

НАНОЧАСТИЦЫ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ХИТОЗАНОВ И НАНОЧАСТИЦЫ МЕТАЛЛОВ В СОСТАВЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ МАЗЕЙ

*Н.Н. Глущенко**, *В.П. Варламов***, *О.А. Богословская**, *Т.А. Байтукалов**,
*А.А. Рахметова**, *Т.П. Алексеева**, *И.П. Ольховская**, *А.В. Ильина***

*Институт энергетических проблем химической физики РАН,
Москва, E-mail: nnglu@mail.ru

**Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, E-mail: Enzyme@biengi.ac.ru

NANOPARTICLES OF CHEMICALLY MODIFIED LOW-MOLECULAR-WEIGHT CHITOSANS AND METAL NANOPARTICLES COMPRISED IN WOUND-HEALING OINTMENTS

*N.N. Glushchenko**, *V.P. Varlamov***, *O.A. Bogoslousskaya**, *T.A. Baytukalov**,
*A.A. Rakhmetova**, *T.P. Alexeeva**, *I.P. Olkhovskaya**, *A.V. Ilyina***

*Institute for Energy Problems of Chemical Physics RAS,
Moscow, E-mail: nnglu@mail.ru

**Center «Bioinzheneriya» RAS, Moscow, E-mail: Enzyme@biengi.ac.ru

ABSTRACT

The wound-healing and antibacterial activity of nanoparticles of 1) chemically modified low-molecular-weight chitosans and 2) copper, both comprised in gels was studied. The combination of these nanoparticles exhibits high wound-healing activity.

Современное развитие нанотехнологий позволяет получать наночастицы (НЧ) из веществ любой природы. При этом установлено, что химические и биологические свойства этих веществ отличаются от исходного материала. Наши исследования по токсичности наночастиц металлов, введенных в виде водных суспензий в организм экспериментальных животных, свидетельствуют о том, что по токсикологическим характеристикам наночастицы металлов ниже токсичности солей. Так, по значению LD₅₀ сульфаты соответствующих металлов токсичнее наночастиц меди в 9 раз, наночастиц цинка в 28 раз, наночастиц железа в 36 раз. Такая же закономерность сохраняется и для других элементов [1, 2].

Исследование областей биологического действия наночастиц металлов выявило наличие зоны биотического действия металлов, которая лежит в пределах доз ниже порогов токсического действия МПД (максимально переносимой дозы) для наночастиц в 4,5–40 раз. При введении наночастиц металлов в организм требуется время для их химического растворения, связывания с биолигандами и достижения мишеней биологического действия. Поэтому наночастицы, введенные в организм, обладают пролонгированным действием [1]. Другим важным свойством наночастиц является проявление ими полифункционального действия, что особенно четко выявлено, например, для наночастиц меди. Наночастицы меди, с одной стороны, проявляют протективное действие при инфаркте миокарда, с другой — обладают выраженным антимикробным действием [3, 4].

Природный полисахарид — хитозан, так же как биоэлементы, обладает полифункциональными свойствами и потому находит широкое применение в различных областях. Наши исследования биологической активности низкомолекулярного хитозана (НМХ) с высокой степенью деацетилирования показали, что он проявляет антимикробное и ранозаживляющее действие, что позволило нам разработать и создать мягкую лекарственную форму [5]. Какие новые качества будет проявлять НМХ в виде наночастиц при индивидуальном и комбинированном воздействии с наночастицами биометаллов?

Материалы и методы. В работе использовали наночастицы низкомолекулярного хитозана, полученные по методу [6]. Наночастицы железа и меди получали по методу высокотемпературной конденсации по методу [7].

Антимикробное действие наночастиц изучали на тест-культурах грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: *Staphylococcus albus* и *Escherichia coli* AB1157 методом диффузии в агар. По площади зон отсутствия или задержки роста тест-культур (мм^2) судили о бактерицидном или бактериостатическом действии наночастиц испытуемого образца [8].

Для изучения действия наночастиц металлов и наночастиц НМХ в составе гелей на скорость заживления ран использовали мышей-самок линии SHK, массой 18–20 г, содержащихся на общевиварийном рационе. Животных получали из Центрального питомника лабораторных животных РАМН, Моск. обл.

Все работы с животными проводили в соответствии с «Правилами использования лабораторных экспериментальных животных» (1984 г., приложение 4). Исследование кинетики заживления ран под действием гелей с химически модифицированными НМХ проводили на модели экспериментальных полнослойных ран [9]. По кинетическим кривым изменения площадей ран в процессе регенерации рассчитывали период полузаживления ран $\tau_{1/2}$ и период полного заживления ран $\tau_{\text{полн}}$.

Результаты и их обсуждение. Наночастицы хитозана были получены из хитозана М.м. 340 кДа, СД 0,85. Суспензию наночастиц (1 мг/мл) разделили на две части: одну лиофильно высушили, другую оставили в виде суспензии. Размер наночастиц в суспензии 106–60 нм; дзета-потенциал 38–42 мВ.

Оценку биологической активности лиофильно высушенных НЧ хитозана проводили по их антимикробному действию на тест-культуры клеток грамположительных (*St. albus*) и грамотрицательных (*E. coli* 1157) микроорганизмов. Установлено, что наночастицы сохраняют свойства самого НМХ проявлять антимикробное действие. Однако эффект антимикробного действия наночастиц НМХ зависит от размеров частиц. Частицы лиофильно высушенных НЧ НМХ проявляют бактериостатическое действие по отношению к культуре клеток *St. albus*, в то же время оказалось, что частицы меньшего диаметра проявляют как бактериостатическое, так и бактерицидное действие по отношению к культуре клеток *St. albus* и бактерицидное по отношению к культуре клеток *E. coli* 1157. Причем зона задержки роста НМХ почти в два раза меньше, чем зона задержки роста культуры клеток при действии наночастиц НМХ.

При введении вышеописанных НЧ НМХ в мазь при лечении экспериментальных полнослойных ран установлено, что время полузаживления ран на 20–35% выше контроля. В опытах использовали также НЧ, полученные на основе N-карбоксиметилхитозана (N-КМХ) из хитозана с М.м. 58 кДа и СД 0,85 и СЗ 0,37. Размер частиц варьировал в пределах 20–60 нм. Мази, приготовленные с НЧ N-КМХ, обладают ранозаживляющей активностью, уменьшая время полузаживления на 40% по сравнению с контролем. Их активность выше, чем активность мази с НЧ НМХ. Это может быть связано как с уменьшением размера НЧ НМХ, так и с результатом модификации исходного хитозана для получения НЧ. Можно также отметить, что для получения сопоставимых значений времени полузаживления ран при лечении мазями с N-КМХ (карбоксиметилхитозан) и наночастицами на его основе концентрация НЧ N-КМХ в мази на два порядка меньше, чем концентрация исходного хитозана — N-КМХ.

В исследованиях были взяты наночастицы меди двух образцов с различными физико-химическими характеристиками, поскольку мы считаем и наблюдаем в экспериментах, что изменения физико-химических характеристик НЧ приводят к изменению их биологической активности. Первый образец наночастиц меди имел следующие характеристики:

1. По результатам электронной микроскопии получены диаграммы распределения частиц по размерам и кривые накопленных частот распределения по размерам и установлено, что НЧ меди имеют сферическую форму, их средний размер равен 119 ± 1 нм. Основное число частиц приходится на НЧ с размером от 75 до 150 нм.

2. По результатам электронно-зондового анализа получены спектральные характеристики для НЧ меди и установлено, что НЧ меди в своем составе имеют только атомы меди и кислорода. Содержание кислорода равно 15,26%.

3. По результатам рентгеноструктурного фазового анализа НЧ меди получены рентгенограммы, по которым установлено, что фазовое состояние НЧ меди следующее: Cu — 5%, Cu₂O — 50%, CuO — 45%.

Нами показано, что описанный образец НЧ меди обладает антимикробным действием по отношению к обеим тест-культурам клеток *St. albus* и *E. coli* 1157. Кроме того, установлено, что НЧ меди, введенные в мазь, проявляют ранозаживляющие свойства, ускоряя процесс регенерации кожи в 3,5 раза по сравнению с контролем.

Для сравнения биологической активности был взят другой образец НЧ меди, имеющий следующие физико-химические характеристики, полученные теми же методами, что и для первого образца. Средний размер частиц составляет 87 нм. Толщина оксидной пленки на частицах — 10 нм. Содержание кристаллической меди — 94%.

Данный образец НЧ меди обладает более выраженным антимикробным действием по отношению к обеим тест-культурам клеток *St. albus* и *E. coli* 1157, по сравнению с первым образцом НЧ меди. Кроме того, установлено, что эти НЧ меди, введенные в мазь, являются менее эффективными, чем НЧ меди, описанные выше. Следовательно, как и в случае НЧ НМХ, для проявления биологической активности важны физико-химические характеристики наночастиц.

При комбинировании наночастиц НМХ со средним размером 15–60 нм и наночастиц меди со средним размером 119+/-1 нм в составе мази время полузаживления ран уменьшалось на 55–70%.

На наш взгляд, основная причина высокой эффективности наночастиц в составе мази связана с легким проникновением частиц домикронного размера в клетки и ткани всего организма к мишеням биологического действия и с проявлением системного действия на организм, как это мы наблюдали при лечении ран наночастицами железа, введенными в ранозаживляющие мази и гели [10].

Таким образом, мази, содержащие НЧ НМХ разной модификации, и мази, содержащие НЧ биоэлемента — меди, позволяют разработать и создать высокоэффективные, современные ранозаживляющие препараты, перспективность применения которых в терапии не вызывает сомнения.

Результаты исследований представлены на сайтах: www.chitin.ru и nanobiology.pagod.ru. Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-12200-офи, 07-08-00376.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глуценко Н.Н., Богословская О.А., Ольховская И.П. Физико-химические закономерности биологического действия высокодисперсных порошков металлов // Химическая физика. 2002. Т. 21 (4). С. 79–85.
2. Богословская О.А., Глуценко Н.Н., Ольховская И.П. и др. Токсичность биологически активных нанопорошков металлов // Всерос. науч.-практ. конф., посвященная памяти проф. Ю.М. Кубицкого «Современные проблемы медико-криминалистических, судебно-химических и химико-токсикологических экспертных исследований»: Тез. докл. Москва, 2007. С. 197–200.
3. Коновалова Г.Г., Ланкин В.З., Богословская О.А. и др. Влияние высокодисперсного порошка меди на активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы при экспериментальном инфаркте миокарда. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1989. № 107(2). С. 154–157.
4. Rakhmetova A.A., Bogoslovskaya O.A., Ovsyannikova M.N., Leipunsky I.O., Olkbouskaya I.P., Glushchenko N.N., Baytukalov T.A., Alekseeva T.P. The Study of Copper Nanoparticles Effect on Bacterial Cells. // Geometry, information and theoretical crystallography of the nanoworld. Saint Petersburg, 2007. P. 24.
5. Богословская О.А., Лобаева Т.А., Байтукалов Т.А. и др. Сравнительное исследование ранозаживляющего действия веществ различной природы // Естественные и технические науки. 2007. № 6 (32). С. 91–99.
6. Ильина А.В., Варламов В.П., Ермаков Ю.А., Орлов В.Н. и др. Хитозан — природный полимер для формирования наночастиц. ДАН. 2008. Т. 43, № 2. С. 199–201.
7. Ген М.Я., Миллер А.В. Авторское свидетельство СССР № 814432 // Бюллетень изобретений. 1981. № 11. С. 25.
8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.— М.: Ремедиум, 2000. С. 264–266
9. Байтукалов Т.А., Богословская О.А., Ольховская И.П. и др. Регенерирующая активность и антибактериальное действие низкомолекулярного хитозана // Изв. РАН. Сер. Биол. 2005. № 6. С. 659–663.
10. Байтукалов Т.А., Глуценко Н.Н., Богословская О.А. и др. Патент на изобретение № 2296571. Ранозаживляющий состав и способ его получения. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 10 апреля 2007 г.