ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ АДЪЮВАНТНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

STUDYING THE POSSIBILITY OF OBTAINING ADJUVANT NANOPARTICLES

Е. Ю. Романика, М. А. Винтер, А. И. Зинченко
E. U. Romanika, M. A. Vinter, A. I. Zinchenko

*Учреждение образования «Международный государственный экологический институт
имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
romanika03@mail.ru*

*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University,
ISEI BSU Minsk, Republic of Belarus*

В работе проведено изучение возможности получения наночастиц хитозана с разными сшивающими агентами, тестирование наночастиц проверкой их антибактериальных свойств.

The paper studies the possibility of obtaining chitosan nanoparticles with different crosslinking agents and testing their antibacterial properties.

Ключевые слова: Наночастицы, хитозан, адъювант, доставка лекарств.

Keywords: Nanoparticles, chitosan, adjuvant, drug delivery.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-401-404>

Наночастицы (НЧ) занимают важное положение в фармацевтических, биологических и медицинских дисциплинах. Полимерные наночастицы имеют большие перспективы в качестве наноносителей, которые могут инкапсулировать молекулы лекарств и других активных химических веществ, доставлять их в указанное место и высвобождать регулируемым образом. Хитозан является одним из наиболее популярных полимеров в науке, который активно исследуется в последнее десятилетие; он является вторым по распространенности после целлюлозы, природным полисахаридом. Полимерные НЧ на основе хитозана могут выступать в качестве превосходных носителей лекарственных средств благодаря некоторым присущим им полезным свойствам, включая биосовместимость, способность к биологическому разложению, нетоксичность, биоактивность и простоту получения [1]. Благодаря своей гидрофильной природе, хитозан является идеальным исходным материалом для биосовместимых и биоразлагаемых гидрогелей [2]. Более того, катионные характеристики хитозана сделали его популярным средством доставки генов и лечения рака. Таким образом, особое внимание уделяется использованию НЧ хитозана в разработке новых систем доставки лекарств [3–5].

Транспорт и высвобождение лекарств из НЧ на основе хитозана зависят от степени перекрестного связывания, морфологии, размера и плотности системы частиц, а также от физико-химических свойств лекарства. Все эти аспекты необходимо учитывать при разработке новых НЧ на основе хитозана в качестве потенциальных систем доставки лекарственных средств [2].

НЧ хитозана обладают хорошей мукоадгезивной способностью, повышенным поглощением клетками по сравнению с нейтральными полимерами (например, декстран), и высокой скоростью растворения гидрофобных лекарственных средств. Кроме того, хитозан обеспечивает стабильность лабильных препаратов в ЖКТ, их усвояемость и контролируемое высвобождение, поскольку частицы находятся в наноразмерном диапазоне, что позволяет эффективно преодолевать биологические барьеры. Однако НЧ хитозана также имеют некоторые недостатки: низкое механическое сопротивление, трудно контролируемая форма и размер частиц. Низкая растворимость хитозана при физиологическом pH негативно влияет на всасывание и вызывает предсистемный метаболизм при пероральном приеме лекарственных средств [1].

Одним из наиболее изученных свойств хитозана является его антимикробный эффект, охватывающий все сферы применения - от биомедицины до косметики и от пищевых продуктов до сельского хозяйства. Чтобы использовать антимикробную активность хитозана вместе с его особыми свойствами для производства самосохраняющихся материалов, было проведено множество исследований. Это привело к разработке большого ассортимента продуктов, содержащих хитозан в виде гранул, пленок, волокон, мембран и гидрогелей, предназначенных для различных применений.

Точный механизм антибактериальной активности еще предстоит полностью понять. Известно, что на антимикробную активность хитозана влияет ряд факторов, которые действуют упорядоченным и независимым образом. Наиболее распространенной предполагаемой антибактериальной активностью хитозана является связывание с отрицательно заряженной клеточной стенкой бактерий, вызывающее разрушение клетки, таким образом

изменяя проницаемость мембраны, с последующим прикреплением к ДНК, вызывающим ингибирование репликации ДНК и последующую гибель клеток.

Тем не менее, текущие исследования по-прежнему направлены на дополнительное улучшение свойств хитозана. Предпринимаются усилия по повышению его низкой растворимости в физиологических рН, увеличению специфичности по отношению к сложным биологическим системам путем химической модификации чистого хитозана или путем его комбинирования с другими полимерами или неорганическими материалами [1]. Уже были разработаны новые модифицированные НЧ и нанокompозиты на основе хитозана, обладающие более или менее улучшенными свойствами. Такие инновационные системы с НЧ обеспечивали, в большей или меньшей степени, нетоксичность, биосовместимость и стабильность доставки препаратов [3].

Приготовление НЧХ часто проводят в мягких условиях, поскольку хитозан растворим в кислых водных растворах при комнатной температуре и не требует никаких токсичных органических растворителей или нагревания.

Ковалентное сшивание относится к соединению двух или более молекул вместе посредством ковалентных химических связей. В случае НЧ образуются ковалентные связи между хитозаном и функциональным сшивающим агентом [3]. Сшивающие вещества обычно содержат несколько функциональных групп, ответственных за ковалентное сшивание. Множественные связи между различными полимерными цепями позволяют наноматериалам формировать трехмерную структуру. Наиболее часто используемыми сшивающими веществами являются глутаровый альдегид, ванилин, генипин, полиэтиленгликоль и триполифосфат. Свободные аминогруппы на хитозане также обеспечивают способность к ионному сшиванию, что позволяет осуществлять посадку на хитозан широкого спектра соединений различной природы (белков, РНК, ДНК, нуклеотидов и олигонуклеотидов) прямо и опосредованно с использованием сшивающих агентов, что было ранее описано в литературе.

НЧ с высокой долей сшивающего агента демонстрируют меньшее набухание, меньшее проникновение воды внутрь и диффузию лекарственного средства в среду. Механическая прочность частиц возрастает при увеличении сшивки (например, анионами, декстраном, глиоксалем, генипином, триполифосфатом, формальдегидом, глутаровым альдегидом).

Более того, многие факторы могут влиять на действие вакцинных адъювантов и систем доставки. Например, размер НЧ будет влиять на их всасывание в организме, трансмембранную транспортную способность НЧ, а положительный заряд, характерный для хитозана, будет легко взаимодействовать с отрицательно заряженными поверхностями (такимикак слизистые оболочки), тем самым влияя на иммунный эффект.

Среди существующих методов получения НЧ некоторые токсичны для клеток из-за использования в них органических растворителей. Удаление органических растворителей очень важно. Кроме того, выбор поверхностно-активных веществ также оказывает большое влияние на размер частиц, морфологию и стабильность наночастиц, поэтому требования к исследованиям и разработкам поверхностно-активных веществ становятся все более жесткими, чтобы обеспечить применение наноматериалов в различных областях. Кроме того, необходимы доклинические исследования для оценки безопасности наноносителей на основе хитозана. Следовательно, необходимо выбрать соответствующий метод синтеза в соответствии с различными областями применения НЧ, и следует получать больше нетоксичных НЧ.

Использованный в данном исследовании штамм *Escherichia coli* K-12 был предоставлен Белорусской коллекцией непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси.

Хитозан (размер 100-300 кДа, степень деацетилирования $\geq 75\%$) (Acros Organics, Бельгия) растворяли в 1% растворе уксусной кислоты до концентрации 10 мг/мл с последующим перемешиванием в течение 1 ч на орбитальном шейкере при скорости вращения 200 об/мин. Полученный раствор разделили на аликвоты объемом 2 мл.

Затем готовили серию растворов ванилина в 96 % этаноле следующих концентраций (мг/мл): 25, 50, 100, 150, 250 и 500.

Далее готовили гидрогели с массовым соотношением (хитозан:ванилин) 10:1, 5:1, 5:2, 5:3, 1:1 и 1:2 путем добавления по каплям свежеприготовленных растворов ванилина в количестве 0,4 мл к 2 мл раствора хитозана при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при скорости вращения 1000 об/мин при комнатной температуре.

Растворы высушивали в термостате с 55°C в течение суток. После высушивания каждого образца отобрали по 6 мг геля для микробиологического анализа.

Те же действия, только в других соотношениях, были проделаны для глутаральдегида, триполифосфата, аденозинтрифосфорной кислоты и лимонной кислоты в качестве сшивающих агентов.

Для определения антибактериальной активности НЧ ранее приготовленные чашки маркером разделяли на сектора в соответствии с количеством проб, после чего на поверхность агарового слоя в центр сектора стерильным шпателем выкладывали образцы НЧ. Сектора подписывали в соответствии с нанесенным образцом, чашки Петри помещали в термостат с температурой 37 °C на 18 ч. Антибактериальную активность определяли по наличию зон задержки роста бактерий на соответствующих секторах.

После добавления сшивающих агентов к раствору хитозана наблюдали следующие изменения: растворы мутнели и приобретали желтоватую окраску, интенсивность окрашивания зависела от конечной концентрации агента. Также, было отмечено желирование образцов с равными соотношениями массы компонентов или с избытком агента.

После высушивания проб в термостате, была замечена зависимость способности гидрогеля сохранять воду от соотношения хитозана и сшивающего агента. В случае с ванилином пробы 6 и 7, соответствующие соотношению

хитозан:ванилин – 1:1 и 1:2 соответственно, даже спустя сутки при 55 °С не были высушены до состояния плёнки и оставались в гелеобразном состоянии.

Антибактериальную активность определяли по наличию зон задержки роста бактерий на соответствующих секторах. Результаты исследования представлены в таблицах 1-5, где “-” – отсутствие зон задержки роста бактерий, “+” – наличие зон задержки роста бактерий, “++” – наличие особо больших зон задержки роста бактерий.

Таблица 1

Наличие зон задержки роста для гидрогеля хитозан/ванилин

Соотношение хитозан/ванилин	10:1	5:1	5:1	5:3	1:1	1:2
Наличие зон задержки роста	-	-	+	+	++	++

Таблица 2

Наличие зон задержки роста для гидрогеля хитозан/глутаральдегид

Соотношение хитозан/глутаровый альдегид	1:5	1:10	1:20	1:2	1:1	1:0,5	1:0,2
Наличие зон задержки роста	+	++	++	+	+	-	-

Таблица 3

Наличие зон задержки роста для гидрогеля хитозан/триполифосфат

Соотношение хитозан/триполифосфат	1:0,2	1:0,33	1:0,5	1:1	1:2	1:3	1:5
Наличие зон задержки роста	+	+	+	+	+	-	-

Таблица 4

Наличие зон задержки роста для гидрогеля хитозан/АТФ

Соотношение хитозан/АТФ	5:1	3:1	2:1	1:1	1:2	1:3	1:5
Наличие зон задержки роста	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 5

Наличие зон задержки роста для гидрогеля хитозан/лимонная кислота

Соотношение хитозан/лимонная кислота	5:1	3:1	2:1	1:1	1:2	1:3	1:5
Наличие зон задержки роста	++	++	+	+	-	-	-

Мы продемонстрировали возможность получения наночастиц хитозана с использованием ванилина, глутаральдегида, триполифосфата, АТФ и лимонной кислоты в качестве сшивающих агентов. Соотношение хитозана и агента было определяющим для проявления антибактериальных и физических свойств.

Минимальное соотношение хитозана и ванилина в получаемых наночастицах, обладающих бактериостатическим действием, было 5:2; зоны задержки роста увеличивались с увеличением соотношения в сторону ванилина. При достижении соотношения хитозан:ванилин – 1:1 нами не было зафиксировано дальнейшего усиления антибактериальной активности.

Зоны задержки роста бактерий с гидрогелем хитозан/глутаральдегид возрастали с увеличением концентрации глутаральдегида и только начиная с соотношения 1:1. Наибольший диаметр зоны задержки роста был зафиксирован у проб 2 и 3 из использованных (соотношение хитозан:глутаральдегид– 1:10 и 1:20). К сожалению, чем дальше соотношение удалялось от 1:1, тем больше терялось физических свойств гидрогеля.

Бактериостатическое действие гидрогеля хитозан/триполифосфат незначительно, размеры зоны возрастали с уменьшением концентрации триполифосфата. Таким образом, антибактериальная активность не была зафиксирована у проб соотношения хитозан/триполифосфат – 1:3 и 1:5. В то же время свойства гидрогеля значительно не изменялись по сравнению с гидрогелями хитозан/глутаральдегид.

Незначительные зоны задержки роста бактерий с гидрогелем хитозан/АТФ образовались вокруг всех проб, причём размеры зоны не разнились.

Лимонная кислота в свою очередь дала очень разные результаты при сшивании хитозана как по физическим, так и по биологическим свойствам. Причем гель образовался только при недостатке кислоты, а осадок только при удалении от соотношения хитозан/лимонная кислота – 1:1. Согласно проведенному исследованию, антибактериальная активность была зафиксирована у осадков проб 1 и 2, также у гидрогелей/плёнок 1,2,3 и незначительная активность в пробе 4; наибольший диаметр зоны задержки роста был зафиксирован у проб 1 и 2 из использованных (соотношение хитозан:ЛК – 5:1 и 3:1). К сожалению, достичь правильного состояния гидрогеля при использовании лимонной кислоты возможно лишь при использовании соотношения 1:1. Если же придерживаться соотношения хитозан/ЛК – 2:1, после высушивания получается плёнка. А при увеличении доли лимонной кислоты получается только гетерогенная жидкость.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mikušová, V. Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery / V. Mikušová, P. Mikuš // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22, № 17. – Art. 9652. <https://doi.org/10.3390/ijms22179652>
2. Derivation of composites of chitosan-nanoparticles from crustaceans source for nanomedicine: A mini review / V. Abere [et al.] // Biomed. Eng. Ad. – 2022. – Vol. 4. – Art. 100058. <https://doi.org/10.1016/j.bea.2022.100058>
3. Chitosan Nanoparticles: A Versatile Platform for Biomedical Applications / S.M. Bashir [et al.] // Materials. – 2022. – Vol. 15, № 19. – Art. 6521. <https://doi.org/10.3390/ma15196521>
4. Винтер, М. А. Получение комплексов хитозана с 3',5'-циклическим диаденозинмонофосфатом / М. А. Винтер, И. С. Казловский, А. И. Зинченко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 3. – С. 206–212. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-3-206-212>.
5. Получение комплексов хитозана с рекомбинантным человеческим лактоферрином / М. А. Винтер [и др.] // Prední vedecke novinky – 2023 : materialy XX Mezinárodní vedecko-praktická conference, Praha, 22–30 srpna 2023 / red. Z. Cernak. – Praha, 2023. – Vol. 2. – P. 8–13.

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ РАСЧЕТ 5-ФОРМИЛ-2-МЕТОКСИФЕНИЛ (3AS,6R,7S,7AR)-2-МЕТИЛ-1-ОКСО-1,2,3,6,7,7А-ГЕКСАГИДРО-3А,6- ЭПОКСИЗОИНДОЛ-7-КАРБОКСИЛАТА

QUANTUM-CHEMICAL CALCULATION OF 5-FORMYL-2-METHOXYPHENYL (3AS,6R,7S,7AR)-2-METHYL-1-OXO-1,2,3,6,7,7A-HEXAHYDRO-3A,6- EPOXYISOINDOLE-7-CARBOXYLATE

М. А. Атрошко¹, Е. А. Дикусар³, Л. Ф. Подобед¹, Е. П. Борсток¹, С. Н. Шахаб^{1,2,3}
М. А. Atroshko¹, Е. А. Dikusar³, L. F. Podobed¹, Е. P. Borstock¹, S. N. Shahab^{1,2,3}

¹Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь
atroshkomikhail@gmail.com

²Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

³Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Chemistry of New Materials National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

³Institute of Physical Organic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

В работе приведены полуэмпирические и теоретические расчеты молекулы 5-формил-2-метоксифенил (3as,6r,7s,7ar)-2-метил-1-оксо-1,2,3,6,7,7а-гексагидро-3а,6-эпоксиизоиндол-7-карбоксилата, в среде растворителя (вода), ее спектр поглощения и оптимизированная структура с значением полной энергии системы.

The paper presents the data of semi-empirical and theoretical calculations of 5-formyl-2-methoxyphenyl (3AS,6R,7S,7AR)-2-methyl-1-oxo-1,2,3,6,7,7a-hexahydro-3a,6-epoxyisoindole-7-carboxylate molecule, in the solvent (water), their absorption spectrum and the optimized structure with the value of the total energy of the system.

Ключевые слова: эпоксиизоиндол, PM6, M06, TZVP, УФ спектр.

Keywords: epoxyisoindole, PM6, M06, TZVP, UV/Vis spectrum.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-404-406>

Предварительное квантово-химическое моделирование молекулы. Для расчетов использован персональный компьютер с процессором AMD Ryzen 5 1600 (2.21 GHz CPU) с установленной операционной системой Ubuntu 20.04.2. При вычислениях стартовой геометрии молекулы выбран метод молекулярной механики (ММ⁺) программного пакета NucleonChem 08. Выбор метода ММ⁺ обоснован тем, что он разработан для органических молекул, учитывает потенциальные поля, формируемые всеми атомами рассчитываемой системы, и позволяет гибко модифицировать параметры расчета в зависимости от конкретной задачи. Стартовую геометрию молекулы дополнительно оптимизировали в среде растворителя (вода) полуэмпирическим методом PM6 программного