

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 544.72.023.22: 544.723.2:547.917

КРАСКОВСКИЙ
Александр Николаевич

**ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА НАНО- И МИКРОСТРУКТУРИРОВАННЫХ
НОСИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА
ОСНОВЕ ПЕКТИНОВ**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук
по специальности 02.00.04 – физическая химия

Минск, 2021

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси»

Научный руководитель **Агабеков Владимир Енокович**, заслуженный деятель науки, академик, доктор химических наук, профессор, заведующий отделом Государственного научного учреждения «Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси»

Официальные оппоненты: **Воробьева Елена Викторовна**, доктор химических наук, доцент, заведующий лабораторией полимерсодержащих дисперсных систем Государственного научного учреждения «ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ И НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Юркштович Татьяна Лукинична, кандидат химических наук, доцент, заведующий лабораторией химии полисахаридов Учреждения Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»

Оппонирующая организация: Белорусский государственный университет

Защита диссертации состоится «12» марта 2021 г. в 14.00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.24.01 при Государственном научном учреждении «ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Сурганова, 13, к. 402. e-mail: secr@ifoch.bas-net.by, тел./факс: (375 17) 272-16-79.

С диссертацией можно ознакомиться в Государственном научном учреждении «ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ» и на сайте <https://ifoch.by/avtoreferaty/>.

Автореферат разослан «10» февраля 2021 г.

Ученый секретарь
Совета по защите диссертаций
кандидат химических наук

С. А. Праценко

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одной из актуальных задач в разработке современных и будущих технологий для сельского хозяйства, клеточной инженерии, регенеративной медицины, фармацевтической отрасли является создание и использование биополимерных биоразлагаемых и биосовместимых носителей различного функционального назначения в виде:

- нано- и микроконтейнеров для инкапсулирования биологически активных веществ (БАВ), позволяющих уменьшить их токсичность, защитить от окисления, продлить сроки хранения, контролировать доставку и высвобождение целевого вещества;

- ультратонких мультислойных пленок, благодаря их возможности изменять такие свойства твердых поверхностей, как смачиваемость, износостойчивость, биосовместимость, способствующих адгезии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и обеспечивающих их функционирование;

- пористых скаффолдов, обладающих противоспаечным эффектом и пригодных в качестве носителей МСК в тканевой инженерии.

Для создания таких носителей наиболее перспективным материалом является природный полисахарид пектин, основными преимуществами которого являются его биосовместимость, нетоксичность, биоразлагаемость, наличие собственной физиологической активности, а также получение из возобновляемого растительного сырья.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами. Работа выполнялась в рамках задания 2.08 «Разработка биосовместимых функциональных наночастиц и контейнеров для целей медицинской диагностики и локальной доставки лекарственных форм пролонгированного действия» ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация» (2011-2013 гг.), задания 4.08 «Разработка новых биосовместимых покрытий на тканевых материалах с пролонгированным действием лекарственного вещества» ГПНИ «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал» (подпрограмма «Химфармсинтез») (2014-2015 гг.), задания «Регуляция биосинтеза фармакологически ценных вторичных метаболитов в культурах *in vitro* с помощью полисахаридных нано- и субмикронных частиц» ГПНИ «Конвергенция-2020» (2016-2020 гг.), задания «Создать тонкопленочные модифицированные полимерные материалы в качестве носителей, обеспечивающих эффективную адгезию и функционирование мезенхимальных стволовых клеток» ГПНИ «Конвергенция-2020» (2016-2020 гг.), договора БРФФИ № X13M-037 «Создание

мультислойных полимерных покрытий на основе полисахаридов для биомедицинских приложений» (2013-2015 гг.).

Работа соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 годы, утвержденным указом Президента Республики Беларусь от 22 апреля 2015 г. №166 (п.6 «Био- и наноиндустрия: нанотехнологии»), а также тематике приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 годы, утвержденных постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12 марта 2015 №190 (п.8 «Многофункциональные материалы и технологии», п.12 «Междисциплинарные исследования»).

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы – установить физико-химические закономерности формирования на основе пектинов биосовместимых и биоразлагаемых нано- и субмикронных частиц в качестве носителей биологически активных веществ (БАВ), мультислойных ультратонких пленок и 3D скаффолдов для иммобилизации мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- синтезировать нано- и субмикронные частицы пектината кальция (Пект-Са) методом ионотропного гелеобразования и установить влияние условий синтеза частиц на их физико-химические свойства;
- включить высоко- и низкомолекулярные БАВ в гидрогелевые частицы пектината кальция и изучить кинетику высвобождения активного компонента в водных растворах с различными ионной силой и рН;
- изучить закономерности формирования мультислойных пленок на основе полисахаридов (пектина, хитозана, карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), декстран сульфата) методом послойного осаждения на твердой планарной поверхности кварца и кремния;
- установить взаимосвязь между компонентным составом пленок и их физико-химическими и вязкоэластичными свойствами, а также эффективностью адгезии и жизнеспособностью МСК;
- сформировать пористые скаффолды на основе пектинов методом криоструктурирования;
- установить влияние молекулярной массы и степени этерификации пектинов, а также условий получения пористых скаффолдов на их физико-химические свойства.

Объекты исследования: нано- и субмикронные частицы пектината кальция, мультислойные ультратонкие пленки и пористые 3D скаффолды на основе пектинов.

Предмет исследования: закономерности формирования и физико-химические свойства нано- и субмикронных частиц, мультислойных ультратонких пленок и пористых скаффолдов на основе пектинов.

Научная новизна. Впервые получены нано- и субмикронные частицы пектината кальция, содержащие низкомолекулярные биологически активные вещества (масс.%): иммуномодулятор L-лизил-L-глутаминовую кислоту – до 61,0; цитостатик иматиниба метансульфонат – 60,0; антисептик мирамистин – 70,0; регулятор роста растений *транс*-коричную кислоту – 56,0.

Установлено влияние компонентного состава биополимерных мультислойных пленок на основе полисахаридов на их физико-химические характеристики (толщину, шероховатость, модуль эластичности), что позволило разработать покрытия, обеспечивающие эффективную адгезию мезенхимальных стволовых клеток в жизнеспособном состоянии.

Впервые на основе пектинов разработаны 3D каркасные структуры с заданными физико-химическими характеристиками, обладающие противоспаечным эффектом.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Методика получения гидрогелевых нано- и субмикронных частиц пектината кальция, содержащих не менее 50 масс.% низкомолекулярных БАВ (L-лизил-L-глутаминовой кислоты, иматиниба метансульфоната, мирамистина, *транс*-коричной кислоты) и обеспечивающих повышение эффективности их действия и/или пролонгированное высвобождение.

2. Закономерности формирования ультратонких мультислойных пленок на основе полисахаридов (пектина, хитозана, КМЦ, декстран сульфата), позволившие разработать методику получения покрытий с заданными физико-химическими характеристиками (толщиной, шероховатостью, эластичностью).

3. Установленная взаимосвязь между компонентным составом пленок и их физико-химическими, вязкоэластичными и биологическими свойствами, позволившая создать хитозансодержащие покрытия, пригодные для модификации твердых поверхностей и обеспечивающие эффективную иммобилизацию мезенхимальных стволовых клеток в жизнеспособном состоянии.

4. Усовершенствованный способ получения на основе пектинов пористых скаффолдов с регулируемой скоростью биодеградации, размером пор и плотностью, пригодных в качестве биосовместимых и биоразлагаемых носителей мезенхимальных стволовых клеток и обладающих противоспаечным эффектом.

Личный вклад соискателя заключается в анализе литературных данных по теме диссертационной работы, выполнении экспериментов по получению нано- и субмикронных частиц пектината кальция, тонких пленок и пористых скаффолдов на основе пектинов, определению их физико-химических характеристик, обобщении экспериментальных данных и их интерпретации, оформлении

публикаций и представлении результатов на конференциях. Постановка цели и задач исследования, планирование экспериментов и обсуждение полученных результатов осуществлялось совместно с научным руководителем академиком, д.х.н., профессором В.Е. Агабековым, а также к.х.н. В.И. Куликовской и к.х.н. К.С. Гилевской. Исследования морфологии частиц, пленок и пористых скаффолдов методами сканирующей зондовой и сканирующей электронной микроскопии выполнены совместно с м.н.с. Е.А. Грачевой и инженером Т.М. Жданко.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Результаты исследования были представлены на международных конференциях: Международная научно-техническая конференция «Полимерные композиты и трибология» (Гомель, Беларусь, 2013, 2017), IV Международная научная конференция «Наноразмерные системы: строение, свойства, технологии» (Киев, Украина, 2013), 15th International Scientific Conference «High-Tech in Chemical Engineering» (Звенигород, Россия, 2014), Международная научная конференция «Наноструктурные материалы: Беларусь-Россия-Украина (Минск, Беларусь, 2014, 2016), International Conference «Nanomeeting» (Минск, Беларусь, 2015), Международная конференция «Современные проблемы химической физики» (Ереван, Армения, 2015), Международная научная конференция «Молодежь в науке» (Минск, Беларусь, 2015, 2019), 16th International Conference on Organized Molecular Films (Хельсинки, Финляндия, 2016), Третий междисциплинарный молодежный научный форум с международным участием «Новые материалы» (Москва, Россия, 2017), 4th International Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials (Краков, Польша, 2018), 29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials (Маастрихт, Нидерланды, 2018), 6th Nano Today Conference (Лиссабон, Португалия, 2019).

Результаты диссертационной работы вошли в Топ-10 исследований ученых Национальной академии наук Беларуси за 2019 год «За создание биосовместимых пористых материалов на пектинах с заданными физико-химическими свойствами и регулируемой скоростью биodeградации для трансплантации мезенхимальных стволовых клеток».

Результаты практического использования подтверждены лабораторным регламентом «Экспериментальная модель трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на биodeградируемых носителях на основе природных полисахаридов» (совместно с БГМУ).

Опубликованность результатов диссертации. Результаты диссертации опубликованы в 33 научных работах, в том числе 8 статьях в зарубежных и отечественных научных журналах, включенных в Перечень научных изданий, рекомендованных ВАК Беларуси, общим объемом 4,7 авторских листа, 3 статьях в сборниках материалов конференций и 21 тезисах докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, пяти глав, заключения, списка литературы и 7 приложений. Полный объем диссертации – 147 страниц, в том числе 58 рисунков (18 стр.), 11 таблиц (3 стр.), список литературы, содержащий список использованных источников (199 наименований) и список публикаций соискателя (33 наименования), на 20 страницах, 7 приложений (23 стр.).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В **первой главе** представлен обзор литературы, в котором проанализированы и обобщены данные о формировании носителей различных БАВ, клеток и др. на основе полимеров в виде нано- и микрочастиц, пленок, гелей, пористых скаффолдов, а также проанализированы основные методы их получения и возможные области применения. Сделан вывод, что перспективным структурным компонентом таких носителей является природный полисахарид пектин. Сформулированы цель и задачи диссертационной работы.

Во **второй главе** обоснован выбор объектов исследований, описаны методики получения гидрогелевых нано- и субмикронных частиц пектината кальция, в том числе, содержащих различные БАВ, мультислойных полисахаридсодержащих (пектин, хитозан, декстран сульфат, КМЦ) LbL-пленок и пористых скаффолдов на основе пектинов. Приведены основные физико-химические методы анализа, использованные в работе: кварцевого микровзвешивания, атомно-силовая (АСМ), сканирующая (СЭМ) и просвечивающая (ПЭМ) электронная микроскопия, УФ- и ИК-спектроскопия.

В **третьей главе** представлены экспериментальные результаты исследования закономерностей формирования частиц Пект-Са, в том числе содержащих различные БАВ, и их физико-химических характеристик.

Синтез частиц пектината кальция и их свойства. Методом ионотропного гелеобразования путем сшивки катионами Ca^{2+} макромолекул низкометоксилированного (Пект-НМ, степень этерификации (СЭ) 35-42%) или низкометоксилированного амидированного (Пект А, СЭ 32%, степень амидирования 18%) пектинов получены гидрогелевые нано- и субмикронные частицы сферической формы с диаметром от 50,0 до 360,0 нм и ζ -потенциалом $-(16,4-20,0)$ мВ (рисунок 1).

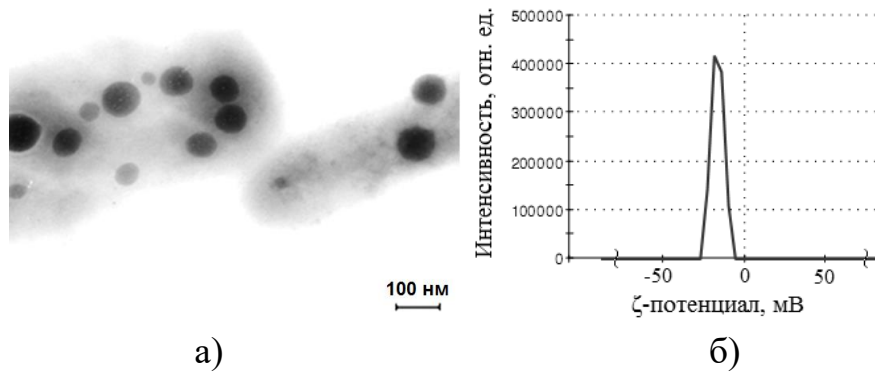


Рисунок 1. – ПЭМ-изображение (а) и ζ -потенциал (б) частиц Пект-Са

Уменьшение рН с 5,0 до 2,3, увеличение ионной силы реакционной смеси до 0,1 моль/л и введение в нее стабилизатора (1,0 масс.% Твин 80) приводят к уменьшению среднего диаметра синтезируемых частиц (таблица 1).

Таблица 1. – Средний диаметр синтезированных частиц пектината кальция при рН водного раствора пектина 5,0

Добавка	Диаметр, нм
-	160,0÷360,0
-*	45,0÷75,0
NaCl	60,0÷300,0
Твин 80	100,0÷150,0

* - рН 2,3

В среде, используемой для культивирования суспензионных клеток растений, синтезированные гидрогелевые частицы Пект-Са за 14 суток теряют менее 25% от первоначальной массы. При этом они либо существенно не влияют на ростовые процессы клеток суспензионной культуры (в случае *Vinca minor*), либо стимулируют их активность на 15,0-20,0% (в случае *Vinca major*) (изучено совместно с к.б.н. Молчан О.В. на биологическом факультете БГУ) [7, 24].

Частицы пектината кальция, содержащие бычий сывороточный альбумин (БСА). Включение БСА, меченого флуоресцеином (БСА-ФИТЦ), в частицы пектината кальция проводили *in situ* в процессе их синтеза. В присутствии низкомолекулярного электролита (0,1 М NaCl, рН 5,0) и в отсутствие соли при рН 2,3 эффективность включения (ЭВ) белка при соотношении в реакционной смеси пектин:БСА-ФИТЦ 1:2 одинакова и составляет 21,0-29,0% независимо от порядка смешения и последующего сливания реагентов.

Максимальная эффективность включения БСА-ФИТЦ наблюдается в кислой среде. При соотношении в реакционной смеси пектин:БСА-ФИТЦ 1:1 эффективность включения белка при рН 2,3 в 2,5–6,2 раза выше, чем при рН 5,0, и составляет 54,0-58,0%. При соотношении пектин:БСА-ФИТЦ 5:1 включается более 99,0% БСА-ФИТЦ. Максимальное количество БСА-ФИТЦ в

синтезированных частицах достигает 0,54–0,58 мг на 1,0 мг пектина при массовом соотношении пектин:белок в реакционной смеси 1:1 и не изменяется при дальнейшем повышении концентрации белка.

Эффективность включения БСА-ФИТЦ при рН 5,0 значительно меньше, чем при рН 2,3. Изменение соотношения пектин:БСА-ФИТЦ в реакционной смеси от 1:1 до 1:2 практически не влияет на эффективность включения, а при соотношении 5:1 синтезируемые наночастицы не содержат БСА-ФИТЦ. При рН 5,0 наиболее эффективное (~ 23,0%) включение белка происходит при добавлении раствора пектина с БСА-ФИТЦ к раствору CaCl_2 . Максимальное количество белка в наночастицах, которое было достигнуто при рН 5,0, составило 0,44 мг БСА-ФИТЦ на 1,0 мг пектина.

Высвобождение БСА-ФИТЦ из частиц пектината кальция. Для частиц Пект-Са, содержащих 0,51 мг БСА-ФИТЦ/1,0 мг пектина, в фосфатном буфере характерно «взрывное» высвобождение белка и через 10–20 мин его количество составляет ~ 60,0% от включенного (рисунок 2 а). В 0,9%-ном NaCl в течение 5 ч релиз БСА-ФИТЦ практически не происходит (менее 1,0% от включенного). Через 10–20 мин выдерживания частиц в растворе NaOH количество высвобожденного белка составляет ~ 40,0% от включенного (рисунок 2 б).

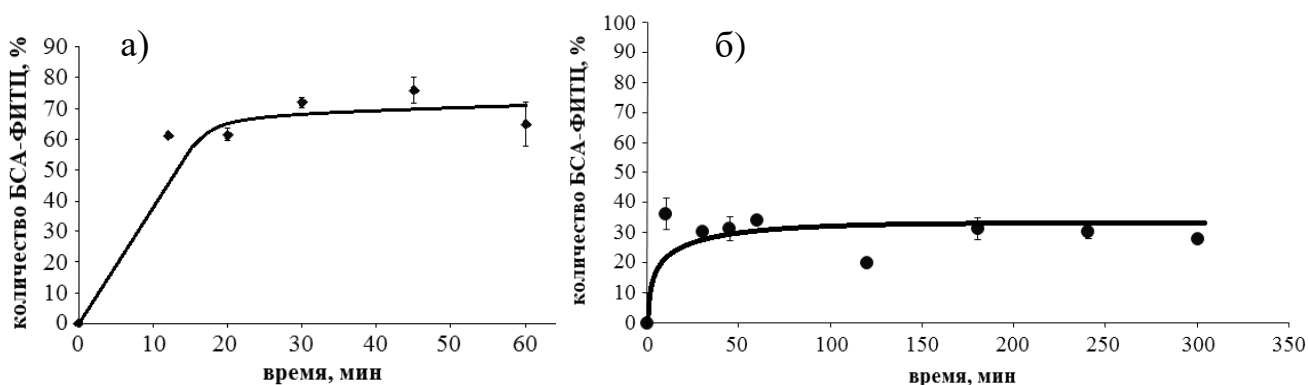


Рисунок 2. – Кинетика высвобождения БСА-ФИТЦ в (а) фосфатном буфере, (б) NaOH при 36,5°C

Частицы пектината кальция, содержащие низкомолекулярные БАВ. В полученные частицы Пект-Са включали иматиниба метансульфонат (*Имат*), дипептид L-лизил-L-глутаминовую кислоту (*ЛГК*), мирамистин (*Мир*), транс-коричную кислоту (*ТКК*) путем их сорбции из водных (для *ТКК* 96% этанольных) растворов с различной концентрацией.

Частицы пектината кальция, содержащие иматиниба метансульфонат. При концентрации *Имат* в водном растворе 0,5÷2,5 мг/мл эффективность его включения в частицы Пект-Са составляет 45,0-58,0%. При увеличении концентрации *Имат* в растворе от 5,0 до 10,0 мг/мл ЭВ уменьшается в 1,8 раза с 44,0 до 25,0%. Это связано с максимальной емкостью частиц Пект-Са по

иматинибу, которая достигает 60,0 масс.% в пересчете на сухой вес частиц. Содержание *Имат* в частицах зависит от его концентрации в растворе и составляет от 10,0 до 60,0 масс.%. Величина ζ -потенциала частиц Пект-Са, содержащих *Имат*, составляет $-19,2 \pm 3,0$ мВ.

Высушенные субмикронные частицы Пект-Са, содержащие иматиниб, имеют сферическую форму с диаметром 120,0-150,0 нм, а в водном растворе гидродинамический диаметр частиц составляет 220,0-460,0 нм.

Предварительные испытания, проведенные совместно с к.б.н. Шолухом М.В. на биологическом факультете БГУ, показали, что цитотоксичность частиц Пект-Са, содержащих 60,0 масс.% *Имат*, в 3 раза выше по сравнению с нативной формой препарата и LC_{50} составляет 0,12 и 0,37 мкг/мл соответственно [17].

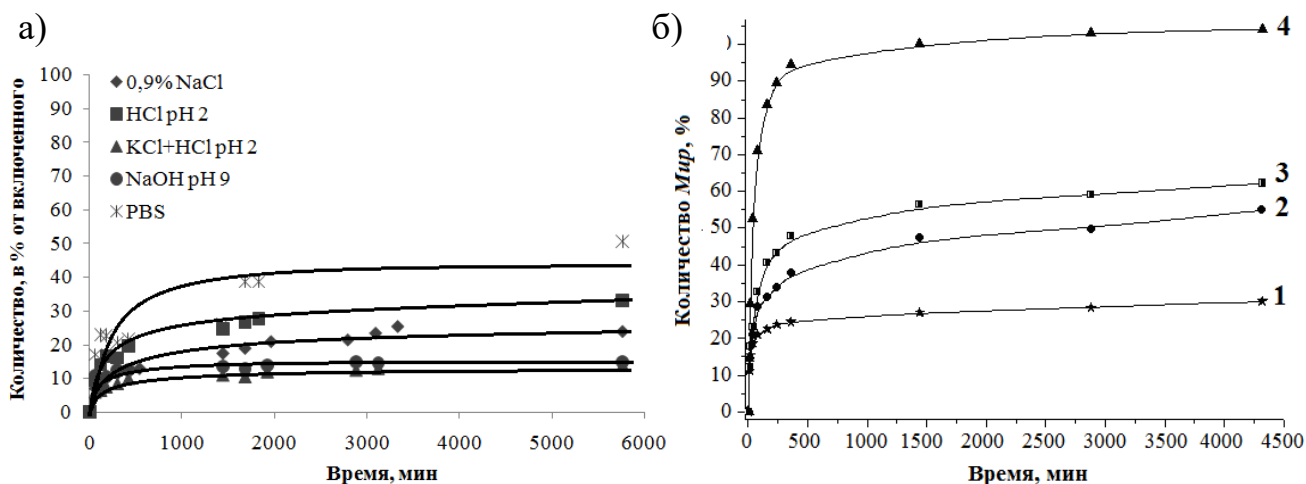
Частицы пектината кальция, содержащие L-лизил-L-глутаминовую кислоту. Эффективность включения ЛГК в частицы Пект-Са во всем изученном диапазоне практически не зависит от его концентрации и составляет 14,0÷17,0%. При увеличении концентрации ЛГК в растворе от 5,0 до 15,0 мг/мл массовая доля дипептида в частицах увеличивается в ~ 1,8 раза и достигает 61,0 масс.%.

Величина ζ -потенциала частиц Пект-Са с включенной ЛГК составляет $-20,5 \pm 2,4$ мВ. Высушенные частицы Пект-Са, содержащие ЛГК, имеют сферическую форму и диаметр 25,0-40,0 нм.

Частицы пектината кальция, содержащие мирамистин. В зависимости от количества *Мир* в водном растворе эффективность его включения в частицы составляет 68,0-92,0%. При увеличении концентрации *Мир* в растворе от 0,3 до 3,3 мг/мл его содержание в частицах увеличивается в 7 раз и достигает 70,0 масс.% в пересчете на сухой вес частиц. Включение *Мир* в частицы Пект-Са приводит к уменьшению значения ζ -потенциала с $-18,0 \pm 3,0$ мВ для исходных частиц до $-13,5 \pm 0,5$ мВ для частиц, содержащих 70,0 масс.% *Мир*.

Частицы Пект-Са, содержащие *Мир*, имеют сферическую форму, их диаметр в высушенном виде составляет 60,0-120,0 нм, а гидродинамический диаметр в водном растворе равен 340,0-530,0 нм.

Высвобождение мирамистина из частиц пектината кальция. Кинетику высвобождения *Мир* из частиц Пект-Са изучали при 36,5°C в растворах, моделирующих физиологические среды организма человека: 0,9%-ном NaCl (плазму крови), кислой среде pH 2 и растворе по Кларку-Лабсу pH 2 (желудочный сок), щелочной среде pH 9 (среду нижних отделов кишечника), фосфатном буфере pH 7,4 (сплюну, кровь). Для частиц Пект-Са во всех исследуемых средах характерно медленное высвобождение *Мир*. Максимальное количество высвобожденного вещества (~ 40,0% от включенного) достигается через 30 ч при выдерживании частиц в фосфатном буфере (рисунок 3 а). В остальных изученных средах релиз *Мир* не превышал 30,0% от включенного количества даже через 96 ч, при этом кинетические кривые запределивались уже через ~ 8 ч (рисунок 3 а).



1 – дистиллированная вода; 2 – 0,9% раствор NaCl; 3 – раствор NaOH + NaCl (pH~9);
4 – раствор HCl + NaCl (pH~2)

Рисунок 3. – Кинетика высвобождения мирамистина из частиц пектината кальция (а) и композита (б) при 36,5°C в различных средах

Полученные частицы Пект-Са с включенным *Мир* использованы в составе мирамистинсодержащих композиционных материалов на основе хлопчатобумажной ткани (бязи) и полидиметилсилоксана (ПДМС). Для такого композита характерно пролонгированное высвобождение лекарственного вещества в кислой среде (рисунок 3 б).

Частицы пектината кальция, содержащие *транс*-коричную кислоту. В зависимости от количества *ТКК* в растворе эффективность ее включения в частицы составляет 15,0-28,0%. Так, при сорбции *ТКК* из разбавленного раствора (0,1 мг/мл) ЭВ составляла 15,0%. Увеличение концентрации *ТКК* до 1,0÷15,0 мг/мл приводит к повышению ЭВ до 24,0-28,0%. При этом ее массовая доля в частицах Пект-Са увеличивалась с 1,4 до 56,0 масс.%. Дальнейшее повышение содержания *ТКК* в растворе до 25,0 мг/мл приводит к уменьшению ЭВ в ~1,7 раза до 16,0%.

По данным атомно-силовой микроскопии размер частиц Пект-Са, содержащих *ТКК*, составляет 60,0-160,0 нм, а гидродинамический диаметр ~ 200,0-700,0 нм, что обусловлено их набуханием в воде. Включение *ТКК* в частицы Пект-Са практически не изменяет значение ζ -потенциала: $-11,8 \pm 1,6$ мВ для исходных и $-9,6 \pm 2,1$ мВ для частиц, содержащих 42,0 масс.% *ТКК*.

Высвобождение *ТКК* из частиц пектината кальция. Кинетическая кривая высвобождения *ТКК* в среде Мурасиге-Скуга, используемой для культивирования суспензионных культур, свидетельствует о том, что зависимость количества высвободившейся *ТКК* от времени в первые 150 мин носит линейный характер, а затем запределивается и через 3 ч выход активного компонента составляет 95,0-98,0% (рисунок 4 а).

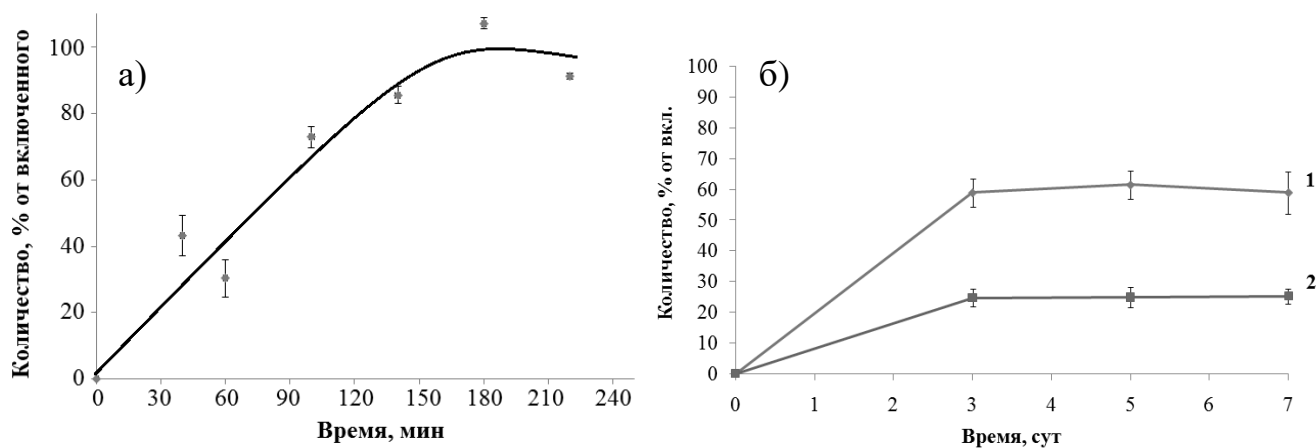


Рисунок 4. – Кинетика высвобождения *ТКК* в среде Мурасиге-Скуга (а) и в воде из частиц Пект-Са, содержащих (1) 5,0 и (2) 55,0 масс.% кислоты (б)

Доля *ТКК*, высвобождающаяся из частиц Пект-Са, содержащих 5,0 масс.% кислоты, через 3 сут выдерживания в дистиллированной воде достигает ~ 50,0-60,0% (рисунок 4 б). В то же время из частиц, содержащих 55,0 масс.% *ТКК*, выход активного компонента через 3 сут составляет 25,0% от включенного. При этом в обоих случаях количество высвободившейся кислоты не изменяется при дальнейшем (до 7 сут) выдерживании образцов в воде (рисунок 4 б).

Частицы Пект-Са, содержащие *транс*-коричную кислоту, увеличивают накопление фотосинтетических пигментов на ~ 17% при обработке семян кукурузы (эксперимент выполнен совместно с к.б.н. Калацкой Ж.Н. и к.б.н. Недведь Е.Л. в ГНУ «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича НАН Беларуси») [8].

В **четвертой** главе представлены и обсуждены результаты изучения методом кварцевого микровзвешивания закономерностей формирования мультислойных пленок на основе хитозана (Хит) или полиэтиленimina (ПЭИ) и пектина (Пект), декстран сульфата (Декст) и КМЦ на кварцевых и кремниевых подложках, а также влияния природы полиэлектролита и количества бислоев на свойства и морфологию их поверхности.

Формирование и свойства LbL-пленок на основе биополимеров. Методом послойного осаждения получены мультислойные пленки, которые можно разделить на две группы. В первой природные полисахариды используются как поликатион и полианион, во второй - синтетический поликатион и природный полианион.

При использовании полисахаридов как в качестве поликатионного, так и полианионного компонента мультислойной системы зависимость изменения частоты колебания кварцевого резонатора с увеличением числа адсорбированных на нем бислоев от 1 до 10 носит линейный характер (рисунок 5 а). Среди изученных полисахаридных пар наиболее толстые пленки формируются при

чередующейся адсорбции хитозана с пектином ($h_{\text{бислоя}} = 8,7 \pm 0,4$ нм), а тонкие – хитозана с декстраном ($h_{\text{бислоя}} = 2,3 \pm 0,3$ нм). Для (Хит)/КМЦ_n толщина первого бислоя составляет $1,5 \pm 0,2$ нм, а со второго по десятый – $5,5 \pm 0,8$ нм, то есть линейный рост наблюдается со второго бислоя.

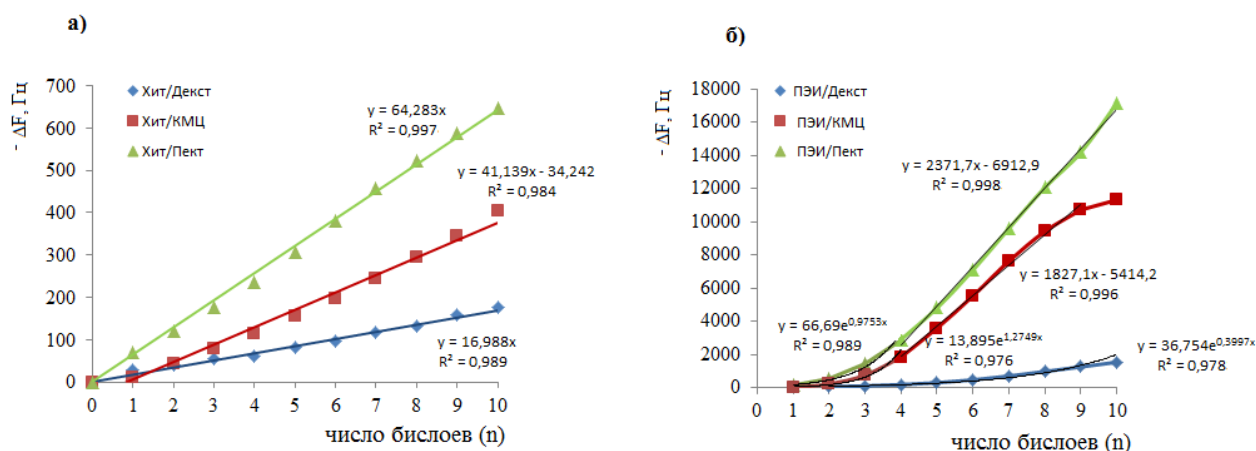


Рисунок 5. – Изменение частоты колебания (ΔF) кварцевого резонатора от числа адсорбированных на его поверхности бислоев в процессе формирования мультислойных пленок

Для ПЭИ-содержащих пленок характерен экспоненциальный рост зависимости изменения частоты колебания кварцевого резонатора от числа адсорбированных бислоев (рисунок 5 б), которая подчиняется уравнению:

$-\Delta F = f_1 \cdot \exp(\beta \cdot n) - f_2$, где f_1 и f_2 – кинетические факторы роста пленок («kinetic scaling factor»), а β – характеристический параметр силы экспоненциального роста или «силовой фактор» («strength factor»).

Среди всех изученных систем пленки на основе Декст и ПЭИ характеризуются самым слабым экспоненциальным ростом ($\beta = 0,3997$): толщина первого бислоя в них составляет $1,8 \pm 0,3$ нм, а к 10-му бислою увеличивается в ~ 20 раз и достигает $38,3 \pm 2,8$ нм (рисунок 5 б). Иная зависимость наблюдается для пленок на основе пектина и КМЦ: экспоненциальный рост с высоким «силовым фактором» регистрируется для первых четырех бислоев ($\beta = 0,9755$ и $1,2749$ для (ПЭИ/Пект)_{n=1-4} и (ПЭИ/КМЦ)_{n=1-4} соответственно), а далее наблюдается линейная зависимость роста толщины пленки (рисунок 5 б). Для ПЭИ и Хит толщина пленок в зависимости от используемого полианиона увеличивается в ряду Декст – КМЦ – Пект.

При формировании первых четырех бислоев пленки на основе ПЭИ и Декст ее поверхность остается морфологически однородной, бездефектной с показателем шероховатости ≤ 4 нм (рисунок 6 а). В то же время мультислойная система (ПЭИ/Декст)₁₀ характеризуется изменением морфологии: поверхность пленки становится неоднородной, в ней наблюдаются «впадины» глубиной до 20-70 нм.

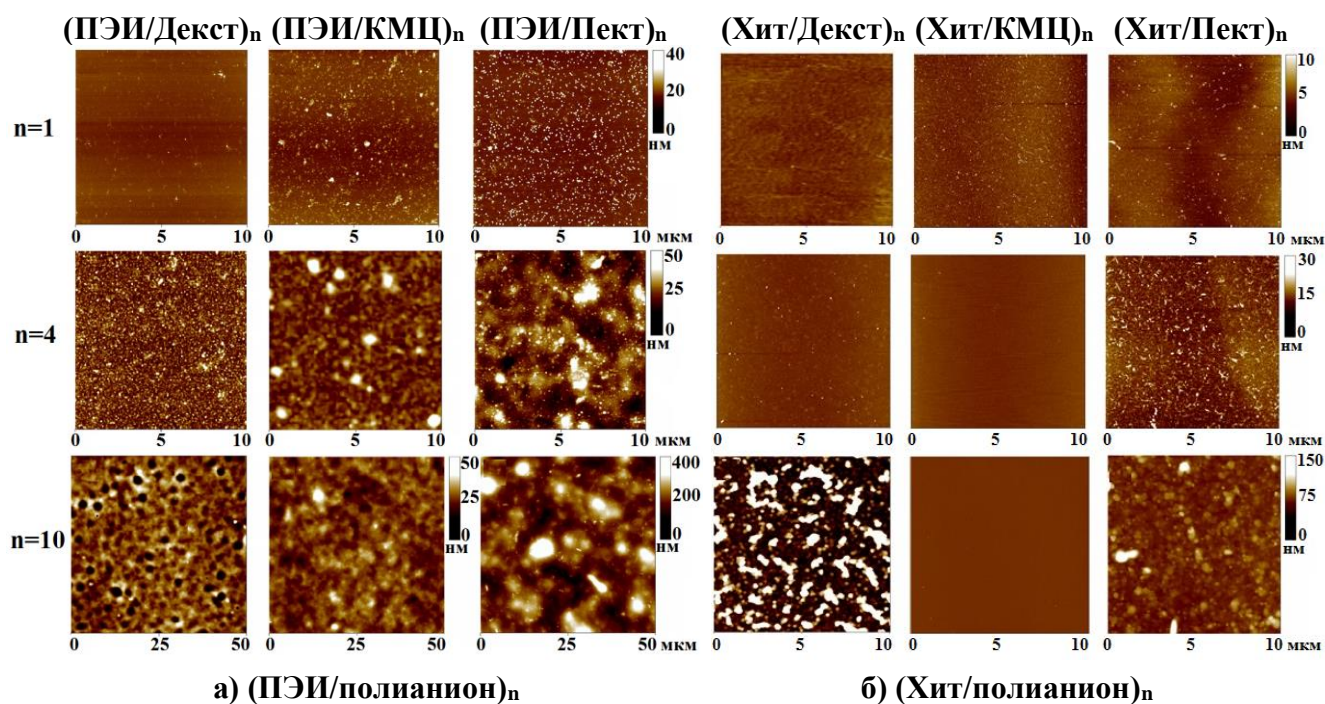


Рисунок 6. – АСМ-изображения поверхности пленок

Для бислоев ПЭИ/КМЦ и ПЭИ/Пект характерна неоднородная поверхность: полисахариды адсорбируются на ПЭИ в виде агрегатов округлой формы, высота которых достигает 30 нм (рисунок 6 а). Система (ПЭИ/Пект)₄ характеризуется наличием отдельных выступающих элементов размерами $\sim 1,0 \div 2,0$ мкм и высотой до 80 нм. Дальнейшая адсорбция компонентов приводит к увеличению неоднородности: перепады по высоте поверхности пленки достигают 1 мкм (рисунок 6 а). В случае (ПЭИ/КМЦ)_n морфология поверхности для $n = 1$ и 4 практически идентична: неоднородна, с небольшими выступающими элементами, высота которых составляет до 50 нм (рисунок 6 а).

Полученные на основе хитозана полиэлектролитные пленки, для которых характерен линейный рост толщины от числа бислоев, являются более гладкими и морфологически однородными по сравнению с ПЭИ-содержащими (рисунок 6 б). Так, для всех изученных бислоев $R_{ms} \leq 0,5$ нм, а для 4-х бислойных систем менее 3,0 нм. При дальнейшем увеличении числа слоев шероховатость поверхности пленок увеличивается только для (Хит/Декст)₁₀ и достигает $30,4 \pm 6,2$ нм, а для (Хит/КМЦ)₁₀ и (Хит/Пект)₁₀ значения $R_{ms} < 5,0$ нм.

Мультислойные покрытия, сформированные на основе хитозана ($n=1-10$), оказывают вязкостную для (Хит/КМЦ)_n и вязкоэластичную в случае (Хит/Пект)_n и (Хит/Декст)_n нагрузку на кварцевый резонатор (рисунок 7 а). В то же время вязкоэластичные свойства ПЭИ-содержащих пленок зависят от числа бислоев и типа входящего в их состав полианиона. Так, мультислои (ПЭИ/Декст)_n для $n=1-10$ и (ПЭИ/КМЦ)_n для $n=1-3$ являются эластичными (рисунок 7 б). Адсорбция компонентов 4-го и последующих бислоев для пленки (ПЭИ/КМЦ)_n приводит к

существенному изменению ее свойств: наблюдается переход через вязкоэластичные для $n=4-6$ ($\text{tg}(\Delta F/\Delta R)=13,9$) к вязким ($\text{tg}(\Delta F/\Delta R) = 2,2$) для $n=7-10$. При чередующейся адсорбции ПЭИ и Пект свойства формируемых покрытий также зависят от числа адсорбированных бислоев: для $n=1-5$ пленка оказывает вязкоэластичную нагрузку на резонатор ($\text{tg}(\Delta F/\Delta R)= 34,0$), а для $n=6-10$ - вязкостную ($\text{tg}(\Delta F/\Delta R)=3,4$). Таким образом, вязкоэластичные свойства пленок, характеризующихся линейным ростом толщины, не зависят от числа бислоев, в то время как для экспоненциально растущих мультислойных систем определяются числом слоев.

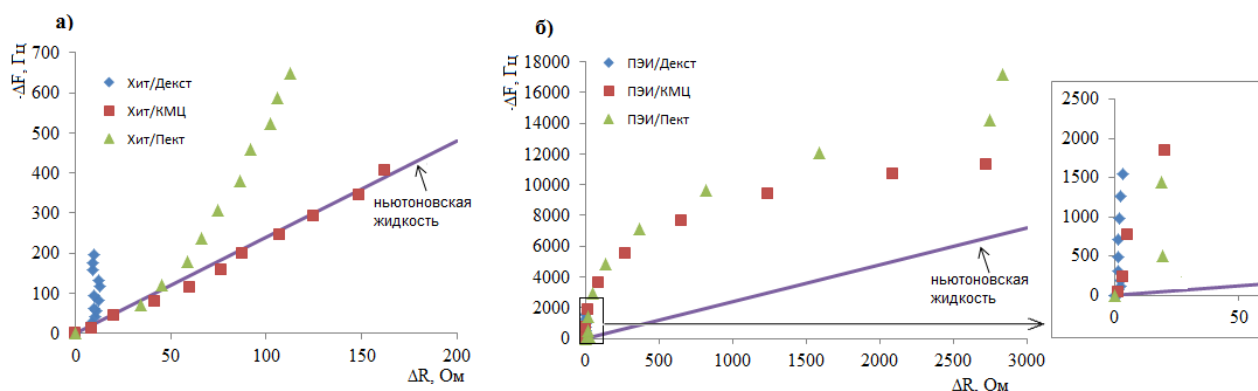


Рисунок 7. – Зависимость изменения частоты колебания (ΔF) кварцевого резонатора от его сопротивления (ΔR) в процессе формирования 10-ти бислоевой системы

Значения модуля эластичности, рассчитанные по силовым кривым, записанным на атомно-силовом микроскопе, для 4-х бислоевых хитозансодержащих пленок составляют $27,0 \div 47,0$ МПа, а для ПЭИ-содержащих – $87,0 \div 120,0$ МПа. Увеличение числа бислоев с 4 до 10 для ПЭИ-содержащих пленок приводит к уменьшению модуля эластичности в $2,2-3,2$ раза, при этом его значения сопоставимы со значениями модуля для пленок на основе Хит.

Все типы сформированных полисахаридсодержащих пленок устойчивы при стерилизации в 70%-ном этиловом спирте или 3%-ной перекиси водорода, а также в ростовой среде для культивирования МСК.

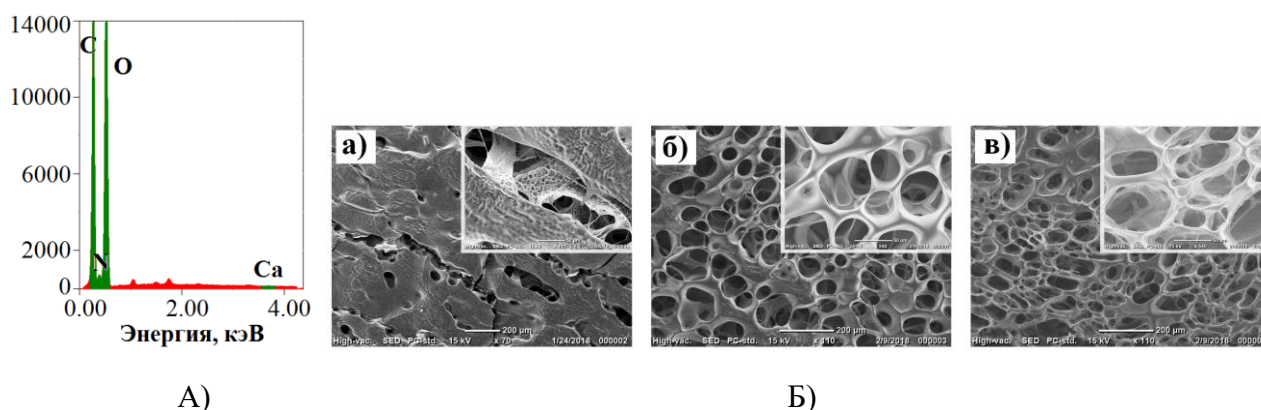
Совместно с к.б.н. Пинчуком С.В. в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» показано [3, 4, 23, 26, 31], что МСК эффективно адгезируют на вязкоэластичных бездефектных ультратонких хитозансодержащих пленках и формируют на них монослойную культуру фибробластоподобных клеток с высокой жизнеспособностью. На «жестких» 4-х бислоевых пленках на основе ПЭИ визуализируются лишь отдельные жизнеспособные клетки и большое количество некротических. Для пленок с положительно заряженным верхним слоем ПЭИ количество адгезированных в жизнеспособном состоянии МСК несколько повышается. В то же время МСК адгезируют эффективно и

находятся в жизнеспособном состоянии на 10-бислойных ПЭИ-содержащих пленках, эластичные свойства которых близки к системам на основе хитозана. На полиэлектролитных мультислойных системах, чем больше шероховатость поверхности и жесткость пленок, тем меньше на них адгезируют МСК и мало жизнеспособных клеток.

Сформированные мультислойные пленки пригодны для модификации планарных и непланарных поверхностей. На пористой ПДМС матрице, модифицированной (хитозан/пектин)₄, МСК формируют монослойную культуру фибробластоподобных клеток с высокой жизнеспособностью [5, 29].

В пятой главе описаны способ получения пористых скаффолдов на основе пектинов, а также влияние молекулярной массы пектина и степени его этерификации на их физико-химические характеристики.

Пористые скаффолды на основе пектинов. Пористые скаффолды получены методом криоструктурирования растворов пектинов. Сформированные скаффолды имеют взаимосвязанную пористую структуру с размером пор 70,0-120,0 мкм (рисунок 8).



а) Пект-А; б) Пект-ВМ; в) Пект-НМ. На вставке показана взаимосвязанность пор микроструктур. Масштабная линейка 200 мкм

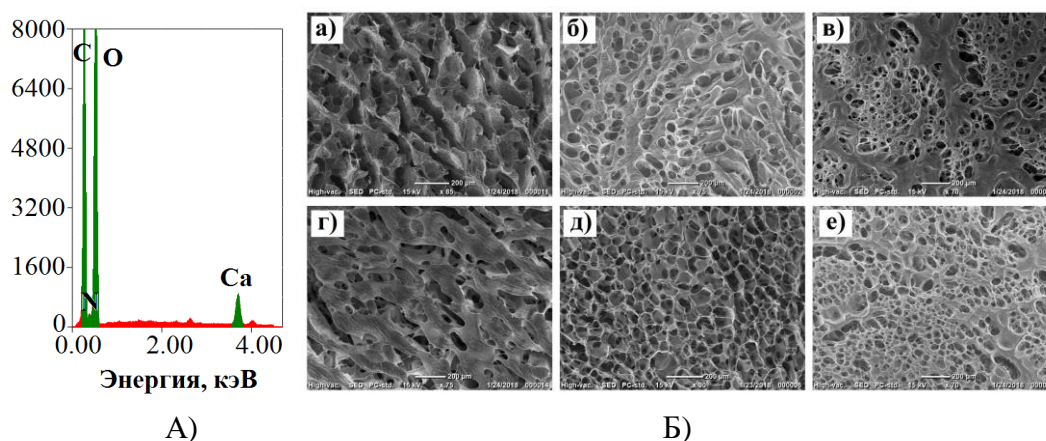
Рисунок 8. – ЭДР-спектр (А) и СЭМ-изображения (Б) пористых скаффолдов

Для повышения устойчивости скаффолдов в физиологических растворах пектиновые цепи были сшиты хлоридами Ca или Mg. Использование Ca²⁺ в качестве сшивающего агента способствует образованию более прочных связей, что приводит к повышению устойчивости скаффолдов в воде и фосфатном буфере. Все типы скаффолдов, за исключением на основе Пект-НМ, сшитых катионами Mg²⁺, неустойчивы в исследованных растворах: они либо полностью разлагаются менее чем за 30 минут, либо подвергаются частичной деградации полимерной матрицы. “Сшитые” скаффолды на основе Пект-НМ независимо от выбранного двухвалентного катиона (Ca²⁺ или Mg²⁺) и его количества в реакционной среде более устойчивы в воде и фосфатном буфере по сравнению с

другими типами матриксов. Высокометоксилированный пектин (Пект-ВМ) обладает меньшим количеством свободных карбоксильных групп по сравнению с Пект-НМ и Пект-А, и в результате “сшитые” скаффолды на его основе быстро деградируют в водных средах.

В энергодисперсионных рентгеновских (ЭДР) спектрах всех “сшитых” скаффолдов появляется интенсивный пик при 3,69 кэВ (рисунок 9 А), соответствующий кальцию, что подтверждает протекание реакции сшивки. Образование связей между Ca^{2+} и карбоксильными группами макромолекул пектина доказано также методом ИК-спектроскопии.

После сшивки Ca^{2+} пористая структура скаффолдов сохраняется (рисунок 9 Б). Морфология и размер пор матриксов на основе Пект-А, полученных при соотношении пектин: CaCl_2 1:10, практически идентичны “несшитым” скаффолдам. Для “сшитых” матриксов Пект-ВМ размер пор уменьшается в зависимости от концентрации Ca^{2+} и составляет $84,0 \pm 31,0$ и $56,0 \pm 19,0$ мкм для соотношений Пект-ВМ: CaCl_2 1:1 и 1:10 соответственно. Скаффолды на основе Пект-НМ в отличие от Пект-ВМ имеют средний размер пор $62,0-70,0$ мкм как для исходных, так и для “сшитых” образцов. Все полученные матриксы характеризуются высокой пористостью (82,0-94,0%). Плотность скаффолдов составляет $30,8-43,8$ мг/см³ и она существенно не зависит от условий сшивки и типа используемого пектина.



а, г) Пект-А; б, д) Пект-ВМ; в, е) Пект-НМ. Соотношение пектин: CaCl_2 1:1 (а-в) и 1:10 (г-е). Масштабная линейка 200 мкм

Рисунок 9. – ЭДР-спектр (А) и СЭМ-изображения (Б) “сшитых” пористых скаффолдов

3D скаффолды в качестве противоспаечных мембран. “Сшитые” катионами Ca^{2+} скаффолды с контролируемой скоростью биodeградации в брюшной полости получены при массовом соотношении пектин: CaCl_2 1:1 или 1:10. При этом “сшитые” при соотношении пектин: CaCl_2 1:1 матриксы полностью растворяются в брюшной полости через 8 дней, характеризуются отсутствием осложнений, противоспаечным эффектом и способностью прикреплять МСК с сохранением их

жизнеспособности (работа выполнена совместно с к.м.н. Журой А.В. в БГМУ). Количество живых МСК, снятых с поверхности скаффолдов через 3 ч, составляет 97,0-98,0%, а через 5 ч - 85,0-90,0% [6, 9, 27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации:

1. Разработана методика получения гидрогелевых частиц пектината кальция с ζ -потенциалом $-(16,4-20,0)$ мВ и диаметром от 50,0 до 360,0 нм, в том числе содержащих низкомолекулярные биологически активные вещества (масс.%): иммуномодулятора L-лизил-L-глутаминовой кислоты - до 61,0; цитостатика иматиниба метансульфоната - 60,0; антисептика мирамистина - 70,0; регулятора роста растений *транс*-коричной кислоты - 56,0. Использование частиц в качестве носителя для иматиниба метансульфоната увеличивает его цитотоксичность в 3 раза по сравнению с нативной формой препарата и LC_{50} составляет 0,12 и 0,37 мкг/мл соответственно. Частицы пектината кальция, содержащие *транс*-коричную кислоту, увеличивают накопление фотосинтетических пигментов на ~ 17,0% при обработке семян кукурузы. Для композита на основе хлопчатобумажной ткани (бязи) и ПДМС, содержащего субмикронные частицы пектината кальция с включенным мирамистином, характерно пролонгированное высвобождение лекарственного вещества (за 10 мин – 14,0%, за 3 сут – 100,0%) [1, 2, 7, 8, 13–20, 22, 24, 25, 30, 32].

2. Показано, что путем чередующейся адсорбции отрицательно заряженных полисахаридов (пектина, декстран сульфата, карбоксиметилцеллюлозы) и поликатиона хитозана формируются мультислойные пленки, для которых характерны линейный рост их толщины от числа бислоев ($n=1-10$), морфологически однородная бездефектная поверхность с $R_{ms} < 5,0$ нм, за исключением $(Хит/Декст)_{10}$ с $R_{ms} 30,4 \pm 6,2$ нм, и преимущественно вязкоэластичные свойства. В мультислойной системе при замене хитозана на синтетический поликатион ПЭИ шероховатость поверхности пленок значительно увеличивается: для пленки $(ПЭИ/Декст)_{10}$ наблюдаются «впадины» глубиной до 20-70 нм, а перепады по высоте поверхности $(ПЭИ/Пект)_{10}$ достигают 1 мкм, зависимость их толщины от числа бислоев носит экспоненциальный характер, при этом механические свойства изменяются от эластичных до вязких при увеличении числа адсорбированных бислоев от 1 до 10 [3, 4, 10–12, 21, 23, 28, 31, 33].

Установлено, что толщина бислоя в пленках (хитозан/полисахарид) $_{10}$, полученных адсорбцией компонентов из их водных растворов с концентрацией 1,0-2,0 мг/мл, составляет: Хит/Пект – $8,7 \pm 0,4$ нм, Хит/Декст – $2,3 \pm 0,3$ нм, Хит/КМЦ – $1,5 \pm 0,2$ нм для первого бислоя и $5,5 \pm 0,8$ нм – со второго по десятый.

Значения локального модуля Юнга для сухих покрытий (хитозан/полисахарид)₄ составляют 27 МПа для (Хит/Декст)₄, 33 МПа для (Хит/Пект)₄ и 47 МПа для (Хит/КМЦ)₄ [3, 4, 10–12, 21, 23, 28].

3. Разработаны ультратонкие покрытия (хитозан/пектин)₄ и (хитозан/декстран)₄ толщиной < 100 нм, обеспечивающие эффективную иммобилизацию и сохранение жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток (95,0-98,0%). При модификации пористой ПДМС матрицы мультислоем (хитозан/пектин)₄ увеличивается эффективность адгезии МСК, которые формируют монослойную культуру фибробластоподобных клеток с жизнеспособностью более 90,0% [3–5, 23, 26, 29, 31, 33].

4. Разработан способ получения на основе пектинов 3D скаффолдов с пористостью 82,0-94,0% и регулируемой скоростью биodeградации, размером пор и плотностью. Сформированы скаффолды со взаимосвязанной пористой структурой, размером пор 70,0-120,0 мкм и плотностью 30,8–43,8 мг/см³, которая существенно не зависит от условий сшивки и типа используемого пектина. Созданные при соотношении пектин:CaCl₂ 1:1 3D скаффолды полностью растворяются в брюшной полости через 8 дней, биосовместимы, характеризуются отсутствием осложнений, противовоспалительным эффектом и обеспечивают эффективную адгезию МСК с сохранением их жизнеспособности, которая для МСК, снятых с поверхности скаффолдов через 3 ч, составляет 97,0-98,0%, а через 5 ч - 85,0-90,0%. Впервые *in vivo* показана высокая эффективность использования полученных при соотношении пектин:CaCl₂ 1:1 скаффолдов в качестве противовоспалительной мембраны в лечении перитонеальных спаек [6, 9, 27, 33].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Полученные частицы пектината кальция могут быть использованы в разработке композиционных носителей БАВ в фармацевтике (акт испытания на биологическом факультете БГУ от 15.06.2016, акт испытания в Институте экспериментальной ветеринарии от 27.05.2019), биотехнологии (акт испытания на биологическом факультете БГУ от 21.10.2020) и сельском хозяйстве (акт испытаний в Институте экспериментальной ботаники НАН Беларуси от 14.08.2019). Сформированные ультратонкие покрытия на основе хитозана и пектина пригодны для модификации имплантатов и в качестве носителей МСК в клеточной инженерии (акт испытания в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси от 17.05.2017). Созданные 3D скаффолды перспективны в качестве объемного матрикса для доставки МСК и в качестве противовоспалительных мембран при лечении перитонеальных спаек брюшной полости (акт испытания в БГМУ от 10.04.2019, лабораторный регламент совместно с БГМУ).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в научных журналах, входящих в Перечень научных изданий, рекомендованных ВАК Беларуси:

1. Получение и свойства наночастиц пектината кальция / А. Н. Красковский, К. С. Гилевская, В. И. Куликовская, В. Е. Агабеков // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2014. – № 1. – С. 51-56.

2. Красковский, А. Н. Мирамистинсодержащие композиционные материалы на основе бязи и полидиметилсилоксана / А. Н. Красковский, Д. И. Егоров, И. В. Парибок // Молодежь в науке–2015: прил. к журн. «Весці Нац. акад. навук Беларусі». В 5 ч. Ч.1. Сер. хім. навук / Нац. акад. наук Беларусі. Совет молодых ученых НАН Беларусі; редкол: С.А. Усанов (гл. ред.), В.В. Гниломедов [и др.]. – Минск: Беларус. навука, – 2016. – С. 40-45.

3. Биополимерные мультислойные пленки в качестве носителей мезенхимальных стволовых клеток / В. И. Куликовская, К. С. Гилевская, С. В. Пинчук, А. Н. Красковский, И. Б. Василевич, К. А. Матиевский, В. Е. Агабеков, И. Д. Волотовский // Доклады НАН Беларусі. – 2017. – Т. 61, № 3. – С. 38-46.

4. Layer-by-Layer Buildup of Polysaccharide-containing Films: Physico-Chemical Properties and Mesenchymal Stem Cells Adhesion / V. I. Kulikouskaya, S. V. Pinchuk, K. S. Hileuskaya, A. N. Kraskouski, I. B. Vasilevich, K. A. Matsieuski, V. E. Agabekov, I. D. Volotovski // Journal of Biomedical Materials Research: Part A. – 2018. – Vol. 106A, I. 8. – P. 2093-2104.

5. Пленки полидиметилсилоксана, модифицированные мультислоями хитозан/пектин, - носители мезенхимальных стволовых клеток / В. И. Куликовская, И. В. Парибок, С. В. Пинчук, А. Н. Красковский, И. Б. Василевич, К. А. Матиевский, В. Е. Агабеков, И. Д. Волотовский // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54, № 5. – С. 465-471.

6. Fabrication and characterization of pectin-based 3D porous scaffolds suitable for treatment of peritoneal adhesions / V. Kulikouskaya, A. Kraskouski, K. Hileuskaya, A. Zhura, S. Tratsyak, V. Agabekov // Journal of Biomedical Materials Research: Part A. – 2019. – Vol. 107, I. 8. – P. 1814-1823.

7. Получение и свойства гидрогелевых наночастиц пектината кальция с транс-коричной кислотой / А. Н. Красковский, В. И. Куликовская, О. В. Молчан, К. С. Гилевская, В. М. Юрин, В. Е. Агабеков // Доклады НАН Беларусі. – 2020. – Т. 64, № 2. – С. 164-172.

8. Нано- и субмикрометровые частицы пектината кальция в качестве носителей регуляторов роста растений / А. Н. Красковский, В. И. Куликовская, К. С. Гилевская, Ж. Н. Калацкая, Е. Л. Недведь, Н. А. Ламан, В. Е. Агабеков // Журнал прикладной химии. – 2020. – Т. 93, № 4. – С. 498-505.

Статьи в других научных изданиях:

9. Использование биodeградируемых материалов на основе альгината и пектинов в профилактике спайкообразования / А. В. Жура, В. И. Куликовская, К. С. Гилевская, А. Н. Красковский, С. И. Третьяк, В. Е. Агабеков // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2019. – Т. 16, № 1. – С. 46-55.

Статьи в сборниках материалов конференций:

10. Морфология и упругие свойства полисахаридных пленок / А. Н. Красковский, К. С. Гилевская, Е. А. Скопцов, Е. А. Грачева, В. И. Куликовская, В. Е. Агабеков // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : сб. докл. XI Междунар. конф., Минск, 21-24 окт. 2014 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т тепло – и массообмена им. А. В. Лыкова ; редкол.: С. А. Чижик (пред.) [и др.]. – Минск : Беларуская навука, 2014. – С. 101-107.

11. Effect of the sterilization method on the morphology of polyelectrolyte films / A. N. Kraskouski, K. S. Hileuskaya, I. V. Paribok, V. I. Kulikouskaya, V. E. Agabekov // Nanomeeting-2015: Proceedings of International Conference, Minsk, 26–29 May 2015. – Minsk, 2015. – P. 499-502.

12. Анализ морфологии и эластичных свойств ультратонких биополимерных LbL-пленок методом атомно-силовой микроскопии / Т. М. Жданко, А. Н. Красковский, В. И. Куликовская, В. Е. Агабеков // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : сб. докл. XIII Междунар. конф., Минск, 16-19 окт. 2018 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т тепло – и массообмена им. А. В. Лыкова ; редкол.: С. А. Чижик (пред.) [и др.]. – Минск : Беларуская навука, 2018. – С. 204-211.

Тезисы докладов конференций:

13. Получение и свойства наночастиц пектината кальция / К. С. Гилевская, В. И. Куликовская, А. Н. Красковский, В. Е. Агабеков // Химия поверхности и нанотехнология : тез. докл. пятой всерос. конф. (с междунар. участием), Санкт-Петербург-Хилово, Псковская область, 24-30 сентября 2012 г. – СПб. : СПбГТИ, 2012. – С. 225-226.

14. Куликовская, В.И. Наночастицы пектината кальция, содержащие бычий сывороточный альбумин / В. И. Куликовская, А. Н. Красковский // Новые функциональные материалы, современные технологии и методы исследования : материалы II Республиканской научно-технической конференции молодых ученых, Гомель, 2-4 октября 2012 г. – Гомель: ИММС НАН Беларуси, 2012. – С. 31-32.

15. Получение лиофилизированных порошков полисахаридных наночастиц в присутствии криопротекторов / А. Н. Красковский, В. И. Куликовская, Т. Г. Шутова, В. Е. Агабеков // Полимерные композиты и трибология» (ПОЛИКОМТРИБ-2013) : тезисы докладов Международной научно-технической конференции, Гомель, 24-27 июня 2013 г. – Гомель: ИММС НАН Беларуси, 2013. – С. 168.

16. Наночастицы пектината кальция, содержащие иматиниба метансульфонат / А. Н. Красковский, К. С. Гилевская, Т. Г. Шутова, В. Е. Агабеков // Наноразмерные системы: строение, свойства, технологии (НАНСИС-2013) : тезисы IV Международной научной конференции, Киев, 19-22 ноября 2013 г. / редкол.: А. Г. Наумовец [и др.]. – Киев, 2013. – С. 63.

17. Исследование цитотоксического действия новых форм препарата Иматиниб на клетках миелобластомы человека K562 / М. С. Чумаченко, А. Н. Красковский, Т. Г. Шутова, Ю. В. Синютнич, М. В. Шолух // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы : материалы XII Международной конференции, Минск, 11-12 апреля 2014 г. / редкол.: В. А. Прокашева [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2014. – С. 260-263.

18. Морфология и структура полисахаридных и полисахарид-неорганических частиц / А. Н. Красковский, А. С. Егоров, К. С. Гилевская, В. И. Куликовская, В. Е. Агабеков // РКЭМ-2014: тезисы докладов XXV Российской конференции по электронной микроскопии, Черногоровка, Россия, 2-6 июня 2014 г. – Черногоровка, 2014. – С. 596-597.

19. Kraskouski, A. N. Preparation of the submicron pectinate particles with miramistin / A. N. Kraskouski, V. I. Kulikouskaya, V. E. Agabekov // High-Tech in Chemical Engineering : abstracts of XV International Scientific Conference, Zvenigorod, Russia, 22-26 September 2014 / M.: Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies (MITHT Publisher). – Zvenigorod, 2014. – P. 150.

20. Частицы пектината кальция, содержащие L-лизил-L-глутаминовую кислоту / А. Н. Красковский, К. С. Гилевская, В. И. Куликовская, З. И. Куваева // Наноструктурные материалы-2014: Беларусь-Россия-Украина (НАНО-2014) : материалы IV Междунар. науч. конф., Минск, 7–10 октября 2014 г. / редкол.: П. А. Витязь (пред.) [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2014. – С. 81.

21. Мультислойные тонкопленочные покрытия на основе хитозана / А. Н. Красковский, К. С. Гилевская, В. И. Куликовская, В. Е. Агабеков // Современные проблемы химической физики: тезисы докладов IV Международной конференции, Ереван, Армения, 5-9 октября 2015 г. – Ер.: Институт химической физики им. А.Б. Налбандяна НАН РА, 2015. – С. 137-138.

22. Красковский, А. Н. Новые композиционные материалы, содержащие мирамистин / А. Н. Красковский, Д. И. Егоров, И. В. Парибок // Молодежь в

науке: материалы X Международной научной конференции, Минск, 1-4 декабря 2015 г. – Минск, 2015. – С. 323.

23. Biopolymer Layer-by-Layer films as substrate for mesenchymal stem cells adhesion / A. N. Kraskouski, K. S. Hileuskaya, V. I. Kulikouskaya, S. V. Pinchuk, I. B. Vasilevich, V. E. Agabekov, I. D. Volotovskii // ICOMF16 - LB16 : abstracts of 16th International Conference on Organized Molecular Films, Helsinki, Finland, July 25-29 2016. – Helsinki, 2016. – P. 173.

24. Влияние наночастиц пектината кальция на ростовые параметры суспензионных культур *vinca sp. in vitro* / О. В. Молчан, П. А. Драгун, А. Н. Красковский, В. И. Куликовская, В. М. Юрин, В. Е. Агабеков // Наноструктурные материалы-2016: Беларусь-Россия-Украина (НАНО-2016) : материалы V Междунар. науч. конф., Минск, 22-25 ноября 2016 г. / редкол.: П. А. Витязь (пред.) [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2016. – С. 421-423.

25. Красковский, А. Н. Частицы пектината кальция, содержащие коричную кислоту / А. Н. Красковский, В. И. Куликовская // Полимерные композиты и трибология (ПОЛИКОМТРИБ-2017) : тезисы докладов Международной научно-технической конференции, Гомель, 27-30 июня 2017 г. – Гомель: ИММС НАН Беларуси, 2017. – С. 214.

26. Тонкопленочные материалы на основе полисахаридов для клеточной инженерии / В. И. Куликовская, К. С. Гилевская, С. В. Пинчук, А. Н. Красковский, К. А. Матиевский // Новые материалы : сб. материалов Третьего междисциплинарного молодежного научного форума с международным участием, Москва, Россия, 21-24 ноября 2017 г. – М: ООО «Буки Веди», 2017. – С. 777-780.

27. Formation of 3D Porous Scaffolds Based on Pectins for Tissue Engineering / Aliaksandr Kraskouski, Alexandr Zhura, Kseniya Hileuskaya, Viktoryia Kulikouskaya, Stanislau Tratyak, Vladimir Agabekov // ISBPPB 2018 : book of abstracts of 4th International Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials, Kraków, Poland, 15-18 July 2018. – P. 78.

28. Formation and physico-chemical properties of chitosan and polyethyleneimine containing LbL films / Viktoryia Kulikouskaya, Kseniya Hileuskaya, Aliaksandr Kraskouski, Tsimafei Zhdanko, Vladimir Agabekov // ISBPPB 2018 : book of abstracts of 4th International Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials, Kraków, Poland, 15-18 July 2018. – P. 26.

29. Porous poly(dimethylsiloxane) as substrate for mesenchymal stem cells adhesion / Vladimir Agabekov, Irina Paribok, Aliaksandr Kraskouski, Sergei Pinchuk, Irina Vasilevich, Kirill Matievski, Igor Volotovskii // ESB 2018 : book of abstracts of 29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials, Maastricht, Netherlands, 9–13 September 2018. – P. 621-622.

30. Calcium pectinate particles as carriers for biologically active substances / A. Kraskouski, K. Hileuskaya, V. Kulikouskaya, E. Stepanova, I. Kuzminski, V. Agabekov

// Book of abstracts of 6th NanoToday Conference, Lisbon, Portugal, 16–20 June 2019. – P3.13.

31. Fabrication of 2D and 3D scaffolds for stem cells based on polyelectrolyte complexes of polysaccharides / V. Kulikouskaya, S. Pinchuk, K. Hileuskaya, A. Kraskouski, V. Agabekov, I. Volotovski // Book of abstracts of 6th NanoToday Conference, Lisbon, Portugal, 16–20 June 2019. – P3.5.

32. Красковский, А. Н. Гидрогелевые частицы на основе пектина и хитозана: получение, свойства и перспективы применения в сельском хозяйстве / А. Н. Красковский, В. И. Куликовская // Молодежь в науке-2019 : тезисы докладов XVI Международной научной конференции молодых ученых, Минск, 14-17 октября 2019 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Совет молодых ученых ; редкол.: В. Г. Гусаков (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2019. – С. 541-542.

33. Куликовская, В. И. Биополимерные носители для стволовых клеток: получение, свойства и перспективы применения / В. И. Куликовская, К. С. Гилевская, А. Н. Красковский // Сборник научных трудов Международной конференции молодых ученых «Наука и инновации», Ташкент, Узбекистан, 1 ноября 2019 г. – С. 281-282.

РЕЗЮМЕ

Красковский Александр Николаевич

Получение и свойства нано- и микроструктурированных носителей различного функционального назначения на основе пектинов

Ключевые слова: *метод послойного осаждения полиэлектролитов, пектин, полисахариды, ионотропное гелеобразование, наночастицы, мультислойные покрытия, криоструктурирование, скаффолды*

Цель работы: установить физико-химические закономерности формирования на основе пектинов биосовместимых и биоразлагаемых нано- и субмикронных частиц в качестве носителей биологически активных веществ (БАВ), мультислойных ультратонких пленок и 3D скаффолдов для иммобилизации мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Методы исследования: метод динамического светорассеяния; метод кварцевого микровзвешивания; атомно-силовая, сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия; УФ- и ИК-спектроскопия.

Полученные результаты и их новизна: разработана методика получения нано- и субмикронных частиц пектината кальция, содержащих низкомолекулярные биологически активные вещества (масс.%): L-лизил-L-глутаминовой кислоты - до 61,0; иматиниба метансульфоната - 60,0; мирамистина - 70,0; *транс*-коричной кислоты - 56,0; установлены закономерности формирования мультислойных пленок на основе полисахаридов; установлена взаимосвязь между компонентным составом пленок и их физико-химическими, вязкоэластичными и биологическими свойствами; впервые на основе пектинов созданы пористые 3D скаффолды с регулируемой скоростью биodeградации, размером пор и плотностью.

Частицы пектината кальция могут быть использованы в разработке композиционных носителей БАВ в фармацевтике и сельском хозяйстве. Пленки на основе хитозана и пектина пригодны для модификации имплантатов и в качестве носителей МСК в клеточной инженерии. 3D скаффолды перспективны как матрицы для доставки МСК и в качестве противоспаечных мембран при лечении перитонеальных спаек брюшной полости.

Область применения: химия поверхностных явлений, физическая химия, биоматериаловедение, нанотехнологии.

РЭЗІЮМЭ

Краскоўскі Аляксандр Мікалаевіч

Атрыманне і ўласцівасці нана- і мікраструктурыраваных носьбітаў рознага функцыянальнага прызначэння на аснове пектынаў

Ключавыя словы: *метад паслойнага асаджэння поліэлектралітаў, пектын, поліцукрыды, іёнатропнае гелеўтварэнне, наначасціцы, мультыслойныя пакрыцці, крыяструктураванне, скафалды*

Мэта працы: устанавіць фізіка-хімічныя заканамернасці фарміравання на аснове пектынаў біясумяшчальных і біяраскладальных нана- і субмікронных часціц у якасці носьбітаў біялагічна актыўных рэчываў (БАР), мультыслойных ўльтратонкіх плёнак і 3D скафалдаў для імабілізацыі мезенхімальна-ствалавых клетак (МСК).

Метады даследавання: метады дынамічнага светарассейвання; метады кварцавага мікраўзважвання; атамна-сілавая, сканавальная і прасвечваючая электронная мікраскапія; УФ- і інфрачырвоная спектраскапія.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацавана метадыка атрымання нана- і субмікронных часціц пектыната кальцыю, якія змяшчаюць нізкамалекулярныя біялагічна актыўныя рэчывы (мас.%): L-лізіл-L-глутамінавай кіслаты - да 61,0; іматыніба метансульфаната – 60,0; мірамісціна – 70,0; *транс*-карычнай кіслаты – 56,0; устаноўлены заканамернасці фарміравання мультыслойных плёнак на аснове поліцукрыдаў; устаноўлена ўзаемасувязь паміж кампанентным складам плёнак і іх фізіка-хімічнымі, вязкаэластычнымі і біялагічнымі ўласцівасцямі; упершыню на аснове пектынаў створаны порыстыя 3D скафалды з рэгуляванымі хуткасцю біядэградацыі, памерам пор і шчыльнасцю.

Часціцы пектыната кальцыю могуць быць выкарыстаны ў распрацоўцы кампазіцыйных носьбітаў БАР ў фармацэўтыцы і сельскай гаспадарцы. Пленкі на аснове хітазану і пектыну прыдатныя для мадыфікацыі імплантатаў і ў якасці носьбітаў МСК у клеткавай інжынерыі. 3D скафалды з'яўляюцца перспектыўнымі як матрыксы для дастаўкі МСК і ў якасці супрацьзнітовачных мембранаў пры лячэнні перытанеальных знітовак брушной поласці.

Вобласць выкарыстання: хімія паверхневых з'яў, фізічная хімія, біяматэрыялазнаўства, нанатэхналогіі.

SUMMARY

Kraskouski Aliaksandr Mikalaevich

Formation and properties of nano- and microstructured carriers of various functional purposes based on pectin

Key words: *method of layer-by-layer assembly of polyelectrolytes, pectin, polysaccharides, ionotropic gelation, nanoparticles, multilayer coatings, cryostructuration, scaffolds*

The aim of the thesis is to establish the physicochemical regularities of the formation on the basis of pectin the biocompatible and biodegradable nano - and submicron particles as carriers of biologically active substances (BAS), multilayer ultrathin films and 3D scaffolds, suitable for immobilization of mesenchymal stem cells (MSCs).

The methods of investigation are dynamic light scattering; quartz crystal microbalance technique; atomic force microscopy, scanning and transmission electron microscopy; UV and FTIR spectroscopy.

Results and their novelty: a method for preparation of nano- and submicron calcium pectinate particles containing low-molecular biologically active substances (L-lysyl-L-glutamic acid - up to 61,0 wt.%; imatinib methanesulfonate – 60,0; miramistin – 70,0; trans-cinnamic acid – 56,0) has been developed. The regularities of the formation of multilayer films based on polysaccharides have been established. The relationship between the component composition of the films and their physicochemical, viscoelastic and biological properties has been determined. Porous 3D scaffolds based on pectins with controlled biodegradation rate, pore size and density have been created for the first time.

The obtained calcium pectinate particles can be used in the development of composite carriers for BAS in pharmaceuticals and agriculture. Films based on chitosan and pectin are suitable for modification of implants and as carriers of MSCs in cell engineering. 3D scaffolds are promising as matrices for MSCs delivery and as anti-adhesion membranes in the treatment of peritoneal adhesions of the abdominal cavity.

Applications: chemistry of surface phenomena, physical chemistry, biomaterials, nanotechnology.