

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА ДЛЯ pH-ЗАВИСИМОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ

*В.А. Александрова**, *Н.Г. Балабушевич***, *Г.Н. Бондаренко**,
*Н.И. Ларионова***, *Н.С. Домнина****

*Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева, РАН, Москва,
E-mail: Alexandrova@ips.ac.ru

**Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва,
E-mail: balab@enzyme.chem.msu.ru

***Химический факультет СПбГУ, Санкт-Петербург

POLYELECTROLYTE COMPLEXES BASED ON CHITOSAN DERIVATIVES FOR PH-SENSITIVE RELEASE OF ANTIOXIDANTS

*V.A. Alexandrova**, *N.G. Balabushevich***, *G.N. Bondarenko**,
*N. I. Larionova***, *N.S. Domnina****

*Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, RAS, Moscow,
E-mail: Alexandrova@ips.ac.ru

**Faculty of Chemistry, The Lomonosov Moscow State University, Moscow,
E-mail: balab@enzyme.chem.msu.ru

***Faculty of Chemistry, St-Petersburg State University, St-Petersburg

ABSTRACT

The water soluble chitosan (Ch) conjugates bearing antiradical fragments have been synthesized by interaction of the partially quaternized chitosan (QCh) with quercetin (QRC) or dihydroquercetin (DHQRC). The complexes of the QCh(DHQRC) and Ch sulphate has been proposed for pH-sensitive controlled release of antioxidants.

Необходимость разработки новых подходов к созданию веществ, способных снизить уровень генетического повреждения клетки и уменьшить риск канцерогенеза, обусловлена глобальным радиационным загрязнением окружающей среды.

Известно, что фенольные антиоксиданты (АО) находят широкое применение в качестве лечебных средств при различных заболеваниях, в том числе в случае свободно-радикальной патологии, вызванной радиационным поражением. Однако существенным недостатком ряда фенольных АО является их плохая растворимость в воде, быстрый метаболизм, малая биодоступность к ответственным мишеням, что снижает их защитную эффективность.

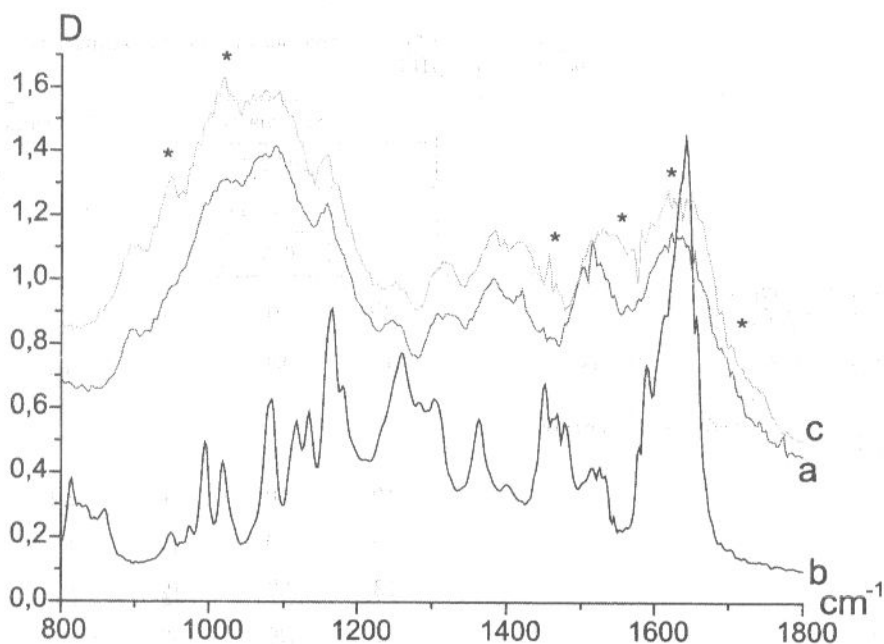
С целью устранения указанных недостатков нами был разработан новый подход к созданию водорастворимых (поли)фенольных АО пролонгированного действия на основе биodeградируемого поликатиона природного происхождения — хитозана. При этом с использованием синтетических поликатионов ряда диаллилдиметиламмония в качестве модельных систем нами ранее было показано, что наличие четвертичных аммониевых групп, а также структурных фрагментов (поли)фенольной природы вносит существенный вклад в реализацию антимуtagenной и антиокислительной активности полимера [1, 2].

С учетом выявленных закономерностей осуществлена направленная модификация хитозана. Получены новые водорастворимые макромолекулярные системы на основе частично кватернизованного хитозана (КХ), содержащие небольшое число (1–3 мас.%) структурных фрагментов кверцетина (КРЦ) или дигидрокверцетина (ДГКРЦ) в боковой цепи полимера, — коньюгаты КХ (КРЦ) и КХ (ДГКРЦ)

соответственно. Следует отметить, что используемые в данном исследовании природные АО — КРЦ и ДГКРЦ относятся к обширной группе полифенолов растительного происхождения — флавоноидов. Частичную кватернизацию хитозана на первой стадии синтеза конъюгатов проводили для усиления заряда макроиона, поскольку ранее на синтетических поликатионах ряда диаллилдиметиламмония было показано, что с ростом заряда полимера антимутагенная активность увеличивается [1]. Помимо этого, превращение части (30 мол. % и более) первичных аминогрупп хитозана в четвертичные аммониевые приводило к образованию водорастворимых КХ (в отличие от исходного хитозана).

На второй стадии направленной модификации хитозана в структуру КХ (для усиления антирадикальной активности) вводили небольшое количество АО в качестве структурного фрагмента боковой цепи полимера. О наличии КРЦ и ДГКРЦ в структуре конъюгатов судили по появлению полосы поглощения с максимумом при 340 и 290 нм соответственно. Отсутствие в конъюгатах примесей “несвязанных” АО было подтверждено с использованием метода гель-хроматографии на сефадексе G-75f.

Наличие ковалентной связи АО с макромолекулой подтверждают также данные ИК-Фурье-спектроскопии. Все спектры регистрировались на Фурье-спектрометре “Bruker-113V”. Образцы готовили в виде таблеток, прессованных с KBr. На рисунке показано сравнение ИК-спектров КХ (а) ДГКРЦ (b) и конъюгата КХ (ДГКРЦ) (c). На спектре звездочками отмечены все спектральные признаки химического связывания КХ с ДГКРЦ. В частности, уширение и расщепление полосы в области 1650–1620 cm^{-1} указывает как на вхождение ДГКРЦ в КХ (ДГКРЦ), так и на появление нового типа амидной связи.



Сравнение ИК-спектров КХ (а), ДГКРЦ (b), конъюгата КХ (ДГКРЦ) (c)

Полученные на основе нетоксичных веществ природного происхождения подобные конъюгаты имеют большой потенциал применения в различных областях биологии и медицины, в частности в качестве лекарственных средств (перорального типа) в случае свободнорадикальной патологии, вызванной радиационным поражением.

С этой целью мы предприняли попытку на основе конъюгатов хитозана с АО растительного происхождения и сульфата хитозана (ХС) разработать интерполи-электролитную систему, позволяющую осуществить контролируемое выделение АО в среду. Основные закономерности создания и поведения такого рода рН-чув-

ствительных полиэлектролитных систем, содержащих белки, нами были описаны ранее [3, 4].

Суть процесса состояла в электростатическом взаимодействии противоположно заряженных полиэлектролитов с образованием нерастворимых комплексов КХ (ДГКРЦ) и ХС, а именно КХ (ДГКРЦ)-ХС, при рН 3,0 или рН 6,0 и концентрации NaCl соответственно 0–0,5 М. Как видно из таблицы, выход комплексообразования, рассчитанный как $(D_0^{290} - D_{\text{суспензии}}^{290})/D_0^{290}$, был несколько выше при проведении процесса при рН 6,0. Суспензии микрочастиц полиэлектролитных комплексов КХ (ДГКРЦ)-ХС были стабильны при хранении.

Микроскопическое изучение нерастворимых комплексов КХ (ДГКРЦ)-ХС показало, что они представляют собой замкнутые микрочастицы неправильной формы с размером 5–60 мкм. При получении в отсутствие NaCl комплексы имели наименьший размер. Использование ультразвуковой обработки позволяло уменьшить размеры частиц комплексов до 5–15 мкм.

Исследование растворения комплексов КХ (ДГКРЦ)-ХС при взаимодействии со средами, значения рН которых соответствуют основным участкам желудочно-кишечного тракта (по поглощению супернатантов при длине волны 290 нм), показано в таблице. При рН 1,7, соответствующей рН желудка, наблюдалось незначительное (до 10%) высвобождение КХ (ДГКРЦ) из нерастворимых комплексов, полученных при рН 3,0, и несколько большее – из комплексов, полученных при рН 6,0. При нейтральных и слабощелочных рН кишечника из комплексов наблюдалось постепенное высвобождение КХ (ДГКРЦ) в раствор. Причем для комплексов, образованных при рН 3,0 и концентрациях NaCl 0,25 и 0,50 М, суммарное высвобождение КХ (ДГКРЦ) было практически полным.

Влияние условий получения на свойства нерастворимых полиэлектролитных комплексов КХ (ДГКРЦ)-ХС

Параметр	Условия образования комплекса				
	рН 3,0			рН 6,0	
	концентрация NaCl, М				
	0	0,25	0,50	0	0,50
Включение ДГКРЦ в нерастворимый комплекс КХ (ДГКРЦ)-ХС, %	40	61	60	74	70
Средний размер частиц комплексов, мкм	15	35	23	18	40
Высвобождение в раствор кх(ДГкРц) при последовательной инкубации в растворах следующего состава, %					
1) рН 1,7, 1 ч	10	10	9	22	12
2) рН 7,0, 3 ч	39	49	42	30	19
3) рН 8,0, 1 ч	13	37	42	24	16
Всего за 5 ч	62	96	93	79	47

Таким образом, в результате проведенных исследований синтезированы новые водорастворимые конъюгаты производных хитозана с АО растительного происхождения. С использованием методов УФ-ИК-Фурье-спектроскопии, а также гель-хроматографии подтверждена предполагаемая структура конъюгатов. Показана возможность использования полиэлектролитных комплексов на основе производных хитозана для контролируемого рН-зависимого высвобождения АО растительного происхождения.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 050448747).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Alexandrova V.A., Obukhova G.V., Torchiev D.A.* // J. Bioact. Compat. Polym. 2002. V. 17. P. 321–341.
2. *Alexandrova V.A., Obukhova G.V., Domnina N.S., Torchiev D.A.* // Macromol. Symp. 1999. V. 144. P. 413–422.
3. *Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И.* // Биохимия. 2004. N. 69. С. 930–936.
4. *Volodkin D.V., Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B., Larionova N.I.* // STP Pharma Sci., 2003. 13. P. 163–170.