

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



МИРГАЛЕЕВ ГРИГОРИЙ МАРАТОВИЧ

**МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ РЯДА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ
КОМПЛЕКСОВ ХИТОЗАНА**

1.4.10. Коллоидная химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, доцент

Шилова Светлана Владимировна

Казань – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ПОЛИСАХАРИДОВ.....	11
1.1 Природные полиэлектrolиты.....	11
1.2 Закономерности формирования и свойства полиэлектrolитных комплексов на основе полисахаридов.....	19
1.3 Применение полиэлектrolитных комплексов природных полисахаридов в доставке лекарственных веществ.....	23
1.4 Подходы к контролируемому высвобождению биологически активных веществ из полимерных носителей на основе полисахаридов.....	32
1.5 Применение систем доставки лекарственных веществ на основе полисахаридов в тераностике.....	42
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	55
2.1 Объекты исследования.....	55
2.1.1 Природные полисахариды.....	55
2.1.2 Лекарственные вещества.....	56
2.1.3 Краситель.....	56
2.2 Получение систем доставки лекарственных веществ на основе полиэлектrolитных комплексов хитозана.....	57
2.2.1 Получение многослойных полиэлектrolитных капсул на основе хитозана и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы.....	57
2.2.2 Получение гелевых частиц на основе альгината натрия и хитозана.....	58
2.2.3 Синтез полупроводниковых квантовых точек.....	59
2.2.4 Синтез наночастиц полиэлектrolитных комплексов хитозан–к-каррагинан.....	61
2.3 Методы исследования.....	61
2.3.1 Кондуктометрия.....	61
2.3.2 pH-метрия.....	62
2.3.3 Динамическое и электрофоретическое рассеяние света.....	62
2.3.4 ИК-спектроскопия.....	62

2.3.5 УФ-спектроскопия и люминесцентная спектроскопия.....	63
2.3.6 Дифракционные исследования.....	63
2.3.7 Микроскопические исследования.....	63
2.3.8 Квантово-химическое моделирование.....	64
2.3.9 Определение состава и константы устойчивости комплексов.....	65
2.3.10 Определение константы связывания субстратов по данным тушения флуоресценции.....	65
2.3.11 Расчет относительного квантового выхода красителя и квантовых точек.....	66
2.3.12 Определение эффективности инкапсулирования лекарственных веществ.....	66
2.3.13 Оценка кинетики высвобождения лекарственных веществ из полимерных носителей.....	67
2.3.14 Определение адсорбционных характеристик полиэлектролитных комплексов.....	68
2.3.15 Оценка антимикробной активности цефотаксима.....	69
ГЛАВА 3. ФОРМИРОВАНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ХИТОЗАНА С АНИОННЫМИ ПОЛИСАХАРИДАМИ И ВЫЯВЛЕНИЕ ХАРАКТЕРА ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИХ ОБРАЗОВАНИЯ.....	71
3.1 Общие закономерности образования полиэлектролитных комплексов хитозана.....	71
3.2 Влияние природы и состава растворителя на взаимодействие хитозана с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы в смешанных средах.....	74
3.3 Влияние pH среды на формирование полиэлектролитного комплекса хитозана с альгинатом натрия.....	76
ГЛАВА 4. МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ С МОДЕЛЬНЫМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ И ОПТИЧЕСКИМИ ЗОНДАМИ.....	79
4.1 Взаимодействие цефотаксима с хитозаном и альгинатом натрия.....	80
4.2 Взаимодействие ванкомицина с хитозаном	90
4.3 Взаимодействие красителя флуоресцеина с хитозаном	93
4.4 Характеризация квантовых точек CdS/ZnS и CdS/ZnS, допированных ионами Mn (II), и их взаимодействие с ванкомицином.....	98

ГЛАВА 5. ПОЛУЧЕНИЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СТИМУЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ	
ХИТОЗАНА.....	113
5.1 Получение многослойных полиэлектролитных микрокапсул на основе комплексов хитозана с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы для инкапсулирования ацетилсалициловой кислоты.....	114
5.2 Получение гелевых сфер на основе полиэлектролитных комплексов альгината натрия с хитозаном для иммобилизации цефотаксима.....	122
5.3 Синтез наночастиц на основе полиэлектролитных комплексов хитозана и κ-каррагинана для иммобилизации люминесцентных сенсоров и ванкомицина.....	132
5.3.1 Формирование и характеристика наночастиц на основе полиэлектролитных комплексов хитозан–κ-каррагинан.....	132
5.3.2 Включение и высвобождение флуоресцеина из наночастиц хитозан–κ-каррагинана.....	136
5.3.3 Включение и высвобождение ванкомицина из наночастиц комплексов хитозан–κ-каррагинан, содержащих квантовые точки на основе CdS/ZnS.....	140
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	148
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	150
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	151
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	173

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

На современном этапе развития биомедицины и фармацевтических технологий особое внимание уделяется созданию новых лекарственных форм с улучшенными биофармацевтическими характеристиками. Эффективная доставка лекарственных веществ (ЛВ) в организм человека позволяет решить важнейшие задачи – повысить терапевтическую эффективность, переносимость и безопасность лекарственной терапии, осуществить контролируемое высвобождение ЛВ в определенных органах и тканях организма человека, способствовать индивидуализации лечения. В настоящее время активно развивается новое направление в наномедицине – тераностика, которое заключается в интеграции терапевтических и диагностических (визуализирующих) средств в одном и том же носителе.

В качестве наиболее перспективных материалов для получения современных носителей для ЛВ рассматриваются природные полисахариды, обладающие комплексом уникальных биологических и физико-химических свойств, среди которых можно выделить их биосовместимость, низкую токсичность, а также способность к комплексообразованию с противоположно заряженными веществами. Положительным моментом в использовании полисахаридов в данном направлении является и то, что большинство из них обладает собственной биологической активностью, проявляя антимикробное действие, способность активировать макрофаги, усиливать пролиферацию фибробластов и т.д. Применение биополимерных носителей на основе полиэлектролитных комплексов хитозана (ХТЗ) для иммобилизации ЛВ различной природы, одновременно содержащих визуализирующие агенты, предоставляет уникальную возможность для комплексного решения задач по ранней диагностике и одновременной таргетной персонализированной терапии заболеваний человека.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на успехи в применении полиэлектролитных комплексов ХТЗ для получения полимерных систем доставки ЛВ различной природы, сохраняются проблемы, ограничивающие их практическое использование. Основные трудности включают в себя недостаточно полную информацию о закономерностях взаимодействия ЛВ с полимерной матрицей; ограниченность знаний о механизмах высвобождения биологически активных веществ из систем доставки на основе природных полисахаридов; отсутствие

универсальных решений для достижения направленной доставки и контролируемого высвобождения ЛВ. Отдельным недостаточно изученным направлением является разработка и оптимизация состава систем доставки для тераностики, включающих наряду с терапевтическими компонентами диагностические агенты для обеспечения возможности визуализации процесса накопления и высвобождения биологически активных веществ (БАВ).

Цель работы заключалась в установлении коллоидно-химических основ разработки многофункциональных систем доставки ряда лекарственных веществ на основе полиэлектролитных комплексов хитозана, обеспечивающих высокую эффективность их инкапсулирования, контролируемое высвобождение и возможность визуализации этих процессов.

Для достижения цели работы решались следующие **задачи**:

- 1) получение полиэлектролитных комплексов хитозана с рядом анионных полисахаридов и выявление характера влияния различных факторов на закономерности их образования;
- 2) выявление особенностей межмолекулярного взаимодействия компонентов полимерных носителей и включенными в них модельными лекарственными веществами;
- 3) получение и характеристика стимул-чувствительных люминесцентных транспортных систем на основе полиэлектролитных комплексов хитозана различной надмолекулярной организации: многослойные капсулы, гели, наночастицы;
- 4) изучение кинетики и механизма высвобождения иммобилизованных лекарственных веществ из полученных систем доставки.

Научная новизна работы:

1. Разработаны системы доставки биологически активных веществ на основе комплексов катионного полиэлектролита (ХТЗ) и анионных полиэлектролитов (натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ), альгината натрия (АЛГ-Na) и каппа-каррагинана (κ-КРГ)), обладающие высокой способностью к иммобилизации модельных лекарственных веществ (ацетилсалициловая кислота (АСК), цефотаксим (ЦФТ) и ванкомицин (ВНЦ)), а также оптических зондов (флуоресцеин (ФЛЦ), квантовые точки (КТ) CdS/ZnS, CdMnS/ZnS).

2. Комплексом физико-химических, оптических методов исследования, а также методом квантово-химического моделирования установлены закономерности межмолекулярных взаимодействия компонентов полимерных носителей с модельными инкапсулированными лекарственными веществами и визуализирующими агентами.

3. Выявлены коллоидно-химические, структурные и антимикробные характеристики новых систем доставки лекарственных веществ на основе полиэлектролитных комплексов хитозана.

4. Показаны возможности наносенсоров на основе тушения люминесценции квантовых точек типа «ядро-оболочка» CdS/ZnS и CdS/ZnS, легированных ионами марганца (II), для оперативного определения концентрации антибиотика ванкомицина в водной среде при его высвобождении из систем доставки.

5. Установлено, что полученные многофункциональные люминесцентные полимерные носители обеспечивают возможность пролонгированного высвобождения лекарственных веществ и одновременной визуализации их накопления и распределения в режиме реального времени.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении банка данных по количественным характеристикам комплексообразования компонентов полимерных носителей с модельными ЛВ и оптическими сенсорами в различных средах. Полученные кинетические данные высвобождения ЛВ из систем доставки и их анализ в рамках математической модели Корсмейера–Пеппаса позволят прогнозировать кинетику высвобождения биологически активных компонентов и их диффузию из полимерной матрицы.

Практическая значимость работы состоит в том, полученные биополиэлектролитные комплексы, обладающие высокой восприимчивостью к различным внешним воздействиям, могут успешно применяться в разработке транспортных систем ЛВ различной природы. Установленные для модельных ЛВ закономерности процессов инкапсулирования и высвобождения из полимерных носителей в условиях *in vitro* позволят повысить эффективность их применения в более сложных реальных живых системах. Выявленные коллоидно-химические закономерности могут лечь в основу создания новых эффективных биосовместимых лекарственных форм для тераностики, способных иммобилизовать ЛВ и сенсоры для

биологической визуализации, сочетая в себе диагностический и терапевтический потенциал.

Методология и методы исследования

Объектами исследования являлись ПЭК на основе ХТЗ и ряда полисахаридов анионной природы. В качестве модельных ЛВ были выбраны антибиотики ЦФТ и ВНЦ, а также нестероидный противовоспалительный препарат АСК, в качестве визуализирующих агентов – краситель ФЛЦ и КТ на основе CdS/ZnS. Для проведения исследований применялся комплекс современных физико-химических и оптических методов исследования (динамическое и электрофоретическое рассеяние света, кондуктометрия, ИК-спектроскопия, спектроскопия УФ- и видимой области, люминесцентная спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия, люминесцентная микроскопия, рентгеновская дифракция). Для тестирования антимикробной активности ЦФТ в полимерных носителях использовали культуры грамположительных бактерий: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P FDA 209P и грамотрицательных бактерий: *Escherichia coli* ATCC 25922, относящиеся к IV-группе патогенности. Оптимизация геометрии, расчет термодинамических параметров комплексообразования и решение колебательной задачи в исследуемых системах проводились с учетом влияния среды растворителя в рамках модели поляризуемого континуума IEFPCM в программном пакете Gaussian 16.

Положения, выносимые на защиту:

1. Физико-химические, коллоидно-химические и квантово-химические характеристики процессов межмолекулярного взаимодействия модельных инкапсулируемых лекарственных веществ и оптических сенсоров между собой и с полиэлектролитными комплексами на основе хитозана;
2. Коллоидно-химические подходы к получению многофункциональных биополимерных носителей ряда лекарственных веществ и визуализирующих агентов на основе полиэлектролитных комплексов хитозана;
3. Описание изотерм и механизма адсорбции модельных лекарственных веществ на поверхности частиц полиэлектролитных комплексов хитозана;
4. Кинетические и диффузионные характеристики высвобождения ряда лекарственных веществ и оптических сенсоров из полученных полимерных носителей.

Достоверность полученных в диссертационной работе результатов

обусловлена применением широкого набора методов исследования структуры, коллоидно-химических свойств объектов исследования и подтверждается сходимостью экспериментальных данных, полученных разными методами. Результаты работы интерпретированы в рамках современных научных теорий и согласуются с имеющимися литературными данными.

Апробация работы. Основные результаты работы были изложены на XII Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Иваново, 2019), Школе-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) (Казань, 2019, 2020, 2021, 2022), Всероссийской научной конференции (с международным участием) преподавателей и студентов ВУЗов «Актуальные проблемы науки о полимерах» (Казань, 2020, 2024), XXVI Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик, 2020), Международной конференции «Перспективная элементная база микро- и наноэлектроники с использованием современных достижений теоретической физики» (Москва, 2020), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», секция «Химия» (Москва, 2021, 2022, 2023), XV Международной конференции молодых ученых, студентов и аспирантов «Синтез и исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений» (Казань, 2021), IX Молодежной конференции ИОХ РАН, посвященной 160-летию со дня рождения академика Н.Д. Зелинского (Москва, 2021), 87-й научно-технической конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов (с международным участием) (Минск, 2023), XXVII Всероссийской конференции молодых ученых-химиков (с международным участием) (Нижний Новгород, 2024), X Юбилейном всероссийском форуме молодых исследователей (Калининград, 2024).

Личный вклад автора заключался в определении цели и задач научного исследования, выборе методов исследования, анализе полученных экспериментальных данных, формулировании выводов и ключевых теоретических утверждений, также в подготовке материала к публикации в периодических изданиях под руководством

научного руководителя. Диссертация включает результаты экспериментов, полученных соискателем лично, либо совместно с ним.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 статей, в том числе 3 в журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки Российской Федерации, 9 – в журналах, входящих в реферативную базу Scopus, и 17 тезисов докладов на Всероссийских и международных конференциях.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка условных обозначений и сокращений, списка литературы из 200 наименований и приложения. Работа изложена на 175 страницах машинописного текста, содержит 81 рисунок и 20 таблиц.

Работа выполнена на кафедре физической и коллоидной химии (ФКХ) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ») Минобрнауки Российской Федерации. Автор выражает искреннюю признательность и глубокую благодарность руководителю – доктору химических наук, профессору кафедры ФКХ ФГБОУ ВО «КНИТУ» Светлане Владимировне Шиловой за предоставленную тему исследования и всестороннюю поддержку на каждом этапе подготовки диссертации. Автор выражает благодарность профессору ФКХ ФГБОУ ВО «КНИТУ» Вильяму Петровичу Барабанову за конструктивные советы в ходе выполнения диссертационной работы, доценту кафедры ФКХ ФГБОУ ВО «КНИТУ» Ксении Андреевне Романовой за проведение квантово-химических расчетов, доценту кафедры ФКХ ФГБОУ ВО «КНИТУ» Дмитрию Олеговичу Сагдееву за синтез квантовых точек, применяемых в настоящем исследовании, заведующему кафедрой физики ФГБОУ ВО «КНИТУ» Кириллу Владимировичу Холину за проведение исследований с применением сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, заведующей лабораторией микробиологии ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения ФГБУН ФИЦ КазНЦ РАН Александре Дмитриевне Волошиной за проведение микробиологических исследований. Автор выражает отдельную благодарность профессору кафедры ФКХ ФГБОУ ВО «КНИТУ» Юрию Генадьевичу Галяметдинову за предложенные в ходе работы идеи и ценные научные консультации при обсуждении результатов исследований.

ГЛАВА 1. МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ПОЛИСАХАРИДОВ

1.1 Природные полиэлектrolиты

Полиэлектrolит – это высокомолекулярное соединение, которое имеет повторяющиеся звенья в структуре макромолекул и может диссоциировать при растворении в ионизирующем растворителе, образуя либо положительно, либо отрицательно заряженную полимерную цепь [1]. Водорастворимые полимеры, содержащиеся в природных источниках и имеющие ионизируемые группы, вызывают большой интерес в области разработки экологически чистых биоматериалов для их применения в биомедицинской, биотехнологической и фармацевтической областях.

Полиэлектrolиты можно классифицировать по разным видам в зависимости от их происхождения, морфологии, заряда и состава. Примерами природных полиэлектrolитов могут служить хитозан, альгинаты, каррагинаны, пектин, гиалуроновая кислота, пуллулан, нуклеиновые кислоты и др. [2]. В зависимости от типа заряда полиэлектrolиты классифицируют на полианионы, поликатионы и полиамфолиты [3]. Катионные полиэлектrolиты содержат в своих структурах основные группы, такие как амино-, фосфо-, борную, имидазольную или пиридиновую группы. Анионные полиэлектrolиты содержат кислотные группы, такие как карбоксильные, сульфатные, сульфонатные, фосфатные, фосфонатные и арсенатные группы [4].

Полисахариды представляют собой сложную совокупность биополимеров, выделенных из растительных, животных, микробных и водорослевых источников, которые построены из моносахаридов, связанных О-гликозидными связями. Поскольку полисахариды являются природными материалами, клеточная физиология организма человека хорошо адаптирована к ним, что обеспечивает их отличную биосовместимость, биоразлагаемость и низкую токсичность [5]. Отличительной особенностью природных полисахаридов является также наличие собственной биоактивности, что предопределяет их преимущества в разработке современных систем доставки БАВ.

Хитозан – это катионный полисахарид, образующийся при деацетилировании хитина, состоящий из β -1,4-связанных N-ацетил-2-амино-2-дезоксид-D-глюкозы и 2-амино-2-дезоксид-D-глюкозы (рисунок 1.1). Благодаря своей хорошей биосовместимости, низкой токсичности, антибактериальным и противогрибковым свойствам он занимает

уникальное положение в биоматериалах и широко используется в различных областях медицины, косметической продукции, упаковке пищевых продуктов. Амино- и гидроксильные функциональные группы в цепи хитозана могут образовывать стабильные ковалентные связи с функциональными группами других веществ. По гидроксильным группам макромолекул хитозана может происходить несколько неспецифических реакций, таких как этерификация и эстерификация, что обеспечивает дополнительное пространство для его функционализации. Кроме того, аминогруппа d-глюкозамина может быть специфически кватернизована в мягких условиях. Уникальным является то, что хитозан является единственным положительно заряженным природным полисахаридом. Однако использование хитозана ограничено из-за его плохой растворимости в воде [6].

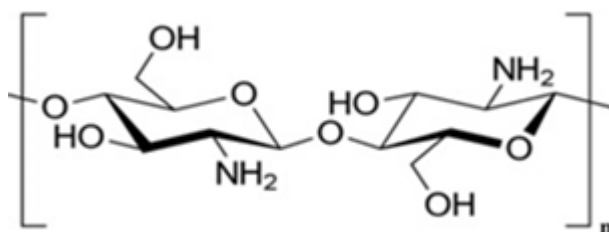


Рисунок 1.1 – Структурная формула хитозана

Анионные полисахариды обладают рядом уникальных свойств и преимуществ благодаря своей химической структуре и функциональным особенностям [7]:

1. Биологическая активность

Анионные полисахариды часто проявляют иммуномодулирующие свойства. Они могут стимулировать выработку цитокинов, активировать макрофаги и другие клетки иммунной системы человека.

2. Антиоксидантные свойства

Некоторые анионные полисахариды способны нейтрализовать свободные радикалы, что делает их полезными для защиты клеток от окислительного стресса и повреждения ДНК.

3. Противовоспалительные свойства

Данные полисахариды могут снижать воспаления за счет ингибирования воспалительных медиаторов и уменьшения активности провоспалительных ферментов.

4. Заживляющие свойства

Полисахариды с анионными группами способствуют ускорению заживления ран, улучшая регенерацию тканей и стимулируя ангиогенез.

5. Антикоагулянтная активность

Некоторые анионные полисахариды, например, гепарин, используются в медицине как антикоагулянты, предотвращая образование тромбов и помогая контролировать свертываемость крови.

6. Пребиотические свойства

Анионные полисахариды могут служить питательной средой для полезных бактерий в кишечнике, поддерживая здоровье микробиома и улучшая пищеварение.

7. Гелеобразующая способность

Многие анионные полисахариды образуют стабильные гели, что используется в пищевой промышленности для создания текстурированных продуктов, а также в фармацевтике для получения лекарственных форм длительного действия.

8. Эмульгирующие свойства

Благодаря своим поверхностно-активным свойствам, некоторые анионные полисахариды могут стабилизировать эмульсии, что находит применение в косметической и пищевой отраслях.

9. Комплексообразующая способность

Способность образовывать комплексы с катионами металлов позволяет использовать анионные полисахариды в качестве хелатирующих агентов для удаления тяжелых металлов из организма человека и окружающей среды.

Комплекс ценных свойств делает анионные полисахариды перспективными полимерами для применения в различных областях. В современной фармацевтической промышленности в качестве носителей БАВ широко используются такие анионные полисахариды как, альгинаты, гиалуроновая кислота, декстраны, пектин, производные целлюлозы, пуллулан, арабиногалактан. Остановимся более подробно на отдельных представителях анионных полисахаридов.

Производные альгиновой кислоты стали одними из наиболее широко изученных биополимеров из-за их уникальных свойств и универсальности. Альгинаты широко распространены в природе, биосовместимы, водорастворимы и обладают хорошими мукоадгезивными свойствами. Являются натуральными линейными полисахаридами, полученными в основном из бурых водорослей, а именно, *Laminaria hyperborean*,

Macrocystis pyrifera и *Ascophyllum nodosum*. Макромолекулы альгинатов состоят из двух моносахаридов уроновой кислоты, а именно, D-маннуровой кислоты [M] и L-гулуровой кислоты [G], которые связаны между собой β -1,4 и α -1,4 гликозидными связями. Наиболее распространенной солью альгиновой кислоты является альгинат натрия (рисунок 1.2). Альгинаты отличаются высокой гелеобразующей способностью в присутствии двухзарядных ионов. При образовании геля молекулы воды физически удерживаются внутри полимерной матрицы, однако остаются подвижными. Это свойство альгинатов уже более трех десятилетий применяется для инкапсуляции различных ЛВ, белков, генов и клеток.

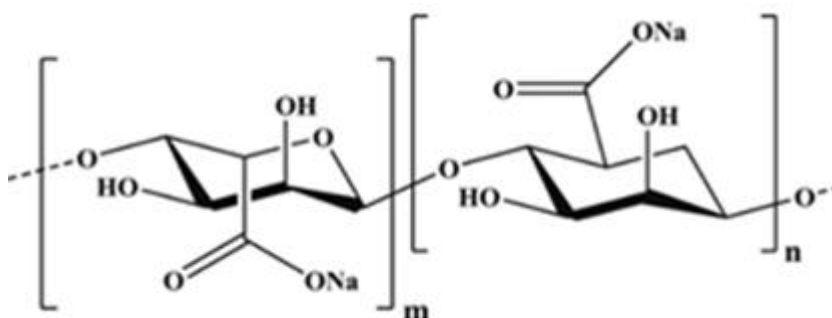


Рисунок 1.2 – Структурная формула альгината натрия

Альгинаты используются для создания ранозаживляющих повязок, а также как гемостатики для остановки кровотечений. Водорастворимые ЛВ обычно высвобождаются из полимерной матрицы посредством диффузии, а для высвобождения малорастворимых веществ требуется разрушение самой альгинатной матрицы. Молекулы небольших размеров высвобождаются довольно быстро, так как поры матрицы альгината имеют диаметр около 5 нм [8]. Если же необходимо продлить время высвобождения, необходимо образовать физические или химические связи между ЛВ и матрицей [9].

Карбоксиметилцеллюлоза представляет собой водорастворимое анионное производное целлюлозы. Годовая биосинтетическая способность природы производить целлюлозу оценивается в 10¹¹-10¹² тонн/год, поэтому целлюлоза имеет статус самого распространенного природного биополимера. Основной мономерной единицей целлюлозы является d-глюкоза (единица ангидроглюкозы, которая последовательно соединяется через связи β -1,4 между углеродом 1 и углеродом 4 соседних единиц). Это обеспечивает линейную структуру макромолекул целлюлозы. Гликозидные связи

относительно легко разрушаются при протекании гидролиза в присутствии кислотных катализаторов. Из-за этого целлюлоза менее устойчива к воздействию водных растворов кислот, однако остается стабильной в условиях щелочного гидролиза [10].

На практике обычно используется натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (рисунок 1.3). Она хорошо растворяется в воде, а также в водных растворах щелочей, аммиака и хлорида натрия. Свойства полиэлектролита зависят от молекулярной массы и степени замены гидроксильных групп на карбоксиметильные группы в цепи. В фармацевтике Na-КМЦ широко применяется для создания разнообразных лекарственных форм, таких как мази, суспензии, эмульсии, таблетки, глазные лекарственные пленки.

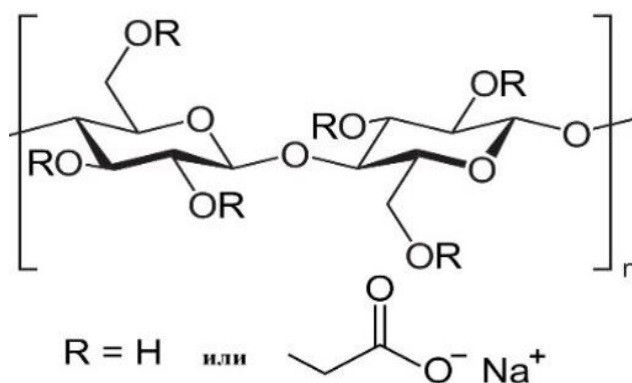


Рисунок 1.3 – Структурная формула натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы

Каррагинаны – это семейство природных анионных полисахаридов, получаемых из красных водорослей Rhodophyta. Впервые они были выделены в 1837 году и долго использовались как желирующие агенты для пищевой промышленности. В последние два десятилетия все чаще используются в качестве биоматериала для различных фармацевтических целей. Каррагинаны демонстрируют улучшение лекарственной формы и замедленное высвобождения ЛВ. Они состоят из длинных линейных цепей d-галактозы и d-ангидрогалактозы с эфирными сульфатами. Различают несколько типов структур каррагинана, которые отличаются содержанием 3,6-ангидро-галактозы, местоположением и количеством сульфатных групп (от 22 до 35%). Различные виды каррагинанов показывают также разную линейную плотность заряда цепи и растворимость в зависимости от количества сульфатных групп. Выделяют более 16

структур каррагинанов, но главными являются гелеобразующие типы, такие как κ - и ι -каррагинаны, и негелеобразующий λ -каррагинан (рисунок 1.4) [11].

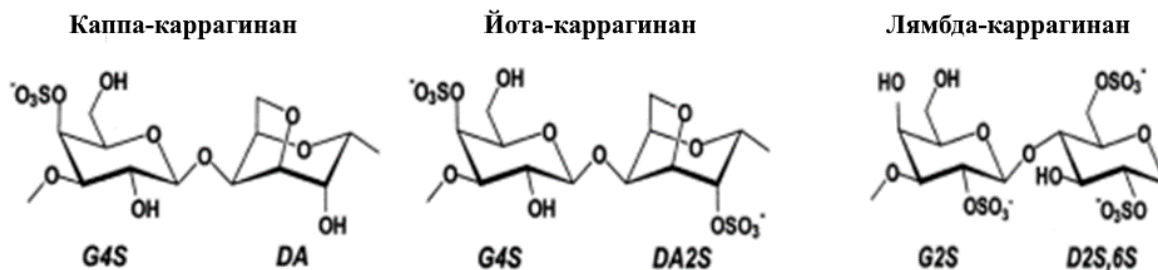


Рисунок 1.4 – Структура κ -, ι - и λ -каррагинанов

Пектин представляет собой линейный полисахарид, состоящий главным образом из остатков D-галактурановой кислоты, связанных α -1,4-гликозидными связями (рисунок 1.5) [12]. Высшие растения служат источником пектина, его содержание в их клеточных стенках может достигать более 30% по массе сухого вещества [13].

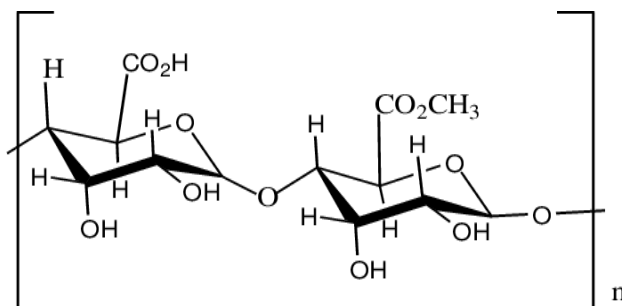


Рисунок 1.5 – Структурная формула пектина

Хотя пектин присутствует почти во всех растительных тканях, природные источники, подходящие для его промышленного получения, ограничены. На сегодняшний день коммерческий пектин извлекают исключительно из яблочного жмыха или кожуры цитрусовых плодов (например, апельсинов, лимонов). Пектин обладает рядом ценных свойств, включая способность прилипать к слизистым оболочкам, биосовместимость и отсутствие токсичности, благодаря чему подходит для использования в системах контролируемого высвобождения ЛВ через желудочно-кишечный тракт и нос [14, 15]. Однако у систем, включающих пектин, есть один минус: они могут набухать в физиологических условиях, что приводит к преждевременному высвобождению

лекарственных средств. Широкое использование пектина в качестве носителя ЛВ затрудняется также нестабильностью его композиций во время хранения. Например, вязкость растворов пектина может существенно уменьшиться через полгода хранения при температурах 25 и 40°C. Однако, согласно исследованию [16], снижение вязкости не оказывает влияния на высвобождение ЛВ из пектинового геля *in vitro* [17-19].

Гиалуроновая кислота – это природный линейный полисахарид, состоящий из повторяющихся звеньев N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкуроновой кислоты, соединенных чередующимися β -1,3- и β -1,4-гликозидными связями (рисунок 1.6) [20]. Из-за того, что значения pK_a карбоксильных групп гиалуроновой кислоты находятся в пределах 3-4, при физиологическом pH 7,4 эти группы находятся в ионизированной форме, превращая кислоту в полианион, известный как гиалуронат [21].

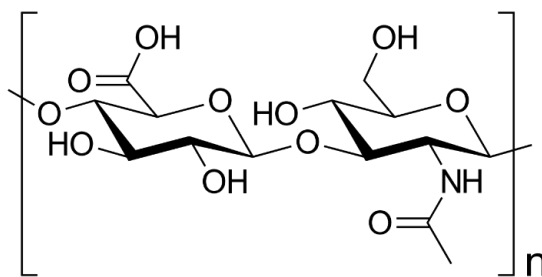


Рисунок 1.6 – Структурная формула гиалуроновой кислоты

Данный анионный полисахарид проявляет высокую гидрофильность благодаря образованию водородных связей с окружающими его молекулами воды, что делают растворы гиалуроновой кислоты чрезвычайно вязкими и эластичными [22]. В организме она преимущественно содержится в межклеточном матриксе соединительных тканей и в больших количествах присутствует в стекловидном теле глаза. Гиалуроновая кислота также играет ключевую роль в функционировании клеток, влияя на их пролиферацию, миграцию и модуляцию внутриклеточной сигнализации [23]. В медицинской практике гиалуроновая кислота используется для лечения остеоартрита (например, Hyalgan®, Artz®, Orthovisc®, Healon® и другие препараты), в офтальмологии и пластической хирургии (Bionect®, Connettivina®, Jossalind®), а также в тканевой инженерии [24]. Как носитель БАВ, данный полисахарид применяется для рецепторно-опосредованной доставки ЛВ при терапии онкологических заболеваний (например, конъюгатов с доксорубицином, паклитакселем,

цисплатином), для доставки белков, пептидов, нуклеотидов, противовоспалительных препаратов (таких как, метотрексат, дексаметазон, метилпреднизалон) [25].

Пуллулан представляет собой полисахарид, образованный из мальтотриозных единиц, который был впервые выделен Бернье в 1958 году. Его структура включает три глюкозные единицы в мальтотриозе, соединенные α -1,4 гликозидной связью, а последовательные мальтотриозные единицы связаны между собой через α -1,6 гликозидные связи (рисунок 1.7).

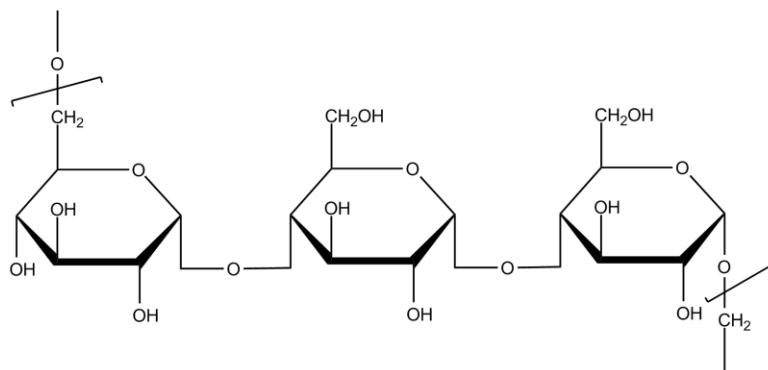


Рисунок 1.7 – Структурная формула пуллулана

Пуллулан производится посредством ферментации крахмала с использованием гриба *Aureobasidium pullulans* [26]. В фармацевтике пуллулан и его производные находят применение в качестве водорастворимого стоматологического клея, а также используются для стабилизации цвета при изготовлении таблеток и гранул. Помимо этого, совместное использование пуллулана с циклодекстринами способствует улучшению стабильности, совместимости с биологическими тканями и способности к биоразложению образующихся микросфер [27]. Производные пуллулана могут использоваться в виде конъюгатов при создании вакцин [28]. Благодаря тому, что пуллулан связывается с лектиноподобными рецепторами печеночных клеток, его можно использовать для направленной доставки ЛВ в печень [29].

Декстраны – это полимеры глюкозы, которые используются в медицине более 50 лет как заменители плазмы и антитромботические препараты [30]. В структурном плане декстраны преимущественно состоят из молекул D-глюкозы, соединенных через α -1,6-связи, при этом боковые цепи присоединены посредством α -1,3-связей (рисунок 1.8).

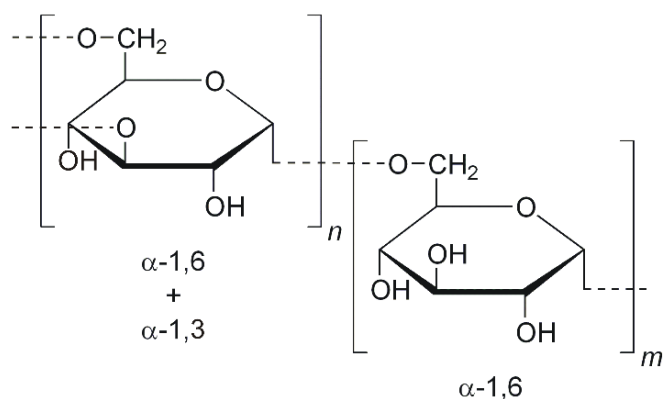


Рисунок 1.8 – Структурная формула декстранов

Степень разветвления значительно варьируется в зависимости от источника декстрана и может составлять от 0,5 до 60% [31-33]. Декстраны с разветвленностью свыше 43% (α -1,3-связи) нерастворимы в воде, поэтому все их коммерческие виды обладают низкой степенью разветвления (0,5%) и отлично растворяются в воде [34]. В связи с особенностями метаболизма, происходящего в толстой кишке, конъюгаты с декстраном применяются для целевой доставки ЛВ в этот участок желудочно-кишечного тракта. Кроме того, в научной литературе упоминаются конъюгаты декстранов с 5-аминосалициловой кислотой, кетопрофеном и селекоксибом [35].

1.2 Закономерности формирования и свойства полиэлектролитных комплексов на основе полисахаридов

В смешанных водных растворах противоположно заряженных полиэлектролитов образуется особый класс полимерных систем – полиэлектролитные комплексы. Впечатляющим примером их использования является обработка загрязненной почвы вокруг Чернобыльского ядерного реактора после катастрофы 1986 года. Этот пример продемонстрировал динамическую природу комплексов, которые в данном случае использовались для связывания ионов и уплотнения загрязненной почвы [4].

Различные аспекты формирования и структура комплексов между противоположно заряженными макромолекулами изучаются уже несколько десятилетий [5]. Благодаря значительным достижениям в методах синтеза ПЭК, они могут широко использоваться в передовых биомедицинских областях науки, таких как направленная доставка лекарственных веществ, создание покрытий на медицинских имплантах, генная

инженерия [6]. ПЭК также широко используются в качестве вспомогательных веществ в фармацевтической промышленности [36-39].

Однако использование комплексов полисахаридов в качестве носителей ЛВ осложнено из-за широкого распределения молекулярной массы их макромолекул, изменчивости свойств в зависимости от сырьевой базы [40-42]. Для преодоления этих недостатков хорошо зарекомендовавшей себя стратегией является введение функциональных фрагментов в основную полимерную цепь. Например, наличие реакционноспособных групп в структуре макромолекул хитозана позволяет получать различные производные, такие как ацетилированный хитозан, алкилированный хитозан, карбоксилированный хитозан и др. [43-46]. Другой перспективной стратегией является объединение природных полиэлектролитов в полиэлектролитные комплексы. Образующиеся полимерные структуры обладают комплексом уникальных свойств, поэтому они все чаще используются при разработке «умных» материалов для биомедицины [47].

ПЭК образуются благодаря кооперативному электростатическому взаимодействию противоположно заряженных полиэлектролитов (поликатионов и полианионов), что приводит к их самосборке (самоассоциации, самоорганизации) в водных средах. Процесс самоорганизации полиэлектролитов в растворе можно описать как «спонтанную межмолекулярную ассоциацию посредством нековалентных связей (электростатических, водородных, донорно-акцепторных, гидрофобных взаимодействий), результатом которой является формирование стабильных супрамолекулярных структур размером от 10 нм до 10 мкм» (рисунок 1.9) [48].

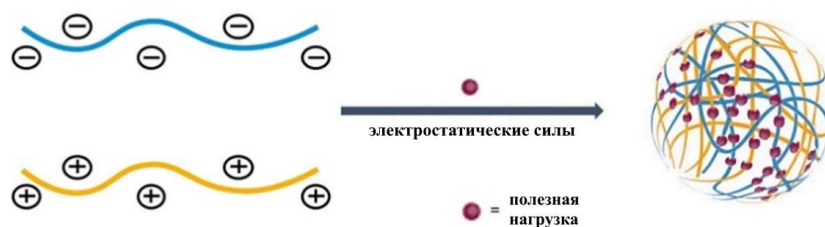


Рисунок 1.9 – Образование самоорганизующейся частицы ПЭК [48]

Наличие гидрофобных областей в структуре макромолекул полиэлектролитов может способствовать образованию комплексов и их агрегации, что добавляет сложность в понимании механизма комплексообразования [49]. На формирование и

прочность ПЭК оказывают влияние и некоторые специфические взаимодействия, такие как водородные связи [50] или координационные взаимодействия [51]. Водородные связи широко распространены в природе и играют важную роль в поддержании стабильности веществ, например, вторичной структуры белков [52]. Одновременное образование большого количества водородных связей приводит к формированию очень стабильной структуры, что может быть распространено на модификацию полиэлектролитных наночастиц [53].

Известно, что основными факторами, определяющими закономерности формирования ПЭК, являются:

1) *Заряд и структура макромолекул*

Заряд и пространственная конфигурация обоих полиэлектролитов играют ключевую роль в образовании комплекса. Если макромолекулы имеют противоположный заряд, то они будут притягиваться друг к другу за счет электростатических взаимодействий [54].

2) *Концентрация компонентов*

Концентрации обоих полиэлектролитов влияют на степень образования комплекса. При избытке одного из полиэлектролитов происходит образование менее стабильной структуры [55].

3) *pH среды*

pH раствора влияет на степень ионизации полиэлектролитов. Увеличение или уменьшение величины pH может привести к изменению степени связывания между полиэлектролитами, а также разрушению уже сформированных комплексов [56].

4) *Ионная сила*

Ионная сила раствора оказывает влияние на стабильность ПЭК. Высокие концентрации солей в растворе ослабляют взаимодействие между полиэлектролитами, поскольку соль снижает эффективность электростатического связывания [57].

5) *Температура*

Повышение температуры обычно способствует увеличению скорости реакции комплексообразования, однако при очень высоких температурах может произойти разрушение комплекса [58].

6) *Молекулярная масса и гибкость цепи полиэлектролита*

Молекулярная масса и гибкость цепи полиэлектролитов определяют их способность к формированию устойчивых структур. Более длинные и гибкие полимерные цепи

склонны к более эффективному комплексообразованию [30]. Природные полисахариды могут иметь значительно различающиеся молекулярные массы. В работе [59] показано, что хитозан с относительной молекулярной массой 600 000 и 100 000 не мог образовывать наночастицы ПЭК с альгинатом натрия. Вместо этого образовывались только большие объемы гидрогелей. Однако при применении хитозана с молекулярной массой 50 000 были получены наночастицы хитозан–альгинат.

Помимо указанных факторов, при формировании комплексов полисахаридов важно учитывать и следующие, более прикладные аспекты [60]:

1) Равновесие и кинетика

- *Динамическое равновесие*: формирование ПЭК часто происходит через динамические процессы, когда полиэлектролиты постоянно переходят из свободного состояния в связанную форму и обратно.

- *Кинетические ограничения*: скорость образования комплекса может быть ограничена диффузией компонентов или кинетикой реакций комплексообразования.

2) Гетерогенность компонентов

- *Полидисперсность*: полиэлектролиты, используемые для формирования ПЭК, часто обладают широким распределением по молекулярной массе, что усложняет контроль над процессом комплексообразования.

- *Химическая неоднородность*: природа функциональных групп и их распределение вдоль цепи могут оказывать различное влияние на формирование комплекса.

3) Стабильность и долговечность

- *Устойчивость к внешним воздействиям*: ПЭК должны сохранять свою структуру и свойства под воздействием различных факторов [61].

- *Разрушение комплекса*: определенные условия, такие как изменение pH, ионной силы, добавление определенных ионов, могут привести к разрушению комплекса.

4) Технологические аспекты

- *Масштабируемость*: перенос лабораторных методов синтеза ПЭК на промышленный уровень может представлять значительные трудности из-за необходимости обеспечения однородности продукта и контроля над всеми параметрами процесса.

- *Стоимость производства*: использование дорогостоящих исходных биополимеров и сложных технологических процессов могут ограничивать коммерческую применимость некоторых ПЭК [62].

Совокупность перечисленных выше факторов делают процесс формирования полиэлектролитных комплексов сложным и многогранным, требующим тщательного анализа и оптимизации для придания им желаемых свойств.

1.3 Применение полиэлектролитных комплексов природных полисахаридов в доставке лекарственных веществ

Разработка новых лекарственных средств является очень сложным процессом, ряд проблем которого можно решить с помощью функционального дизайна средств доставки ЛВ. Важно поддерживать терапевтическую концентрацию препарата в определенных тканях и органах человека, минимизируя при этом системную доступность и токсичность ЛВ [31]. Сложной проблемой является также повышение биодоступности нестабильных и плохо растворимых ЛВ. ПЭК на основе полисахаридов находят широкое применение в биомедицине и фармацевтической промышленности благодаря комплексу уникальных свойств. К основным преимуществам ПЭК природных полиэлектролитов можно отнести следующие свойства [63]:

1. Контролируемое высвобождение лекарственного вещества

ПЭК могут быть разработаны таким образом, чтобы обеспечивать контролируемую скорость высвобождения активного компонента. Это позволяет избежать резких скачков концентрации ЛВ в организме человека и поддерживать необходимый уровень препарата в течение длительного времени.

2. Биосовместимость и биodeградируемость

ПЭК на основе полисахаридов являются биосовместимыми и способны разлагаться в организме без токсического воздействия.

3. Биоактивность

Природные полиэлектролиты в составе ПЭК обладают собственной биоактивностью, которая включает способность модулировать иммунную систему человека, а также разнообразную тканеспецифическую способность.

4. Защита лекарственного вещества от разрушения

ПЭК могут защищать активные лекарственные компоненты от агрессивной среды желудочно-кишечного тракта, ферментов крови и других факторов, что увеличивает стабильность и эффективность доставляемого ЛВ.

5. Целевая доставка лекарственных веществ

За счет специфических свойств полиэлектролитов на основе их комплексов можно создавать системы, способные направленно доставлять ЛВ к определенным органам и тканям организма человека.

6. Увеличение растворимости гидрофобных лекарственных веществ

Использование ПЭК позволяет инкапсулировать ЛВ с низкой водорастворимостью, улучшать их растворимость, повышая биодоступность.

7. Снижение побочных эффектов

Благодаря возможности контролировать высвобождение и концентрацию лекарственного вещества, ПЭК помогают минимизировать побочные эффекты, связанные с высокими дозами препаратов.

8. Возможность модификации структуры комплексов

Структура ПЭК может быть модифицирована различными способами, включая изменение молекулярного веса полиэлектролитов, степени их ионизации, а также введения функциональных групп в основную цепь. Это открывает широкие перспективы для создания новых типов носителей, адаптированных под конкретные задачи.

9. Многофункциональность комплексов

В одном ПЭК можно сочетать несколько активных компонентов, что делает возможным создание комбинированных препаратов с синергетическим эффектом.

Важным преимуществом ПЭК полисахаридов как полимерных систем является возможность разрабатывать на их основе носители ЛВ различной надмолекулярной организации: нано- и микрокапсулы, сферогели, наночастицы, пленки и т.д.

Наночастицы обладают большой площадью поверхности, что обеспечивает их высокую способность к инкапсуляции БАВ. Системы доставки в виде наночастиц ПЭК полисахаридов значительно повышают биодоступность терапевтических препаратов благодаря их мукоадгезивным свойствам. Наночастицы ПЭК получают, как правило, в мягких условиях в водных средах, что позволяет поддерживать стабильность лабильных ЛВ.

При пероральном или назальном введении небольшой размер таких полимерных носителей способствует их адгезии на слизистых поверхностях. После этого транспорт происходит через внутриклеточные пути и дефекты в эпителии слизистой оболочки, что позволяет им быстро проникать в клетки и слизистые ткани [64]. Размер наночастиц ПЭК полисахаридов позволяет им при парентеральном введении проходить через самые мелкие кровеносные сосуды и избегать системы фагоцитов, тем самым продлевая период полувыведения инкапсулированных ЛВ из кровотока и потенциально снижая токсические эффекты «взрывного» высвобождения. Парентерально доставляемые наночастицы ПЭК могут быть разработаны для концентрирования в опухолях из-за улучшенного эффекта проницаемости и удержания, при котором более проницаемая сосудистая сеть и нарушенный лимфатический клиренс позволяют удерживать наночастицы внутри пораженных тканей лучше, по сравнению с нормальной тканью [65].

Возможность настраивать размер и морфологию наночастиц на основе ПЭК позволяет использовать преимущества различных размерных форм. Например, для вакцин частицы размером менее 500 нм, как правило, лучше поглощаются дендритными клетками [66]. При пероральной доставке проникновение ЛВ через мембрану желудочно-кишечного тракта увеличивается с уменьшением размера частиц и, в идеале, необходимо использовать частицы диаметром от 50 до 300 нм [64]. Это связано с тем, что частицы меньшего размера лучше захватываются микроворсинками желудочно-кишечного тракта, увеличивая время пребывания носителя БАВ. Микрочастицы с размером больше 1 мкм, несмотря на более ограниченный транспорт, также могут перемещаться через мембрану желудочно-кишечного тракта, в основном посредством иммунной активности через бляшки Пейера [67]. Для парентерального ввода ЛВ используются наночастицы с размером, не превышающим 100-200 нм.

Парентеральное введение ЛВ имеет клинические преимущества по сравнению с другими методами, так как при таком способе преодолеваются проблемы стабильности ЛВ и транспортировки их из пищеварительной и дыхательной систем в кровоток. Для повышения эффективности перорального и назального введения необходимы системы доставки БАВ, которые могут максимально увеличить время их пребывания в определенном месте и способность проникать через эпителий, увеличивая всасывание в кровеносную систему [68]. Наночастицы ПЭК хитозана и альгината использовались для

назальной доставки, что позволяло ЛВ избежать метаболизма в печени, который происходит при внутривенном введении [69]. Такая трансмукозальная доставка через эпителиальные барьеры достигается благодаря способности хитозана расширять плотные клеточные соединения, которая усиливает транспорт и поддерживает активность объемных биомакромолекул, таких как белки [70].

В работе [71] показано, что наночастицы ПЭК хитозан–каррагинан не обладают цитотоксичностью в диапазоне концентраций от 0,1 до 3 мг/мл. Исследование высвобождения инкапсулированного альбумина яичного белка *in vitro* показало, что такие наночастицы обеспечивают контролируемое высвобождение белка в течение длительного периода. На рисунке 1.10 представлена микрофотография наночастиц ПЭК хитозан–каррагинан, которая свидетельствует о компактной структуре частиц и их сферической форме. Разработанные наноносители хитозан–каррагинан показали низкую токсичность при контакте с фибробластоподобными клетками, что является обнадеживающим показателем их биосовместимости и безопасности.

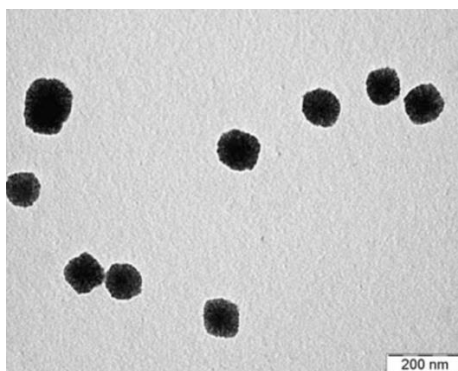


Рисунок 1.10 – ТЭМ-изображение наночастиц полиэлектролитного комплекса хитозан–каррагинан (3,5 : 1)

Большинство полисахаридов имеют в структуре несколько полярных групп. Это означает, что они могут образовывать нековалентные сшивки между цепями в водных средах, образуя гидрогели. В зависимости от размера частиц полимерные гидрогели подразделяются на макро-, микро- или наногели. Благодаря биоимитирующим свойствам гидрогели на основе ПЭК полисахаридов перспективны для биомедицинского применения (рисунок 1.11). Гидрогели отличаются от других типов биоматериалов тем, что они имеют высокое содержание воды и контролируемую тенденцию к набуханию. Благодаря своей химической структуре и сшитой сети они могут тонко реагировать на различные стимулы [72].

Однако зачастую свойства гидрогелей полисахаридов не подходят для доставки ЛВ, поэтому полимеры подвергают химической модификации, чтобы либо улучшить физические свойства структуры геля, либо настроить их для оптимальной загрузки терапевтического препарата, его хранения и доставки. Чтобы обеспечить продолжительное высвобождение ЛВ из полимерных гелей, например, проводят модификацию полимерной матрицы другими полиэлектролитами с образованием ПЭК, либо сшивающими агентами.

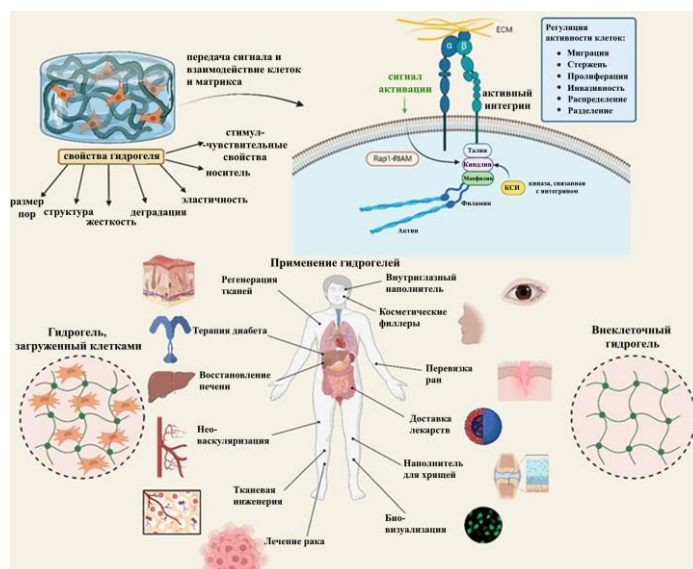


Рисунок 1.11 – Биомедицинское применение гидрогелей [72]

Полимерные носители на основе гидрогелей ПЭК полисахаридов имеют преимущества в использовании при парентеральном и трансмукозальном способах введения. Вместе с тем, гелевые системы используются и для пероральной доставки ЛВ, поскольку образуют мягкие пористые структуры с высоким содержанием воды и могут имитировать микросреду внеклеточного матрикса (рисунок 1.12) [73].

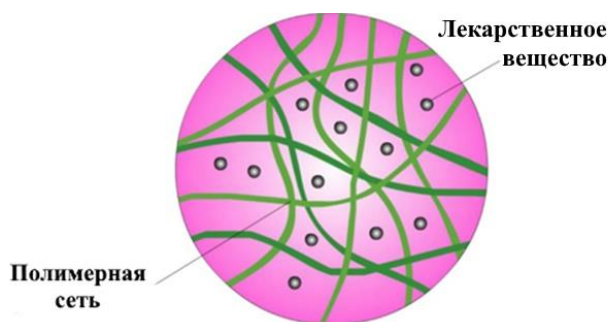


Рисунок 1.12 – Пористый гидрогель с иммобилизованным лекарственным веществом [73]

Гидрогели на основе ПЭК полисахаридов обладают способностью к набуханию и деградации в различных средах, что можно использовать для специфического нацеливания БАВ. Отрицательно заряженные гидрогели устойчивы к набуханию и растворению в кислых условиях. Это минимизирует высвобождение ЛВ из геля во время их транзита через желудок [74]. Более высокий уровень pH в кишечнике, особенно в толстой кишке, позволяют отрицательно заряженным гидрогелям набухать, высвобождая инкапсулированные БАВ [75]. При использовании хитозана в качестве внешнего покрытия таких ионотропных гидрогелей при прохождении через кишечник обеспечивается мукоадгезия, увеличивается время высвобождения ЛВ из гелевой системы доставки [76].

Самосборка по методу «слоя за слоем» («Layer-by-layer», сокращенно LbL) – это универсальная технология, используемая для получения функциональных поверхностных покрытий. Такая сборка включает в себя чередуемое осаждение мновалентных соединений, что приводит к образованию многослойной структуры. Впервые продемонстрированное с заряженными коллоидами, использование метода LbL для различных приложений резко возросло после того, как Дечер и Хонг [77] применили этот метод к полиэлектролитам в 1991 году. С помощью технологии послойного нанесения возможно формирование как многослойных полиэлектролитных покрытий на плоских поверхностях, так и оболочек на сферических темплатных матрицах (рисунок 1.13 а, б). Среди преимуществ сборки по методу LbL является способность легко покрывать субстраты, различающиеся по физико-химическим свойствам и геометрии, не повреждая их. Мягкие условия процесса позволяют включать в многослойные структуры биомолекулы, избегая токсичных растворителей, повышенных температур, высоких значений pH и ионной силы. Исследователи изучили использование биоматериалов, полученных по технологии LbL, для клеточной инженерии, тканевой инженерии и регенеративной медицины, получения биосенсоров [78] и систем доставки ЛВ [79].

Наиболее известным способом получения полиэлектролитных капсул является методика, основанная на использовании темплатной матрицы различного типа. Этот метод заключается в последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на поверхность матрицы, что позволяет создать многослойную оболочку.

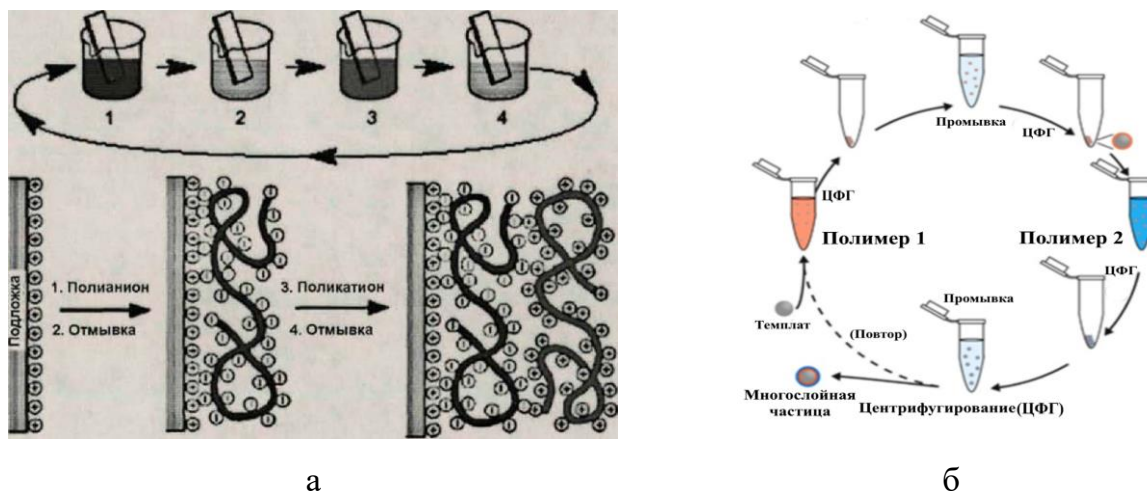


Рисунок 1.13 – Схематическое изображение получения многослойных полиэлектролитных покрытий с использованием коллоидных частиц в качестве темплата

Для получения сферических полиэлектролитных капсул в качестве темплата применяются дисперсные микро- и наночастицы, которые могут быть как органического происхождения (например, полистирольные и меламинформальдегидные частицы), так и неорганического (такие как, CaCO_3 , MnCO_3 , CdCO_3). Сферические частицы CaCO_3 активно применяются в роли неорганического матрикса, благодаря своей биосовместимости и способности легко растворяться этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) в нейтральных условиях, что особенно ценно при взаимодействии с нестабильными биологическими соединениями (рисунок 1.14) [80].

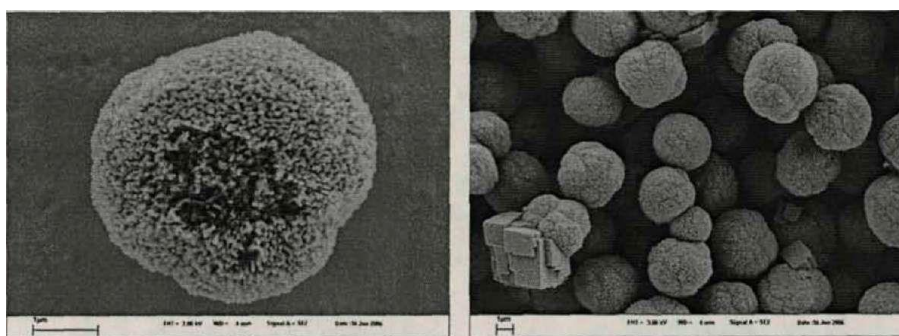


Рисунок 1.14 – СЭМ-изображения микрочастиц CaCO_3 [80]

Органические ядра, такие как меламиноформальдегид (МФ) и полистирол (ПС) первоначально использовались в качестве темплата [81]. Ядра МФ и ПС обычно растворяются в растворах с рН ниже 1,6 или органическими растворителями

(диметилформамид, диметилсульфоксид и тетрагидрофуран). Использование темплата из оксида кремния (SiO_2) довольно распространено, однако растворение с использованием плавиковой кислоты ограничивает его применение [82].

Процесс разложения ядра может влиять на свойства полиэлектролитных капсул, например, на ее целостность, размер, проницаемость стенок, топологию поверхности и эластичность стенок. Например, исследования [81] выявили макроскопически обнаруживаемые поры в капсулах, изготовленных из полистиренсульфоната и полидиаллилдиметиламмонийхлорида. Набухание и усадка капсул наблюдались параллельно с исчезновением флуоресценции ядер, меченых родамином (рисунок 1.15).

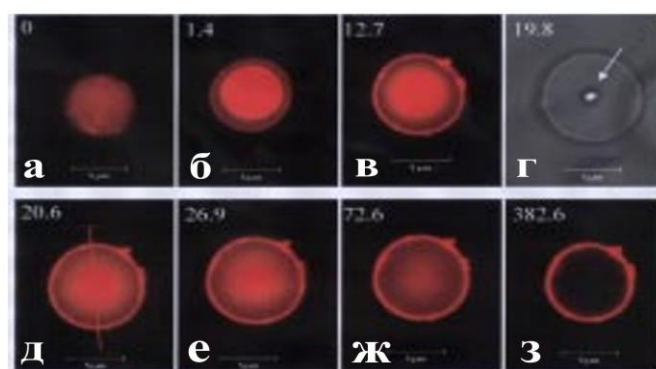


Рисунок 1.15 – Изображение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии процесса разложения органического ядра полистиренсульфоната как функции времени. Стрелка на (г) указывает на остаток ядра, цифры на вставках указывают время разложения ядра соответственно [81]

В работе [83] по технологии LbL получены хорошо диспергированные полые многослойные микрокапсулы с использованием положительно и отрицательно заряженных слоев хитозана и альгината. В качестве темплата использовались микрочастицы CaCO_3 . Попеременное осаждение бислоев полиэлектролитов контролировалось с помощью измерения ζ -потенциала (рисунок 1.16 А). Показано получение неагрегированных сферических капсул, включающих бислой полиэлектролитов хитозан/альгинат, со средним диаметром $4,8 \pm 0,9$ мкм (рисунки 1.16 Б, В). Из рисунков видно, что полые микрокапсулы сохраняли сферическую форму ядра после его удаления ЭДТА. Аналогичное поведение наблюдалось и для микрочастиц CaCO_3 , покрытых 4 слоями полиэлектролитов (рисунок 1.16 Г).

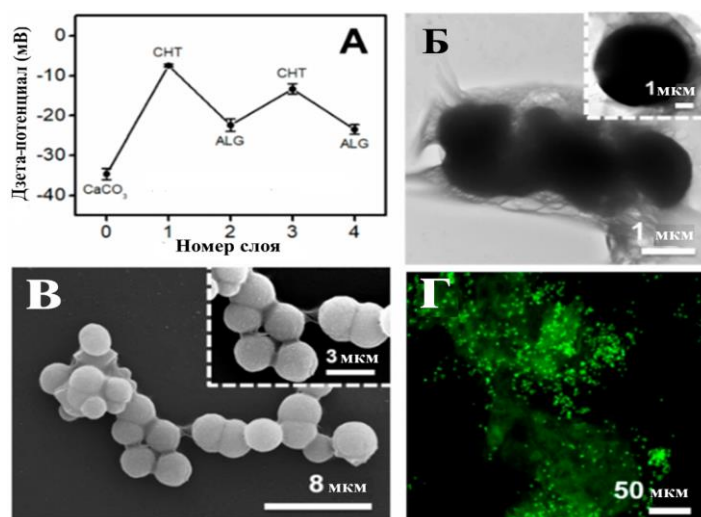


Рисунок 1.16 – Средний ζ -потенциал как функция количества слоев полисахаридов для микрочастиц CaCO_3 , покрытых чередующимися слоями хитозана и альгината (А); ТЭМ (Б), СЭМ (В) и флуоресцентные микрофотографии частиц CaCO_3 с ядром и оболочкой после осаждения четырех слоев полисахаридов (Г) [83]

Процесс сборки многослойных капсул на основе ПЭК хитозан–карбоксиметилцеллюлоза контролировали с помощью УФ-спектроскопии [84]. Полиэлектролиты чаще всего не обладают поглощением в УФ-области, поэтому в качестве поликатиона вместо чистого хитозана использовали хитозан, меченый красителем флуоресцеином. Продукт имел два пика поглощения в диапазоне 450-500 нм. Электронные спектры свидетельствуют о том, что полиэлектролиты собрались в многослойную поверхность (рисунок 1.17). Максимальное поглощение при 490 нм увеличивается с ростом числа бислоев.

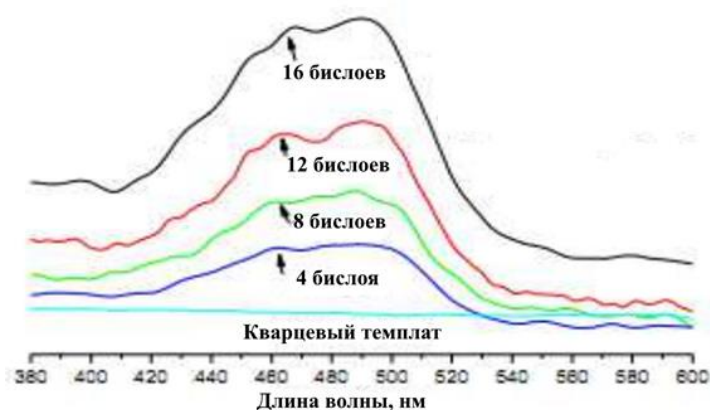


Рисунок 1.17 – Спектры поглощения микрокапсул хитозан–карбоксиметилцеллюлоза с различным количеством слоев [84]

СЭМ-изображения свидетельствуют от том, что капсулы, покрытые ПЭК хитозан–карбоксиметилцеллюлоза, имеют более гладкую поверхность по сравнению с темплатом (рисунок 1.18). Анализ изображений показал, что частицы темплата и микрокапсулы имеют размер 2,03 мкм и 2,15 мкм соответственно. Таким образом, толщина одной двухслойной пленки хитозан–карбоксиметилцеллюлоза составляет 25 нм [84].

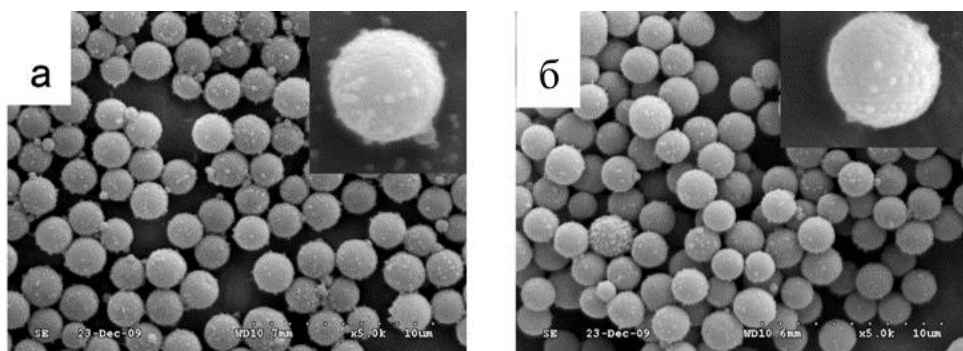


Рисунок 1.18 – СЭМ-изображения коллоидных частиц темплата (а) и частиц меламинаформальдегида после осаждения бислоев хитозан–карбоксиметилцеллюлоза (б) [84]

Разработанные биосовместимые носители лекарственных веществ на основе полисахаридов в виде наночастиц, гидрогелей и полиэлектролитных микрокапсул имеют большие перспективы в их использовании для успешной инкапсуляции, защиты и контролируемого высвобождения биоактивных молекул, открывая новые пути в доставке лекарств/генов, внутриклеточном трафике и стратегиях тканевой инженерии. Вместе с тем, современная биомедицина становится все более сложной и новым лекарственным веществам часто требуется поддержка системы доставки для улучшения свойств. Реализация множественных функций в одном полимерном носителе является решением этой сложной проблемы.

1.4 Подходы к контролируемому высвобождению биологически активных веществ из полимерных носителей на основе полисахаридов

Полимерные системы доставки на основе комплексов полисахаридов можно отнести к «умным» («интеллектуальным») системам введения ЛВ, поскольку они

способны высвободить иммобилизованные лекарственные средства в нужный момент и в требуемом месте под воздействием определенных физиологических факторов. Чувствительность ПЭК полисахаридов к различным стимулам определяет их выбор для создания биосовместимых адресных систем доставки ЛВ с контролируемым высвобождением.

Основные факторы, влияющие на процесс высвобождения ЛВ из полимерного носителя, можно разделить на несколько групп [85]:

1. Свойства полимера

- *Тип полимера*: различные полимеры имеют разные скорости деградации и взаимодействия с БАВ.

- *Молекулярная масса*: чем выше молекулярная масса полимера, тем медленнее происходит его деградация и соответственно медленнее высвобождается ЛВ.

- *Кристалличность*: полимеры могут быть аморфными или кристаллическими. Аморфные полимеры обычно быстрее деградируют и высвобождают ЛВ по сравнению с кристаллическими.

- *Гидрофильность/гидрофобность*: Гидрофильные полимеры легче впитывают воду и ускоряют высвобождение ЛВ, тогда как гидрофобные полимеры замедляют этот процесс.

2. Структура системы доставки

- *Форма частиц*: размер и форма частиц влияют на скорость диффузии воды внутрь полимерной матрицы и высвобождение ЛВ. Например, сферические частицы обеспечивают более равномерное высвобождение по сравнению с неправильной формой.

- *Пористость*: пористые материалы позволяют воде проникать внутрь полимера быстрее, что ускоряет высвобождение ЛВ.

- *Толщина покрытия*: если препарат покрыт слоем полимера, то толщина этого слоя будет влиять на время высвобождения активного вещества.

3. Физико-химические свойства лекарственного вещества

- *Растворимость*: ЛВ с высокой растворимостью будут высвобождаться быстрее, чем те, у которых низкая растворимость.

- *Размер молекул ЛВ*: молекулы меньшего размера диффундируют через полимерную матрицу быстрее, чем крупные молекулы.

- *Взаимодействие с полимером*: сила связи между ЛВ и полимерной матрицей влияет на скорость высвобождения. Более сильные связи требуют больше времени для разрушения.

4. Условия окружающей среды

- *pH*: изменение величины pH может повлиять на структуру полимера и его способность к высвобождению ЛВ.

- *Температура*: повышение температуры увеличивает кинетическую энергию молекул, что приводит к увеличению скорости диффузии и высвобождения ЛВ.

- *Ионная сила*: влияние ионной силы раствора на зарядовые взаимодействия между полимером и ЛВ также может изменять скорость высвобождения.

5. Механизмы высвобождения

- *Диффузия*: высвобождение ЛВ путем диффузии через полимерный материал.

- *Дегградация*: высвобождение БАВ происходит в процессе химической или ферментативной дегградации полимера.

- *Осмотическое давление*: осмос создает градиент давления внутри системы доставки, который способствует высвобождению ЛВ.

Взаимное влияние этих факторов определяет конечную скорость и профиль высвобождения ЛВ из полимерного носителя (рисунок 1.19) [86].

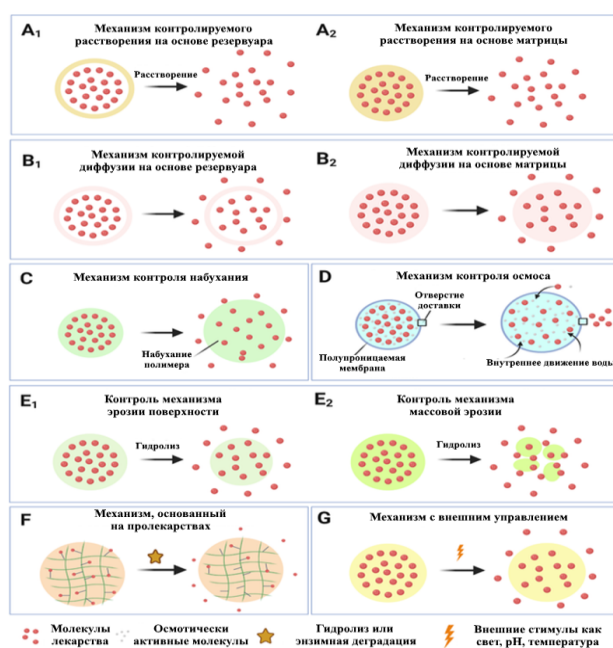


Рисунок 1.19 – Различные контролируемые механизмы высвобождения лекарственных веществ [86]

Действие ЛВ, иммобилизованного в системе доставки, определяется биофармацевтическими, фармакокинетическими аспектами абсорбции и распределения лекарственного средства, которые представляют собой совокупность процессов, описываемых системой LADMER (высвобождение, адсорбция, распределение, метаболизм, выведение и реакция) [87]. Высвобождение ЛВ из лекарственной формы является самым первым шагом в этой системе и в большинстве случаев может управляться путем оптимизации различных факторов. ЛВ с высокой растворимостью показывает более быстрое высвобождение, в то время как плохо растворимые в воде препараты ($<0,01$ мг/мл) часто приводят к неполному высвобождению из-за плохой растворимости и скорости растворения в матрице.

Растворимость ЛВ влияет не только на его растворение, но и эрозию самой полимерной матрицы. По мере снижения растворимости ЛВ тенденция матрицы к эрозии увеличивается. В набухающих матрицах, загруженных умеренно- или слаборастворимыми ЛВ, твердые частицы препарата могут транспортироваться внутри слоя геля за счет набухания полимера. Скорость растворения ЛВ отвечает за его транспорт близко к фронту эрозии матрицы. Присутствие твердых частиц в полимерной матрице уменьшает набухание полимерных цепей и влияет на ее устойчивость к эрозии [88]. Такой фактор, как размер частиц труднорастворимых ЛВ также влияет на их высвобождение, в основном из-за разницы в эффективной площади поверхности и, таким образом, собственной скорости растворения. В работе [89] авторы обнаружили снижение скорости растворения оксазепам с увеличением размера его частиц при постоянном содержании ЛВ.

Механизмы высвобождения играют ключевую роль в фармакокинетике и терапевтическом эффекте лекарственного препарата, поскольку от него зависит скорость поступления активного компонента в кровь и его концентрация в тканях организма человека.

Диффузия – это перенос вещества под действием градиента его концентрации (или активности). Для диффузии через полимерную среду молекулы ЛВ должны находиться в растворенном состоянии. Диффузионный механизм высвобождения ЛВ из твердых лекарственных форм включает три основных этапа. Первый этап – смачивание поверхности и проникновение среды в матрицу, второй этап – растворение ЛВ в гидратированной полимерной матрице и, наконец, диффузия растворимого ЛВ через

гидратированную матрицу в среду растворения. Для однонаправленного переноса в направлении X поток диффузии J из-за градиента концентрации $\partial C/\partial x$ определяется первым и вторым законами Фика [90]:

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x}, \quad (1.1)$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad (1.2)$$

где D – коэффициент диффузии Фика.

Набухание – это увеличение объема полимерной матрицы из-за поглощения воды из окружающей водной фазы. В гидрогелях медленные структурные релаксации набухающего полимера влияют на кинетику поглощения воды, что, в свою очередь, влияет на высвобождение ЛВ. Системы доставки, контролируемые набуханием, относятся к случаям, когда вода не только активирует высвобождение лекарственного компонента, но и является механизмом, контролирующим скорость его высвобождения.

Осмотические системы доставки основаны на принципе осмоса, который происходит, когда мембрана, проницаема для воды, но не для растворенных веществ [91]. Основные компоненты осмотических систем доставки включают препарат, который сам по себе может действовать как осмоген, в противном случае в рецептуру может быть добавлена осмогенная соль. Кроме того, можно использовать наружное покрытие из материала, проницаемого для воды, но непроницаемого для растворенных ЛВ (рисунок 1.20). Такие полимеры, как ацетат целлюлозы, триацетат целлюлозы и этилцеллюлоза обычно используются в осмотических системах доставки ЛВ [92].

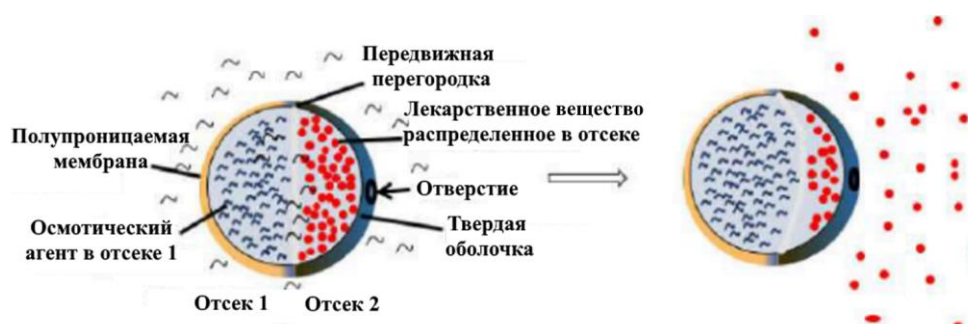


Рисунок 1.20 – Система доставки лекарственных веществ с регулируемым осмотическим давлением [92]

Профиль высвобождения ЛВ обычно выражается в виде графика зависимости его концентрации в приемной среде от времени. На рисунке 1.21 обозначены два важных уровня концентрации ЛВ в плазме крови: минимальная эффективная концентрация, ниже которой оно неэффективно, и токсическая концентрация, выше которой возникают нежелательные побочные эффекты. Поддержание концентрации лекарственного компонента в диапазоне от минимально эффективной до минимально токсичной концентрации имеет решающее значение для безопасности и терапевтической эффективности ЛВ [93].

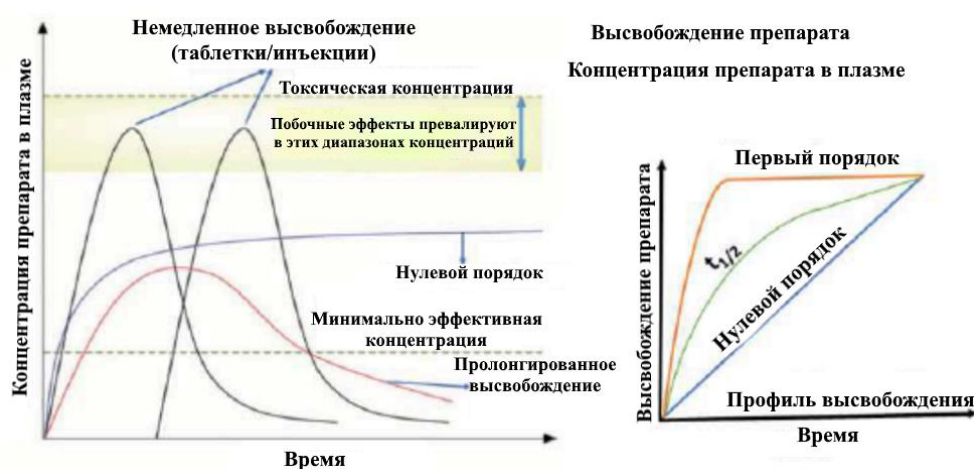


Рисунок 1.21 – Профили высвобождения лекарственного вещества в плазму крови [93]

Кинетические данные о высвобождении ЛВ из систем доставки в условиях *in vitro* анализируются с использованием различных математических моделей, таких как модели нулевого порядка, первого порядка, модель Хигучи и Корсмейера–Пеппаса [94]:

Модель нулевого порядка:

$$Q = k\tau + Q_0, \quad (1.3)$$

где Q – высвобожденное количество ЛВ во времени τ , Q_0 – начальное значение Q ; k – константа скорости.

Модель первого порядка:

$$Q = Q_0 \cdot e^{k\tau}. \quad (1.4)$$

Модель Хигучи:

$$Q = k_H \cdot \tau^{0.5}, \quad (1.5)$$

где k_H – константа растворения Хигучи.

Модель Хиксона–Кроуэлла:

$$Q^{1/3} = k\tau + Q_0^{1/3}. \quad (1.6)$$

Модель Корсмейера–Пеппаса:

$$Q = k\tau^n, \quad (1.7)$$

где n – показатель диффузии, указывающий на механизм высвобождения ЛВ.

Модель Корсмейера–Пеппаса используется в анализе поведения высвобождения ЛВ из полимерных систем доставки, чтобы различать конкурирующие механизмы высвобождения: высвобождение по Фику (контролируемое диффузией высвобождение), высвобождение не по Фику (аномальное высвобождение) и высвобождение Case-II (контролируемое релаксацией высвобождение) (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Интерпретация механизмов диффузионного высвобождения лекарственного вещества из полимерных матриц в модели Корсмейера-Пеппаса [95]

Показатель n		Механизм высвобождения ЛВ	Характер зависимости от времени
пленка	сфера		
$0,45 \leq n$	$0,43 \leq n$	Диффузия по закону Фика	$\tau^{-0,5}$
$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Диффузия не по закону Фика	τ^{n-1}
$n=0,89$	$n=0,85$	Case-II-транспорт	Высвобождение нулевого порядка
$n > 0,89$	$n > 0,85$	Аномальная диффузия (Super Case II)	τ^{n-1}

Системы доставки ЛВ, реагирующие на стимулы, продвинулись вперед с применением биополимеров, чувствительных к внешней физической среде. В зависимости от вида используемого биополимера стимулы, оказывающие активное влияние на высвобождение ЛВ, могут включать температуру, pH, ионную силу среды, состав растворителя, ультразвук, электрическое и магнитное поля.

Чувствительные к pH биополимеры реагируют на уровень pH и претерпевают физико-химические изменения в полимерных цепях, которые запускают высвобождение ЛВ. Традиционно используемые pH-чувствительные полимерные носители проявляют свое действие в зависимости от pH таких органов, как кишечник и желудок. Чувствительные к pH полиэлектролиты могут быть либо поликислотами (которые инкапсулируют и высвобождают ЛВ при основном pH), либо полиоснованиями

(которые инкапсулируют и высвобождают ЛВ при кислом рН). В качестве примера можно привести Eudragit S100 – это наночастицы пектина, которые специфически воздействуют на толстую кишку противоопухолевым препаратом 5-фторурацилом [96]. Носители, сконструированные таким образом, могут дифференцировать изменения рН в определенных органах и тканях организма человека. Например, в нормальных тканях внеклеточный рН равен 7,4. В опухолевых тканях из-за увеличения скорости гликолиза рН снижается до 7,0. Более низкий уровень рН в зоне опухоли действует как стимул для систем контролируемой доставки [97].

В исследовании [98] тамоксифен инкапсулировали в наночастицы хитозана путем образования комплекса и тамоксифен высвобождался быстрее при рН 4,0 и 6,0 по сравнению с рН 7,4, что являлось желательным для доставки данного ЛВ, нацеленной на опухолевые ткани. В работе [99] наночастицы хитозана конъюгировали с противораковым лекарственным препаратом с использованием рН-чувствительного линкера, который расщеплял и высвобождал ЛВ после эндоцитоза в раковых клетках, где рН является кислым (рисунок 1.22).

Похожий тип рН-зависимого высвобождения был продемонстрирован для комплексов хитозана с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы. Было показано, что катионный полиэлектролит хитозан взаимодействует с анионными ЛВ и вспомогательными веществами в полимерной матрице, тем самым активно влияя на скорость высвобождения β -адреноблокаторов (пропранолола гидрохлорид, метопролола тартрат и альпренолола гидрохлорид) [100].

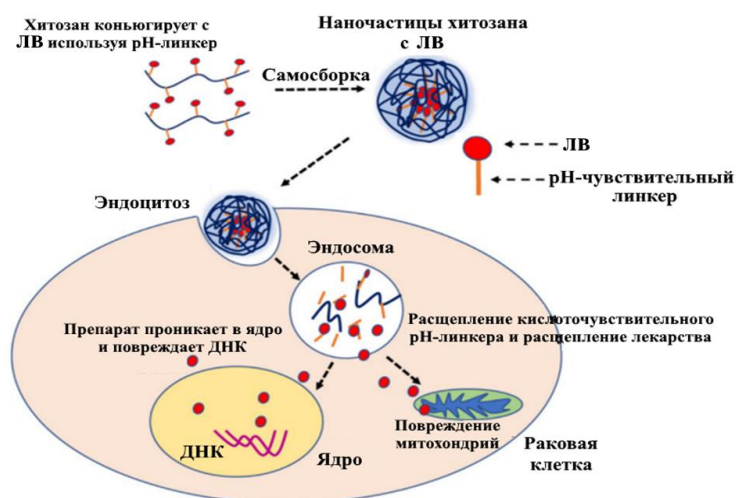


Рисунок 1.22 – Высвобождение тамоксифена из наночастиц хитозана в зависимости от рН [99]

Изменение окислительно-восстановительного потенциала запускает высвобождение ЛВ в полимерных носителях, чувствительных к окислительно-восстановительным процессам [101]. Наночастицы, чувствительные к глутатиону (окислительно-восстановительной системе в раковых клетках), широко используются в адресной доставке противораковых препаратов. Обнаружено, что концентрация глутатиона в нормальном внеклеточном матриксе составляет 2-20 мкМ, в то время как его концентрация в раковых клетках равна 1-10 мкМ. Из-за разницы в уровнях глутатиона в нормальных и раковых клетках он используется в качестве стратегии при разработке систем контролируемой доставки ЛВ [102].

Ионная сила раствора оказывает значительное влияние на процессы высвобождения ЛВ из полимерных носителей на основе ПЭК. К основным аспектам влияния ионной силы можно отнести следующее [103]:

- увеличение ионной силы может приводить к снижению растворимости ионогенных соединений, что обусловлено эффектом «высаливания» – в результате высвобождение активных компонентов может замедляться;
- ионная сила влияет на подвижность ионов в растворе, что может изменять скорость диффузии ЛВ через мембраны, гели или матрицы с контролируемым высвобождением;
- изменение ионной силы влияет на интенсивность электростатических взаимодействий и стабильность комплексов ЛВ с компонентами ПЭК, приводя либо к ускорению, либо к замедлению высвобождения активного компонента.

Ферменты используются в качестве триггеров в системах доставки ЛВ. Они обладают уникальными свойствами, такими как специфичность к субстрату и высокая селективность в мягких условиях. Поскольку ферменты в основном связаны с биологическими и метаболическими процессами, они могут быть использованы для достижения опосредованного ферментами высвобождения ЛВ в очаге воспаления. Пример контролируемого высвобождения противоопухолевого препарата доксорубицина из липосом на основе полиэтиленгликоля с пептидным линкером GLFG (G - глицин, L - лейцин, F - фенилаланин и G - глицин), вызванного воздействием фермента катепсина В, показан на рисунке 1.23. В присутствии специфичных для опухоли ферментов и воздействии низкого pH в раковых клетках липиды гидролизуются и высвобождают ЛВ [104].

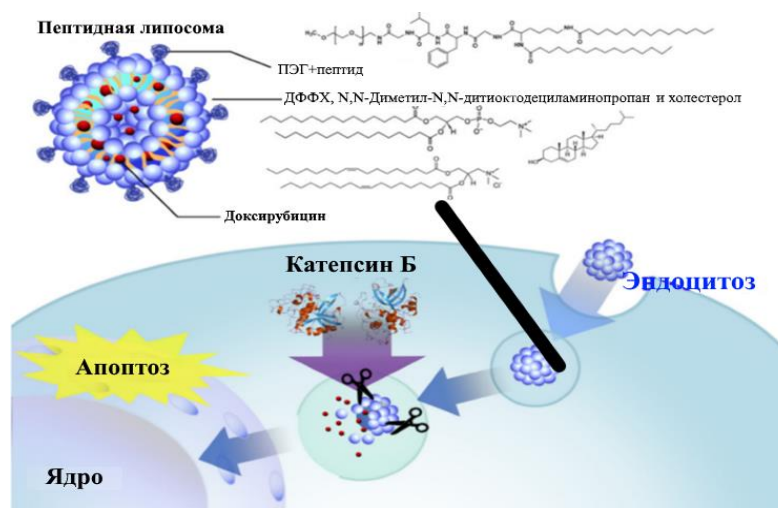


Рисунок 1.23 – Высвобождение доксорубина из липидной ПЭГ липосомы с пептидным линкером GLFG под действием ферментов [104]

Светочувствительные полимерные носители могут высвобождать ЛВ в системе включения-выключения при стимуляции светом. Из-за ограничения проникновения света в глубокие ткани организма человека неинвазивным способом применение в качестве стимула света ограничено [105]. Литературные данные свидетельствуют о том, что светочувствительные мицеллы на основе полисахаридов могут служить функциональными материалами для доставки ЛВ. Модификацией пуллулана спиропираном получен гидрофобизированный образец полисахарида, который самоорганизовался в мицеллы. Амфифильность спиропиранового ядра модулировалась посредством облучения видимым светом, что впоследствии влияло на взаимодействие и высвобождение связанных белков [106].

Температура является стимулом для высвобождения ЛВ. Термочувствительные полимеры обладают более низкой критической температурой растворения (КТР). Ниже КТР полимеры растворимы, имеют тенденцию к гидратации и набуханию, что реализуется при загрузке ЛВ. Выше КТР полимеры, как правило, находятся в обезвоженном состоянии и ЛВ высвобождается [107]. Под воздействием температуры тела раствор превращается в гель посредством фазового перехода. Упомянутый метод доставки ЛВ может усилить как гидрофобную загрузку препарата, так и структуру гидрогеля, а также может ингибировать пассивное диффузионное высвобождение ЛВ, в конечном итоге, снижая вероятность взрывного высвобождения. Авторы работы [108] синтезировали системы доставки доксорубина на основе альгинат-

полиизопрпилакриламида для повышения его биодоступности и терапевтической эффективности. Одним из существенных преимуществ термочувствительных полимеров является то, что при получении носителей ЛВ на их основе можно отказаться от применения любых органических растворителей [109].

Стимуляцию различных стимулов для полимерных носителей на основе комплексов природных полисахаридов можно комбинировать друг с другом для достижения точного высвобождения лекарственного вещества в конкретных мишенях.

1.5 Применение систем доставки лекарственных веществ на основе полисахаридов в тераностике

Тераностика – это интеграция терапевтических и диагностических средств, которые можно вводить одновременно или последовательно. Наночастицы являются ключом к применению нанотехнологий в медицине, определяемой как наномедицина. Цель тераностической наномедицины заключается в адаптации терапии к диагнозу конкретного пациента и улучшению результатов лечения с меньшим количеством побочных эффектов за более короткий промежуток времени, чем у текущих схем лечения. Наночастицы имеют значительные преимущества в тераностике благодаря их нацеливаемости и многофункциональности [110]. Тераностические наночастицы могут диагностировать заболевание, определять место локализации и степень выраженности патологических изменений в организме человека [111]. Таким образом, тераностическая наномедицина может использоваться для мониторинга доставки ЛВ, их контролируемого высвобождения и усиления эффективности лекарственной терапии в целом.

Идеальная тераностическая наночастица избирательно и быстро накапливается в предполагаемой цели, испускает сигнал на основе определенного биомаркера и обеспечивает соответствующую терапию на основе полученного результата. Благодаря достижениям в области химической модификации и нанотехнологии, наночастицы на основе полисахаридов могут быть синтезированы с настраиваемыми размерами и формой для терапевтических и визуализационных применений.

Для тераностики как терапевтические, так и визуализирующие агенты могут быть ковалентно конъюгированы в основе полисахаридов или физически инкапсулированы в

наночастицы на их основе. Функциональные группы в полисахаридах, доступные для химической модификации, включают гидроксильные, amino-, альдегидные и карбоксильные группы (рисунок 1.24) [112].

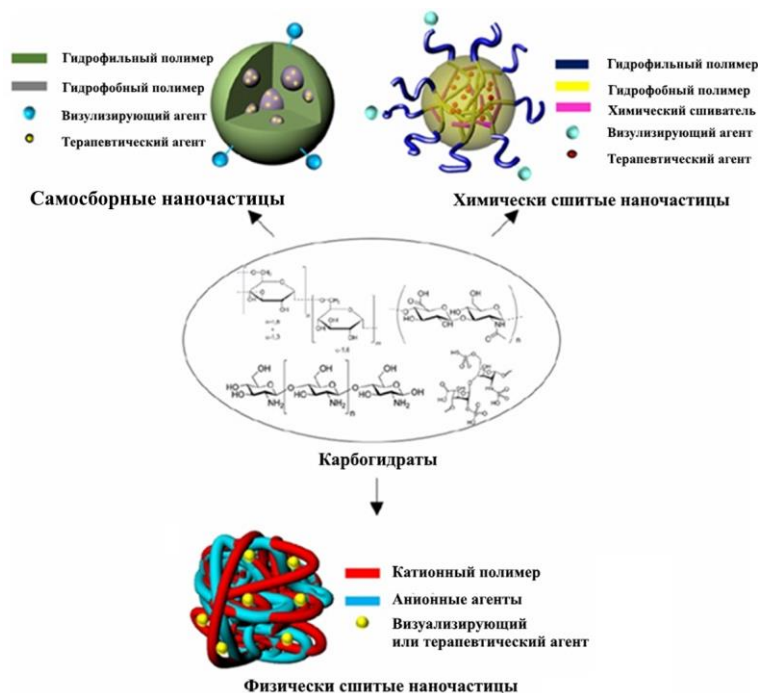


Рисунок 1.24 – Схематическая иллюстрация репрезентативных стратегий приготовления наночастиц на основе полисахаридов [112]

Визуализирующие агенты играют важную роль в диагностике различных заболеваний благодаря своей способности улучшать визуализацию тканей и органов во время медицинских исследований, таких как компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, рентгенография и ультразвуковое исследование.

В качестве визуализирующих агентов, оптических зондов или наносенсоров широко используются полупроводниковые квантовые точки (КТ), наноразмерные углеродные квантовые точки (УКТ), органические красители [113]. КТ особенно привлекательны для биовизуализации и маркировки из-за их уникальных оптических свойств, включая широкое поглощение с узкими спектрами фотолюминесценции, высокий квантовый выход, низкое фотообесцвечивание и устойчивость к химической деградации [114]. Использование КТ в качестве наносенсоров может обеспечить необходимую точность, чувствительность и экспрессность определения концентрации различных лекарственных веществ.

КТ на основе кадмия (например, CdS, CdSe, CdSe/ZnS) обычно используются для биологических исследований *in vitro* благодаря хорошо зарекомендовавшим себя стратегиям синтеза и функционализации, настраиваемых профилей эмиссии и высоких квантовых выходов флуоресценции. Однако, присутствие тяжелых металлов и связанная с этим токсичность ограничивают применение полупроводниковых КТ *in vivo* [115]. Поэтому разработка флуоресцентных наночастиц, способных воспроизводить свойства флуоресценции КТ, не проявляя долгосрочных профилей токсичности, является очень актуальной задачей.

Углеродные квантовые точки (УКТ) – это новый класс наноматериалов, получаемых из углеродных источников. Они особенно перспективны в визуализации процессов в реальном времени и доставке ЛВ, благодаря их растворимости в воде, низкой токсичности, фото- и химической стабильности. Установлено, что эффективным методом модификации свойств УКТ является введение гетероатомов, причем наиболее распространенным является использование N-допантных агентов. В работе [116] синтезированы УКТ из трех различных полисахаридов: хитозана, альгиновой кислоты и крахмала в присутствии ПЭГ-200 микроволновым методом (рисунок 1.25). Анализ образцов с помощью ТЭМ показал, что в зависимости от используемого полимера были получены УКТ различной морфологии и размера. Например, крахмал обеспечивал наименьший размер частиц (1-2 нм), но низкую морфологическую однородность. С другой стороны, УКТ из хитозана имели сферическую морфологию с размерами 2-10 нм, наночастицы из альгиновой кислоты также демонстрировали сферическую форму частиц с размерами 2-4 нм. Интересно отметить, что самые маленькие по размеру УКТ из крахмала проявляли самую высокую интенсивность флуоресценции из трех образцов.

Хитозан является полисахаридом, который при соответствующей модификации может служить многофункциональным средством визуализации и терапии. Например, наночастицы хитозана, конъюгированные с флуоресцентными красителями, широко используются в биомедицинских приложениях, таких как исследования клеточного поглощения и клеточная визуализация. Неспецифическое обнаружение может происходить, если флуорофор физически адсорбируется на поверхности наночастиц. Если флуорофор ковалентно конъюгирован с носителем ЛВ, его диссоциация может быть затруднена во время экспериментов по клеточному поглощению [117].

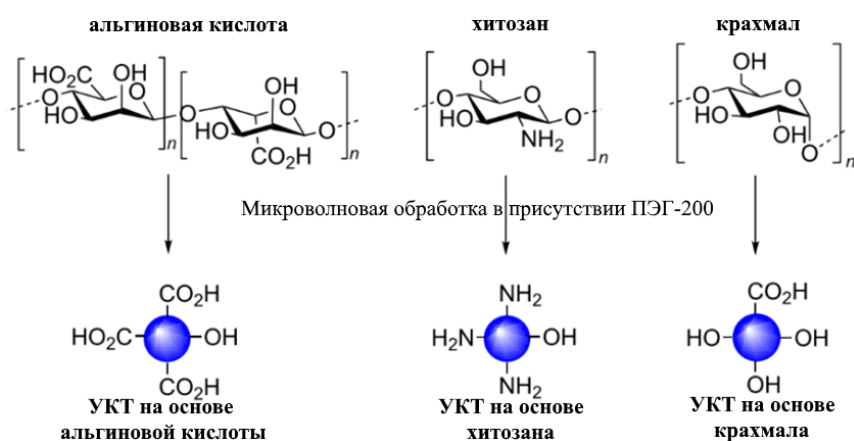


Рисунок 1.25 – Углеродные квантовые точки, полученные из полисахаридов в присутствии ПЭГ-200 [116]

Использование флуоресцеина как диагностического красителя имеет несколько преимуществ, включая простоту конъюгации с хитозаном, растворимость в воде, фотостабильность и хорошую биосовместимость наряду с интенсивной и стабильной эмиссией флуоресценции [118]. Конъюгация хитозана с флуоресцеином осуществляется за счет тиомочевинной связи, образованной между изотиоцианатной группой флуоресцеина и аминогруппой хитозана (рисунок 1.26).

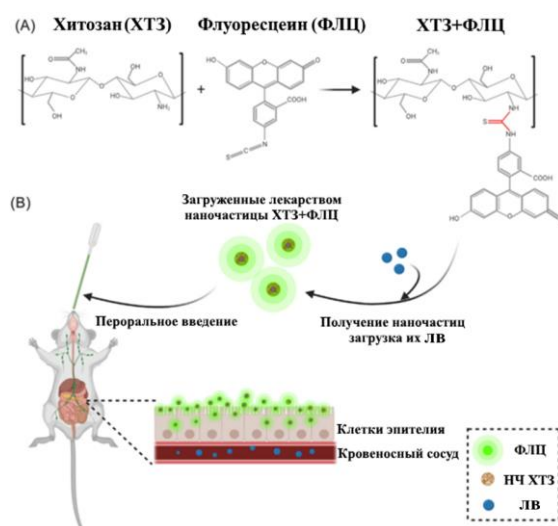


Рисунок 1.26 – Синтез и применения наночастиц хитозана, допированных флуоресцеином [118]

В работе [119] использовали две различные стратегии формулирования модифицированных гликоль-хитозановых наночастиц для инкапсуляции доксорубина

или комплекса регулятора апоптоза клеток с короткой интерферирующей РНК для генной терапии, доставляя так же агенты визуализации на поверхности наночастиц (рисунок 1.27).

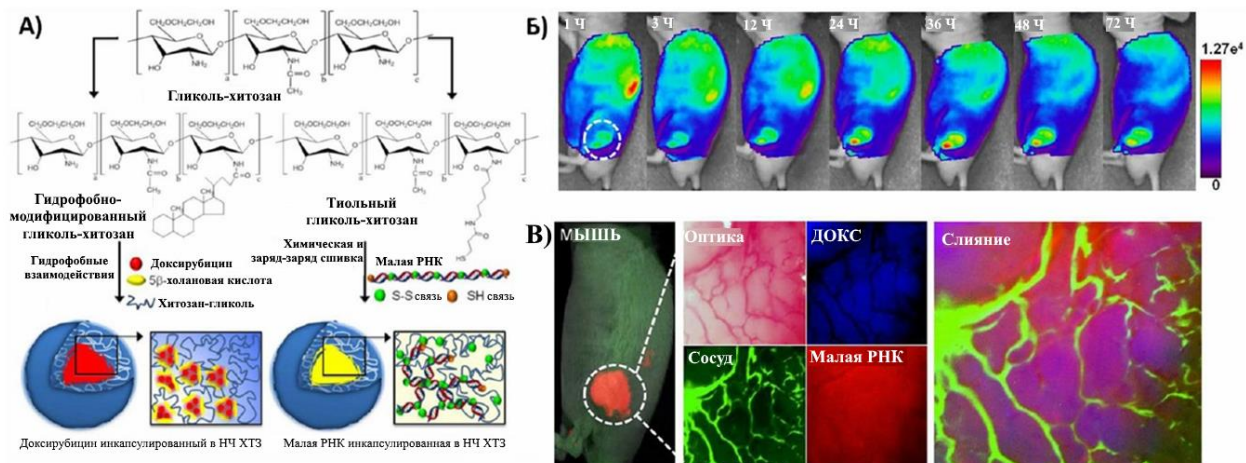


Рисунок 1.27 – Гликоль-хитозановые наночастицы для флуоресцентной визуализации и доставки гидрофобных ЛВ с короткой интерферирующей РНК: А) схема синтеза гидрофобной 5b-холановой кислоты, модифицированной хитозан-гликолем; Б) зависимость от времени распределение хитозановых наночастиц; В) визуализация направленного высвобождения и локализации доксорубина и малой РНК [119]

На рисунке 1.27 А приведены схемы получения наночастиц путем модификации гликоль-хитозана: левых гидрофобных фрагментов для инкапсуляции гидрофобных препаратов (доксорубина) и правых тиоловых групп для обеспечения сшивания и комплексообразования с отрицательно заряженной РНК. Под буквой Б показано изображение, демонстрирующее зависящее от времени нарушение распределения меченых красителем гликоль-хитозановых наночастиц, визуализированное в ближнем ИК диапазоне *in vivo*. Рисунок 1.27 В отражает процесс визуализации высвобождения терапевтических средств из наночастиц и их локализации в опухоли.

В работе [120] отмечено, что макромолекулы хитозана, содержащие аминогруппы, могут быть использованы в качестве активных реакционных участков для связи с КТ, функционализированных карбоксильными группами (рисунок 1.28).

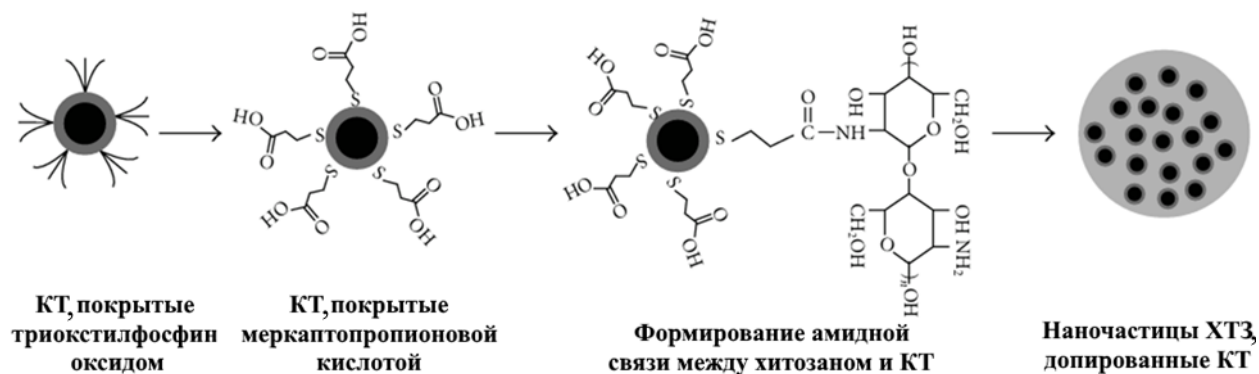


Рисунок 1.28 – Схема синтеза наночастиц хитозана со встроенными квантовыми точками [120]

В работе [121] сообщается о разработке нанокомпозита на основе хитозана/углеродных точек и его эффективности в качестве носителя для замедленного высвобождения препарата дофамина. Углеродные точки были синтезированы путем карбонизации хитозана и далее были конъюгированы с хитозаном для получения матрицы хитозан/углеродные точки. Дофамин инкапсулировали в полимерную матрицу для формирования нанокомпозита дофамин@хитозан/УКТ. Цитотоксичность клеточных линий IC-21 и SH-SY5Y изучалась при различных концентрациях нанокомпозита и результаты показали наличие около 97% жизнеспособности клеток. Исследование люминесцентных свойств наночастиц выявило характерное свойство углеродных точек – зависимость люминесценции от длины волны возбуждения (рисунок 1.29). При возбуждении углеродных точек на 510 нм пик испускания наблюдался при 550 нм, что позволяет использовать данные углеродные квантовые точки в качестве трассера для биовизуализации. Размер наночастиц хитозан/углеродные точки, определенный методом динамического светорассеяния, составил 3 нм.

Кинетика высвобождения инкапсулированного препарата дофамина из нанокомпозита была проанализирована в условиях *in vitro* при различных уровнях pH (рисунок 1.30). Новизна метода заключалась в использовании нетоксичного полимерного носителя на основе хитозана для эффективного лечения нейродегенеративных заболеваний с возможностью отслеживания доставки препарата посредством биовизуализации с применением углеродных точек.

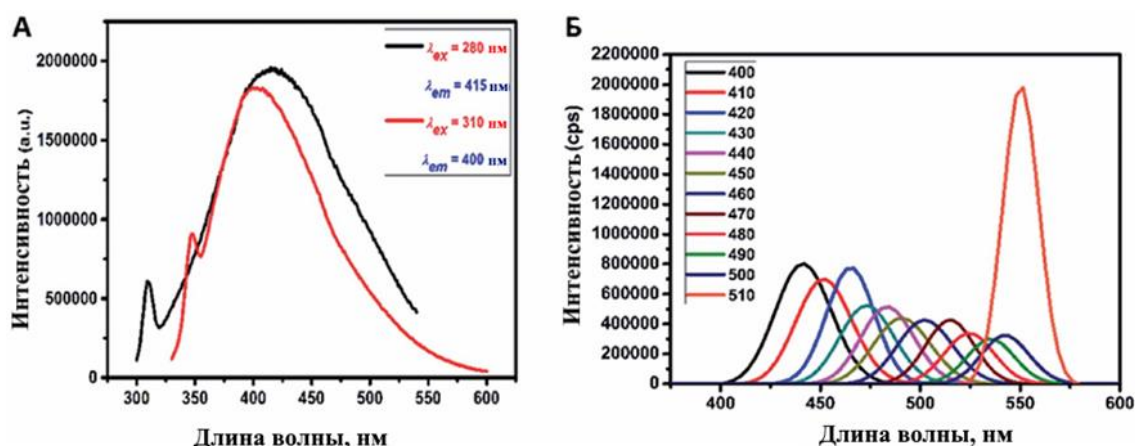


Рисунок 1.29 – Эмиссия флуоресценции углеродных точек при длинах волн возбуждения 280 и 310 нм (А). Спектр эмиссии возбуждения углеродных точек при варьировании длины волны возбуждения от 400 до 510 нм (Б) [118]

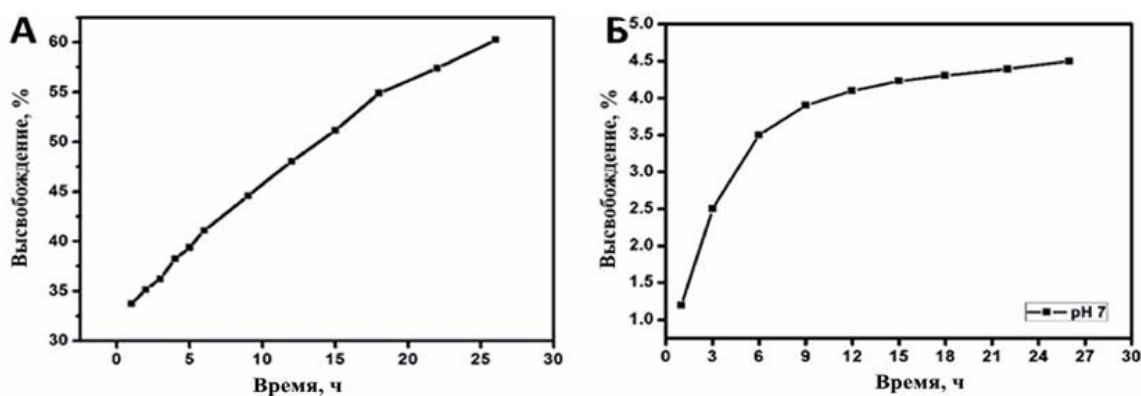


Рисунок 1.30 – Кинетика высвобождения дофамина из нанокompозита хитозан/углеродные точки при pH 4 (А) и pH 7 (Б) [118]

Функционализированные хитозаном магнитные графеновые наночастицы служат терапевтической платформой для одновременной доставки генов/лекарств и суперпарамагнитных оксидов железа (СОЖ) для терапии рака и визуализации процессов [122]. Противораковые препараты и гены доставляются в опухоль, тогда как частицы СОЖ служат в качестве контрастных агентов для неинвазивной МРТ, которая используется для мониторинга в режиме реального времени. На основании результатов *in vitro* и *in vivo* показано, что многофункциональные магнитные графеновые наночастицы хитозана обладают эффективным нацеливанием на опухоль, контролируемой доставкой ЛВ в опухолевые клетки и одновременно выступают контрастным агентом для МРТ-визуализации. После того, как водорастворимый хитозан

ковалентно связывается с карбоксильными группами графена через амидную связь, частицы магнитного графена становятся более растворимы в воде и адаптируемы для применения *in vivo*, в отличие от нефункционализированного магнитного графена. Функционализация хитозана позволяет увеличить поглощение доксорубина клетками и, следовательно, повысить противоопухолевую эффективность по сравнению со свободным препаратом. Данное исследование подчеркивает, что определенные наноплатформы могут синергически работать с добавлением биоматериалов, таких как полисахариды, в области тераностики [62].

Системы доставки ЛВ, одновременно включающие магнитные частицы и КТ, могут осуществлять их целевую доставку и в режиме реального времени визуализировать процесс высвобождения. В недавних исследованиях сообщалось о микросферах полисахарида, включающих магнитные наночастицы и КТ. Однако микроразмерные сферы не подходят для доставки ЛВ *in vivo* из-за легкости их удаления ретикулоэндотелиальной системой (тканевыми макрофагами) (РЭС) [123]. Вместе с тем, наночастицы подходящего размера способны уйти из-под контроля РЭС и накапливаться в опухолевой ткани за счет эффекта повышенной проницаемости и эффекта удержания.

Магнитные наночастицы часто инкапсулируют в коллоидные носители, включая твердые наночастицы ПЭК, β -циклодекстрины, липосомы, мицеллы, которые при воздействии внешнего магнитного поля индуцируют нагрев и запускают высвобождение ЛВ при гипертермии рака. В последнее время магнитные наночастицы (Fe_3O_4 и CoFe_2O_4), покрытые биосовместимыми полимерными оболочками (например, полисахаридами), приобрели важное значение в терапии раковых заболеваний [124].

В работе [125] получены многофункциональные системы доставки антибиотика цефрадина на основе хитозана, которые одновременно включали магнитные и флуоресцентные наночастицы (МФНХ) (рисунок 1.31).

В слабокислых водных средах к положительной заряженной макроцепи хитозана электростатически притягиваются отрицательно заряженные КТ, наночастицы Fe_3O_4 и ионизированные карбоксильные группы COO^- цефрадина ($\text{pK}_a = 2,5$ и $7,3$). Увеличение времени сшивания наночастиц хитозана глутаровым альдегидом снижает их положительный дзета-потенциал, поскольку свободные аминогруппы хитозана реагируют с глутаральдегидом и поверхностный заряд частиц уменьшается. Из

предыдущих исследований [126] известно, что положительно заряженные частицы могут вызывать неспецифическое прилипание клеток и взаимодействие с белками плазмы, в то время как отрицательно заряженные частицы легко поглощаются эндотелиальными клетками печени. Таким образом, почти нейтральные и гидрофильные свойства магнитных наночастиц хитозана со временем сшивания 12 часов оказались эффективными для предотвращения нежелательного взаимодействия белков и клеток при длительной циркуляции в кровотоке.

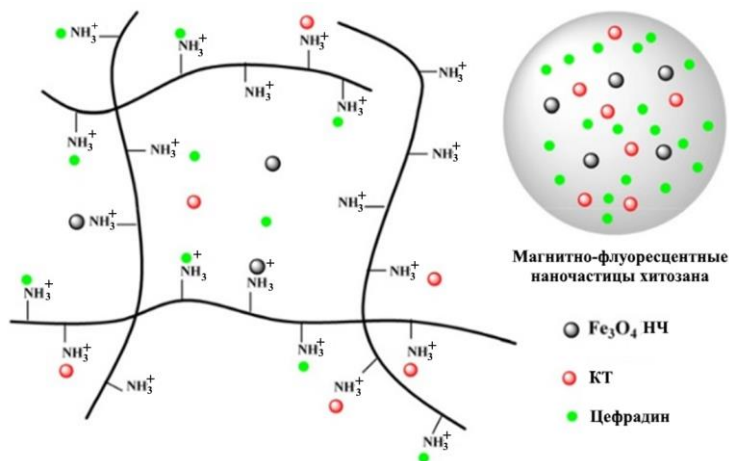


Рисунок 1.31 – Схематическое изображение процесса получения магнитных и флуоресцентных наночастиц хитозана, содержащих цефрадин [125]

Были исследованы флуоресцентные свойства индивидуальных КТ CdTe с пиком излучения 560 нм и КТ в составе магнитных наночастиц хитозана (рисунок 1.32) [127]. Как видно из рисунка 1.32 (а), МФНХ демонстрируют интенсивный и узкий спектр излучения с пиком при 565 нм, аналогичный спектру КТ CdTe с пиком при 560 нм. Небольшое смещение пика в «красную» область, вероятно, вызвано различным окружением КТ, а также взаимодействием CdTe с магнитными частицами, инкапсулированными в матрицу хитозана [128]. Спектр излучения наночастиц был стабилен в течение семи дней в стандартном фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). Флуоресцентное изображение наночастиц хитозана, модифицированного магнетитом, показано на рисунке 1.32 (б). Частицы представляют собой сферы с хорошей дисперсностью, что подтверждается данными ТЭМ, и имеют сильную зеленую эмиссию флуоресценции. Сильное и стабильное свечение композитных магнитных хитозановых наночастиц обеспечивает визуальный метод обнаружения и мониторинга местоположения системы доставки антибиотика в организме человека.

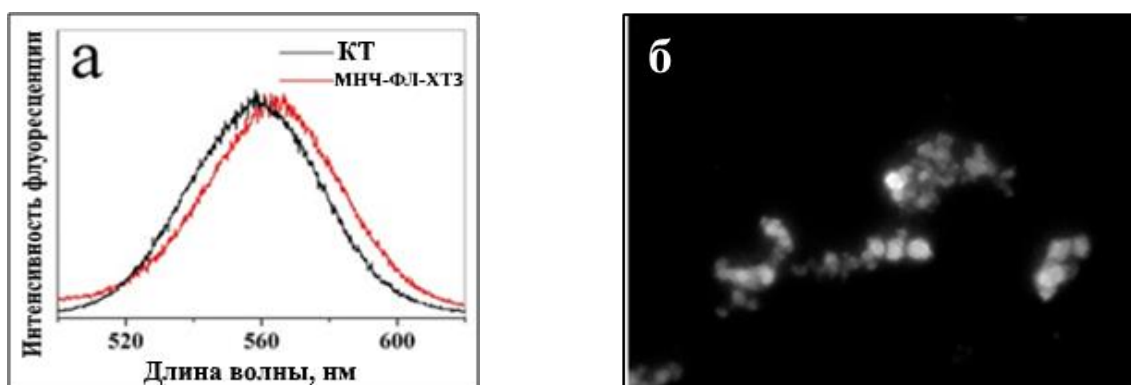


Рисунок 1.32 – Спектры излучения ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ нм) КТ CdTe и магнитных наночастиц хитозана с КТ (а) и флуоресцентное изображение магнитных наночастиц хитозана ($\lambda_{\text{ex}} = 480$ нм) (б) [127]

На рисунке 1.33 изображена кривая петли магнитного гистерезиса МФНХ при температуре 25°C. Намагниченность наночастиц Fe_3O_4 достигает примерно 77 эрг/Гс, что говорит о суперпарамагнитном поведении частиц, при котором отсутствует остаточная намагниченность во время цикла намагничивания. Наночастицы хитозана проявляли сильную магнитную реакцию, благодаря чему их намагниченность можно контролировать, регулируя содержание магнетита в составе композиционных частиц.

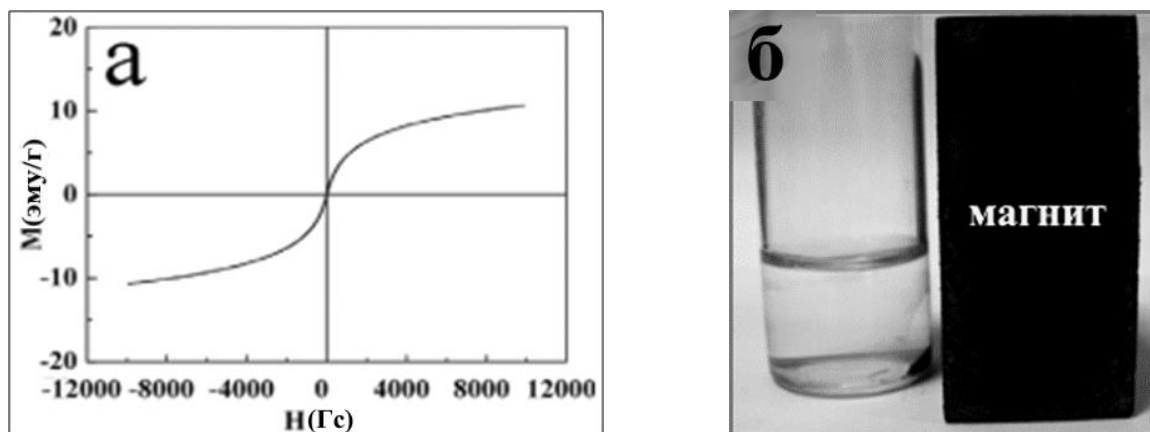


Рисунок 1.33 – Кривая намагничивания МФНХ (а) и изображение, демонстрирующее воздействие магнитного поля на композитные наночастицы хитозана (б) [127]

Магнитная восприимчивость дисперсий наночастиц была дополнительно протестирована воздействием магнитного поля. Как видно на рисунке 1.33 б, магнитные частицы хитозана притягиваются к магниту в течение 30 секунд, что подтверждает наличие

сильных магнитных свойств у синтезированных многофункциональных наночастиц хитозана. Благодаря сильному магнетизму, эти наночастицы могут стать эффективным средством для магнитной доставки биологически активных соединений.

Время сшивки хитозана глутаровым альдегидом оказывает значительное влияние на эффективность инкапсулирования антибиотика в системе доставки и время его высвобождения. Рисунок 1.34 демонстрирует профили высвобождения цефрадина из сшитых наночастиц ХТЗ с временами сшивки 3 и 12 часов в различных средах высвобождения: с рН 2,0 (имитирующей желудочный сок) и рН 7,4 (имитирующей кровь). Полученные кинетические данные указывают на пролонгированное высвобождение ЛВ из наночастиц в обе приемные среды, однако скорость высвобождения отличается в зависимости от рН среды. Из наночастиц хитозана со временем сшивки 3 часа цефрадин высвобождался в объеме 23% за начальный период и 42% за первый час. Всего за 40 часов высвобождено 90% цефрадина в среде с рН 7,4 и 50% – в приемной среде с рН 2,0. Для наночастиц ХТЗ со временем сшивания 12 ч препарат демонстрировал более равномерное высвобождение и на начальном этапе не наблюдалось взрывного высвобождения.

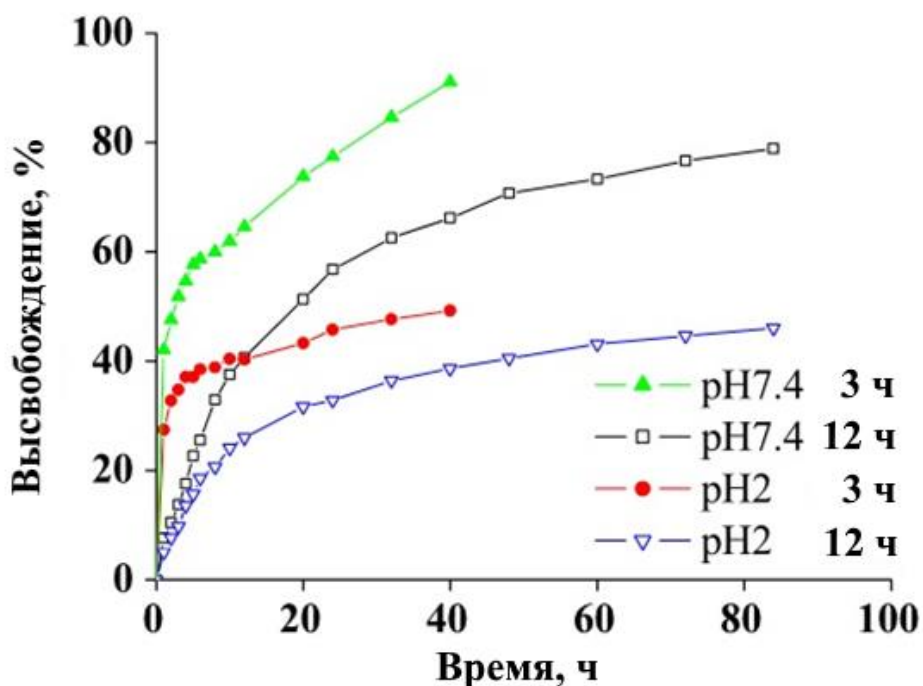


Рисунок 1.34 – Кинетические кривые высвобождения цефрадина из многофункциональных наночастиц ХТЗ с различным временем сшивания в приемные среды высвобождения с различным значением рН [127]

Более продолжительная сшивка хитозана глутаровым альдегидом способствует образованию наночастиц с более плотной структурой. Авторы связывают различия в скорости высвобождения цефтрина из наночастиц в исследованные приемные среды с отличиями показателей набухания и осмоса наночастиц хитозана. Таким образом, регулируемое высвобождение лекарственного вещества из композитных наночастиц ХТЗ можно достичь путем изменения значений pH и времени сшивки хитозана глутаровым альдегидом.

Таким образом, наночастицы хитозана с визуализирующими агентами и различные методы визуализации *in vitro* и *in vivo* с их использованием могут применяться для изучения биораспределения наночастиц и их внутриклеточных путей. Продемонстрированные результаты могут быть применены для разработки многофункциональных систем доставки лекарственных веществ, генов и других биомолекул.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

В литературном обзоре рассмотрены характеристики и области применения природных полисахаридов и полиэлектролитных комплексов на их основе в биомедицине и фармацевтических технологиях. Особое внимание привлекают исследования по созданию систем доставки лекарственных веществ на основе хитозана, поскольку такие полимерные носители обладают высокой биосовместимостью, биodeградируемостью, сорбционной способностью и широким спектром собственных биоактивных свойств, полезных для организма человека. На основе проведенного анализа научной литературы можно сделать вывод о том, что комплексы хитозана с природными анионными полиэлектролитами различной надмолекулярной организации представляют собой многообещающую платформу для тераностики, поскольку позволяют инкапсулировать лекарственные вещества различной природы и конъюгировать визуализирующий и нацеливающий агенты.

Однако, несмотря на существенные достижения в использовании полиэлектролитных комплексов хитозана в качестве носителей биологически активных веществ, остаются нерешенными ряд проблем, ограничивающих их применение при создании новых и усовершенствовании имеющихся лекарственных форм. Особенно

важно их решение для разработки систем доставки токсичных препаратов для химиотерапии, а также антибиотиков и других сильнодействующих лекарственных средств. Среди таких проблем можно выделить следующее:

- недостаточно информации о закономерностях межмолекулярных взаимодействий между лекарственными веществами и компонентами полимерной матрицы, а именно особенности таких взаимодействий определяют эффективность инкапсулирования и фармакокинетические профили высвобождения биологически активных веществ в различных средах;

- ограничены знания о механизмах высвобождения лекарственных веществ из систем доставки на основе природных полисахаридов, выявление которых позволяет прогнозировать степень высвобождения лекарственных веществ, оптимизировать составы лекарственных препаратов, определять влияние различных технологических параметров на их высвобождение;

- не всегда решена проблема адресности доставки лекарственного вещества и его пролонгированного высвобождения, обеспечивающих создание и поддержание необходимой концентрации активного лекарственного компонента в определенных органах и тканях организма человека;

- необходимым этапом разработки систем доставки для тераностики является оптимизация их состава, включая введение диагностических агентов для мониторинга высвобождения лекарственного вещества с возможностью визуализации патологических образований.

Описанные нерешенные задачи замедляют процесс разработки прогрессивных систем доставки лекарственных веществ на основе природных полисахаридов. В связи с этим выявление коллоидно-химических основ получения многофункциональных высокоэффективных систем доставки лекарственных веществ на основе полиэлектролитных комплексов хитозана, обладающих возможностью целенаправленно доставлять биологически активные агенты к пораженным тканям и органам человека, одновременно обеспечивая визуализацию их распределения и накопления в режиме реального времени, представляет собой актуальную задачу современной коллоидной химии.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объекты исследования

2.1.1 Природные полисахариды

Для проведения работы использовали природные полисахариды: ХТЗ с молекулярной массой (M) = $3,8 \cdot 10^4$ Да и степенью деацетилирования 80% (ЗАО «Биопрогресс», Россия); Na-КМЦ с $M = 1,2 \cdot 10^6$ Да и степенью замещения 80% («Panreac», E.U., Барселона); АЛГ-Na с $M = 1,08 \cdot 10^5$ Да и к-КРГ с $M = 4,0 \cdot 10^5$ Да и степенью сульфатирования 22 % («Molecularmeal», Россия). Структурные формулы полисахаридов приведены на рисунке 2.1.

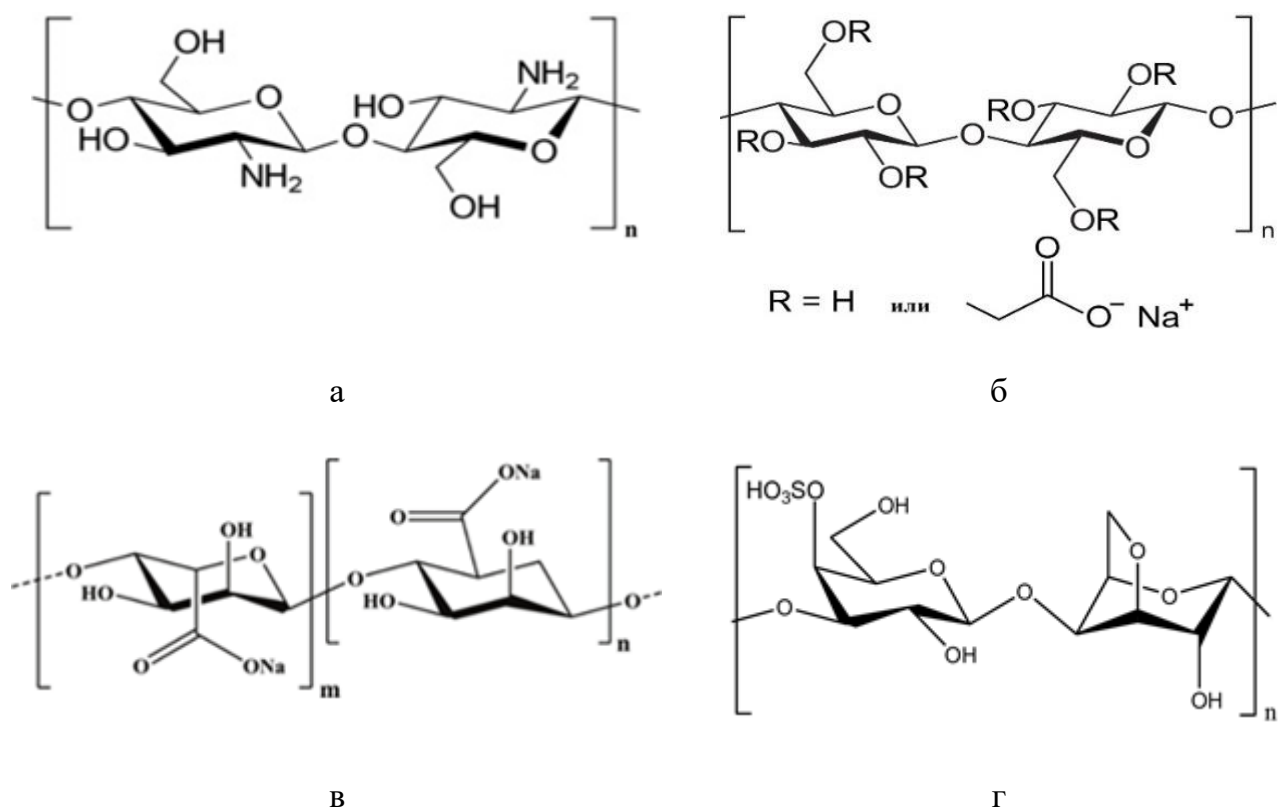


Рисунок 2.1 – Структурные формулы хитозана (а), натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (б), альгината натрия (в) и к-каррагинана (г)

2.1.2 Лекарственные вещества

В качестве модельных биологически активных веществ был выбран ряд лекарственных веществ, благодаря их широкому применению в медицинской практике, хорошо изученным фармакологическим свойствам, но в тоже время необходимости получения новых лекарственных форм. Использовали ацетилсалициловую кислоту (чистота $\geq 99,0\%$, «Sigma-Aldrich», США), натриевую соль цефотаксима (торговое название «Лифоран», АО «Фармасинтез», Россия) и ванкомицин (торговое название «Ванкомицин эльфа», «Эльфа Лабораториз», Индия). ЦФТ И ВНЦ применяли в виде порошков для приготовления раствора для инъекций. Структурные формулы лекарственных веществ представлены на рисунке 2.2.

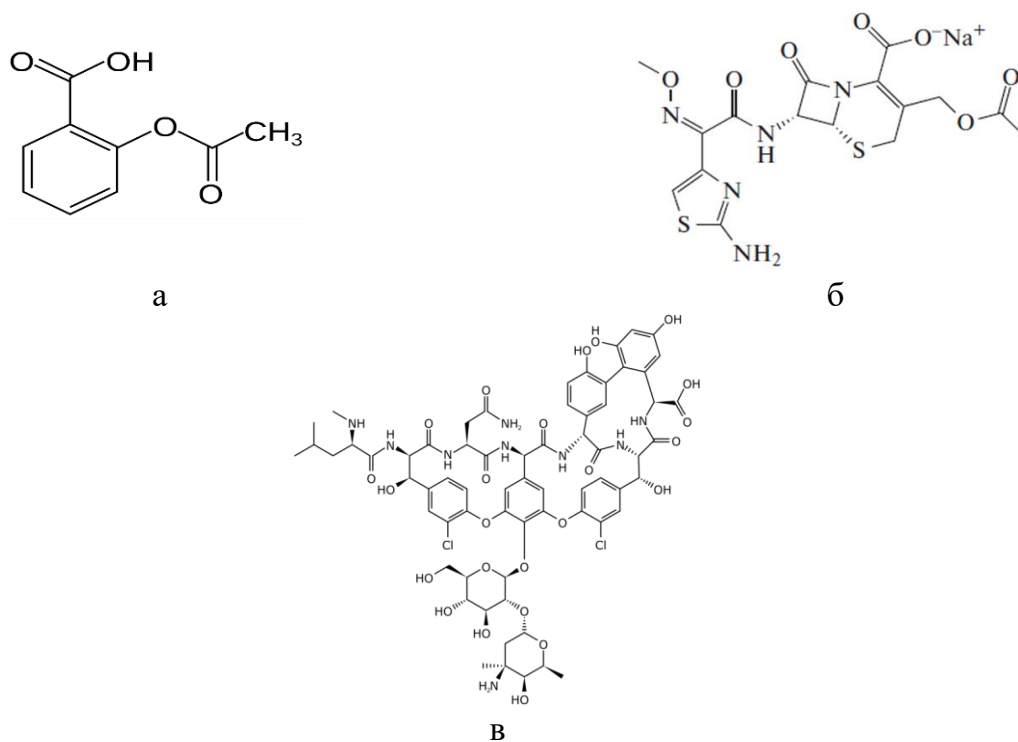


Рисунок 2.2 – Структурные формулы ацетилсалициловой кислоты (а), цефотаксима (б) и ванкомицина (в)

2.1.3 Краситель

В качестве оптического зонда применяли краситель ксантенового ряда флуоресцеин в виде динатриевой соли (торговое название «Уранин А», «Русхим», Россия) с молекулярной массой $M = 332,3$ г/моль (рисунок 2.3).

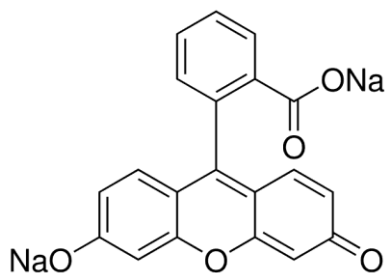


Рисунок 2.3 – Структурная формула флуоресцеина

2.2 Получение систем доставки лекарственных веществ на основе полиэлектролитных комплексов хитозана

Полимерные носители для доставки лекарственных веществ получали на основе полиэлектролитных комплексов ХТЗ с противоположно заряженными полиэлектролитами.

ПЭК получали смешением растворов ХТЗ с концентрацией 0,01 осново-моль/л в растворе соляной кислоты (0,1 моль/л) и 0,01 осново-моль/л водных растворов Na-КМЦ, АЛГ-Na, κ-КРГ. Соотношение объемов ХТЗ и анионного полиэлектролита (АПЭ) в смеси варьировалось от 9:1 до 1:9. Смешивание проводилось при температуре 25 °С. Полученные смеси двух полиэлектролитов тщательно перемешивались на магнитной мешалке, а затем оставлялись на сутки при комнатной температуре до установления равновесия. Состав смесей полиэлектролитов выражали в виде отношения мольных концентраций анионного полиэлектролита и хитозана $Z=[\text{АПЭ}] : [\text{ХТЗ}]$ (моль : моль).

2.2.1 Получение многослойных полиэлектролитных капсул на основе хитозана и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы

Многослойные полиэлектролитные капсулы получали методом послойной адсорбции ХТЗ и Na-КМЦ на микрочастицы карбоната кальция. CaCO_3 получали методом химического осаждения с использованием солей Na_2CO_3 , $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (х.ч., АО «Реахим», Россия). Микрочастицы CaCO_3 (20 мг) ресуспендировали в 1 мл водного раствора ХТЗ (2 мг/мл), содержащем 0,5 моль/л NaCl (х.ч., АО «Реахим», Россия) (с целью подавления эффекта полиэлектролитного набухания). Частицы инкубировали при

интенсивном перемешивании на магнитной мешалке в течение 15 мин. Излишек полимера удаляли центрифугированием в течение 5 минут при 3000 об/мин. Осадок промывали 1 мл раствора 0,5 моль/л NaCl и повторно центрифугировали. Затем проводили адсорбцию Na-КМЦ (1 мг/мл). После необходимого числа стадий адсорбции полиэлектролитов проводили удаление CaCO_3 из ядра микрочастиц обработкой раствором 0,2 моль/л Трилона Б ($\geq 99,0\%$, «Sigma-Aldrich», США). Далее отделяли капсулы от раствора путем центрифугирования в течение 5 минут при 3000 об/мин.

2.2.2 Получение гелевых частиц на основе альгината натрия и хитозана

Для получения гелевых частиц АЛГ-Са 2 мл 2%-ного водного раствора АЛГ-Na, содержащего ЦФТ определенной концентрации, капельным способом через шприцевой насос «Shenchen ISPLab01» со скоростью 0,2 мл/мин вводили в 10 мл раствора хлорида кальция с концентрацией 0,1 моль/л. Концентрация CaCl_2 была выбрана на основе предварительных экспериментов, поскольку при более низких концентрациях (0,01 и 0,05 моль/л) гелевые частицы АЛГ-Са имели рыхлую волокнистую структуру и низкую прочность. Количество загруженного ЦФТ в частицах варьировалось от 0,5 до 250 мг/г. Оптимальные размеры частиц достигались при температуре растворения альгината натрия 40°C и времени растворения 1-1,5 часа. После формирования частицы многократно промывали холодной бидистиллированной водой и хранили при низкой температуре $2-5^\circ\text{C}$.

Синтез сферических частиц АЛГ-Са, модифицированных ХТЗ, проводили двумя способами. В первом способе 2%-ный водный раствор альгината натрия, содержащий цефотаксим, медленно (со скоростью 0,2 мл/мин) добавляли капельным способом при помощи шприцевого насоса к раствору хлорида кальция с концентрацией 0,1 моль/л, содержащему 2% хитозана. Во втором методе модификации 20 мг микросфер АЛГ-Са с ЦФТ, приготовленных вышеуказанным способом, погружали на 5 минут в 10 мл раствора хитозана (0,25 %). Дальнейшую обработку модифицированных гелевых частиц проводили также как и в случае немодифицированных хитозаном образцов.

Для исследования деградация гелевых частиц в кислых средах 10 мг сфер выдерживали в 10 мл раствора HCl (0,01 моль/л) в течение не менее 6 часов при комнатной температуре. Гелевые сферы периодически извлекали из раствора HCl, промывали дистиллированной водой, высушивали и взвешивали на аналитических

весах. Потерю массы микросфер W выражали в виде отношения массы гелей в момент времени t к ее исходной массе.

При изучении набухания 10 мг сфер выдерживали в 10 мл фосфатно-солевого буферного раствора Дульбекко (137 ммоль/л NaCl; 2,68 ммоль/л KCl; 1,47 ммоль/л KH_2PO_4 ; 8,0 ммоль/л Na_2HPO_4) в течение 6 ч при комнатной температуре. Гелевые образцы периодически извлекали из буферного раствора, при помощи фильтровальной бумаги удаляли с их поверхности влагу и взвешивали на аналитических весах. Равновесную степень набухания H (в %) определяли по формуле:

$$H = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100, \quad (2.1)$$

где W_t – масса влажных образцов в момент времени t , мг; W_0 – масса сухих сфер до выдержки в фосфатно-солевом буфере, мг.

2.2.3 Синтез полупроводниковых квантовых точек

Для получения полупроводниковых КТ использовали следующие реагенты: ацетат кадмия (II) дигидрат (99%, «ТатХимПродукт», Россия), ацетат марганца (II) тетрагидрат (ч.д.а., «ТатХимПродукт», Россия), ацетат цинка (II) дигидрат (ч.д.а., «ТатХимПродукт», Россия), сера элементарная (осч., «ТатХимПродукт», Россия), селен металлический (99%, «Panreac», E.U., Барселона), олеил-1-амин (90%, «Acros», Россия), октадецен (90%, «Acros», Россия), олеиновая кислота (75%, «Купавнареактив», Россия), гидроксид натрия (99%, «ТатХимПродукт», Россия), хлороформ (ч.д.а., «ТатХимПродукт», Россия), меркаптопропионовая кислота (МПК) (ч.д.а., «ТатХимПродукт», Россия), этанол (ректификат).

Синтез квантовых точек CdS/ZnS проводили по оригинальной методике, описанной в [129] с использованием в качестве реакционной среды неполярного растворителя – октадецена-1. Процесс синтеза состоял из трех основных этапов: подготовка органических прекурсоров, коллоидный синтез наночастиц и их последующее выделение и очистка. На первом этапе ацетаты кадмия и цинка растворялись отдельно в смеси олеиновой кислоты и октадецена-1, что приводило к образованию олеатов. Реакция проводилась при температуре 130 °С в вакууме для

удаления уксусной кислоты и других газообразных продуктов реакции. Одновременно элементарная сера также растворялась в октадецене при тех же условиях. На втором этапе полученные растворы переносились в колбы объемом 100 мл, где они нагревались до 300-310 °С и смешивались, инициируя процесс образования наночастиц (нуклеацию). Все реакции проводились в атмосфере аргона. После завершения процесса смесь охлаждалась до комнатной температуры, что способствовало выпадению наночастиц из раствора. Полученные КТ дважды очищали центрифугированием при добавлении этанола и вновь диспергировали в толуоле. Готовые образцы хранились в виде коллоидных растворов.

Квантовые точки CdS/ZnS, допированные ионами марганца II состава $\text{Cd}_{0.9}\text{Mn}_{0.1}\text{S}/\text{ZnS}$, синтезировали по аналогичной методике с заменой олеиновой кислоты на олеил-1-амин с целью предотвращения окисления марганца. Для проведения реакции заданные пропорции ацетатов кадмия и марганца растворяли в смеси олеил-1-амин и октадецена при 120 °С под вакуумом для дегазирования смесей. Элементарную серу растворяли в октадецене при 160 °С также под вакуумом. Растворы ацетата кадмия и элементарной серы смешивали при 245 °С, предварительно создав в реакционном сосуде инертную атмосферу аргона для предотвращения окисления наночастиц. После 15 минут синтеза «ядер» по каплям в течение дополнительных 15 минут в реакционный сосуд добавляли раствор прекурсора цинка для наращивания оболочки ZnS. Температуру поддерживали на уровне 245 °С в течение всего процесса синтеза. По окончании реакция КТ дважды переосаждали этанолом и диспергировали в хлороформе.

Для проведения дальнейших исследований КТ были гидрофилизированы. Гидрофилизацию проводили по методике, приведенной в [129]. Для этого квантовые точки CdS/ZnS или $\text{Cd}_{0.9}\text{Mn}_{0.1}\text{S}/\text{ZnS}$ диспергировали в хлороформе и добавляли к полученной дисперсии 1 мл олеиновой кислоты. Отдельно готовили водный раствор меркаптопропионовой кислоты (МПК), pH которого доводили до 10 при помощи раствора NaOH (2 моль/л). Далее раствор МПК приливали к дисперсии КТ. Полученную двухфазную систему при интенсивном перемешивании нагревали до 90 °С для испарения хлороформа. После испарения хлороформа КТ переходили в водную фазу. Остатки олеиновой кислоты, олеиламина и прочих веществ удаляли путем центрифугирования при добавлении этанола, после чего гидрофилизированные КТ диспергировали в воде.

2.2.4 Синтез наночастиц полиэлектrolитных комплексов хитозан–к-каррагинан

Наночастицы на основе хитозана получали микроволновым и гидротермальным методами.

В первом методе для получения наночастиц на основе ХТЗ применяли метод с использованием микроволнового излучения. Для проведения микроволнового синтеза (МВС) использовали бытовую микроволновую печь. Навеску 0,00625 г ХТЗ растворяли в 5 мл 0,01 моль/л растворе соляной кислоты, доводя объем с помощью дистиллированной воды до 20 мл. Раствор перемешивали в круглодонной колбе в течение 3 часов. После этого раствор подвергали ультразвуковой обработке. Затем колбу с раствором помещали в микроволновую печь, отрегулированную на определенное время и мощность. Реакцию проводили при разной мощности (90, 360, 600, 700 и 800 Вт) и продолжительности процесса (4, 7, 10, 12 и 15 мин).

Во втором методе самосборка наночастиц проводилась на основе формирования полиэлектrolитного комплекса ХТЗ–КРГ. Наночастицы получали методом гидротермального синтеза (ГТС), используя в качестве растворителя азотную кислоту. Синтез проводили в стальном автоклаве с тефлоновым вкладышем. В автоклав помещали навески ХТЗ (0,01 г) и КРГ (0,01 г) и заливали раствор 0,01 моль/л азотной кислоты. Реактор помещали в печь, нагревали до 180°C со скоростью 2,5 град/мин, выдерживали 4,5 ч при этой температуре, а затем охлаждали в проточной воде. Реакционную смесь после синтеза фильтровали под вакуумом на фильтре с порами 0,22 мкм, отделяя осадок, который не растворился при гидротермальной обработке. В ходе синтезов варьировалось время процесса, соотношение полиэлектrolитов в исходной смеси и природа растворителя.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Кондуктометрия

Удельную электропроводимость растворов регистрировали с помощью кондуктометра Seven Compact («Mettler Toledo», Италия) с диапазоном измерений от 0,001 мкСм/см до 1000 мСм/см при температуре 25 °С. Относительная погрешность измерений составляла $\pm 0,5\%$.

2.3.2 pH-метрия

pH растворов определяли на pH-метре pH-410 («Аквилон», Россия). В качестве растворителей использовали деионизированную воду (pH 7,0), водный раствор 0,01 моль/л HCl (pH 2,0) и 0,2 моль/л раствор фосфатно-солевого буфера (pH 7,2), а так же трис-солевой буфер (pH 7,4).

2.3.3 Динамическое и электрофоретическое рассеяние света

Размер и электрокинетический потенциал исследуемых образцов определяли методом динамического светорассеяния на анализаторе размера частиц и дзета-потенциала серии «Zetasizer Nano ZS» («Malvern Instruments Ltd», Великобритания) с применением технологии M3-PALS. Анализатор оснащен He-Ne лазером мощностью 4 мВт с длиной волны 633 нм. Угол светорассеяния составлял 173°. Графическую интерпретацию результатов измерения получали с помощью программного обеспечения «DTS Application Software» компании Malvern Instruments для работы под управлением операционной системы Windows®. При анализе автокорреляционной функции использовали приближение твердых сферических частиц. Определение ζ -потенциала в водных системах проводили методом электрофоретического рассеяния света с применением технологии M3-PALS (использование быстро и медленно переменного электрического поля наряду с фазовым и частотным анализом рассеянного света). Перед выполнением измерений образцы фильтровали через фильтры Millipore с мембраной Durapore PVDF и диаметром пор 0,45 мкм. Для каждого образца проводили 3 серии измерений по 10 измерений в каждой. Ошибки измерений размера и ζ -потенциала частиц составили $\pm 2\%$ и $\pm 0,12$ мВ соответственно.

2.3.4 ИК-спектроскопия

Регистрация ИК-спектров образцов осуществлялась на Фурье-спектрометре ALPHA-T S/N 102706 («Bruker», США) со спектральным диапазоном 400-4000 см^{-1} , разрешением 4 см^{-1} , в таблетках с KBr и жидкостных кюветах. Исследуемые образцы

выделяли из растворов, высушивали и измельчали до тонких порошков массой 0,5-1 г. Порошки перемешивали с бромидом калия массой 100 мг и спрессовывали в тонкую пластину. Перед приготовлением таблеток КВг сушили в сушильном шкафу при 150-160 °С в течение 4 часов.

2.3.5 УФ-спектроскопия и люминесцентная спектроскопия

Для получения спектров поглощения в работе использовали сканирующий двухлучевой спектрофотометр Lambda 35 («Perkin Elmer», США) для УФ/видимой области, содержащий один монохроматор. В исследованиях применяли кварцевые кюветы марки «Purshee» объемом 3 мл и диапазоном пропускания 185-2500 нм. Кювету сравнения заполняли дистиллированной водой. Регистрацию электронных спектров растворов производили в интервале длин волн 300-700 нм. Графическую интерпретацию получали при помощи программного обеспечения UV WinLab.

Спектры люминесценции растворов получали на сканирующем спектрофлуориметре CaryEclipse («Varian», Великобритания). Возбуждение проводили при определенной длине волны с учетом люминесцентных характеристик исследуемых веществ. Для исследований применяли кюветы с диапазоном пропускания 170-2700 нм объемом 1 мл марки «Varian». Регистрацию спектров возбуждения производили в интервале длин волн 400-900 нм.

2.3.6. Дифракционные исследования

Рентгенодифракционные исследования образцов полупроводниковых КТ проводили на порошковом рентгеновском дифрактометре XRD-7000 («Shimadzu», Япония) с использованием монохроматизированного $\text{CuK } \alpha$ излучения ($\lambda = 1,54063 \text{ \AA}$).

2.3.7 Микроскопические исследования

Для оценки размера, морфологии и поверхности образцов проводили различные микроскопические исследования с использованием: люминесцентного микроскопа BX-43 («Olympus», Япония), поляризационного микроскопа «BX-51» («Olympus», Япония),

сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Evo ls 10 («Carl Zeiss»). При проведении исследований методом СЭМ изображения получали при помощи детектора вторичных электронов. Предварительно диспергированные и образцы осаждались на алюминиевую фольгу. Исследования проводились после напыления проводящего золотого слоя на установке Vac Coat DSCT. Для получения микрофотографий гелевых частиц на основе альгината кальция образцы были предварительно лиофильно высушены.

2.3.8 Квантово-химическое моделирование

Оптимизация геометрии, расчет термодинамических параметров и решение колебательной задачи проводились с учетом влияния среды растворителя (воды) в рамках модели поляризуемого континуума IEFPCM в программном пакете Gaussian 16 [130]. Квантово-химическое моделирование равновесной геометрии, энергетических характеристик комплексообразования и гидратации, а также колебательного спектра комплекса ХТЗ–ЦФТ проводились с учетом влияния неспецифической гидратации с применением модели IEFPCM. Расчеты проводились методом функционала плотности (DFT) с использованием функционала CAM-B3LYP и базисного набора 6-31G(d,p). Начальная структура одиночной молекулы ВНЦ для процесса оптимизации строилась по экспериментальным данным рентгеноструктурного анализа [131].

Молекулярно-динамическая релаксация геометрии системы «КТ–МПА–ВНЦ» в боксе с 5833 молекулами воды проводилась в течение 50 пикосекунд с шагом по времени 0,01 пикосекунд при температуре 298 К в программе HyperChem [132]. Оптимизация геометрии систем КТ–МПК–ВНЦ, КТ–МПК, ВНЦ с восемью и девятью координированными молекулами МПК, а также ВНЦ с одиночной молекулой МПК проводилась полуэмпирическим методом PM7 в программном обеспечении МОРАС2016 [133]. Результаты полуэмпирического моделирования использовались для расчетов энергий связи в системах КТ–МПК–ВНЦ.

2.3.9 Определение состава и константы устойчивости комплексов

Состав комплексов определяли методом изомолярных серий Остромысленского–Жоба [134] и методом молярных отношений [135]. Для изучения комплексообразования методом изомолярных серий готовили исходные растворы компонентов с концентрациями 10^{-4} моль/л. Растворы обоих компонентов смешивали в соотношениях от 1:9 до 9:1, сохраняя при этом общий объем раствора 10 мл и общую концентрацию 10^{-4} моль/л. При исследовании комплексообразования методом молярных отношений также использовали растворы реагентов с исходными концентрациями 10^{-4} моль/л. В 10 мерных колб наливали по 2 мл раствора первого и от 0,5 до 8 мл второго реагента, затем доводили объем смеси водой до 10 мл. В соответствии с методом молярных отношений при постоянной концентрации первого и переменной концентрации второго реагента спектральные изменения для исследуемого раствора вещества описывали уравнением:

$$\frac{[C_1]}{A-A_0} = \frac{1}{\varepsilon-\varepsilon_0} + \frac{1}{(\varepsilon-\varepsilon_0)\beta[C_2]}, \quad (2.2)$$

где A и A_0 – оптические плотности растворов в присутствии и в отсутствие второго реагента; $[C_1]$ – начальная концентрация раствора первого реагента; $[C_2]$ – концентрация второго реагента; ε и ε_0 – молярные коэффициенты экстинкции комплекса и первого реагента соответственно; β – константа устойчивости комплекса.

Константу устойчивости комплекса β_k определяли способом Клотца [135] из зависимости $[C_1]/(A-A_0)$ от $1/[C_2]$ по тангенсу угла наклона.

2.3.10 Определение константы связывания субстратов по данным тушения флуоресценции

Для определения констант связывания компонентов использовали метод тушения флуоресценции. Динамическое тушение флуоресценции описывали уравнением Штерна–Фольмера [136]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K[Q], \quad (2.3)$$

где F_0 и F – интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя; k_q – биомолекулярная константа скорости тушения; τ_0 – время затухания флуоресценции в отсутствие тушителя; $[Q]$ – концентрация тушителя.

Предел обнаружения (ПО) лекарственного вещества рассчитывали по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту графика линейной зависимости (калибровочного графика $F_0/F - 1$ от концентрации ВНЦ) по уравнению:

$$\text{ПО} = 3,3 \cdot S/b, \quad (2.4)$$

где S – стандартное отклонение аналитического сигнала; b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой).

2.3.11 Расчет относительного квантового выхода красителя и квантовых точек

Среди веществ с известными выходами флуоресценции выбирали соединения, спектр возбуждения которого перекрывается со спектром полупроводниковых квантовых точек или наночастиц на основе ХТЗ. В данной работе определение квантового выхода люминесценции производилось с использованием хинин сульфата и флуоресцеина, как веществ с известным квантовым выходом, по методике [137].

Квантовый выход определяли по уравнению:

$$Q_x = Q_{st} \frac{I_x}{I_{st}} \frac{A_{st}}{A_x} \frac{n_x^2}{n_{st}^2}, \quad (2.5)$$

где Q_x – относительный квантовый выход образца КТ; Q_{st} – относительный квантовый выход эталона; I_x – интегральная интенсивность флуоресценции образца КТ; I_{st} – интегральная интенсивность эталона; A_x – оптическая плотность образца КТ; A_{sm} – оптическая плотность эталона; n_x – показатель преломления воды; n_{st} – показатель преломления этилового спирта.

2.3.12 Определение эффективности инкапсулирования лекарственных веществ

На основании расчета концентрации лекарственных веществ в супернатанте, отделенном от полимерного носителя, оценивалась эффективность включения лекарственного вещества. Процесс инкапсулирования контролировали методом УФ-

спектроскопии. Количество иммобилизованного лекарственного вещества определяли по разности ее количества в носителе и количества, взятого для инкапсулирования. Эффективность включения определяли, принимая за 100% исходное количество лекарственного вещества, взятого для инкапсулирования.

2.3.13 Изучение кинетики высвобождения лекарственных веществ из полимерных носителей

Изучения кинетики высвобождения лекарственных веществ и красителя из полимерных носителей проводили в условия *in vitro* при температуре 37°C. В качестве приемных сред использовали растворы, имитирующие кислую среду желудка с pH 2,0 (раствор 0,01 моль/л HCl объемом 20 мл, к которому добавляли 5 мл фермента пепсина ($\geq 99,0\%$, «Sigma-Aldrich», США) и щелочную среду тонкого кишечника с pH 7,2 (к 23,5 мл дистиллированной воды прибавляли 1,4 мл трипсина ($\geq 99,0\%$, «Sigma-Aldrich», США) и 0,1 мл α -амилазы («Амилон», Россия). В качестве среды, имитирующей кровь человека, применяли раствор трис-солевого буфера (pH 7,4) и раствор белка альбумина (АБ) (70 мкг/мл).

Процесс высвобождения инкапсулированного вещества в приемную среду отслеживался методами УФ-спектроскопии и люминесцентной спектроскопии. Отбор пробы для анализа производился в кварцевые кюветы, после чего проба немедленно возвращалась обратно в приемную среду.

Оценка выхода инкапсулированного вещества из полимерных носителей осуществлялась путем сравнения количества вещества m_t , высвободившегося из носителя за время t , с его равновесным количеством m_∞ :

$$Q = \frac{m_t}{m_\infty}. \quad (2.6)$$

Анализ механизма диффузии воды и иммобилизованного в биополимерный носитель биологически активного вещества осуществляли в рамках модели Корсмейера–Пеппаса [138], которая описывается следующим уравнением:

$$m_t/m_\infty = k\tau^n, \quad (2.7)$$

где m_t – количество вещества в момент времени t (мг); m_∞ – равновесное количество вещества (мг); k – константа, связанная с параметрами взаимодействия полимер–

диффундирующее вещество; n – показатель, характеризующий механизм переноса низкомолекулярного вещества.

Коэффициенты диффузии воды и биоактивных соединений из полимерных носителей находили в рамках второго закона Фика. Решение этого уравнения для малых времен эксперимента ($m_t/m_\infty \leq 0,5$) имеет вид:

$$m_t/m_\infty = (16Dt/\pi r^2)^{0,5}, \quad (2.8)$$

где D – коэффициент диффузии ($\text{см}^2/\text{с}$); r – радиус сферических частиц (см).

Коэффициент диффузии воды и лекарственных средств определяли по уравнению:

$$D = \frac{0,25\pi r^2}{16t_{1/2}} \pi r^2, \quad (2.9)$$

при $t = t_{1/2}$, т.е. в момент, когда m_t достигало половины равновесной величины m_∞ .

2.3.14 Определение адсорбционных характеристик полиэлектролитных комплексов

Для исследования эффективности и механизма адсорбции ванкомицина и флуоресцеина на наночастицах полиэлектролитного комплекса ХТЗ–КРГ были получены равновесные изотермы адсорбции и проведен их анализ в рамках различных моделей адсорбции для оценки процесса адсорбции на наночастицах комплекса.

Для нахождения удельной концентрации адсорбтива (q_e) и равновесной концентрации неадсорбированного вещества (c_e) использовали уравнение:

$$q_e = \frac{(C_0 - c_e)V}{m}, \quad (2.10)$$

где C_0 – начальная концентрация адсорбируемого вещества; V – объем раствора; m – масса адсорбента.

Равновесную концентрацию адсорбтива в растворе c_e определяли по величине оптической плотности при определенной длине волны с использованием калибровочной зависимости.

Анализ изотерм адсорбции ФЛЦ и ВНЦ на частицах ПЭК проводили в рамках моделей Ленгмюра [139] и Фрейндлиха [140]. Модель адсорбции Ленгмюра описывали уравнением:

$$q_e = q_m \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e}, \quad (2.11)$$

где q_m – адсорбционная емкость монослоя (г/г); K_L – константа связывания.

С использованием изотермы Ленгмюра находили безразмерный параметр адсорбционного равновесия R_L :

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_{max}}, \quad (2.12)$$

где C_{max} – наибольшая начальная концентрация адсорбата.

Параметр R_L указывает на тип адсорбции, который в зависимости от выбранного диапазона концентраций адсорбата может быть необратимый ($R_L = 0$), благоприятный ($0 < R_L < 1$), неблагоприятный ($R_L > 1$) [141].

Адсорбцию лекарственных веществ и красителя на гетерогенной поверхности ПЭК характеризовали также моделью Фрейндлиха:

$$q_e = K C_e^{1/n}, \quad (2.13)$$

где K – константа адсорбции Фрейндлиха; n – параметр, указывающий на степень неоднородности поверхности адсорбента.

2.3.15 Оценка антимикробной активности цефотаксима

Антимикробную активность в условиях *in vitro* гелевых образцов АЛГ и АЛГ–ХТЗ с иммобилизованным ЦФТ определяли методом серийных разведений в бульоне Мюллера–Хинтона. Для тестирования использовали культуры грамположительных бактерий: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P FDA 209P и грамотрицательных бактерий: *Escherichia coli* ATCC 25922, относящихся к IV-группе патогенности (государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»). Бактериальная нагрузка в опыте составляла $3,0 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Исходный раствор

антибиотика ЦФТ (концентрация 7,5 мг/мл) готовили непосредственно в питательной среде Мюллера–Хинтона с добавлением для лучшей растворимости 5% раствора диметилсульфоксида. Образцы были выложены в стерильные чашки Петри и высушены сначала 24 часа при комнатной температуре, затем 2 часа в термостате при 60 °С. Затем к полностью высушенным гелевым частицам добавляли 10 мл стерильной дистиллированной воды и выдерживали при комнатной температуре в течение 24 часов. Бактериальные культуры инкубировали в термостате при 37 °С. Эксперимент повторяли три раза. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) была определена как минимальная концентрация соединения, которая подавляет рост тестируемого микроорганизма. Для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК), при которой колонии бактерий не обнаруживались, аликвоту бактериальной культуры переносили на агар Мюллера-Хинтона в 10-сантиметровую чашку Петри и инкубировали в течение 24-48 ч при 37 °С. МБК представляла собой минимальную концентрацию, при которой колонии бактерий не обнаруживались, что свидетельствовало о гибели бактерий с эффективностью > 99,9%.

ГЛАВА 3. ФОРМИРОВАНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ХИТОЗАНА С АНИОННЫМИ ПОЛИСАХАРИДАМИ И ВЫЯВЛЕНИЕ ХАРАКТЕРА ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИХ ОБРАЗОВАНИЯ

3.1 Общие закономерности образования полиэлектролитных комплексов хитозана

Полиэлектролитные комплексы формируются благодаря кооперативному электростатическому взаимодействию между полиэлектролитами с противоположными зарядами на макроцепи (поликатионами и полианионами) в водной среде. В качестве катионного полиэлектролита для получения ПЭК в работе использовали ХТЗ, который является слабым полиоснованием, проявляющим полиэлектролитные свойства за счет протонирования аминогрупп в слабокислых средах. В качестве анионных полиэлектролитов из существующего многообразия природных полисахаридов были выбраны полимеры, которые уже нашли широкое применение в современной биомедицине и разрешены к использованию в лекарственных препаратах. Выбор был сделан в пользу следующих анионных полисахаридов: Na-КМЦ – соль слабой поликислоты с метилкарбоксильными группами, АЛГ-Na – соль альгиновой поликислоты, содержащая в своем составе карбоксильные группы, к-КРГ – полианион с сульфатными группами. За счет разнообразия функционально-активных групп катионного и анионного типа между макромолекулами данных полиэлектролитов образуются ион-ионные связи, приводящие к формированию комплексов. На рисунке 3.1 показаны схемы электростатического взаимодействия катионного полиэлектролита ХТЗ и анионных полиэлектролитов в водных растворах. Образование ПЭК ХТЗ с анионными полисахаридами сопровождается снижением удельной электропроводимости смешанных растворов полиэлектролитов за счет компенсации зарядов макроионов, электрокинетического потенциала частиц ПЭК и изменением их размера [142-146].

Для подтверждения структуры исходных образцов полиэлектролитов и образования комплексов ХТЗ с анионными полисахаридами было проведено сравнительное исследование с использованием метода ИК-спектроскопии. На спектрах всех исходных образцов присутствуют характерные для полисахаридов полосы поглощения: ν_{O-H} (полоса поглощения 3700-3000 см^{-1}), ν_{C-H} (полоса поглощения 3000-

2800 cm^{-1}), $\nu_{\text{C-C}}$, $\nu_{\text{C-O}}$ пиранозных колец (полоса поглощения 1200-1000 cm^{-1}). Для ХТЗ отмечается наличие полос поглощения в интервале, характерном для амидных групп δ_{NH_2} (1650-1300 cm^{-1}). Присутствие полос поглощения 1521 cm^{-1} и 1318 cm^{-1} подтверждает высокую степень деацетилирования исходного образца ХТЗ и его катионную форму, обусловленную присутствием NH_3^+ -групп (рисунок 3.2).

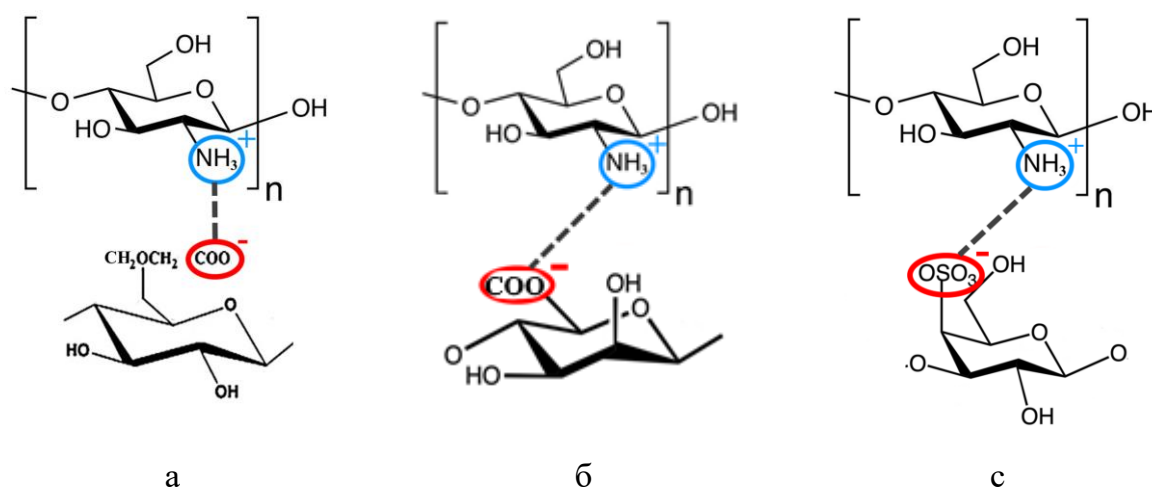


Рисунок 3.1 – Схемы электростатического взаимодействия ХТЗ с анионными полиэлектролитами: а) Na-КМЦ, б) АЛГ-Na, в) КРГ

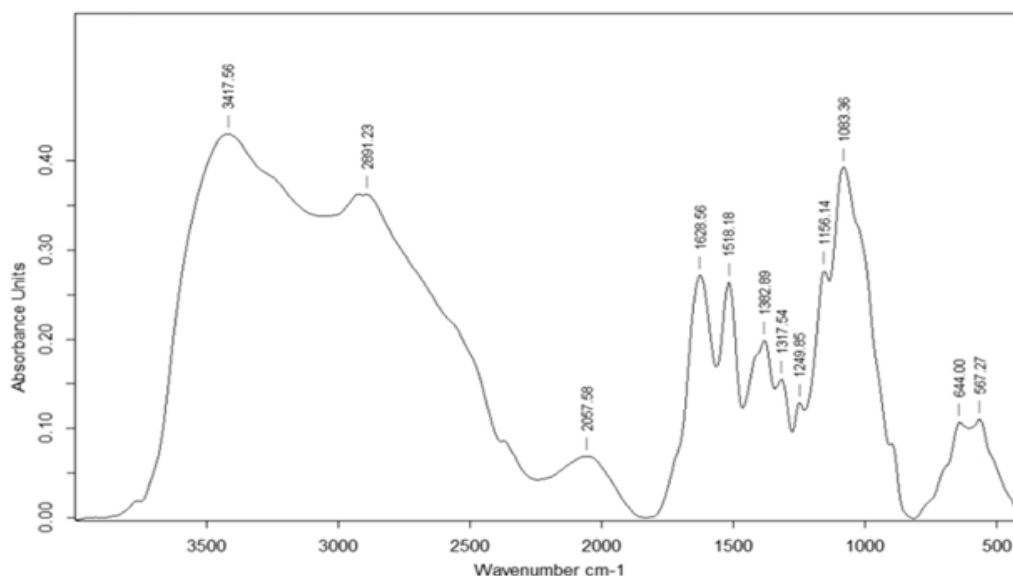


Рисунок 3.2 – ИК-спектр ХТЗ

В ИК-спектрах Na-КМЦ и АЛГ-Na наблюдаются интенсивные полосы поглощения в области 1650-1550 cm^{-1} и 1400-1300 cm^{-1} , соответствующие

асимметричным и симметричным валентным колебаниям карбоксилат-аниона. Полосы поглощения $1060\text{--}1030\text{ см}^{-1}$ можно отнести к недиссоциированным карбоксильным группам (рисунки П1, П2 в Приложении). Спектр к-КРГ также отражает характерную структуру данного сульфатированного полисахарида: полоса поглощения при 1258 см^{-1} соответствует сульфатным группам, полоса 847 см^{-1} подтверждает присутствие в структуре сульфата галактозы-4 (рисунок П3 в Приложении).

В ИК-спектрах комплексов ХТЗ с анионными полисахаридами основные изменения отмечаются в области полос поглощения функциональных групп полиэлектролитов, что свидетельствует об их электростатическом взаимодействии. Так, в спектре комплекса ХТЗ–АЛГ наблюдается появление полосы при 1609 см^{-1} (COO-группы альгината) и исчезновение полосы 1518 см^{-1} , которая относится к NH_3^+ -группам ХТЗ (рисунок 3.3).

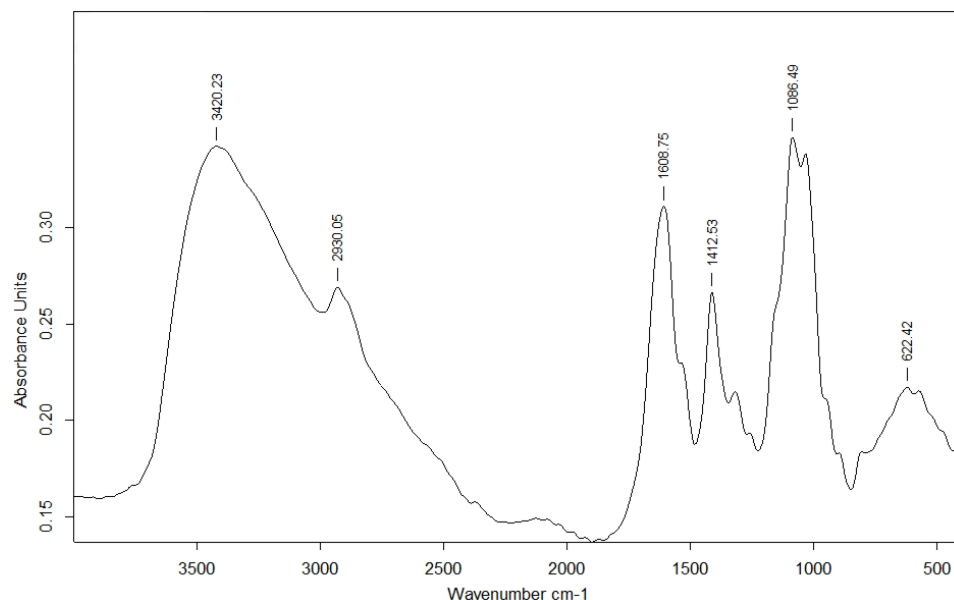


Рисунок 3.3 – ИК-спектр комплекса ХТЗ–АЛГ

Для ПЭК ХТЗ с Na-КМЦ также характерны схожие изменения в ИК-спектре образца. В спектрах ПЭК ХТЗ–КРГ выявлено появление полосы поглощения при 1525 см^{-1} , соответствующей NH_3^+ -группам, которые отсутствуют в спектре КРГ. Спектр содержит характерные для КРГ полосы – 1252 см^{-1} (сульфатные группы), 930 см^{-1} (3,6-ангидрогалактоза), 847 см^{-1} (галактоза-4-сульфат). Следует отметить, что на ИК-спектрах всех образцов ПЭК хитозана наблюдаются сдвиги полос поглощения в области валентных колебаний O–H- и N–H-связей и увеличение их интенсивности, что

указывает на образование водородных связей между функциональными группами полиэлектролитов (рисунки П4, П5 в Приложении).

Благодаря особенностям механизма образования, ПЭК имеют высокую чувствительность к изменению различных факторов: температуры, pH среды, ионной силы раствора, состава растворителя. Даже незначительные вариации перечисленных факторов могут приводить к изменениям фазового состояния комплексов и их надмолекулярной организации.

В зависимости от гидрофильно-гидрофобного баланса частиц ПЭК, который зависит от химической природы полиэлектролитов, их концентраций и соотношения в смеси, ПЭК хитозана могут быть как растворимыми, так и нерастворимыми в водных и водно-солевых средах [147]. Образование нерастворимых ПЭК, как правило, наблюдается при эквимольном соотношении концентраций противоположно заряженных полиэлектролитов в системе. Так, например, в зависимости от соотношения концентраций ХТЗ и Na-КМЦ в их смешанных растворах, полученных в различных объемных соотношениях ($V_{\text{ХТЗ}} : V_{\text{Na-КМЦ}} = 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 4:6; 3:7; 2:8; 1:9; 0.8:9.2; 0.4:9.6; 0.2:9.8$), может отмечаться появление опалесценции, частичное или полное гелеобразование. Смешение эквимольных растворов ХТЗ с Na-КМЦ приводит к фазовому разделению – появлению опалесценции или осадка, что обусловлено образованием нерастворимых ПЭК. Комплекс в виде геля формируется в смесях с избытком натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы – $[\text{Na-КМЦ}] : [\text{ХТЗ}] = 7$ и выше [146].

Далее было изучено влияние химической природы и pH среды на комплексообразование ХТЗ с анионными полисахаридами.

3.2 Влияние природы и состава растворителя на взаимодействие хитозана с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы в смешанных средах

Изменение природы и состава растворителя можно рассматривать как эффективное средство управления процессом комплексообразования ХТЗ. Для исследования влияния свойств растворителя на образование комплексов ХТЗ с анионными полисахаридами нами были выбраны водно-этанольные растворители. Выбор этанола в качестве соразтворителя связан с возможностью изменять полярность растворителя в широких

пределах путем варьирования его содержания в смеси. Выбор сорастворителя был также обусловлен тем, что этанол относится к эндогенным биологически активным веществам, которые проявляют выраженную физиологическую активность в организме человека.

Анализ влияния состава водно-этанольных растворителей проводили на примере взаимодействия ХТЗ с Na-КМЦ [146]. Для проведения исследований были получены смеси полиэлектролитов в водно-спиртовых средах различного состава: 10 об. % этанола + 90 об. % воды; 25 об. % этанола + 75 об. % воды; 50 об. % этанола + 50 об. % воды.

На рисунке 3.4 а представлены графики зависимостей удельной электропроводности смешанных растворов ХТЗ и Na-КМЦ от соотношения их концентраций в воде (кривая 1) и водно-спиртовых средах (кривые 2-4). Из рисунка видно, что при составе смеси $[\text{Na-КМЦ}] : [\text{ХТЗ}] = 7$ на изотермах удельной электропроводности присутствуют выраженные переломы, свидетельствующие об образовании в системе ПЭК. Данное соотношение концентраций полиэлектролитов указывает на образование нестехиометрического комплекса, содержащего одновременно как связанные, так и не связанные между собой функциональные группы ХТЗ и Na-КМЦ.

Увеличение содержания органического сорастворителя сопровождается снижением диэлектрической проницаемости среды, что приводит к усилению конденсации противоионов и уменьшению линейной плотности заряда на полимерных цепях. Это приводит к последующему образованию ПЭК ХТЗ– Na-КМЦ с меньшим количеством солевых связей со снижением полярности растворителя. Действительно, переход от воды к смешанным водно-этанольным растворителям сопровождается значительным уменьшением угла наклона изотерм электропроводности в области составов смесей $[\text{Na-КМЦ}] : [\text{ХТЗ}] = 1 \div 6$. Особенно ярко данный эффект проявляется в системе с содержанием этанола 50 об. %, в которой электропроводность смешанных растворов ХТЗ и Na-КМЦ существенно ниже по сравнению с водными растворами.

Влияние состава смешанного водно-этанольного растворителя на взаимодействие ХТЗ с Na-КМЦ подтверждается характером изменения ζ -потенциала частиц ПЭК от состава исходных смесей полимеров (рисунок 3.4 б). ζ -потенциал макромолекул ХТЗ имеет значение в районе +30 мВ, что обусловлено зарядом протонированных аминогрупп. С увеличением содержания этанола в растворителе до 50

об. % ζ -потенциал макроионов ХТЗ снижается до +12 мВ вследствие уменьшения диссоциирующей способности растворителя. Добавление Na-КМЦ в раствор ХТЗ приводит к уменьшению ζ -потенциала вплоть до полной нейтрализации заряда частиц комплексов. Дальнейшее повышение концентрации анионного полиэлектролита в системе вызывает перезарядку частиц ПЭК. С увеличением концентрации спирта в растворителе инверсия знака ζ -потенциала комплексов наблюдается при меньшем содержании Na-КМЦ по сравнению с водным раствором ($[\text{Na-КМЦ}] : [\text{ХТЗ}] = 6, 4, 3$ для смешанных растворителей с содержанием этанола 10, 25 и 50 об. % соответственно).

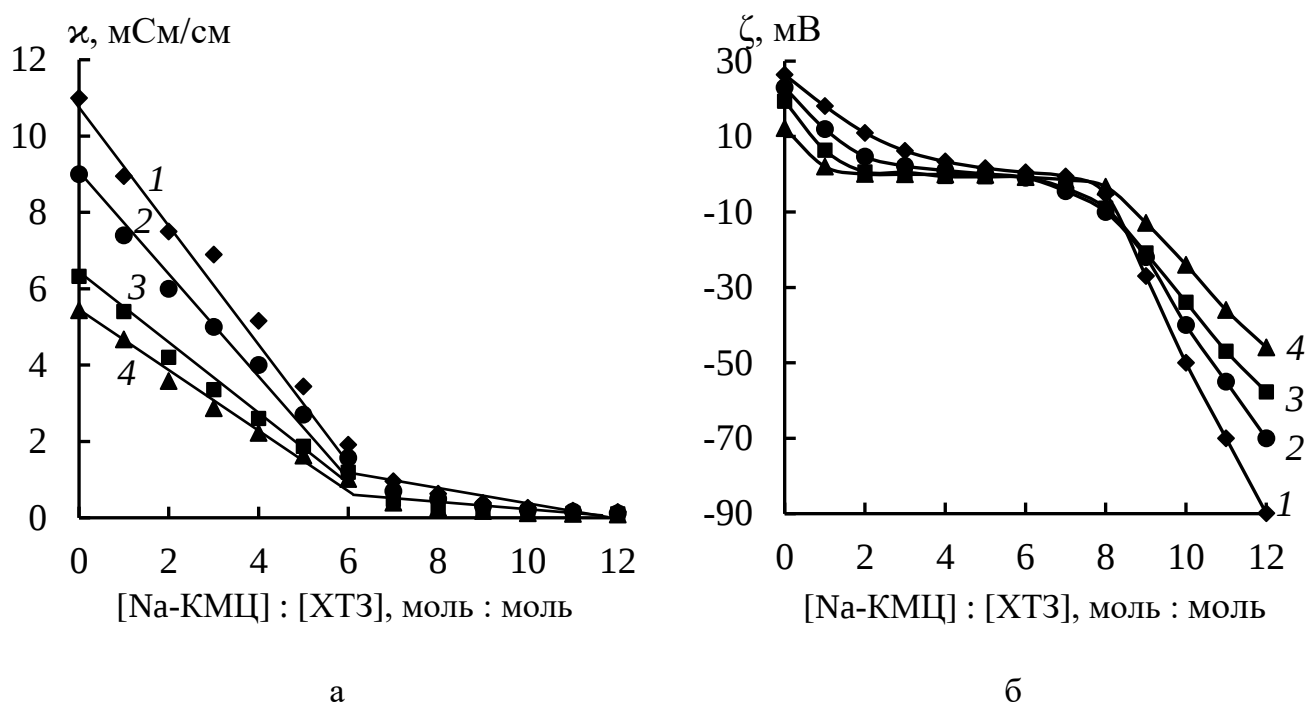


Рисунок 3.4 – Зависимость удельной электропроводности (а) и ζ -потенциал полиэлектролитных комплексов ХТЗ–Na-КМЦ (б) от состава смесей $[\text{Na-КМЦ}] : [\text{ХТЗ}]$ при содержании этанола в растворителе 0 (1), 10 (2), 25 (3) и 50 об. % (4)

3.3 Влияние pH среды на формирование полиэлектролитного комплекса хитозана с альгинатом натрия

Механизм образования ПЭК и его суммарный заряд зависят от pH среды, так как этот фактор определяет степень ионизации функциональных групп полиэлектролитов. Благодаря высокой чувствительности к изменениям pH ПЭК на основе ХТЗ особенно перспективны в разработке систем доставки биологически активных веществ, учитывая

различия физиологического pH в нормальном и патологическом состояниях в органах и тканях организма человека.

Для изучения характера влияния pH среды на закономерности образования ПЭК исследовали взаимодействие полиэлектролитов на примере ХТЗ и АЛГ-Na в растворе 0,01 моль/л HCl (pH 2,0; $I = 0,01$) и 10% фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко (pH 7,2; $I = 0,0165$). Данные среды были выбраны как имитирующие биологические жидкости в организме человека при пероральной доставке [148]. Зависимости удельной электропроводности смешанных растворов ХТЗ и АЛГ-Na от их состава для сред с разным значением pH демонстрируют явные перегибы, указывающие на образование стехиометрического ПЭК (рисунок 3.5 а).

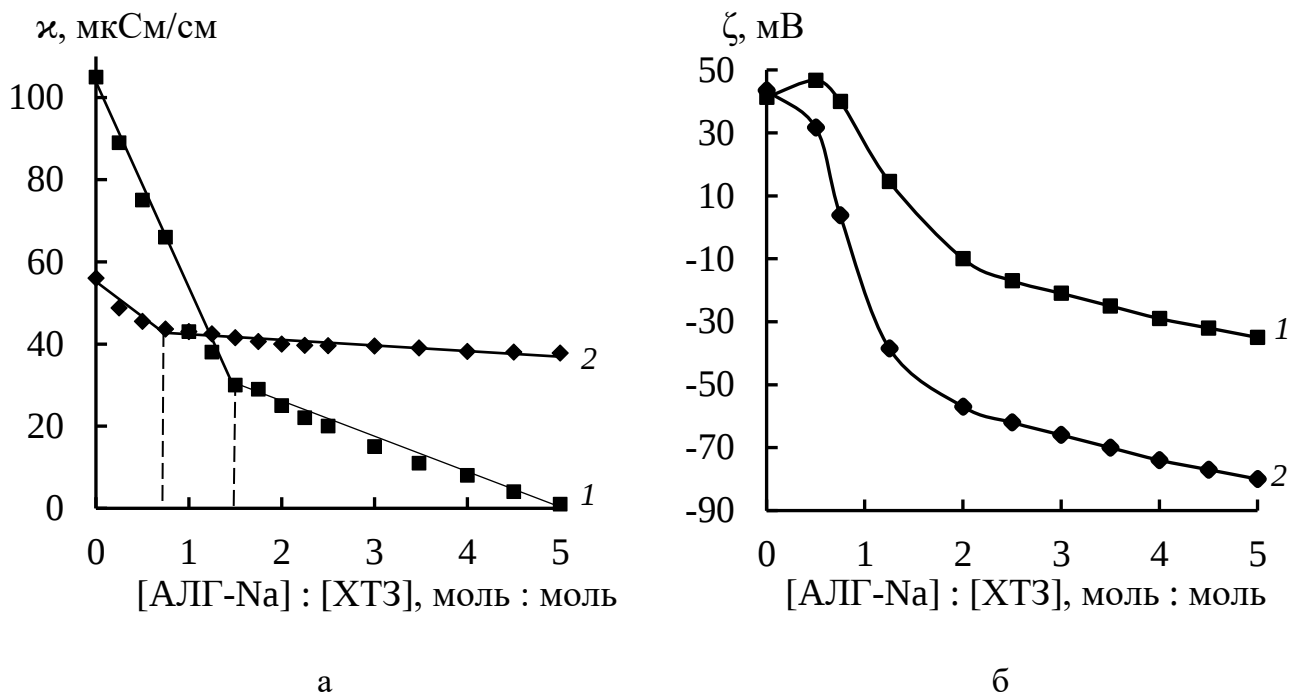


Рисунок 3.5 – Зависимость удельной электропроводности (а) и ζ -потенциала ПЭК ХТЗ–АЛГ (б) от состава [АЛГ-Na] : [ХТЗ] при pH 2,0 (1) и 7,2 (2)

Однако состав смесей, отвечающий за формирование таких комплексов, зависит от pH среды. В кислой среде (кривая 1) комплекс содержит больше звеньев альгината из-за неполной диссоциации его карбоксильных групп ([АЛГ-Na] : [ХТЗ] = 1,5). В растворе с pH 7,2 (кривая 2) происходит депротонирование аминогрупп ХТЗ, в результате соотношение концентраций полиэлектролитов уменьшается до 0,75, что говорит о включении бóльшего количества звеньев катионного полиэлектролита в ПЭК.

Влияние pH среды на комплексообразование ХТЗ с альгинатом подтверждается данными по изменению ζ -потенциала их комплексов (рисунок 3.5б). Добавление отрицательно заряженного АЛГ-Na в раствор ХТЗ приводит к закономерному снижению ζ -потенциала ПЭК, но полная нейтрализация аминогрупп хитозана карбоксильными группами альгината и последующая инверсия знака ζ -потенциала комплексов в кислой среде (кривая 1) происходит при бóльшем содержании АЛГ-Na по сравнению с раствором с pH 7,2 (кривая 2). Составы, соответствующие отсутствию заряда у ПЭК, совпадают с перегибами на изотермах электропроводности.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Установлено, что с увеличением содержания этанола в растворителе до 50 % наблюдается образование полиэлектролитного комплекса хитозана и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы с меньшим количеством солевых связей в смешанных водно-спиртовых средах.

2. На примере взаимодействия хитозана с альгинатом натрия показано, что частицы полиэлектролитного комплекса ведут себя как pH-зависимые системы. В нейтральной и слабокислой средах образуются комплексы с максимальным количеством солевых связей. При pH 7,2 наблюдается сильное ослабление взаимодействия депротонированного хитозана с альгинатом натрия. Состав комплексов также зависит от pH среды.

3. Изменение концентрации и соотношения компонентов в смеси исследуемых полиэлектролитов, состава смешанного растворителя и pH среды можно рассматривать как средство управления процессом формирования полиэлектролитных комплексов хитозана в различных средах. Это позволяет рассматривать комплексы хитозана как перспективные полимерные материалы для создания различных типов носителей с контролируемым высвобождением биологически активных веществ.

ГЛАВА 4. МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С МОДЕЛЬНЫМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ И ОПТИЧЕСКИМИ ЗОНДАМИ

Неотъемлемой частью разработки перспективных лекарственных форм на основе полиэлектролитных комплексов ХТЗ является проведение фундаментальных исследований сложных межмолекулярных взаимодействий в системе «катионный полиэлектролит–анионный полиэлектролит–лекарственное вещество». Именно энергетика и механизм межмолекулярных взаимодействий полимерной матрицы с лекарственными веществами играют ключевую роль в эффективности их инкапсулирования и определяют фармакокинетические профили высвобождения в различных средах. Для выявления закономерностей межмолекулярных взаимодействий в исследуемых системах было проведено изучение комплексообразования ХТЗ, анионных полиэлектролитов и их ПЭК с модельными биологически активными веществами в различных средах. В качестве них были выбраны лекарственные вещества, широко применяемые в медицинской практике, но нуждающиеся в разработке новых или усовершенствовании уже существующих лекарственных форм – антибиотики цефотаксим и ванкомицин, а также нестероидное противовоспалительное средство ацетилсалициловая кислота.

Тераностика – это сравнительно новое направление в наномедицине, которое заключается в интеграции терапевтических и диагностических (визуализирующих) средств в одном и том же носителе. Основной целью медицинской визуализации является неинвазивный анализ биопроцессов во время медицинских исследований, таких как компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, рентгенография и ультразвуковое исследование. Особенно комплексный тераностический подход перспективен для разработки систем доставки токсичных препаратов для химиотерапии, антибиотиков и других сильнодействующих лекарственных средств. В качестве визуализирующих агентов или наносенсоров широко используются полупроводниковые квантовые точки, углеродные квантовые точки, органические люминофоры. Из широкого спектра соединений, применяемых в качестве оптических зондов, нами были выбраны флуороновый краситель флуоресцеин и полупроводниковые квантовые точки «ядро-оболочка» на основе сульфида кадмия – CdS/ZnS и CdS/ZnS, допированные ионами марганца (II).

Понимание механизмов, лежащих в основе формирования комплексов между компонентами полимерного носителя и лекарственными веществами, а также визуализирующими агентами, позволит оптимизировать процесс разработки новых лекарственных форм, обеспечивающих контролируемое высвобождение активных ингредиентов в целевые ткани организма человека и возможность визуализации данного процесса.

4.1 Взаимодействие цефотаксима с хитозаном и альгинатом натрия

Цефотаксим – это полусинтетический бета-лактамный антибиотик, относящийся к группе цефалоспоринов третьего поколения. Антимикробную активность антибиотиков этой группы определяет цефем-группа, которая представляет собой дигидротиазолидиновое кольцо, соединенное с бета-лактамным кольцом [149]. ЦФТ широко применяется в терапии большинства инфекций и занимают ведущее место в современной антибактериальной терапии в условиях стационара. С химической точки зрения данный антибиотик относится к соединениям амфотерного типа, содержащим карбоксильные и аминотиазольные группы, ионное состояние которого в растворе зависит от pH среды. Появление разных ионных форм ЦФТ в водном растворе при изменении pH отражается в его спектральных характеристиках (рисунок 4.1). В кислой среде (кривая 1) в спектре ЦФТ присутствует один пик при 262 нм, что соответствует поглощению протонированной аминотиазольной группы. Это отвечает существованию ЦФТ преимущественно в катионной форме. При pH 5,6 (кривая 2) в спектре проявляются два плеча при длинах волн 235 и 262 нм, отражающие поглощение двух групп антибиотика – аминотиазольной и карбоксильной, что указывает на то, что в слабокислых средах ЦФТ находится в растворе в виде цвиттериона. При повышении величины pH до 7,2 (кривая 3) максимумы поглощения при длинах волн 235 и 262 нм сохраняются, что также связано с присутствием в структуре молекулы ЦФТ положительных и отрицательных зарядов при данном значении pH [149, 150].

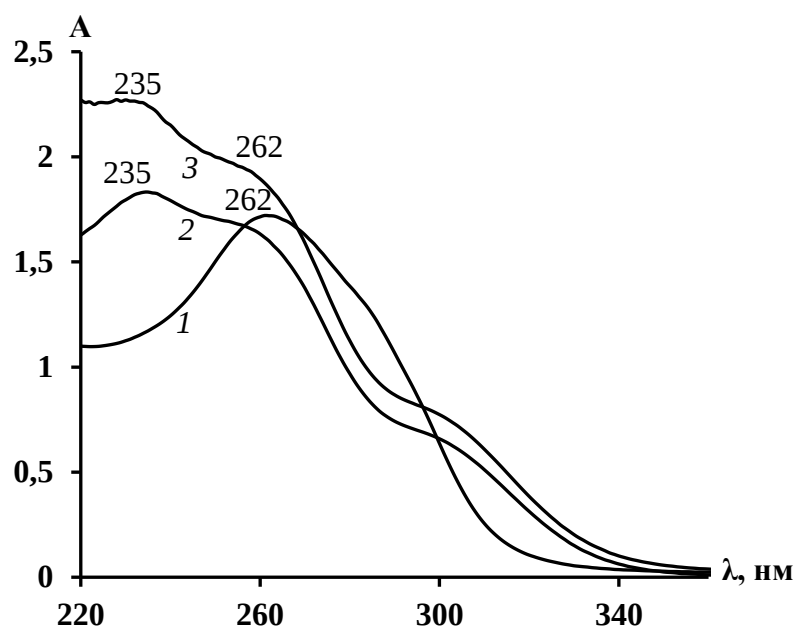


Рисунок 4.1 – Спектры поглощения растворов ЦФТ ($c_{\text{ЦФТ}} = 50$ мкг/мл) при рН 2,0 (1), 5,6 (2) и 7,2 (3)

В смешанных слабокислых водных растворах ХТЗ и ЦФТ создаются условия для ионного взаимодействия протонированных аминогрупп ХТЗ с карбоксильными группами ЦФТ. При добавлении ХТЗ, который сам не поглощает в УФ области, в раствор ЦФТ в спектрах поглощения антибиотика по сравнению со спектром чистого ЦФТ наблюдается bathochromic shift максимумов поглощения и hyperchromic effect, что указывает на взаимодействие ЦФТ с полимером (рисунок 4.2).

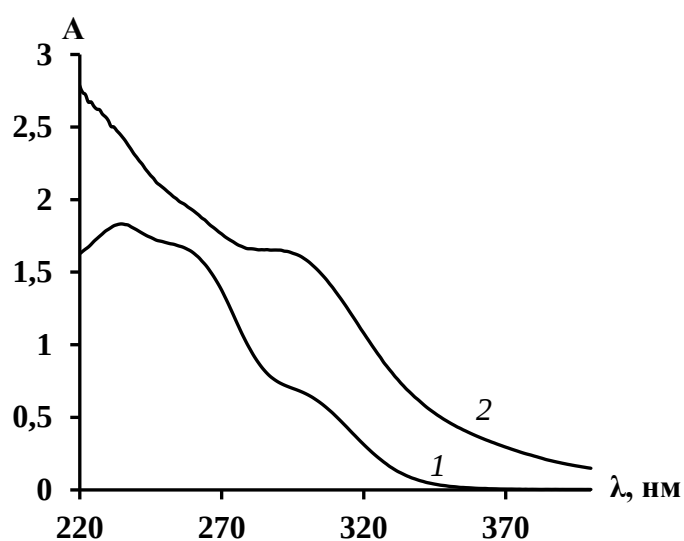


Рисунок 4.2 – Спектры поглощения растворов ЦФТ (1) и комплекса ХТЗ–ЦФТ (2) при рН 5,6 ($c_{\text{ЦФТ}} = 50$ мкг/мл, $[\text{ЦФТ}] : [\text{ХТЗ}] = 1$)

По изменению электропроводности смешанных растворов ЦФТ и ХТЗ можно судить о характере межмолекулярного взаимодействия в системе (рисунок 4.3). В кислой и слабокислой средах наблюдается уменьшение электропроводности смешанных растворов, что свидетельствует об электростатическом характере их взаимодействия. На изотермах электропроводности смесей ЦФТ и ХТЗ в данных средах имеются перегибы, соответствующие образованию комплексов определенного состава с максимальным количеством ионных связей. В слабокислых средах функциональные группы ХТЗ и ЦФТ хорошо диссоциированы, поэтому при pH 5,6 образование комплекса отмечается при меньшем содержании ЦФТ в смеси по сравнению с кислой средой. При pH 7,2 происходит депротонирование аминогрупп ХТЗ, что значительно ослабляет связывание ЦФТ хитозаном, и выражается в постоянстве значений электропроводности смешанных растворов ЦФТ–ХТЗ при всех изученных составах.

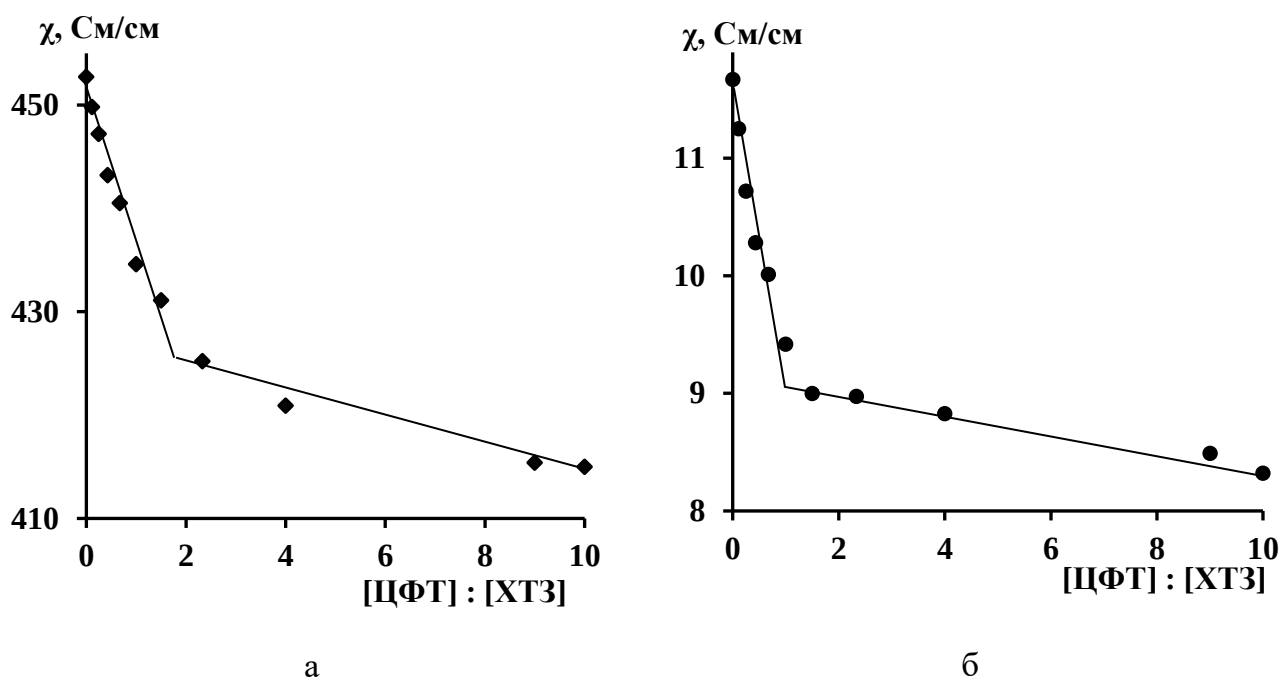


Рисунок 4.3 – Зависимость удельной электропроводности смесей цефотаксима и хитозана от состава $[ЦФТ] : [ХТЗ]$ при pH 2,0 (а) и 5,6 (б)

Составы комплексов ЦФТ–ХТЗ, образованных в кислой и слабокислой средах, определяли методом изомолярных серий (рисунок 4.4). Несимметричность изомолярных кривых и более крутой наклон в области бóльших концентраций ХТЗ указывают на нестехиометричный состав комплексов, а наличие размытого максимума на кривых – на образование нестабильного комплекса или нескольких стабильных комплексов с близкими

оптическими свойствами [151]. Состав комплексов при pH 2,0 соответствует молярному отношению $[ЦФТ] : [ХТЗ] = 1,0 : 4,0$, при pH 5,6 – $1,0 : 2,0$. Нестехиометричный состав комплексов указывает на то, что часть аминогрупп ХТЗ оказываются не вовлеченных в процесс комплексообразования. Этот вывод согласуется с результатами других исследований [152], показавших снижение содержания ЦФТ в составе комплекса с ХТЗ при уменьшении pH из-за изменения степени протонирования аминогрупп полиэлектролита.

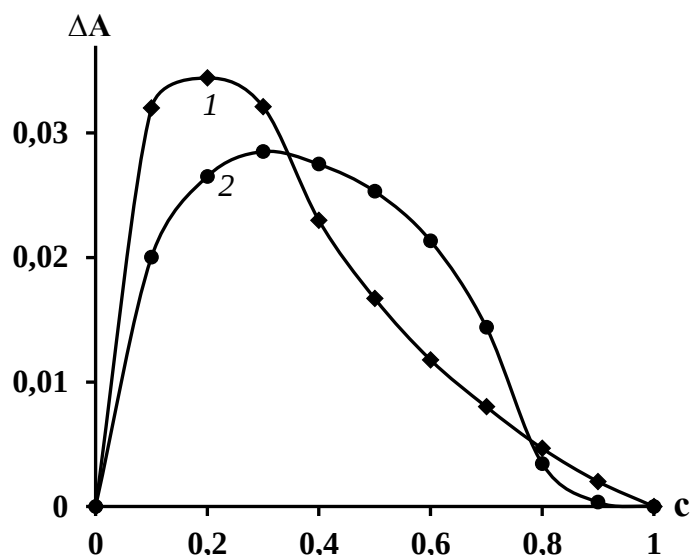


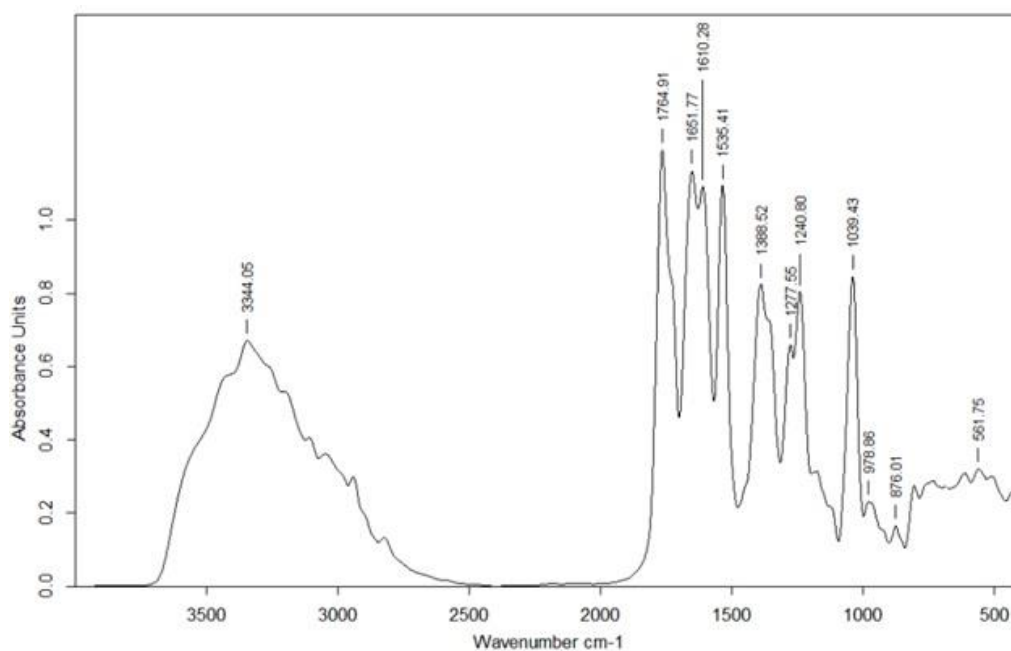
Рисунок 4.4 – Изомолярные кривые для системы ЦФТ–ХТЗ при pH 2,0 (1) и 5,6 (2)

$$([ЦФТ] + [ХТЗ] = 1 \cdot 10^{-4} \text{ М}, c = \frac{[ЦФТ]}{[ЦФТ] + [ХТЗ]}; \lambda = 262 \text{ нм})$$

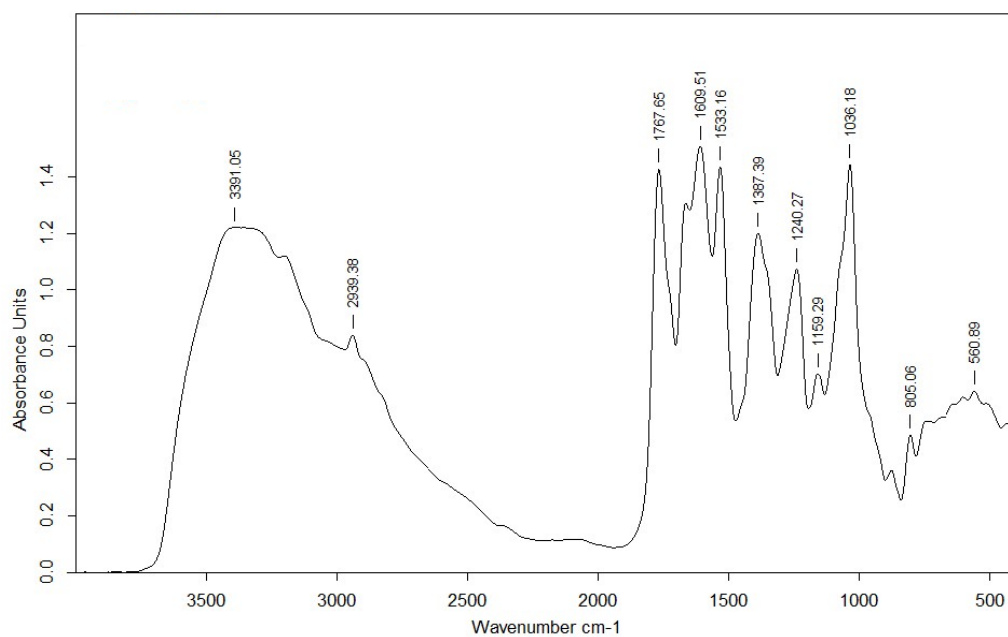
Константы устойчивости комплексов ЦФТ–ХТЗ, найденные по методу Клотца по тангенсу угла наклона зависимости $[ХТЗ]/(A - A_0)$ от $1/[ЦФТ]$, в кислой среде составили $\beta_k = 5,0 \cdot 10^5$ л/моль, а при pH 5,6 – $\beta_k = 1,5 \cdot 10^4$ л/моль. Комплексы имеют низкую устойчивость ($\beta_k < 10^6$), что соответствует форме изомолярной кривой. Однако следует отметить, что большей устойчивостью характеризуется комплекс ЦФТ–ХТЗ, образованный в кислой среде.

Для подтверждения образования комплексов между ЦФТ с ХТЗ проводили сравнительный анализ ИК-спектров исходных компонентов и их комплекса, выделенного из водного раствора. ИК-спектр ЦФТ (рисунок 4.5 а) демонстрирует полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям N–H-связей (3344 см^{-1}), деформационным колебаниям этих связей (1610 см^{-1} , полоса «Амид II»), валентным колебаниям карбонила

(β -лактамы, эфир карбоновой кислоты, «Амид I» – 1765, 1710, 1652 cm^{-1}), C=N-связи (1535 cm^{-1}) и деформационным колебаниям C–H-связей (1389, 1356 cm^{-1}).



а



б

Рисунок 4.5 – ИК-спектры ЦФТ (а) и комплекса ЦФТ–ХТЗ (б), выделенного из водного раствора при pH 5,6

В ИК-спектрах продукта взаимодействия ХТЗ с ЦФТ (рисунок 4.5 б) наблюдаются изменения в области полос поглощения функциональных групп ЦФТ и аминокрупп ХТЗ (ИК-спектр приведен на рисунке 3.2). В спектре наблюдается полоса поглощения при

1768 см^{-1} и плечо при 1675 см^{-1} , характерные для колебаний связей карбонила $\text{C}=\text{O}$ в β -лактаманной группировке и карбоксильной группе ЦФТ. Это свидетельствует о присутствии ЦФТ в продукте его комплексообразования с ХТЗ. Отмечается исчезновение полосы 1318 см^{-1} , соответствующей симметричным деформационным колебаниям NH_3^+ -группы ХТЗ. Сдвиг полос поглощения в области валентных колебаний $\text{O}-\text{H}$ - и $\text{N}-\text{H}$ -связей могут указывать на образование водородных связей между функциональными группами ЦФТ и ХТЗ [150].

Для выявления механизма связывания ЦФТ с ХТЗ были проведены квантово-химические расчеты равновесной геометрии, колебательного спектра комплекса ЦФТ–ХТЗ, а также энергетических характеристик процесса комплексообразования. Для моделирования было использовано одно мономерное звено протонированного хитозана (ХТЗ^+), в котором к протонированной группе NH_3^+ присоединяли хлорид-ион ($\text{ХТЗ}^+\text{Cl}^-$). Расчет термодинамических характеристик комплексообразования проводили, определяя разницы между суммой энергетических характеристик комплекса ЦФТ–ХТЗ, изолированной молекулы HCl и суммой характеристик изолированных молекул $\text{ХТЗ}^+\text{Cl}^-$ и ЦФТ. В результате были получены следующие термодинамические характеристики образования комплекса ЦФТ–ХТЗ: $\Delta H_{298}^0 = -41,0$ кДж/моль, $\Delta G_{298}^0 = -31,3$ кДж/моль и $\Delta E_{\text{комп}} = -41,1$ кДж/моль. Уменьшение энтальпии, энергии Гиббса и энергии образования комплекса указывает на самопроизвольность процесса комплексообразования.

На рисунке 4.6 представлена оптимизированная геометрия комплекса ЦФТ–ХТЗ. В рассчитанной геометрии комплекса присутствуют водородные связи, образованные между атомами кислорода ЦФТ и атомами водорода NH_3^+ - и OH^- -групп ХТЗ^+ . Геометрические параметры этих связей соответствуют критериям образования водородных связей, в число которых входит расстояние между атомами кислорода и водорода ($< 2,5$ Å), а также угол $\text{O}-\text{H}\dots\text{O}$ ($> 140^\circ$). Согласно результатам расчета, на колебательном спектре комплекса ЦФТ–ХТЗ присутствует полоса колебаний $\text{N}-\text{H}$ -связи 806 см^{-1} (805 см^{-1} на экспериментальном спектре), что также можно рассматривать в качестве подтверждения комплексообразования ХТЗ с ЦФТ [150].

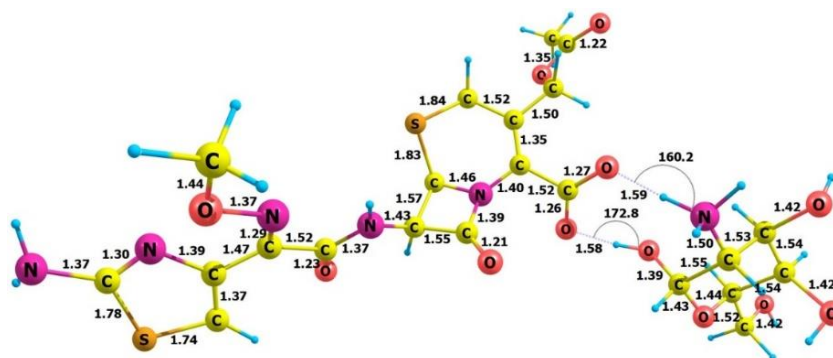


Рисунок 4.6 – Оптимизированная геометрия комплекса ЦФТ–ХТЗ (длины связей в Å, углы в градусах)

В процессе образования ПЭК ХТЗ с альгинатом натрия в присутствии ЦФТ наличие реакционноспособных карбоксильных и аминотиазольных групп в молекуле лекарственного вещества обеспечивает возможность его взаимодействия как с ХТЗ, так и с АЛГ-Na. Поэтому при разработке систем доставки ЦФТ на основе данных полисахаридов необходимо учитывать весь комплекс конкурирующих межмолекулярных взаимодействий в системе «ХТЗ–АЛГ–ЦФТ–Н₂О».

Комплексообразование АЛГ-Na с ЦФТ в водных средах возможно за счет ионного взаимодействия протонированных аминотиазольных групп ЦФТ с карбоксильными группами альгината. На рисунке 4.7 показано влияние АЛГ-Na на спектр поглощения раствора антибиотика при pH 5,6. Альгинат, как и ХТЗ, не поглощает в УФ-области (кривая 1). В присутствии полимера в спектре раствора ЦФТ сохраняются полосы поглощения, характерные для слабокислых растворов (кривая 2), но отмечается гиперхромный эффект, который может указывать на связывание компонентов. При других значениях pH (2,0 и 7,2) в электронных спектрах смешанных растворов ЦФТ–АЛГ отмечаются те же изменения, что и для индивидуального ЦФТ при данных pH [153].

Изомолярные кривые для системы ЦФТ–АЛГ в кислых средах (рисунок 4.8, кривые 1, 2) имеют сильно асимметричную форму и более крутой уклон в области высоких концентраций ЦФТ. В отличие от системы ЦФТ–ХТЗ, комплексы антибиотика с АЛГ обогащены ЦФТ. При pH 2,0 состав комплексов соответствует молярному соотношению [ЦФТ] : [АЛГ] = 4,0 : 1,0, при pH 5,6 – 2,3 : 1,0. Следует отметить, что в средах, близких к нейтральным (pH 7,2, кривая 3), формируется комплекс стехиометрического состава. В слабокислой и нейтральной средах устойчивость

комплексов низкая (при pH 5,6 $\beta_k=4,0 \cdot 10^5$ л/моль, при pH 7,2 – $2,1 \cdot 10^5$ л/моль). Наиболее устойчивый комплекс ЦФТ–АЛГ образуется в кислой среде ($\beta_k=6,5 \cdot 10^6$ л/моль).

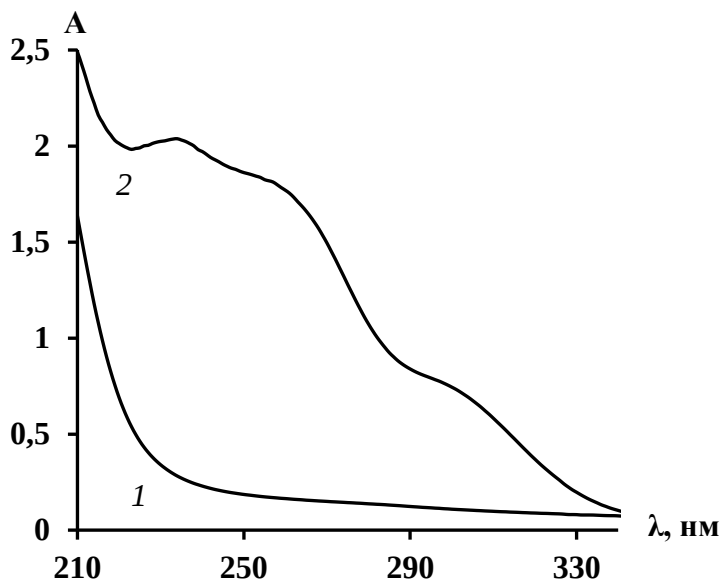


Рисунок 4.7 – Спектры поглощения растворов АЛГ-Na (1) и комплекса ЦФТ–АЛГ (2) при pH 5,6 ($c_{\text{ЦФТ}} = 50$ мкг/мл, $[\text{ЦФТ}] : [\text{АЛГ}] = 1$)

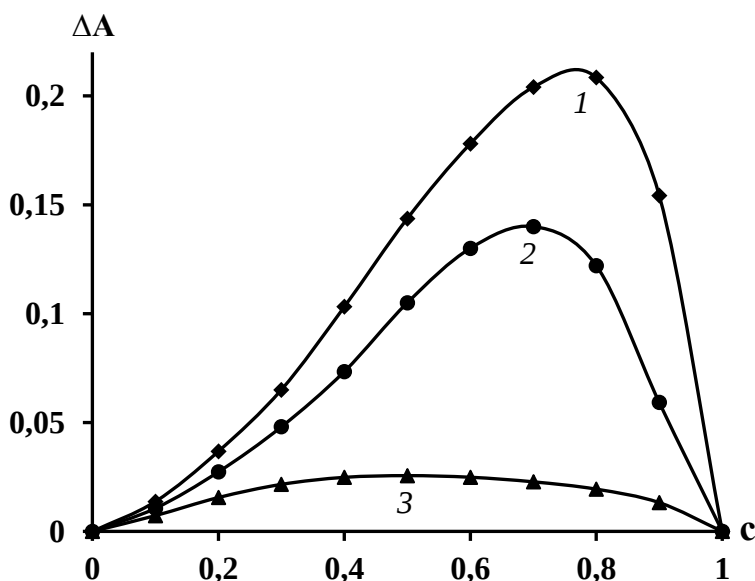


Рисунок 4.8 – Изомолярные кривые для системы ЦФТ–АЛГ при pH 2,0 (1), 5,6 (2) и 7,2

$$(3) \quad c = \frac{[\text{ЦФТ}]}{[\text{ЦФТ}] + [\text{АЛГ}]}; \lambda = 262 \text{ нм})$$

Во всех исследованных средах наблюдается уменьшение электропроводности смешанных растворов ЦФТ и АЛГ, что указывает на образование ионных связей. На изотермах электропроводности смесей антибиотика и полиэлектролита, как и в случае

ХТЗ, обнаруживаются перегибы, которые отвечают образованию комплексов с максимальным количеством таких связей. Наибольшее изменение удельной электропроводности в процессе взаимодействия ЦФТ с АЛГ наблюдается в растворах с рН 2,0, в которых складываются наиболее благоприятные условия для электростатического взаимодействия ЦФТ, находящегося при данном рН в виде катиона, и макроаниона АЛГ. Данные кондуктометрии согласуются с результатами, полученными методом УФ-спектроскопии.

Подтверждением электростатического характера взаимодействия ЦФТ с АЛГ служат и данные метода динамического рассеяния света, отражающие значения ζ -потенциала комплексов ЦФТ–АЛГ при рН 2,0 и 5,6 (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – ζ -потенциал комплексов ЦФТ–АЛГ

Молярное соотношение [ЦФТ] : [АЛГ], (моль : моль)	рН 2,0	рН 5,6
	ζ , мВ	ζ , мВ
0	–5,4	–17,7
0,5	+6,2	–25,4
1,0	+9,8	–27,6
1,5	+15,4	–31,1
4,0	+18,7	–31,4

Как видно из таблицы, в кислой среде ζ -потенциал макроиона АЛГ значительно меньше, чем при рН 5,6, что обусловлено протонированием карбоксильных групп альгината. Введение ЦФТ в раствор альгината при рН 2,0 приводит к закономерному снижению ζ -потенциала комплекса за счет компенсации зарядов противоположно заряженных функциональных групп полиэлектролита и антибиотика. Полная нейтрализация карбоксильных групп АЛГ протонированными аминотиазольными группами ЦФТ и последующее изменение знака ζ -потенциала комплекса отмечается при малом содержании антибиотика ([ЦФТ] : [АЛГ] = 0 ÷ 0,5). В слабокислой среде наблюдается иная зависимость – при введении в раствор анионного полиэлектролита ЦФТ происходит уменьшение ζ -потенциала. При рН 5,6 ЦФТ присутствует в растворе в виде цвиттер-иона и не вовлеченные в процесс комплексообразования карбоксильные

группы, по-видимому, вносят свой вклад в отрицательный заряд частиц комплекса. Наличие одноименных зарядов на макроцепи и у ЦФТ затрудняет его диффузию в объем макроклубка для образования ионных связей между карбоксильными группами АЛГ и аминотиазольными группами ЦФТ [153].

Сравнительный анализ ИК-спектра комплекса ЦФТ–АЛГ (рисунок 4.9) со спектрами ЦФТ (рисунок 4.5 а) и АЛГ-Na (рисунок П2) показал появление в спектре комплекса полосы поглощения 1768 см^{-1} , характерной для колебаний связей C=O в β -лактамной группировке ЦФТ. В спектре комплекса также отмечается смещение полос ассиметричных и симметричных валентных колебаний карбоксильных групп АЛГ относительно их положения в спектре индивидуального полиэлектролита ($1612 \rightarrow 1629\text{ см}^{-1}$, $1416 \rightarrow 1434\text{ см}^{-1}$).

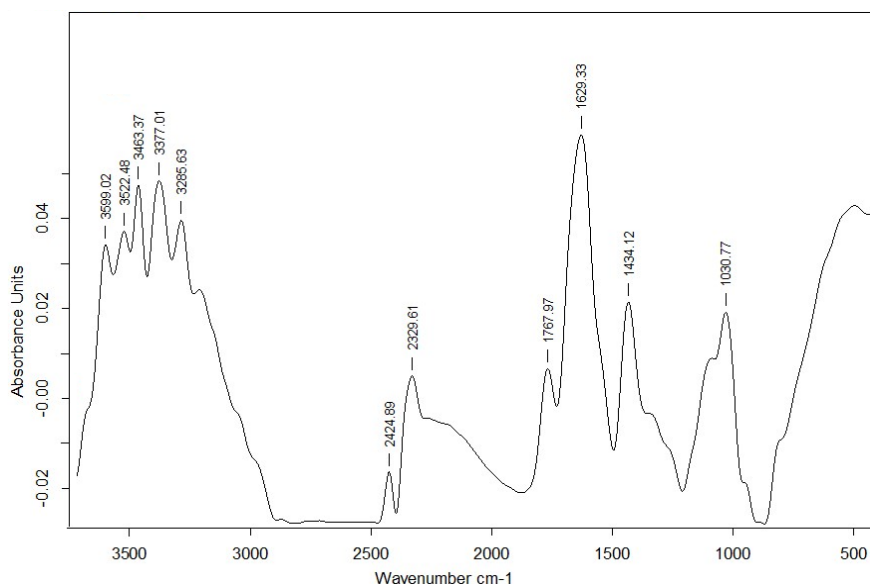


Рисунок 4.9 – ИК-спектр комплекса ЦФТ–АЛГ, выделенного из водного раствора при pH 5,6

Отмеченные батохромные сдвиги могут быть вызваны заменой катиона Na^+ на катион ЦФТ. Сдвиг полос поглощения в области валентных колебаний O-H - и N-H -связей свидетельствуют об образовании межмолекулярных водородных связей между компонентами системы.

Таким образом, комплексы цефотаксима с ХТЗ и АЛГ демонстрируют pH-зависимый характер образования за счет электростатических взаимодействий

функциональных групп антибиотика и полиэлектролитов. Дополнительной стабилизации комплексов способствуют водородные связи.

4.2 Взаимодействие ванкомицина с хитозаном

Ванкомицин – это гликопептидный трициклический антибиотик с длительным бактерицидным эффектом, обладающий широким спектром активности в отношении аэробных грамположительных бактерий, таких как стафилококк, стрептококк, энтерококк. ВНЦ применяется для лечения инфекционных заболеваний тяжелого течения при непереносимости или неэффективности терапии другими антибиотиками, включая пенициллины или цефалоспорины. Активно включается в состав временных эндопротезов при возникновении воспалений в ходе протезирования коленных и тазобедренных суставов [154]. Особенностью ВНЦ является то, что он имеет узкое терапевтическое окно (эффективная концентрация близка к токсической). Недостаточная концентрация антибиотика может приводить к развитию бактериальной резистентности, а слишком высокая концентрация приводит к неблагоприятным воздействиям на организм человека (нефротоксичность, ототоксичность, гипотония, флебит, реакции гиперчувствительности) [155]. Вместе с тем, последние годы его клиническое использование неуклонно возрастает, несмотря на споры относительно развития бактериальной устойчивости и системной токсичности. Поэтому для данного антибиотика очень актуальна разработка многофункциональных систем доставки, которые бы обеспечивали возможность контролируемого пролонгированного высвобождения и одновременной визуализации его накопления и распределения в тканях организма человека в режиме реального времени. Для достижения этой цели предварительно были исследованы межмолекулярные взаимодействия ВНЦ с ХТЗ, а также связывание антибиотика с полупроводниковыми квантовыми точками «ядро-оболочка» CdS/ZnS и CdS/ZnS, допированные ионами марганца (II).

ВНЦ имеет характерный широкий пик поглощения при 270-290 нм ($\lambda_{\text{max}} = 280$ нм) и спектр люминесценции с пиком при 340 нм (рисунок 4.10). Из рисунка видно, что при последовательном увеличении концентрации ВНЦ до 500-1000 мкг/мл наблюдается рост оптической плотности и концентрационное тушение люминесценции. Смещения максимумов поглощения и эмиссии с изменением концентрации антибиотика не

отмечается. В присутствии ХТЗ форма спектров поглощения ВНЦ сохраняется, но для всех изученных концентраций ВНЦ при этом наблюдается гиперхромный эффект (рисунок 4.11) [156, 157].

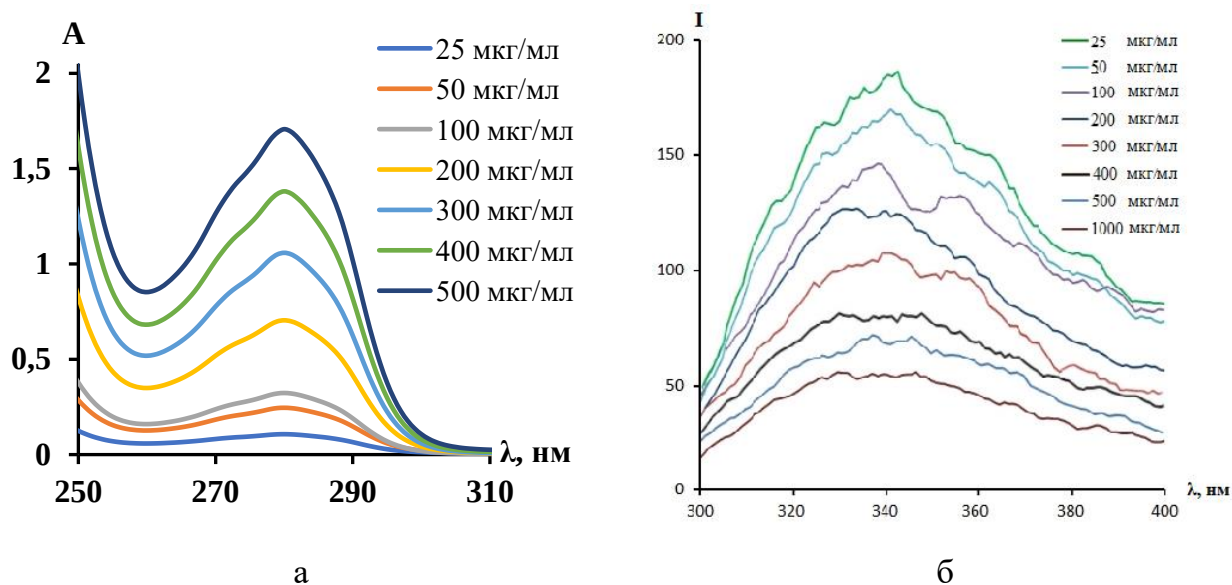


Рисунок 4.10 – Спектры поглощения (а) и люминесценции (б) ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм) водных растворов ВНЦ при различных концентрациях

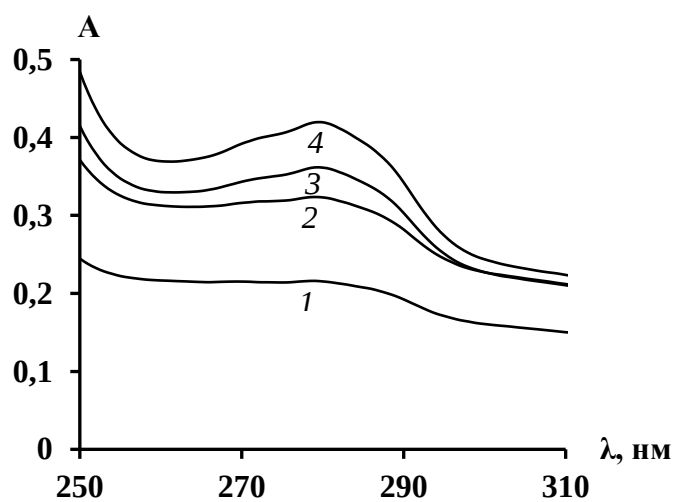
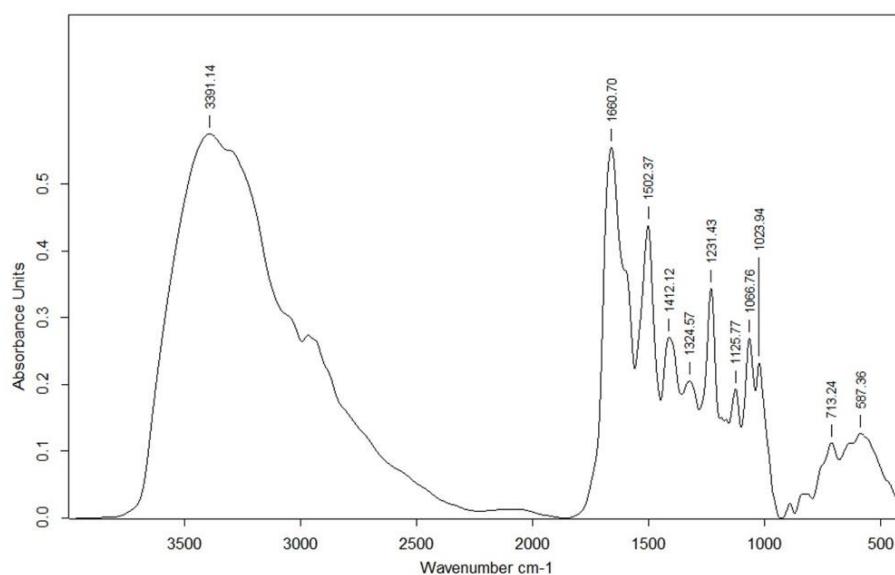


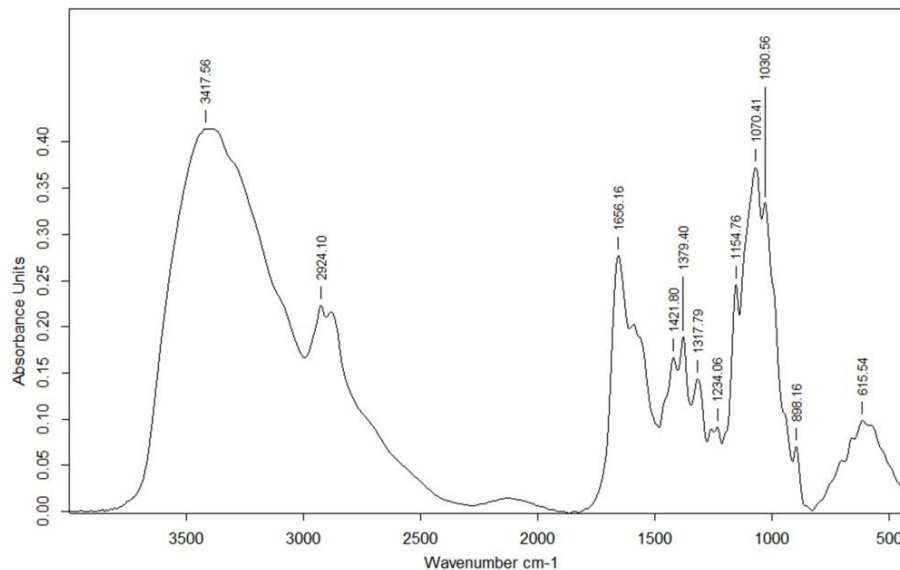
Рисунок 4.11 – Спектры поглощения водных растворов ВНЦ (25 $\mu\text{g/mL}$) различной концентрации в присутствии ХТЗ: 1 – 20; 2 – 30; 3 – 40; 4 – 50 мг/мл

ИК-спектр ВНЦ подтверждает его сложную структуру, характерную для гликопептидов с углеводными фрагментами, ковалентно связанными с боковыми цепями аминокислотных остатков (рисунок 4.12 а). В спектре присутствуют

интенсивные полосы колебаний, характерные для аминокислот и углеводов: $\nu_{\text{O-H}}$ и $\nu_{\text{N-H}}$ ($3700\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, с максимумом 3391 см^{-1}), $\nu_{\text{C-H}}$ ($3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$), «Амид II» (1661 см^{-1}), $\nu_{\text{C-C}}$ ароматического кольца (1502 см^{-1}), $\nu_{\text{C=O}}$ карбоксилат-аниона (1412 см^{-1}), $\delta_{\text{O-H}}$ в фенольной группе (1231 см^{-1}) и $\nu_{\text{C-C}}$, $\nu_{\text{C-O}}$ пиранозных колец ($1200\text{--}1000\text{ см}^{-1}$).



а



б

Рисунок 4.12 – ИК-спектры ВНЦ (а) и комплекса ВНЦ–ХТЗ (б)

В ИК-спектрах смешанных систем ХТЗ с ВНЦ (рисунок 4.12 б) присутствует полоса поглощения $1650\text{--}1660\text{ см}^{-1}$, отнесенная к деформационным колебаниям связей N–H в пептидах («Аминокислотная полоса I»). Появление в спектре полосы при 1234 см^{-1}

см⁻¹, отсутствующей в ИК-спектре ХТЗ, которая была отнесена нами к фенольным гидроксилам ВНЦ, указывает на его присутствие в продукте их взаимодействия. Сдвиг полосы поглощения в области валентных колебаний О–Н- и N–Н-связей (3391 → 3418 см⁻¹) может служить косвенным доказательством взаимодействия функциональных групп ВНЦ и ХТЗ посредством водородных связей [158].

4.3 Взаимодействие красителя флуоресцеина с хитозаном

Флуороновые красители широко применяются в медицине в качестве контрастных агентов для исследования биологических объектов, диагностики и лечения раковых опухолей [159]. Дианион-анионное равновесие ксантенового красителя флуоресцеина приходится на физиологический диапазон pH, поэтому он может выступать в роли pH-индикатора, и это обуславливает его применение в качестве внутриклеточного pH-зонда [160].

ХТЗ содержит функциональные группы разной полярности, что позволяет активно управлять их связыванием с органическими красителями. Интерес к исследованиям совместных систем на основе красителей и природных полисахаридов обусловлен и тем, что флуороновые красители можно использовать в качестве флуоресцентных зондов для биовизуализации, а также они могут выступать в качестве модели отрицательно заряженных лекарственных веществ.

Заряд ФЛЦ в водных растворах определяется уровнем pH среды. При pH ниже 5,5 краситель несет слабый положительный заряд, в диапазоне pH 5,5–6,8 он находится в нейтральной форме. В интервале pH 6,8–8,0 ФЛЦ становится слабым моноанионом, а при еще более высоких значениях pH – дианионом с высоким отрицательным зарядом [160]. Поэтому основным механизмом его связывания с ХТЗ является электростатическое взаимодействие карбоксильных групп ФЛЦ с протонированными аминогруппами ХТЗ в средах, близких к нейтральным. Дополнительно могут присутствовать диполь-дипольные взаимодействия amino- и гидроксильных групп ХТЗ с ксантоновым трициклическим фрагментом ФЛЦ, а также гидрофобные взаимодействия глюкозаминowych звеньев полимера с неполярными участками молекул ФЛЦ.

Исследования, проведенные методом динамического рассеяния света (таблица 4.2), показали, что в смешанных водных растворах ФЛЦ и ХТЗ формируются частицы размером

430-710 нм, что достаточно сильно превышает размер исходных частиц ХТЗ. Как следует из таблицы, с ростом рН среды размер частиц увеличивается, что, по-видимому, обусловлено различиями в сорбционной способности ХТЗ по отношению к ФЛЦ в зависимости от рН. ζ -потенциал частиц ФЛЦ–ХТЗ составляет менее 30 мВ, что говорит о недостаточной электростатической стабильности водной суспензии. Наиболее эффективное связывание ФЛЦ хитозаном за счет электростатического взаимодействия наблюдается при рН 7,0, т.е. в той области, где функциональные группы ФЛЗ и ХТЗ имеют слабые противоположные заряды и отмечается наибольшая компенсация их зарядов.

Таблица 4.2 – Размер и ζ -потенциал частиц ФЛЦ–ХТЗ*

Образец	Размер d, нм	ζ -потенциал, мВ
ФЛЦ–ХТЗ (рН 2,0)	$430,4 \pm 8,61$	+17,0
ФЛЦ–ХТЗ (рН 5,6)	$598,6 \pm 11,97$	+15,2
ФЛЦ–ХТЗ (рН 7,0)	$708,3 \pm 14,17$	+7,4

* Концентрации компонентов в смеси: $c_{\text{ФЛЦ}} = 20$ мкг/мл, $c_{\text{ХТЗ}} = 12,5$ мМ

На рисунке 4.13 представлено изображение частиц ФЛЦ–ХТЗ, полученное на люминесцентном микроскопе (рН 7,0). Результат определения размеров частиц согласуются с данными метода динамического рассеяния света [161].

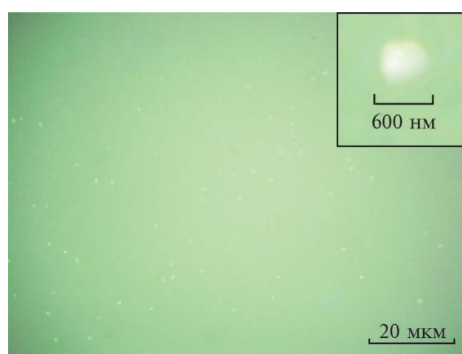


Рисунок 4.13 – Изображения частиц ФЛЦ–ХТЗ при рН 7,0, полученные на люминесцентном микроскопе ($c_{\text{ФЛЦ}} = 20$ мкг/мл, $c_{\text{ХТЗ}} = 12,5$ мг/мл)

Связывание ФЛЦ с ХТЗ и комплексом ХТЗ–КРГ изучали на основе анализа изменений спектров поглощения и флуоресценции красителя при добавлении биополимера. В электронном спектре водного раствора ФЛЦ (рисунок 4.14, кривая 1) при рН 7,0 наблюдается интенсивная полоса поглощения 490 нм и перегиб при 470 нм, что отвечает существованию ФЛЦ в растворе в форме дианиона R^{2-} и согласуется с данными литературных источников [159].

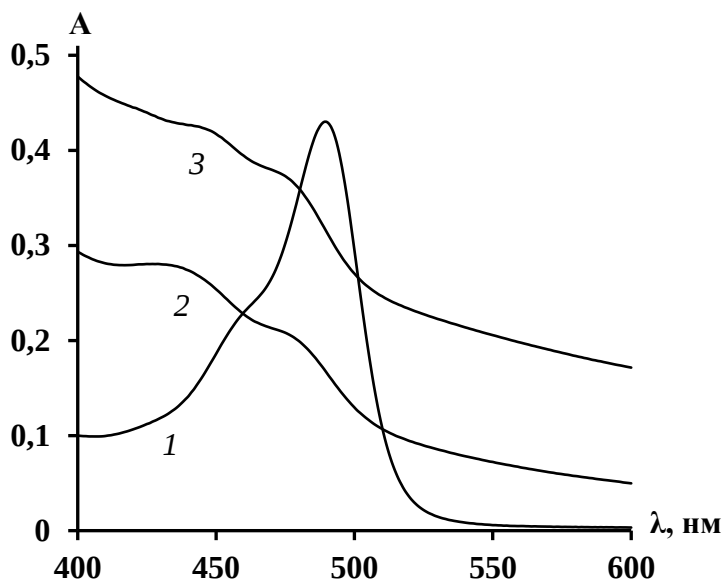
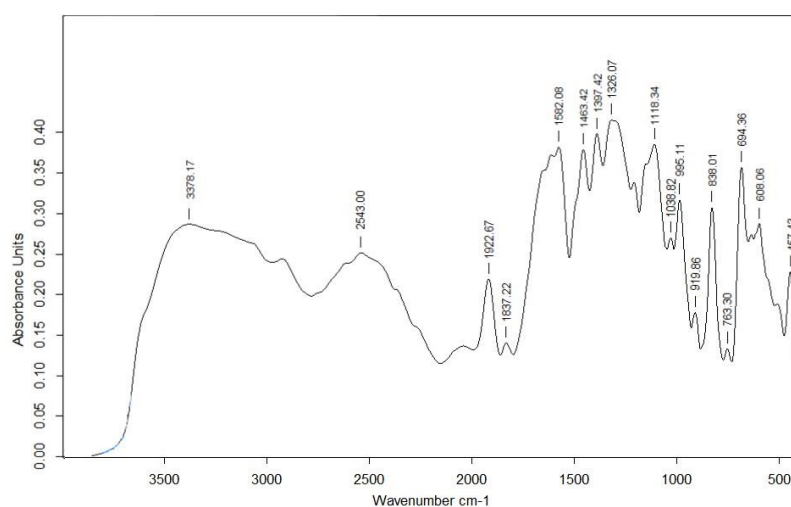


Рисунок 4.14 – Спектры поглощения растворов ФЛЦ (1) в присутствии ХТЗ (2) и ПЭК ХТЗ–КРГ (3) ($c_{\text{ФЛЦ}} = 20$ мкг/мл, $c_{\text{ХТЗ}} = 12,5$ мг/мл, отношение концентраций в ПЭК [КРГ] : [ХТЗ] = 1,5; рН 7,0)

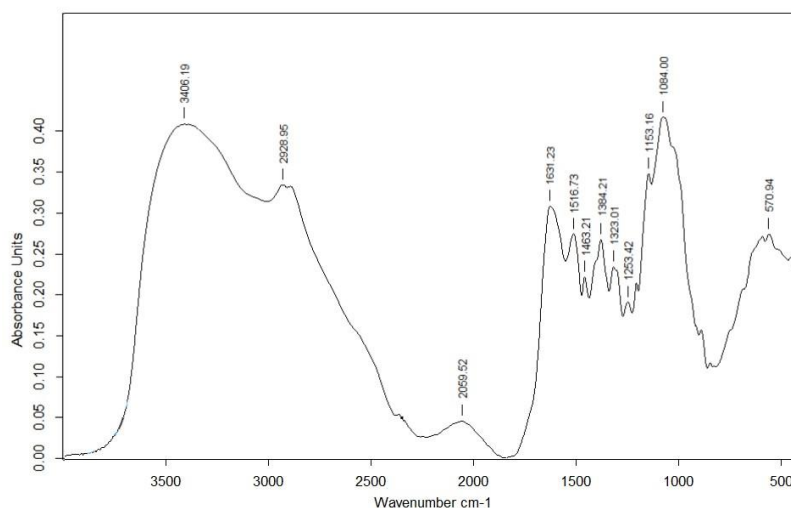
Спектр поглощения раствора ФЛЦ, связанного с ХТЗ (кривая 2), существенно отличается от спектра раствора исходного красителя – с добавлением ХТЗ появляется широкая полоса с двойным максимумом в области 455-475 нм и плечом при 425 нм, что характерно для анионной формы HR^- ФЛЦ в воде. Причиной такого изменения в спектре ФЛЦ может являться присутствие красителя в растворе в виде различных ионных свободных и связанных форм. Похожие по характеру спектральные изменения для ФЛЦ наблюдаются и в результате его адсорбции на частицах ПЭК (кривая 3) [162].

Константа устойчивости комплексов ФЛЦ–ХТЗ, полученная по данным метода мольных соотношений, при рН 2,0 составила $6,5 \cdot 10^6$ л/моль, при рН 5,6 – $4,0 \cdot 10^5$ л/моль, а при рН 7,0 – $2,1 \cdot 10^5$ л/моль. В слабокислых и нейтральных средах константа устойчивости β_k меньше 10^6 , что свидетельствует о низкой стабильности этих комплексов.

Комплексообразование ФЛЦ с ХТЗ изучено методом ИК-спектроскопии (рисунок 4.15). В спектре ФЛЦ присутствует полоса поглощения $3700\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ с максимумом при 3378 см^{-1} , которая характерна для валентных колебаний ОН-групп. ИК спектр образца не содержит признаков лактонной структуры, так как отсутствуют полосы поглощения в области $1800\text{--}1600\text{ см}^{-1}$, относящиеся к валентным колебаниям карбонильной группы лактона. Полосы карбоксилат-аниона COO^- ($1582, 1463, 1397\text{ см}^{-1}$), по-видимому, перекрываются поглощением ароматических колец. Присутствует полоса 1250 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям связи С-О в фенольной группе.



а



б

Рисунок 4.15 – ИК-спектры ФЛЦ (а) и комплекса ФЛЦ–ХТЗ (б)

В ИК-спектре комплекса ФЛЦ с ХТЗ, выделенного из водного раствора, присутствуют полосы при 1631 см^{-1} (деформационные колебания NH_2 -группы) и 1517

cm^{-1} (NH_3^+ -группы). Появляются полосы 1463 и 1253 cm^{-1} , что может свидетельствовать о присутствии в структуре продукта взаимодействия карбоксилат-анионов и фенольных гидроксильных ФЛЦ. Можно предположить, что отмеченные изменения в спектре вызваны ионным взаимодействием функциональных групп ФЛЦ и ХТЗ. Наблюдается также сдвиг полос поглощения в области валентных колебаний $\text{O}-\text{H}$ - и $\text{N}-\text{H}$ -связей (максимум при 3406 cm^{-1}).

Далее изучали влияние присутствия ХТЗ на флуоресцентные свойства красителя (рисунок 4.16). Раствор ФЛЦ обладает желто-зеленой люминесценцией, имеет эмиссию при 510 nm , что делает его подходящим оптическим зондом для визуализации процессов в организме человека. Форма спектров флуоресценции красителя и положение максимума не изменяются в присутствии ХТЗ. Однако наблюдается значительное снижение интенсивности флуоресценции ФЛЦ, по-видимому, за счет межмолекулярных взаимодействий красителя и ХТЗ [163].

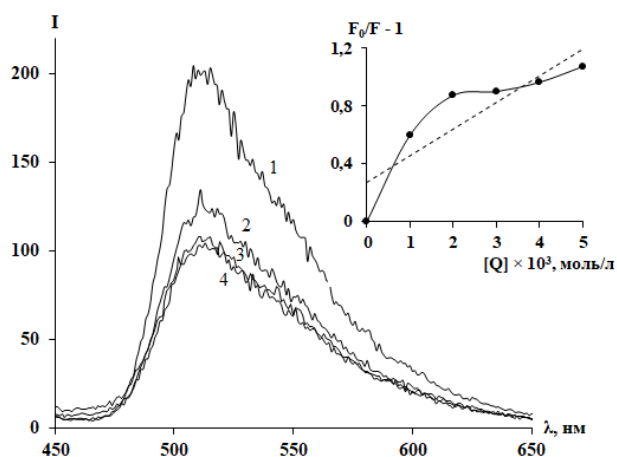


Рисунок 4.16 – Спектры флуоресценции ФЛЦ (3 мкмоль/л) (1) в растворах с различными концентрациями ХТЗ: 1 (2), 3 (3), 5 (4) мг/мл ;

вставка – графики в координатах Штерна–Фольмера

На основе анализа спектров флуоресценции растворов ФЛЦ с разными концентрациями ХТЗ были построены графики зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации тушителей в координатах Штерна–Фольмера $F_0/F - 1$ от $[Q]$ (вставка на рисунке 4.16) [164]. Данная зависимость представляет собой прямую линию с наклоном K , в случае одного механизма взаимодействия тушителя с

люминофором, а при наличии нескольких механизмов связывания наблюдаются отклонения от линейности [136, 165]. Из графиков видно, что зависимость $F_0/F - 1 = f [Q]$ при тушении флуоресценции ФЛЦ хитозаном имеет отклонение от линейности, что указывает на различные механизмы связывания красителя. Эффективная константа связывания ФЛЦ с ХТЗ (усредненно учитывающая все механизмы связывания) составила 186 л/моль.

4.4 Характеризация квантовых точек CdS/ZnS и CdS/ZnS, допированных ионами Mn (II), и их взаимодействие с ванкомицином

В разделе 4.2 отмечалось, что антибиотик ванкомицин имеет узкое терапевтическое окно. Существующие на сегодняшний день методы обнаружения данного антибиотика позволяют определять сверхмалые его концентрации в узком диапазоне и предназначены в основном для исследования концентрации в плазме крови и моче [166]. Среди методов обнаружения ВНЦ можно выделить такие методы как спектрофотометрия, вольтамперометрия, жидкостная хроматография высокого давления, флуоресцентно-поляризационный иммуноанализ, радиоиммуноанализ, иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографический анализ (ИХА), масс-спектрометрия и др. [167]. Применение каждого из этих методов имеет как достоинства, так и ряд недостатков. Например, хроматографические методы имеют высокую чувствительность и специфичность, однако требуют сложной пробоподготовки и дорогостоящего оборудования. Отсутствие простых, лишенных недостатков методов обнаружения ВНЦ существенно ограничивает его практическое применение.

Важным свойством ВНЦ является его способность к тушению излучения люминофоров. Как отмечалось выше, в качестве наносенсоров широко используются полупроводниковые КТ, которые особенно привлекательны для биовизуализации благодаря тому, что их оптические свойства можно варьировать путем изменения размера частиц и их конфигурации. К безусловным достоинствам КТ можно отнести также высокий квантовый выход, низкое фотообесцвечивание и устойчивость к химической деградации [168]. Применение КТ в качестве люминесцентного зонда может обеспечить необходимую точность, чувствительность и экспрессность определения концентрации ВНЦ, а также позволит распространить аналитический

метод обнаружения ВНЦ по тушению люминесценции на исследования других биологических жидкостей, фармацевтических препаратов, образцов сточных вод больниц и водоемов.

Использование КТ для обнаружения ВНЦ в различных средах находится в начале пути и представлено только отдельными публикациями. В качестве наночастиц использованы КТ на основе CdTe [169] и углеродные КТ [170]. Однако применение оригинальных КТ, модифицированных ионами переходных металлов, с улучшенными фотолюминесцентными свойствами, может способствовать увеличению чувствительности и специфичности обнаружения ВНЦ. Следует отметить также, что работы по обнаружению ВНЦ с помощью КТ ограничены исследованиями в узком диапазоне концентраций антибиотика и в них уделено недостаточное внимание природе тушения люминесценции полупроводниковых наноструктур. Поэтому было проведено детальное исследование межмолекулярных взаимодействий ВНЦ с КТ CdS/ZnS и CdS/ZnS, допированными ионами марганца (II), комплексом экспериментальных и теоретических методов [156, 171, 172].

КТ «ядро-оболочка» CdS/ZnS получали коллоидным методом синтеза [129]. Синтезированные наночастицы сульфида кадмия с оболочкой сульфида цинка имеют узкую полосу интенсивной люминесценции в синей области спектра электромагнитного излучения при 464 нм (рисунок 4.16 а). Варьируя условия синтеза, можно регулировать размер частиц и, соответственно, положение полос излучения в пределах 420-470 нм. Ширина полосы люминесценции на полувысоте составила порядка 25 нм, что характерно для наночастиц CdS. Как видно из рисунка, при длине волны 630 нм обнаруживается слабо выраженная полоса люминесценции дефектов кристаллической решетки.

КТ CdS/ZnS демонстрируют интенсивную полосу поглощения в ближней УФ-области спектра (рисунок 4.17 а). Экситонные пики поглощения не выражены и поэтому были определены через вторую производную и составили для полученных образцов КТ 455 нм, что, согласно эмпирическому полиному, выведенному в [173], соответствует размеру 4,98 нм. Гидрофилизация КТ CdS/ZnS приводит к изменению их люминесцентных свойств (рисунок 4.17 б). Пик с максимумом на 630 нм, отнесенный нами к излучению поверхностных дефектов, становится более интенсивным.

Средний гидродинамический размер синтезированных КТ с учетом размеров молекул стабилизатора – олеиновой кислоты и сольватной оболочки, определенный методом динамического рассеяния света, составил 10-11 нм, ζ -потенциал –22 мВ.

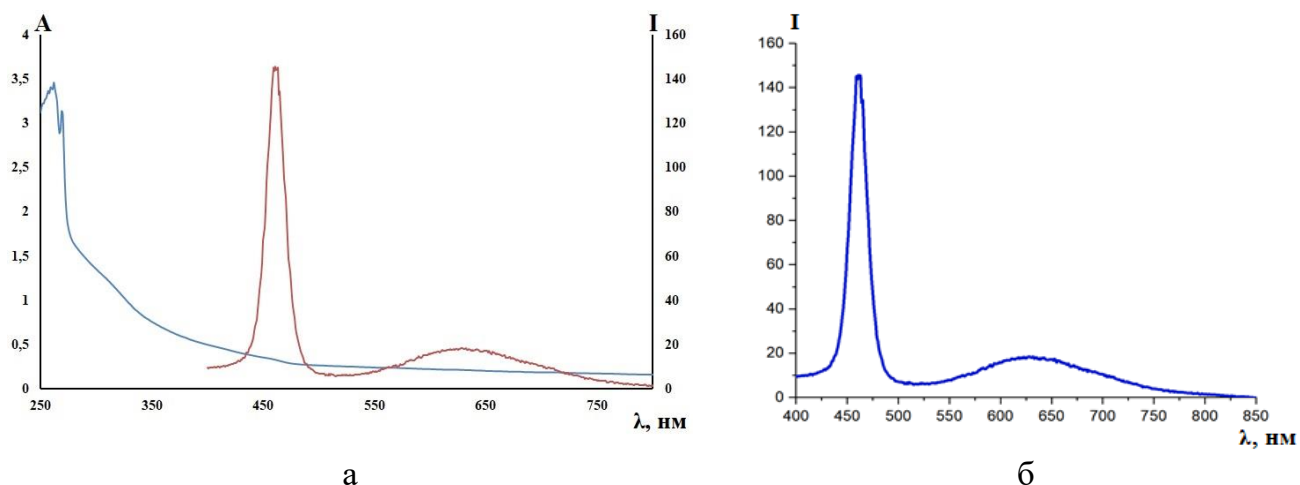
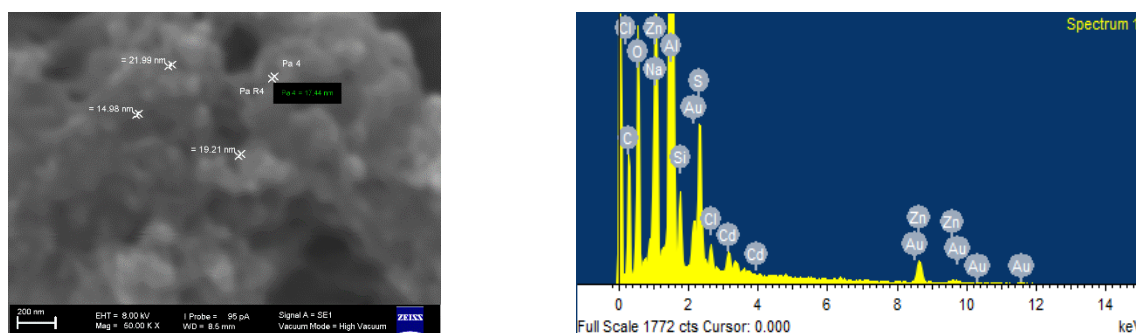


Рисунок 4.17 – Спектры поглощения (слева) и люминесценции (справа) дисперсий КТ CdS/ZnS в толуоле (а); спектр люминесценции КТ CdS/ZnS после гидрофилизации (б)

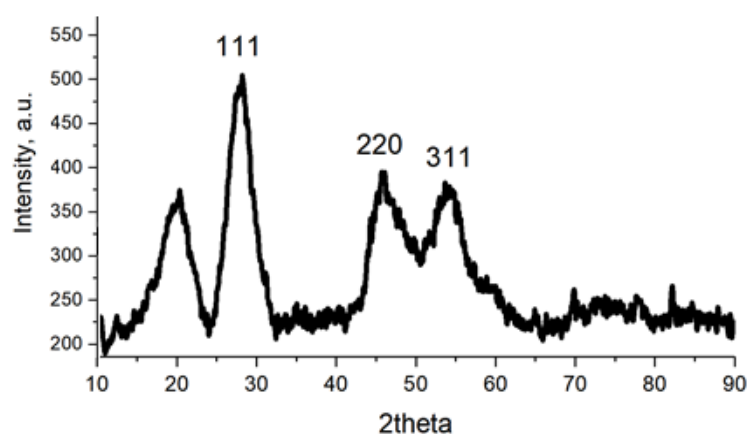
Анализ СЭМ-изображений КТ CdS/ZnS выявил присутствие наночастиц с размерами от 15 до 22 нм (рисунок 4.18 а), которые включают в свой состав кадмий, цинк и серу (рисунок 4.18 б). Данные рентгенодифракционного анализа (рисунок 4.18 в) подтверждают образование частиц, имеющих «ядра» CdS. КТ обладают кубической структурой кристаллической решетки типа цинковой обманки (сфалерита). Размер кристаллической ячейки, определенный по уравнению Дебая–Шеррера [174], составил 2 нм, что значительно меньше значений размеров КТ, полученных методом динамического рассеяния света и СЭМ. Вероятной причиной обнаруженного различия может являться отсутствие четкой границы между ядром и оболочкой КТ, а также формирование аморфного сплава CdZnS.

Люминесцентные свойства КТ CdS/ZnS после допирования ионами марганца (II), демонстрируют существенные отличия. Внедрение ионов Mn^{2+} приводит к созданию в электронной структуре КТ дополнительных энергетических уровней, что приводит к смещению полосы излучения и увеличению времени жизни возбужденного состояния.



а

б



в

Рисунок 4.18 – СЭМ-изображение (а), EDX-спектр (б) и рентгенодифрактограмма порошков (в) КТ CdS/ZnS

На рисунке 4.19 а приведены спектры флуоресценции и фосфоресценции КТ $\text{Cd}_{0.9}\text{Mn}_{0.1}\text{S}/\text{ZnS}$, стабилизированных олеиламином. Полоса фосфоресценции КТ расположена в желтой области спектра с пиком на длине волны 600 нм, что соответствует переходу между термами $4T^1$ и $6A^1$ ионов Mn^{2+} , находящихся в возбужденном состоянии [175]. Следует также отметить, что при длине волны 700 нм присутствует второй пик, соответствующих люминесценции «ловушек», возникающих при образовании дефектов на поверхности наночастиц. Во флуоресцентном режиме вклад люминесценции поверхностных дефектов кристаллической решетки имеет большую интенсивность, что приводит к слиянию двух полос в один широкий пик с серединой при 635 нм.

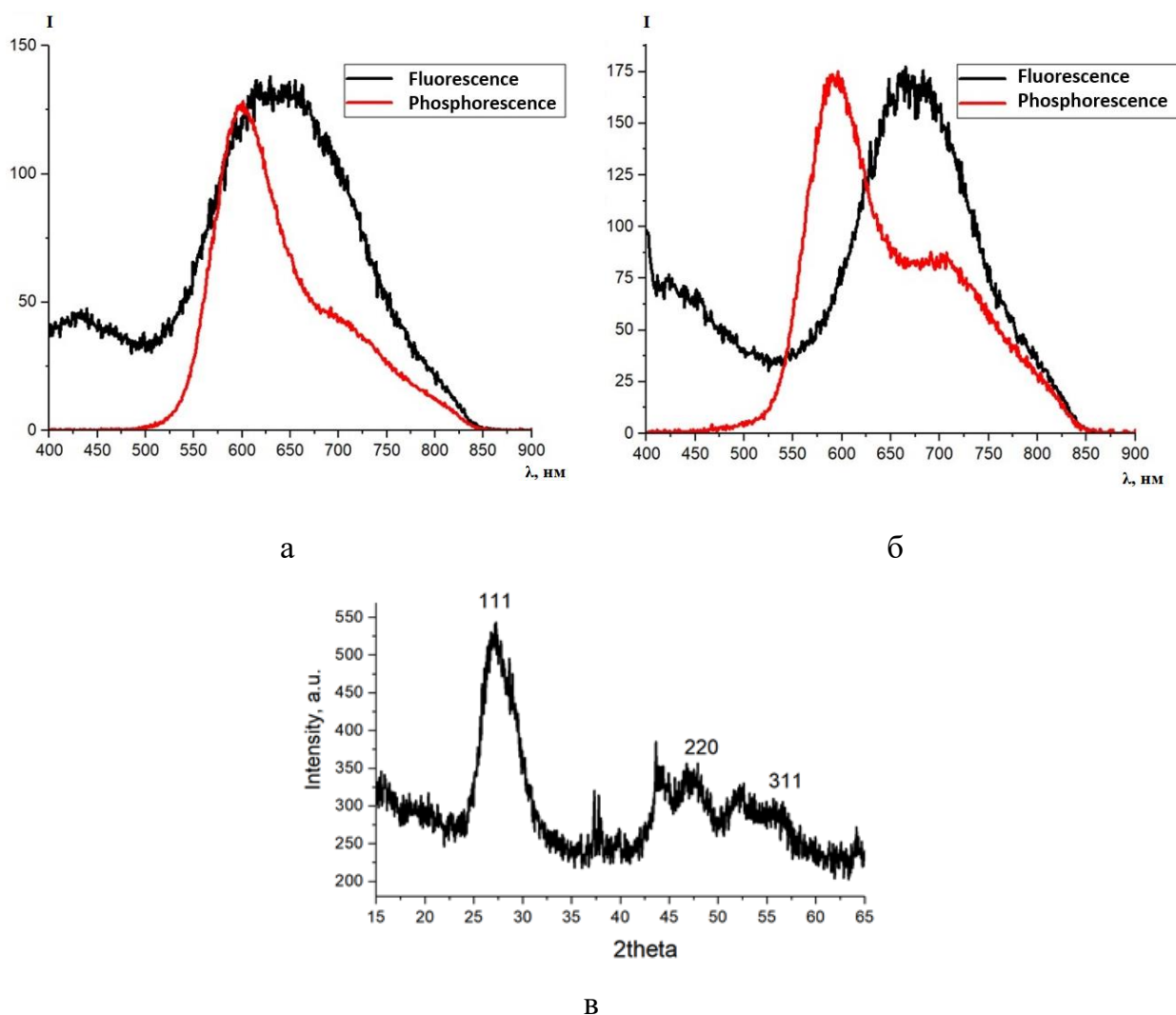


Рисунок 4.19 – Спектр люминесценции КТ Cd_{0.9}Mn_{0.1}S/ZnS, стабилизированных олеиламином (а); спектр люминесценции КТ после гидрофилизации меркаптопропионовой кислотой (б); рентгенодифрактограмма порошков КТ (в)

После гидрофилизации КТ Cd_{0.9}Mn_{0.1}S/ZnS происходит значительное изменение спектра флуоресценции, относительная интенсивность люминесценции дефектов возрастает, что приводит к смещению общего пика в красную область спектра с 635 до 680 нм (рисунок 4.19 б). КТ строения «ядро-оболочка» общей формулой Cd_{0.9}Mn_{0.1}S/ZnS также имеют кубическую структуру кристаллической решетки (рисунок 4.19 в). На дифрактограмме наблюдается рефлекс фазы ZnS при $2\theta = 52,4$, свидетельствующий об образовании оболочки. По виду дифрактограммы можно сделать вывод о том, что MnS и ZnS отдельной кристаллической фазы не формируют, что свидетельствует об их внедрении в общую структуру кристалла. Средний размер ячейки CdS, рассчитанный по уравнению Дебая–Шеррера, составил 4,08 нм.

По данным метода динамического рассеяния света средний гидродинамический размер гидрофилизированных КТ CdS/ZnS, допированных ионами Mn^{2+} , в коллоидном растворе равен 101 нм, что указывает на их сильную агрегацию. ζ -потенциал наночастиц Cd_{0,9}Mn_{0,1}S/ZnS по сравнению с КТ CdS/ZnS изменился незначительно и равен –23 мВ. Относительный квантовый выход полученных образцов КТ CdS/ZnS и Cd_{0,9}Mn_{0,1}S/ZnS составил 0,34 и 0,18 соответственно.

С целью выявления механизма взаимодействия ВНЦ с полученными образцами КТ изучено влияние добавок ВНЦ на размер и ζ -потенциал наночастиц CdS/ZnS и Cd_{0,9}Mn_{0,1}S/ZnS (таблица 4.3). Также проведен сравнительный анализ ИК-спектров синтезированных КТ и продуктов их взаимодействия с ВНЦ (рисунок 4.20) и квантово-химическое моделирование межмолекулярных взаимодействий в исследованных системах.

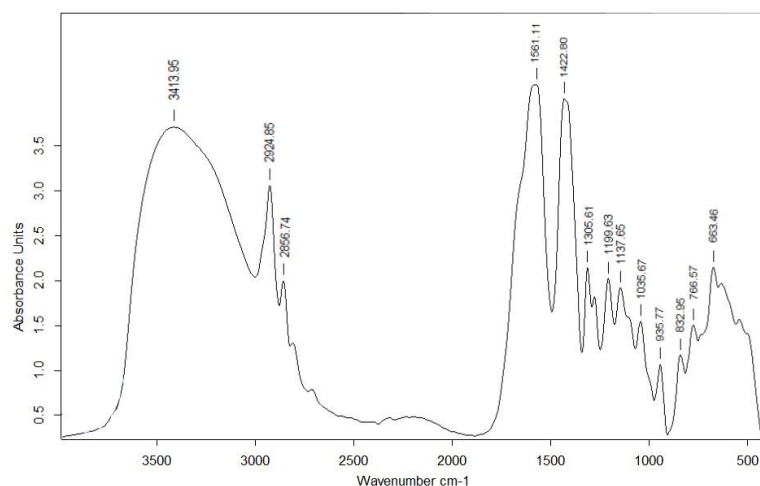
Таблица 4.3 – Средний размер и ζ -потенциал КТ CdS/ZnS и Cd_{0,9}Mn_{0,1}S/ZnS в присутствии ВНЦ

Система	Содержание ВНЦ, мкг/мл	Средний размер частиц d, нм	ζ -потенциал, мВ
CdS/ZnS (1,5 мг/мл) + ВНЦ	0	10,2	–22,0
	10	26,4	–26,0
	30	56,4	–24,9
	50	53,0	–27,9
	100	77,7	–28,4
	150	32,5	–24,0
Cd _{0,9} Mn _{0,1} S/ZnS (1,8 мг/мл) + ВНЦ	0	101,3	–23,2
	50	81,7	–25,6
	150	295,4	–22,7
	300	678,0	–34,5

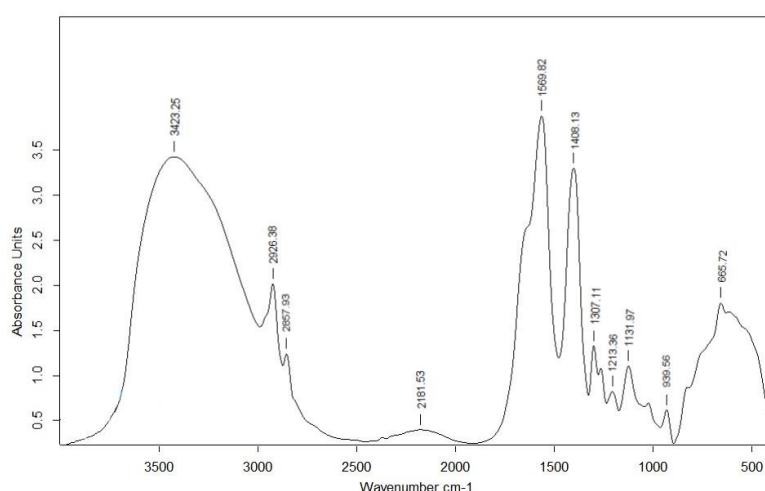
Установлено, что введение увеличивающихся по концентрации добавок ВНЦ в коллоидные растворы КТ обоих типов приводит к достаточно значительному увеличению размера наночастиц. ζ -потенциал КТ CdS/ZnS и Cd_{0.9}Mn_{0.1}S/ZnS в присутствии ВНЦ изменяется незначительно, что указывает на сохранение коллоидной стабильности КТ в присутствии антибиотика.

ИК-спектры КТ CdS/ZnS (рисунок 4.20 а) и Cd_{0.9}Mn_{0.1}S/ZnS демонстрируют интенсивные полосы поглощения, указывающие на высококристаллическую структуру образцов. Кубическая структура ZnS в КТ «ядро-оболочка» CdS/ZnS подтверждается наличием характерных пиков в дальней инфракрасной области (767, 664⁻¹ см, 550-450⁻¹ см). В случае наночастиц Cd_{0.9}Mn_{0.1}S/ZnS отмечаются сдвиги в положении полос в данной области (709, 607, 465⁻¹ см), что свидетельствует о структурных изменениях при допировании КТ CdS/ZnS ионами Mn (II), но сохранении кубической структуры ZnS. Вид спектров КТ обоих видов подтверждает также их гидрофилизацию меркаптопропионовой кислотой. В спектрах присутствует полоса поглощения 3700-3000 см⁻¹, соответствующая валентным колебаниям ОН-групп воды, адсорбированной КТ. Интенсивные полосы 1561 и 1423 см⁻¹ (1591, 1425 см⁻¹) обусловлены валентными колебаниями карбоксилат-аниона COO⁻. Колебание связи S–C подтверждается появлением полосы 833 см⁻¹.

Для спектров наночастиц CdS/ZnS и Cd_{0.9}Mn_{0.1}S/ZnS в присутствии ВНЦ (рисунок 4.20 б) характерно появление полос в диапазоне 1650-1660 см⁻¹, отнесенных к деформационным колебаниям связей N–H в пептидах («Аминокислотная полоса I»), и полосы при 1570 см⁻¹, связанной с деформационными колебаниями N–H-связи во вторичных амидах. Отмечается появление полос 1213, 1132 см⁻¹, соответствующих фенольным гидроксилам ВНЦ. Наблюдаются сдвиги полос поглощения в области колебаний O–H- и N–H-связей (3414→3423 см⁻¹, 3412→3386 см⁻¹).



а



б

Рисунок 4.20 – ИК-спектры КТ CdS/ZnS (а) и системы КТ CdS/ZnS–МПК–ВНЦ (б)

Для выявления механизма взаимодействия КТ с ВНЦ были проведены квантово-химические расчеты равновесной геометрии и колебательного спектра системы КТ CdS/ZnS–МПК–ВНЦ, а также энергетических характеристик процессов взаимодействия в данной системе [156].

Оптимизированная геометрия отдельной молекулы ВНЦ, полученная методом DFT (теория функционала плотности) с использованием функционала плотности CAM-B3LYP и базисного набора 6-31G(d,p) в программе Gaussian16, представлена на рисунке 4.21 а. Молекула ВНЦ имеет несколько аминогрупп, доступных для координации на поверхности КТ, покрытой молекулами поверхностного агента (ПА). Эти азотсодержащие функциональные группы могут взаимодействовать с карбоксильными группами ПА меркаптопропионовой кислоты.

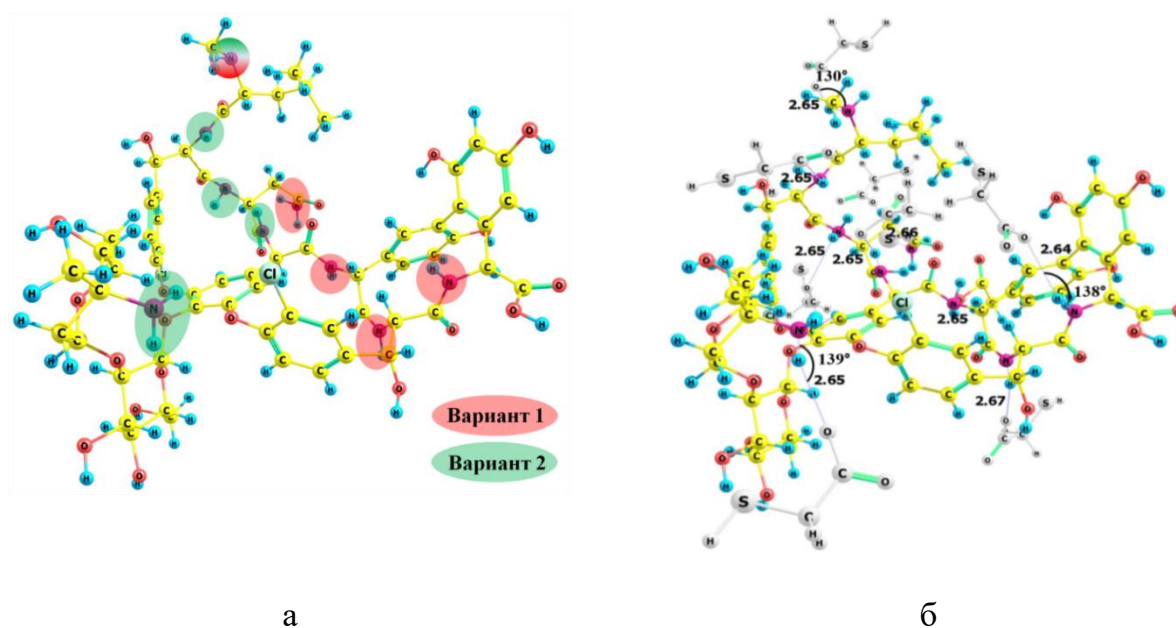


Рисунок 4.21 – Оптимизированная геометрия молекулы ВНЦ, полученная методом CAM-B3LYP/6-31G(d,p), с выделенными аминогруппами для взаимодействия с молекулами МПК

Молекулы МПК в процессе синтеза наночастиц закрепляются на поверхности КТ с помощью донорно-акцепторных связей, образующихся между атомами металла поверхностного слоя КТ и тиольными группами МПК. Аминогруппы в ВНЦ можно условно разделить на две группы в зависимости от пространственного расположения в молекуле ВНЦ (рисунок 4.21 а). Таким образом, могут быть реализованы два направления присоединения молекул ВНЦ к поверхности КТ через МПК.

Для построения геометрии системы КТ CdS/ZnS–МПК–ВНЦ были использованы оптимизированные геометрии молекул ВНЦ и МПК, а также кубическая элементарная ячейка ZnS. Согласно экспериментальным данным, толщина оболочки ZnS исследуемой КТ CdS/ZnS составляет около 4 нм. Таким образом, для расчета была выбрана (001) поверхность КТ, состоявшая из двух монослоев ZnS. Геометрия поверхности была построена с помощью оптимизированной кубической элементарной ячейки ZnS, полученной в предыдущих работах [176] согласно экспериментальным геометрическим параметрам из Crystallography Open Database [177, 178]. В результате образец поверхности имел состав $\text{Zn}_{142}\text{Se}_{142}$. В ходе оптимизации элементарной ячейки ZnS методом DFT существенных изменений геометрии по сравнению с экспериментальными данными не наблюдалось [176].

Полученная система КТ–МПК–ВНЦ была помещена в бокс с 5833 молекулами воды (рисунок 4.22 а), далее была проведена ее релаксация с использованием метода молекулярной динамики. Полученная в результате расчета система с извлеченными молекулами воды представлена на рисунке 4.22 б. Согласно рисунку 4.21 б, можно обнаружить образование водородных связей между карбоксильными группами МПК и аминогруппами ВНЦ с характерными длинами связей в диапазоне 2,4 – 2,5 Å.

Для подтверждения предложенного механизма связывания МПК и ВНЦ были проведены квантово-химические расчеты равновесной геометрии и ИК-спектров системы ВНЦ–МПА. На рисунке 4.21 б представлена оптимизированная геометрия системы ВНЦ–МПК с двумя возможными отдельными вариантами координации молекул МПК на ВНЦ. В результате проведения процесса оптимизации в полученной геометрии молекулы можно обнаружить образование водородных связей между атомами водорода карбоксильных групп МПК и атомами азота аминогрупп ВНЦ. Геометрические параметры этих связей соответствуют критериям образования водородных связей, которые включают расстояние между атомами N...O (2,45–2,85 Å) и угол N-H...O (135–139°) [179].

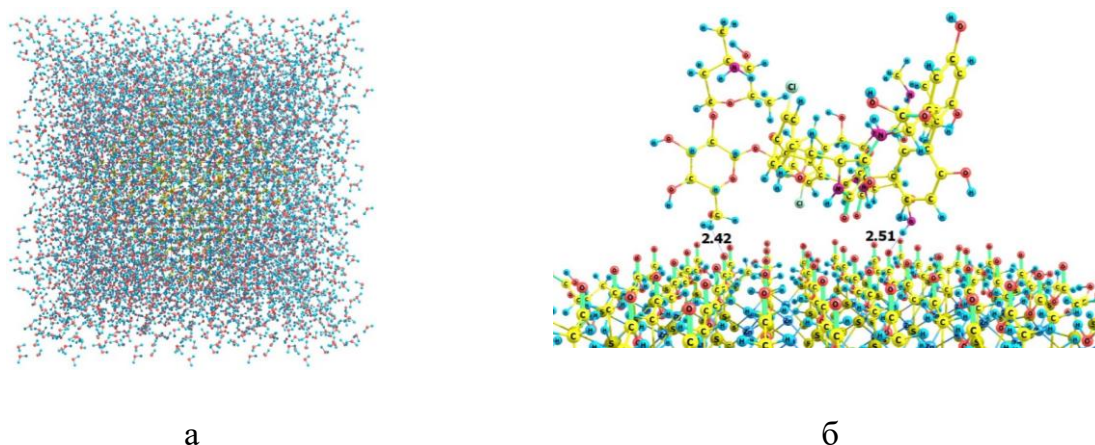


Рисунок 4.22 – Оптимизированная геометрия системы КТ CdS/ZnS– МПК–ВНЦ в ячейке до (а) и после (б) моделирования методом молекулярной динамики

Рассчитанный методом CAM-B3LYP/6-31G(d,p) ИК-спектр системы ВНЦ–МПК, скорректированный в соответствии с масштабирующим множителем [180], демонстрирует хорошее сходство с экспериментальным спектром для системы КТ CdS/ZnS–МПК–ВНЦ (рисунок 4.23).

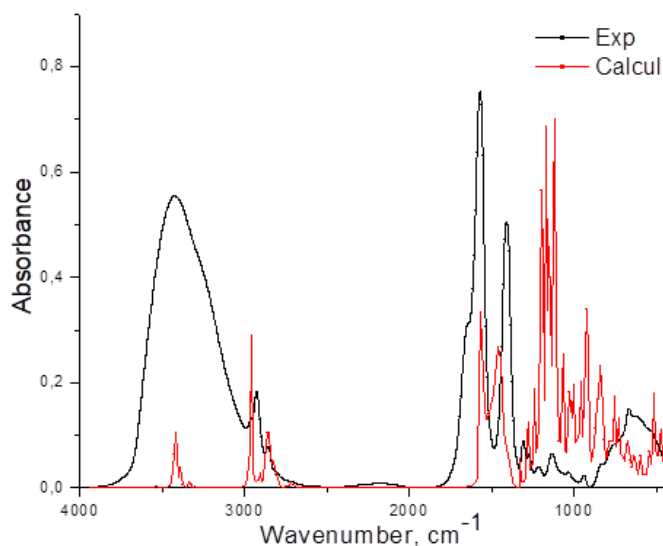


Рисунок 4.23 – Экспериментальный (черная линия) и рассчитанный (красная линия) ИК-спектры системы КТ CdS/ZnS–МПК–ВНЦ

Отсутствие поверхности КТ в моделируемой системе объясняется высокими вычислительными затратами. Также для текущего исследования и анализа ИК-колебательных частот взаимодействия между молекулами ВНЦ и МПК играют большую роль, чем взаимодействия между КТ и МПК. Согласно результатам моделирования, колебательный спектр системы ВНЦ–МПК содержит полосу валентных колебаний N–H при 3420 см^{-1} (3423 см^{-1} в экспериментальном спектре), что подразумевает взаимодействие и образование связей между молекулами ВНЦ и МПК. Рассчитанный ИК-спектр также показывает характерные пики при 1570 и 670 см^{-1} (1570 и 666 см^{-1} в экспериментальном спектре), относящиеся к колебаниям изгиба N–H и виляющим колебаниям N–H, соответственно. Виляние представляет собой особый тип внеплоскостных изгибных колебаний, возникающих, когда связь и присоединенные к ней атомы движутся перпендикулярно плоскости молекулы.

Для оценки влияния ВНЦ на люминесценцию КТ были проведены исследования люминесценции синтезированных КТ при их фиксированном содержании, но разной концентрации ВНЦ (рисунки 4.24 и 4.25). Результаты показали, что добавление ВНЦ самой низкой из исследованных концентраций (50 мкг/мл) увеличивает интенсивность люминесценции КТ CdS/ZnS, а дальнейшее повышение концентрации добавки ВНЦ приводит к снижению интенсивности люминесценции наночастиц (рисунок 4.24 а). В области концентраций ВНЦ $35\text{--}690\text{ мкмоль/л}$ ($50\text{--}1000\text{ мкг/мл}$) график, построенный в

координатах Штерна–Фольмера (рисунок 4.24 б), линейен и аппроксимируется уравнением с $R^2 = 0,9879$. Определенное по графику значение константы Штерна–Фольмера составило 30400 л/моль.

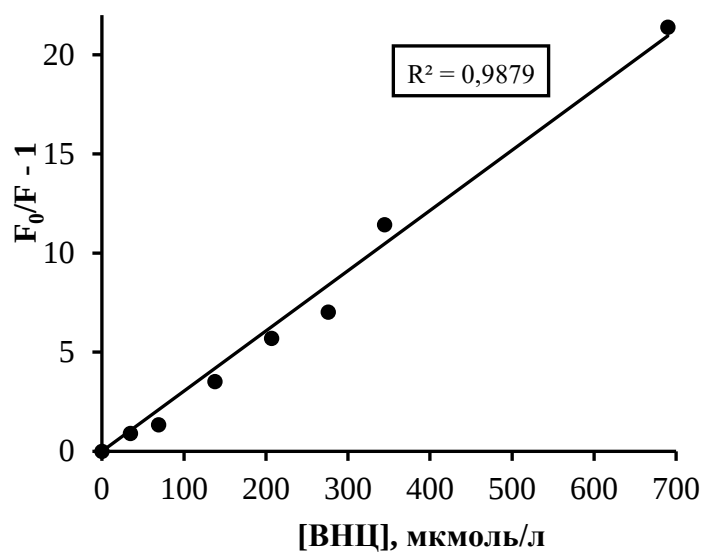
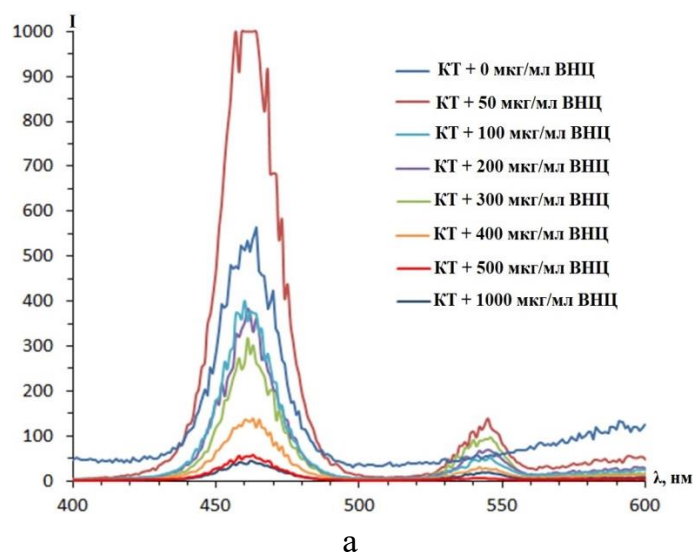
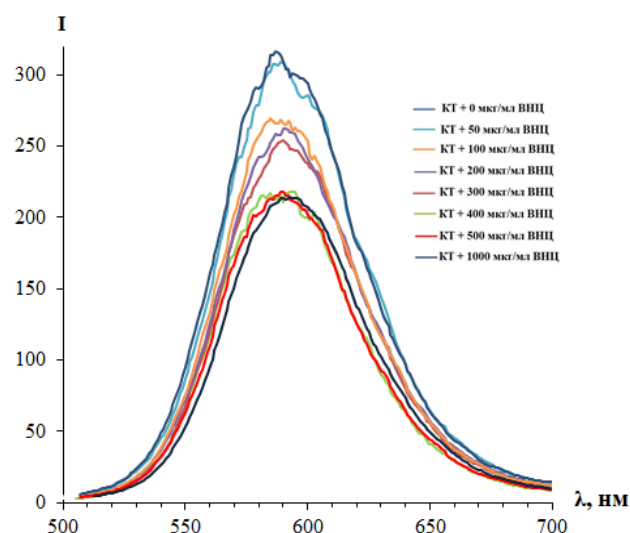
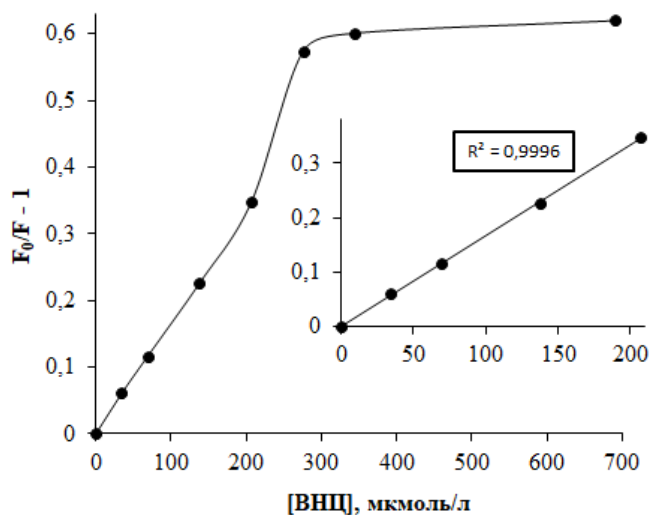


Рисунок 4.24 – Спектры люминесценции ($\lambda_{\text{ex}} = 370$ нм) дисперсий КТ CdS/ZnS (а) в присутствии ВНЦ различной концентрации (содержание КТ постоянное – 1,5 мг/мл) и график в координатах Штерна–Фольмера (б)

Предел обнаружения (ПО) ВНЦ рассчитывали по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту графика линейной зависимости (калибровочного графика $F_0/F - 1$ от концентрации ВНЦ) по уравнению 2.3. Значение ПО ВНЦ, рассчитанное с использованием данного подхода, составило 56,2 мкмоль/л для КТ CdS/ZnS.



а



б

Рисунок 4.25 – Спектры люминесценции ($\lambda_{\text{ex}} = 370$ нм) дисперсий КТ $\text{Cd}_{0.9}\text{Mn}_{0.1}\text{S}/\text{ZnS}$ (а) в присутствии различных концентраций ВНЦ (содержание КТ постоянное – 1,8 мг/мл) и график в координатах Штерна–Фольмера (б); Вставка (б): график Штерна–Фольмера для 0–207 мкмоль/л ВНЦ

Присутствие ВНЦ оказывает иное влияние на люминесценцию КТ, допированных ионами Mn^{2+} , по сравнению с КТ CdS/ZnS (рисунок 4.25 а). По характеру влияния можно выделить два диапазона концентраций антибиотика: при концентрациях ВНЦ < 200 мкмоль/л происходит тушение эмиссии КТ $Cd_{0.9}Mn_{0.1}S/ZnS$, а в диапазоне концентраций > 200 мкмоль/л влияние ВНЦ не проявляется – наблюдается примерно одинаковая интенсивность люминесценции КТ.

Линейный диапазон концентраций ВНЦ на графике зависимости $F_0/F - 1 = f [ВНЦ]$ составил 0–207 мкмоль/л, что соответствует 0–300 мкг/мл (рисунок 4.25 б). Как видно из рисунка, при более высоких концентрациях ВНЦ данная зависимость имеет значительное отклонение от линейности, что может указывать на различную природу (химическую и физическую) взаимодействия тушителя с КТ данного вида. Эффективная константа связывания КТ $Cd_{0.9}Mn_{0.1}S/ZnS$ с ВНЦ составила 1700 л/моль.

Следует отметить, что для КТ $Cd_{0.9}Mn_{0.1}S/ZnS$ отмечается лучшая линейность графика Штерна–Фольмера ($R^2 = 0,9996$ для 0–207 мкмоль/л ВНЦ) по сравнению с графиком тушения люминесценции для КТ CdS/ZnS. Но для КТ CdS/ZnS линейный характер зависимости сохраняется в более широком диапазоне концентраций ВНЦ. ПО ВНЦ для КТ $Cd_{0.9}Mn_{0.1}S/ZnS$ равен 1,9 мкмоль/л.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. Установлено, что комплексообразование цефотаксима с хитозаном и альгинатом натрия в водных растворах осуществляется за счет образования ионных связей между функциональными группами цефотаксима и полиэлектролитов, а также межмолекулярных водородных связей. Выявлено, что на состав и устойчивость комплексов цефотаксима с хитозаном и альгинатом натрия определяющее влияние оказывает рН среды.

2. Показано, что взаимодействие гликопептидного трициклического антибиотика ванкомицина с хитозаном может включать сложный комплекс межмолекулярных взаимодействий, но в исследованном диапазоне концентрации ванкомицина и полиэлектролита не оказывает значительного влияния на оптические свойства лекарственного вещества.

3. Выявлено, что наиболее эффективное связывание флуоресцеина хитозаном наблюдается в физиологическом диапазоне pH. Определены эффективные константы связывания флуоресцеина с хитозаном и показано, что связывание наномаркера с биополимером осуществляется за счет разных механизмов взаимодействия (электростатические, диполь-дипольные и гидрофобные механизмы связывания).

4. Продемонстрированы возможности модельных наносенсоров на основе тушения люминесценции квантовых точек «ядро-оболочка» CdS/ZnS и CdS/ZnS, допированных ионами марганца (II), для обнаружения антибиотика ванкомицина в водных средах. Установлено, что тушение люминесценции квантовых точек происходит за счет химического взаимодействия ванкомицина с наночастицами. Это согласуется с результатами квантово-химического моделирования взаимодействия в данной системе и анализом экспериментальных и расчетных ИК-спектров систем.

5. Выявленные физико-химические и коллоидно-химические закономерности межмолекулярных взаимодействий модельных лекарственных веществ и оптических зондов с хитозаном закладывают основу для разработки стимул-чувствительных, люминесцентных систем доставки исследованных лекарственных веществ.

ГЛАВА 5. ПОЛУЧЕНИЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СТИМУЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ХИТОЗАНА

Системы доставки биологически активных веществ, разработанные на основе полиэлектролитных комплексов полисахаридов, представляют собой перспективное направление современной биомедицины и фармацевтических технологий, особенно в области тераностики – объединения диагностики и терапии заболеваний в одном процессе.

В главе 3 было установлено, что изменение концентрации и соотношения компонентов в смеси полиэлектролитов, состава смешанного растворителя и pH среды является инструментом для управления закономерностями комплексообразования ХТЗ с анионными полисахаридами. В главе 4 показано, что поликатион ХТЗ и полианионы, используемые в работе, обладают уникальными свойствами, позволяющими им формировать достаточно стабильные комплексы с лекарственными веществами и оптическими маркерами. Полученные результаты закладывают основу для создания различных типов полимерных носителей с контролируемым высвобождением лекарственных веществ, которые обеспечат постепенное поступление активных терапевтических компонентов в организм человека, поддерживая их оптимальную концентрацию в течение длительного периода времени.

Кроме того, возможность включения в состав ПЭК хитозана различных люминесцентных зондов делает возможным проведение визуализации тканей-мишеней непосредственно во время терапии, позволяя контролировать процесс лечения и оценивать его эффективность в режиме реального времени. Данная глава посвящена получению и характеристике различных стимул-чувствительных и люминесцентных полимерных носителей на основе ПЭК хитозана для ряда лекарственных веществ, для которых системы доставки на сегодняшний день не разработаны или нуждаются в их улучшении. Следует также отметить, что важным преимуществом используемых в работе комплексов природных полисахаридов является возможность разрабатывать на их основе различные виды носителей лекарственных веществ – микрокапсулы, гели, наночастицы и т.д.

5.1 Получение многослойных полиэлектролитных микрокапсул на основе комплексов хитозана с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы для инкапсулирования ацетилсалициловой кислоты

В качестве модельного ЛВ в данном разделе использовали ацетилсалициловую кислоту, которая остается одним из наиболее известных и широко используемых лекарственных препаратов. АСК проявляет анальгетические, жаропонижающие и противовоспалительные свойства, а также применяется для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Однако данное ЛВ имеет и ряд существенных недостатков. Она плохо растворяется в воде, может разлагаться с образованием салициловой и уксусной кислот. Длительное ее применение оказывает раздражающее действие на слизистую оболочку желудка человека. Заключением АСК в полиэлектролитные капсулы можно добиться снижения раздражающего влияния на слизистую желудочно-кишечного тракта, улучшить фармакокинетические свойства, обеспечить пролонгированное действие при сохранении терапевтического эффекта.

Микро- и нанокапсулы – это полые частицы диаметром от 1 мкм до 6-7 мм, ограниченные оболочкой, которая изолирует заключенное в них ЛВ. К настоящему времени опубликованы данные об успехах в инкапсулировании различных органических веществ: инсектицидов, пестицидов, ферментов, вакцин, лекарственных препаратов и т.д. [79]. Вместе с тем, несмотря на развитие различных методов капсулирования биологически активных веществ, для получения капсул с требуемыми свойствами необходим тщательный подбор условий коллоидного синтеза, уникальный для сочетания используемых для получения оболочки полиэлектролитов и инкапсулированного ЛВ.

Для получения микрокапсул для инкапсулирования АСК применяли метод «слой-за-слоем» (layer-by-layer; LbL), основанный на поочередной адсорбции поликатионов и полианионов [181-183]. Полиэлектролитные капсулы получали путем последовательного осаждения слоев ХТЗ и Na-КМЦ на частицы CaCO_3 . По завершении заданного количества циклов адсорбции полиэлектролитов, ядра карбоната кальция удалялись путем обработки капсул раствором Трилона-Б. В результате были получены одно-, двух-, трех-, четырех- и пятислойные капсулы.

Предварительно проводили подбор оптимальных исходных концентраций ХТЗ и Na-КМЦ для формирования оболочки на поверхности частиц CaCO_3 . Исходные концентрации полимеров подбирались таким образом, чтобы обеспечить изменение знака ζ -потенциала капсул после нанесения очередного слоя полиэлектролита. В работе использовались образцы ХТЗ и Na-КМЦ с различной молекулярной массой и различающимися степенями деацетилирования ХТЗ и замещения у образца Na-КМЦ, поэтому суммарный заряд данных макроионов различался. В результате проведенных исследований выбор был остановлен на следующих исходных концентрациях полиэлектролитов: ХТЗ – 2 мг/мл, Na-КМЦ – 1 мг/мл.

Образование многослойной оболочки на частицах CaCO_3 контролировали, фиксируя значения ζ -потенциала частиц после каждого этапа адсорбции полиэлектролитов (таблица 5.1). Изменение знака ζ -потенциала капсул после очередного этапа сорбции служило доказательством сверхэквивалентного связывания полимеров. Рост размера капсул с увеличением числа осажденных слоев полиэлектролитов, дополнительно подтверждает процесс послойной адсорбции.

Таблица 5.1 – Средний размер d и ζ -потенциал полиэлектролитных капсул на основе ПЭК ХТЗ с Na-КМЦ

Число слоев ХТЗ и Na-КМЦ	d , мкм	ζ -потенциал
0*	3,8	–9,3
1	4,1	+2,8
2	4,4	–12,3
3	5,8	+3,7
4	6,3	–20,5
5	6,7	+5,6

*частицы CaCO_3

Инкапсулирование АСК в полиэлектролитные капсулы проводили тремя способами: сорбцией в порах (способ 1), соосаждением (способ 2) и способом,

основанным на контролируемой проницаемости стенок капсул (способ 3). Первый способ заключался в адсорбции АСК на поверхности частиц CaCO_3 . Инкапсулирование ЛВ происходило за счет его физической сорбции в порах заранее полученных микрочастиц карбоната кальция. Второй способ заключался во включении АСК в частицы CaCO_3 в результате ее совместного осаждения с материалом темплата в процессе получения карбоната кальция при взаимодействии Na_2CO_3 и CaCl_2 . После инкапсулирования АСК в частицы CaCO_3 по способам 1 и 2 на поверхности частиц были сформированы полиэлектролитные оболочки ХТЗ и Na-КМЦ.

Многослойная оболочка капсул формируется за счет образования ПЭК в результате электростатических взаимодействий противоположно заряженных функциональных групп ХТЗ и Na-КМЦ. Это означает, что степень проницаемости стенок капсул можно контролировать путем изменения различных факторов. В качестве способа регулирования проницаемости стенок полиэлектролитных капсул нами был выбран способ, основанный на изменении природы и полярности используемого растворителя.

В разделе 3.2 был изучен характер влияния природы и состава растворителя на образование ПЭК ХТЗ и Na-КМЦ в водно-этанольных средах и показано, что с ростом содержания спирта в растворителе до 50 об. % наблюдается значительное ослабление комплексообразующей способности полиэлектролитов. Исходя из полученных результатов, предложен метод инкапсулирования АСК, заключающийся в варьировании полярности водно-этанольного растворителя на разных этапах получения полиэлектролитных капсул (способ 3).

На первом этапе полые микрокапсулы (эксперименты проводились для 5-слойных капсул) помещали в водно-этанольный раствор (50 об. % этанола + 50 об. % воды) АСК. Происходило проникновение АСК внутрь капсул, поскольку в растворителе такого состава происходит снижение диэлектрической проницаемости. При этом наблюдается появление дефектов в полиэлектролитных стенках капсул вследствие ослабления интенсивности электростатического взаимодействия ХТЗ с Na-КМЦ и оболочка капсул становится проницаемой для кислоты. На следующем этапе в системе создавали избыток воды, в результате чего электростатическое взаимодействие полиэлектролитов в стенках капсул усиливалось, оболочка восстанавливалась и АСК оставалась внутри капсул. Такой подход к регулированию проницаемости стенок многослойных

полиэлектrolитных капсул основан на том, что изменение pH или полярности растворителя может приводить к появлению в стенках капсул пор вследствие нарушения строения полиэлектролитного комплекса, диаметр которых составляет около 100 нм [184].

Процесс инкапсулирования АСК контролировали на основе анализа УФ-спектров супернатанта, полученного после отделения полиэлектролитных капсул. На спектрах поглощения этанольных растворов АСК различной концентрации отмечаются максимумы поглощения при длинах волн 228 ± 2 нм и 280 ± 2 нм. В предварительно проведенных исследованиях было показано, что интервал линейной зависимости оптической плотности от концентрации АСК составляет 0,02-0,2 мг/мл. На основании определения равновесной концентрации АСК проведена оценка эффективности трех способов инкапсулирования ЛВ в полиэлектролитные капсулы (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Эффективность инкапсулирования АСК в полиэлектролитные капсулы

Способ инкапсулирования АСК	Исходная концентрация, мг/мл	Равновесная концентрация, мг/мл	Эффективность инкапсулирования, %
способ 1	1,8	1,697	5,7
способ 2	0,24	0,191	20,8
способ 3	1,0	0,152	84,8

Как видно из таблицы, способы, базирующиеся на физическом поглощении АСК пористой поверхностью микрочастиц CaCO_3 и соосаждении, демонстрируют низкую эффективность инкапсулирования кислоты. Самым неэффективным оказался метод физической сорбции ЛВ на поверхности частиц карбоната кальция. Вероятно, это связано с наличием карбоксильных групп в молекуле АСК, которые препятствуют ее фиксации на отрицательно заряженной поверхности микрокристаллов CaCO_3 вследствие доминирования электростатических сил отталкивания.

При оценке эффективности инкапсуляции АСК по способу, основанному на контролируемой проницаемости стенок полиэлектролитных капсул (способ 3), выявлено изменение спектров поглощения АСК в супернатанте, что затруднило процедуру

определения равновесной концентрации кислоты. Электронный спектр характеризовался наличием одного максимума поглощения при 230 нм, в отличие от максимумов поглощения при 228 и 281 нм, обнаруженных в спектрах поглощения индивидуальных растворов АСК, что свидетельствует о влиянии полиэлектролитной оболочки капсул на электронный спектр раствора кислоты. Возможной причиной спектральных изменений является взаимодействие карбоксильных групп АСК с противоположно заряженными (за счет хитозана) внутренними и внешними стенками полиэлектролитной оболочки. Аналогичное явление наблюдалось и при взаимодействии антибиотика ЦФТ с ХТЗ (раздел 4.1).

Обращает на себя внимание, что капсулирование АСК способом 3 обеспечивает значительно бóльшую эффективность ее включения по сравнению со способами сорбции в порах и соосаждения. Вероятно, высокая эффективность процесса инкапсуляции обусловлена взаимодействием АСК с полиэлектролитной оболочкой капсул, которое препятствует ее выходу в объемную фазу. Важно отметить, что эффективность инкапсулирования АСК зависит и от длительности процесса включения, достигая максимальных значений при времени инкапсулирования от 30 до 60 минут (таблица 5.3).

Таблица 5.3 – Кинетика инкапсулирования АСК в полиэлектролитные микрокапсулы

Продолжительность инкапсулирования АСК, мин	Равновесная концентрация АСК, мг/мл	Эффективность включения, %
30	0,052	94,8
60	0,044	95,6
90	0,105	89,6
120	0,128	87,2
150	0,152	84,8

Применение стимул-чувствительных систем доставки лекарственных веществ значительно увеличивает терапевтический эффект и минимизирует негативное токсическое воздействие на организм человека за счет создания концентрации активных лекарственных компонентов в терапевтическом диапазоне в требуемых тканях и органах. Наиболее перспективным направлением, обеспечивающим повышение безопасности и переносимости АСК, является разработка ее желудочно-резистентных, а именно кишечнорастворимых лекарственных форм. Технология получения таких лекарственных форм и входящие в их состав вспомогательные вещества способствуют растворению и высвобождению АСК в щелочной среде 12-перстной кишки, снижая тем самым риск повреждающего действия кислоты на слизистую оболочку желудка.

Высвобождение АСК из полиэлектролитных капсул обусловлено двумя процессами: диффузией кислоты через стенки капсул в приемную среду и последующей реакцией гидролиза. Изучение высвобождения АСК из капсул проводили в условиях *in vitro* в модельных средах, соответствующих рН желудочного и кишечного содержимого. Модельные среды подбирали в соответствии с требованиями к проведению испытания «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» 2 группы (кишечнорастворимые капсулы)¹. В качестве среды растворения 1, соответствующей кислой среде желудка, использовали 0,01 М раствор HCl. Для приготовления среды растворения 2, соответствующей щелочной среде кишечника, к 75 мл среды растворения 1 прибавляли 25 мл фосфатного буфера и доводили рН до $7,2 \pm 0,05$ с помощью 2 моль/л раствора NaOH.

Процесс высвобождения АСК контролировали спектрофотометрически в первом случае по оптической плотности в максимуме поглощения 228 нм, во втором случае – при длине волны 299 нм, поскольку АСК подвергается щелочному гидролизу с образованием салициловой и уксусной кислот. Салициловая кислота является главным метаболитом АСК, который метаболизируется, в основном, в печени. Схема щелочного гидролиза АСК представлена на рисунке 5.1:

¹ Государственная фармакопея РФ. IX изд. Т. 2. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм. ОФС.1.4.2.0014.15. М. 2018.

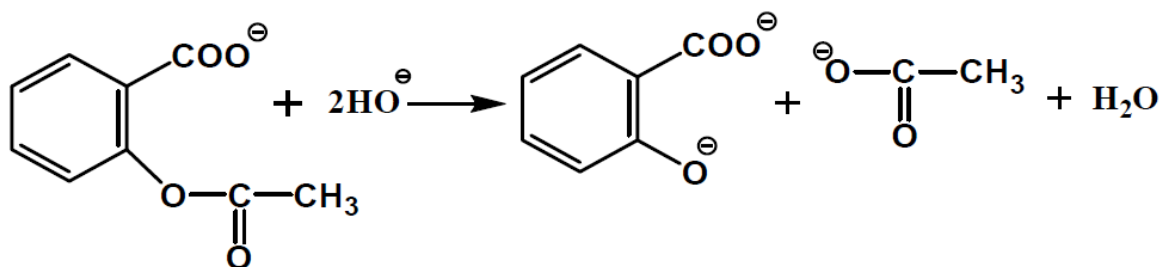


Рисунок 5.1 – Схема реакции щелочного гидролиза АСК

Кинетические кривые высвобождения АСК из полиэлектролитных капсул в кислой и щелочной средах, представлены на рисунке 5.2. Профили высвобождения АСК сопоставляли с требованиями нормативной документации НД № 42–12959–03, согласно которым, при высвобождении АСК в кислую среду через 120 минут может перейти не более 10% от инкапсулированного количества АСК. Кинетическая кривая высвобождения в 0,1М НСl выходит на плато за 120 минут и при этом высвобождается 7,3 % кислоты. Далее на протяжении проведенных исследований в период до 240 мин показатели высвобождения АСК из капсул в кислую среду оставались стабильно низкими. В клинической интерпретации это может означать, что инкапсулированная АСК менее подвержена воздействию кислой среды желудочного сока.

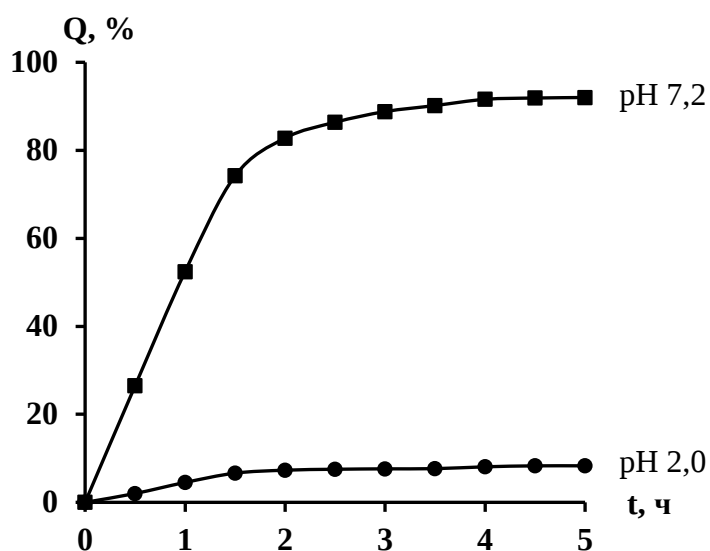


Рисунок 5.2 – Кинетические кривые высвобождения АСК из полиэлектролитных капсул в различные приемные среды

В соответствии с требованиями НД № 42–12959–03 в щелочной среде должно высвобождаться не менее 75% лекарственного вещества через 90 минут. Как видно из рисунка, для щелочной среды характерно постепенное высвобождение АСК. Анализ отобранных через 90 минут проб показал, что в приемную среду 2 перешло более 74 % кислоты и в течение изученного нами временного периода (до 300 мин) продолжался процесс высвобождения.

Для прогнозирования профилей высвобождения АСК из полиэлектролитных капсул был проведен анализ механизма высвобождения. Интерпретация кинетических данных высвобождения ЛВ из полимерных систем доставки является сложным процессом, потому что диффузия низкомолекулярных веществ протекает параллельно с изменениями, которая претерпевает сама полимерная матрица в различных приемных средах. К таким процессам можно отнести растворение, набухание и, в отдельных случаях, деструкцию полимерного носителя [185]. Кинетические данные высвобождения ЛВ из систем доставки анализируются с использованием различных математических моделей, таких как модели нулевого порядка, первого порядка, модель Хигучи и Корсмейера–Пеппаса [94]. Модель Корсмейера–Пеппаса используется при проведении анализа высвобождения ЛВ из полимерных систем доставки, если механизм высвобождения неизвестен или предполагаются конкурирующие механизмы высвобождения. Поэтому анализ кинетических данных высвобождения АСК из капсул и последующий анализ кинетики высвобождения других модельных ЛВ из полученных систем доставки проводили в рамках данной математической модели.

В модели Корсмейера–Пеппаса механизм переноса низкомолекулярного вещества из полимерного носителя в приемную среду отражает показатель n , который был определен согласно уравнению 2.7 (таблица 5.4). В таблице также представлены коэффициенты диффузии АСК из полимерной матрицы, рассчитанные по уравнению 2.9. Механизм высвобождения устанавливался на основе сравнительного анализа полученных нами значений показателя n и значений показателя, характеризующих различные механизмы согласно литературным данным (см. таблицу 1.1 [95]). Анализ проводился исходя из предположения, что полиэлектролитные капсулы имели сферическую форму.

Таблица 5.4 – Параметры высвобождения АСК из полиэлектролитных капсул в различные приемные среды

pH 2,0		pH 7,2	
n	$D \times 10^8, \text{см}^2/\text{с}$	n	$D \times 10^7, \text{см}^2/\text{с}$
0,16	4,04	0,31	2,82

Как видно из таблицы 5.4, значение показателя $n < 0,43$, что указывает на диффузионный механизм высвобождения АСК, который подчиняется II закону Фика. Коэффициент диффузии АСК при высвобождении в приемную среду 1 с pH 2,0 закономерно меньше по сравнению с коэффициентом диффузии в приемной среде 2, что согласуется с кинетическими профилями высвобождения АСК из полученных капсул. Таким образом, полученные данные по кинетике высвобождения АСК из многослойных полиэлектролитных капсул на основе ПЭК ХТЗ с Na-КМЦ позволяют сделать вывод о протекторных свойствах полученных систем доставки в кислых средах.

5.2 Получение гелевых сфер на основе полиэлектролитных комплексов альгината натрия с хитозаном для иммобилизации цефотаксима

Как отмечалось в разделе 4.1, антибиотик цефотаксим широко используется в условиях стационара для терапии инфекционных заболеваний. Однако его применение ограничено тем, что в настоящее время разработана только парентеральная форма этого ЛВ. Попытки перейти от инъекционной к таблетированной или другой непарентеральной лекарственной форме приводили к снижению биодоступности ЦФТ и, соответственно, его терапевтической активности. Дополнительные ограничения вызывали низкая всасываемость при пероральном приеме из-за нестабильности в кислой среде желудка и плохая проницаемость через мембрану слизистой оболочки кишечника вследствие присутствия данного цефалоспорины в ионизованной форме в условиях желудочно-кишечного тракта [186].

Для повышения биодоступности антибиотиков, предназначенных для перорального приема, широко используется их модификация различными полимерами,

которые выступают в роли или комплексообразователя (с целью уменьшения степени ионизации), или кислотонерастворимой оболочки (капсулы) [187]. Однако до сих пор для ЦФТ не разработана непарентеральная лекарственная форма, сохраняющая его лекарственную активность.

Перспективным полимером для получения капсул и комплексообразования с ЦФТ является альгинат натрия. Наличие в структуре макромолекул полисахарида карбоксильных групп обеспечивает его способность к комплексообразованию с ЦФТ (раздел 4.1). Чувствительность функциональных групп АЛГ-Na к pH среды, а также хорошие гелеобразующие свойства в присутствии двухзарядных катионов обеспечивают его способность встраивать кислотолабильные ЛВ в гелевую матрицу, образующуюся после сшивания. Для создания лекарственных форм замедленного релизинга широко используется метод модификации поверхности гелевых частиц другими полимерами. С целью модификации гелей АЛГ-Na нами был использован ХТЗ, применение которого обеспечивало формирование ПЭК данных полисахаридов на поверхности гелевых частиц.

В разделах 3.3 и 4.1 было показано, что комплексообразование ХТЗ с АЛГ-Na и ЦФТ с обоими полиэлектролитами являются pH-зависимыми процессами, что можно использовать в получении лекарственных форм ЦФТ с контролируемым его высвобождением в определенном отделе желудочно-кишечного тракта человека [148, 150, 188, 189].

АЛГ-Na формирует физические гели в присутствии двухзарядных катионов, например, катионов кальция. Ионы кальция замещают ионы натрия в макромолекулах альгината, содержащих остатки (1→4)-связанной α -L-гулурановой и β -D-маннуроновой кислот. Это инициирует процесс ассоциации макроцепей посредством поперечной физической сшивки блоков гулурановой кислоты соседних макромолекул альгината, формируя трехмерную сетчатую структуру геля, которую в литературе определяют как «модель яичной упаковки» [190] (рисунок 5.3).

На размер, форму и структуру формирующихся гелевых частиц АЛГ-Na оказывают влияние условия приготовления и концентрация раствора АЛГ-Na, скорость подачи раствора полимера в раствор CaCl_2 , концентрация CaCl_2 , порядок ввода и содержание ЦФТ [191, 192].

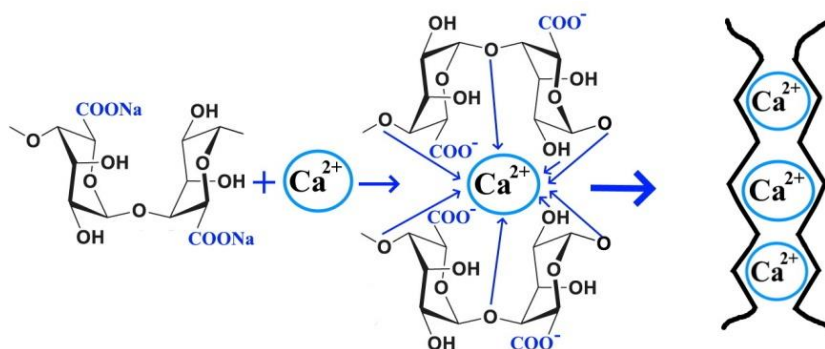


Рисунок 5.3 – Схематическое изображение гелеобразования АЛГ-Na в присутствии ионов Ca^{2+}

Важной характеристикой лекарственных форм является емкость загрузки ЛВ. В предварительных исследованиях был установлен характер влияния содержания ЦФТ в гелевых частицах АЛГ-Са на кинетику его высвобождения (рисунок 5.4). Рост емкости загрузки гелевых частиц антибиотиком от 25 до 250 мг/г приводит к значительному снижению скорости выхода ЛВ из гелевых частиц. При емкости загрузки ЦФТ 125 мг/г половина его количества высвобождается за 30 мин, для гелевого образца с содержанием антибиотика 250 мг/г – время высвобождения 50 % вещества составляет 240 мин. Самой высокой скоростью высвобождения характеризовался образец АЛГ-Са с емкостью загрузки 25 мг/г [188]. На основе сравнительного анализа профилей высвобождения ЦФТ из гелевых частиц для дальнейших исследований была выбрана емкость загрузки 125 мг/г.

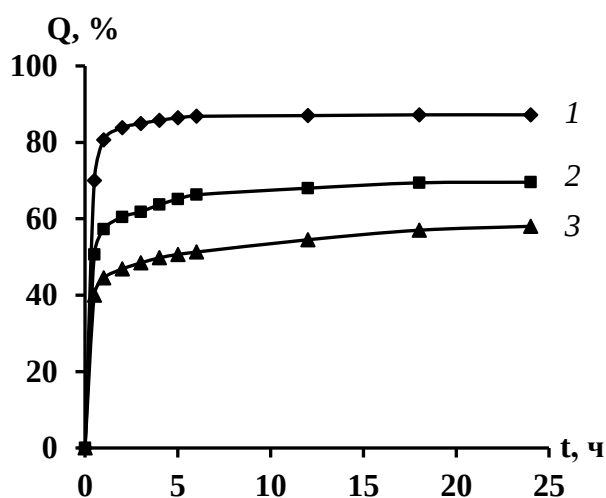


Рисунок 5.4 – Кинетика высвобождения ЦФТ из гелевых частиц АЛГ-Са при емкости загрузки ЦФТ 25 (1), 125 (2) и 250 мг/г (3)

Полученные при подобранных значениях концентраций АЛГ-Na (2%) и CaCl_2 (0,1 моль/л), емкости загрузки ЦФТ (125 мг/г), скорости подачи полимера в раствор CaCl_2 (0,2 мл/мин) гелевые частицы АЛГ-Са имели средний диаметр $2,0 \pm 0,05$ мм и характеризовались плотной однородной структурой. Эффективность включения ЦФТ в гелевые сферы АЛГ-Са составила $94 \pm 1\%$.

Модификацию гелевых образцов АЛГ-Са хитозаном проводили двумя способами. В первом способе 2%-ный водный раствор АЛГ-Na с ЦФТ добавляли в раствор CaCl_2 , содержащий ХТЗ (0,25%). Второй способ заключался в следующем: предварительно полученные частицы АЛГ-Са с ЦФТ вводили в раствор ХТЗ той же концентрации. Эффективность иммобилизации ЦФТ в модифицированных хитозаном гелевых образцах АЛГ-Са, полученных двумя способами, оказалась равной $95 \pm 1\%$ и $97 \pm 1\%$ соответственно. Средний размер гелевых частиц сохранялся и составлял 2,0 мм (рисунок 5.5).



Рисунок 5.5 – Гелевые сферы АЛГ–ХТЗ, полученные способом 2

В обоих способах модификации гелевых частиц альгината хитозаном сначала происходит формирования геля АЛГ-Са («ядро»), а затем на их поверхность наслаивается покрытие ПЭК АЛГ–ХТЗ («оболочка»). Причиной такой последовательности процесса является, бóльшая, чем у макромолекул ХТЗ, подвижность катионов кальция Ca^{2+} , которые за счет координации с гулурановыми звеньями АЛГ быстрее образуют гель [193]. Образование слоя ПЭК на поверхности гелевых сфер альгината протекает значительно медленнее. Таким образом, в обоих способах модификации формировались частицы, которые представляют собой гель, покрытый снаружи эластичной гелеобразной оболочкой, т.е. структуру «гель в геле» или «ядро-оболочка».

На рисунке 5.6 в качестве примера показаны микрофотографии сфер АЛГ–ХТЗ с инкапсулированным ЦФТ, полученные способом 2. Из рисунка видно, что поверхность гелевых образцов представляет собой плотную однородную структуру (рисунок 5.6 а). Исследование внутренней морфологии сфер позволяет заключить, что поры имеют характерную ромбическую форму с тонкими стенками, но поры неоднородны по своим размерам (рисунок 5.6 б, с).

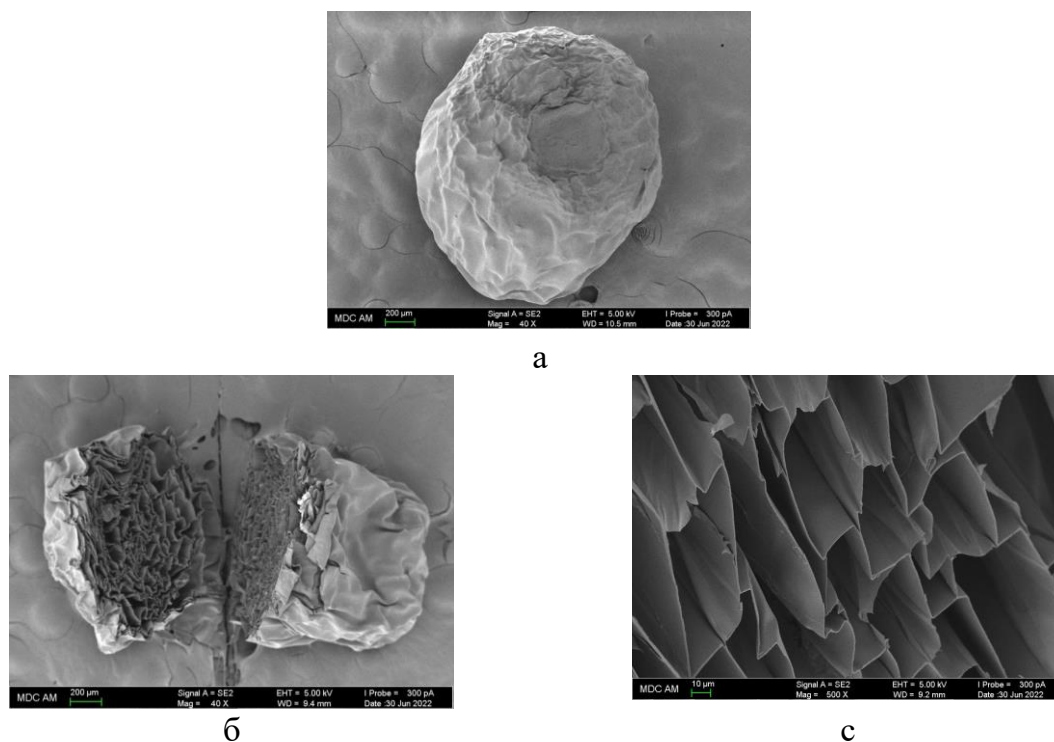


Рисунок 5.6 – СЭМ-изображения гелевой сферы АЛГ–ХТЗ с инкапсулированным ЦФТ (а), поперечного среза сферы (б) и внутренней структуры образца (с)

В разделе 5.1 обсуждалось, что диффузия низкомолекулярных веществ из полимерных носителей может сопровождаться изменениями самой полимерной матрицы. Для изучения механизма высвобождения ЦФТ из полученных гелевых частиц предварительно было исследовано влияние рН среды на состояние сфер АЛГ-Са, модифицированных хитозаном. Установлено, что в кислой среде у всех полученных гелевых образцов наблюдается потеря массы, свидетельствующая о постепенном растворении полимерной матрицы (рисунок 5.7 а). Особенно ярко этот процесс выражен у сфер АЛГ-Са, не подвергнутых модификации хитозаном (кривая 1).

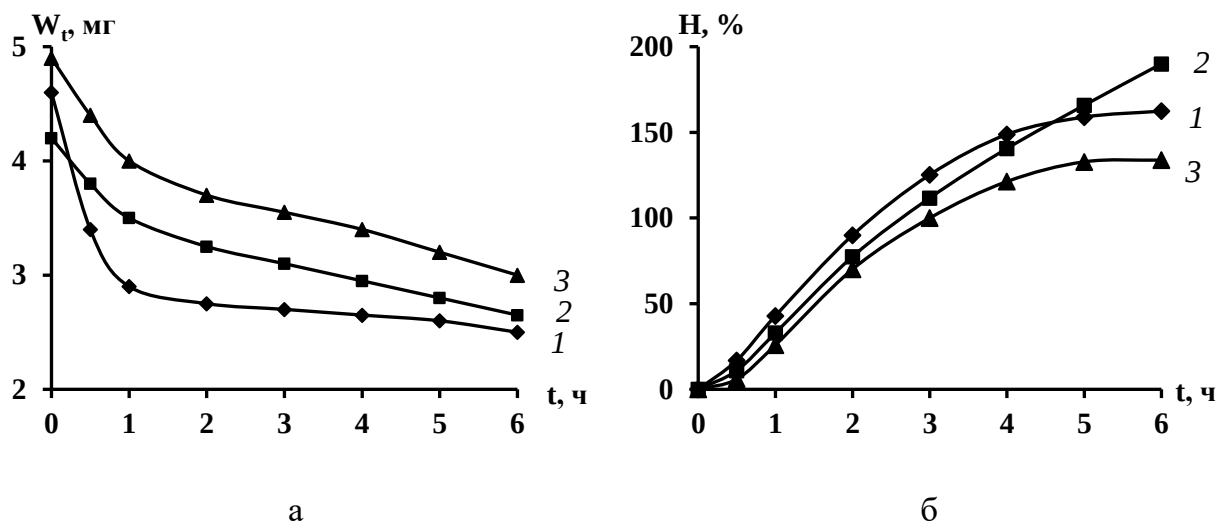


Рисунок 5.7 – Кинетические кривые потери массы в растворе 0,01 моль/л HCl (а) и кривые набухания в фосфатно-солевом буфере (б) сфер АЛГ-Са (1) и сфер АЛГ-Са, модифицированных ХТЗ способом 1 (2) и способом 2 (3)

В фосфатно-солевом буфере (рН 7,2) наблюдается набухание гелевых частиц, полученных как без ЦФТ (рисунок 5.7 б), так и в его присутствии. Отличия в поведении гелей при различном рН можно связать с изменениями в структуре рН-зависимых ПЭК АЛГ–ХТЗ, закономерности образования которых обсуждались в разделе 3.3.

В кислых средах протонированные аминогруппы ХТЗ, которые находятся в избытке, связывают все ионизированные карбоксильные группы АЛГ и препятствуют набуханию геля. При рН 7,2 напротив происходит процесс депротонирования аминогрупп ХТЗ, что значительно ослабляет его взаимодействие с АЛГ в поверхностном слое частиц. Свободные ионизированные карбоксильные группы АЛГ поглощают воду, что приводит к высокой степени набухания геля.

На процесс набухания гелевых частиц в фосфатно-солевом буфере оказывает влияние присутствие ЦФТ. Гели с иммобилизованным антибиотиком имеют более высокую степень набухания по сравнению с образцами, полученными без него. Возможной причиной увеличения степени набухания гелевых частиц является дополнительная гидратация, связанная с присутствием гидрофильного ЛВ с достаточно высокой молекулярной массой (455 г/моль у ЦФТ), вследствие которой образуется гидрогель с большим объемом порового пространства [194-196].

Возможность переноса низкомолекулярных ЛВ из полимерных носителей во внешнюю среду обеспечивает первичный процесс набухания полимерной матрицы за счет сорбции воды. Увеличение содержания воды в гидрогеле способствует росту подвижности макромолекул и, следовательно, увеличению свободного объема, доступного для диффузии. Исследование механизма переноса воды в полученных гелевых образцах проводили путем анализа кинетических данных набухания с использованием математической модели Корсмейера–Пеппаса (таблица 5.5). Значение показателя n для всех сфер превышает 0,85, что свидетельствует о транспорте воды, контролируемом процессом набухания полимерной матрицы. Кроме того, отмечено увеличение времени достижения половины равновесной степени набухания ($t_{1/2}$) для гелевых образцов, содержащих ЦФТ, по сравнению с аналогичными гелями без ЛВ.

Наблюдается существенное отклонение механизма диффузии воды от классического закона Фика ($n > 0,43$). Это означает, что коэффициент диффузии D следует интерпретировать как эффективную характеристику процесса. Данные таблицы 5.5 демонстрируют уменьшение коэффициента диффузии воды во всех типах гелевых сфер в присутствии ЦФТ. Важно также отметить, что способ проведения модификации гелевых образцов хитозаном оказывает менее значительное влияние на параметры набухания, чем присутствие самого ЛВ.

Таблица 5.5 – Кинетические параметры набухания гелевых сфер в фосфатно-солевом буфере (pH 7,2)

Состав образца	$t_{1/2}$, мин	n	$D \times 10^8$, см ² /с
АЛГ-Са	133,3	0,92	6,14
АЛГ-Са–ХТЗ (способ 1)	142,6	0,90	5,74
АЛГ-Са–ХТЗ (способ 2)	135,2	0,87	6,05
АЛГ-Са –ЦФТ	174,3	0,94	4,69
АЛГ-Са–ЦФТ–ХТЗ (способ 1)	182,2	0,86	4,49
АЛГ-Са–ЦФТ–ХТЗ (способ 2)	154,2	0,91	5,31

Кинетические закономерности высвобождения ЦФТ из гелевых образцов АЛГ-Са и АЛГ-Са, модифицированного ХТЗ, изучали в условиях *in vitro* (рисунок 5.8). В качестве приемных сред применяли растворы пищеварительных ферментов, имитирующих кислую среду желудка (рН 2,0) и щелочную среду тонкого кишечника (рН 7,2) при пероральном приеме ЛВ. Количество выделившегося ЦФТ определяли спектрофотометрически по величине оптической плотности при длине волны 262 нм с использованием предварительно полученных калибровочных зависимостей для разных приемных сред.

Обращает на себя внимание, что высвобождение антибиотика из гелевых образцов немодифицированного и модифицированного хитозаном АЛГ-Са является рН-зависимым процессом. Так, в кислой среде 9-28% ЦФТ высвобождается в течение 1-2 часов – примерно столько же лекарственная форма находится в желудке после приема ее внутрь (кривые 1-3). При переходе к приемной среде с рН 7,2 скорость выхода ЦФТ значительно возрастает: из исходных сфер АЛГ-Са и гелевых образцов, модифицированных ХТЗ по первому способу, высвобождается от 65 до 76% лекарственного вещества за четыре часа (кривые 1 и 2). Медленнее всего процесс высвобождения идет из сфер, модифицированных ХТЗ вторым способом (кривая 3).

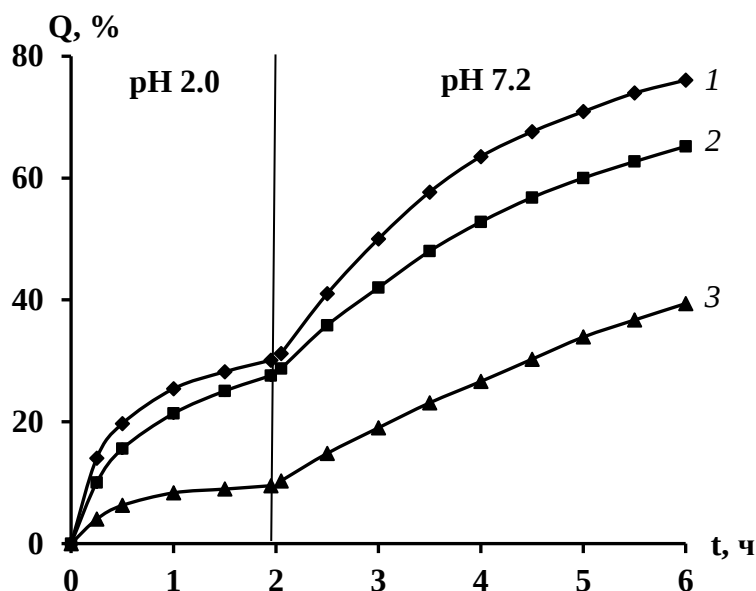


Рисунок 5.8 – Кинетические кривые высвобождения ЦФТ из гелевых образцов АЛГ-Са (1) и модифицированных хитозаном гелевых сфер АЛГ-Са, полученных способом 1 (2) и способом 2 (3)

Выявленные кинетические закономерности высвобождения ЦФТ из гелевых образцов при различных значениях pH являются отражением изменения межмолекулярных взаимодействий в сложной системе «АЛГ-Са-ХТЗ-ЦФТ-Н₂О», которые были изучены в разделах 3.3 и 4.1.

В кислых средах протонированные аминогруппы ХТЗ прочно связывают карбоксильные группы АЛГ, препятствуя набуханию полимерной матрицы и тормозя высвобождение ЦФТ. Отсутствие набухания, а также сильные межмолекулярные взаимодействия обоих полиэлектролитов с антибиотиком в полимерной матрице приводят к значительному замедлению выхода ЦФТ в кислую приемную среду. Повышение pH до 7,2 приводит к ослаблению интенсивности комплексообразования депротонированного ХТЗ с АЛГ и сопровождается значительным набуханием гелевых образцов вплоть до их разрушения. В присутствии ЦФТ процесс набухания полимерной матрицы усиливается, создавая условия для его стабильного высвобождения в фосфатно-солевом буфере.

На кинетику высвобождения ЦФТ из полимерной системы доставки влияет и ее строение. Оболочка из ПЭК АЛГ-ХТЗ на «ядрах» АЛГ-Са увеличивает толщину слоя, через который диффундирует ЦФТ, что приводит к уменьшению скорости его высвобождения из геля. Причиной самого медленного выхода ЦФТ из гелевых частиц, полученных при введении предварительно полученных сфер АЛГ-Са в раствор ХТЗ, по-видимому, является то, что при таком способе получения в поверхностном слое геля изначально отсутствует ЦФТ. Дополнительно замедлению выхода ЛВ при данном способе модификации геля АЛГ-Са может способствовать взаимодействие аминогрупп ЦФТ с карбоксильными группами поликислоты. Поэтому во втором способе получения покрытие ПЭК выступает в роли дополнительного «барьера», через который молекулам ЦФТ, преодолевая силы межмолекулярного взаимодействия, нужно пройти в процессе диффузии из альгинатного геля в приемную среду.

Величина показателя n , описывающего механизм высвобождения ЦФТ в приемных средах, находится в диапазоне 0,5-0,6, что указывает на высвобождение, контролируемое одновременно диффузией ЦФТ и набуханием полимерной матрицы (таблица 5.6). Рассчитанные значения коэффициента диффузии D показывают снижение скорости выхода ЛВ из гидрогелей АЛГ-Са, модифицированных хитозаном. Отклонение механизма высвобождения ЦФТ от диффузионного, можно объяснить сильным

взаимодействием полимерной матрицы с лекарственным веществом – ЦФТ взаимодействует и с ХТЗ, и АЛГ, и поэтому сам выступает в качестве модификатора гидрогеля.

Таблица 5.6 – Параметры высвобождения ЦФТ из сфер АЛГ-Са в 0,01 моль/л HCl (pH 2,0) и фосфатно-солевой буфер (pH 7,2)

Состав гелевых образцов	pH 2,0			pH 7,2		
	$t_{1/2}$, мин	n	$D \times 10^8$, см ² /с	$t_{1/2}$, мин	n	$D \times 10^7$, см ² /с
АЛГ-Са-ЦФТ	72,4	0,60	1,13	206,3	0,58	3,97
АЛГ-Са-ЦФТ-ХТЗ (способ 1)	74,2	0,59	1,10	235,6	0,49	3,47
АЛГ-Са-ЦФТ-ХТЗ (способ 2)	93,5	0,49	0,87	264,0	0,58	3,10

Далее были проведены исследования антимикробной активности ЦФТ, иммобилизованного в гелевых частиц АЛГ и АЛГ-ХТЗ (таблица 5.7). Как видно из таблицы, частицы, имеющие хитозановое покрытие, в 2-8 раз превышает по активности образцы АЛГ-ЦФТ. Данный эффект можно объяснить проявлением антимикробных свойств ХТЗ. Оба гелевых образца, как и ЦФТ, оказались более эффективными в отношении грамположительной бактерии *E. coli* 25922 и действуют бактерицидно.

Таблица 5.7 – Антимикробная активность ЦФТ, иммобилизованного в гелевых образцах АЛГ и АЛГ-ХТЗ

Образец	<i>S. aureus</i> 209 - P		<i>E. coli</i> 25922	
	МИК (мкг/мл)	МБК (мкг/мл)	МИК (мкг/мл)	МБК (мкг/мл)
АЛГ-ЦФТ	14,6±1,2	58,6±4,5	7,3±0,5	7,3±0,5
АЛГ-ХТЗ-ЦФТ	7,3±0,6	7,3±0,6	3,7±0,4	3,7±0,4

5.3 Синтез наночастиц на основе полиэлектролитных комплексов хитозана и κ-каррагинана для иммобилизации люминесцентных сенсоров и ванкомицина

Для целей тераностики используются разнообразные наноматериалы, такие как полимеры, дендримеры, жидкие кристаллы, металлические и неметаллические наночастицы и др. Наноразмерные частицы помимо возможности контроля скорости высвобождения лекарственного вещества, могут увеличивать площадь поверхности, что обеспечивает высокую пропускную способность биологически активных и оптических агентов. Нанометровый размер также позволяет частицам легко проникать из кровеносных сосудов в злокачественные или поврежденные ткани, благодаря более проницаемой сосудистой сети и нарушенному лимфатическому клиренсу таких тканей, по сравнению с нормальной тканью.

5.3.1 Формирование и характеристика наночастиц на основе полиэлектролитных комплексов хитозан–κ-каррагинан

Наночастицы синтезировали на основе ХТЗ и его полиэлектролитного комплекса с kappa-каррагинаном методами микроволновой и гидротермальной обработки растворов полисахаридов при различных температурах и времени обработки [171, 197]. Микроволновой метод основывался на воздействии микроволнового излучения на раствор ХТЗ (таблица 5.8). Гидротермальным методом наночастицы ХТЗ синтезировали в стальном автоклаве в относительно мягких условиях, исключая применение органических растворителей.

Таблица 5.8 – Условия проведения микроволнового синтеза наночастиц ХТЗ

Время, мин	5
Мощность излучения, Вт	700
Компонент	ХТЗ
Растворитель	0,01 моль/л HCl

Отличительной особенностью наноструктур является зависимость их оптических свойств от размеров и химической природы веществ, из которых они получены.

Функционализация наночастиц хитина и хитозана позволяет улучшать их растворимость и фотолюминесценцию [198], поэтому далее были синтезированы наночастицы с использованием в качестве прекурсоров ПЭК ХТЗ с к-КРГ. Синтез проводили гидротермальным методом, варьируя продолжительность процесса, соотношение полиэлектролитов в исходной смеси и тип используемого растворителя (таблица 5.9).

Таблица 5.9 – Условия проведения гидротермального синтеза наночастиц ХТЗ и ПЭК ХТЗ–КРГ

Вид синтеза	ГТС-1	ГТС-2	ГТС-3	ГТС-4
Время, ч	3	4	4	4,5
t, C°	180	180	180	180
Компонент	ХТЗ	ХТЗ	ХТЗ–КРГ (1:1,5)	ХТЗ–КРГ (1:1)
Растворитель	0,01 моль/л HCl	0,1 моль/л CH ₃ COOH	0,1 моль/л CH ₃ COOH	0,01 моль/л HNO ₃

Размер частиц, синтезированных на основе ХТЗ и ПЭК ХТЗ–КРГ, а также их ζ -потенциал, определенные методом динамического рассеяния света, приведены в таблице 5.10. Согласно данным таблицы, наночастицы ХТЗ, полученные как микроволновым, так и гидротермальным методами, имеют размер менее 10 нм. Частицы, полученные на основе ПЭК, демонстрируют высокую склонность к агрегации. Положительная величина ζ -потенциала наночастиц ХТЗ при переходе к наноагрегатам комплексов ХТЗ–КРГ изменяется незначительно.

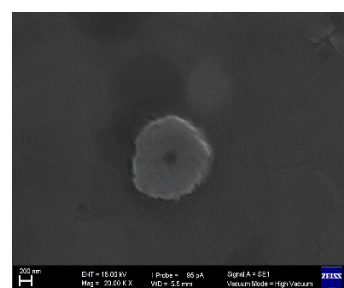
Таблица 5.10 – Средний размер и ζ -потенциал наночастиц ХТЗ и ПЭК ХТЗ–КРГ

Вид синтеза	Наночастицы	Средний размер частиц d, нм	ζ -потенциал, мВ
МВС	ХТЗ	3,3	+18,2
ГТС-1	ХТЗ	9,6	+15,6
ГТС-2	ХТЗ	55,6	+12,8
ГТС-3	ХТЗ–КРГ (1:1,5)	102,4	+11,4
ГТС-4	ХТЗ–КРГ (1:1)	158,7	+19,6

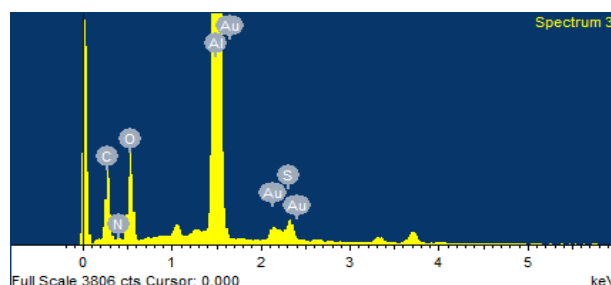
Исследования морфологии поверхности и размера наночастиц ПЭК ХТЗ–КРГ, проведенное с помощью сканирующей электронной микроскопии, показало наличие различных структур, состоящих из частиц с размером от 30 до 45 нм (рисунок 5.9 а). На отдельных изображениях видны скопления частиц, размеры которых варьируются от 600 до 900 нм, что говорит о сильной агрегации частиц ПЭК и коррелирует с данными метода ДРС (рисунок 5.9 б). На EDX-спектрах комплексов наблюдаются сигналы в области серы и азота (рисунок 5.9 в), что согласуется с химическим составом полученных ПЭК ХТЗ–КРГ.



а



б



в

Рисунок 5.9 – СЭМ-изображения (а), (б) и EDX-спектр (в) поверхности частиц ПЭК ХТЗ–КРГ

Из рисунка 5.10 а видно, что водные растворы наночастиц ХТЗ и ПЭК, синтезированные методом ГТС-2 и ГТС-3 (кривые 3, 4), демонстрируют поглощение в УФ-диапазоне, но являются прозрачными в видимой области электромагнитного спектра. Растворы наночастиц комплексов КРГ–ХТЗ, полученные методом ГТС-4 (кривая 5), характеризуются снижением интенсивности поглощения и смещением максимума поглощения в длинноволновую область.

На следующем этапе были изучены люминесцентные свойства полученных наноструктур (рисунок 5.10 б). У всех наночастиц при длине волны возбуждения 340 нм на спектрах отчетливо проявляются пики люминесценции при 420 нм. Наибольшей интенсивностью люминесценции характеризуются частицы ХТЗ, полученные методом ГТС-2. Для наночастиц, синтезированных с использованием в качестве прекурсоров комплексов ХТЗ с КРГ, отмечается снижение интенсивности люминесценции. Особенно ярко этот эффект проявляется для наноструктур, полученных методом ГТС-4.

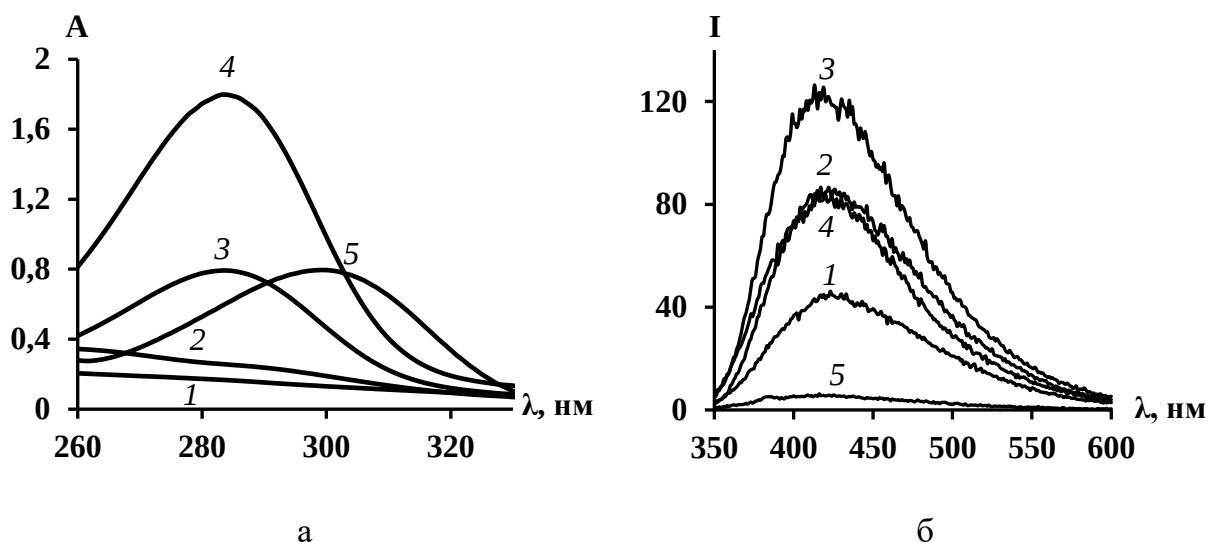


Рисунок 5.10 – Спектры поглощения (а) и люминесценции (б, $\lambda_{\text{ex}}=340$ нм) растворов наночастиц: 1 – ХТЗ (МВС), 2 – ХТЗ (ГТС-1), 3 – ХТЗ (ГТС-2), 4 – ХТЗ-КРГ (ГТС-3), 5 – ХТЗ-КРГ (ГТС-4)

Для определения относительного квантового выхода люминесценции наночастиц в качестве вещества с известным квантовым выходом использовали флуоресцеин, спектр возбуждения которого перекрывается со спектром возбуждения частиц. Выявлено, что высокий квантовый выход характерен для наночастиц ХТЗ, полученных

методом ГТС-2, и частиц ПЭК ХТЗ–КРГ, синтезированных методом ГТС-3 (таблица 5.11).

Таблица 5.11 – Относительный квантовый выход Q_x наночастиц ХТЗ и ПЭК ХТЗ–КРГ

Вид синтеза	Наночастицы	Q_x
МВС	ХТЗ	0,34
ГТС-1	ХТЗ	0,43
ГТС-2	ХТЗ	0,79
ГТС-3	ХТЗ–КРГ (1:1,5)	0,66
ГТС-4	ХТЗ–КРГ (1:1)	0,033

Для дальнейших исследований в качестве носителей оптических зондов и лекарственного вещества ванкомицина были выбраны наночастицы комплексов ХТЗ–КРГ, синтезированные методом ГТС-3, обладающие высокой эффективностью люминесценции и квантовым выходом.

5.3.2 Включение и высвобождение флуоресцеина из наночастиц хитозан–к-каррагинана

Добавление красителей и других флуорофоров в полимерные частицы приводит к повышению их чувствительности в видимом диапазоне спектра, делая эти материалы перспективными для применения в сенсорных системах доставки биологически активных веществ.

В разделе 4.3 было показано, что флуоресцеин в комплексе с поликатионом ХТЗ демонстрирует изменение спектральных и фотофизических характеристик в различных средах. На рисунке 5.11 приведено сравнение тушения флуоресценции ФЛЦ в присутствии ХТЗ и ПЭК ХТЗ–КРГ с таким же содержанием катионного полиэлектролита. Добавки ПЭК вызывают еще большее снижение интенсивности флуоресценции ФЛЦ по сравнению с ХТЗ. Из графиков видно, что зависимости $F_0/F - 1 = f [Q]$ при тушении флуоресценции ФЛЦ комплексом ХТЗ–КРГ, также имеют отклонения от линейности, что указывает на различные механизмы связывания

красителя. Эффективная константа связывания ФЛЦ с ПЭК ХТЗ–КРГ составила 340 л/моль, следовательно, краситель взаимодействует с комплексом КРГ–ХТЗ сильнее, чем с ХТЗ (см. раздел 4.3). Это может быть связано с усилением вторичных типов взаимодействий (гидрофобных, диполь-дипольных) между молекулами ФЛЦ и более гидрофобной поверхностью частиц ПЭК. В работе [165] также было показано, что сорбционная емкость флуороновых красителей на частицах ПЭК хитозана имеет большие значения по сравнению с индивидуальным ХТЗ, что достигается, по мнению авторов, за счет оптимальной площади и качества поверхности, которые имеют частицы ПЭК сферической формы.

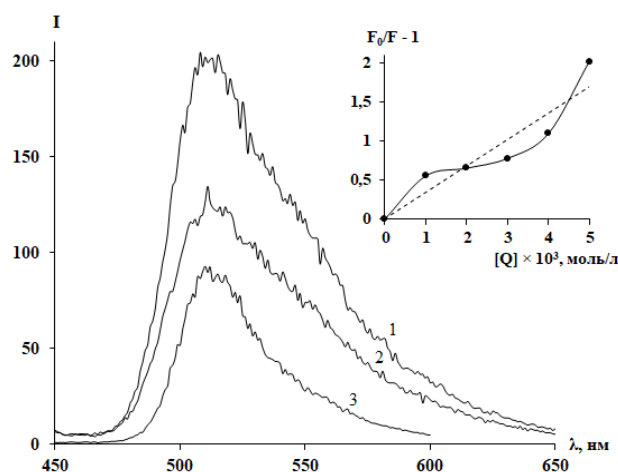


Рисунок 5.11 – Спектры флуоресценции растворов ФЛЦ (3 мкМ) (1) в присутствии ХТЗ (2) и ПЭК ХТЗ–КРГ (3) ($c_{\text{ХТЗ}} = 1$ мг/мл, отношение концентраций полиэлектролитов в ПЭК $[\text{ХТЗ}] : [\text{КРГ}] = 1 : 1,5$); вставка – графики в координатах Штерна–Фольмера

ХТЗ, благодаря наличию аминогрупп в структуре макромолекул, а также полиэлектролитные комплексы на его основе эффективно сорбируют соединения анионной природы, как в концентрированных, так и разбавленных растворах. Для подтверждения закономерностей связывания ФЛЦ исследовали его адсорбцию из водного раствора на частицах комплекса ХТЗ–КРГ и проводили анализ полученных изотерм сорбции с использованием уравнений Ленгмюра (уравнение 2.10) и Фрейдлиха (уравнение 2.12) (таблица 5.12). Равновесную концентрацию ФЛЦ c_e определяли

спектрофотометрически после удаления из раствора частиц ПЭК с адсорбированным красителем.

По изотерме адсорбции, построенной в координатах модели Ленгмюра, находили безразмерный параметр адсорбционного равновесия R_L (уравнение 2.11). Данный параметр позволяет определить тип адсорбции, который в зависимости от выбранного диапазона концентраций адсорбата может быть необратимый ($R_L = 0$), благоприятный ($0 < R_L < 1$), неблагоприятный ($R_L > 1$) [141].

Адсорбцию ФЛЦ на поверхности ПЭК ХТЗ–КРГ описывали также моделью Фрейндлиха, которая широко используется для описания адсорбции растворенного вещества из раствора на гетерогенных поверхностях. Данная модель основывается на предположении о том, что в первую очередь заполняются адсорбционные центры с более сильной сорбционной способностью, а прочность связывания уменьшается с ростом степени заполнения поверхности адсорбента. Параметр n в уравнении Фрейндлиха характеризует интенсивность сорбционного процесса. Если $n < 1$, энергия связей адсорбент–адсорбат возрастает, при $n > 1$ энергия этой связи уменьшается по мере заполнения поверхности, в случае $n = 1$ все адсорбционные центры эквивалентны [140].

Таблица 5.12 – Константы изотерм адсорбции Ленгмюра и Фрейндлиха ФЛЦ на частицах ПЭК ХТЗ–КРГ*

Константы изотермы адсорбции Ленгмюра			
q_m , мг/г	K_L , л/мг	R_L	R^2
1,64	0,51	0,99	0,891
Константы изотермы адсорбции Фрейндлиха			
K , л/мг	$1/n$	n	R^2
0,0113	0,87	1,15	0,997

* Отношение концентраций полиэлектролитов в ПЭК [ХТЗ] : [КРГ] = 1 : 1,5

Значение параметра R_L свидетельствует о благоприятных условиях для сорбционного процесса ФЛЦ на частицах ПЭК. Параметр n в уравнении Фрейндлиха больше 1, что указывает на неоднородность поверхности адсорбента. Как следует из

таблицы 5.12, экспериментальная изотерма адсорбции лучше описывается моделью Фрейндлиха. В целом можно сделать вывод о том, что адсорбция красителя ФЛЦ на частицах ПЭК ХТЗ–КРГ невелика [164].

Для прогнозирования характера высвобождения ФЛЦ, как модельного анионного ЛВ, из наночастиц в организме человека определено количество выделившегося из комплексов ХТЗ–КРГ иммобилизованного ФЛЦ в раствор 0,01 М HCl (кислая среда желудка) с последующим перемещением в воду (нейтральная среда тонкого кишечника). Выявлено, что высвобождение ФЛЦ из наночастиц определяется уровнем pH приемной среды. Кинетическая кривая ФЛЦ, характерная для кислой среды, выходит на плато за 1 час и высвобождается при этом 16 % ФЛЦ. В приемной среде с pH 7,0 до 74 % ФЛЦ выходит из наночастиц в течение 4 часов.

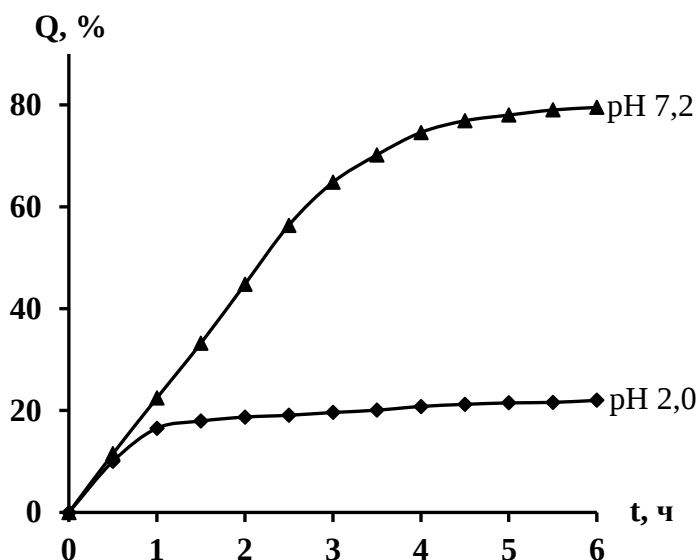


Рисунок 5.12 – Кинетические кривые высвобождения ФЛЦ из наночастиц комплексов ХТЗ–КРГ в различные приемные среды

Различия в профилях высвобождения ФЛЦ из ПЭК при разных pH приемных сред связаны с изменениями закономерностей комплексообразования компонентов системы доставки. При pH 2,0 отмечаются интенсивные электростатические взаимодействия полиэлектролитов и комплекс ФЛЦ с ХТЗ отличается высокой устойчивостью (раздел 4.3). В нейтральной среде депротонирование аминогрупп ХТЗ ослабляет его взаимодействие с КРГ и красителем, что и приводит к увеличению скорости высвобождения ФЛЦ из наночастиц ПЭК.

Параметры высвобождения ФЛЦ из полимерного носителя, рассчитанные в рамках модели Корсмейера–Пеппаса, приведены в таблице 5.13. Для обеих приемных сред характерно контролируемое диффузией высвобождение, так как параметр $n < 0,43$. Коэффициент диффузии D красителя в кислой приемной среде меньше в сравнении с коэффициентом диффузии в приемной среде с pH 7,0. Таким образом, наночастицы комплексов ХТЗ с к-КРГ можно рассматривать в качестве биосовместимых систем доставки лекарственных веществ анионной природы, обнаружение которых можно проводить спектральными методами.

Таблица 5.13 – Параметры высвобождения ФЛЦ из наночастиц ПЭК ХТЗ–КРГ

pH 2,0		pH 7,0	
n	$D \times 10^8, \text{см}^2/\text{с}$	n	$D \times 10^7, \text{см}^2/\text{с}$
0,36	3,04	0,33	2,23

5.3.3 Включение и высвобождение ванкомицина из наночастиц комплексов хитозан–к-каррагинан, содержащих квантовые точки на основе CdS/ZnS

В разделе 4.4 были продемонстрированы возможности квантовых точек «ядро-оболочка» CdS/ZnS как аналитических наносенсоров для оперативного обнаружения антибиотика ВНЦ в водных средах. Сочетание эффективной люминесценции КТ и биоактивных свойств ПЭК на основе ХТЗ позволяет создавать на их основе перспективные мультифункциональные диагностические и терапевтические носители. Биосовместимая полимерная основа выполняет при этом двойную функцию: позволяет снизить долгосрочные профили токсичности полупроводниковых нанокристаллов и обеспечивает пролонгированное высвобождение иммобилизованного ЛВ.

Люминесцентные наночастицы комплексов ХТЗ–КРГ с иммобилизованным ВНЦ получали путем смешения раствора ХТЗ с раствором КРГ, в который предварительно были добавлены растворы ВНЦ и дисперсии КТ CdS/ZnS. Эффективность иммобилизации ВНЦ на наночастицах ПЭК составила 95-97 % [200].

Предварительно были проведены исследования закономерностей адсорбции ВНЦ на частицах комплекса ХТЗ–КРГ и проведен анализ равновесных изотерм адсорбции с использованием моделей Ленгмюра (уравнение 2.10) и Фрейндлиха (уравнение 2.12). Удельную концентрацию адсорбированного на частицах ПЭК ВНЦ (q_e) находили по уравнению 2.9. В таблице 5.14 сведены результаты математической обработки экспериментальной изотермы адсорбции ВНЦ из водного раствора на частицах ПЭК по двум моделям. По значению параметра R_L можно сделать вывод, что условия для адсорбции ЛВ на частицах комплекса КРГ–ХТЗ благоприятны. Параметр $n > 1$, что свидетельствует о снижении энергии связывания ВНЦ комплексом в процессе заполнения его поверхности. Эти выводы согласуются с результатами адсорбции ФЛЦ на поверхности комплексов ХТЗ–КРГ. Как видно из таблицы, модель адсорбции Ленгмюра дает лучшую сходимость с экспериментальными результатами сорбции ВНЦ на частицах ПЭК, о чем говорят более высокие коэффициенты корреляции, полученные при линеаризации экспериментальной изотермы по модели Ленгмюра, по сравнению с моделью Фрейндлиха.

Таблица 5.14 – Константы изотерм адсорбции ВНЦ на частицах комплекса ХТЗ–КРГ* в рамках моделей Ленгмюра и Фрейндлиха

Константы изотермы адсорбции Ленгмюра			
q_m , мг/г	K_L , л/мг	R_L	R^2
3,052	0,523	0,037	0,927
Константы изотермы адсорбции Фрейндлиха			
K , л/мг	$1/n$	n	R^2
1,060	0,340	2,893	0,828

* Состав ПЭК – [ХТЗ] : [КРГ] = 1 : 1,5

При получении полимерного носителя ВНЦ в слабокислых условиях (рН 5,6) к макроцепи ПЭК ХТЗ–КРГ, несущей слабый положительный заряд (таблица 5.15), электростатически притягиваются отрицательно заряженные в водном растворе КТ CdS/ZnS и ионизованные карбоксильные группы ВНЦ. В полученной системе ПЭК–КТ–МПК–ВНЦ реализуется сложный комплекс межмолекулярных электростатических

взаимодействий, дополненный образованием водородных связей между отдельными функциональными группами компонентов. Данные таблицы 5.15 подтверждают эти предположения. ПЭК в присутствии КТ и ВНЦ имеет размер 141 нм и отрицательный ζ -потенциал. При увеличении содержания ВНЦ в ПЭК отмечается рост среднего размера частиц до 190 нм. ζ -потенциал комплекса ХТЗ–КРГ, содержащий КТ, в присутствии ВНЦ меняется незначительно, что указывает на коллоидную стабильность полимерных частиц в присутствии антибиотика и наночастиц CdS/ZnS. В работе [199] сообщалось, что положительно заряженные частицы могут вызывать неспецифическое прилипание клеток и взаимодействие с белками плазмы, в то время как отрицательно заряженные частицы легко поглощаются эндотелиальными клетками в печени. Поэтому отрицательно заряженные частицы ПЭК в качестве системы доставки ВНЦ могут быть полезными для предотвращения нежелательного взаимодействия с белками при длительном ее нахождении в кровотоке.

Таблица 5.15 – Размер и ζ -потенциал частиц ПЭК КРГ–ХТЗ, содержащих ВНЦ и КТ CdS/ZnS

Состав системы	Содержание ВНЦ, мкг/мл	Средний размер частиц d, нм	ζ -потенциал, мВ
КТ CdS/ZnS	–	10,2	–22,0
ПЭК*	–	102,7	+11,4
ПЭК+ CdS/ZnS (1,5 мг/мл) + ВНЦ	25	140,7	–36,1
	100	147,4	–38,8
	300	181,2	–40,2
	500	189,8	–40,9

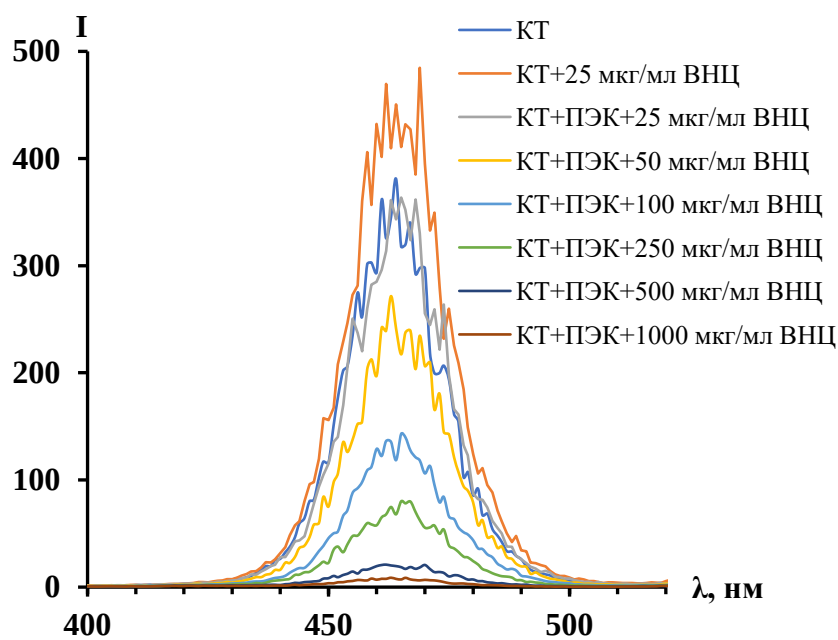
* Состав ПЭК – [ХТЗ] : [КРГ] = 1 : 1,5

Для исследования кинетических закономерностей высвобождения ВНЦ из инкапсулированной формы по тушению люминесценции наночастиц CdS/ZnS, необходимо оценить влияние ВНЦ, инкапсулированного в частицы комплексов ХТЗ–КРГ, на люминесценцию КТ. С этой целью были получены ПЭК, содержащие

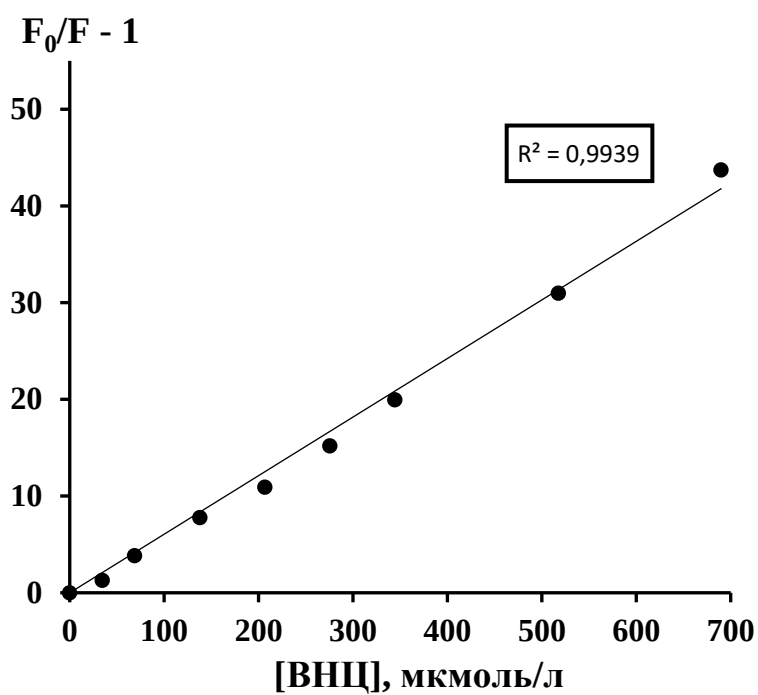
постоянное количество КТ, а ВНЦ – в широком интервале концентраций (от 25 до 1000 мкг/мл). Выбор содержания антибиотика в полимерном носителе был обусловлен тем, что при проведении антибактериальной терапии используются достаточно высокие его концентрации (500 мг – при приготовлении растворов для инфузий, 0,5 - 2 г – при приеме внутрь).

Зависимости интенсивности люминесценции КТ CdS/ZnS в присутствии иммобилизованного ВНЦ приведены на рисунке 5.13 а. Как показано в разделе 4.4, наночастицы CdS/ZnS имеют узкую полосу интенсивной люминесценции при 464 нм. При введении добавок свободного ВНЦ и его иммобилизованной формы положение пика люминесценции КТ не изменяется. Вместе с тем, обращает на себя внимание, что интенсивность люминесценции КТ зависит от концентрации ВНЦ и того, в какой форме он находится. В присутствии антибиотика с самой низкой из изученных нами концентраций ВНЦ (25 мкг/мл) отмечается увеличение интенсивности эмиссии КТ. Сам ВНЦ демонстрирует полосу люминесценции при 340 нм. Проявление собственной люминесценции антибиотика влияет на общую люминесценцию системы КТ–ВНЦ. Иммобилизованный в ПЭК ВНЦ той же концентрации практически не оказывает влияние на люминесцентные свойства наночастиц CdS/ZnS. При дальнейшем увеличении концентрации иммобилизованного антибиотика от 50 до 1000 мкг/мл отмечается тушение люминесценции КТ [200].

Для определения механизма и константы связывания ВНЦ, находящегося в инкапсулированной форме, с КТ CdS/ZnS строили графики в координатах Штерна–Фольмера (рисунок 5.13 б). Из рисунка видно, что зависимость $F_0/F - 1$ от концентрации ВНЦ представляет собой прямую линию с наклоном K в области концентраций тушителя 35–518 мкмоль/л (50–750 мкг/мл) и аппроксимируется уравнением с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,996$. Константа связывания КТ с ВНЦ, определенная по графику, составила 61000 л/моль. Таким образом, присутствие ВНЦ, иммобилизованного на наночастицах ПЭК ХТЗ–КРГ, оказывает схожее влияние на люминесцентные характеристики КТ, как и в случае свободного антибиотика (раздел 4.4). Полимерный носитель не влияет на люминесцентные свойства наночастиц CdS/ZnS и, следовательно, данные КТ можно использовать в качестве модельного оптического зонда при изучении высвобождения ВНЦ из систем замедленного релизинга.



а



б

Рисунок 5.13 – Спектры люминесценции дисперсий КТ CdS/ZnS, КТ в присутствии ВНЦ ($c_{ВНЦ} = 25$ мкг/мл) и КТ в присутствии ВНЦ различной концентрации, иммобилизованного в ПЭК (а); график в координатах Штерна–Фольмера для исследуемой системы (б) ($\lambda_{ex} = 370$ нм, содержание КТ 1,5 мг/мл, состав ПЭК – [ХТЗ] : [КРГ] = 1 : 1,5)

Далее исследовали кинетические закономерности высвобождения ВНЦ из наночастиц ПЭК ХТЗ–КРГ, содержащих КТ CdS/ZnS, в условиях *in vitro* (рисунок 5.14). В качестве приемных сред, имитирующих биологическую жидкость, использовали раствор трис-буфера, а также раствор АБ как модель белка крови. Альбумины – это простые белки в организме человека, которые являются основным компонентом крови, выполняющим функции транспорта неорганических ионов, гормонов, лекарственных веществ в крови. Особенностью многих антибиотиков является их высокая способность к связыванию с белками крови и поверхностью клеток, что существенно осложняет анализ их высвобождения из носителей в крови и других биожидкостях.

Как видно из рисунка, высвобождение ВНЦ из частиц ПЭК носит замедленный характер, 75-80 % антибиотика высвобождается за 10 часов. При проведении экспериментов по высвобождению с применением в качестве приемной среды раствора АБ отмечается замедление скорости выхода антибиотика из наночастиц ХТЗ–КРГ по сравнению с трис-буфером, что можно объяснить тем, что в растворе АБ часть ЛВ находится в связанном с белком виде.

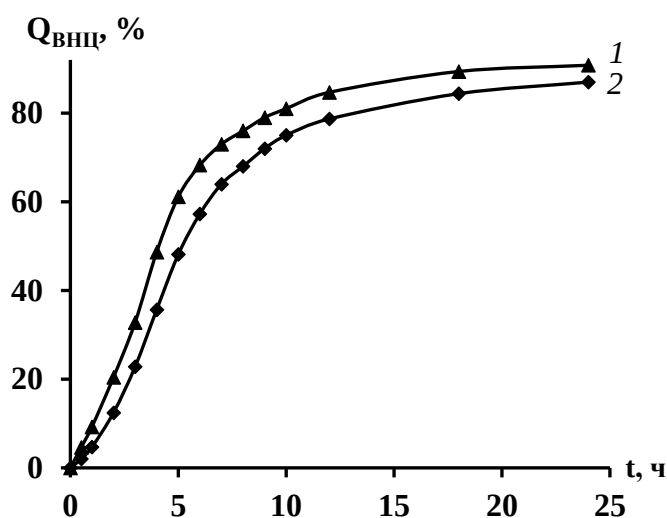


Рисунок 5.14 – Кинетические кривые высвобождения ВНЦ из наночастиц ПЭК ХТЗ–КРГ, содержащих КТ CdS/ZnS, в приемную среду: 1 – раствор трис-буфера; 2 – раствор АБ (70 мкг/мл)

Анализ механизма высвобождения ВНЦ из наночастиц ПЭК проводили также в рамках модели Корсмейера–Пеппаса. Данные таблицы 5.16 указывает на то, процесс высвобождения ВНЦ из частиц комплексов ХТЗ–КРГ происходит за счет его диффузии

из полимерной матрицы. Коэффициент диффузии ВНЦ в растворе белка имеет меньшее значение по сравнению с трис-буфером.

Таблица 5.16 – Параметры высвобождения ВНЦ из наночастиц ПЭК ХТЗ–КРГ, содержащих КТ, в приемные среды

Раствор трис-буфера		Раствор АБ (70 мкг/мл)	
n	$D \times 10^7, \text{см}^2/\text{с}$	n	$D \times 10^7, \text{см}^2/\text{с}$
0,40	2,82	0,42	2,11

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Разработан метод управления проницаемостью оболочек многослойных капсул на основе комплексов хитозана с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы, основанный на изменении полярности растворителя. Это позволило получить полиэлектролитные микрокапсулы с высокой эффективностью включения ацетилсалициловой кислоты, обладающие протекторными свойствами в кислых средах.
2. Получены гелевые частицы альгината кальция, модифицированные хитозаном, в качестве систем доставки цефотаксима, характеризующиеся высоким уровнем его инкапсуляции, регулируемым высвобождением в средах с различным рН и сохранением антимикробных свойств антибиотика.
3. Установлены механизмы адсорбции ванкомицина и флуоресцеина на наночастицах комплексов хитозана с κ -каррагинаном. Показано, что экспериментальную изотерму адсорбции флуоресцеина лучше описывает модель Фрейндлиха, а процесс адсорбции ванкомицина – модель Ленгмюра.
4. Синтезированы наночастицы полиэлектролитных комплексов хитозана и κ -каррагинана с квантовыми точками на основе CdS/ZnS для эффективной доставки ванкомицина. Показана возможность инкапсулированной формы ванкомицина тушить люминесценцию наночастиц CdS/ZnS, что позволяет использовать их в качестве модельных наносенсоров для обнаружения антибиотика.

5. Полученные системы доставки модельных лекарственных веществ на основе полиэлектролитных комплексов хитозана в виде различных лекарственных форм (капсулы, гели и наночастицы) характеризуются высоким уровнем включения активного компонента, контролируемым высвобождением и возможностью мониторинга данного процесса в режиме реального времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получены полиэлектролитные комплексы хитозана с анионными полисахаридами (натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы, альгинатом натрия, каррагинаном. Установлен характер влияния pH и состава растворителя на закономерности их образования и коллоидно-химические характеристики в различных средах.

2. Выявлены особенности межмолекулярного взаимодействия хитозана и его полиэлектролитных комплексов с включенными в них модельными лекарственными веществами. Определен состав, устойчивость комплексов и показано, что основными механизмами комплексообразования является электростатическое взаимодействие и образование водородных связей.

3. Методом послойной адсорбции хитозана и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы на микрочастицы карбоната натрия получены многослойные микрокапсулы с инкапсулированной ацетилсалициловой кислотой. Предложен способ варьирования проницаемости капсул, основанный на изменении полярности растворителя путем введения в водный раствор 50 об. % этанола, посредством которого были получены микрокапсулы с высокой эффективностью инкапсулирования ацетилсалициловой кислоты, обладающие протекторными свойствами в кислых средах.

4. Методом иотропного гелеобразования получены pH-чувствительные гелевые сферы альгината кальция, модифицированные хитозаном, со средним диаметром $2,0 \pm 0,05$ мм, для иммобилизации антибиотика цефотаксима. Установлено, что набухание гелей и высвобождение цефотаксима из них в условиях *in vitro* в среды, имитирующие биологические жидкости в организме человека при пероральной доставке, являются pH-зависимыми процессами. Показано, что наличие поверхностного слоя полиэлектролитного комплекса на сферах альгината кальция позволяет увеличить время выхода цефотаксима.

5. Синтезированы наночастицы хитозана и его полиэлектролитного комплекса с к-каррагинаном как потенциальные носители оптических зондов и антибиотика ванкомицина. Наночастицы получены методами микроволновой и гидротермальной обработки растворов хитозана и каррагинана при различных температурах и времени обработки, соотношении и концентрации исходных полиэлектролитов.

6. Продемонстрированы возможности наносенсоров на основе тушения люминесценции квантовых точек «ядро-оболочка» CdS/ZnS и CdS/ZnS , допированных ионами марганца (II), для оперативного обнаружения антибиотика ванкомицина в водных средах. Показано, что тушение люминесценции квантовых точек CdS/ZnS ванкомицином имеет линейную зависимость в диапазоне концентраций 35-690 мкмоль/л, квантовых точек $\text{Cd}_{0.9}\text{Mn}_{0.1}\text{S/ZnS}$ – в более узком диапазоне 0-207 мкмоль/л. Значения предела обнаружения ванкомицина составили 5,2 и 1,9 мкмоль/л с использованием квантовых точек CdS/ZnS и CdS/ZnS , допированных ионами Mn (II), соответственно.

7. Получены люминесцентные системы доставки ванкомицина на основе наночастиц полиэлектролитного комплекса хитозана с к-каррагинаном, содержащие квантовые точки CdS/ZnS и $\text{Cd}_{0.9}\text{Mn}_{0.1}\text{S/ZnS}$, для целей тераностики, обеспечивающие визуализацию и пролонгированный характер высвобождения антибиотика.

8. Анализ кинетических данных высвобождения модельных лекарственных веществ из полученных полимерных носителей в рамках математической модели Корсмейера–Пеппаса показал отклонение механизма высвобождения от диффузионного механизма и его зависимость от природы полимерной матрицы и лекарственного компонента.

Установленные для модельных лекарственных веществ закономерности процессов инкапсулирования и высвобождения из полимерных носителей в условиях *in vitro* позволят прогнозировать механизм доставки и их эффективность в более сложных реальных живых системах. Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в разработке новых эффективных биосовместимых лекарственных форм для тераностики, способных иммобилизовать специфические лекарственные вещества и оптические зонды для биологической визуализации, сочетая в себе диагностический и терапевтический потенциал.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ХТЗ – хитозан

АЛГ-Na – альгинат натрия

АЛГ-Ca – альгинат кальция

Na-КМЦ – натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы

КРГ – каррагинан

κ-КРГ – каппа-каррагинана

ПЭК – полиэлектролитный комплекс

ЛВ – лекарственное вещество

БАВ – биологически активное вещество

АСК – ацетилсалициловая кислота

ФЛЦ – флуоресцеин

ЦФТ – цефотаксим

ВНЦ – ванкомицин

КТ – квантовые точки

УКТ – углеродные квантовые точки

D – коэффициент диффузии

ДРС – динамическое светорассеяние

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барабанов, В.П. Растворы полиэлектролитов. Избранные статьи / В.П. Барабанов. – М.: ЗАО «Отраслевые ведомости», 2003. – 248 с.
2. Chakraborty, G. Polyelectrolyte–dye interactions: An overview / G. Chakraborty, A. Bhattacharai, R. De // *Polymers*. – 2022. – V. 14. – № 3. – P. 1-17.
3. Petrila, L.M. Polyelectrolyte multilayers: An overview on fabrication, properties, and biomedical and environmental applications / L.M. Petrila, F. Bucatariu, M. Mihai, C. Teodosiu // *Materials*. – 2021. – V. 14. – № 15. – P. 1-29.
4. León-Campos, M.I. Polyelectrolyte-based hydrogels for biomedicine / M.I. León-Campos, J.A. Claudio-Rizo, M. Caldera-Villalobos, D.A. Cabrera-Munguía, J.J. Mendoza-Villafañá, L.F. Cano-Salazar, & T.E. Flores-Guía // *Mediterranean Journal of Basic and Applied Sciences*. – 2023. – V. 7. – № 1. – P. 58-74.
5. Кабанов, В.А. Физико-химические основы и перспективы применения интерполиэлектролитных комплексов (Обзор) / В.А. Кабанов // *Высокомолекулярные соединения. Серия С*. – 1994. – Т. 36. – № 2. – С. 183-197.
6. Cai, J. Preparation of copper-chelate quaternized carboxymethyl chitosan/organic rectorite nanocomposites for algae inhibition / J. Cai, W. Ye, X. Wang, W. Lin, Q. Lin, Q. Zhang, F. Wu // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – V. 151. – P. 130-134.
7. Sivakumar, P.M. Anionic polysaccharides as delivery carriers for cancer therapy and theranostics: An overview of significance / P.M. Sivakumar, A. Zarepour, S. Akhte, G. Perumal, A. Khosravi P. Balasekar, A. Zarrabi // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2025. – V. 294. – ID 139211.
8. Avazverdi, E. Polysaccharide-based polyampholyte complex formation: Investigating the role of intra-chain interactions / E. Avazverdi, H. Mirzadeh, M. Ehsani, S. Bagheri-Khoulenjani // *Carbohydrate Polymers*. – 2023. – V. 313. – ID 120836.
9. Chaturvedi, K. Sodium alginate in drug delivery and biomedical areas / K. Chaturvedi, K. Ganguly, U.A. More, K.R. Reddy, T. Dugge, B. Naik, M.N. Noolvi // *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications*. – Academic Press, 2019. – P. 59-100.

10. Kukrety, A. Comprehension on the synthesis of carboxymethylcellulose (CMC) utilizing various cellulose rich waste biomass resources / A. Kukrety, R.K. Singh, P. Singh, S.S. Ray // *Waste and Biomass Valorization*. – 2018. – V. 9. – P. 1587-1595.
11. Liu, J. Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects / J. Liu, X. Zhan, J. Wan, Y. Wang, C. Wang // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – V. 121. – P. 27-36.
12. Liu, C. Novel biodegradable lipid nano complex for siRNA delivery significantly improving the chemosensitivity of human colon cancer stem cells to paclitaxel / C. Liu, G. Zhao, J. Liu, N. Ma, P. Chivukula, L. Perelman, L. Yu // *Journal of Controlled Release*. – 2009. – V. 140. – № 3. – P. 277-283.
13. Maksimenko, A. In vivo potentialities of EWS-Fli-1 targeted antisense oligonucleotides-nanospheres complexes / A. Maksimenko, V. Polard, M. Villemeur, H. Elhamess, P. Couvreur, J. R. Bertrand, C. Malvy // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2005. – V. 1058. – № 1. – P. 52-61.
14. Park, H.S. Hyaluronic Acid/Poly (β -Amino Ester) polymer nanogels for cancer-cell-specific NIR fluorescence switch / H.S. Park, J.E. Lee, M.Y. Cho, J.H. Hong, S.H. Cho, Y.T. Lim // *Macromolecular Rapid Communications*. – 2012. – V. 33. – № 18. – P. 1549-1555.
15. Choi, K.Y. Versatile RNA interference nanoplatform for systemic delivery of RNAs / K.Y. Choi, O.F. Silvestre, X. Huang, K.H. Min, G.P. Howard, N. Hida, X. Chen // *ACS Nano*. – 2014. – V. 8. – № 5. – P. 4559-4570.
16. Kusakabe, T. Intranasal hydroxypropyl- β -cyclodextrin-adjuvanted influenza vaccine protects against sub-heterologous virus infection / T. Kusakabe, K. Ozasa, S. Kobari, M. Momota, N. Kishishita, K. Kobiyama, K.J. Ishii // *Vaccine*. – 2016. – V. 34. – № 27. – P. 3191-3198.
17. Zhang, W. Targeting CpG adjuvant to lymph node via dextran conjugate enhances antitumor immunotherapy / W. Zhang, M. An, J. Xi, H. Liu // *Bioconjugate Chemistry*. – 2017. – V. 28. – № 7. – P. 1993-2000.
18. Saremi, S. Enhanced oral delivery of docetaxel using thiolated chitosan nanoparticles: preparation, in vitro and in vivo studies / S. Saremi, R. Dinarvand, A. Kebriaeezadeh, S.N. Ostad, F. Atyabi // *BioMed Research International*. – 2013. – V. 2013. – № 1. – ID 150478.

19. Choukaife, H. Current advances in chitosan nanoparticles based oral drug delivery for colorectal cancer treatment / H. Choukaife, S. Seyam, B. Alallam, A.A. Doolaanea, M. Alfatama // *International Journal of Nanomedicine*. – 2022. – V. 17. – P. 3933-3966.
20. Song, H. Hydrogen-bonded network enables polyelectrolyte complex hydrogels with high stretchability, excellent fatigue resistance and self-healability for human motion detection / H. Song, Y. Sun, J. Zhu, J. Xu, C. Zhang, T. Liu // *Composites Part B: Engineering*. – 2021. – V. 217. – ID 108901.
21. Costa, M.P. Interaction of polyelectrolyte complex between sodium alginate and chitosan dimers with a single glyphosate molecule: A DFT and NBO study / M.P. Costa, L.M. Prates, L. Baptista, M.T. Cruz, I.L. Ferreira // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – V. 198. – P. 51-60.
22. Tsuchida, E. Formation of polyelectrolyte complexes and their structures / E. Tsuchida // *Journal of Macromolecular Science – Pure and Applied Chemistry*. – 1994. – V. 31. – № 1. – P. 1-15.
23. Lankalapalli, S. Polyelectrolyte complexes: A review of their applicability in drug delivery technology / S. Lankalapalli, V.R.M. Kolapalli // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2009. – V. 71. – № 5. – P. 481.
24. Kovačević, D. The influence of ionic strength, electrolyte type and preparation procedure on formation of weak polyelectrolyte complexes / D. Kovačević, S. Borković, J. Požar // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2007. – V. 302. – № 1-3. – P. 107-112.
25. Van Hees, I.A. Temperature-responsive polyelectrolyte complexes for bio-inspired underwater adhesives / I.A. Van Hees, A.H. Hofman, M. Dompé, J. Van der Gucht, M. Kamperman // *European Polymer Journal*. – 2020. – V. 141. – ID 110034.
26. Prajapati, V.D. Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications / V.D. Prajapati, G.K. Jani, S.M. Khanda // *Carbohydrate Polymers*. – 2013. – V. 95. – № 1. – P. 540-549.
27. Fundueanu, G. Pullulan–cyclodextrin microspheres: a chromatographic approach for the evaluation of the drug–cyclodextrin interactions and the determination of the drug release profiles / G. Fundueanu, M. Constantin, D. Mihai, F. Bortolotti, R. Cortesi, P. Ascenzi, E. Menegatti // *Journal of Chromatography B*. – 2003. – V. 791. – № 1-2. – P. 407-419.

28. Singh, R.S. Pullulan: microbial sources, production and applications / R.S. Singh, G.K. Saini, J.F. Kennedy // *Carbohydrate Polymers*. – 2008. – V. 73. – № 4. – P. 515-531.
29. Seymour, L. Intraperitoneal and subcutaneous retention of a soluble polymeric drug-carrier bearing galactose / L. Seymour, R. Duncan, V. Chytrý, J. Strohalm, J.K. Ulbrich, J. Kopeček // *Journal of Controlled Release*. – 1991. – V. 16. – № 3. – P. 255-262.
30. Chawla, J.S. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen / J.S. Chawla, M.M. Amiji // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2002. – V. 249. – № 1-2. – P. 127-138.
31. Debele, T.A. Synthesis and characterization of bio-reducible heparin-polyethyleneimine nanogels: application as imaging-guided photosensitizer delivery vehicle in photodynamic therapy / T.A. Debele, S.L. Mekuria, S.Y. Lin, H.C. Tsai // *RSC Advances*. – 2016. – V. 6. – № 18. – P. 14692-14704.
32. Knop, K. Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives / K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U.S. Schubert // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2010. – V. 49. – № 36. – P. 6288-6308.
33. Kan, B. Carbohydrate nanocarriers in biomedical applications: functionalization and construction / B. Kang, T. Opatz, K. Landfester, F.R. Wurm // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – V. 44. – № 22. – P. 8301-8325.
34. Aizawa, M. Stability of dextran solutions / M. Aizawa, S. Suzuki, T. Kuoka, N. Nakajima, Y. Iwao // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. – 1976. – V. 49. – № 8. – P. 2061-2065.
35. Naessens, M. Leuconostoc dextranase and dextran: production, properties and applications / M. Naessens, A.N. Cerdobbel, W. Soetaert, E.J. Vandamme // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*. – 2005. – V. 80. – № 8. – P. 845-860.
36. Nur, M. Can natural polymers assist in delivering insulin orally? / M. Nur, T. Vasiljevic // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – V. 103. – P. 889-901.
37. Yadav, L.R. Chitosan-based 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering / L.R. Yadav, S.V. Chandran, K. Lavanya, N. Selvamurugan // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – V. 183. – P. 1925-1938.

38. Kunrath, M.F. Metallic-nanoparticle release systems for biomedical implant surfaces: Effectiveness and safety / M.F. Kunrath, M.M. Campos // *Nanotoxicology*. – 2021. – V. 15. – № 6. – P. 721-739.
39. Lin, M.H. Hybrid ZnO/chitosan antimicrobial coatings with enhanced mechanical and bioactive properties for titanium implants / M.H. Lin, Y.H. Wang, C.H. Kuo, S.F. Ou, P.Z. Huang, T.Y. Song // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – V. 257. – P. 1-10.
40. Suarato, G. Borrowing from nature: biopolymers and biocomposites as smart wound care materials / G. Suarato, R. Bertorelli, A. Athanassiou // *Bioengineering and Biotechnology*. – 2018. – V. 6. – P. 1-11.
41. George, A. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review / A. George, P.A. Shah, P.S. Shrivastav // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2019. – V. 561. – P. 244-264.
42. Salamanca, C.H. Natural gum-type biopolymers as potential modified nonpolar drug release systems / C.H. Salamanca, C.J. Yarce, R.A. Moreno V. Prieto, J. Recalde // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – V. 189. – P. 31-38.
43. Yahoum, M.M. Synthesis, physicochemical, structural and rheological characterizations of carboxymethyl xanthan derivatives / M.M. Yahoum, N. Moulai-Mostefa, D. Le Cerf // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – V. 154. – P. 267-275.
44. Shah, K.U. Thiomers and their potential applications in drug delivery / K.U. Shah, S.U. Shah, N. Dilawar, G.M. Khan, S. Gibaud // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2017. – V. 14. – № 5. – P. 601-610.
45. Federer, C. Thiolated chitosans: A multi-talented class of polymers for various applications / C. Federer, M. Kurpiers, A. Bernkop-Schnürch // *Biomacromolecules*. – 2020. – V. 22. – № 1. – P. 24-56.
46. Puri, V. Thiolation of biopolymers for developing drug delivery systems with enhanced mechanical and mucoadhesive properties: A review / V. Puri, A. Sharma, P. Kumar, I. Singh // *Polymers*. – 2020. – V. 12. – № 8. – P. 1-27
47. Meka, V.S. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes / V.S. Meka, M.K. Sing, M.R. Pichika, S.R. Nali, V.R. Kolapalli, P. Kesharwani // *Drug Discovery Today*. – 2017. – V. 22. – № 11. – P. 1697-1706.

48. Fan, Y. Natural polysaccharides based self-assembled nanoparticles for biomedical applications—A review / Y. Fan, Y. Liu, Y. Wu, F. Dai, M. Yuan, F. Wang, H. Deng // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – V. 192. – P. 1240-1255.
49. Mende, M. Influence of the hydrophobicity of polyelectrolytes on polyelectrolyte complex formation and complex particle structure and shape / M. Mende, S. Schwarz, S. Zschoche, G. Petzold, A. Janke // *Polymers*. – 2011. – V. 3. – № 3. – P. 1363-1376.
50. Song, H. Hydrogen-bonded network enables polyelectrolyte complex hydrogels with high stretchability, excellent fatigue resistance and self-healability for human motion detection / H. Song, Y. Sun, J. Zhu, J. Xu, C. Zhang, T. Liu // *Composites Part B: Engineering*. – 2021. – V. 217. – ID 108901.
51. Beatty, A.M. Open-framework coordination complexes from hydrogen-bonded networks: toward host/guest complexes / A.M. Beatty // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2003. – V. 246. – № 1-2. – P. 131-143.
52. Luo, D. Interparticle forces underlying nanoparticle self-assemblies / D. Luo, C. Yan, T. Wang // *Small*. – 2015. – V. 11. – № 45. – P. 5984-6008.
53. Zhu, T. Ferroptosis promotes photodynamic therapy: supramolecular photosensitizer-inducer nanodrug for enhanced cancer treatment / T. Zhu, L. Shi, C. Yu, Y. Dong, F. Qiu, L. Shen, X. Zhu // *Theranostics*. – 2019. – V. 9. – № 11. – P. 3293-3307.
54. Dakhara, S.L. Polyelectrolyte complex: A pharmaceutical review / S.L. Dakhara, C.C. Anajwala // *Systematic Reviews in Pharmacy*. – 2010. – V. 1. – № 2. – P. 121-127.
55. Gradzielski, M. Polyelectrolyte–surfactant complexes as a formulation tool for drug delivery / M. Gradzielski // *Langmuir*. – 2022. – V. 38. – № 44. – P. 13330-13343.
56. Lin, K. pH-Dependent complexation and polyelectrolyte chain conformation of polyzwitterion–polycation coacervates in salted water / K. Lin, B. Jing, Y. Zhy // *Soft Matter*. – 2021. – V. 17. – № 39. – P. 8937-8949.
57. Ermi, B.D. Domain structures in low ionic strength polyelectrolyte solutions / B.D. Ermi, E.J. Amis // *Macromolecules*. – 1998. – V. 31. – № 21. – P. 7378-7384.
58. Pogodina, N.V. Structure and dynamics of the polyelectrolyte complex formation / N.V. Pogodina, N.V. Tsvetkov // *Macromolecules*. – 1997. – V. 30. – № 17. – P. 4897-4904.
59. Wasupalli, G.K. Molecular interactions in self-assembled nano-structures of chitosan-sodium alginate based polyelectrolyte complexes / G.K. Wasupalli, D. Verma // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – V. 114. – P. 10-17.

60. Turgeon, S.L. Protein-polysaccharide complexes and coacervates / S.L. Turgeon, C. Schmitt, C. Sanchez // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. – 2007. – V. 12. – № 4-5. – P. 166-178.
61. Mende, M. The stability of polyelectrolyte complex systems of poly (diallyldimethylammonium chloride) with different polyanions / M. Mende, H.M. Buchhammer, S. Schwarz, G. Petzold, W. Jaeger // *Macromolecular Symposia*. – 2004. – V. 211. – № 1. – P. 121-134.
62. Chavez, B.A. A comparative analysis of biopolymer production by microbial and bioelectrochemical technologies / B.A. Chavez, V. Raghavan, B. Tartakovsky // *RSC Advances*. – 2022. – V. 12. – № 25. – P. 16105-16118.
63. Jagtap, P. Polyelectrolyte complex for drug delivery in biomedical applications: A Review / P. Jagtap, K. Patil, P. Dhatrak // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. – IOP Publishing, 2021. – V. 1183. – № 1. – ID 012007.
64. Sithole, M.N. A review of semi-synthetic biopolymer complexes: modified polysaccharide nano-carriers for enhancement of oral drug bioavailability / M.N. Sithole, Y.E. Choonara, L.C. du Toit, P. Kumar, V. Pillay // *Pharmaceutical Development and Technology*. – 2017. – V. 22. – № 2. – P. 283-295.
65. Nguyen, D.H. Disulfide-crosslinked heparin-pluronic nanogels as a redox-sensitive nanocarrier for intracellular protein delivery / D.H. Nguyen, J.H. Choi, Y.K. Joung, K.D. Park // *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. – 2011. – V. 26. – № 3. – P. 287-300.
66. Foged, C. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model / C. Foged, B. Brodin, S. Frokjaer, A. Sundblad // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2005. – V. 298. – № 2. – P. 315-322.
67. Francis, M.F. Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how / M.F. Francis, M. Cristea, F.M. Winnik // *Pure and Applied Chemistry*. – 2004. – V. 76. – № 7-8. – P. 1321-1335.
68. Saremi, S. Enhanced oral delivery of docetaxel using thiolated chitosan nanoparticles: preparation, in vitro and in vivo studies / S. Saremi, R. Dinarvand, A. Kebriaeezadeh, S.N. Ostad, F. Atyabi // *BioMed Research International*. – 2013. – V. 2013. – № 1. – ID 150478.
69. Goycoolea, F.M. Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules / F.M. Goycoolea, G. Lollo, C. Remunán-López, F. Quaglia, M.J. Alonso // *Biomacromolecules*. – 2009. – V. 10. – № 7. – P. 1736-1743.

70. Huang, P. Improving the oral delivery efficiency of anticancer drugs by chitosan coated polycaprolactone-grafted hyaluronic acid nanoparticles / P. Huang, C. Yang, J. Liu, W. Wang, S. Guo, J. Li, A. Dong // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2014. – V. 2. – № 25. – P. 4021-4033.
71. Grenha, A. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications / A. Grenha, M.E. Gomes, M. Rodrigues, V.E. Santo, J.F. Mano, N.M. Neves, R.L. Reis // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2010. – V. 92. – № 4. – P. 1265-1272.
72. Gooneh-Farahani, S. Stimuli-responsive graphene-incorporated multifunctional chitosan for drug delivery applications: a review / S. Gooneh-Farahani, M.R. Naimi-Jamal, S.M. Naghib // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2019. – V. 16. – № 1. – P. 79-99.
73. Lee, C. Bioinspired, calcium-free alginate hydrogels with tunable physical and mechanical properties and improved biocompatibility / C. Lee, J. Shin, J.S. Lee, E. Byun, J.H. Ryu, S.H. Um, S.W. Cho // *Biomacromolecules*. – 2013. – V. 14. – № 6. – P. 2004-2013.
74. Elzatahry, A.A. Evaluation of alginate–chitosan bioadhesive beads as a drug delivery system for the controlled release of theophylline / A.A. Elzatahry, M.M. Eldin, E.A. Soliman, E.A. Hassan // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2009. – V. 111. – № 5. – P. 2452-2459.
75. Castelli, F. Differential scanning calorimetry study on drug release from an inulin-based hydrogel and its interaction with a biomembrane model: pH and loading effect / F. Castelli, M.G. Sarpietro, D. Micieli, S. Ottimo, G. Pitarresi, G. Tripodo, G. Giammona // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2008. – V. 35. – № 1-2. – P. 76-85.
76. Du, J. Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan–chitosan nanoparticles for drug delivery. II. Release of albumin in vitro / J. Du, S. Zhang, R. Sun, L.F. Zhang, C.D. Xiong, Y.X. Peng // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2005. – V. 72. – № 2. – P. 299-304.
77. Fu, C. Protein-based bioactive coatings: from nanoarchitectonics to applications / C. Fu, Z. Wang, X. Zhou, B. Hu, C. Li, P. Yang // *Chemical Society Reviews*. – 2024. – T. 53. – № 3. – P. 1514-1551.

78. Cai, X. A layer-by-layer assembled and carbon nanotubes/gold nanoparticles-based bienzyme biosensor for cholesterol detection / X. Cai, X.Gao, L. Wang, Q. Wu, X. Lin // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2013. – V. 181. – P. 575-583.
79. Alkekha, D. Layer-by-layer biomaterials for drug delivery / D. Alkekha, P.T. Hammond, A. Shukla // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2020. – V. 22. – № 1. – P. 1-24.
80. Sukhorukov, G.B. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds. / G.B. Sukhorukov, D.V. Volodkin, A.M. Günther, A.I. Petrov, D.B. Shenoy, H. Möhwald // *Journal of Materials Chemistry* . – 2004. – V. 14. – P. 2073-2081
81. Gao, C. The decomposition process of melamine formaldehyde cores: the key step in the fabrication of ultrathin polyelectrolyte multilayer capsules / C. Gao, S. Moya, H. Lichtenfeld, A. Casoli, H. Fiedler, E. Donath, H. Möhwald, H. // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2001. – V. 286. – № 6. – P. 355-361.
82. Schuetz, P. Copper-assisted weak polyelectrolyte multilayer formation on microspheres and subsequent film crosslinking / P. Schuetz, F. Caruso // *Advanced Functional Materials*. – 2003. – V. 13. – № 12. – P. 929-937.
83. Ribeiro, C. Preparation of well-dispersed chitosan/alginate hollow multilayered microcapsules for enhanced cellular internalization / C. Ribeiro, J. Borges, A.M. Costa, V.M. Gaspar, V.D.Z. Bermudez, J.F. Mano // *Molecules*. – 2018. – V. 23. – № 3. – P. 1-16.
84. Wang, F.J. Biocompatible microcapsule of carboxymethyl cellulose/chitosan as drug carrier / F.J. Wang, F.S. Lu, M. Cui, Z.Q. Shao // *Advanced Materials Research*. – 2015. – V. 1118. – P. 227-236.
85. Varma, V.M. Factors affecting mechanism and kinetics of drug release from matrix-based oral controlled drug delivery systems / V.M. Varma, A.M. Kaushal, A. Garg, S. Garg // *American Journal of Drug Delivery*. – 2004. – V. 2. – P. 43-57.
86. Jamaledin, R. Engineered microneedle patches for controlled release of active compounds: recent advances in release profile tuning / R. Jamaledin, P. Makvandi, C.K. Yiu, T. Agarwal, R. Vecchione, W. Sun, P.A. Netti // *Advanced Therapeutics*. – 2020. – V. 3. – № 12. – ID 2000171.

87. Panchagnula, R. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research / R. Panchagnula, N.S. Thomas // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2000. – V. 201. – № 2. – P. 131-150.
88. Bettini, R. Translocation of drug particles in HPMC matrix gel layer: effect of drug solubility and influence on release rate / R. Bettini, P.L. Catellani, P. Santi, G. Massimo, N.A. Peppas, P. Colombo // *Journal of Controlled Release*. – 2001. – V. 70. – № 3. – P. 383-391.
89. de Llarduya, M.T. Oxazepam dissolution rate from hydroxypropylmethylcellulose matrices / M.T.de Llarduya, C. Martin, M.M. Goñi, M.C. Martínez-Ohárriz // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 1997. – V. 23. – № 4. – P. 393-396.
90. Brazel, C.S. Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers / C.S. Brazel, N.A. Peppas // *Polymer*. – 1999. – V. 40. – № 12. – p. 3383-3398.
91. Amsden, B. Review of osmotic pressure driven release of proteins from monolithic devices / B. Amsden // *Journal of Pharmaceutical Science*. – 2007. – M. 10. – P. 129-143.
92. Patil, P.B. A review: osmotic drug delivery system / P.B. Patil, K.B. Uphade, R.B. Saudagar // *Pharma Science Monitor*. – 2018. – V. 9. – № 2. – P. 283-300.
93. Hallare, J. Half life / J. Hallare, V. Gerriets // *StatPearls* [Internet]. – StatPearls Publishing, 2023.
94. Kini, S. Mechanism of anti-cancer activity of benomyl loaded nanoparticles in multidrug resistant cancer cells / S. Kini, D. Bahadur, D. Panda // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. – 2015. – V. 11. – № 5. – P. 877-889.
95. Hopkinson, I. Fickian and Case II diffusion of water into amylose: A stray field NMR study / I. Hopkinson, R.A.L. Jones, S. Black, D.M. Lane, P.J. McDonald // *Carbohydrate Polymers*. – 1997. – V. 34. – № 1-2. – P. 39-47.
96. Rai, G. Eudragit-coated dextran microspheres of 5-fluorouracil for site-specific delivery to colon / G. Rai, A.K. Yadav, N.K. Jain, G.P. Agrawal // *Drug Delivery*. – 2016. – V. 23. – № 1. – P. 328-337.
97. Deirram, N. pH-responsive polymer nanoparticles for drug delivery / N. Deirram, C. Zhang, S.S. Kermaniyan, A.P. Johnston, G.K. Such // *Macromolecular Rapid Communications*. – 2019. – V. 40. – № 10. – ID 1800917.
98. Vivek, R. pH-responsive drug delivery of chitosan nanoparticles as Tamoxifen carriers for effective anti-tumor activity in breast cancer cells / R. Vivek, V. Babu, R.T hangam, K.S.

- Subramanian, S. Kannan // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – V. 111. – P. 117-123.
99. Babu, A. Multifaceted applications of chitosan in cancer drug delivery and therapy / A. Babu, R. Ramesh // *Marine Drugs*. – 2017. – V. 15. – № 4. – P. 96-114.
100. Baveja, S. K. Zero-order release hydrophilic matrix tablets of β -adrenergic blockers / S.K. Baveja, K.V. Rao, K.P. Devi // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1987. – V. 39. – № 1-2. – P. 39-45.
101. Monteiro, P.F. Reduction-responsive polymers for drug delivery in cancer therapy – Is there anything new to discover? / P.F. Monteiro, A. Travanut, C. Conte, C. Alexander // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2021. – V. 13. – № 2. – e1678.
102. Geiselhart, C.M. Degradable redox-responsive polyolefins / C.M. Geiselhart, W. Xue, C. Barner-Kowollik, H. Mutlu // *Macromolecules*. – 2021. – V. 54. – № 4. – P. 1775-1782.
103. Johnson, J.L. Influence of ionic strength on matrix integrity and drug release from hydroxypropyl cellulose compacts / J.L. Johnson, J. Holinej, M.D. Williams // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1993. – V. 90. – № 2. – P. 151-159.
104. Lee, S. Cathepsin B-responsive liposomes for controlled anticancer drug delivery in Hep G2 cells / S. Lee, S.J. Song, J. Lee, T.H. Ha, J.S. Choi // *Pharmaceutics*. – 2020. – V. 12. – № 9. – P. 876-888.
105. Zhao, W. Remote light-responsive nanocarriers for controlled drug delivery: advances and perspectives / W. Zhao, Y. Zhao, Q. Wang, T. Liu, J. Sun, R. Zhang // *Small*. – 2019. – V. 15. – № 45. – ID 1903060.
106. Hirakura, T. Photoresponsive nanogels formed by the self-assembly of spiropyran-bearing pullulan that act as artificial molecular chaperones / T. Hirakura, Y. Nomura, Y. Aoyama, K. Akiyoshi // *Biomacromolecules*. – 2004. – V. 5. – № 5. – P. 1804-1809.
107. Jain, K. Tunable LCST behavior of poly (N-isopropylacrylamide/ionic liquid) copolymers / K. Jain, R. Vedarajan, M. Watanabe, M. Ishikiriya, N. Matsumi // *Polymer Chemistry*. – 2015. – V. 6. – № 38. – P. 6819-6825.
108. Liu, M. Injectable thermoresponsive hydrogel formed by alginate-g-poly (N-isopropylacrylamide) that releases doxorubicin-encapsulated micelles as a smart drug delivery system / M. Liu, X. Song, Y. Wen, J.L. Zhu, J. Li // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2017. – V. 9. – № 41. – P. 35673-35682.

109. Tu, Y. Advances in injectable self-healing biomedical hydrogels / Y. Tu, N. Chen, C. Li, H. Liu, R. Zhu, S. Chen, L. He // *Acta Biomaterialia*. – 2019. – V. 90. – P. 1-20.
110. Xie, J. Nanoparticle-based theranostic agents / J. Xie, S. Lee, X. Chen // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2010. – V. 62. – № 11. – P. 1064-1079.
111. Toy, R. Targeted nanotechnology for cancer imaging / R. Toy, L. Bauer, C. Hoimes, K.B. Ghaghada, E. Karathanasis // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2014. – V. 76. – P. 79-97.
112. Park, J.H. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives / J.H. Park, G. Saravanakumar, K. Kim, I.C. Kwon // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2010. – V. 62. – № 1. – P. 28-41.
113. Elugoke, S.E. Carbon quantum dots: basics, properties, and fundamentals / S.E. Elugoke, G.E. Uwaya, T.W. Quadri, E.E. Ebenso // *Carbon Dots: Recent Developments and Future Perspectives*. – American Chemical Society, 2024. – P. 3-42.
114. Smith, A.M. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging / A.M. Smith, H. Duan, A.M. Mohs, S. Nie // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2008. – V. 60. – № 11. – P. 1226-1240.
115. Derfus, A.M. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots / A.M. Derfus, W.C. Chan, S.N. Bhatia // *Nano Letters*. – 2004. – V. 4. – № 1. – P. 11-18.
116. Chandra, S. Tuning of photoluminescence on different surface functionalized carbon quantum dots / S. Chandra, S.H. Pathan, S. Mitra, B.H. Modha, A. Goswami, P. Pramanik // *RSC Advances*. – 2012. – V. 2. – № 9. – P. 3602-3606.
117. Huang, M. Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells / M. Huang, Z. Ma, E. Khor, L.Y. Lim // *Pharmaceutical Research*. – 2002. – V. 19. – P. 1488-1494.
118. Zhao, J. Preparation and characterization of the fluorescent chitosan nanoparticle probe / J. Zhao, J. Wu // *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. – 2006. – V. 34. – № 11. – P. 1555-1559.
119. Yoon, H.Y. Glycol chitosan nanoparticles as specialized cancer therapeutic vehicles: Sequential delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA / H.Y. Yoon, S. Son, S.J. Lee, D.G. You, J.Y. Yhee, J.H. Park, M.G. Pomper // *Scientific Reports*. – 2014. – V. 4. – № 1. – P. 6878-6890.
120. Etgar, L. Synthesis of water-soluble PbSe quantum dots / L. Etgar, E. Lifshitz, R. Annenbaum // *Journal of Materials Research*. – 2008. – V. 23. – № 4. – P. 899-903.

121. Mathew, S.A. Luminescent chitosan/carbon dots as an effective nano-drug carrier for neurodegenerative diseases / S.A. Mathew, P. raveena, S. Dhanavel, R. Manikandan, S. Senthilkumar, A. Stephen // RSC Advances. – 2020. – V. 10. – № 41. – P. 24386-24396.
122. Wang, C. Multifunctional chitosan magnetic-graphene (CMG) nanoparticles: a theranostic platform for tumor-targeted co-delivery of drugs, genes and MRI contrast agents / C. Wang, S. Ravi, U.S. Garapati, M. Das, M. Howell, J. Mallela, S. Mohapatra // Journal of Materials Chemistry B. – 2013. – V. 1. – № 35. – P. 4396-4405.
123. Couvreur, P. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease / P. Couvreur, C. Vauthier // Pharmaceutical research. – 2006. – V. 23. – P. 1417-1450.
124. Jacob, S. Emerging role of hydrogels in drug delivery systems, tissue engineering and wound management / S. Jacob, A.B. Nair, J. Shah, N. Sreeharsha, S. Gupta, P. Shinu // Pharmaceutics. – 2021. – V. 13. – № 3. – P. 357-393.
125. Gaponik, N. Labeling of biocompatible polymer microcapsules with near-infrared emitting nanocrystals / N. Gaponik, I.L. Radtchenko, M.R. Gerstenberger, Y.A. Fedutik, G.B. Sukhorukov, A.L. Rogach // Nano Letters. – 2003. – V. 3. – № 3. – P. 369-372.
126. Adibnia, V. Nonspecific interactions in biomedical applications / V. Adibnia, M. Mirbagheri, S. Salimi, G. De Crescenzo, X. Banquy // Current Opinion in Colloid & Interface Science. – 2020. – V. 47. – P. 70-83.
127. Li, L. Magnetic and fluorescent multifunctional chitosan nanoparticles as a smart drug delivery system / L. Li, D. Chen, Y. Zhang, Z. Deng, X. Ren, X. Meng, Tang F., Ren J., L. Zhang // Nanotechnology. – 2007. – V. 18. – № 40. – ID 405102.
128. Imhof, A. Spectroscopy of fluorescein (FITC) dyed colloidal silica spheres / A. Imhof, M. Megens, J.J. Engelberts, D.T.N. De Lang, R. Sprik, W.L. Vos // The Journal of Physical Chemistry B. – 1999. – V. 103. – № 9. – P. 1408-1415.
129. Galyametdinov, Yu.G. Luminescent composites based on liquid crystalline europium (III) complex and CdSe/CdS/ZnS quantum dots / Yu.G. Galyametdinov, A.S. Krupin, D.O. Sagdeev, M.E. Karyakin, R.R. Shamilov, A.A. Knyazev // Liquid Crystals and their Application. – 2022. – V. 22. – № 1. – P. 27-38 (in Russ.)
130. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings,

B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox // Gaussian Inc. Wallingford CT. – 2016. – V. 1. – 572 p.

131. Loll, P.J. Simultaneous recognition of a carboxylate-containing ligand and an intramolecular surrogate ligand in the crystal structure of an asymmetric vancomycin dimer / P.J. Loll, A.E. Bevivino, B.D. Korty, P.H. Axelsen // Journal of the American Chemical Society. – 1997. – V. 119. – № 7. – P. 1516-1522.

132. HyperChem(TM) Professional 7.51 [Электронный ресурс]. – 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA: Hypercube, Inc.

133. Stewart, James J. P. MOPAC2016 [Электронный ресурс]. – Colorado Spring, CO, USA: Stewart Computational Chemistry, 2016. – Режим доступа: <http://OpenMOPAC.net>

134. Zhou, N. An improved method of isomolar series by dual-wavelength spectrophotometry / N. Zhou, C. X. He // Microchimica Acta. – 1993. – V. 111. – P. 183-191.

135. Ельчищева, Ю.Б. Спектрофотометрические методы анализа: учебное пособие / Ю.Б. Ельчищева // Пермь: ПГНИУ. – 2023. – С. 106-119.

136. Motz, R.N. High-throughput determination of Stern-Volmer quenching constants for common photocatalysts and quenchers / R.N. Motz, A.C. Sun, D. Lehnher, S. Ruccolo // ACS Organic & Inorganic Au. – 2023. – V. 3. – № 5. – P. 266-273.

137. Ortiz, S.N.C. Spectroscopy characterization and quantum yield determination of quantum dots / S.N.C. Ortiz, E.M. Ospino, R. Cabanzo // Journal of Physics: Conference Series. – 2016. – V. 687. – ID 012097.

138. Ritger, P.L. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs / P.L. Ritger, N.A. Peppas // Journal of Controlled Release. – 1987. – V. 5. – № 1. – P. 23-36.

139. Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids / I. Langmuir // Journal of the American chemical society. – 1916. – V. 38. – № 11. – P. 2221-2295.

140. Freundlich, H. Über die adsorption in lösungen / H. Freundlich // Zeitschrift für Physikalische Chemie. – 1907. – V. 57. – № 1. – P. 385-470.
141. Hall, K.R. Pore-and solid-diffusion kinetics in fixed-bed adsorption under constant-pattern conditions / K.R. Hall, L.C. Eagleton, A. Acrivos, T. Vermeulen. // Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals. – 1966. – V. 5. – № 2. – P. 212-223.
142. Миргалеев, Г.М. Полиэлектrolитные комплексы хитозана с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы и получение микрокапсул на их основе / Г.М. Миргалеев, А.Д. Хамидуллина, С.В. Шилова, // Сборник тезисов докладов XII Всероссийской школы-конференции молодых ученых
«Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Крестовские чтения - 2019). – Иваново, 2019. – С. 158-159.
143. Миргалеев, Г.М. Полиэлектrolитные комплексы хитозана с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы в водно-спиртовых средах / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова, А.Я. Третьякова, В.П. Барабанов // Сборник тезисов докладов XXVI Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем». – Национальный парк «Марий Чодра»: Издательство «Перо», 2020. – С. 120-122.
144. Шилова, С.В. Комплексообразование хитозана с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы в водных и водно-спиртовых растворителях / С.В. Шилова, Г.М. Миргалеев, Ю.Г. Галяметдинов // Сборник тезисов Международной конференции «Перспективная элементная база микро- и нанoeлектроники с использованием современных достижений теоретической физики». – Москва, 2020. – С. 167.
145. Миргалеев, Г.М. Биосовместимые полиэлектrolитные гели на основе комплексов хитозана / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова, А.Я. Третьякова, В.П. Барабанов // Сборник тезисов докладов Школы-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием). – Казань, 2020. – С. 92.
146. Shilova, S.V. Polyelectrolyte complexes of chitosan with sodium carboxymethyl cellulose in water–alcohol media and microcapsules based on them / S.V. Shilova, G.M. Mirgaleev, A.Y. Tret'yakova, V.P. Barabanov // Polymer Science. Series A. – 2020. – V. 62. – № 6. – P. 630-635)

147. Краюхина, М.А. Полиэлектrolитные комплексы хитозана: формирование, свойства и применение / М.А. Краюхина, Н.А. Самойлова, И.А. Ямсков // Успехи химии. – 2008. – Т. 77. – № 9. – С. 854-869.
148. Shilova, S.V. pH-responsive calcium alginate microspheres modified with chitosan for immobilization of antibiotic cefotaxime / S.V. Shilova, G.M. Mirgaleev, V.P. Barabanov // Polymer Science. Series A. – 2022. – V. 64. – № 5. – P. 447-455.
149. Umeidy, I.T. Spectrophotometric determination of cefotaxime sodium in pharmaceutical formulations / I.T. Umeidy // Materials Today: Proceedings. – 2021. – V. 47. – P. 6043-6049.
150. Shilova, S.V. Alginate/chitosan hydrogels as perspective transport systems for cefotaxime / S.V. Shilova, G.M. Mirgaleev, K.A. Romanova, Yu.G. Galyametdinov // Biopolymers. – 2023. – V. 114. – I. 10. – e23555.
151. Zhou, N. An improved method of isomolar series by dual-wavelength spectrophotometry / N. Zhou, C.X. He // Microchimica Acta. – 1993. – V. 111. – № 4. – P. 183-191.
152. Mudarisova, R.Kh. Interaction of chitosan with cefotaxime / R.Kh. Mudarisova, E.I. Kulish, R.M. Zinatullin, N.E. Tamindarova, S.V. Kolesov, S.N. Khunafin, Y.B. Monakova // Russian Journal of Applied Chemistry. – 2006. – V. 79. – № 7. – P. 1210-1212.
153. Mirgaleev, G.M. Intermolecular interactions of cefotaxime with sodium alginate biopolymer in aqueous solutions / G.M. Mirgaleev, S.V. Shilova, V P. Barabanov // Russian Journal of Applied Chemistry. – 2023. – V. 96. – № 4. – P. 422-428.
154. Cunha, B.A. Vancomycin / B.A. Cunha // Medical Clinics of North America – 1995. – V. 79. – P. 817-831.
155. Elyasi, S. Vancomycin-induced nephrotoxicity: Mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review / S. Elyasi, H. Khalili, S. Dashti-Khavidak, A. Mohammadpour // European Journal of Clinical Pharmacology – 2012. – V. 68. – P. 1243-1255.
156. Shilova, S.V. Novel nanosensors represented by CdS/ZnS quantum dots doped with Manganese (II) ions for detection of vancomycin / S.V. Shilova, D.O. Sagdeev, G.M. Mirgaleev, K.A. Romanova, Yu.G. Galyametdinov // Physica Scripta. – 2025. – V. 100. – № 3. – e035906.

157. Миргалеев, Г.М. Наночастицы полиэлектролитного комплекса хитозан-каррагинан как биосовместимые системы доставки ванкомицина / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова, В.П. Барабанов // Вестник технологического университета. – 2025. – Т. 28. – № 3. – С. 29-34.
158. Миргалеев, Г.М. Наночастицы на основе полиэлектролитного комплекса хитозан-каррагинан для адресной доставки антибиотика ванкомицина / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова, В.П. Барабанов // Сборник трудов IV Всероссийской научной конференции (с международным участием) преподавателей и студентов ВУЗов «Актуальные проблемы науки о полимерах». – Казань, 2024. – С. 241-243.
159. Buck, S.T.G. Photodynamic efficiency of xanthene dyes and their phototoxicity against a carcinoma cell line: A computational and experimental study / S.T.G. Buck, F. Bettanin, E. Orestes, P. Homem-de-Mello, H. Imasato, R.B. Viana, J.R. Perussi, B.F. da Silva Albérico // Journal of Chemistry. – 2017. – ID 7365263.
160. Пчедлов-Петросян, Н.О. Флуоресцеиновые красители в растворах – хорошо изученные системы? / Н.О. Пчедлов-Петросян // Вестник Харьковского национального университета. – 2004. – № 626. Химия. – Вып. 11. – № 34. – С. 221-313.
161. Mirgaleev, G.M. Fluorescein binding with chitosan and a chitosan-based polyelectrolyte complex in aqueous solutions / G.M. Mirgaleev, S.V. Shilova // Colloid Journal. – 2024. – V. 86 – № 3. – P. 431-440.
162. Миргалеев, Г.М. Межмолекулярные взаимодействия флуоресцеина с биополимером хитозаном в водных средах / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова, М.В. Волкова, В.П. Барабанов // Сборник тезисов докладов IV Школы-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием). – Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, 2022. – С. 97.
163. Миргалеев, Г.М. Межмолекулярное взаимодействие биополимера хитозана с красителем флуоресцеином в водных средах / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова // Материалы 87-й научно-технической конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов (с международным участием). – Минск: Белорусский государственный технологический университет, 2023. – С. 424-426.
164. Г.М. Миргалеев. Изучение взаимодействия биополимера хитозана с красителем флуоресцеином в водных средах / Г.М. Миргалеев, Д.Ю. Горбунова, С.В. Шилова, В.П.

Барабанов // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2023». – М.: ООО «МАКС Пресс», 2023. – С. 64.

165. Slyusareva, E. Spectral study of fluorone dyes adsorption on chitosan-based polyelectrolyte complexes / E. Slyusareva, M. Gerasimova, A. Plotnikov, A. Sizykh // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2014. – V. 417. – № 1. – P. 80-87.

166. Cheng, X. An Overview of analytical methodologies for determination of vancomycin in human plasma / X. Cheng, J. Ma, J. Su // *Molecules*. – 2022. – V. 27. – № 21. – ID 7319.

167. Nascimento, P.A.D. Current Status of Vancomycin analytical methods / P.A.D. Nascimento, A.C. Kogawa, H.R.N. Salgado // *Journal of AOAC International*. – 2020. – V. 103. – № 3. – P. 755-769.

168. Mescheryakova, S.A., Fluorescent alloyed CdZnSeS/ZnS nanosensor for doxorubicin detection / S.A. Mescheryakova, I.S. Matlakhov, P.D. Strokin, D.D. Drozd, I.Y. Goryacheva, O.A. Goryacheva // *Biosensors*. – 2023. – V. 13. – PMID 596.

169. Liang, W. Electron transfer and fluorescence “turn-off” based CdTe quantum dots for vancomycin detection at nanogram level in aqueous serum media / W. Liang, S. Liu, Z. Liu, D. Li, L. Wang, C. Hao, Y. He // *New Journal of Chemistry*. – 2015. – V. 39. – P. 4774-4782.

170. Zhong, D. Employing carbon dots modified with vancomycin for assaying Gram-positive bacteria like *Staphylococcus aureus* / D. Zhong, Y. Zhuo, Y. Feng, X. Yang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – V. 74. – P. 546-553.

171. Миргалеев, Г.М. Углеродные квантовые точки на основе природных полисахаридов как новый материал для диагностической биовизуализации / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова, В.П. Барабанов // Сборник тезисов докладов XXVII Всероссийской конференции молодых ученых-химиков (с международным участием). – Нижний Новгород: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», 2024. – С. 314.

172. Миргалеев, Г.М. Взаимодействие ванкомицина с квантовыми точками CdS/ZnS и его влияние на их оптические свойства / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова, Д.О. Сагдеев, Ю.Г. Галяметдинов // Сборник тезисов докладов X Юбилейного всероссийского форума молодых исследователей. – Калининград: Балтийский федеральный университет им. И. Канта, 2024. – 101 Мб. [Электронное издание]. – С. 243.

173. Yu, W.W. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals / W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng // *Chemistry of Materials*. – 2003. – V. 15. – № 14. – P. 2854-2860.
174. Patterson, A. The scherrer formula for X-Ray particle size determination / A. Patterson // *Physical Review*. – 1939. – V. 56. – № 10. – P. 978-982.
175. Galyametdinov, Y.G. The dependence of paramagnetic and optical characteristics of Mn: CdS nanoparticles on high-temperature synthesis conditions / Y.G. Galyametdinov, D.O. Sagdeev, V.K. Voronkova, A.A. Sukhanov, R.R. Shamilov // *Materials Research Express*. – 2018. – V. 5. – I. 7. – ID 075009.
176. Romanova, K.A. Modeling quantum states of “Core-Shell” CdSe/CdS and CdSe/ZnS quantum dots / K.A. Romanova, Yu.G. Galyametdinov // *Bulletin of the Technological University*. – 2017. – V. 20. – № 19. – P. 15-17 EDN ZXFIPN [in Russian].
177. Crystallography Open Database. <http://www.crystallography.net/cod/> (accessed April 5, 2020).
178. Jumpertz, E.A. Electron-density distribution in zinc blende / E.A. Jumpertz // *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie*. – 1955. – V. 59. – P. 419-425.
179. Jezierska, A. N–H···O versus O–H···O: density functional calculation and first principle molecular dynamics study on a quinoline-2-carboxamide N-oxide / A. Jezierska // *The Journal of Molecular Modeling*. – 2015. – V. 21. – article number 47.
180. Scott, A.P. Harmonic vibrational frequencies: an evaluation of Hartree-Fock, Møller-Plesset, quadratic configuration interaction, density functional theory, and semiempirical scale factors / A.P. Scott, L. Radom // *Journal of Physical Chemistry*. – 1996. – V. 100. – P. 16502-16513.
181. Shilova, S.V. Comparison of methods for encapsulation of acetyl salicylic acid in polyelectrolyte capsules based on chitosan / S.V. Shilova, G.M. Mirgaleev, A.Y. Tretyakova, V.P. Barabanov // *Russian Journal of Applied Chemistry*. – 2021. – V. 94. – № 7. – P. 934-939.
182. Миргалеев, Г.М. Полиэлектролитные микрокапсулы на основе комплексов хитозана с контролируемым высвобождением лекарственного вещества / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова, А.Я. Третьякова, В.П. Барабанов // *Сборник тезисов докладов Школы-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии,*

биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием). – Казань, 2019. – С. 83.

183. Миргалеев, Г.М. Полиэлектrolитные капсулы на основе хитозана и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова, А.Я. Третьякова, В.П. Барабанов // Сборник тезисов Всероссийской научной конференции (с международным участием) преподавателей и студентов ВУЗов «Актуальные проблемы науки о полимерах». – Казань, 2020. – С. 151.

184. Mendelson, J. Fabrication of microporous thin films from polyelectrolyte multilayers / J. Mendelson, C. Barrett, V. Chan, A. Pal, A. Mayes, M. Rubner // *Langmuir*. – 2000. – V. 16. – P. 5017-5023.

185. Иорданский, А.Л., Диффузионная кинетика и гидролиз биоразлагаемых полимеров. Потеря массы и контроль высвобождения низкомолекулярных веществ / А.Л. Иорданский, Г.Е. Заиков, А.А. Берлин // Вестник Казанского технологического университета. – 2015. – Т. 18. – № 2. – С. 81-87.

186. Umeidy, I.T. Spectrophotometric determination of cefotaxime sodium in pharmaceutical formulations / I.T. Umeidy // *Materials Today: Proceedings*. – 2021. – V. 47. – P. 6043-6049.

187. Patel, N. Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation / N. Patel, D. Lalwani, S. Gollmer, E. Injeti, Y. Sari, J. Nessamony // *Progress in Biomaterials*. – 2016. – V. 5. – № 2. – P.117-133.

188. Шилова, С.В. Биосовместимые системы доставки антибиотика цефотаксима на основе гелевых микрочастиц альгината кальция / С.В. Шилова, Г.М. Миргалеев, М.В. Волкова, А.Я. Третьякова, В.П. Барабанов // Вестник технологического университета. – 2021. – Т. 24. – № 12. – С. 56-59.

189. Shilova, S.V. Chitosan-modified calcium alginate microspheres for cefotaxime immobilization / S.V. Shilova, G.M. Mirgaleev, V.P. Barabanov // *Russian Journal of Applied Chemistry*. – 2022. – V. 95. – № 3. – P. 401-407.

190. Morris, E.R. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation / E.R. Morris, D.A. Rees, D. Thom, J. Boyd // *Carbohydrate Research*. – 1978. – V. 66. – P. 145-154.

191. Миргалеев, Г.М. Иммобилизация цефотаксима в сферогелях альгината кальция с хитозановым покрытием / Г.М. Миргалеев, М.В. Волкова, С.В. Шилова, А.Я.

Третьякова, В.П. Барабанов // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2021», секция «Химия». – М.: Издательство «Перо», 2021. – 80 МБ. [Электронное издание]. – С. 185.

192. Миргалеев, Г.М. Получение сферогелей альгината кальция, модифицированных хитозаном, для создания пролонгированной лекарственной формы антибиотика цефотаксима / Г.М. Миргалеев, М.В. Волкова, С.В. Шилова, А.Я. Третьякова, В.П. Барабанов // Материалы XV Международной конференции молодых ученых, студентов и аспирантов «Синтез и исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений». – Казань, 2021. – Т. 2 – С. 6-7.

193. Григорьев, Д. Иммобилизация противоопухолевого препарата циклофосфида в альгинате кальция / Д. Григорьев, К.Б. Мусабеков, Н.К. Мусабеков, Ж.Ж. Кусаинова // Высокомолекулярные соединения. – 2017. – Т. 59А. – № 4. – С. 341-349.

194. Миргалеев, Г.М. Сферогели альгината кальция, модифицированные хитозаном, для иммобилизации цефотаксима / Г.М. Миргалеев, М.В. Волкова, С.В. Шилова, А.Я. Третьякова, В.П. Барабанов // Сборник тезисов докладов Школы-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием). – Казань, 2021. – С. 112.

195. Миргалеев, Г.М. Иммобилизация антибиотика цефотаксима в альгинате кальция / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова, М.В. Волкова, А.Я. Третьякова, В.П. Барабанов // Сборник тезисов докладов IX Молодежной конференции ИОХ РАН, посвященной 160-летию со дня рождения академика Н.Д. Зелинского. – Москва, 2021. – С. 202.

196. Миргалеев, Г.М. Получение pH-чувствительных микросфер альгинат кальция/хитозан для иммобилизации цефотаксима / Г.М. Миргалеев, М.В. Волкова, С.В. Шилова, В.П. Барабанов // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2022», секция «Химия». – М.: Издательство «Перо», 2022. – 72 МБ. [Электронное издание]. – С. 166.

197. Миргалеев, Г.М. Синтез углеродных квантовых точек из природных полисахаридов хитозана и каррагинана и исследование их оптических характеристик / Г.М. Миргалеев, С.В. Шилова, В.П. Барабанов // Вестник технологического университета. – 2023. – Т. 26. – № 11. – С. 37-41.

198. Щипунов, Ю.А. Углеродные квантовые точки, синтезируемые гидротермально из хитина / Ю.А. Щипунов, О.Н. Хлебников, В.Е. Силантьев // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. – 2015. – Т. 57. – № 1. – С. 18-28.
199. Li, L. Magnetic and fluorescent multifunctional chitosan nanoparticles as a smart drug delivery system / L. Li, D. Chen, Y. Zhang, Z. Deng, X. Ren, X. Meng, F. Tang, J. Ren, L. Zhang // Nanotechnology. – 2007. – V. 18. – № 40. – ID 405102.
200. Shilova, S.V. Luminescent nanoparticles of chitosan–carrageenan polyelectrolyte complex as promising multifunctional vancomycin delivery systems / S.V. Shilova, G.M. Mirgaleev, D.O. Sagdeev, Yu.G. Galyametdinov // Colloid Journal. – 2025. – V. 87 – № 5. – P. 694-706.

ПРИЛОЖЕНИЕ

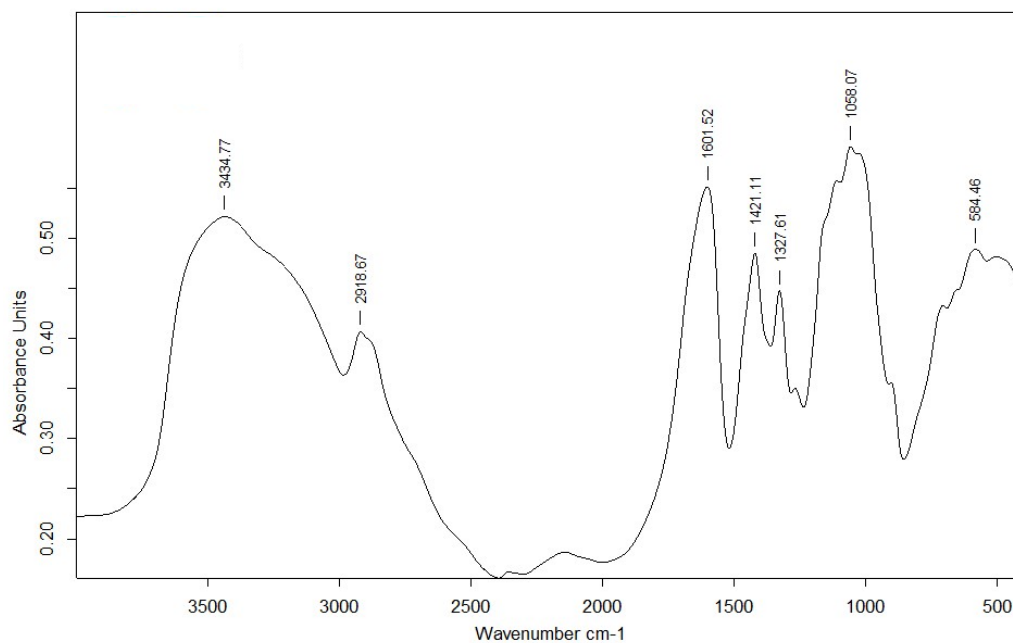


Рисунок П1 – ИК-спектр Na-КМЦ

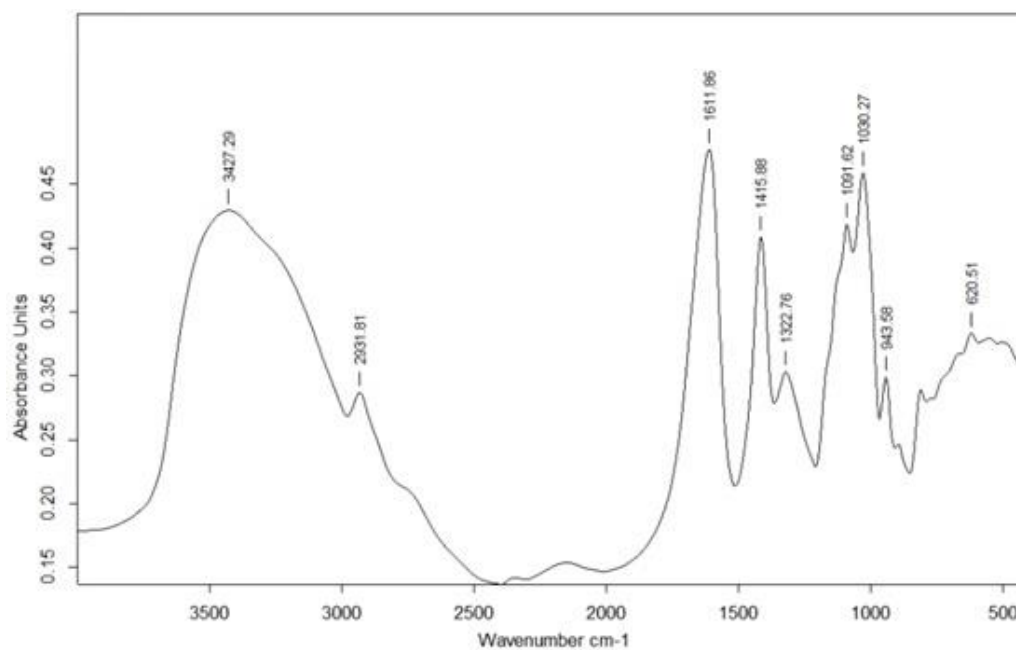


Рисунок П2 – ИК-спектр АЛГ-На

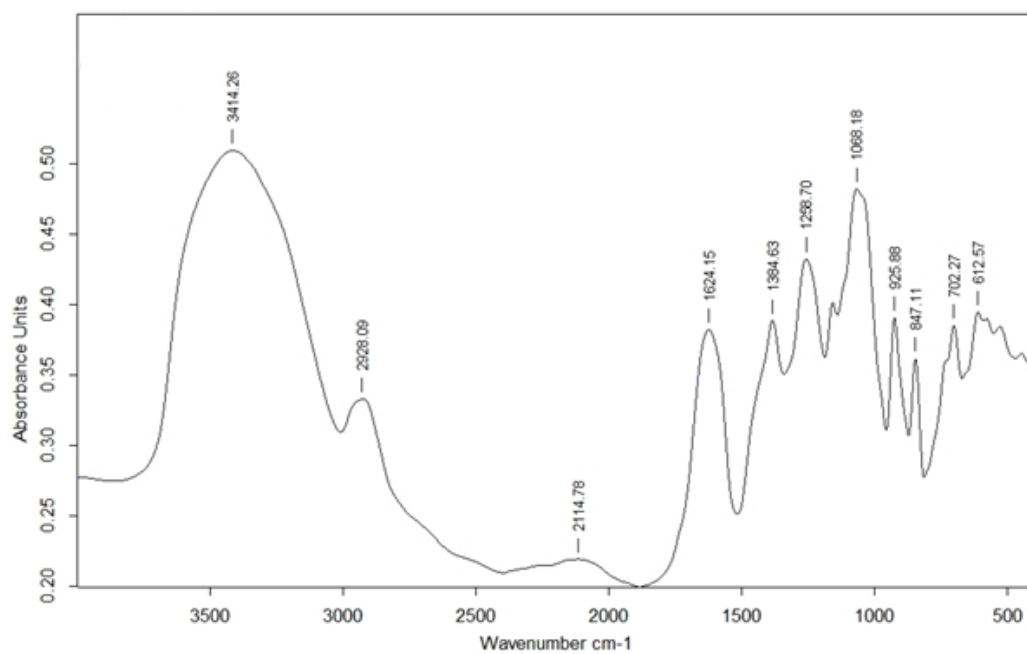
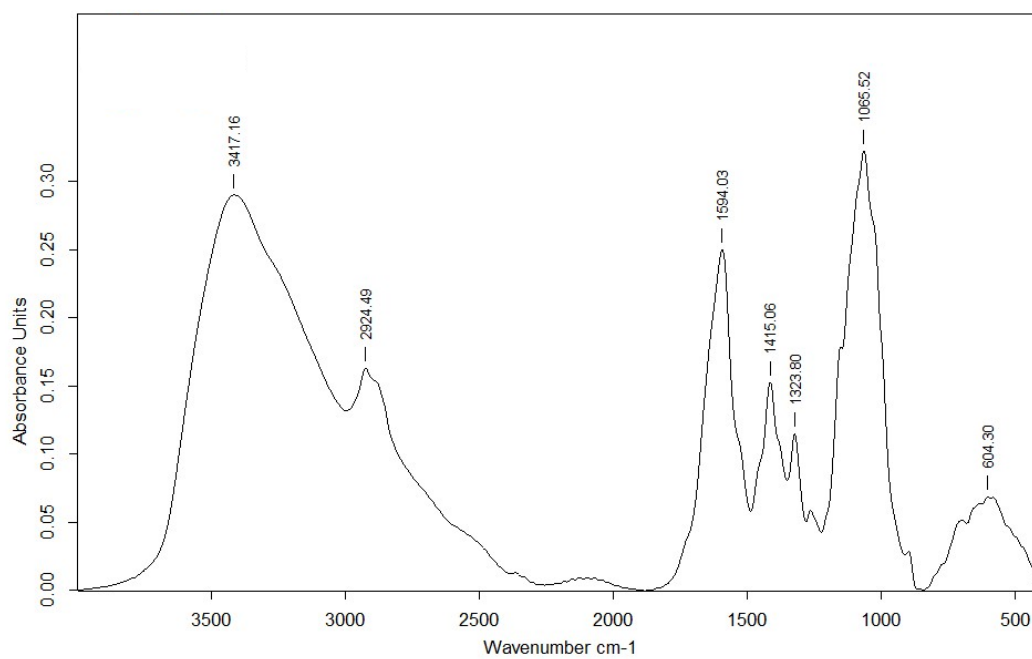
Рисунок ПЗ – ИК-спектр κ -КРГ

Рисунок П4 – ИК-спектр ПЭК ХТЗ-КМЦ

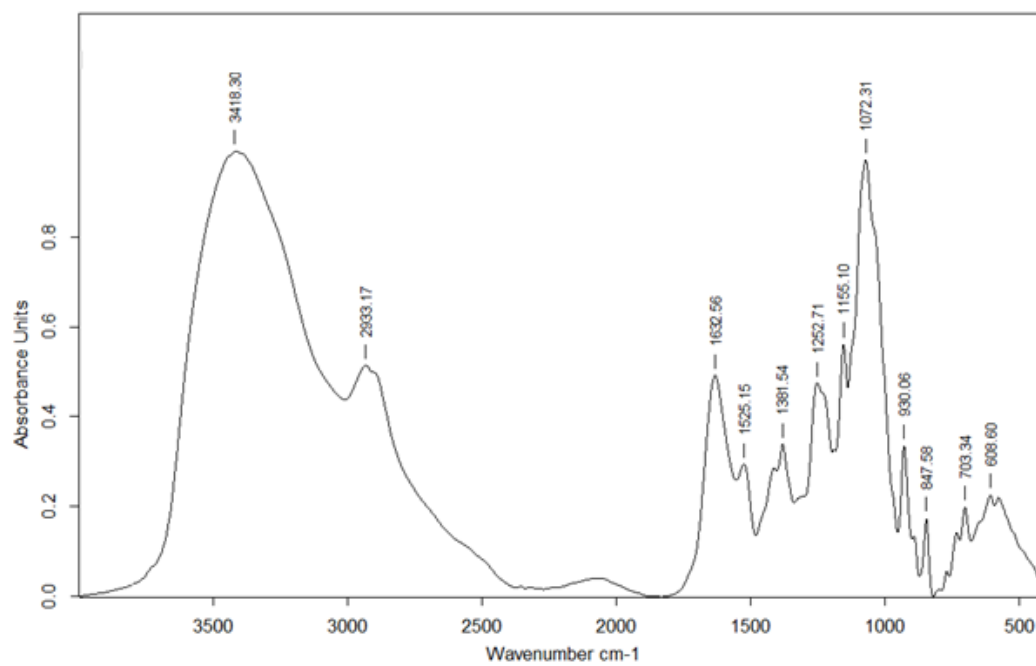


Рисунок П5 – ИК-спектр ПЭК ХТЗ–КРГ