АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D060600 – «Химия»

Савденбекова Балжан Есимханкызы

Физико-химические основы получения антибактериальных покрытий для имплантируемых изделий

Диссертационная работа посвящена установлению условий получения антибактериальных нанопленок на основе полиэлетролитов и биоактивных соединений для медико-биологических изделий. Обоснованы использование в качестве полимерных матриц для мультислоев хитозана, карбоксиметилцеллюлозы натрия, полиакриловой кислоты, а в качестве перспективных антисептиков – хлоргексидин, триклозан и наночастицы серебра (НЧAg). Разработаны методика получения пленок методом полислойной сборки (LbL) и способы внедрения антибактериальных агентов в полученные пленки, предложен механизм формирования мультслоев, изучено влияние физико-химических параметров на морфологию поверхности тонких пленок, показана возможность прикладного использования исследованных материалов в качестве антибактериальных покрытий для имплантируемых систем. Все исследования в рамках диссертационной работы проведены впервые, результаты оформлены в виде статей, в том числе в рецензируемом журнале, и тезисов докладов международных конференций, а также получено положительное решение о выдаче патента РК на полезную модель.

Актуальность темы исследования. В практической медицине важной проблемой на сегодняшний день являются инфекционные заболевания, связанные с последствиями имплантируемых в организме медико-биологических изделий. Фиксация бактерий и развитие биопленки на поверхности имплантирующих биомедицинских устройств очень часто приводят к инфекциям и воспалениям, к сожалению, даже к необходимости их удаления, что сопровождается моральными и материальными затратами, а иногда и гибелью пациента. В связи с этим остро стоит вопрос ингибирования роста биопленки вокруг имплантата. Удаление и уничтожение образовавшейся биопленки требует применения антибиотиков, а это в свою очередь может привести к долгосрочному, неэффективному лечению и проявлению резистентности. Решение данной проблемы облегчается разработкой многослойных покрытий, содержащих антибактериальные агенты, которые могут быть выращены на поверхности медико-биологических изделий. В отличие от монопокрытий, аналог, состоящий из нескольких слоев, эффективен с точки зрения пролонгированного действия и может служить в качестве системы для доставки и хранения антисептиков и других антибактериальных препаратов.

Одним из наиболее перспективных в научном и прикладном отношении разновидностей антибактериальных покрытий являются тонкие полимерные

пленки, которые высвобождают биологические активные вещества и предотвращают инфекционные изменения рядом с имплантируемым изделием.

Таким образом, разработка условий получения полиэлектролитных мультислоев на основе биосовместимых, экологически безвредных и доступных полиэлектролитов с дальнейшим нанесением на их поверхность антибактериальных покрытий для медико-биологических изделий является актуальной проблемой современной практической медицины.

Целью диссертационной работы является разработка условий получения антибактериальных покрытий на основе биосовместимых, экологически безвредных полиэлектролитов для медико-биологических изделий.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1 Квантово-химическое обоснование энергетических и структурных характеристик биоактивных полисахаридов и антибактериальных препаратов;

2 Установление условий получения антибактериальных тонких пленок на поверхности медицинских имплантатов методом LbL;

3 Определение особенностей изменения морфологии и роста пленок в зависимости от pH системы и внедрения антибактериального агента в структуру пленок;

4 Определение антибактериальной активности полученных пленок;

5 Разработка рекомендации по получению антибактериальных тонких пленок на основе полиэлектролитов на поверхности медицинских имплантатов.

Объекты исследования: тонкие пленки на основе полиэлектролитов на поверхности различных подложек, обладающие антибактериальными свойствами.

Предмет научного исследования: нанесение пленок на поверхность различных подложек методом LbL; зависимость морфологии поверхности пленок от физико-химических параметров; антибактериальные свойства пленок на основе полиэлектролитов.

Методы исследования. При выполнении исследований в рамках диссертационной работы были применены следующие методы получения полиэлектролитных пленок и физико-химического исследования: метод LbL; эллипсометрия; атомно-силовая и сканирующая электронная микроскопия; определение угла смачивания методом лежащей капли; определение антибактериальной активности методом диффузии в агар.

Источниковедческую базу и материалы исследования составляют 180 источников литературы по методам получения антибактериальных мультислоев на основе полиэлектролитов, росту пленок на поверхности медицинских имплантатов, а также по другим областям естествознания, касающихся темы данного исследования.

Научная новизна:

- Впервые разработаны условия получения нанопленок на основе полисахаридов: хитозан-карбоксиметилцеллюлоза натрия, хитозан-полиакриловая кислота и исследованы физико-химические характеристики полученных мультислоев;

- установлены влияние природы полиэлектролитов и pH среды на механизм формирования нанопленок, обоснованы зависимость толщины пленок от количества бислоев и форм нахождения полиэлектролитов;

- разработаны два способа получения НЧAg и механизм их внедрения в мультислои;

- установлена антибактериальная активность полученных нанопленок на титановых и стальных имплантатах.

Теоретическая значимость исследования. Найденные экспериментальным путем условия получения тонких пленок на основе полиэлектролитов для покрытия поверхности имплантируемых систем, предложенный механизм формирования нанопленок в зависимости от pH среды и природы полимерных матриц, значения физико-химических параметров, влияющих на морфологию поверхности тонких пленок, а также условия внедрения и высвобождения антибактериального агента представляют значительный теоретический интерес.

Практическая ценность. Ценность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы в области получения тонких пленок на основе полиэлектролитов, заключается в возможности их использования для покрытия имплантируемых систем для придания им антибактериальных свойств; кроме того, результаты изучения зависимости морфологии поверхности тонких пленок от физико-химических параметров найдут применение в будущем при получении тонких пленок. По результатам диссертационной работы будут выданы рекомендации по получению и нанесению тонких пленок на основе полиэлектролитов на различные подложки, в частности, на имплантируемые материалы, для придания им противомикробных свойств.

Основные положения, выносимые на защиту:

1 Результаты квантово-химического исследования структурных и энергетических характеристик хитозана, карбоксиметилцеллюлозы натрия, хлоргексидина и триклозана и обоснование потенциальных активных центров электростатического взаимодействия в полимерных матрицах и биоактивных реагентов позволяют обосновать использование вышеуказанных веществ в качестве полимерных матриц для получения биоактивных нанопленок с антибактериальными свойствами;

2 Использование полуавтоматического метода погружения «dip coating» позволяет получать монотонно растущую пленку на обе стороны твердой подложки. Начальная концентрация растворов полиэлектролитов и их pH влияют на толщину, шероховатость и морфологию пленок ХЗ/ПАК и ХЗ/КМЦ.

3 Пленки с ХГ показывают антибактериальную активность в отношении S.aureus, а также музейного штамма E.coli ATCC25922 и дикого штамма P.Aeruginosa. Зона угнетения пленок $(ХЗ/КМЦ)_{40}$ со встроенным ХГ составляет 19 мм и 7 мм, против E.coli ATCC25922 и P.Aeruginosa, соответственно, а пленки, содержащие в своем составе НЧAg, показали антибактериальную активность по отношению к музейным штаммам Staphylococcus aureus. Зона

угнетения для образца ХЗ/КМЦ со встроенными НЧAg составляет 7,1 ± 0,03 мм.

Основные итоги диссертационного исследования отражены в 12 научных работах, в том числе:

- в одной статье, опубликованной в периодическом издании, индексируемой базой данных Scopus (с процентилем выше 25);
- в одной статье, опубликованной в материале международной научной конференций (Proceedings), индексируемой базой данных Scopus;
- в четырех статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан;
- в пяти тезисах докладов на республиканских и зарубежных международных научно-практических конференциях и симпозиумах.

Кроме того, получено положительное решение о выдаче патента РК на полезную модель «Способ получения антибактериального покрытия на поверхности титановых и стальных имплантатов на основе хлоргексидина».

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, трех разделов, заключения, а также списка использованных источников из 180 наименований. Работа изложена на 124 страницах, содержит 52 рисунка и 14 таблиц.

По результатам диссертационного исследования сделаны следующие выводы:

1 На основании квантово-химических расчетов структурных и энергетических характеристик проведен научно-обоснованный выбор полимерных матриц: хитозана, карбоксиметилцеллюлозы натрия, альгината и антибактериальных агентов из числа перспективных антисептиков, какими являются триклозан, хлоргексидин. Результаты этих исследований позволили теоретически предсказать и обосновать природу активных центров электростатического взаимодействия выбранных полиэлектролитов и антибактериальных агентов: хлоргексидина и триклозана с полимерными матрицами предполагаемых мультислоев.

2 Разработаны условия очистки, подготовки и активации поверхности стандартных пластинок (кремниевые и стеклянные) и ортопедических имплантатов. На основании физико-химических методов были исследованы морфология и гидрофильность поверхностей и установлено:

- травление поверхности титановых, стальных имплантатов органическими растворителями с последующей обработкой в ультразвуковой ванне и раствором «пиранья» значительно уменьшает углы смачивания до 62° и обеспечивает гидрофильность поверхности носителей;
- для кремниевых и стеклянных носителей наиболее приемлемы обработка раствором серной кислоты с добавлением перекиси водорода. Полученные в результате обработки многочисленные микротрещины являются активными центрами и согласно теории Тейлора, способствуют хорошей и равномерной адсорбции функциональных групп полиэлектролитов.

3 Установлены условия получения нанопокрытий на поверхности твердых подложек. Охарактеризованы условия метода «погружения»: а) автоматическое погружение и вынимание с заданной скоростью (0,001 м/с) без перемешивания; б) ручное погружение подложки в раствор с перемешиванием. Установлено, что использование полуавтоматического «dip coater» позволяет получать монотонно растущую пленку на обе стороны твердой подложки, в то время как ручное погружение подложки в раствор с перемешиванием приводит к хаосному наложению слоев нанопленки и образование дефектов в результате случайной диффузии. Изучение влияния начальной концентрации полиэлектролитов на качество пленки показало, что в диапазоне изученных параметров оптимальной концентрацией полиэлектролитов для получения более гладкой пленки является 0,01 М.

Показано влияние pH растворов наносимых полиэлектролитов на толщину, шероховатость и морфологии пленок ХЗ/ПАК и ХЗ/КМЦ. Выявлено что толщина пленок зависит от числа бислоев линейно, степень ионизация и конформация полиэлектролитов, вызванной изменением pH системы, является критерием образование тонкой прозрачной и толстой непрозрачной пленки. Для полной характеризации морфологических свойств покрытий ХЗ/ПАК, полученных в интервале pH 3-6, были определены среднеквадратичная шероховатость (R_q) с помощью полуконтактного режима АСМ. Относительно большое значение R_q, равный 15,3 ± 1,4 нм, получено для образца при pH-5, в то время как изменение pH на единицу приводит к уменьшении значения R_q, до 4,1 ± 0,1. Показатель преломления (n), практический для всех образцов пленок, при λ = 632,8 нм, находится в диапазоне 1,4-1,55, что является характерным для прозрачных полимерных пленок. Результаты эллипсометрического анализа показали, что полученные пленки хорошо описываются дисперсионной моделью Коши в рамках модели однослойной отражающей системы.

4 Обосновано два метода нанесения антибактериального агента – хлоргексидина в мультислоиные покрытия: первое – прямое осаждение молекул ХГ, путем ассоциации с одним из полиэлектролитов, принимая его в качестве одного из многослойных компонентов; второе – погружение и пропитка предварительно собранных пленок в раствор антисептика. Для каждого подхода был выбран свой «резервуар» для доставки антибактериального агента. Была разработана схема формирования антибактериального покрытия в пленках, так называемый «нижележащей и верхнележащей части». Установлена кинетика высвобождения ХГ из пленки $(ХЗ/ПАК)_{10}$ – $(ХГ/ПАК)_{40,5}$, согласно которой в первые 24 часа высвобождается 0,45 мг/мл, самая большая доза антисептика, а в последующие часы идет более медленное высвобождение. Выявлено, что образцы, полученные по двум методам, показали антибактериальную активность против *S.aureus* (являются наиболее распространенным микроорганизмам, участвующий в инфицировании, связанных с ортопедическими имплантациями), а также в отношении музейного штамма *E.coli* ATCC25922 и дикого штамма *P.Aeruginosa*. Установлено, что покрытия $(ХЗ/КМЦ)_{40}$ с ХГ показал 19 мм и 7 мм зоны угнетения против *E.coli* ATCC25922 и *P.Aeruginosa*.

5 Разработаны два метода (подхода) получения полиэлектролитных мультислоев, содержащих НЧAg. В первом подходе, основанный на поэтапном включении НЧAg в одну из полимерных матриц, установлено влияние начальной концентрации $AgNO_3$ на размер частиц. Выявлено образование НЧAg трех видов: такие как дендриты, сферические и агрегаты. Во втором подходе при получении НЧAg, обоснован механизм химического восстановления «in situ» ионов серебра до наночастиц, который основан на том, что пленки погружают в раствор аскорбиновой кислоты для восстановления ионов серебра до металлического, а затем освободившиеся карбоксильные группы регенерируются и снова готовы для повторного связывания катиона. На основании экспериментальных данных предложена общая схема формирования таких пленок. Размер НЧ в мультислоях и их распределение по поверхности можно регулировать путем выбора начальной концентрации $AgNO_3$ и оптимальная концентрация ионов серебра для получения наноразмерных сферических частиц составляет 0,001М.

Полученные нанопленки, содержащие в своем составе НЧAg, показали антибактериальную активность по отношению к музейным штаммам бактерии *Staphylococcus aureus*. Зона угнетения для образца ХЗ/КМЦ с НЧAg составляет 7,1 ± 0,03 мм.

Оценка полноты решений поставленных задач. Все задачи, поставленные для решения цели данной диссертационной работы, решены в полном объеме. Квантово-химический обосновано использование в качестве полимерных матриц для мультислоев хитозана, карбоксиметилцеллюлозы натрия, полиакриловой кислоты, а в качестве перспективных антисептиков – хлоргексидин, триклозан и наночастицы серебра. Разработана методика проведения полислойной сборки методом LbL и способы внедрения антибактериальных агентов в полученные пленки.

Таким образом, цели диссертационного исследования достигнуты – разработаны условия получения антибактериальных пленок на основе биосовместимых, экологически безвредных полиэлектролитов для медико-биологических изделий и исследованы их антибактериальные условия.

Оценка технико-экономической эффективности предложенных в диссертационной работе решений. Решения, предложенные в рамках данной диссертационной работы, могут лечь в основу получения тонких антибактериальных пленок, на основе полиэлектролитов, на поверхности медицинских имплантатов.