

УДК 547.458.5

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ НАНОДИСПЕРСИЙ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНОГО КОМПЛЕКСА «ХИТОЗАН–СУКЦИНАМИД ХИТОЗАНА»

© С. В. Колесов, М. С. Гурина, Р. Х. Мударисова*

*Уфимский институт химии УФИЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября 71.**Тел.: +7 (347) 235 55 60.***Email: mударисова@anrb.ru*

Приводятся и обсуждаются экспериментальные данные по ферментативной деструкции дисперсной системы микрочастиц полиэлектrolитного комплекса водорастворимых полисахаридов гидрохлорида хитозана и натриевой соли сукцинамида хитозана под действием гиалуронидазы. Исследовался полиэлектrolитный комплекс, образованный из хитозана с молекулярной массой 30 кДа и сукцинамида хитозана с молекулярной массой 207 кДа при мольном соотношении ионогенных групп поликатиона к полианиону $z = 0.4$. Средний размер частиц в полученной дисперсной системе составлял 340 нм. Концентрация фермента в растворе варьировалась от 0.005 до 0.12% масс. Процесс исследовался по изменению размеров частиц. Показано, что микрочастицы полиэлектrolитного комплекса подвергаются ферментативному разрушению, следствием чего является уменьшение размера частиц во времени до 15–50 нм за время от 10 до 360 мин в зависимости от соотношения концентраций полимеров и фермента. Полного разрушения микрочастиц не обнаружено. Особенностью процесса оказалось то, что полимерные фрагменты, образующиеся при разрыве макромолекул сформировавших полиэлектrolитный комплекс полисахаридов, могут вступить в последующие полиэлектrolитные взаимодействия с образованием «вторичного» полиэлектrolитного комплекса в виде осадка.

Ключевые слова: хитозан, сукцинамид хитозана, полиэлектrolитный комплекс, ферментативная деструкция, наночастицы.

Введение

В литературе описано множество интерполиэлектrolитных систем, включающих хитозан (ХТЗ), и способов получения из них нано- и микрочастиц [1–10]. Целями разработки и применения нано- и микрочастиц в биомедицинском приложении являются преодоление тканевых барьеров, уменьшение побочных эффектов лекарственных соединений (токсичности, аллергенности), повышение эффективности за счет пролонгирования действия и, главное, достижение их адресной доставки в клетки. Материалы на основе полимеров природного происхождения, предназначенные для временного функционирования в организме, должны обладать контролируемым сроком деградации, а продукты их распада должны быть нетоксичными и легко выводиться из организма. Биосовместимые и биodeградируемые полимеры хитозана этому в полной мере отвечают.

В многочисленных работах показано, что ХТЗ подвергается распаду под действием целого ряда неспецифических ферментов, в том числе ферментов живого организма (пепсина, трипсина, коллагеназы, гиалуронидазы, лизоцима) [11–13]. Процесс ферментативной деградации фиксируется по изменению различных характеристик в зависимости от вида материала. В случае растворов полимеров определяется, как правило, изменение степени полимеризации или связанные с ней показатели вязкости [14–16]. В [17–18] процесс ферментативной деструкции изучался по накоплению восстанавливающих сахаров. В случае полимерных пленок,

волокон объемных материалов (имплантов или матриц) чаще всего фиксируется потеря массы или изменение качества поверхности материала [19–20]. В случае полимерных нано- и микрочастиц на основе биополимеров представляется возможным фиксировать процесс биodeградации непосредственно по изменению размеров частиц. Среди многих видов полимерных нано- и микрочастиц внимание привлекают дисперсные системы, образующиеся в совместном растворе комплементарных по заряду полиэлектrolитов (ПЭ) по механизму электростатического взаимодействия противоположно заряженных ионогенных групп с образованием солевых полиэлектrolитных комплексов (ПЭК).

Целью настоящей работы стала оценка ферментативной устойчивости микрочастиц ПЭК на основе поликатиона – гидрохлорида ХТЗ и полианиона – натриевой соли сукцинамида хитозана (СХТЗ) в водной дисперсии под действием ферментного препарата гиалуронидазы, выяснение закономерностей и особенностей этого процесса.

Экспериментальная часть

В работе использовали образцы хитозана производства ЗАО «Биопрогресс» (г. Щелково, Россия), соответствующие ТУ 9289-067-00473124-03. Использовали образец натриевой соли сукцинамида хитозана производства ЗАО «Биопрогресс» (г. Щелково, Россия), соответствующий ТУ 9284-027-11734126. с молекулярной массой 207 Кда. Образец СХТЗ с молекулярной массой 26 кДа получали методом окислительного расщепления высоко-

молекулярного полимера с массой 207 кДа перекисью водорода в водном растворе, как описано в [21]. Полагали, что содержание ацетамидных, amino- и сукцинамидных групп при окислительном расщеплении макроцепей по закону случая не изменялось. Характеристики использованных образцов приведены в *табл. 1*.

В качестве ферментного препарата использовали лиразу производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава РФ, рег. №ЛСР007075/08, относящуюся к группе гиалуронидаз. Гидрохлорид хитозана (ХТЗ) получали в виде пленки из солянокислого раствора хитозана (2 г хитозана в 50 мл 1% раствора соляной кислоты) путем высушивания на воздухе и далее под вакуумом до постоянной массы. Молярное соотношение соляная кислота/хитозан при этом составляет 1.07. Согласно данным потенциометрии уже при значении этого соотношения 0.8 достигается максимально возможная степень протонирования NH_2 -групп.

Таблица 1

Физико-химические характеристики
полиэлектролитов

Поли- мер	[η], дл/г	M_z , кДа	Количество звеньев, % мол.		
			R-NH ₂	R-NHCOCH ₃	R-COOH
ХТЗ	0.7	30	75	25	–
СХТЗ-1	0.6	26	20	18	62
СХТЗ-2	3.60	207	20	18	62

Молекулярную массу исследуемых полимеров определяли методом седиментационного равновесия, используя ультрацентрифугу MOM – 3080 и рассчитывали согласно:

$$M_z = \frac{RT}{(1-\nu\rho_0)\omega^2} \cdot \text{tg}\alpha,$$

где $R = 8.3$ Дж/моль·К; T – абсолютная температура; $\omega = 2\pi n$ рад/сек; n – число оборотов ротора в минуту; $\text{tg}\alpha$ – угол наклона зависимости Z/X от концентрации раствора C , где $Z_i = dC/dX$.

Водные дисперсии ПЭК получали путем добавления к водным растворам СХТЗ по каплям водный раствор ХТЗ при интенсивном перемешивании при комнатной температуре с интервалом между введением порций 5 мин. Состав реакционной смеси выражали через молярное соотношение z :

$$z = \frac{[\text{ХТЗ}] \cdot V_{\text{ХТЗ}}}{[\text{СХТЗ}] \cdot V_{\text{СХТЗ}}},$$

где $[\text{ХТЗ}]$ – молярная концентрация ионогенных звеньев хитозана, рассчитанная с учетом степени деацетилирования, $[\text{СХТЗ}]$ – молярная концентрация ионогенных звеньев сукцината хитозана, рассчитанная с учетом степени деацетилирования и степени модификации по amino-группам, $V_{\text{ХТЗ}}$ и

$V_{\text{СХТЗ}}$ – объемы растворов соответствующих компонентов.

Фазовое поведение смесей оценивали визуально по появлению опалесценции смеси растворов ПЭК и по образованию осадка комплекса.

Для проведения ферментативной деструкции ферментный препарат, предварительно растворенный в небольшом количестве дистиллированной воды, вводили в свежеприготовленную водную суспензию микрочастиц ПЭК и экспонировали при температуре 25°C. С целью оценки изменения размеров частиц во времени через определенные промежутки отбирали пробы из объема реакционной системы и определяли текущие средние размеры частиц.

Размеры частиц ПЭК определяли методом лазерного рассеяния на приборе Sald 7101 (Shimadzu). Длина волны полупроводникового лазера 375 нм. Рабочий диапазон измерения диаметров частиц 10 нм – 300 мкм. Измерения проводились в специальных кварцевых кюветах Sald-BC с механическим вертикальным перемешиванием. Измерения проводили в инертной атмосфере аргона. Определение размеров частиц для свежеприготовленных дисперсных систем проводили через 1 день после получения.

Анализы выполнены на оборудовании ЦКП «Химия» УфИХ УФИЦ РАН.

Результаты и их обсуждение

Выбор пары полисахаридов ХТЗ–СХТЗ обусловлен тем, что оба компонента, являясь солями, хорошо растворимы в нейтральной водной среде. Водные смеси ХТЗ–СХТЗ имеют pH 6.5–7.0. Это важно, т.к. оптимум активности гиалуронидазы проявляется в интервале pH = 5.5–7.0. Достаточно эффективное деструктирующее действие гиалуронидазы на ХТЗ в растворе и в виде пленки описано в [15].

При сливании растворов ХТЗ и СХТЗ образуется дисперсная система микрочастиц ПЭК, что обнаруживается по появлению опалесценции смеси. В настоящей работе исследовали дисперсную систему, образующуюся при $z = 0.4$ в растворе с общей концентрацией по сумме полимеров 0.94% масс. При этом парциальная концентрация СХТЗ в растворе составила 0.80% масс., соответственно ХТЗ – 0.14% масс. В этой системе образуются микрочастицы, которые имеют начальный средний размер порядка 340 нм. Система относительно устойчива и сохраняет дисперсное состояние в течение 30 дней, хотя в ней непрерывно идут процессы, приводящие к изменению размеров частиц (*табл. 2*). Через 30 дней в системе происходит фазовый распад с образованием осадка.

Очевидно, именно по этой причине после достижения размеров частиц порядка 15–50 нм (соответственно, накопления достаточного количества низкомолекулярных полисахаридов) в ферментосо-держажих системах происходит образование осадка ПЭК. При соотношении $C_{\text{пол.}}/C_{\text{ф}} \approx 10^2$ это достигается за 6 часов, а при $C_{\text{пол.}}/C_{\text{ф}} \approx 10$ за 2 часа экспозиции.

Таблица 4

Размер частиц ПЭК для систем ХТЗ - СХТЗ-1

ω, % масс.	z	D, нм	
		В день получения (1 час)	после выдерживания в теч. 3 дней
0.44	0.4	206	осадок
0.52	0.4	239	осадок
1.00	0.4	267	осадок
2.10	0.4	371	367

Выводы

Таким образом, микрочастицы ПЭК, образованного хитозаном и сукцинамидом хитозана, подвергаются ферментативному разрушению под действием гиалуронидаз, следствием чего является уменьшение размера частиц во времени. Однако в условиях эксперимента не обнаружилось полного разрушения микрочастиц. Особенностью процесса оказалось то, что полимерные фрагменты, образующиеся при разрыве макромолекул сформировавшихся ПЭК полисахаридов, могут вступать в последующие полиэлектролитные взаимодействия. В результате этого процесс ферментализации дисперсии микрочастиц в условиях эксперимента сопровождается не полным разрушением частиц, а образованием «вторичного» ПЭК в виде осадка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barck K., Butler M. F. Comparison of morphology and properties of polyelectrolyte complex particles formed from chitosan and polyanionic biopolymers // *J. Appl. Polym. Sci.* 2005. Vol. 98. No. 4. P. 1581–1593.
2. Boddohi S., Moore N., Johnson P. A., Kipper M. J. Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan // *Biomacromolecules.* 2009. Vol. 10. No. 16. P. 1402–1409.
3. Shu X. Z., Zhu K. J. Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation // *J. Microencapsul.* 2001. Vol. 18. No 2. P. 237–245.
4. Губайдуллина А. А., Смагина Г. И., Мелентьев А. И., Алсынбаев М. М. Микрочастицы хитозана для получения пролонгированной формы альфа-интерферона // *Биотехнология.* 2010. №5. С. 37–45.
5. Bemkop-Schnurch A., Dunnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012. Vol. 81, No 3. P. 463–469.
6. Гурина М. С., Вильданова Р. Р., Бадыкова Л. А., Власова Н. М., Колесов С. В. Микрочастицы на основе интерполиэлектролитного комплекса хитозан – гиалуроновая ки-

7. слота, обеспечивающие стабильность водных дисперсий // *Журнал прикладной химии.* 2017. Т. 90, №2. С. 197–402.
8. Киржанова Е. А., Печенкин М. А., Демина Н. Б., Балабушевич Н. Г. Микро- и наночастицы из альгината и хитозана для трансмукозальной доставки белка // *Вестник Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2016. Т. 57. №2. С. 103–111.
9. Guo R., Chen L., Cai S. Novel alginate coated hydrophobically modified chitosan polyelectrolyte complex for the delivery of BSA // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2013. Vol. 24.No. 9. P. 2093–2100.
10. Patil S. B., Sawant K. K. Chitosan microspheres as a delivery system for nasal insufflation // *Colloid Surf B: Biointerfaces.* 2011. Vol. 84. P. 384–389.
11. Rafiee A., Taraneh Gazori M. H. A., Riaz-rad F. Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection // *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* 2014. Vol. 4.No. 5. P. 372–377.
12. Zhang H., Du Y., Yu X., Mitsutomi M., Aiba S. Preparation of chitosan oligosaccharides from chitosan by a complex enzyme // *Carbohydrate Research.* 1999. Vol. 320. P. 257–260.
13. Ильина А. В., Варламов В. П. Энзимология синтеза и деградации хитина и хитозана // *Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / под ред. К. Г. Скрыбина, Г. А. Вихоревой., В. П. Варламова. М.: Наука, 2002. С. 79–90.*
14. Кулиш Е. И., Володина В. П., Колесов С. В., Заиков Г. Е. Ферментативная деструкция хитозановых пленок под действием коллагеназы // *Высокомолек. соед. Сер. В.* 2006. Т. 48. №9. С. 1721–1724.
15. Кулиш Е. И., Володина В. П., Фаткуллина Р. Р., Колесов С. В., Заиков Г. Е. Макромолекулярные эффекты при ферментативной деструкции хитозана в растворе // *Высокомолек. соед. Сер. В.* 2008. Т. 50. №7. С. 1277–1280.
16. Чернова В. В., Володина В. П., Кулиш Е. И., Колесов С. В. Деструкция хитозана в растворе под действием фермента гиалуронидазы // *Вестник Баш.ГУ.* 2009. Т. 14. №1. С. 44–47.
17. Kulish E. I., Chernova V. V., Volodina V. P., Kolesov S. V. Peculiarities of viscometric studies of enzymatic hydrolysis of chitosan // *Inorganic Materials: Applied Res.* 2014. Vol. 5. №2. P. 170–173.
18. Кулиш Е. И., Чернова В. В., Хуснутдинова А. Р., Володина В. П., Колесов С. В. // *Журнал прикладной химии.* 2012. Т. 85. №1. С. 163–165.
19. Луньков А. П., Шагдарова Б. Ц., Ильина А. В. Синтез кватернизованных производных хитозана и изучение их свойств // *Известия Уфимского научного центра РАН.* 2016. №3(1). С. 56–58.
20. Коновалова М. В., Курек Д. В., Дурiev Е. А., Литвинцев С. Г., Варламов В. П. Дегградация *invitro* пектин-хитозановых криогелей // *Известия Уфимского научного центра РАН.* 2016. №3(1). С. 42–45.
21. Tomihata K., Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives // *Biomaterials.* 1997. V. 18. P. 567–575.
22. Патент 2417088 РФ. Купреев Н. И., Быковский Д. В., Кузнецов В. А., Ваел Шехта Матвалли Э. Е. Способ получения низкомолекулярного хитозана, опубл. 27.04.2011.
23. Кабанов В. А., Зезин А. Б. Новый класс комплексных водорастворимых полиэлектролитов // *Успехи химии.* 1982. Т. 51. №9. С. 1447–1483.
24. Кулиш Е. И., Чернова В. В., Володина В. П., Колесов С. В. О возможных причинах «непостоянства» значений характеристической вязкости хитозана // *Высокомолек. соед. Сер. А.* 2015. Т. 57. №5. С. 390–397.

Поступила в редакцию 29.06.2018 г.

**ENZYMATIC STABILITY OF NANODISPERSIONS
OF POLYELECTROLYTE COMPLEX
OF CHITOSAN - SUCCINAMIDE OF CHITOSAN**

© S. V. Kolesov, M. S. Gurina, R. Kh. Mudarisova*

*Ufa Institute of Chemistry, Ufa Scientific Center of RAS
71 Oktyabrya Avenue, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

Phone: +7 (347) 235 55 60.

**Email: mudarisova@anrb.ru*

Experimental data on the enzymatic degradation of a dispersed system of microparticles of a polyelectrolyte complex of water-soluble polysaccharides of chitosan hydrochloride and succinamide of chitosan under the action of hyaluronidase are presented and discussed. A polyelectrolyte complex formed from chitosan with a molecular mass of 30 kDa and succinamide of chitosan with a molecular mass of 207 kDa was studied at a molar ratio of the ionic groups of the polycation to the polyanion of $z = 0.4$. The average particle size in the resulting dispersed system was 340 nm. The concentration of the enzyme in the solution ranged from 0.005 to 0.12% by weight. The process was studied by changing in the size of particles. It is shown that the microparticles of the polyelectrolyte complex undergo enzymatic destruction, which results in a decrease in the size of the particles up to 15–50 nm in a time of 10 to 360 min, depending on the ratio of the concentrations of the polymers and the enzyme. Complete destruction of the microparticles was not detected. The peculiarity of the process was that the polymer fragments, which were formed during the “rupture” of macromolecules arranged into a polyelectrolyte complex of polysaccharides, could participate in subsequent polyelectrolyte interactions with the formation of a “secondary” polyelectrolyte complex in the form of a precipitate.

Keyword: chitosan, succinamide of chitosan, polyelectrolyte complex, enzymatic degradation, nanoparticles.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

REFERENCES

1. Barck K., Butler M. F. *J. Appl. Polym. Sci.* 2005. Vol. 98. No. 4. Pp. 1581–1593.
2. Boddohi S., Moore N., Johnson P. A., Kipper M. J. *Biomacromolecules.* 2009. Vol. 10. No. 16. Pp. 1402–1409.
3. Shu X. Z., Zhu K. J. *J. Microencapsul.* 2001. Vol. 18. No. 2. Pp. 237–245.
4. Gubaidullina A. A., Smagina G. I., Melent'ev A. I., Alsynbaev M. M. *Biotekhnologiya.* 2010. No. 5. Pp. 37–45.
5. Bernkop-Schnurch A., Dunnhaupt S. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012. Vol. 81, No. 3. Pp. 463–469.
6. Gurina M. S., Vil'danova R. R., Badykova L. A., Vlasova N. M., Kolesov S. V. *Zhurnal prikladnoi khimii.* 2017. Vol. 90, No. 2. Pp. 197–402.
7. Kirzhanova E. A., Pechenkin M. A., Demina N. B., Balabushevich N. G. *Vestnik Mosk. un-ta. Ser. 2. Khimiya.* 2016. Vol. 57. No. 2. Pp. 103–111.
8. Guo R., Chen L., Cai S. J. *Mater. Sci. Mater. Med.* 2013. Vol. 24. No. 9. Pp. 2093–2100.
9. Patil S. B., Sawant K. K. *Colloid Surf B: Biointerfaces.* 2011. Vol. 84. Pp. 384–389.
10. Rafiee A. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* 2014. Vol. 4. No. 5. Pp. 372–377.
11. Zhang H., Du Y., Yu X., Mitsutomi M., Aiba S. *Carbohydrate Research.* 1999. Vol. 320. Pp. 257–260.
12. Il'ina A. V., Varlamov V. P. *Khitin i khitozan: poluchenie, svoistva i primeneniye.* Moscow: Nauka, 2002. Pp. 79–90.
13. Kulish E. I., Volodina V. P., Kolesov S. V., Zaikov G. E. *Vysokomolek. soed. Ser. Vol.* 2006. Vol. 48. No. 9. Pp. 1721–1724.
14. Kulish E. I., Volodina V. P., Fatkullina R. R., Kolesov S. V., Zaikov G. E. *Vysokomolek. soed. Ser. Vol.* 2008. Vol. 50. No. 7. Pp. 1277–1280.
15. Chernova V. V., Volodina V. P., Kulish E. I., Kolesov S. V. *Vestnik Bash.GU.* 2009. Vol. 14. No. 1. Pp. 44–47.
16. Kulish E. I., Chernova V. V., Volodina V. P., Kolesov S. V. *Inorganic Materials: Applied Res.* 2014. Vol. 5. No. 2. Pp. 170–173.
17. Kulish E. I., Chernova V. V., Khusnutdinova A. R., Volodina V. P., Kolesov S. V. *Zhurnal prikladnoi khimii.* 2012. Vol. 85. No. 1. Pp. 163–165.
18. Lun'kov A. P., Shagdarova B. Ts., Il'ina A. V. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN.* 2016. No. 3(1). Pp. 56–58.
19. Konovalova M. V., Kurek D. V., Duriev E. A., Litvinets S. G., Varlamov V. P. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN.* 2016. No. 3(1). Pp. 42–45.
20. Tomihata K., Ikada Y. *Biomaterials.* 1997. Vol. 18. Pp. 567–575.
21. Patent 2417088 RF. Kupreev N. I., Bykovskii D. V., Kuznetsov V. A., Vael Shekhta Matvalli E. E. *Sposob polucheniya nizkomolekulyarnogo khitozana*, opubl. 27.04.2011.
22. Kabanov V. A., Zezin A. B. *Uspekhi khimii.* 1982. Vol. 51. No. 9. Pp. 1447–1483.
23. Kulish E. I., Chernova V. V., Volodina V. P., Kolesov S. V. *Vysokomolek. soed. Ser. A.* 2015. Vol. 57. No. 5. Pp. 390–397.

Received 29.06.2018.