

Изучение возможности получения инкапсулированных форм иринотекана в полипептидные частицы показало, что максимальная эффективность инкапсулирования составляет 20 % или 350 мкг/мг частиц. Полученные инкапсулированные системы характеризовались отсутствием самопроизвольного высвобождения вещества, а значит стабильностью, в течение срока наблюдения (45 дней). Изучение кинетики высвобождения лекарственного вещества *in vitro* в плазме крови человека показало, что полное высвобождение иринотекана протекало в течение 4-5 суток и связано с частичной деградацией полипептидной частицы под действием ферментов плазмы крови.

В предварительных экспериментах по инкапсулированию 5-фторурацила показано, что данный цитостатик также включается в исследуемые частицы.

На основании результатов, полученных в ходе выполнения данной работы, можно заключить, что частицы на основе амфифильных полипептидов являются перспективными средствами для адресной доставки лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00069). Исследования проведены с использованием приборной базы ресурсных центров СПбГУ: "Методы анализа состава вещества" и "Развитие молекулярных и клеточных технологий".

Список литературы / References:

1. Laweus D., Taylor I. Chemotherapy for colorectal cancer – an overview of current managements for surgeons. *EJSO*, 2005, vol. 31, pp. 932-941.
2. Deming T.J., Synthetic polypeptides for biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2007, vol. 32, pp. 858-875.
3. Cheng J., Deming T.J. Synthesis of polypeptides by ring-opening polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides. *Top Curr. Chem.*, 2012, vol. 310, pp. 1-26.
4. Prokop A., Iwasaki Y., Harada A. (Eds.) Intracellular delivery II: Fundamentals and Applications. *Springer, Heidelberg*, 2014, 479 p.

МОРФОЛОГИЯ И ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ КАРРАГИНАН:ХИТОЗАН

Володько А.В.¹, Давыдова В.Н.¹, Чусовитин Е.А.², Ермак И.М.¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Просп. 100-летия Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ

² Институт автоматизации и процессов управления
ул. Радио, 5, г. Владивосток, 690041, РФ

Аннотация. Получены полиэлектролитные комплексы (ПЭК) каррагинан:хитозан и изучено влияние соотношения исходных компонентов на их формирование методами динамического рассеяния света (ДРС), атомно-силовой микроскопии (АСМ) и электрокинетических измерений. Показано, что механизм образования ПЭК определяется полимером, находящимся в избытке. При избытке в системе поликатиона – хитозана формируются положительно заряженные частицы ПЭК стабилизированные аминогруппами, которые определяют положительный заряд комплекса (среднее значение ζ -потенциала 40 мВ). Согласно данным АСМ хитозан локализуется на поверхности фибрилл каррагинана. В комплексах с преобладанием каррагинана при увеличении содержания хитозана уменьшается количество несвязанных сульфатных групп, что приводит к снижению отрицательного поверхностного заряда частиц (с -92,4 до -55,6 мВ). Исследование ПЭК методом АСМ показало, что в данном случае хитозан встраивается в сетчатую структуру каррагинана, а при соотношении каррагинан:хитозан 1:0,5 в/в разрывает ее, что согласуется с изменением поверхностного заряда и размеров комплексов.

Ключевые слова: полиэлектролитный комплекс, каррагинан, хитозан, атомно-силовая микроскопия, ζ -потенциал.

MORPHOLOGY AND ELECTROKINETIC CHARACTERISTICS OF CARRAGEENAN: CHITOSAN POLYELECTROLYTE COMPLEXES

Volod'ko A.V.¹, Davydova V.N.¹, Chusovitin E.A.², Yermak I.M.¹¹Pacific Institute of Bioorganic Chemistry

100 let Vladivostoku av., 159, Vladivostok, 690022, Russia

²Institute of Automation and Control Processes

5, Radio St., Vladivostok, 690041, Russia

Abstract. Carrageenan:chitosan polyelectrolyte complexes (PEC) were obtained and the initial components ratio effect on their formation was studied by dynamic light scattering (DLS), atomic force microscopy (AFM) and electrokinetic measurements. It was shown that the PEC formation mechanism is determined by polymer abundance. Positively charged PEC particles (the average value of ζ -potential was 40 mV) stabilized by chitosan amino groups were formed provided that polycation was present in excess in the complex. According to the AFM data, chitosan was located on the carrageenan fibers surface. In PEC where carrageenan prevails the number of unbound sulfate groups decreases if the chitosan content increases. It results in PEC negative surface charge decrease (from -92.4 to -55.6 mV). In this case AFM data showed that chitosan is incorporated into the network structure of carrageenan and at the ratio carrageenan:chitosan 1:0.5 w/w breaks. These data are correlated with the PEC surface charge values and sizes.

Key words: polyelectrolyte complex, carrageenan, chitosan, atomic force microscopy, ζ -potential.

Полиионные полисахариды морского происхождения представляют оправданный интерес благодаря их биоразлагаемости, биосовместимости, доступности и разнообразной биологической активности. Способность противоположно заряженных полиионов образовывать полиэлектролитные комплексы (ПЭК) открывает возможность создания на их основе различного рода биологически активных композитов.

Среди природных полианионов важное место занимают сульфатированные полисахариды красных водорослей – каррагинаны, дисахаридные звенья которых построены из остатков D-галактозы и ее производных, соединенных $\beta(1\rightarrow4)$ и $\alpha(1\rightarrow3)$ гликозидными связями. Структурное разнообразие каррагинанов обусловлено присутствием 3,6-ангидрогалактозы, различным местоположением и количеством сульфатных групп, а также нерегулярным построением полимерной цепи. Каррагинаны обладают уникальными физико-химическими свойствами и разнообразной биологической активностью, в том числе выраженной антивирусной, антимикробной, иммуномодулирующей и антикоагулирующей [1]. Среди природных поликатионных полисахаридов широким спектром активности обладает хитозан (ХЗ) – линейный полисахарид, полимерная цепь которого построена из β -1,4-связанных остатков D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. К настоящему времени установлено, что хитозан обладает гиполипидемической, гепатопротекторной, радиопротекторной, иммуностимулирующей, антибактериальной и противовирусной активностями, проявляет кровоостанавливающие свойства, регулирует кислотность желудочного сока, нормализует микрофлору кишечника [2].

Физико-химические свойства ПЭК, полученных на основе этих биополимеров, могут отличаться от свойств исходных полисахаридов и зависеть как от структурных особенностей полимеров и их соотношения, так и условий, при которых происходит образование комплексов. Изучение влияния этих факторов позволит дополнить представление о механизме образования ПЭК и расширить возможности целенаправленного регулирования физико-химических и биологических свойств новых композитных материалов. Целью данного исследования является изучение макромолекулярной организации и физико-химических характеристик (размер и ζ -потенциал) комплексов каррагинан:хитозан, полученных при разных соотношениях исходных полимеров.

В данной работе были использованы образцы каппа-каррагинана (Каппа), выделенного из красной водоросли *Chondrus armatus* (437 кДа) и хитозана (110 кДа, СА 6%), полученного методом щелочного дезацетилирования хитина из камчатского краба. Для характеристики ПЭК Каппа:ХЗ были определены значения ζ -потенциала комплексов и их размер методом ДРС и электрокинетических измерений, а также исследована их макромолекулярная организация методом АСМ. Ранее нами было показано, что образование растворимых нестехиометрических комплексов Каппа:ХЗ наблюдалось как при избытке каррагинана, так и при избытке хитозана [3]. В настоящей работе были приготовлены 2 серии растворимых ПЭК Каппа:ХЗ. Первая из них представляла собой набор комплексов, содержащих избыток хитозана, содержание каппа-каррагинана в которых постепенно увеличивалось до соотношения Каппа:ХЗ 0.7:1 в/в. Во второй серии комплексы готовили при избытке каппа-каррагинана, постепенно увеличивая содержание в них хитозана. Размеры полученных ПЭК и их поверхностный ζ -потенциал представлены в таблице 1.

Как показали данные ДРС (см. табл. 1), растворимые комплексы при избытке хитозана представляют собой положительно заряженные частицы, которые формируются в интервале соотношений Каппа:ХЗ от 0,1:1 до 0,7:1 в/в, размер основной популяции частиц увеличивался от 69 до 103 нм с повышением содержания каррагинана в смеси. Дальнейшее увеличение содержания каррагинана приводит к образованию видимого осадка.

Таблица 1 – Размер и поверхностный потенциал комплексов Каппа:ХЗ

Образец	Размер частиц		ζ-потенциал мВ
	г, нм	Содержание, %	
<i>Избыток хитозана</i>			
Хитозан 0,1 мг/мл (110 кДа, 6%)	297,0±95,4	83,7±4,5	26,4±2,5
	2315±74,0	8,5±2,5	
	28,9±10,5	7,6±2,3	
Каппа:ХЗ 0,1:1 в/в	69,9±6,3	95,1±0,8	40,5±3,8
	2465±43	4,9±0,8	
Каппа:ХЗ 0,25:1 в/в	73,5±1,3	96,9±0,8	42,7±0,9
	2323±87	3,1±0,8	
Каппа:ХЗ 0,5:1 в/в	93,7±3,5	98,1±0,8	40,3±0,5
	2443±121	1,9±0,8	
Каппа:ХЗ 0,6:1 в/в	103,6±5,8	97,7±0,8	40,3±0,3
	2390±134	2,3±0,8	
Каппа:ХЗ 0,7:1 в/в	103,5±4,0	94,8±1,5	39,6±0,5
	2218±23,7	5,2±1,5	
<i>Избыток каррагинана</i>			
Каппа 0,1 мг/мл	489±4,9	89,9±0,4	-92,4±1,5
	47,7±	10,1±	
Каппа:ХЗ 1:0,1 в/в	51,8±28,3	29,8±18,3	-88,2±2,3
	222,4±41,3	57,1±13,2	
	2540±112	12,7±4,9	
Каппа:ХЗ 1:0,25 в/в	146,0±4,8	90,3±3,2	-67,8±5,7
	2235±143	7,2±1,8	
Каппа:ХЗ 1:0,5 в/в	131,4±4,3	92,9±2,5	-55,6±4,1
	2195±162	5,2±1,3	

Незначительное различие в значениях ζ-потенциала образовавшихся ПЭК при избытке хитозана позволяет предположить формирование частиц комплексов по механизму, с образованием так называемой «гидрофильной короны» предложенному в работе Чатза [4]. Согласно этому механизму, вероятнее всего, образующиеся частицы ПЭК могут быть стабилизированы непрореагировавшими аминогруппами хитозана, которые и определяют заряд комплекса. При этом положительно заряженные группы хитозана располагаются с внешней стороны частиц ПЭК, о чем свидетельствует более высокое значение ζ-потенциала комплекса по сравнению с исходным хитозаном.

Анализ ПЭК, полученных с избытком каппа-каррагинана, свидетельствует о несколько ином характере образования частиц комплексов. Как следует из данных таблицы 1, в этом случае в диапазоне соотношений ХЗ:Каппа от 0,1:1 до 0,5:1 в/в формируются полидисперсные более крупные, по сравнению с первой серией комплексов, отрицательно заряженные частицы ПЭК. Увеличение содержания хитозана в комплексах сопровождается как снижением размеров основной образовавшейся популяции частиц с 222,4 до 131,4 нм, так и значений их ζ-потенциала (с -88,2 до -55,6 мВ), что может объясняться уменьшением количества несвязанных сульфатных групп каррагинана. Каппа-каррагинан формирует сетчато-волоконистую структуру и взаимодействие агрегированных спиралей каппа-каррагинана с хитозаном приводит к формированию отрицательно заряженных ПЭК при избытке полианиона, что согласуется с результатами Хьюгера с соавторами [5], изучавших формирование ПЭК каррагинан:хитозан в условиях полной диссоциации полимеров.

Для изучения макромолекулярной структуры полученных комплексов был выбран метод АСМ, который по сравнению с другими методами микроскопии характеризуется наименьшим количеством артефактов, связанных с фиксацией и окрашиванием исследуемых образцов. Кроме того, высота и ширина объектов на АСМ-изображениях может дать дополнительную информацию о степени гетерогенности и ассоциации полимеров. Была исследована макромолекулярная структура ПЭК, сформированных как при избытке хитозана (Каппа:ХЗ 0,1:1; 0,5:1 в/в), так и каррагинана (Каппа:ХЗ 1:0,1; 1:0,5 в/в). Исходные полисахариды были исследованы в концентрациях, соответствующих их концентрациям в комплексах.

Согласно данным АСМ, представленным на рисунке 1а, хитозан при концентрации 0,1 мг/мл формирует ровную (среднеквадратичная шероховатость (RMS) – 0,89 нм) поверхность, представленную плотно упакованными цилиндрическими структурами.

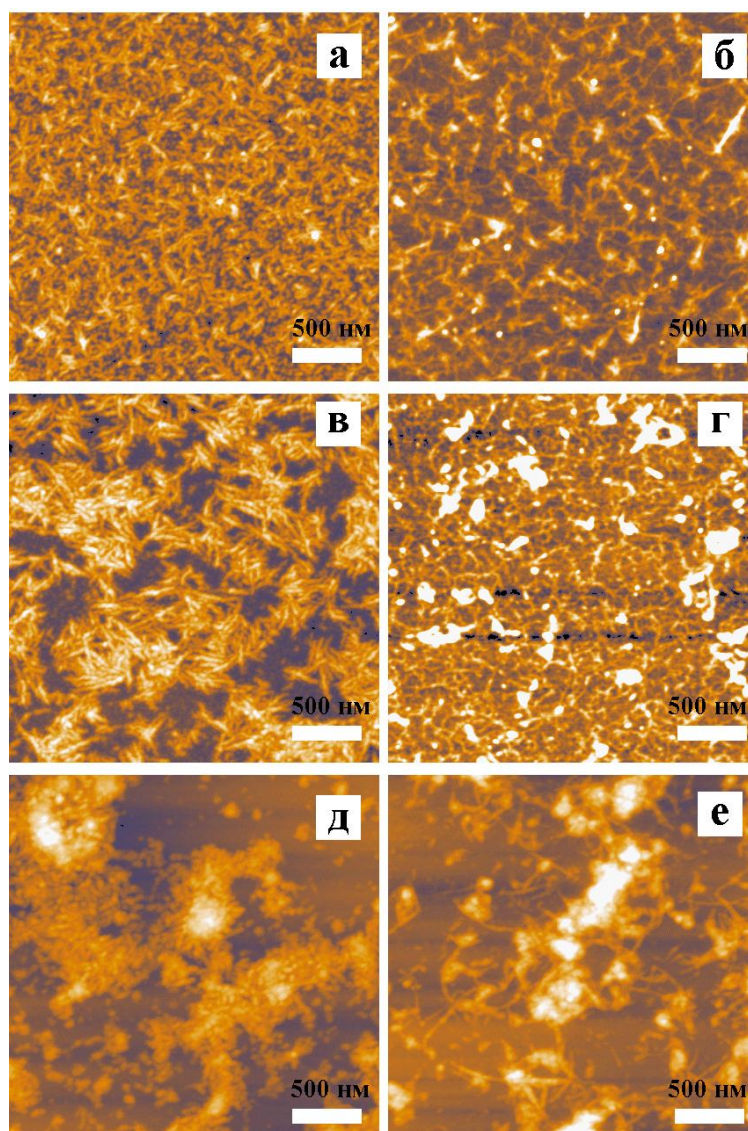


Рисунок 1 – АСМ образцов, нанесенных на свежесколотую слюду: а – хитозан 0,1 мг/мл, б – каппа-каррагинан 0,1 мг/мл, в - Каппа:ХЗ 0,1:1 в/в, г – Каппа:ХЗ 1:0,1 в/в, д – Каппа:ХЗ 0,5:1 в/в, е – Каппа:ХЗ 1:0,5 в/в

В отличие от хитозана, каппа-каррагинан (рисунок 1б) образует трехмерную сетчатую структуру высотой до 2 нм, образованную из разветвленных фибрилл (RMS = 0,96 нм).

Макромолекулярная структура ПЭК Каппа:ХЗ отличается от структур исходных компонентов в соответствующих концентрациях. Как видно из рисунка 1в и 1д, при избытке хитозана комплекс Каппа:ХЗ 0,1:1 и 0,5:1 в/в представлены плотно упакованными образованиями, состоящими из сегментов, характерных для исходного ХЗ, но в отличие от него они не равномерно распределены по поверхности слюды, а собраны в конгломераты основой которым, вероятно, послужили фибриллы каппа-каррагинана. Это может соответствовать формированию так называемой «гидрофильной короны», когда на поверхности фибрилл каррагинана собираются макромолекулы хитозана.

При избытке каррагинана как показывают данные АСМ, поликатион встраивается в трёхмерную сетчатую структуру полианиона (см. рис. 1г). С увеличением содержания хитозана наблюдается разрыв сетчатой структуры каррагинана (см. рис. 1е) и на скане видны отдельно расположенные фибриллы макромолекул каррагинана. Это коррелирует с данными ДРС и электрокинетических измерений, согласно которым добавление хитозана приводит к уменьшению размеров основной популяции частиц ПЭК, а поверхностный потенциал комплексов ниже, чем у исходного каппа-каррагинана.

Таким образом, данные ДРС, электрокинетических измерений и АСМ показали, что механизм образования ПЭК определяется полимером, находящимся в избытке. В случае избытка ХЗ образуются частицы ПЭК, стабилизированные непрореагировавшими аминогруппами, которые определяют положительный заряд комплекса. В ПЭК с избытком каррагинана при увеличении содержания в комплексе ХЗ уменьшается количество несвязанных сульфатных групп, что приводит к снижению отрицательного поверхностного заряда комплекса. ПЭК, полученные при избытке одного из компонентов, имеют разную макромолекулярную

организацию. При избытке в ПЭК поликатиона X3 располагается на поверхности каррагинана, а в случае избытка каррагинана X3 встраивается в сетчатую структуру каррагинана и при определенных соотношениях растягивает и разрывает ее.

Работа выполнена при поддержке молодёжного гранта РФФИ № 16-34-00655 и частично (ДРС и электрокинетические измерения) гранта РНФ № 16-14-00051.

Список литературы / References:

1. Yermak I.M., Khotimchenko, Yu.S. Recent advances in marine biotechnology. Chemical properties, biological activities and applications of carrageenan from red algae. *Plymouth Science Publishers Inc.: New York, USA/London, UK*, 2003, pp. 207-255.
2. Muzzarelli R.A.A., Boudrant J. Meyer D., Manno N., DeMarchis M., Paoletti M.G. A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydr. Polym.*, 2012, vol. 87, pp. 995-1012.
3. Volod'ko A.V., Davydova V.N., Barabanova A.O., Solov'eva T.F., Ermak I.M. Formation of soluble chitosan-carrageenan polyelectrolyte complexes. *Chem. Nat. Compd.*, 2012, vol. 48, pp. 353-357.
4. Schatz C., Domard A., Viton C., Pichot C., Delair T. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules.*, 2004, vol. 5, pp. 1882-1892.
5. Hugerth A., Caram-Lelham N., Sundeliir L.O. The effect of charge density and conformation on the polyelectrolyte complex formation between carrageenan and chitosan. *Carbohydr. Polym.*, 1997, vol. 34, pp. 149-156.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ НАРУШЕНИЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЕТЧАТКИ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ СОЕДИНЕНИЯМИ СЕЛЕНА

Джафаров А.И.¹, Ахмедова С.Х.²

¹Национальная академия наук Азербайджана
пр. Г. Джавида, 33, г. Баку, AZ1143, Азербайджан

²Азербайджанский государственный медицинский университет
ул. Бакиханова, 23, г. Баку, AZ1022, Азербайджан
e-mail: cafarov.haqverdi@mail.ru

Аннотация. Действие продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), накопленных в изолированной сетчатке индуцированием системой железоаскорбат сопровождается подавлением электрической активности сетчатки. Продуктами ПОЛ происходит подавляется амплитуды «а» и «b» волн ЭРГ в процессе инкубации. Установлено, что при этом соединениями селена в определенной степени можно восстановить нарушение функциональной активности сетчатки. Соединение селена (селенит натрия, селенцистеин, селенсемикарбозид, хлоргидрат 1-фенил-селено-4 фенил-4-гексаметилениминобутин-2 (ХФФГМ), хлоргидрат 1-фенил-селено-3-морфолинопропанол-2 (ХФМП)) как при парэнтеральном введении, так и при внесении в инкубационную среду задерживали падение амплитуды «а» и «b» волн ЭРГ. При внесении селенита натрия и селенцистеина на фоне действия железоаскорбата амплитуда волн ЭРГ изолированной сетчатки восстанавливалась незначительно. В отличие от названных соединений селена внесение в перфузионную жидкость селенсемикарбозид, ХФФГМ и ХФМП происходило отчетливое восстановление амплитуд ЭРГ сетчатки. Полученные результаты указывают на перспективу возможности применения соединений селена в офтальмологической практике при разных патологиях сетчатой оболочки сопровождающихся интенсификацией ПОЛ.

Ключевые слова: индуцирование ПОЛ, сетчатка, электроретинограмма, соединения селена.

REHABILITATION OF BREACHES IN ELECTRICAL ACTIVITY OF THE RETINA DURING OXIDATIVE STRESS BY SELENIUM COMPONENTS

Jafarov A. N.¹, Akhmedova S. Kh.²

¹Institute of Physics of Azerbaijan National Academy of Sciences
pr. H. Javid, 33, Baku, AZ1143, Azerbaijan

²Azerbaijan State Medical University
Bakikhanov str., 23, Baku, AZ1022, Azerbaijan
e-mail: cafarov.haqverdi@mail.ru

Abstract. The effect of lipid peroxidation (LPO) products accumulated in the isolated retina by induction of ferric ascorbate causes suppression of electrical activity of retina. LPO products suppress the amplitudes of “a” and “b” waves of electrical retinogram (ERG) during the process of incubation. It was established that the functional activity of retina can be considerably rehabilitated with use of selenium compounds. Application of selenium compounds such as sodium selenite, selenium cysteine, selenium semicarboxide, chlorhydrate 1-phenyl-seleno-4 phenil-4-hexamethyleneaminobutyne-2 (ChPhHM) and chlorhydrate 1-phenil-seleno-3-morpholinopropanol-2 (ChPhMP) for parenteral use and in incubation medium delays the dropping of amplitudes “a” and “b” waves of ERG. During use of sodium selenite and selenium cysteine the amplitudes of ERG waves of isolated retina were rehabilitated insignificantly. Unlike the abovementioned compounds of selenium, obvious rehabilitation of ERG amplitudes of retina