

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ

ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

им. А.Н. НЕСМЕЯНОВА

РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ДОКЛАД ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ РЕАЦЕТИЛИРОВАННОГО ХИТОЗАНА
С БИОСОВМЕСТИМЫМИ ПОЛИМЕРАМИ В СЛАБОЩЕЛОЧНОЙ
СРЕДЕ**

1.4.7. – Высокомолекулярные соединения

Автор: Тищенко Никита Андреевич

Научный руководитель: д.х.н. Благодатских Инэса Васильевна

Москва 2024

Комплексы из биосовместимых макромолекул к настоящему времени находят применение в различных областях биотехнологии, как например, создание систем очистки воды, а также в области наномедицины в качестве систем доставки биологически активных веществ и генетического материала. Среди биополимеров природного происхождения особое внимание в качестве одного из компонентов для создания композитов биомедицинского назначения занимает хитозан. Хитозан – катионный полисахарид, состоящий из звеньев глюкозамина и N-ацетилглюкозамина, обладающий широким спектром уникальных свойств, таких как: биосовместимость, биodeградируемость, антиоксидантная и антикоагулянтная активность, мукоадгезивность, антимикробная активности. Существенным ограничением для создания лекарственных форм на его основе является потеря хитозаном растворимости при значениях pH выше $pK_a \approx 6.5$, т.е. практическая нерастворимость в нейтральных и слабощелочных средах, соответствующих кислотности основных физиологических жидкостей. Решением данной проблемы является частичное гомогенное реацетилирование, которое позволяет получить статистическое распределение N-ацетилглюкозаминных звеньев по цепи, что способствует увеличению растворимости хитозана в щелочных средах. В литературе имеются данные о том, что реацетилированный хитозан (РА-ХИ) способен образовывать комплекс с сильной поликислотой на примере ДНК при pH 7.4. Однако, вопрос о взаимодействии РА-ХИ со слабыми поликислотами и белками остается открытым. В данной работе впервые с использованием таких методов, как рассеяние света (РС) и изотермическое калориметрическое титрование (ИКТ), показана возможность формирования комплексов РА-ХИ с карбоксилсодержащими поликислотами и белком при pH 7.4. В работе также исследован механизм взаимодействия между полимерами и влияние комплексообразования на вторичную структуру белка.

А) В качестве первого объекта исследования была выбрана карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) (рис.1)

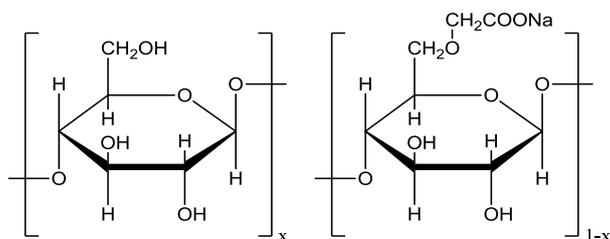


Рисунок 1.

КМЦ - коммерчески доступный анионный водорастворимый полисахарид. Такие характеристики как биоадгезивность, чувствительность к рН, нетоксичность и биосовместимость позволяют использовать этот полимер в качестве одного из компонентов для создания векторов доставки лекарственных веществ.

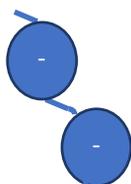
Поэтому мы задались вопросом, а возможно ли сделать систему, состоящую из РА-ХИ и КМЦ для получения наноконтейнеров биомедицинского назначения, которая способна образовывать устойчивые комплексы при рН 7.4? Для ответа на это вопрос мы использовали 2 пары образцов РА-ХИ и КМЦ (табл.1)

Образец	Степень ацетилирования, %	Степень карбоксиметилирования, %	M_w	M_w/M_n
РА-ХИ13	24	-	13700	1.95
РА-ХИ20	28	-	20300	2.47
Na-КМЦ13	-	72	13100	1.79
Na-КМЦ26	-	72	26500	1.81

Таблица .1. Молекулярные характеристики РА-ХИ и КМЦ

Для титрования образцы подбирали таким образом, чтобы лиофилизирующий полиэлектролит (ПЭ) имел длину цепи больше, чем блокирующий полиэлектролит (рис. 2).

Леофилизирующий ПЭ



Блокирующий ПЭ

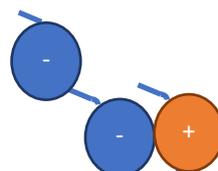
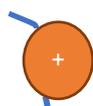


Рисунок 2.

Титрование РА-ХИ13 в КМЦ26 при рН 7.4. Лиофилизирующий ПЭ - КМЦ

Эксперимент проводили в фосфатном и ТРИС буферах с одинаковым рН, одинаковой ионной силой, но разным значением энтальпии ионизации. За процессом взаимодействия использовали метод РС (рис.3)

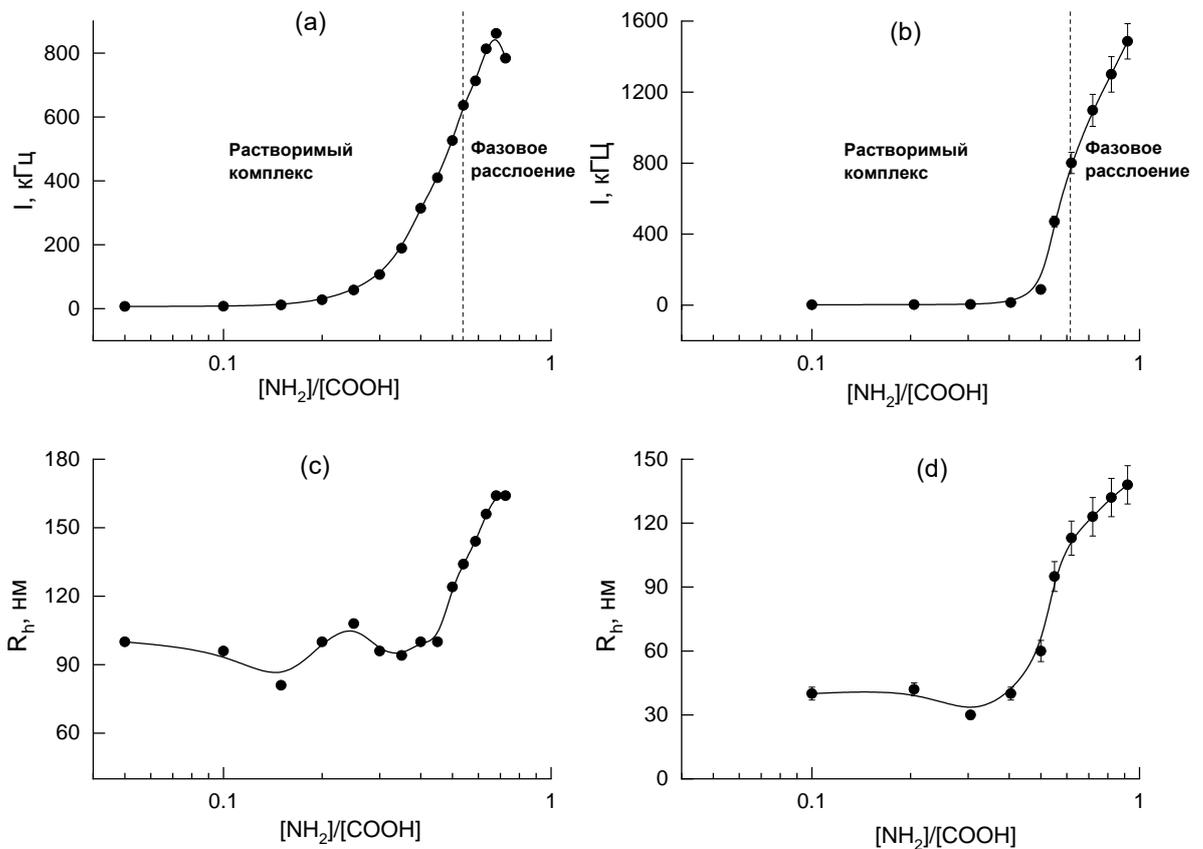
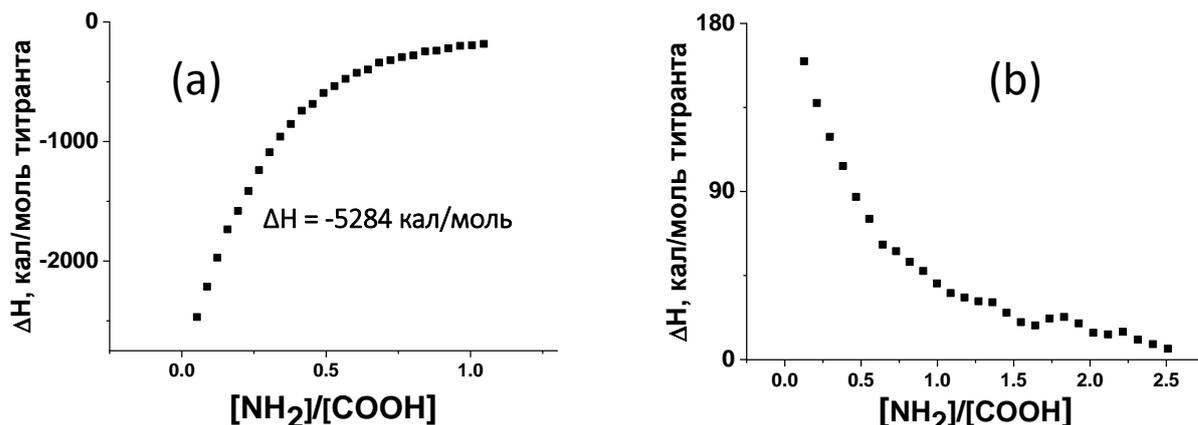


Рисунок.3. Изменение интенсивности светорассеяния (а, б) и гидродинамического радиуса (с, d) при титровании Na-КМЦ26 раствором РА-ХИ13 в ТРИС (а), (с) и фосфатном (б), (d) буферах при рН 7,4.

В фосфатном и ТРИС буферах фазовое расслоение начинается при значении $z \approx 0.6$ ($z = [\text{NH}_2]/[\text{COOH}]$). Природа буферного вещества не вносит существенных различий в кривые титрования. Для установления механизма связывания использовали ИКТ. Результаты ИКТ зависят от выбранного буфера (рис. 4). В случае буфера ТРИС-НСl с высокой энтальпией ионизации $\Delta H_i = 11,4$ ккал/моль наблюдается слабый эндотермический эффект (рис.4b), а в



Na-фосфатном буфере с низкой энтальпией ионизации 0,864ккал/моль наблюдается сильный экзотермический эффект (рис.4а).

Зависимость наблюдаемого теплового эффекта от энтальпии ионизации буфера может свидетельствовать о том, что основной механизм связывания – электростатический, который сопровождается дополнительной ионизацией хитозана за счет переноса протона с буферного вещества на хитозан. Используя величину рассчитанной из калориметрических

Рисунок 4. Кривые ИКТ при титровании КМЦ26 раствором РА-ХИ13 (а) фосфатном и (б) ТРИС буфере

данных по модели одного набора идентичных сайтов связывания кажущейся энтальпии связывания в фосфатном буфере ($\Delta H = -5,3$ кКал/моль) и приняв ее значение в ТРИС буфере равным нулю, сделана количественная оценка доли дополнительно ионизированных ГА-звеньев по известной из литературы формуле

$$n_{H^+} = \frac{\Delta H_b^{app}(P) - \Delta H_b^{app}(\text{ТРИС})}{\Delta H_i^P - \Delta H_i^{\text{ТРИС}}}, \text{ которая составила величину } 50\%. \text{ Исходная степень}$$

ионизации составляет приблизительно 10%.

Это позволяет сделать вывод о том, что дополнительное протонирование хитозана вносит существенный вклад в образование комплекса, а основной механизм взаимодействия при рН 7,4 - электростатический. Однако, нельзя исключать возможность водородного связывания, которое дополнительно стабилизирует систему. Косвенно об этом свидетельствует тот факт, что нерастворимый комплекс, полученный путем смешения полиэлектролитов в ТРИС-буфере, не удалось растворить при постепенном добавлении низкомолекулярной соли NaCl до 1,9 М, что свидетельствует о дополнительном водородном связывании. При этом, смешение растворов двух полимеров в присутствии 0.15М NaCl не приводит к формированию комплекса, следовательно основную роль в связывании играет электростатическая составляющая.

Титрование КМЦ13 в РА-ХИ20 при рН 7.4. Лиофилизирующий ПЭ – РА-ХИ20.

Из полученных данных СР видно, что система не является агрегативно устойчивой (рис.5), а фазовое расслоение наблюдается при $z \approx 0.1$, т.е. хитозан в качестве лиофилизирующего ПЭ недостаточно эффективен для стабилизации коллоидного раствора комплекса.

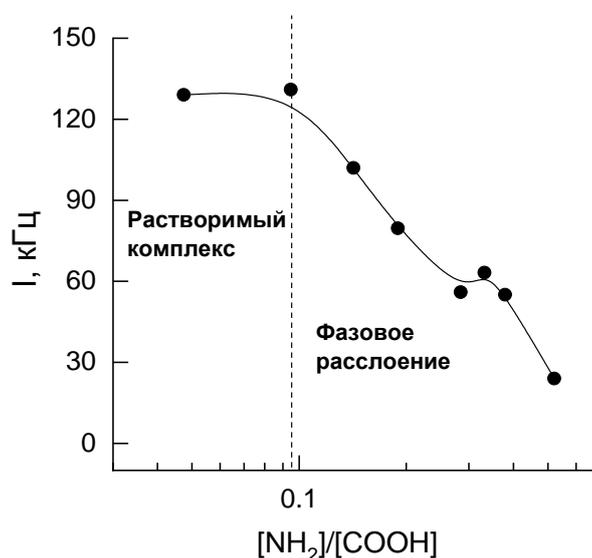


Рисунок.5. Изменение интенсивности светорассеяния при титровании РА-ХИ20 раствором КМЦ13 в фосфатном буфере

Причинами неустойчивости системы могут являться: 1) низкая степень ионизации хитозана и, следовательно, незначительный вклад электростатического фактора в

стабилизацию частиц комплекса; 2) способность полисахаридов, содержащих карбоксильные группы, аминогруппы и гидроксильные группы к дополнительному водородному связыванию; 3) высокая склонностью КМЦ к самоагрегации в растворах.

Для установления механизма связывания использовали ИКТ в двух буферах с разной теплотой ионизации (рис.6).

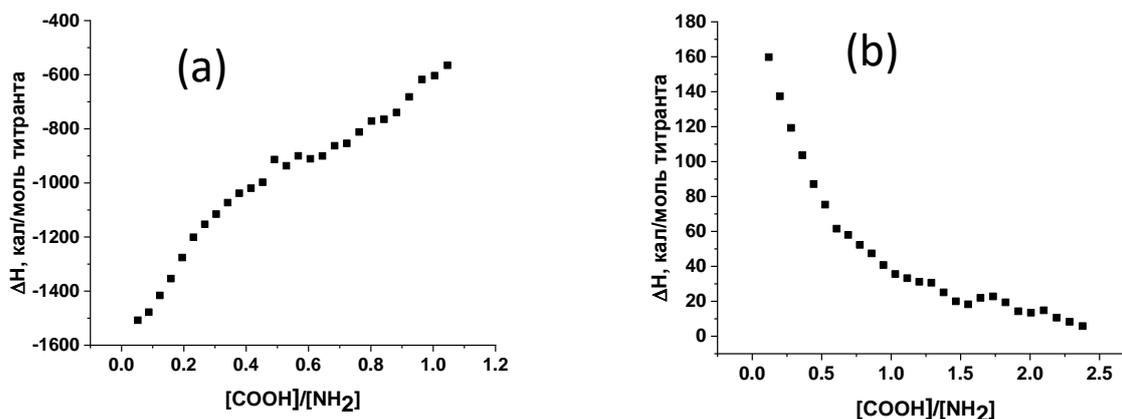


Рисунок 6. Кривые ИКТ при титровании РА-ХИ20 раствором КМЦ13 (а) фосфатном и (б) ТРИС буфере

Характер кривой ИКТ в фосфатном буфере, (рис.6а) значительно отличается от титрования РА-ХИ13 в КМЦ26, и характеризуется слабо выраженной двухстадийностью, которую можно аппроксимировать моделью с набором двух типов сайтов связывания и которая характеризуется меньшей экзотермичностью ($\Delta H_1 = -992$ кКал/моль, $\Delta H_2 = -1700$ кКал/моль). Можно предположить, что на начальном этапе основной тип взаимодействия – электростатический; дальнейшее изменение наклона кривой ИКТ может быть связано с образованием крупных надмолекулярных частиц комплекса, которые затрудняют протекание реакций полиэлектролитного обмена и способствует формированию водородных связей. В ТРИС буфере кривая ИКТ показывает слабый эндотермический эффект, аналогичный наблюдаемому при титровании РА-ХИ13 в КМЦ26 (рис. 4b). Такое различие в наблюдаемых энтальпиях взаимодействия в буферах с высокой и низкой энтальпией ионизации указывает на участие переноса протона с буферного вещества на хитозан.

Влияние pH на процесс комплексообразования. Титрование РА-ХИ13 в КМЦ26.

Лиофилизирующий ПЭ – КМЦ 26.

Для изучения влияния pH на процесс образования комплексов, эксперименты проводили в буферах с pH 6; 8 и 8.5.

За процессом образования комплексов следили с помощью СР (рис.7) и ИКТ (рис 8). Сравнение кривых титрования при разных рН от 6 до 8 показывает, что с повышением рН критическая точка начала образования нерастворимых комплексов сдвигается в область более высоких зарядовых чисел (z).

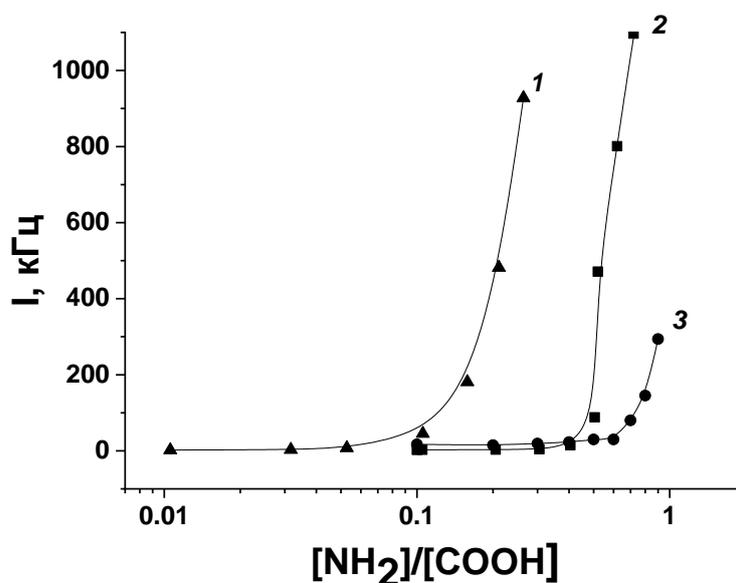


Рисунок 7. Изменение интенсивности светорассеяния при титровании КМЦ26 раствором РА-ХИ13 в фосфатном буфере при рН (1) 6, (2) 7.4 и (3) 8.0.

При рН 8,5 титрование фосфатном буфере не выявило увеличения интенсивности РС по сравнению с нормированной суммой рассеяния исходных растворов вплоть до стехиометрического соотношения, а также не наблюдалось фазового расслоения.

Результаты ИКТ (рис.8).

При рН 6.0 кривая ИКТ (рис. 8 кривая 2) имеет более сложную форму по сравнению с титрованием при рН 7,4 и схожа с кривой в которой лиофилизирующим ПЭ выступает РА-ХИ20 при том же значении рН. Можно предположить, что, как и в случае обратного титрования в среде с рН 7.4, образование крупных супрамолекулярных частиц затрудняет протекание реакций полиэлектролитного обмена и способствует формированию водородных связей. При рН 8 кривая ИКТ (рис. 8 кривая 3) по форме близка к полученной при рН 7.4, однако экзотермический эффект существенно меньше. Форма кривой и значительный экзотермический эффект взаимодействия в буфере с низкой энтальпией ионизации позволяют предположить, что основным механизмом взаимодействия при рН 8

является ион-парное связывание за счет переноса протона из буферного вещества, хотя макромолекулы РА-ХИ в исходном растворе практически не заряжены

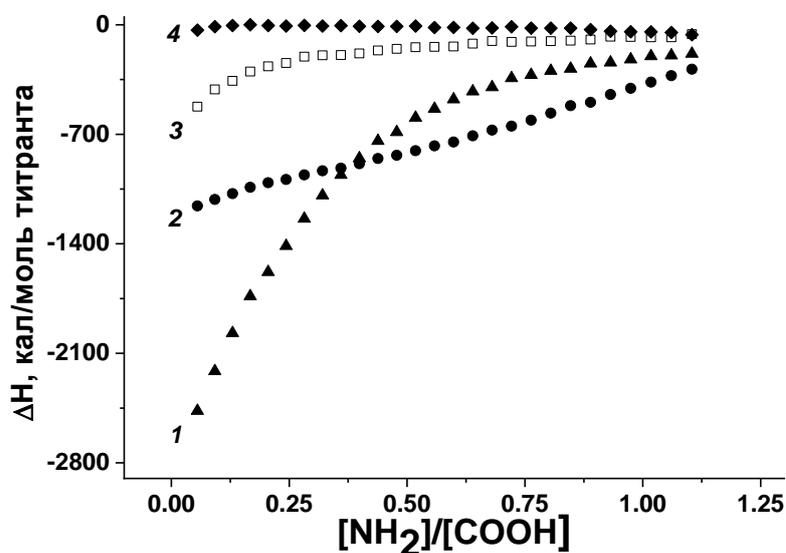


Рисунок 8. Кривые ИКТ при титровании КМЦ26 раствором РА-ХИ13 в фосфатном буфере при рН (1) 7.4, (2) 6, (3) 8 и (4) 8.5

При рН 8.5 кривая ИКТ (рис. 8 кривая 4) наблюдаемые тепловые потоки были меньше, чем в холостых титрованиях в буфер и почти на 2 порядка меньше, чем в экспериментах при рН 8. Объединение данных РС и ИКТ позволяет сделать вывод об отсутствии комплексообразования между РА-ХИ и КМЦ при рН 8,5. Для оценки порогового значения рН, ниже которого может образовываться комплекс между РА-ХИ и Na-КМЦ, была приготовлена прозрачная смесь при рН 8,5 путем титрования РА-ХИ13 в КМЦ26 до соотношения $z = 0,82$. Смесь титровали 0,1 М раствором HCl и измеряли интенсивность рассеянного света. В диапазоне рН 8,5–8,1 существенного увеличения интенсивности не наблюдалось, а при рН 7,8 визуально наблюдалось помутнение системы. Эти данные позволили нам сделать вывод о том, что пороговое значение рН для образования комплексов РА-ХИ/КМЦ очень близко к рН 8,0.

Выделение и анализ структуры комплекса РА-ХИ13/КМЦ26 при рН 7.4. Анализ методом СРС-ДРС, ИК и ГПХ

Фракции гелеобразных осадков и растворимых комплексов в виде прозрачных коллоидных растворов были выделены центрифугированием и охарактеризованы методами СРС-ДРС, ГПХ и ИК-Фурье спектроскопии. Эти анализы позволили оценить

размер и форму частиц комплекса, установить состав растворимой и нерастворимой фракций, подтвердить наличие ионных пар в выделенном твердом комплексе.

Чтобы получить информацию о структуре частиц комплекса, определяли радиус инерции R_g и гидродинамический радиус R_h (рис. 9). Отношение $\rho = R_g/R_h$, называемое фактором асимметрии, может быть качественным критерием формы частицы.

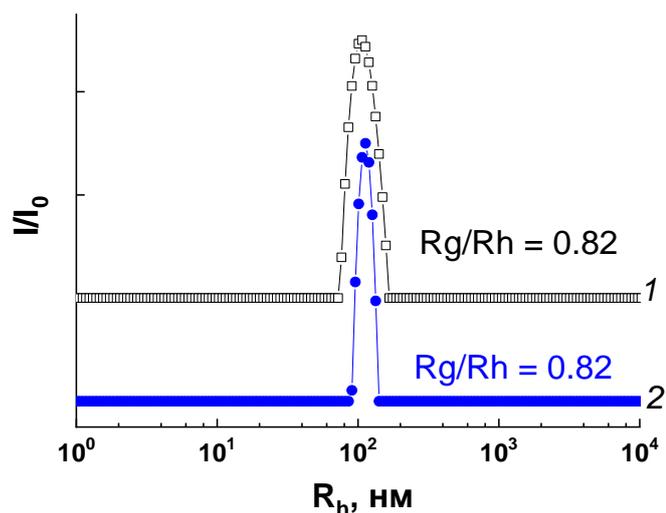


Рисунок 9. Распределения интенсивности рассеянного света по гидродинамическому радиусу частиц комплекса РА-ХИ13/Na-КМЦ26 в буфере ТРИС pH 7,4 (1) после смешивания растворов полиэлектролитов и (2) после центрифугирования. Угол измерения 90°

Полученные результаты СРС-ДРС свидетельствуют о том, что комплексы после смешения полиэлектролитов и растворимый комплекс после центрифугирования имеют одинаковый фактор формы близкий к «жесткой сфере».

Состав растворимой и нерастворимой фракций оценивали методом ГПХ. На рис. 10 сопоставлены элюограммы исходных полимеров и выделенных фракций. Из вида элюограмм можно сделать вывод, что в супернатанте присутствуют оба исходных полимера. Сравнение рассчитанных значений кажущихся средних ММ с теоретическими свидетельствует о том, что при разделении фаз происходит дополнительное фракционирование полимеров по длине цепи, т.е. в осадке появляются фракции полимеров с более высокими молекулярными массами.

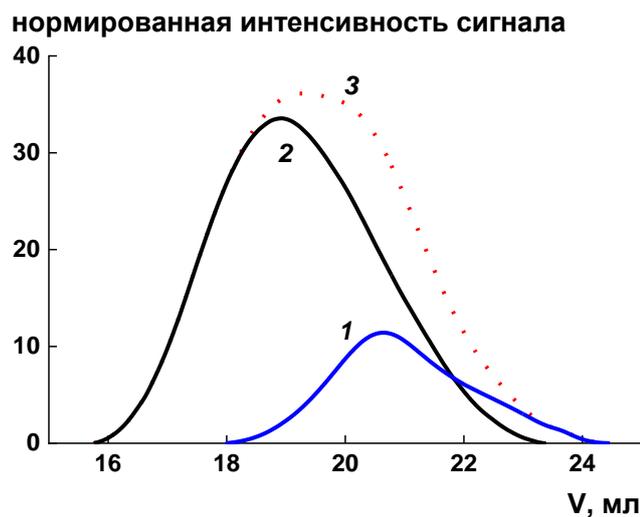


Рисунок 10. (а) – Элюограммы растворов (1) Na-КМЦ26 и (2) РА-ХИ13, (3) нормализованные по весовым долям в смеси и их сумме с учетом разницы коэффициентов отклика. (б) – Элюограммы (4) супернатанта и (5) осадка. рН 7,4.

ИК спектры фракций, выделенных из смеси показаны на рисунке 11 вместе со спектрами индивидуальных полиэлектролитов. ИК спектр КМЦ (кривая 1) демонстрирует как полосы при 1593 и 1414 см^{-1} , соответствующие асимметричным валентным колебаниям ($\text{C}=\text{O}$), принадлежащим карбоксильным группам, так и характерные полосы полисахаридного скелета при $1025\text{--}1154\text{ см}^{-1}$. Полосы при 1414 см^{-1} можно отнести к ножничным колебаниям $-\text{CH}_2$, а также к симметричным валентным колебаниям карбоксильной группы в форме соли ($-\text{COO}^-$) [49,50]. Спектр РА-ХИ (кривая 2) показывает полосы при 1631 см^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ амид I), 1524 см^{-1} (NH_2), 1377 см^{-1} (NH_2). ИК спектры супернатанта (кривая 3) и осадка (кривая 4) представляют собой суперпозицию КМЦ и РА-ХИ, причем осадок сильнее обогащен РА-ХИ, чем супернатант. Это может быть связано с меньшей долей РА-ХИ в супернатанте. В спектрах обеих фракций поглощение групп $\text{C}=\text{O}$ КМЦ при 1593 см^{-1} смещено в сторону меньших волновых чисел

в результате образования ионных пар. Сдвиг в спектре осадка (1574 см^{-1}) больше, чем в спектре супернатанта (1582 см^{-1}), что можно объяснить большей долей карбоксильных анионных групп, координированных с аминогруппами хитозана.

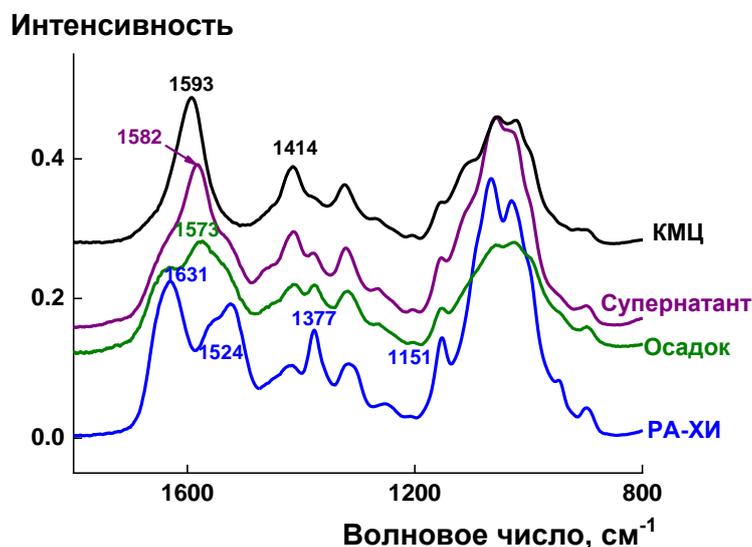


Рисунок 11. Спектры ИК (1) полиэлектролитов Na-КМЦ26 и (2) РА-ХИ13 и (3) супернатанта и (4) осадка ПЭК РА-ХИ13/Na-КМЦ26 ($z = 0,53$, ТРИС, рН 7,4), смешанных с КВr.

Также показано, что супернатант был стабилен в течение не менее 4 суток, сохраняя постоянный размер частиц.

Проведено дополнительное исследование возможности хранения твердого комплекса. Показано, что после длительного хранения (около трех месяцев) выделенный твердый лиофилизат можно перерастворять в буфере и стерилизовать через мембрану 0.2 мкм без потери массы.

Выводы:

- ❖ Установлена возможность формирования растворимых нестехиометрических комплексов между РА-ХИ и КМЦ в среде, близкой к нейтральной при $6 < \text{pH} < 8$;
- ❖ При $6 < \text{pH} < 8$, основной механизм связывания – электростатическое взаимодействие, которое сопровождается дополнительной ионизацией хитозана за счет переноса протонов с буферного вещества;
- ❖ В избытке поликислоты при рН 7.4 можно получить прозрачные устойчивые коллоидные растворы с размерами $R_g = 100 \text{ нм}$ и концентрацией 1 мг/мл;

- ❖ Лиофилизированный комплекс, можно стерилизовать фильтрованием без потери массы, с образованием наночастиц радиусом меньше 100 нм, перспективных для создания наноконтейнеров биомедицинского назначения;

Б) В качестве следующего объекта исследования была выбрана двухосновная поликислота сополимер этилена и малеиновой кислоты – синтетический, биосовместимый сополимер, способный стабилизировать наночастицы благородных металлов, а также легко модифицируемый для создания векторов направленной доставки, и золь золота на его основе ЭМК@Au.

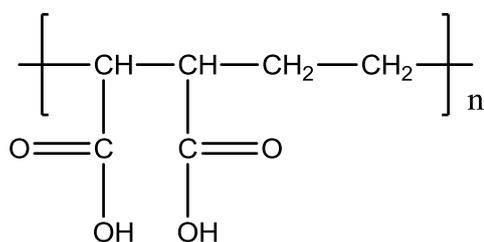


Рисунок 12.

Совмещение оптических свойств наночастиц золота (НЧЗ) и биологических свойств хитозана может быть перспективными для получения тераностических препаратов.

В работе исследованы особенности взаимодействия РА-ХИ с данным сополимером, изучена возможность получения растворимых наноконплексов в зависимости от рН, а также исследована возможность создания комплексов, содержащих наночастицы золота и исследована их структура.

Таблица 2. Молекулярные характеристики РА-ХИ и ЭМК

Образец	СА, %	M_w
РА-ХИ10	24	10200
ЭМК	-	25000

Взаимодействие РА-ХИ10 с ЭМК при рН 7.4 и 6.

За процессом взаимодействия между полимерами следили с помощью метода РС (рис. 13). При рН 7.4 ются агрегативно устойчивые комплексы в широком диапазоне составов смеси (рис. 13а). Фазового расслоения не наблюдается. Кривая титрования имеет двухстадийный характер, а размер частиц изменяется на протяжении всего титрования (рис. 13б). Характер кривой титрования при рН 6 качественно отличается, переход от растворимых

комплексов к нерастворимым наблюдается при соотношении полимеров ниже эквивалентного (рис. 13с).

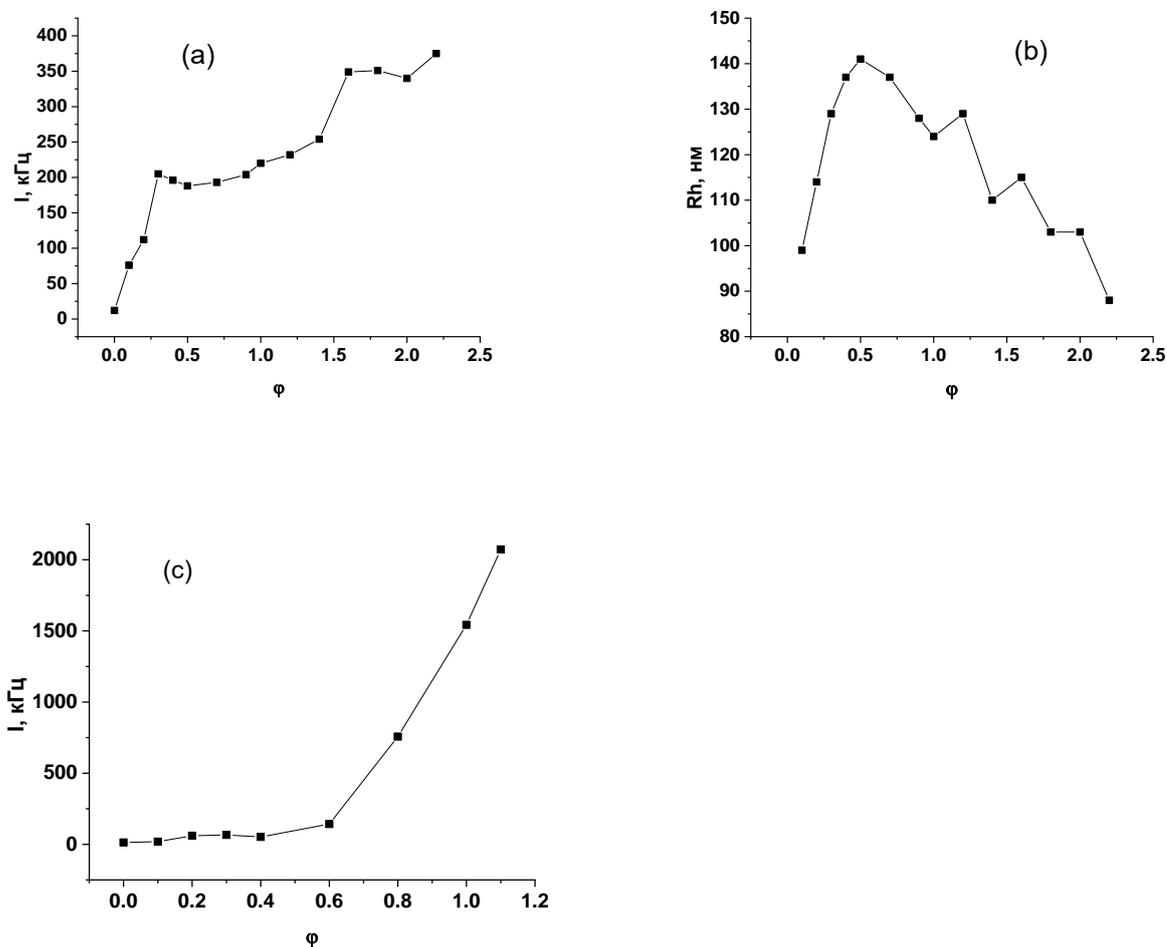


Рисунок 13. Изменение интенсивности светорассеяния (а) и гидродинамического радиуса (б) при титровании ЭМК раствором РА-ХИ10 в фосфатном буфере рН 7.4, (с) – изменение интенсивности рассеяния при рН 6 в МЕС буфере. ϕ = осново-моль РА-ХИ/осново-моль ЭМК

Такое различие позволяет предположить, что при рН 6 ниже pK_{a2} в процессе комплексообразования участвует одна карбоксильная группы малеиновой кислоты, тогда как при рН 7.4 выше $pK_{a2}=6.4$ в процессе комплексообразования участвуют две ионизированные карбоксильные группы малеиновой кислоты.

Для установления механизма связывания использовали метод ИКТ.

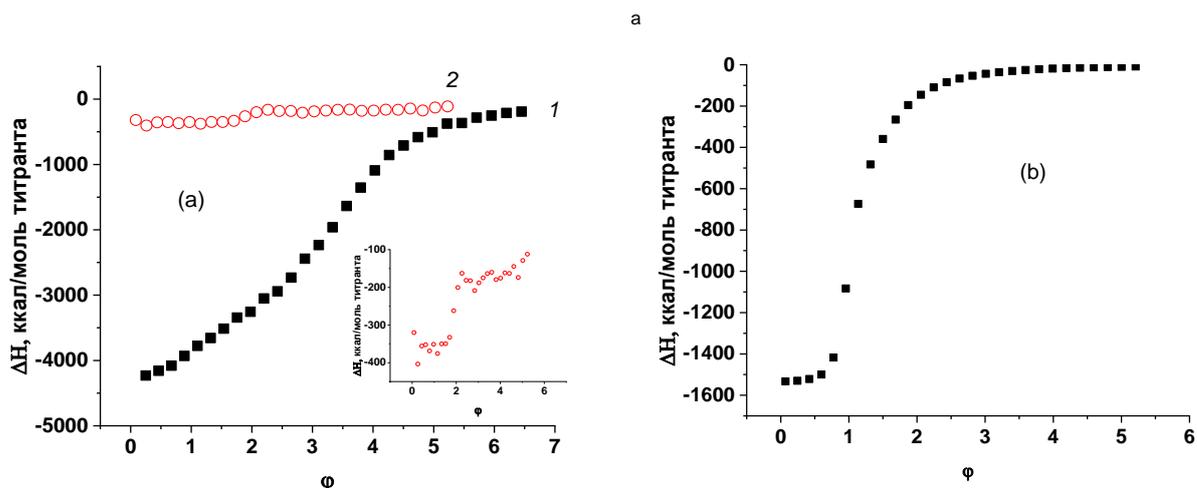


Рисунок 14. Кривые ИКТ при титровании РА-ХИ10 в ЭМК (а) при рН 7,4 в (1) фосфатном и (2) ТРИС-буфере, (b) - рН 6 в МЕС буфере. На вставке показан более крупный масштаб кривой титрования в ТРИС-буфере.

Эксперимент при рН 7.4 проводили в двух буферах с одинаковой ионной силой, но разным значением энтальпии ионизации (рис. 14). В буфере с низкой энтальпией ионизации - фосфатный буфер (рис. 14 кривая 1) наблюдается сильно выраженный экзотермический тепловой эффект. В буфере с высокой энтальпией ионизации - ТРИС буфер (рис. 14 кривая 2) также наблюдается экзотермический эффект, но ниже на порядок чем в фосфатном буфере. Как в фосфатном, так и в ТРИС - буфере кривая ИКТ имеет двухстадийный характер и описывается моделью двух типов сайтов связывания, что коррелирует с результатами РС. Зависимость наблюдаемого теплового эффекта от энтальпии ионизации буфера свидетельствует о том, что происходит дополнительная ионизация хитозана за счет переноса протона с буферного вещества на хитозан.

При рН 6 кривая ИКТ описывается моделью одного набора сайтов связывания и приходит к насыщению при приближении к эквимольному соотношению, что коррелирует с данными РС. Отрицательное значение наблюдаемой энтальпии при рН 6 в два раза ниже, чем в фосфатном буфере рН 7.4. Можно предположить, что основной механизм – электростатическое взаимодействие.

Увеличение ионной силы при добавлении в фосфатный буфер 0.15 М NaCl не подавляет полностью процесс взаимодействия (рис.15) в отличие от системы РА-ХИ/КМЦ, но уменьшает его экзотермический эффект. Все это свидетельствует о сложном механизме взаимодействия, включающем в себя как дополнительную ионизацию хитозана за счет

переноса протонов, так и возможные вклады дополнительных структурирующих процессов с участием водородного взаимодействия. Для полного понимания механизма взаимодействия необходимы дополнительные исследования.

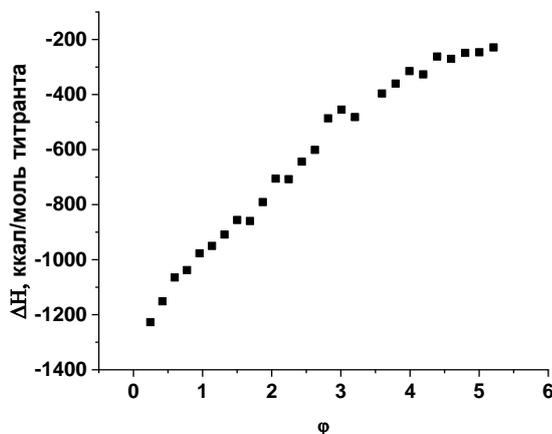


Рисунок 15. Кривая ИКТ при титровании РА-ХИ10 в ЭМК при рН 7.4 в соленом фосфатном буфере
рН 7.4.

Взаимодействие РА-ХИ с ЭМК@Au при рН 6 и 7.4

За процессом взаимодействия между РА-ХИ и золев ЭМК@Au следили с помощью метода РС и ИКТ (рис.16, 17). Интенсивность нормировали на сумму интенсивностей исходных растворов, умноженных на объемную долю. Поведение смесей при разных рН различается подобно тому, что было обнаружено при взаимодействии РА-ХИ с полимером. При использовании золя в слабощелочной среде также образуются агрегативно устойчивые комплексы в широком диапазоне соотношений.

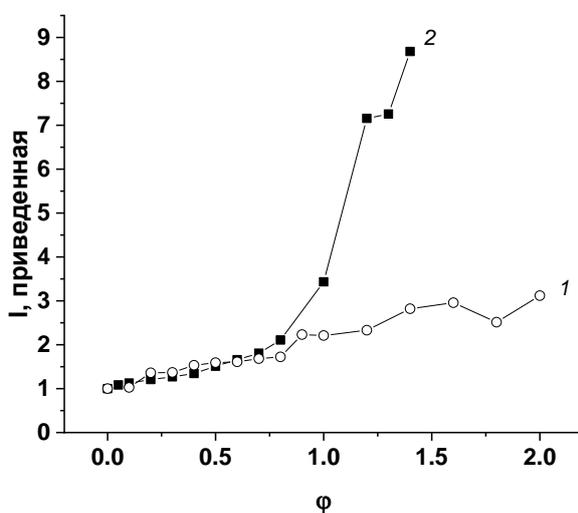


Рисунок 16. Изменение интенсивности светорассеяния при титровании ЭМК@Au раствором РА-ХИ в фосфатном буфере при рН (1) 7.4 и (2) 6.

Характер кривой ИКТ в фосфатном буфере при рН 7.4 (рис.17) также подобен калориметрической кривой для смеси с полимером ЭМК и имеет двухступенчатый тип.

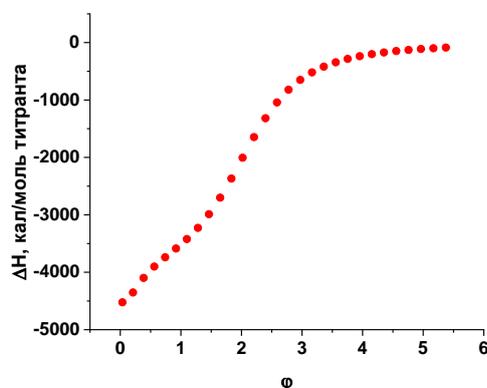


Рисунок.17. Кривые ИКТ при титровании РА-ХИ10 в ЭМК@Au при рН 7,4 в фосфатном буфере рН 7.4.

Сопоставляя результаты для систем РА-ХИ/ЭМК и РА-ХИ/ЭМК@Au, можно сделать заключение, что процесс взаимодействия между РА-ХИ и золев происходит в стабилизирующей ЭМК-оболочке.

Анализ структуры комплекса РА-ХИ/ЭМК@Au

Растворимые комплексы РА-ХИ/ЭМК@Au с разным значением φ готовили в фосфатном буфере рН 7.4 и анализировали методом СРС-ДРС для нахождения радиусов R_g , R_h и фактора формы R_g/R_h (таблица 3).

Таблица 3. Результаты СРС-ДРС исходного ЭМК@Au и его комплексов с РА-ХИ

	φ = 0	φ = 1	φ = 2
$R_h(0)$, нм	217	149	118
R_g , нм	70	73	80
R_g/R_h	0.32	0.5	0.7

По результатам СРС-ДРС добавление хитозана приводит к уменьшению гидродинамического радиуса и увеличению радиуса инерции. Изменение фактора формы от 0.32 до 0.7 при повышении содержания хитозана указывает на изменение структуры частиц от мицеллярных частиц исходного золя с объемной разреженной короной к структурам с более компактной короной, и, в конечном счете, к частицам близким по характеристикам к жесткой сфере.

Спектрофотометрический анализ исходного ЭМК@Au и его комплекса с хитозаном представлен на (рис. 18). Результаты спектрофотометрии показали, что процесс комплексообразования между РА-ХИ и ЭМК@Au не приводит к агрегации наночастиц золота. Полоса поглощения поверхностного плазмонного резонанса золотых наночастиц (520 нм) не меняет свое положение при образовании комплекса РА-ХИ/ЭМК@Au.

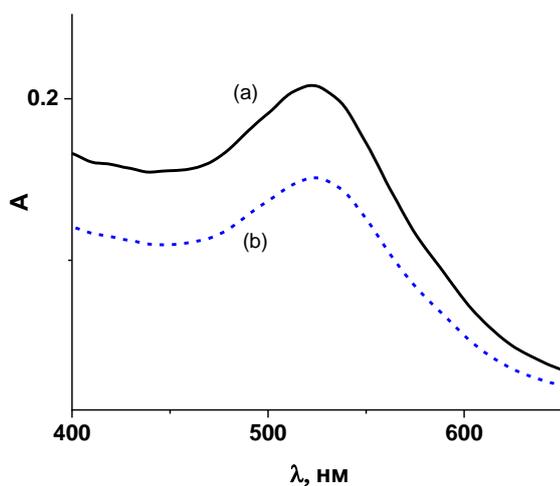


Рисунок 18. УФ спектры (a) исходного золя ЭМК@Au и (b) комплекса РА-ХИ/ЭМК@Au в фосфатном буфере pH 7.4.

Формирование полиэлектролитного комплекса в оболочке золя ЭМК@Au подтверждено нами путем анализа микро-ИК спектрометрией выделенного и лиофилизованного комплекса. Комплекс РА-ХИ/ЭМК@Au готовили в фосфатном буфере pH 7.4 при соотношении $\varphi = 2$. Полученную смесь диализовали и лиофильно высушили. Твердые частицы комплекса анализировали методом микро - ИК (рис.19).

Из полученных спектров видно, что спектр комплекса (a) содержит в себе полосы АМИД I (1642 см^{-1}) и АМИД II (1383 см^{-1}) принадлежащие хитозану, которые незначительной смещены в сторону больших волновых чисел, относительно исходного спектра хитозана (c). Полоса асимметричных валентных колебаний (1730 см^{-1}) карбоксильной группы (C=O) малеиновой кислоты (b) смещена на 167 см^{-1} (1563 см^{-1}) в сторону меньших волновых чисел, что указывает на образование ионной пары.

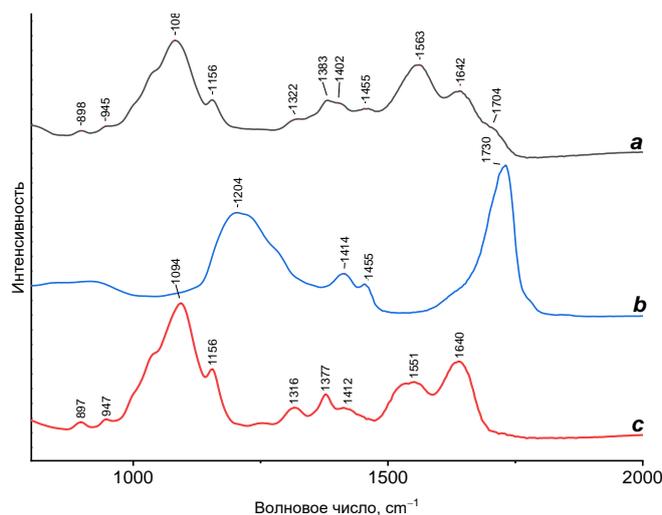


Рисунок 19. Сравнение микро-ИК-спектров комплексов РА-ХИ10/ЭМК@Au (a) ($\varphi = 2$) с спектрами золя ЭМК@Au (b) и РА-ХИ10 (c).

Выводы:

- ❖ Взаимодействие РА-ХИ с ЭМК и с ЭМК@Au в слабощелочной среде происходит в 2 стадии и приводит к образованию агрегативно устойчивых комплексов в широком диапазоне составов; показано, что в образовании комплексов принимают участие обе карбоксильные группы кислоты;
- ❖ Основной механизм связывания для пары полимер-полимер и полимер-золь – электростатическое связывание между полимерами, которое сопровождается переносом протонов с буферного вещества на хитозан и его дополнительной ионизацией; для полного понимания механизмов взаимодействия необходимы дополнительные исследования;
- ❖ Структура частиц комплекса РА-ХИ/золь меняется в зависимости от содержания хитозана от мицелл типа ядро-корона к жесткой сфере.
- ❖ Показано, что при образовании комплексов РА-ХИ/ЭМК-Au не происходит изменения размера наночастиц золота.

В) Для потенциального использования хитозана как основного компонента для создания векторов направленной доставки, необходимо рассмотреть его взаимодействие с белками плазмы крови. Поэтому в качестве 3-го объекта исследования был выбран бычий сывороточный альбумин (БСА) – белок сыворотки крови теплокровных, который идентичен человеческому сывороточному альбумину на 76%.

1.3 Взаимодействие РА-ХИ с БСА рН 7.4

Для исследования выбраны 2 образца РА-ХИ, обладающие наиболее высокой способностью к растворению в щелочных средах (табл.3).

Таблица 3. Молекулярные характеристики РА-ХИ

Образец	СА, %	M_w	M_n
РА(24)-ХИ	24	12500	7000
РА(40)-ХИ	40	10600	5300

За процессом взаимодействия между РА-ХИ12 и БСА изучали путем титрования хитозана в белок с использованием СР (рис 20.) и ИКТ (рис 21). Для получения сведений о механизме взаимодействия использовали два разных буфера с одинаковой ионной силой (20 мМ) и рН, но разной энтальпией ионизации.

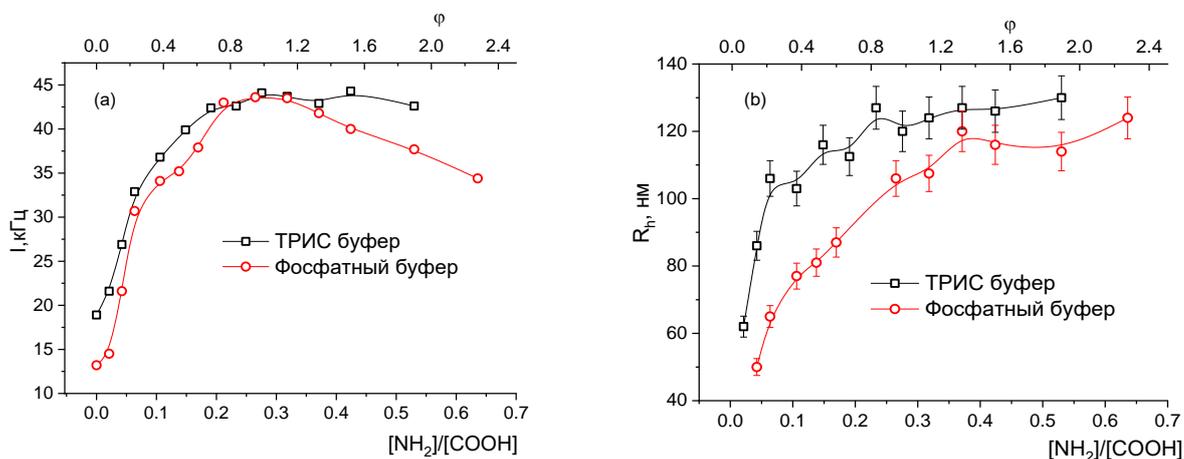


Рисунок 20. Изменение (а) интенсивности рассеянного света и (б) размера агрегатов при титровании БСА раствором РА(24)-ХИ в ТРИС и фосфатном буфере при рН 7,4.

Фазовое расслоение с образованием нерастворимых комплексов, которое сопровождается падением интенсивности РС наблюдается при $z = [NH_2]/[COOH] = 0.25 - 0.3$.

На рисунке 21 показано перераспределение интенсивностей быстрой и медленной релаксационных мод в процессе титрования. По мере добавления РА-ХИ в БСА происходит перераспределение релаксационных мод. Быстрая мода в растворе белка относится к индивидуальным молекулам белка с радиусом 4.5нм, медленная мода отражает наличие агрегатов. Природа буферного вещества не оказывает существенного влияния на кривые титрование.

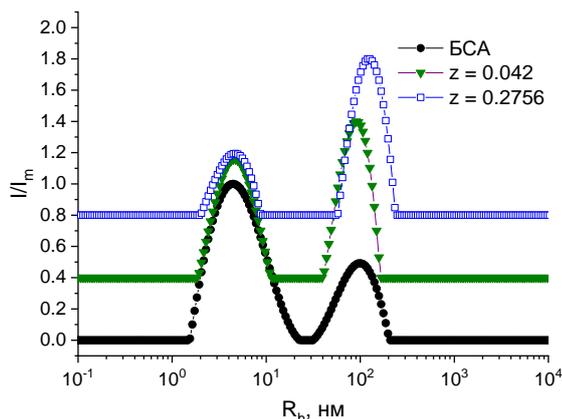


Рисунок 21. Перераспределение интенсивностей рассеяния быстрых и медленных мод при титровании в ТРИС-буфере ($z = [\text{NH}_2]/[\text{COOH}]$)

Для установления основного механизма связывания между полимерами использовали ИКТ. Результаты ИКТ зависят от выбранного буфера (рис. 22).

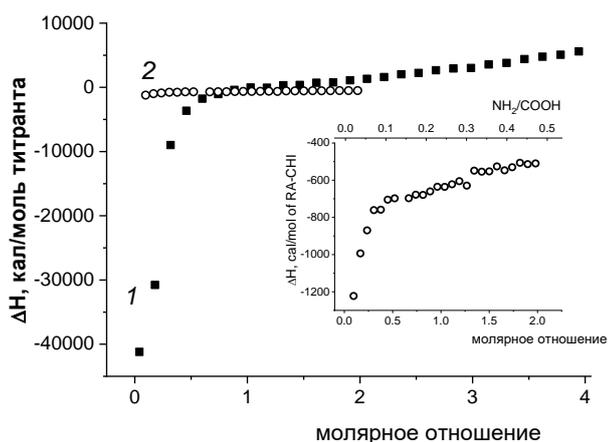


Рисунок 22. Кривые ИКТ при титровании РА(24)-ХИ в БСА при рН 7,4 в (1) фосфатном и (2) ТРИС-буфере. На вставке показан более крупный масштаб кривой титрования в ТРИС-буфере.

Аналогично взаимодействию с КМЦ, ЭМК и ЭМК@Au наблюдаемый тепловой эффект при взаимодействии РА-ХИ и БСА зависит от энтальпии ионизации буфера. Это наблюдение позволяет предположить, что электростатическое взаимодействие противоположно заряженных групп вносит существенный вклад в связывание, при этом происходит в некоторой степени дополнительная ионизация хитозана, за счет переноса протонов с буферного вещества.

Чтобы оценить влияние ионной силы раствора на процесс комплексообразования эксперимент проводили в фосфатном буфере с добавлением 0.15 М NaCl. Данные ИКТ

(рис.23) позволяют сделать вывод о том, что присутствие низкомолекулярной соли NaCl приводит к экранированию электростатических взаимодействий между хитозаном и белком и подавляет взаимодействие.

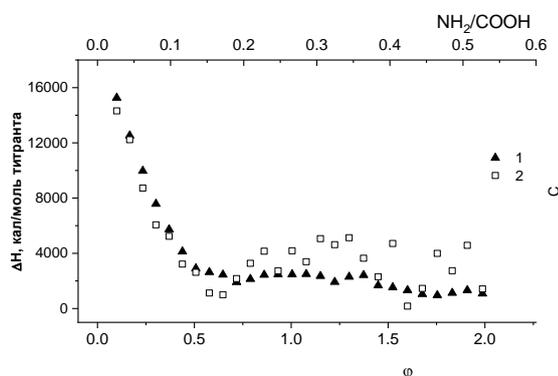


Рисунок.25. Кривые ИТК при титровании БСА ($[NH_2] = 1 \text{ мМ}$) (1) раствором РА(24)-ХИ и (2) в фосфатном буфере при pH 7,4 в присутствии 0,15 М NaCl.

Структура комплексов РА(24)-ХИ/БСА pH 7.4

Растворимый комплекс РА-ХИ/БСА в ТРИС буфере pH 7.4 анализировали методом СРС-ДРС для нахождения радиусов R_g , R_h и фактора формы R_g/R_h . Полученные угловые зависимости обратного времени релаксации позволили определить $R_h = 136 \text{ нм}$, полученное значение фактора формы $R_g/R_h = 0,96$ близко к значению, характерному для так называемой «мягкой сферы».

Для определения влияния связывания БСА с РА-ХИ при pH 7,4 на вторичную структуру белка в растворе было проведено исследование растворимых комплексов методом спектроскопии кругового дихроизма (КД). На рисунке 24 представлены спектры молярной эллиптичности свободного БСА и его комплексов. Расчеты вторичной структуры белка и его комплексов показали идентичность их структуры (таблица 4).

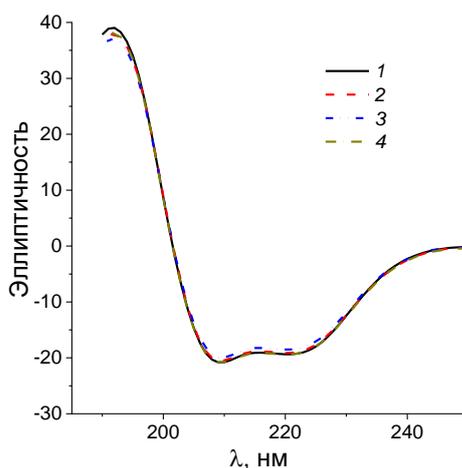


Рисунок 24. Спектры молярной эллиптичности (1) свободного белка и белка и его комплексов с РА(24)-ХИ: $\varphi =$ (2) 0,28, (3) 0,38, (4) 0,57, рН 7,4.

Таблица 4. Вторичная структура БСА и его комплексов с РА(24)-ХИ

Образец	α -спираль	β -слой	β -поворот	Неупорядоченная структура
БСА	68	5	9	18
РА(24)-ХИ/БСА молярное соотн.				
0.19	68	6	8	18
0.38	66	5	9	20
0.57	68	5	9	18

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии конформационных изменений в белке при комплексообразовании с хитозаном.

Кроме того, был проведен сравнительный анализ ИК-спектров БСА и выделенных комплекса РА(24)-ХИ/БСА. Комплекс диализовали, лиофилизировали и проанализировали с помощью микро-ИК-спектроскопии рисунок 25.

Частота полосы амид-I имеет схожее положение в свободном белке и комплексах (1654, 1653 и 1657 см^{-1} соответственно), а полуширина пиков комплекса также близка к таковой в свободном белке. Исходя из положения полосы амид-I в ИК-спектрах, можно сделать вывод, что БСА как в комплексе, так и в свободном состоянии присутствует преимущественно в форме α -спирали, увеличения содержания β -слоев не наблюдается. Изменение ИК-спектров комплекса по сравнению с исходным белком в области водородных связей (2500–3600 см^{-1}) также незначительно, а появление этих полос на рисунке 25а и 25б наиболее характерно для БСА. Полученные результаты свидетельствуют

о том, что существенных изменений во вторичной структуре белка в составе комплекса как в высушенном состоянии, так и в растворах не происходит.

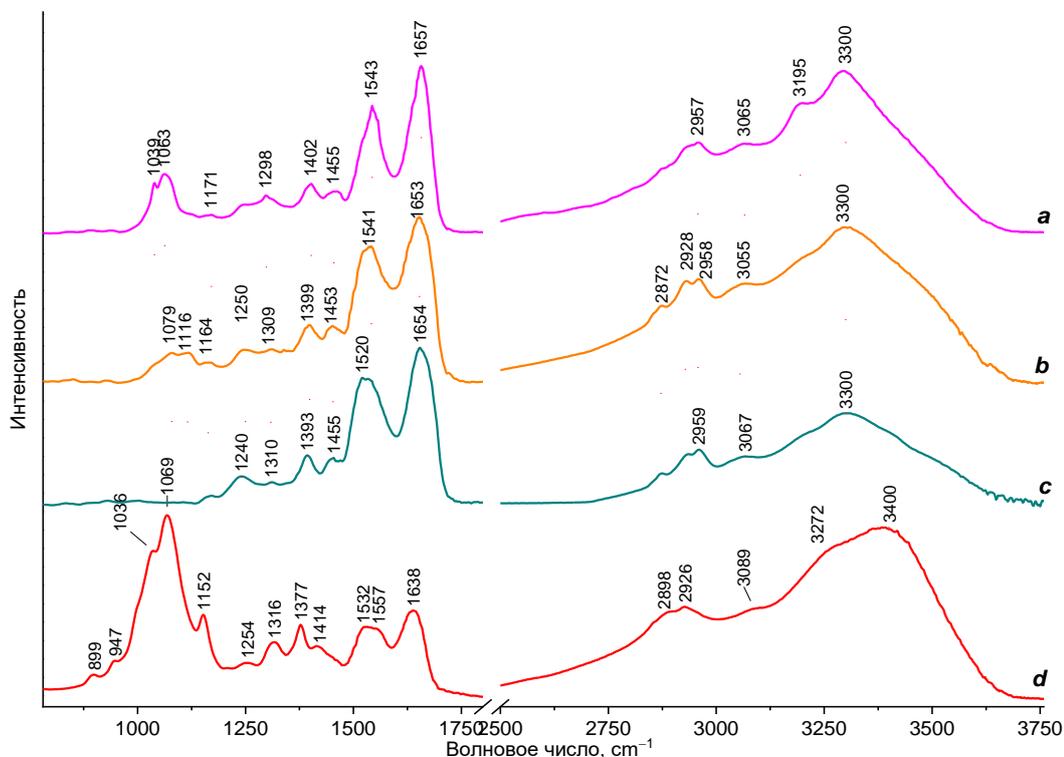


Рисунок.25. Сравнение микро-ИК-спектров комплексов РА(24)-ХИ/БСА (а, б) (молярные соотношения 0,30 и 0,48 соответственно) с спектрами БСА (с) и РА(24)-ХИ (д).

Влияние степени ацетилирования (СА) РА-ХИ на процесс комплексообразования с БСА при рН 7.4

Для определения влияния увеличения степени ацетилирования хитозана процесс взаимодействия с БСА при рН 7,4 использовали РА(40)-ХИ. Характерной особенностью РА(40)-ХИ является высокая степень самоагрегации его молекул в растворе с образованием компактных супрамолекулярных частиц, проявляющаяся в высокой интенсивности светорассеяния по сравнению с растворами других образцов РА-ХИ и растворами БСА. При титровании РА(40)-ХИ в БСА, растворенном как в фосфатном, так и в ТРИС-буфере при рН 7,4, наблюдалось примерно двукратное увеличение относительной интенсивности рассеяния (интенсивность, нормированная на сумму интенсивностей исходных растворов, умноженных на объемную долю) при молярном соотношении ≈ 1 , далее интенсивность практически не изменялась (рис. 26).

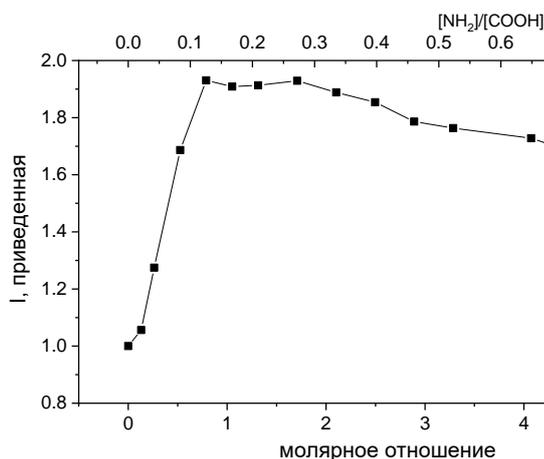


Рисунок 26. Зависимость интенсивности рассеянного света от соотношения РА(40)-ХИ/БСА в фосфатном буфере при рН 7,4.

Анализ ИКТ проводили в фосфатном буфере с использованием РА(40)-ХИ в качестве титранта. В отличие от выраженного экзотермического эффекта связывания, наблюдаемого при титровании РА(24)-ХИ в БСА, в случае с РА(40)-ХИ был обнаружен слабый эндотермический эффект (рис. 27 кривая 1), что указывает на преимущественно энтропийный характер взаимодействия. Кривая ИКТ в присутствии 0,15 М NaCl (рис. 27 кривая 2), аналогична полученной в фосфатном буфере при низкой ионной силе. Эта особенность подтверждает предположение об изменении типа взаимодействия с увеличением степени ацетилирования с преимущественно электростатического к преимущественно гидрофобному.

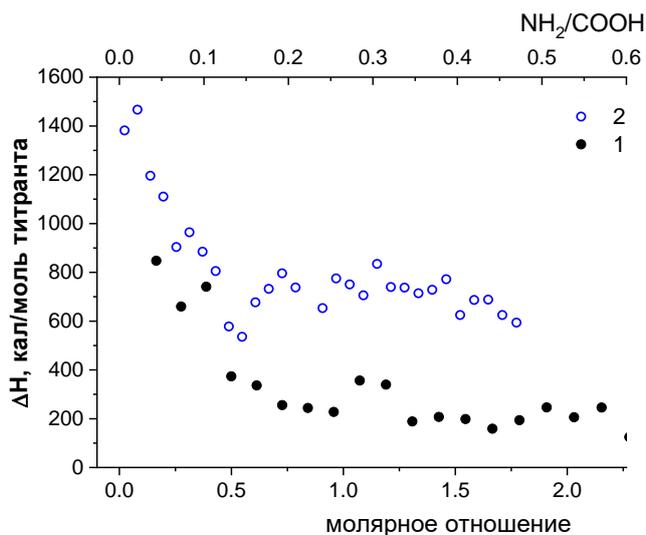


Рисунок 27. Кривые ИКТ при титровании РА(40)-ХИ в растворе БСА в (1) фосфатном буфере при рН 7,4 и (2) в фосфатном буфере с добавлением соли.

Влияние степени ацетилирования на константы связывания РА-ХИ–БСА. Анализ методом УФ спектрофотометрии.

Для выявления влияния СА на средство РА-ХИ к БСА при pH 7,4 были определены соответствующие константы связывания, для образцов хитозана РА(24)-ХИ и РА(40)-ХИ. Для определения констант связывания использовали спектрофотометрический метод (рис.28). Для двух образцов с разной СА получены следующие значения K_{app} :

$K_{app} = (23,0 \pm 2,3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ для РА(24)-ХИ и $K_{app} = (3,4 \pm 0,6) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ для РА(40)-ХИ.

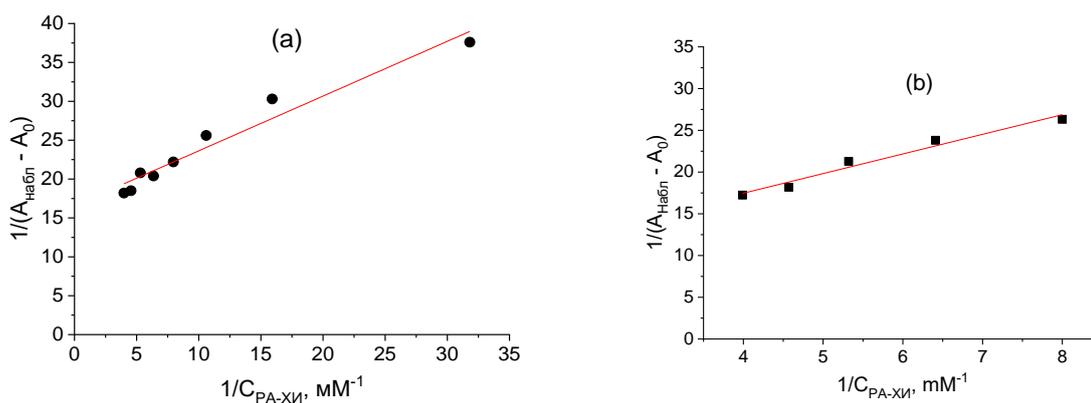


Рисунок 28. Определение констант связывания БСА с (а) с РА(24)-ХИ и (б) с РА(40)-ХИ

Эти результаты показывают существенное различие констант связывания. Уменьшение значения константы почти на порядок в случае РА-ХИ(40)-ХИ можно интерпретировать как изменение механизма взаимодействия с преимущественно электростатического на преимущественно гидрофобный. Это предположение коррелирует с приведенными выше результатами анализа ИКТ.

Выводы

- ❖ Показано, что РА-ХИ (СА 24%) способен образовывать комплексы с БСА, в образование комплекса основной вклад вносит электростатическое взаимодействие, которое сопровождается переносом протонов на хитозан;
- ❖ Повышение ионной силы до физиологических значений подавляет связывание полимер-белок;
- ❖ Методами ИК и КД показано, что образование комплекса хитозан-белок не приводит к изменению вторичной структуры белка;

- ❖ Показано, что увеличение СА хитозана до 40% приводит к снижению аффинности к белку и изменению основного механизма взаимодействия на гидрофобный.