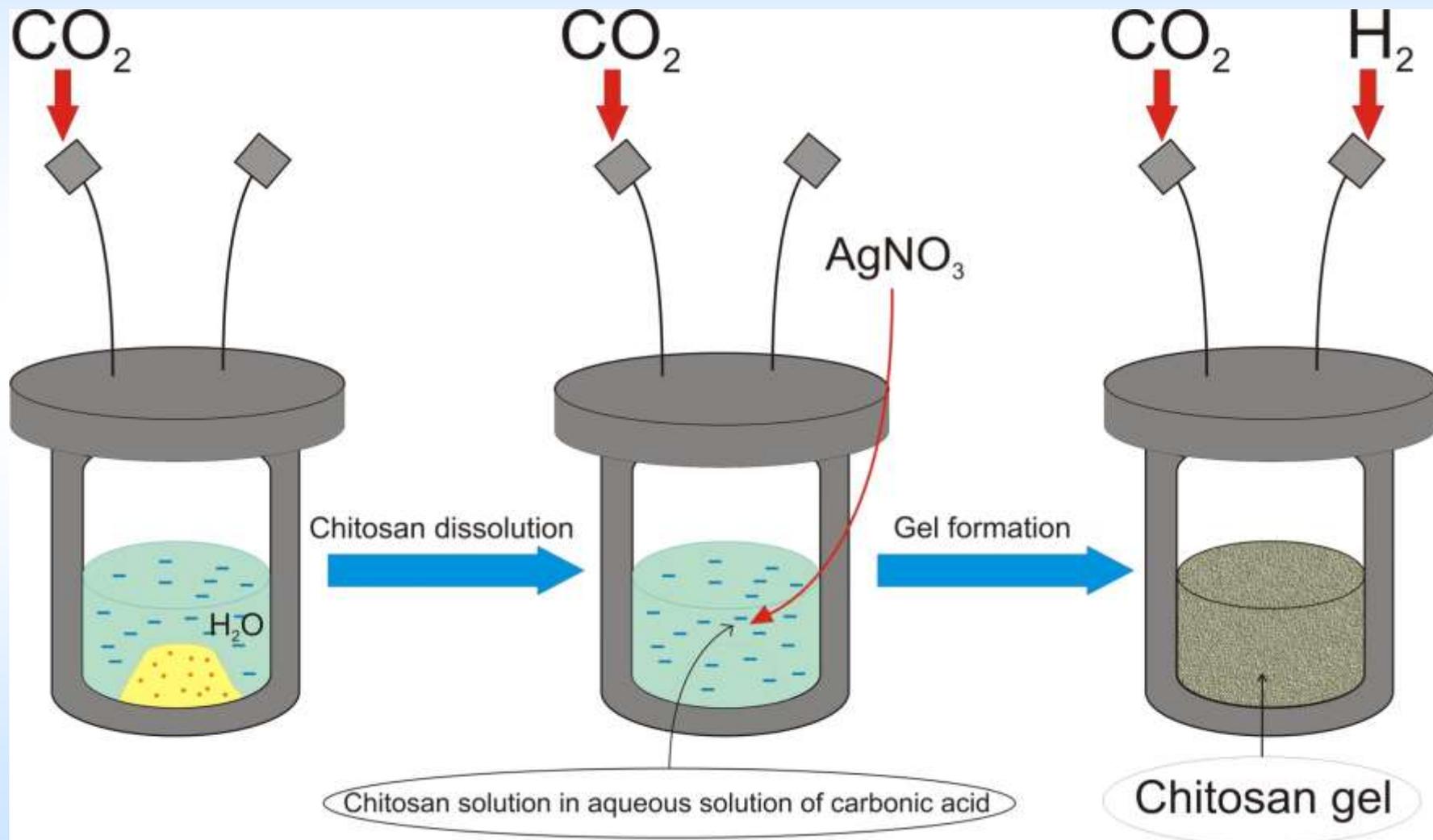


ПС-блок-П4ВП,
 H_2O , 300 атм CO_2 ,
 25 $^\circ\text{C}$,
 + $\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{HAuCl}_4$,
 + 1 атм $\text{CO}/10$ атм
 H_2

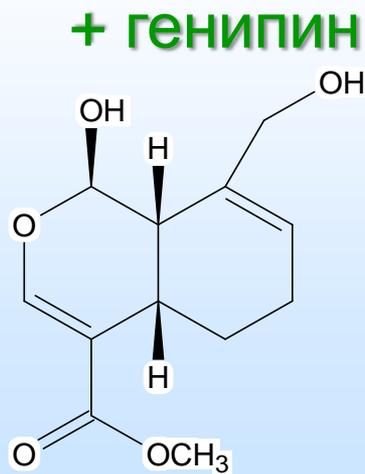
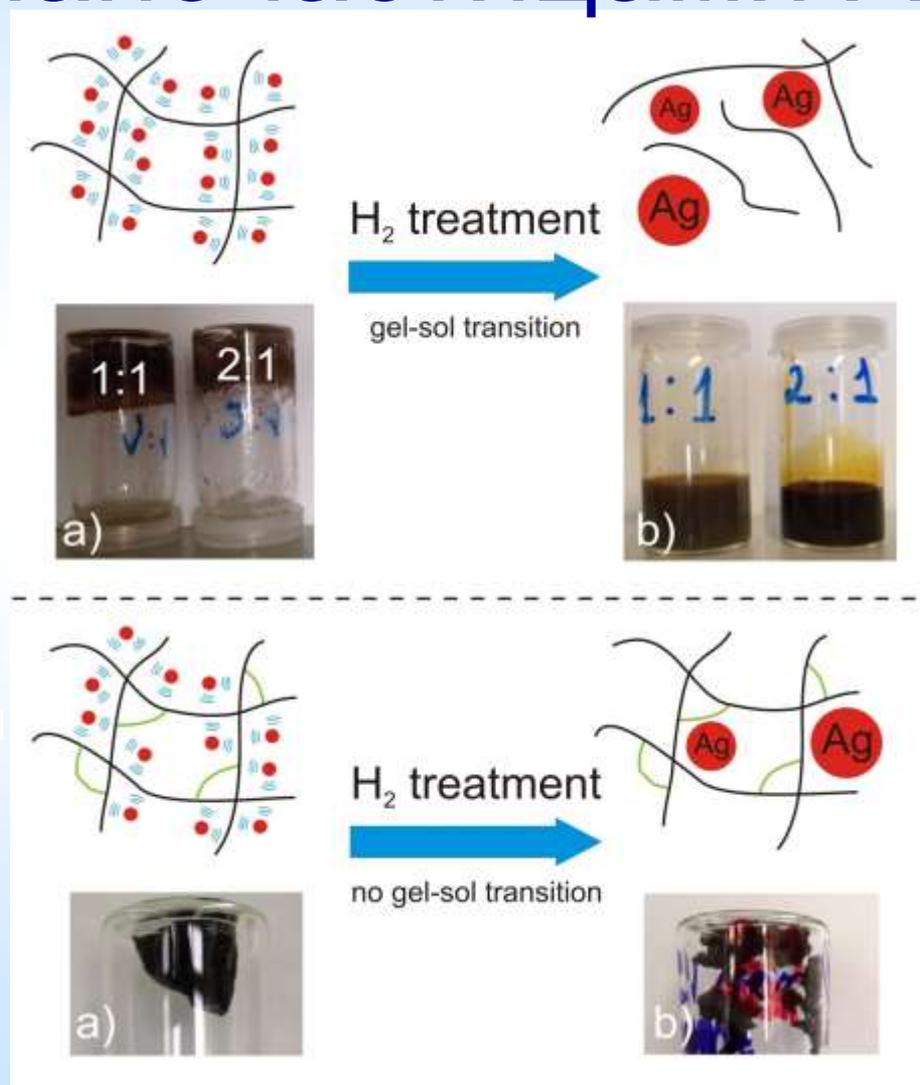
Композиты хитозана с наночастицами Ag



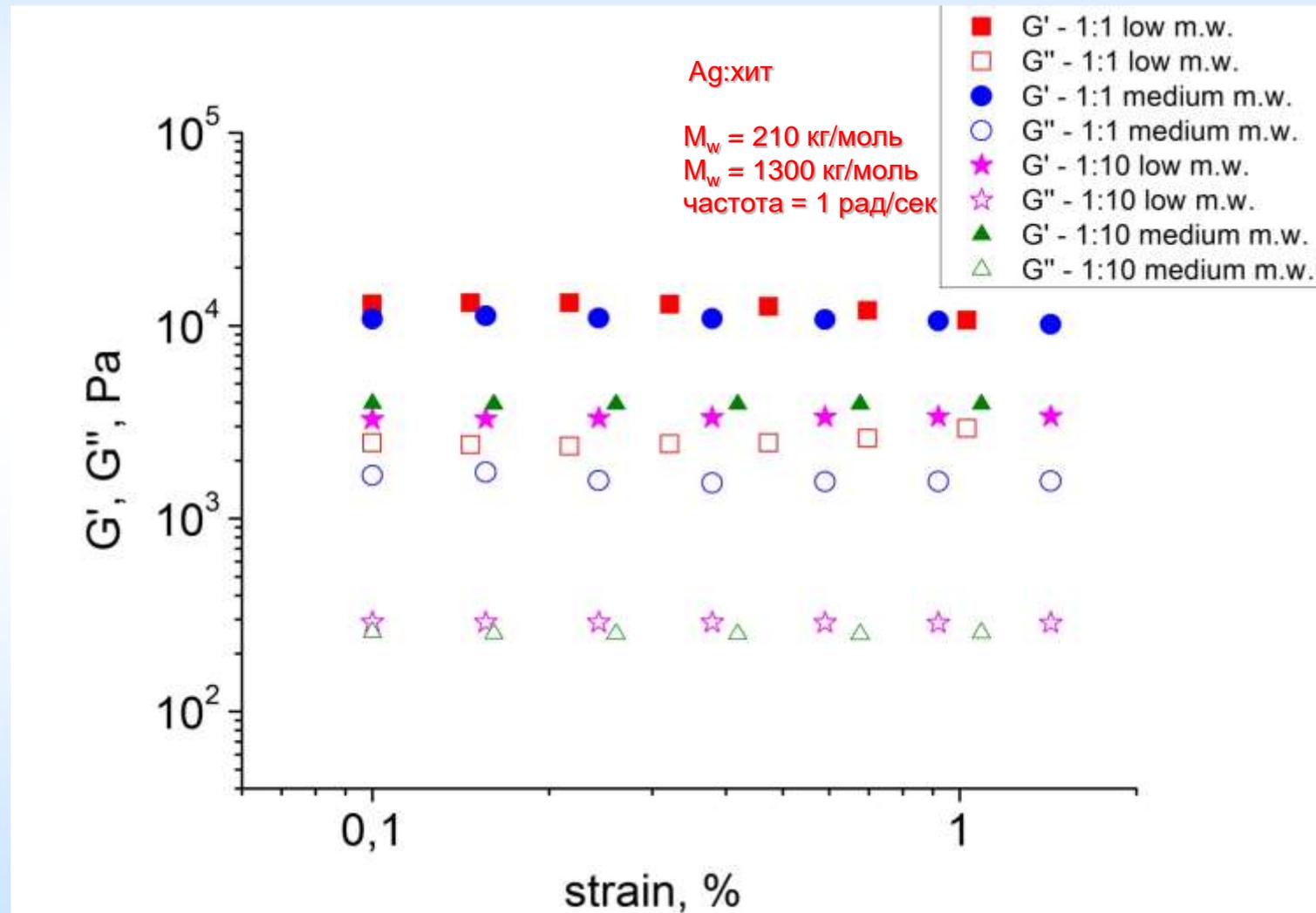
Композиты хитозана с наночастицами Ag



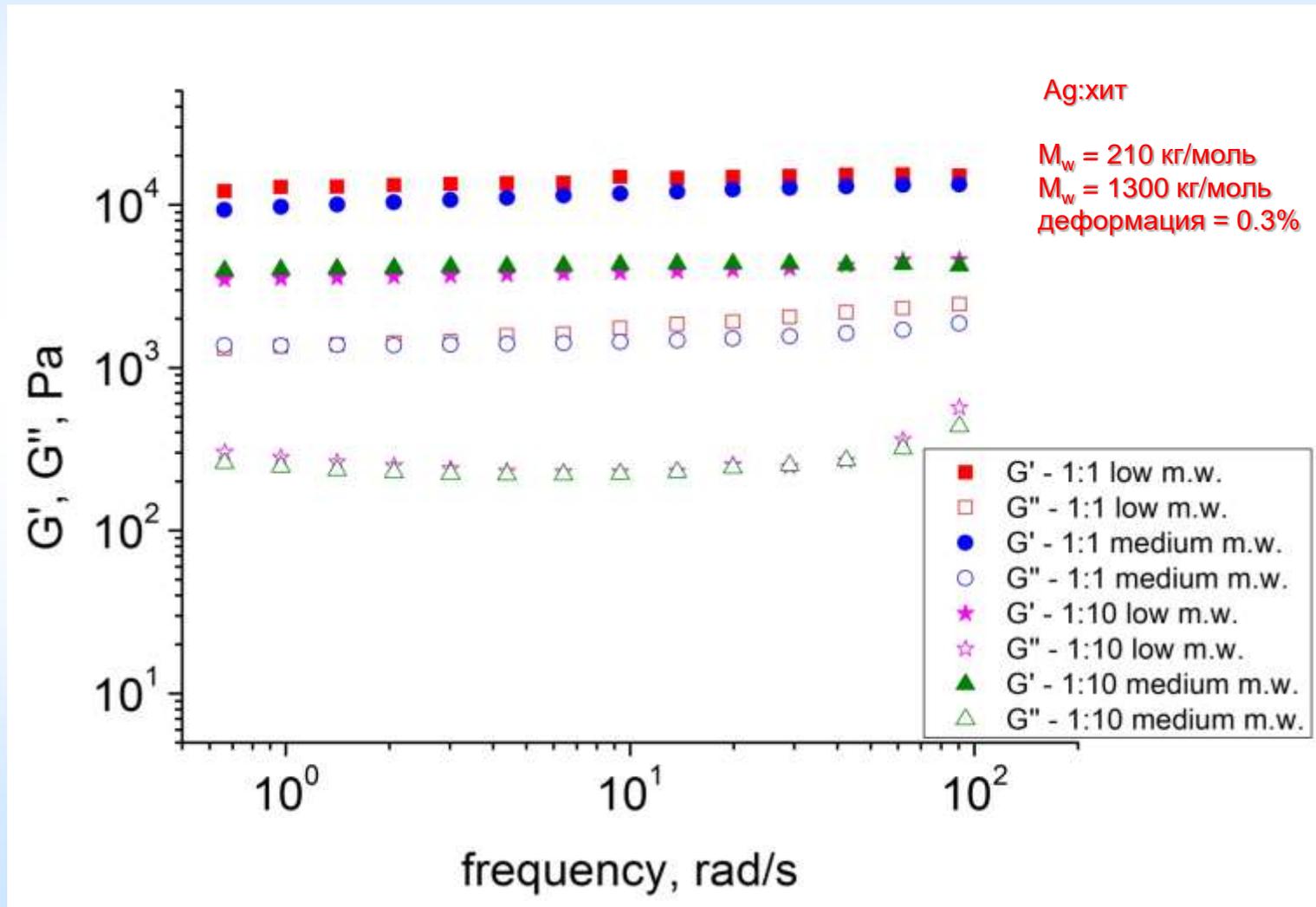
Композиты хитозана с наночастицами Ag



Композиты хитозана с наночастицами Ag

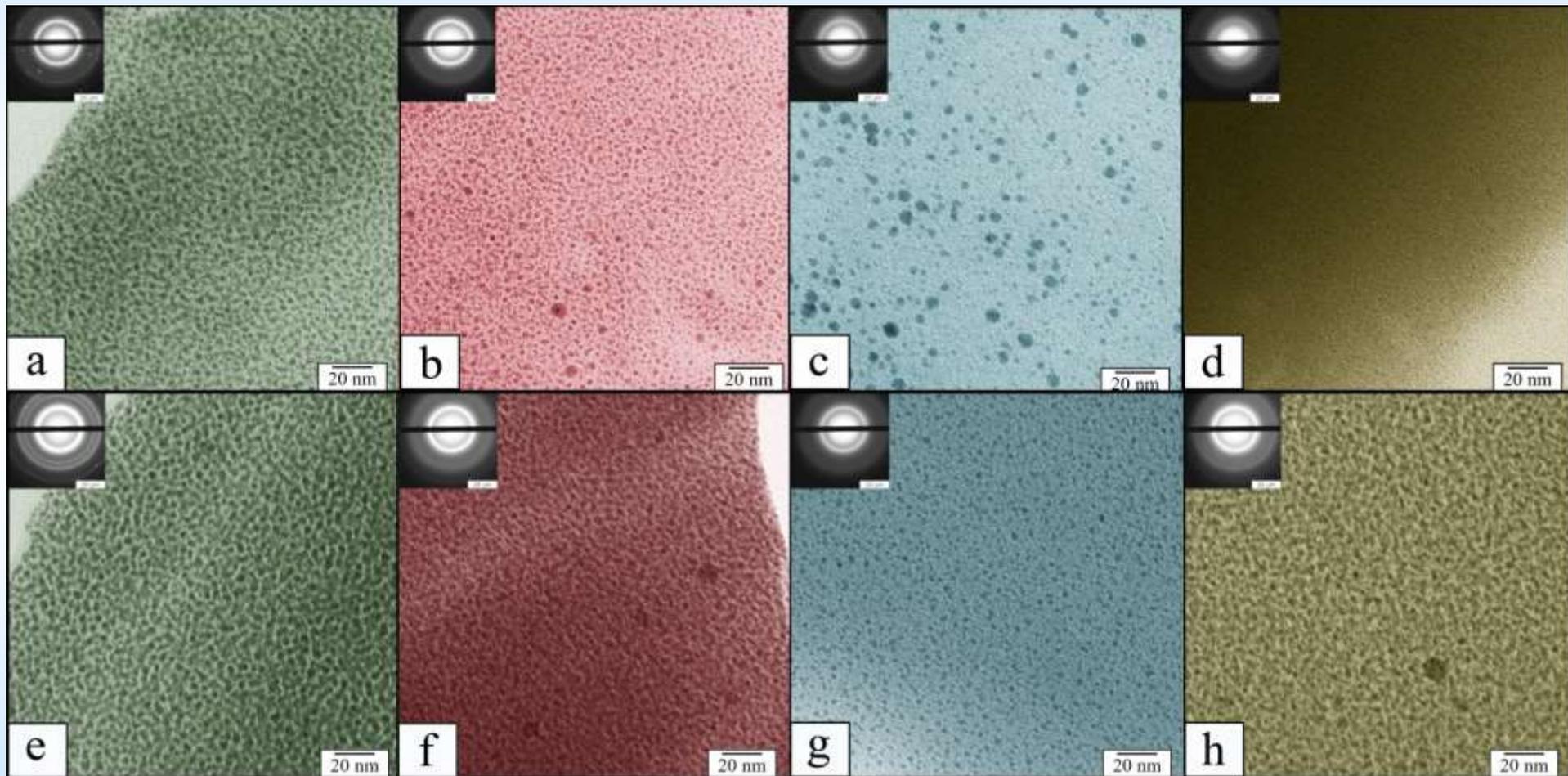


Композиты хитозана с наночастицами Ag



Композиты хитозана с наночастицами Ag

$M_w=210$ кг/моль



хит:Ag 1:1

2:1

5:1

10:1

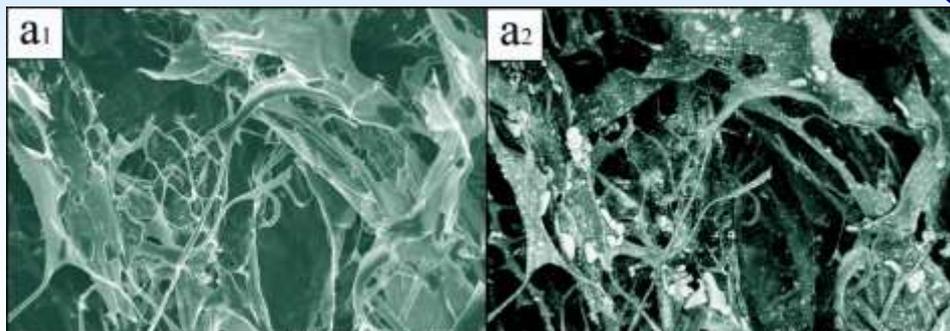
ПЭМ $M_w=1300$ кг/моль

Композиты хитозана с наночастицами Ag

вторичные

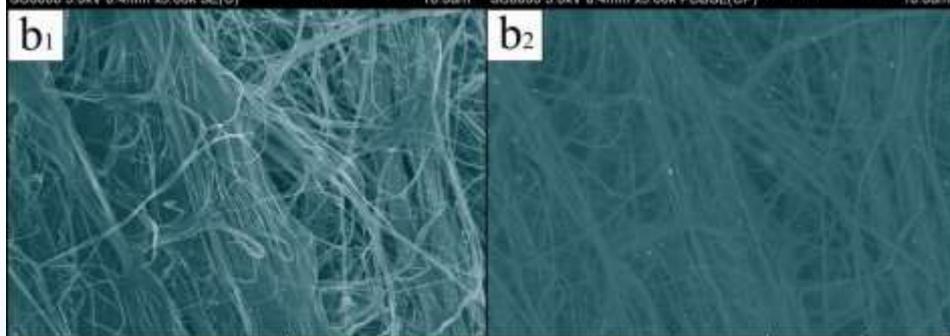
хит:Ag

1:1



обратно-
рассеянные

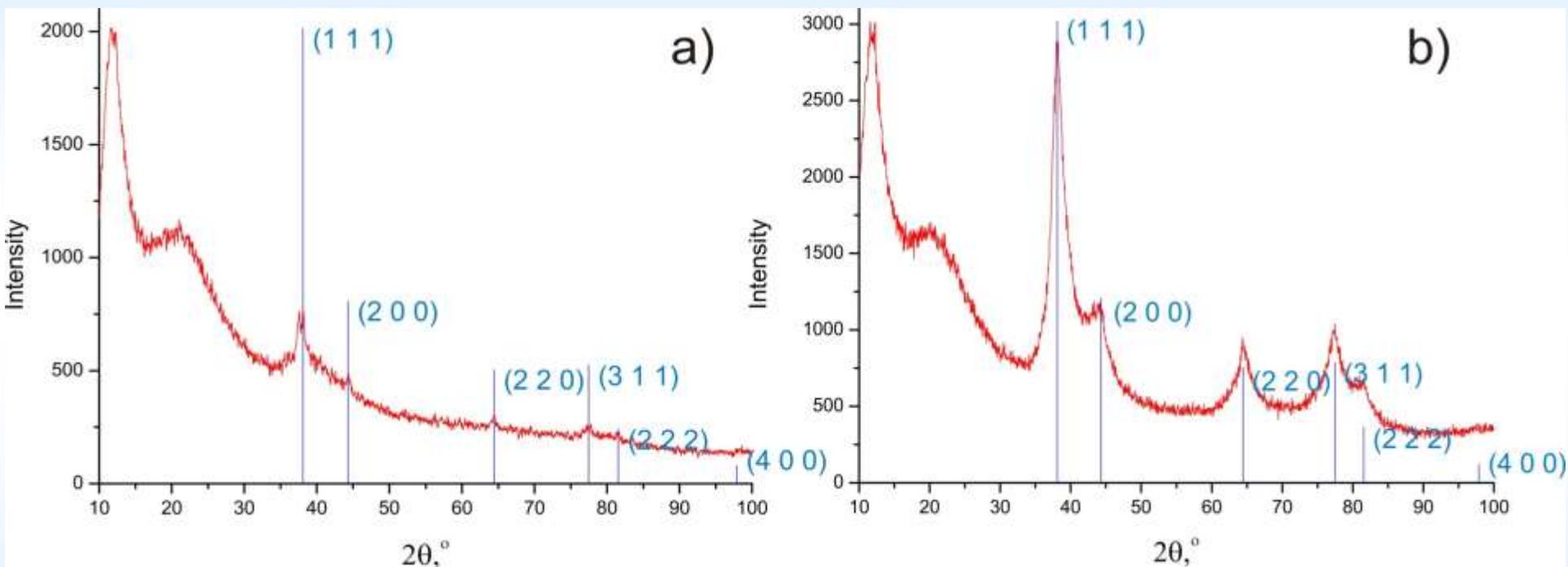
5:1



10:1



Композиты хитозана с наночастицами Ag



без обработки водородом

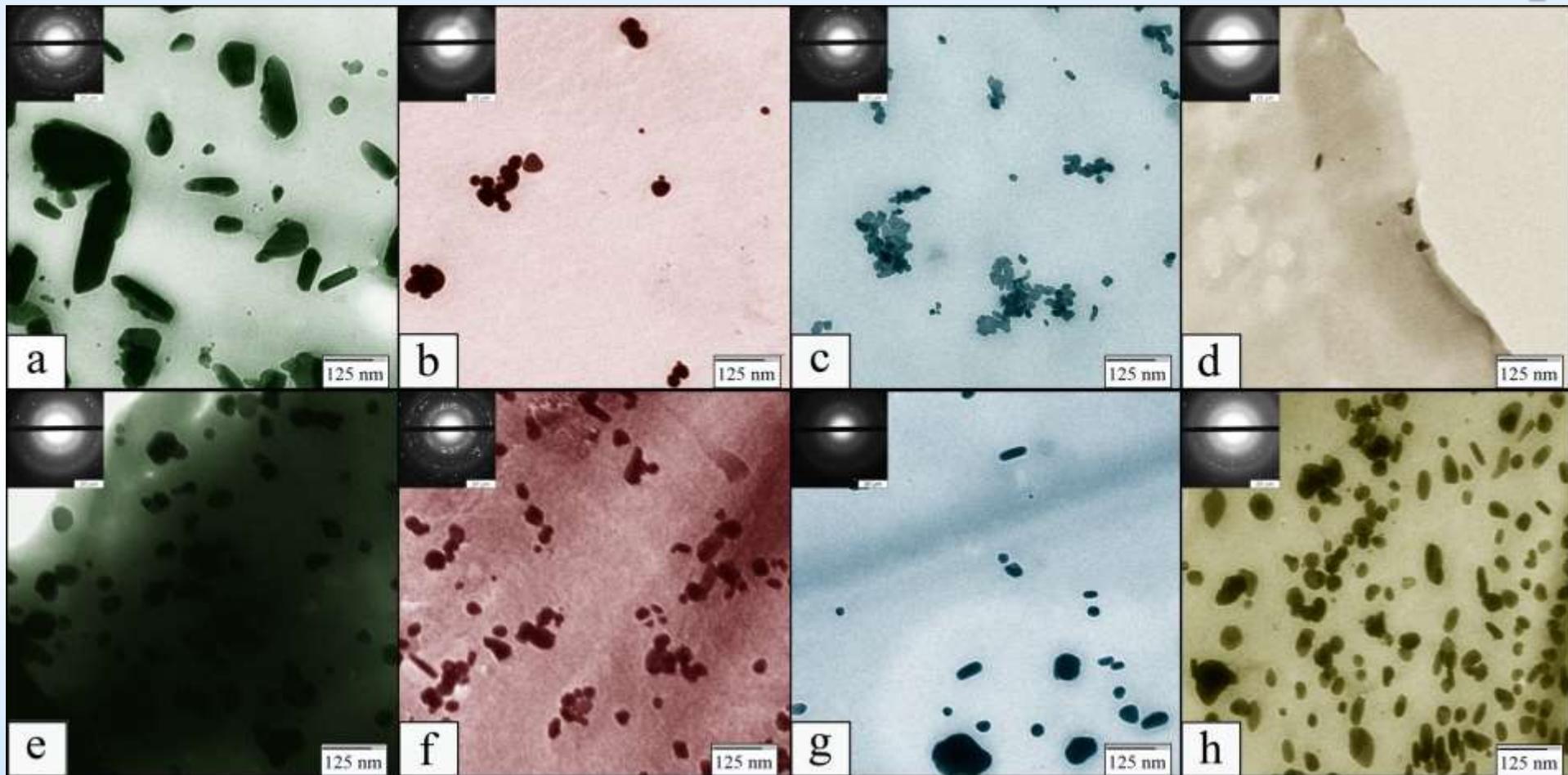
с обработкой водородом

хит:Ag = 2:1

Композиты хитозана с наночастицами Ag

после H_2

$M_w=210$ кг/моль



хит:Ag 1:1

2:1

5:1

10:1

ПЭМ $M_w=1300$ кг/моль

Композиты хитозана с наночастицами Ag

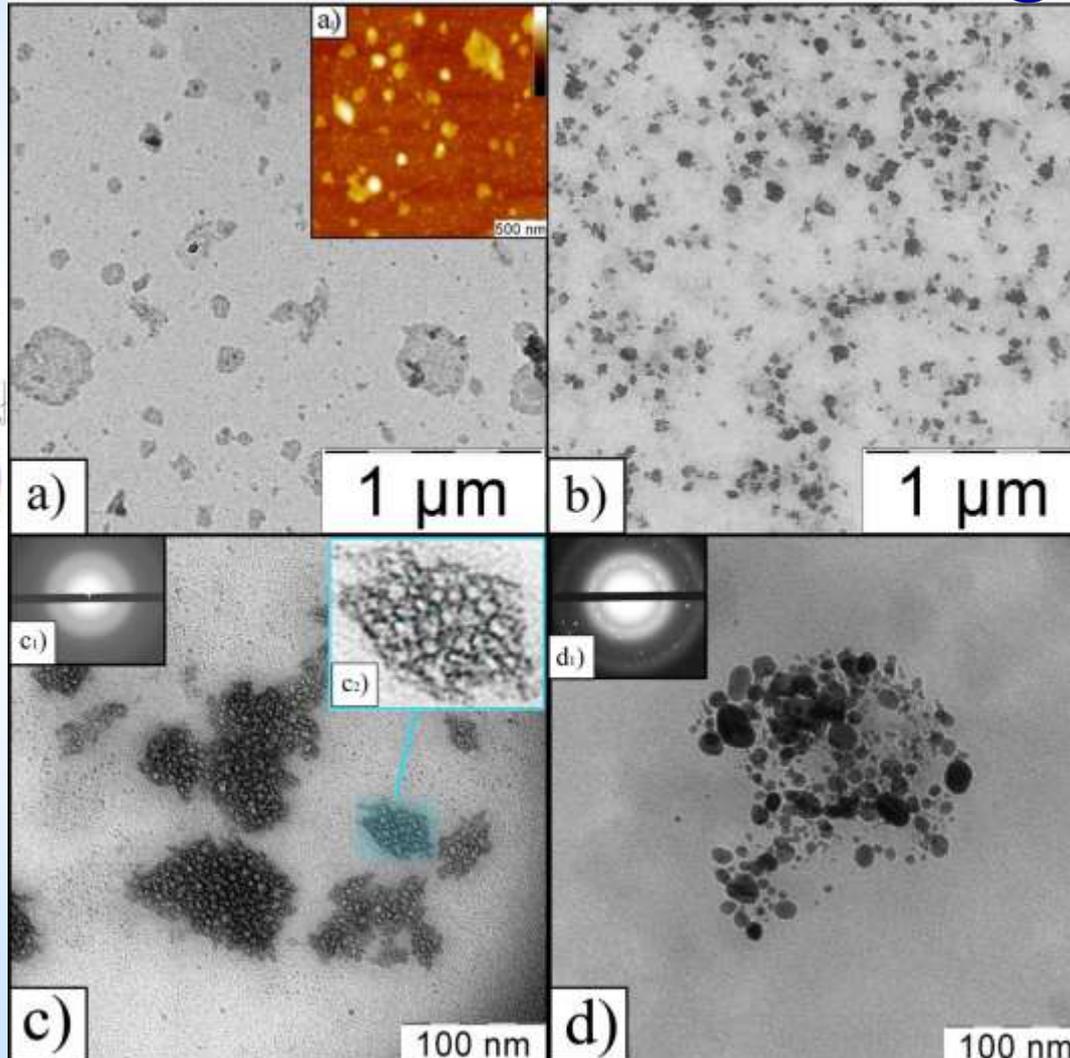
No	Composition	Molar ratio chitosan:AgNO ₃	Form	Average size, nm (TEM)
Chitosan with low molecular weight ($Mw_{chit}=210$ kg/mol, $Mn_{chit}=77$ kg/mol, DD=84%)				
1	chitosan + AgNO ₃	1:1	gel	3±1
			sol	80±20
2	chitosan + AgNO ₃	2:1	gel	3±1
			sol	30±10
3	chitosan + AgNO ₃	5:1	gel	5±2
			sol	30±12
4	chitosan + AgNO ₃	10:1	gel	2.1±0.4
			sol	14±6
5	chitosan + AgNO ₃ + genipin	2:1	gel	2.3±0.5
			sol	27±12
Chitosan with medium molecular weight ($Mw_{chit}=1300$ kg/mol, $Mn_{chit}=240$ kg/mol, DD=74%)				
6	chitosan + AgNO ₃	1:1	gel	3±1
			sol	50±20
7	chitosan + AgNO ₃	2:1	gel	3±1
			sol	37±9
8	chitosan + AgNO ₃	5:1	gel	5±1
			sol	50±17
9	chitosan + AgNO ₃	10:1	gel	3±1
			sol	42±18
10	chitosan + AgNO ₃	20:1	gel	2.0±0.4
			sol	40±12
11	chitosan + AgNO ₃ + genipin	2:1	gel	4±2
			gel after H ₂ treatment	57±18

Композиты хитозана с наночастицами Ag

ХИТ+ПГХ



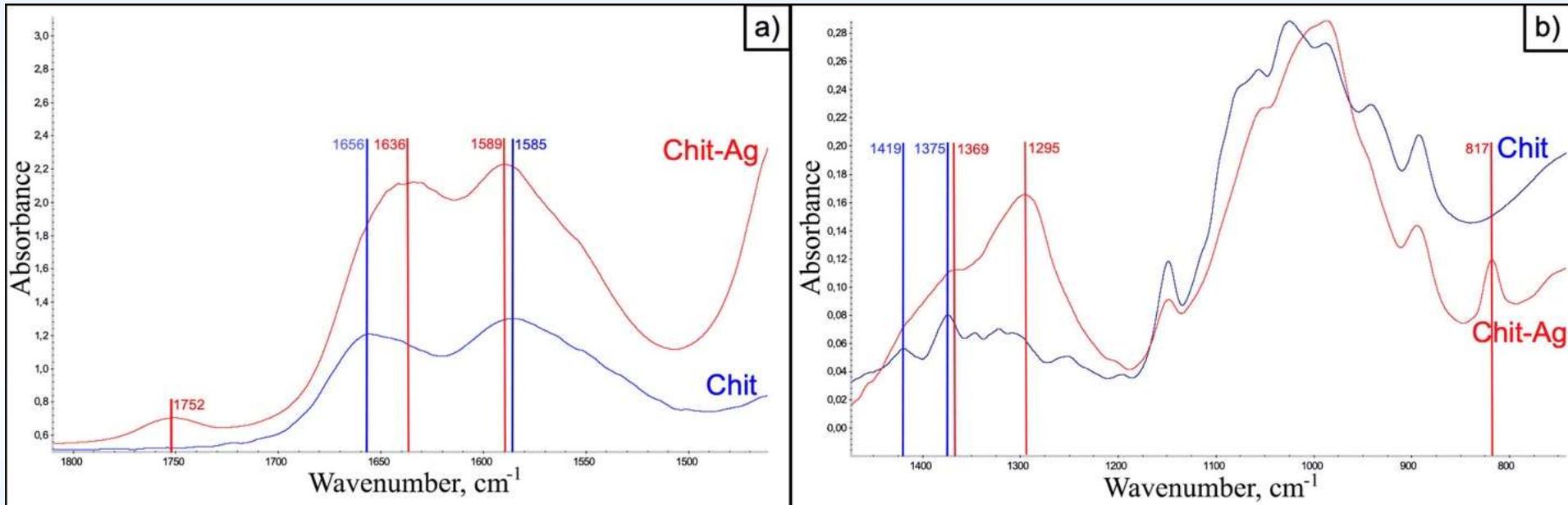
ХИТ+ПГХ+Ag



ХИТ+ПГХ+Ag
+H₂

ПЭМ

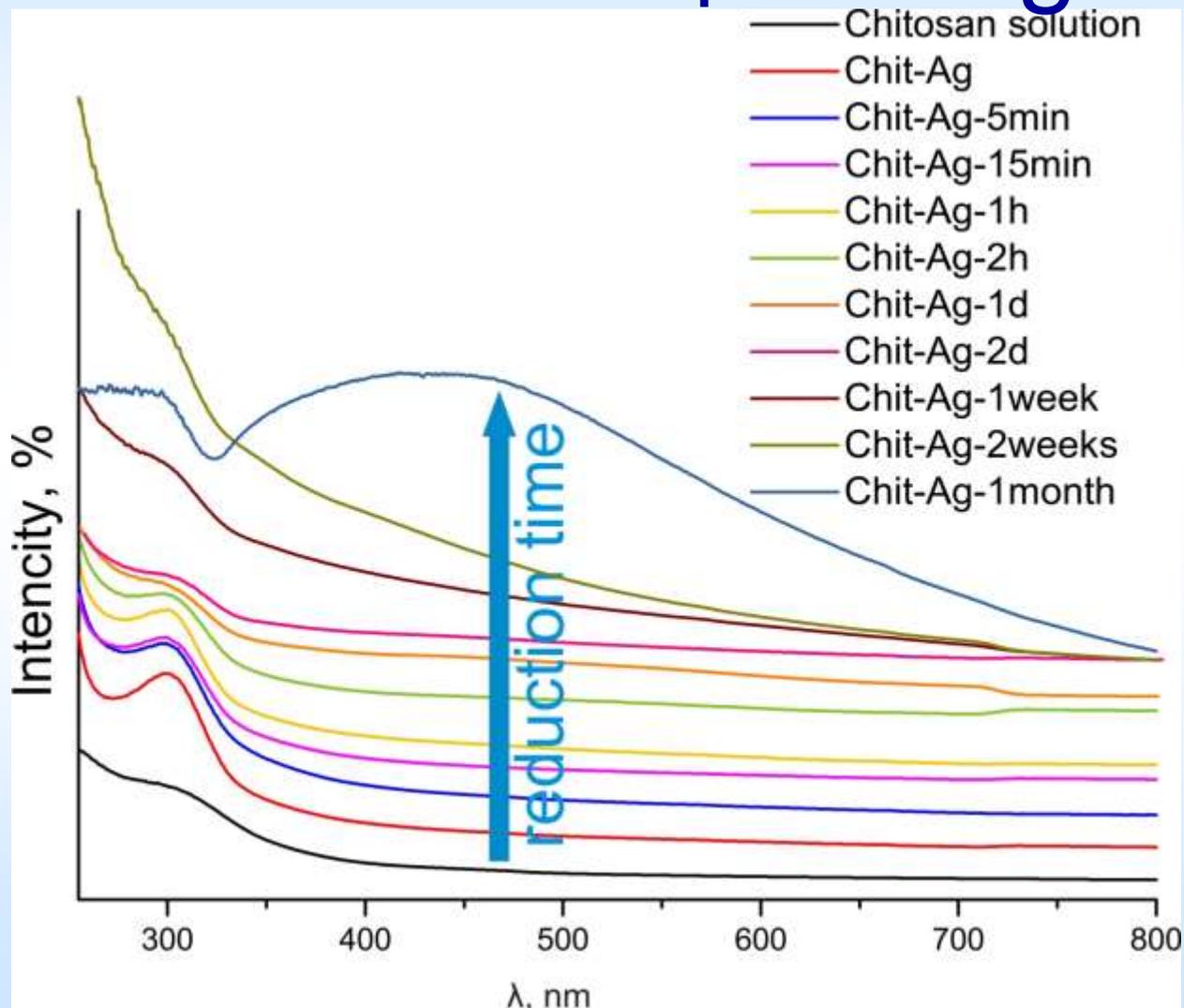
Композиты хитозана с наночастицами Ag



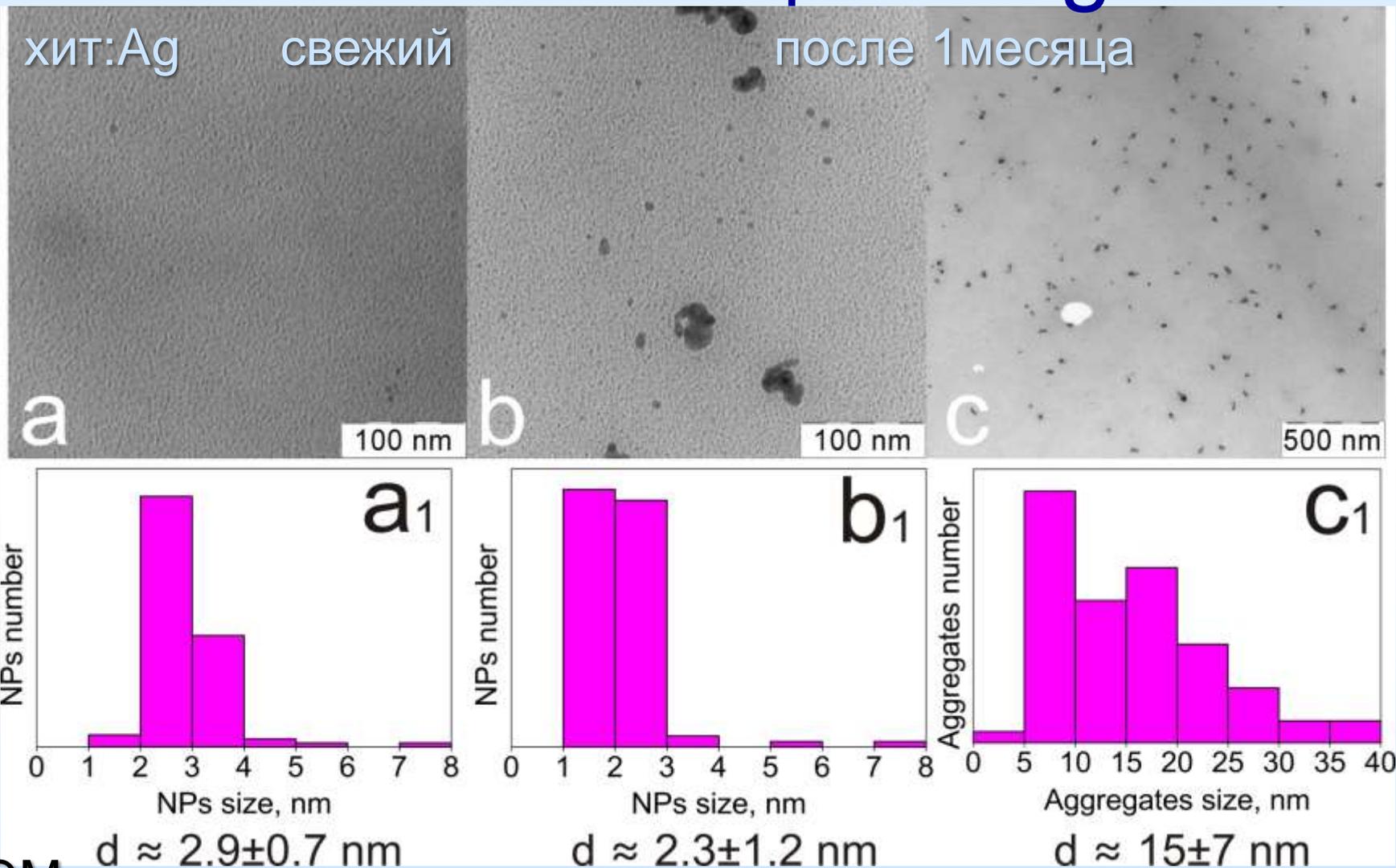
на просвет

НПВО

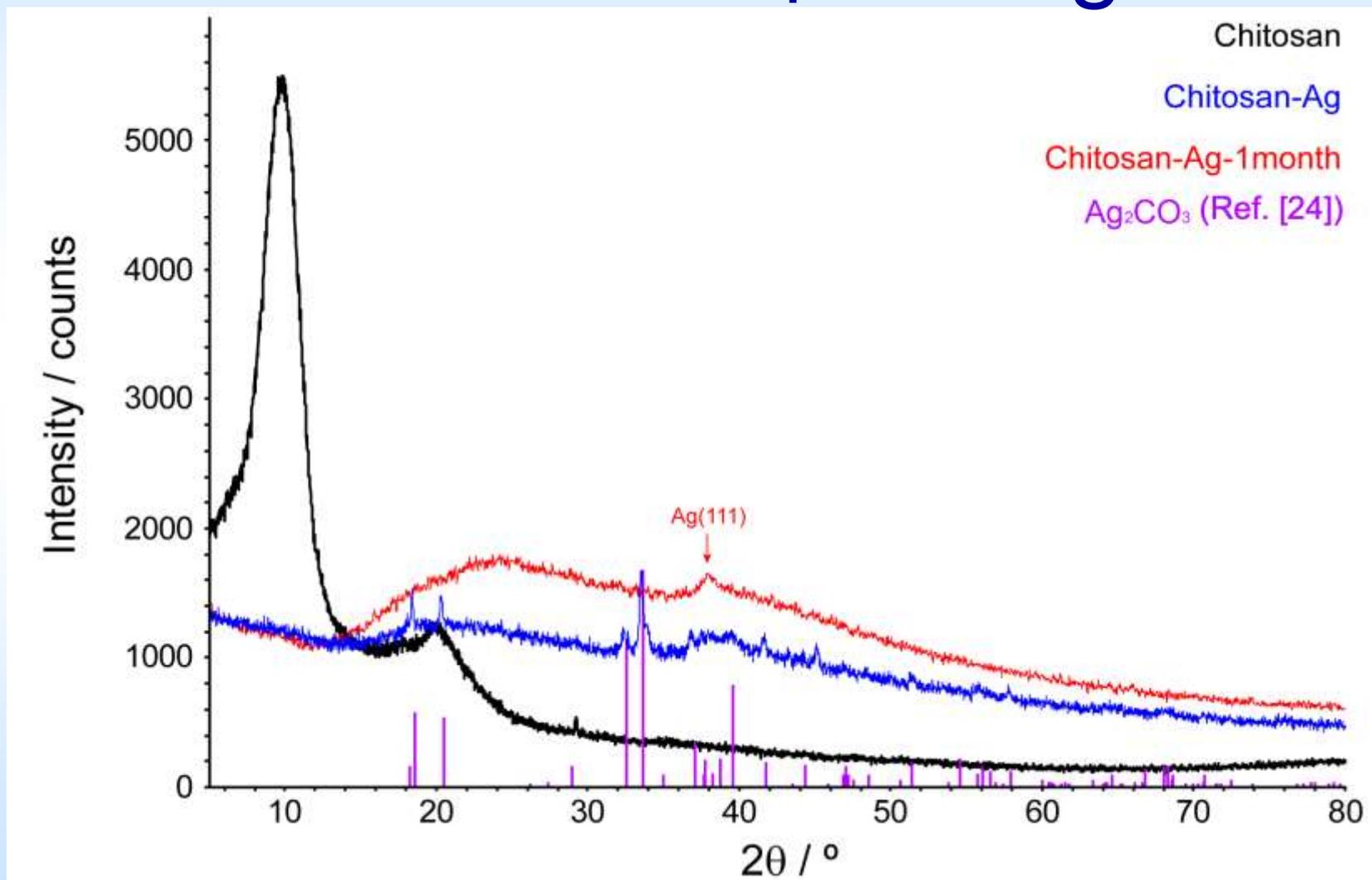
Композиты хитозана с наночастицами Ag



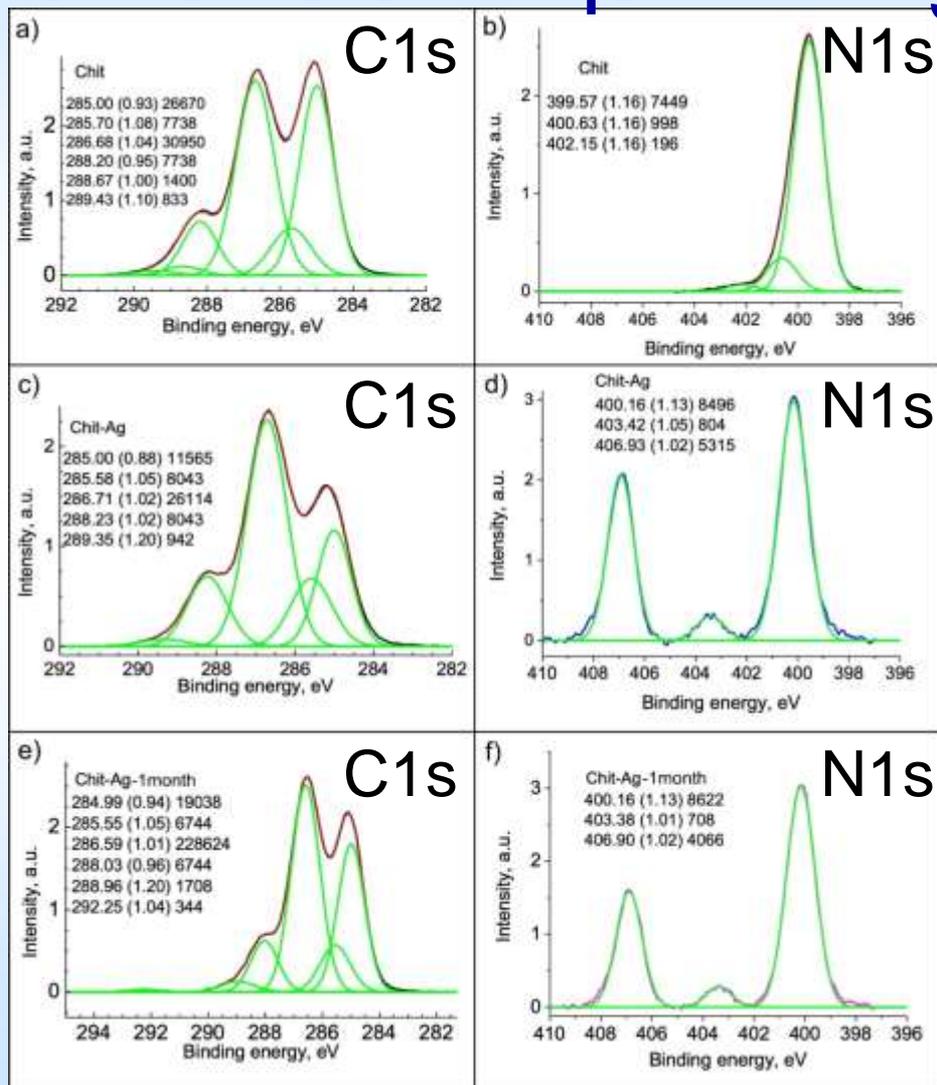
Композиты хитозана с наночастицами Ag



Композиты хитозана с наночастицами Ag



Композиты хитозана с наночастицами Ag

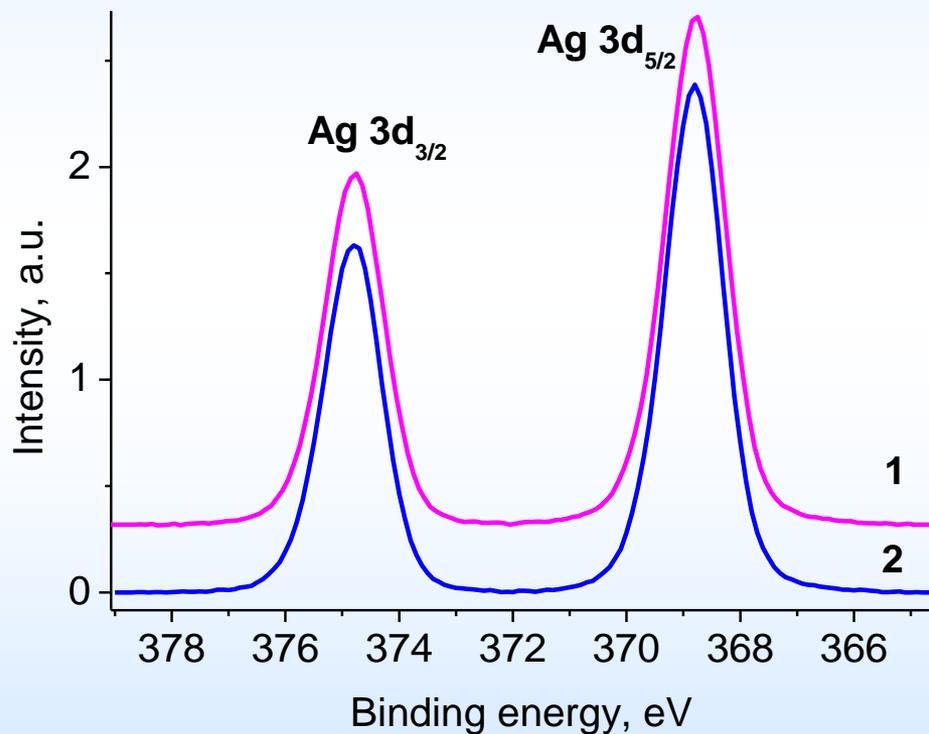


Композиты хитозана с наночастицами Ag

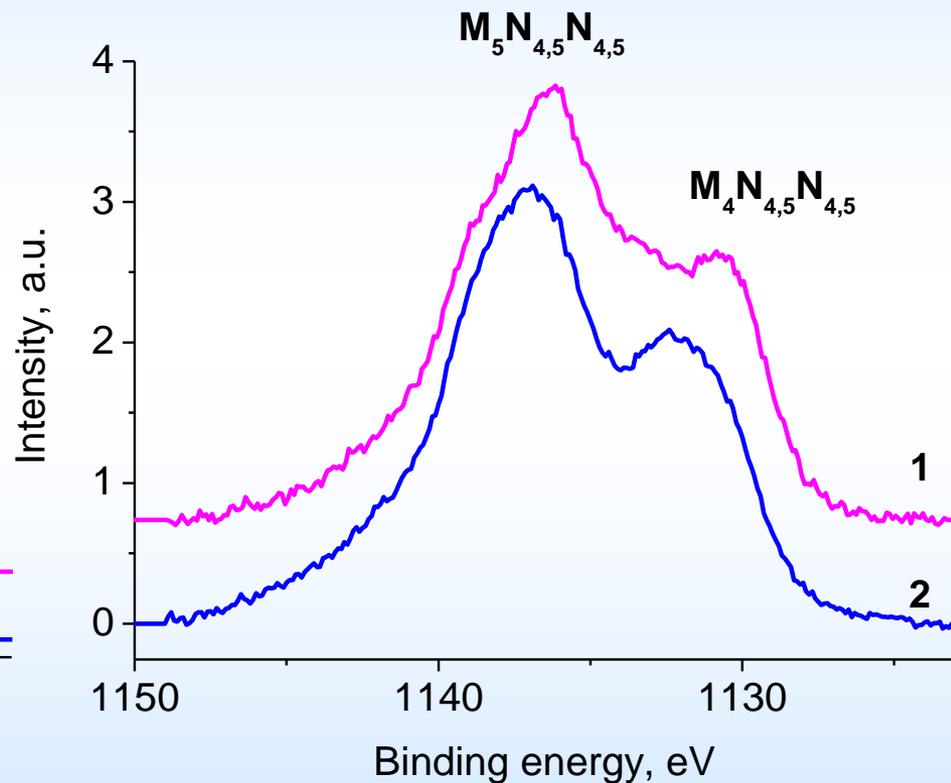
Sample	Group	C 1s						N 1s			
		C-C/ C-H	C-N	C-OH	O-C-O	C(O)N, C(O)O	CO ₃	NH ₂	N(O)C	NH ₃ ⁺	NO ₃ , ONO ₂
	Peak	C1	C2	C3	C4	C5	C6	N1	N2	N3	N4
Chit	E, eV	285.0	285.7	286.7	288.2	288.7	289.43	399.6	400.63	402.2	
	W, eV	0.93	1.08	1.04	0.95	1.00	1.10	1.16	1.16	1.16	
	I _{rel}	0.35	0.10	0.41	0.10	0.02	0.01	0.86	0.11	0.02	
Chit-Ag	E, eV	285.0	285.6	286.7	288.2	289.4	-	400.2		403.4	406.9
	W, eV	0.88	1.05	1.02	1.02	1.2	-	1.13		1.05	1.02
	I _{rel}	0.21	0.15	0.48	0.15	0.02	-	0.58		0.06	0.36
Chit-Ag- 1month	E, eV	285.2	285.8	286.8	288.2	289.4	292.5	400.4		403.6	407.1
	W, eV	0.94	1.05	1.01	0.96	1.2	1.04	1.13		1.01	1.02
	I _{rel}	0.29	0.13	0.43	0.13	0.02	0.01	0.64		0.05	0.30

Композиты хитозана с наночастицами Ag

фотоэлектроны



Оже-электроны



Chit:Ag 2) свежий 1) после 1 месяца