

**С.Н. Морозкина, Р.О. Олехнович,  
П.П. Снетков**

**НЕКОТОРЫЕ  
БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА  
ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И  
СИСТЕМЫ ИХ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ  
ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ**



**Санкт-Петербург  
2021**

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ**

**УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**С.Н. Морозкина, Р.О. Олехнович,  
П.П. Снетков**

**НЕКОТОРЫЕ  
БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА  
ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И  
СИСТЕМЫ ИХ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ  
ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

**УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ**

**РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО  
по направлению подготовки (специальности) 12.04.04 Биотехнические  
системы и технологии в качестве учебного пособия для реализации основных  
профессиональных образовательных программ высшего образования  
магистратуры**

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**Санкт-Петербург**

**2021**

Морозкина, С.Н. Некоторые биологически-активные вещества природного происхождения и системы их доставки на основе гиалуроновой кислоты / С.Н. Морозкина, Р.О. Олехнович, П.П. Снетков. – СПб: Университет ИТМО, 2021. – 72 с.

Рецензент: Зорин Иван Михайлович, доктор химических наук, доцент института химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Пособие адресовано студентам, обучающимся по направлениям 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии» и посвящено системам доставки биологически активных веществ на основе гиалуроновой кислоты. В пособие изложены сведения о структуре, свойствах, способах получения, видах модификации гиалуроновой кислоты, а также биологически активным соединениям растительного происхождения в части их выделения, свойств и некоторых методов их инкапсулирования в полимерные матрицы.



**Университет ИТМО** – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2021

© Морозкина С.Н., 2021

© Олехнович Р.О., 2021

© Снетков П.П., 2021

## Содержание

|  |    |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ .....   | 4  |
| ЧАСТЬ 1. Гиалуроновая кислота: структура, свойства, способы получения, виды модификации .....  | 5  |
| Глава 1.1. Историческая справка .....  | 5  |
| Глава 1.2. Структура и физико-химические свойства .....  | 6  |
| Глава 1.3. Способы получения гиалуроновой кислоты .....  | 9  |
| Глава 1.4. Деполимеризация и гидролиз гиалуроновой кислоты .....   | 10 |
| 1.4.1. Ферментативная деполимеризация (гидролиз) .....   | 10 |
| 1.4.2. Кислотная деполимеризация (гидролиз) .....  | 11 |
| Глава 1.5. Назначение и виды модификации .....   | 12 |
| 1.5.1. Химическое сшивание .....   | 12 |
| 1.5.2. Взаимодействие с биологически активными компонентами .....  | 18 |
| Глава 1.6. Электроформование как способ получения нанотрунтур .....  | 20 |
| 1.6.1. Основы метода электроформования .....   | 20 |
| 1.6.2 Влияние различных параметров на характеристики нановолокон .....   | 23 |
| Глава 1.7. Основные характеристики прибора NANON-01A .....   | 25 |
| 1.7.1. Общее описание прибора .....  | 25 |
| 1.7.2. Комплектация прибора NANON-01A .....  | 27 |
| Глава 1.8. Экспериментальная часть .....   | 30 |
| 1.8.1. Получение микрочастиц на основе гиалуроновой кислоты .....  | 30 |
| 1.8.2. Получение микрофотографий, их цифровая обработка, а также статистическая обработка результатов .....  | 31 |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....  | 39 |
| ЧАСТЬ 2. Биологически активные соединения растительного происхождения: выделение, свойства и некоторые методы их инкапсулирования в полимерные матрицы ..... | 39 |
| Глава 2.1. Введение .....  | 39 |
| Глава 2.2. Усниновая кислота .....   | 40 |
| 2.2.1. Направленная (таргетная) доставка усниновой кислоты .....   | 44 |
| 2.2.2. Липосомы .....  | 45 |
| 2.2.3. Наноэмульсии .....  | 45 |
| 2.2.4. Полимерные микро- и наноносители .....  | 46 |
| 2.2.5. Получение усниновой кислоты .....   | 48 |
| Глава 2.3. Мангиферин .....  | 52 |
| Глава 2.4. Куркумин .....  | 55 |
| Глава 2.5. Бетулиновая кислота .....   | 58 |
| 2.5.1. Выделение бетулина и синтез бетулиновой кислоты .....   | 59 |
| 2.5.2. Синтез бетулиновой кислоты .....  | 60 |
| Глава 2.6. Метилловый эфир глицирретовой кислоты .....   | 62 |
| Глава 2.7. Эхиноцистовая кислота из мари противоглистной .....   | 64 |
| Глава 2.8. Выделение урсоловой кислоты из толокнянки ( <i>Uvae ursi</i> ) .....  | 65 |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....  | 67 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....  | 68 |

## ВВЕДЕНИЕ

Адресная (таргетная, прицельная) доставка фармацевтических субстанций и биологически активных веществ (БАВ) к поражённому органу на сегодняшний день является актуальным, востребованным и перспективным направлением, находящимся на стыке нескольких наук: биотехнология, медицина, биоинженерия, биохимия, химия полимеров и т.п.

Использование систем доставки лекарств обеспечивает пролонгированное действие препарата и его дозированное высвобождение, а также существенно увеличивает терапевтическую эффективность лечения. Более того, за счёт «точечного» действия лекарства непосредственно в зоне поражения снижается системное действие препарата, и, соответственно, уменьшается вероятность возникновения побочных эффектов.

Особый интерес вызывают природные БАВ, обладающие уникальным комплексом свойств. Однако подавляющее число таких соединений имеют крайне низкую растворимость в воде, что значительно уменьшает их биодоступность. Применение полимерных оболочек (капсул) позволяет существенно повысить растворимость гидрофобных БАВ в воде, тем самым улучшить их биодоступность и терапевтическую эффективность.

В качестве полимерной оболочки предпочтительно использовать природные полимеры, такие как коллаген, фиброин шёлка, хитозан, гиалуроновая кислота (ГК). Последний биополимер представляет особый интерес, так как в значительном количестве содержится в клетках и тканях организма человека, следовательно, обладает полной биосовместимостью.

Основные сведения о ГК, её структуре, свойствах, способах получения и модификации представлены в первой части пособия. Вторая часть пособия посвящена БАВ природного происхождения, их строению, свойствам и способам выделения. Экспериментальная часть пособия позволит студентам получить и исследовать наночастицы на основе ГК, в том числе содержащие БАВ.

Данное учебное пособие рекомендовано для студентов обучающихся по программе магистратуры 12.04.04 «Биоинженерия и биотехнические системы» и изучающим дисциплину «Молекулярные переключатели биологических мишеней». Изложенная в пособии информация о возможности применения БАВ в молекулярно-таргетной терапии и системах их доставки будет полезна при подготовке лекционным занятиям и промежуточной аттестации. В пособии также приведены руководства к выполнению лабораторных работ по курсу. Данное пособие также будет полезно лицам, занимающимся получением наноматериалом методом электроспиннинга.

## **ЧАСТЬ 1. Гиалуроновая кислота: структура, свойства, способы получения, виды модификации**

### **Глава 1.1. Историческая справка**

Необычный полисахарид с высокой молекулярной массой, выделенный из стекловидного тела бычьего глаза, впервые упоминается в 1934 г. в работе Карла Мейера и Джона Палмера. Учёные обнаружили вещество, содержащее два углеводных остатка, одним из которых была уроновая кислота. Для удобства они назвали обнаруженное вещество «гиалуроновой кислотой» («hyaluronic acid»), от греческого «hyalos» – стекло + уроновая кислота [1]. По мнению авторов, выделенный полисахарид не был сульфатирован (что было доказано позднее), а молекулярная масса повторяющегося звена составляла 450 Да (впоследствии значение было откорректировано до 397 Да).

Между тем, ещё с 1916 г. Levene и Lopez-Suarez проводили работы по выделению полисахаридов из различных субстанций (стекловидного тела, пупочных канатиков, желудочной слизи). Но в то время это была смесь ГК с другими, сульфатированными гликозаминогликанами.

В 1937 г. ГК была впервые получена бактериальным путём, что открыло новое направление в производстве этого биополимера.

Перечислим значимые этапы в применении и исследовании ГК:

- 1941-1948 гг. – первое применение ГК в медицине в повязках для лечения ран, а также в составе препаратов для лечения туберкулёза (Н.Ф. Гамалея);
- 1950-е годы – применение ГК в офтальмологических операциях (Е.А. Balazs);
- 1969 г. – применение ГК для предотвращения послеоперационных спаек;
- 1970 г. – ГК введена в пораженные артритом суставы беговых лошадей;
- 1972 г. – использование ГК в составе внутриглазных линз;
- 1985 г. – первая конференция, проведённая во Франции, посвящённая ГК;
- 1986 г. – введение термина «гиалуронан», обозначавшего как ГК, так и её соль (например, натриевую);
- 2004 г. – создание Международного общества по науке о ГК (ISHAS).

Интерес к ГК не ослабевает, работы по её исследованию и применению ведутся во многих странах мира, в основном в США, Японии, Китае. Несмотря на большое количество доступных способов получения этого биополимера (см. Главу 1.3), стоимость её на сегодняшний день остаётся чрезвычайно высокой. Так, в Таблице 1.1 приведены 3 марки ГК особой чистоты компании Sigma Aldrich:

Соответственно, по причине высокой стоимости исходной ГК дорогими получаются и препараты на её основе.

Существуют и более дешёвые, так называемые «косметические» марки ГК, но их нельзя применять в медицинских целях (для внутрикожного и внутрисуставного введения, для раневых и послеоперационных повязок, для адресной доставки лекарственных средств) по причине более высокого содержания примесей.

Таблица 1.1 – Примеры марок ГК, полученных различным путём

| Наименование продукта  | Объём поставки | Стоимость, руб. (на 25.12.2020) |
|--|----------------|---------------------------------|
| Гиалуронат натрия (Streptococcus equi <sup>1</sup> )<br>Молекулярная масса 2,0 ... 2,4 МДа | 10 мг          | 17 573,73                       |
| Гиалуронат натрия (bovine vitreous humor <sup>2</sup> )<br>Молекулярная масса не указана   | 10 мг          | 35 503,66                       |
| Гиалуронат натрия (rooster comb <sup>3</sup> )<br>Молекулярная масса 1,0 ... 4,0 МДа       | 100 мг         | 15 436,38                       |

## Глава 1.2. Структура и физико-химические свойства

ГК – это высокомолекулярный гетерополисахарид соединительной ткани, протеогликан, состоящий из повторяющихся звеньев D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина. В живых организмах ГК существует в виде соли – это более стабильная форма данного соединения. ГК в больших концентрациях находится в синовиальной жидкости, пупочных канатиках, стекловидном теле глаза, коже, лёгких, почках, головном мозге и мышечной ткани.

ГК – это один из наиболее изученных полисахаридов соединительной ткани, помимо хондроитинсульфата (входит в состав кожи, хрящей и сухожилий) и гепарина (входит в состав печени). Полисахариды соединительной ткани иногда называют кислыми мукополисахаридами (от лат. mucus – слизь), поскольку они содержат карбоксильные группы и сульфогруппы (хондроитинсульфат и гепарин) [2].

Молекулярная масса ГК, полученной из синовиальной жидкости, стекловидного тела глаза и петушиных гребней, может достигать 20'000 кДа [3]. После переработки (выделения, очистки, стерилизации) молекулярная масса значительно снижается, так как ГК очень чувствительна к различным воздействиям.

Химическая структура ГК приведена на Рисунке 1.1.

<sup>1</sup> <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/73641>

<sup>2</sup> <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h7630>

<sup>3</sup> <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h5388>

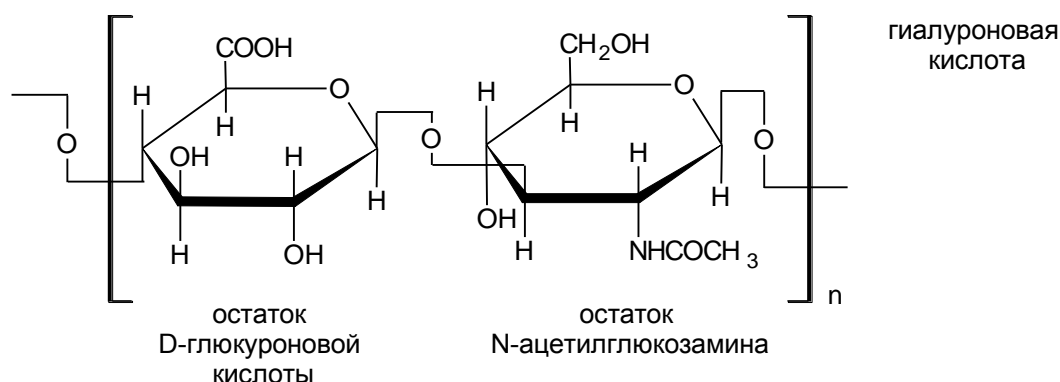


Рисунок 1.1 – Химическая структура гиалуроновой кислоты

Длина «растянутой» цепочки молекулы ГК с молекулярной массой 6000 кДа составляет приблизительно 15 мкм, а диаметр этой вытянутой цепочки приблизительно равен 0,5 нм [4].

Молекула ГК – это анионный, линейный гетерополисахарид, построенный из регулярно чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина. Аминосахар в молекуле ГК соединён с D-глюкуроновой кислотой  $\beta$ -(1→4)-гликозидной связью, а глюкуроновая кислота с аminosахаром соединена  $\beta$ -(1→3) гликозидной связью [3].

Оба углеводных остатка соответствуют  $\beta$ -конфигурации молекулы глюкозы, что позволяет имеющимся в молекуле громоздким функциональным группам-заместителям при углеродных атомах пиранозного кольца (гидроксильные и карбоксильная группы, ацетилированная аминогруппа), а также самим гликозидным связям со смежными углеводными остатками располагаться в стерически-выгодном, экваториальном положении. В то же время атомы водорода занимают менее пространственно-выгодные осевые (аксиальные) положения. В целом структура дисахарида энергетически стабильна [5].

Осевые атомы водорода формируют неполярную, относительно гидрофобную часть молекулы, в то время как экваториальные заместители формируют полярную, гидрофильную часть молекулы [4].

Наличие полярных и неполярных фрагментов в структуре молекулы ГК позволяет ей взаимодействовать с различными химическими веществами (в том числе с так называемыми кросс-линкерами), что даёт возможность проводить модификацию этого соединения и «прививать» различные биологически-активные вещества к цепочке ГК.

Растворы ГК обнаруживают необычные реологические свойства, позволяющие биополимеру проявлять вязкоупругие свойства даже при низких концентрациях. Методом светорассеяния было показано, что в растворе макромолекула ведёт себя как свёрнутая, плотно упакованная цепь с радиусом кривизны около 200 нм [6]. Малая подвижность цепей ГК



обусловлена наличием большого количества водородных связей: внутри молекулы между соседними углеводными остатками, между соседними молекулами, а в водном растворе – с молекулами воды. Водородные связи формируются между кислородом карбоксильной группы и водородом ацетилированной аминогруппы как напрямую, так и через молекулу воды (вода играет роль «мостика»). Другие водородные связи образуются между водородом гидроксильных групп и кислородом соседней ацетогруппы или между гидроксильными группами и кислородом глюкопиранозного кольца [7].

На Рисунке 1.2 представлена схема образования водородных связей.

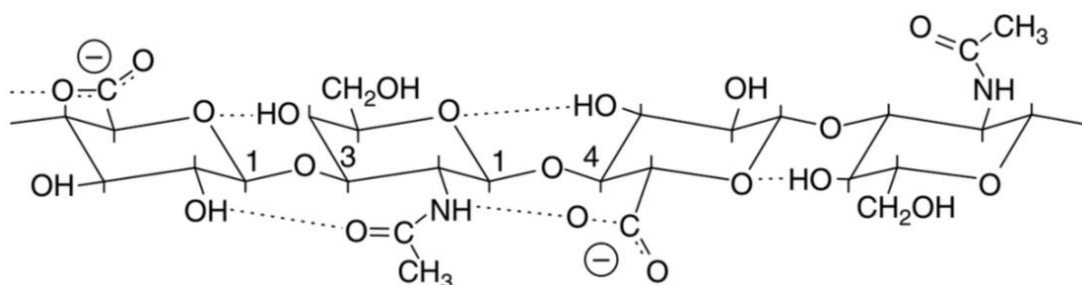


Рисунок 1.2 – Схематическое обозначение образующихся водородных связей

В растворе полимерные цепи принимают форму спирали, причём эти цепочки начинают «спутываться» между собой уже при низких концентрациях. Раствор ГК с концентрацией 1% обладает высокой вязкостью, однако может быть легко приведён в движение посредством приложенного давления. Таким образом, его можно ввести, например, в сустав с помощью тонкой иглы [5].

Как упоминалось выше, ГК в растворе принимает форму скрученной спирали, что происходит благодаря образованию водородных связей вдоль цепи молекулы. При этом, как было установлено методом рентгеноструктурного анализа (РСА), натриевая соль ГК формирует в растворе двойную спираль [8].

Дальнейшие исследования с использованием РСА, лазерного светорассеивания и вискозиметрии [9] показали, что помимо двойной спирали, может существовать сверхспирализованная конформация молекулы с участками плотного геля. С ростом концентрации ГК в растворе происходит самопроизвольное образование межмолекулярных сеток.

Дополнительные исследования уточнили структуру молекулы ГК в разбавленных растворах: биополимер приобретает вид клубка, состоящего из лент спиралевидной структуры и поглощающего большое количество воды. При этом образуются «домены», что говорит о существовании

третичной структуры молекул ГК в растворе. В чём-то такая структурная организация напоминает структуру белков (спираль – клубок – глобула).

Ячеистая (сетчатая) структура молекул ГК в растворах позволяет частицам других химических компонентов раствора (воды, питательных веществ, солей и т. п.) свободно перемещаться внутри образовавшегося «домена» макромолекул полимера. Между тем, большие молекулы и частицы задерживаются. Это свойство ГК играет важную биологическую роль в тканях живых организмов.

### Глава 1.3. Способы получения гиалуроновой кислоты

На сегодняшний день существует два основных промышленных способа получения ГК (гиалуроната натрия): из тканей позвоночных животных и с помощью бактерий: *Streptococcus genus (uberis, equisimilis, zooepidermicus, pyogenes, equi)*, *Pasteurella multocida* и *Corynebacterium glutamicum* [3].

Содержание ГК в различных органах и тканях приведено в Таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Содержание ГК в биологических тканях и жидкостях

| Ткань/биологическая жидкость         | Содержание ГК   |
|--------------------------------------|---|
| Эпидермис кожи                       | 0,1 мг/г сырой ткани  |
| Стекловидное тело глаза              | 0,1 ÷ 0,4 мг/г сырой ткани  |
| Дерма кожи                           | 0,5 мг/г сырой ткани  |
| Гиалиновый хрящ                      | 1,0 мг/г сырой ткани  |
| Синовиальная жидкость                | 1,5 ÷ 3,0 мг/мл (здоровый коленный сустав)<br>0,3 ÷ 1,9 мг/мл (коленный сустав при артрите) |
| Пупочные канатики (Вартонов студень) | 4,0 мг/мл   |
| Петушиные гребни                     | 7,5 мг/г  |
| Амниотическая жидкость               | 20 мг/мл  |

В связи с высоким содержанием ГК в петушиных гребнях этот путь получения ГК наиболее экономически выгоден для промышленных целей. Количество извлекаемой ГК при такой технологии составляет от 0,5 до 6 г на 1 кг сырья. С другой стороны, этот метод требует комплексного многостадийного очищения конечного продукта от белков, пептидов, липидов, нуклеиновых кислот и других биологических примесей. При этом молекулярная масса ГК заметно снижается. Без удаления белковых примесей возможны побочные эффекты при применении таких препаратов в виде аллергических реакций различной степени выраженности.

Наиболее перспективным с точки зрения чистоты получаемого продукта и разнообразия молекулярно-массового состава считается получение ГК бактериальным способом. Этот способ предполагает выращивание штаммов бактерий в особом питательном «бульоне» при специально подобранных условиях, при которых на поверхности бактерий формируются капсулы из ГК, которая затем переходит в культуральную жидкость. При этом средний выход ГК составляет от 4 до 7 г на 1 л культуральной среды. ГК затем выделяют и очищают от микроорганизмов, низкомолекулярных составляющих и других примесей. Таким образом, с использованием, например, бактерии *Streptococcus equi*, получают ГК с молекулярной массой от 1,4 кДа до 2400 кДа.

При этом данный метод требует более тщательной очистки конечного продукта от белковых составляющих, поскольку на белки, образовавшиеся в процессе бактериального синтеза ГК, аллергические реакции могут быть сильнее, чем на примесные белки в ГК природного происхождения.

## **Глава 1.4. Деполимеризация и гидролиз гиалуроновой кислоты**

ГК может подвергаться деструкции не только в процессе выделения, очистки, стерилизации и хранения, но и в процессе применения. В частности, ферментативная деструкция ГК, введённой, например, в кожу, приводит к уменьшению косметического и терапевтического эффекта. С целью увеличения стойкости к деструкции проводят модификацию ГК (см. Главу 1.5).

### **1.4.1. Ферментативная деполимеризация (гидролиз)**

В животных тканях ферментативная деструкция ГК приводится в действие за счёт трёх типов ферментов: гиалуронидаза,  $\beta$ -глюкуронидаза, и  $\beta$ -N-ацетил-гексозаминидаза. В живом организме эти ферменты находятся в различных формах и могут быть найдены как внутри клеток, так и в сыворотке крови. Гиалуронидаза расщепляет высокомолекулярную ГК на олигосахариды, тем самым заметно снижая молекулярную массу полимера.  $\beta$ -Глюкуронидаза и  $\beta$ -N-ацетил-гексозаминидаза в дальнейшем расщепляют олигосахаридные фрагменты путём воздействия на концевые участки молекул [10].

В итоге ферментативный гидролиз может привести к полному разрушению ГК и образованию D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина (см. Рисунок 1.3).

При этом активность различных ферментов зависит от pH среды, причём для одного и того же фермента оптимальные значения pH могут меняться в зависимости от измеряемого параметра (см. Таблицу 1.4).

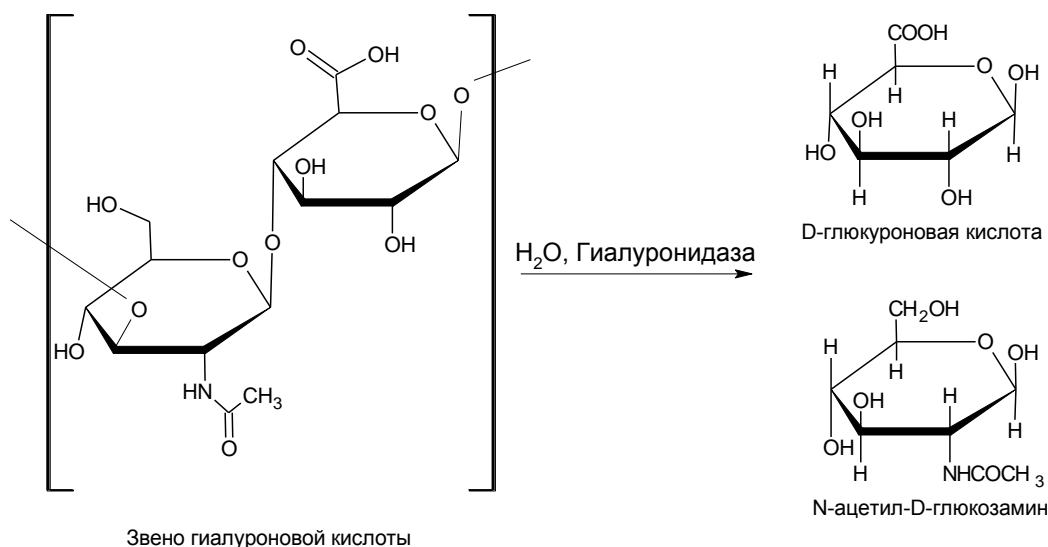


Рисунок 1.3 – Схема полного ферментативного гидролиза ГК

Таблица 1.4 – Оптимальное значение pH для различных ферментов

| Тип гиалуронидазы<br>(hyaluronidase,<br>gialuronatglikanogidrolaza)<br>Далее в таблице «G.» | Оптимальное значение pH <sup>4</sup> ,<br>определённое по |                                    |
|---|---|------------------------------------|
|   | Уменьшению<br>вязкости раствора ГК                        | Накоплению<br>редуцирующих сахаров |
| testicular G.   | 7,0   | 4,4                                |
| G. from Clostridium welchii   | 6,0   | 5,7                                |
| streptococcal G.  | 5,5   | 5,6 и 7,1                          |
| staphylococcal G.   | 6,6   | 5,6                                |
| pneumococcal G.   | -   | 5,6 – 5,8                          |

При разработке новых полимерных систем на основе ГК ферментативный гидролиз может применяться для сравнительной оценки степени биodeградации полученных препаратов. Оценку стойкости ГК к ферментативной деполимеризации удобно проводить вискозиметрическим методом.

#### 1.4.2. Кислотная деполимеризация (гидролиз)

Растворы ГК чувствительны к подкислению: даже небольшая добавка кислоты к раствору запускает механизм деполимеризации [10]. При этом, в конечном счёте, образуются глюкозамин, глюкуроновая кислота и уксусная кислота. Схема полного гидролиза приведена на Рисунке 1.5.

<sup>4</sup> По материалам Интернет-сайта URL: <http://bigmed.info/index.php/HYALURONIDASE>

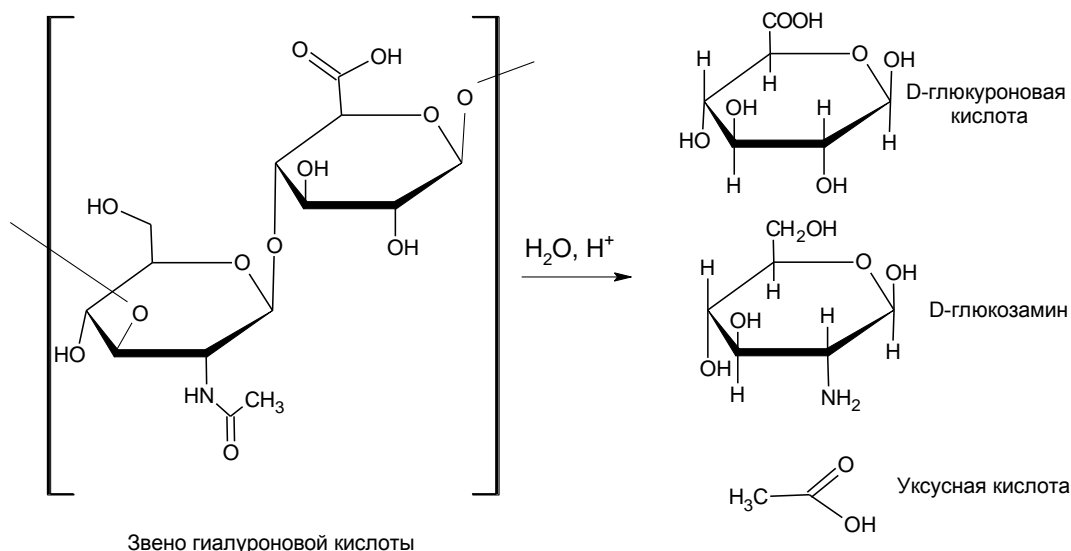


Рисунок 1.5 – Схема полного кислотного гидролиза ГК

## Глава 1.5. Назначение и виды модификации

Модификация ГК проводится с целью сохранения её молекулярной массы, а также физико-механических, реологических, эксплуатационных свойств конечного продукта в процессе использования, в том числе, при воздействии различных ферментов. Помимо этого, модификация позволяет «привить» к молекуле ГК различные биологически активные вещества. Кроме того, возможно проведение «загрузки» фармакологических субстанций или биологически активных веществ внутрь полимерной оболочки без химической сшивки вводимого вещества с активными группами ГК [11-13].

С химической точки зрения у ГК есть несколько реакционных центров, доступных для межмолекулярного сшивания: ацетамид-, карбоксил-, гидроксил- и восстанавливающая концевая альдегидная группа. В зависимости от строения сшивающего агента из ГК получают различные материалы, начиная с плёнок с низким содержанием воды, заканчивая гидрогелями с высоким её содержанием. Большинство методов сшивания ГК можно разделить на 2 типа: одностадийный процесс, при котором кросс-линкер сразу образует поперечные связи, либо двустадийный процесс, при котором вначале получают производные ГК, обладающие высокой реакционной способностью, а затем производят процесс сшивания [10].

### 1.5.1. Химическое сшивание

Наиболее распространённым методом модификации является метод сшивания ГК различными кросс-линкерами. При этом происходит

увеличение химической, механической и ферментативной устойчивости ГК.

Одним из наиболее распространённых сшивающих агентов считается дивинилсульфон (ДВС, DVS, см. Рисунок 1.6). Примечателен он тем, что в водных щелочных растворах быстро образует сетки ГК даже при комнатной температуре. Сшивка проходит по гидроксильным группам, образуя сульфонил-диэфирные связи. В зависимости от условий реакции получают продукты различного вида: от мягких гелей до прочных плёнок [10].

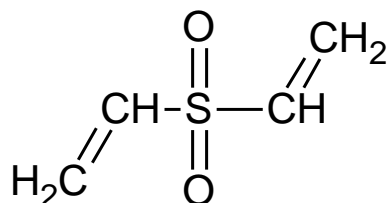


Рисунок 1.6 – Дивинилсульфон

Существенный недостаток дивинилсульфона – его чрезвычайно высокая токсичность. Работы с ним необходимо проводить в вытяжном шкафу и с использованием средств индивидуальной защиты, в том числе глаз и органов дыхания.

В Таблице 1.5 приведены основные свойства дивинилсульфона.

Таблица 1.5 – Основные характеристики дивинилсульфона

| Параметр  | Значение                             |
|---|--------------------------------------|
| CAS №   | 77-77-0                              |
| Внешний вид   | Бесцветная жидкость                  |
| Показатель преломления  | n <sub>20/D</sub> 1,476              |
| Плотность   | 1,177 г/мл при 25 °С                 |
| Растворимость в воде  | ≥ 10 г/100 мл при 17 °С              |
| Температура плавления, °С   | -26                                  |
| Температура кипения, °С   | 234                                  |
| Температура вспышки, °С   | 102                                  |
| Токсичность   | Чрезвычайно токсичен                 |
| Воспламеняемость  | Легко воспламеняемый                 |
| Взаимодействие с окислителями   | Реагирует с большим выделением тепла |
| Рекомендуемая температура хранения, °С  | 2 ÷ 8                                |
| Примечание: информация об основных свойствах дивинилсульфона получена на сайте URL: <a href="http://www.chemicalbook.com">http://www.chemicalbook.com</a> |                                      |

Схема сшивки дивинилсульфоном представлена на Рисунке 1.7.

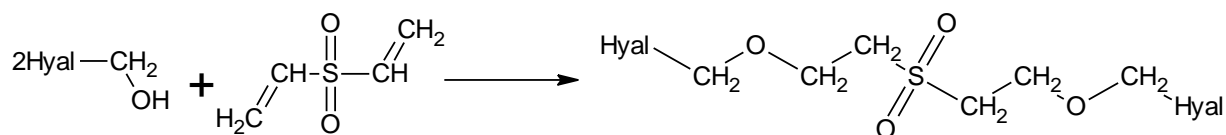


Рисунок 1.7 – Схема сшивки ГК дивинилсульфоном

По данным работы [6], дивинилсульфон используется при производстве препаратов линейки «Гиалуформ», предназначенных для проведения контурной пластики лица и биоревитализации.

Стоит отметить, что с использованием дивинилсульфона получены гидрогели на основе химически стабилизированной ГК и некоторых производных целлюлозы: гидроксиэтилцеллюлозы и карбоксиметилцеллюлозы [13].

Вторым из наиболее используемых кросс-линкеров является 1,4-бутандиол-диглицидиловый эфир (БДДЭ, BDDE, см. Рисунок 1.8). Помимо него, сшить молекулу ГК можно и другими диэпоксидами, например, диглицидиловым эфиром полиэтиленгликоля, диглицидиловым эфиром этиленгликоля и глицидиловым эфиром полиглицерина. Сшивание посредством диэпоксидов имеет интересную особенность: в кислой среде диэпоксиды формируют сложноэфирные связи между карбоксильными группами ГК, а в щелочной среде образуют простые эфирные связи между гидроксильными группами. Причём реагировать способна как первичная гидроксильная группа  $-\text{CH}_2\text{OH}$ , так и вторичная гидроксильная группа  $=\text{CHOH}$ .

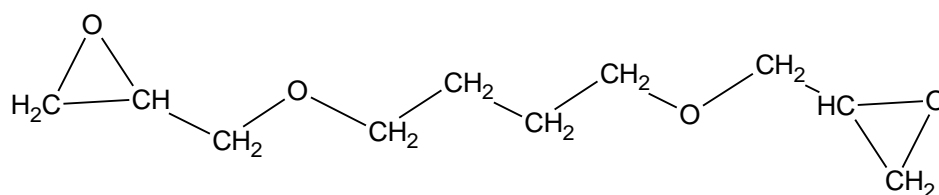


Рисунок 1.8 – 1,4-бутандиол-диглицидиловый эфир

При этом уровень  $pK_a$  гидроксильных групп ГК находится на уровне 10, поэтому при больших значениях pH, реакция идёт в основном по гидроксильным группам (с образованием простых эфиров) по причине более сильной нуклеофильности, чем у карбоксильных групп. Однако при снижении pH уменьшается депротонированность  $-\text{OH}$  групп, и реакция идёт в основном по карбоксильным группам (с образованием сложных эфиров) [15].

Схематические изображения получаемых сшивок ГК при использовании 1,4-бутандиол-диглицидилового эфира при различной кислотности среды показаны на Рисунках 1.9 и 1.10.

Основные свойства BDDE приведены в Таблице 1.6.

Таблица 1.6 – Основные свойства 1,4-бутандиол-диглицидилового эфира

| Параметр                               | Значение                       |
|--|--------------------------------|
| CAS №                                  | 219-371-7                      |
| Внешний вид                            | Бледно-жёлтая жидкость         |
| Показатель преломления                 | n <sub>20/D</sub> 1,453        |
| Плотность                              | 1,1 г/мл при 25 °С             |
| Растворимость в воде                   | Растворим в любых соотношениях |
| Температура кипения, °С                | 266                            |
| Температура вспышки, °С                | 110                            |
| Токсичность                            | Низкая                         |
| Воспламеняемость                       | Легко воспламеняемый           |
| Взаимодействие с окислителями          | Реагирует с кислотами          |
| Рекомендуемая температура хранения, °С | -20                            |

Примечание: информация об основных свойствах 1,4-бутандиол-диглицидилового эфира получена на сайте URL: <http://www.chemicalbook.com>

Стоит отметить, что BDDE гораздо менее токсичен, чем DVS, поэтому его предпочтительнее использовать в качестве кросс-линкера.

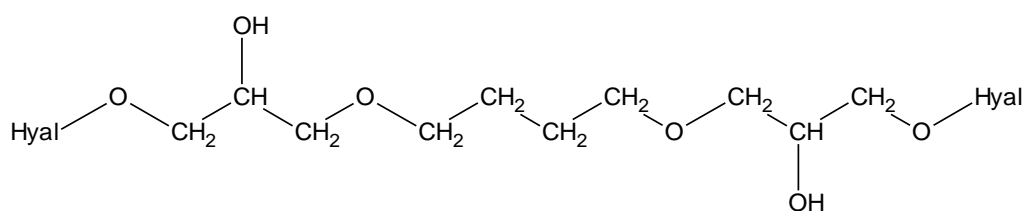


Рисунок 1.9 – Продукт сшивки ГК с использованием BDDE (реакция по гидроксильной группе)

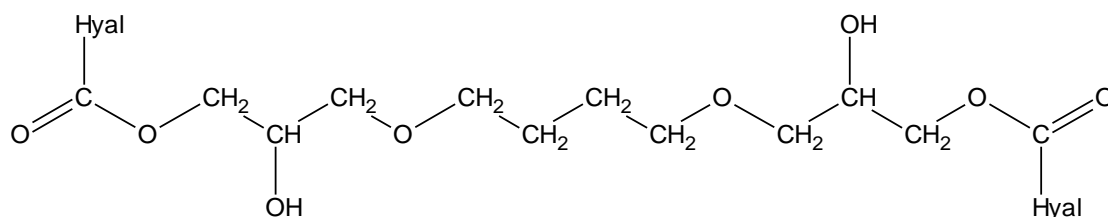


Рисунок 1.10 – Продукт сшивки ГК с использованием BDDE (реакция по карбоксильной группе)



Таблица 1.7 – Сводная таблица методов химической сшивки ГК [15]

| Тип реакции   | Активатор реакции<br>(химическая группа)    | Основные и второстепенные<br>реагенты          | Растворитель,<br>значение pH       |
|---|---|--|------------------------------------|
| <b>1 Реакции по карбоксильной группе –COOH</b>  |   |  |                                    |
| 1.1 Амидирование  | Карбодиимиды                                | EDC, NHS                                       | Вода (pH 4,75–7,5) / ДМСО          |
|   | CMPI  | CMPI, триэтиламин                              | DMFA или ДМСО                      |
|   | CDMT  | CDMT, NMM                                      | Вода или ацетонитрил               |
|   | CDI   | CDI  | ДМСО                               |
| 1.2 4-х компонентная<br>конденсация   |   | Формальдегид, диамин,<br>циклогексил изоцианид | Вода (pH 3)                        |
| 1.3 Образование<br>сложных эфиров<br>(этерификация)   | Диазометан                                  | Триметилсилил диазометан,<br>уксусная кислота  | ДМСО                               |
|   | Галоидные алкилы                            | Йодиды или бромиды алкилов                     | ДМСО                               |
|   | Тетраэтиленгликоль<br>ди(п-толуенсульфонат) | Тетраэтиленгликоль<br>ди(п-толуенсульфонат)    | ДМСО                               |
|   | Бисэпоксиды                                 | 1,4-бутандиол-диглицидиловый<br>эфир           | Вода (уксусная кислота, pH<br>2–5) |
| 1.4 Окисление   | Периодат натрия                             | Периодат натрия                                | Вода                               |
| Сокращения:<br>EDC – 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид<br>NHS – N-Гидроксисукцинимид<br>CMPI – 2-хлор-1-метилпиридиний йодид<br>DMFA – Диметилформамид<br>CDMT – 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазин<br>NMM – N-метилморфолин<br>CDI – N,N'-Карбонилдиимидазол<br>DTT – Дитиотриэтолл<br>n-OSA – N-Октенил янтарный ангидрид<br>ДМСО – Диметилсульфокси |   |  |                                    |

Продолжение таблицы 1.7

| Тип реакции   | Активатор реакции<br>(химическая группа) | Основные и второстепенные<br>реагенты                                   | Растворитель,<br>значение pH   |
|---|--|---|--------------------------------|
| <b>2 Реакции по гидроксильной группе –ОН</b>        |  |   |                                |
| 2.1 Образование<br>простых эфиров                   | Бисэпоксиды                              | 1,2,3,4-диэпоксидбутан  | Вода (+0,2М NaOH,<br>pH > 13)  |
|   |  | 1,2-бутандиол-диглицидиловый<br>эфир                                    | Вода (+0,25М NaOH,<br>pH > 13) |
|   |  | Этиленгликоль<br>диглицидиловый эфир или<br>полиглицерил полирицинолеат | Вода (1М NaOH, pH 14)          |
|   |  | Эпихлоргидрин или<br>диэпоксидоктан                                     | Вода (pH 10, затем pH 4)       |
|   | Дивинилсульфон DVS                       | Дивинилсульфон  | Вода (0,2М NaOH,<br>pH > 13)   |
|   | Этиленсульфид                            | Этиленсульфид, DTT  | Вода (pH 8,5-10)               |
| 2.2 Образование<br>полуацеталей                     | Глютаровый альдегид                      | Глютаровый альдегид   | Вода (pH 2)                    |
| 2.3 Образование<br>сложных эфиров<br>(этерификация) | Ангидриды                                | n-OSA   | Вода (pH 9)                    |
|   |  | Хлорангидриды карбоновых<br>кислот                                      | DMCO                           |
|   |  | Метакриловый ангидрид   | Вода (pH 8-10)                 |
|   | Уретаны                                  | Бромистый циан (CNBr)   | Вода (pH 9-10)                 |
| <b>3 Реакции по группе –NHCOCH<sub>3</sub></b>      |  |   |                                |
| 3.1 Деацетилирование/<br>амидирование               | Гидразинсульфат                          |   | Вода, затем DMCO               |

Помимо указанных выше кросс-линкеров, при модификации ГК используются и другие соединения. В Таблице 1.7 представлена сводная информация по различным кросс-линкерам и условиям проведения реакций в соответствии с материалами статьи [15].

Недостаток применения химических кросс-линкеров состоит в том, что большинство этих соединений является высокотоксичными и их присутствие в конечном продукте недопустимо. Токсичными могут быть и промежуточные соединения, а также продукты распада сшитой ГК. Удаление непрореагировавших реагентов из сшитого продукта – это довольно сложный процесс, который может приводить, в частности, к деполимеризации ГК и уменьшению молекулярной массы.

### 1.5.2. Взаимодействие с биологически активными компонентами

Помимо проведения сшивающих реакций, возможно и связывание молекулы ГК с различными биологически активными компонентами, например, витаминами, аминокислотами и пептидами. В строении молекул так называемых низкомолекулярных биорегуляторов присутствуют функциональные группы –ОН, –СООН, –NH<sub>2</sub>, –SH, что позволяет произвести их «прививку» к молекуле ГК. Такую «прививку» можно осуществить как растворным методом, так и твердофазным методом, причём в последнем случае равновесие в реакциях смещается в сторону конечных продуктов. При этом увеличивается устойчивость ГК к действию ферментов, что увеличивает время пребывания введённого препарата и, соответственно, улучшает терапевтический эффект [10].

Некоторые биологически активные вещества, используемые при твердофазной модификации ГК, приведены на Рисунках 1.11-1.14.

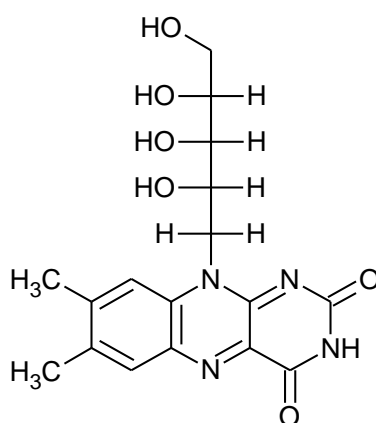


Рисунок 1.11 – Рибофлавин (Витамин В<sub>2</sub>)

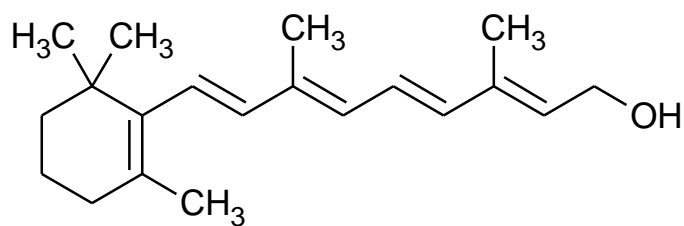


Рисунок 1.12 – Ретинол (витамин А)

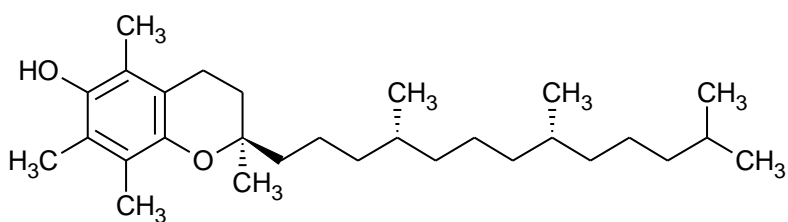


Рисунок 1.13 –  $\alpha$ -токоферол (Витамин Е)

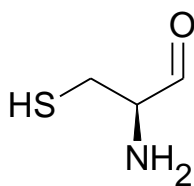


Рисунок 1.14 – L-цистеин

Учитывая возможность проведения «прививки» аминокислот на цепочку ГК, интересным и перспективным направлением исследования можно считать прививку селен-содержащих аминокислот (см. Рисунки 1.15 и 1.16), что, возможно, улучшит биодоступность лекарственных препаратов с селеном.

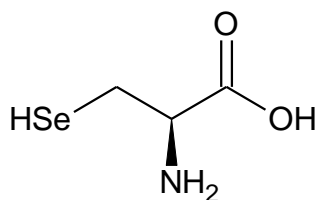


Рисунок 1.15 – Селенцистеин (Se-Cys)

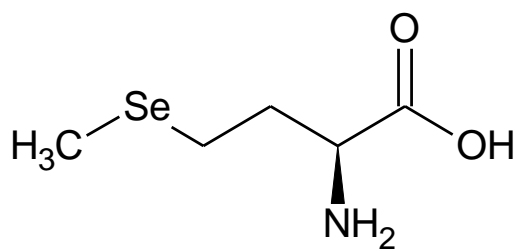


Рисунок 1.16 – Селенметионин (Se-Met)

## Глава 1.6. Электроформование как способ получения наноструктур

В настоящее время существует несколько способов формирования структур наноразмерного уровня, в частности, нановолокон, из растворов полимеров: вытягивание, метод нанопильер и метод электроформования (электроспиннинг). Вне зависимости от выбранного способа, процесс получения таких структур должен включать следующие стадии: перевод полимера в вязкотекучее состояние путём растворения или расплавления, формование волокон, а также их отверждение за счёт охлаждения ниже температуры стеклования полимера или за счёт удаления растворителя [16].

Одним из наиболее перспективных способов получения нановолокон и наночастиц из растворов полимеров является процесс электроформования (ЭФ). Этот метод обладает высокой эффективностью, аппаратурной простотой, гибкостью технологического процесса. Однако чаще с помощью метода ЭФ получают нановолокна, чем наночастицы. За счёт варьирования различных технологических параметров процесса электроформования можно получить структуры различной степени пористости и упорядоченности [17]. Высокое значение удельной поверхности нановолокон (повышенная пористость) позволяет использовать их в различных отраслях, начиная от систем фильтрации, заканчивая материалами для тканевой инженерии.

### 1.6.1. Основы метода электроформования

Электроформование – это процесс, который приводит к формированию структур наноразмерного уровня в результате воздействия электростатических сил на электрически заряженную струю полимерного раствора или расплава [18].

Первый патент на метод получения волокон в электростатическом поле был выдан в 1902 г. в США, однако в то время он не получил широкого распространения. Интерес к данному методу стал возрастать

позднее, и количество публикаций по тематике нановолокон ежегодно возрастает.

Разработкой теоретических основ, формовочных растворов, а также приборов занимаются ведущие научно-исследовательские центры США, Южной Кореи, Японии, Швейцарии, Китая. Функционируют лабораторные, полупромышленные и промышленные установки для производства нетканых материалов методом электроформования [16].

Прототипом электроформования волокон (ЭФВ) является метод электрогидродинамического распыления жидкостей (ЭРЖ), в котором раствор, обладающий низкой электропроводностью, подаётся в дозирующее сопло, находящееся под постоянным высоким электрическим напряжением, и тем самым распыляется силами отталкивания одноимённых электрических зарядов на мелкие капли. Эти капли можно осадить на противоположном электроде [19]. При этом получают как покрытия, так и отдельные наночастицы. Также существует разновидность метода электрораспыления, называемая «Nano Spray Drying Technology» [20].

На Рисунке 1.16 представлена схема процесса ЭФ.

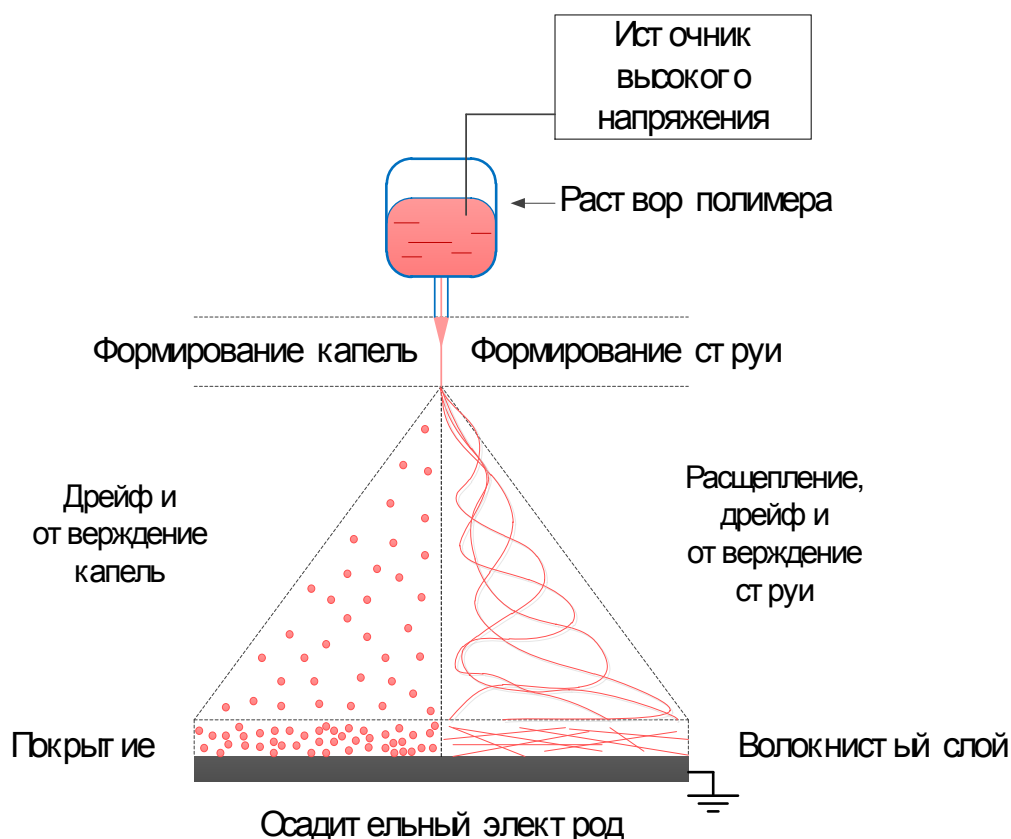


Рисунок 1.16 – Принципиальная схема процесса ЭФ

Опишем более подробно процесс электроформования. Прядильный полимерный раствор с заданным расходом подаётся из ёмкости (шприца) в капиллярное сопло (иглу). При этом высокое электрическое напряжение может быть подведено как к ёмкости (с помощью металлического стержня), так и к самой игле или к прядильному раствору полимера чуть выше иглы (последняя схема применяется в приборе NANON-01A). Под действием электростатических сил образуется исходная непрерывная и стационарная ускоряющаяся и утончающаяся свободная струя, ось которой совпадает с генеральным направлением электрического поля. Это первая и достаточно легко регулируемая стадия процесса ЭФ, от стабильности которой зависят все остальные его стадии и, соответственно, характеристики получаемых структур наноразмерного уровня. Вторая стадия состоит из нескольких одновременно протекающих процессов. В ней образовавшаяся струя под воздействием гидродинамического момента сил со стороны вязкой газовой среды (возникающего за счёт колебания объемной плотности электрических зарядов) разворачивается поперек направления поля и «под тормаживается» возрастающей силой сопротивления среды, образуя расталкиваемое одноименными электрическими зарядами облако (пучок) в виде расширяющегося книзу конуса. Одновременно заметно ускоряется испарение растворителя, начавшееся еще на первой стадии процесса, струя отверждается, и образовавшееся «облако» (волокон или частиц) дрейфует во внешнем электрическом поле на осадительный электрод (коллектор). На этой стадии процесса возможны последовательные расщепления струи на несколько более мелких и тонких с образованием в облаке нестационарной объемной сеточно-волоконистой структуры. Третья стадия также состоит из двух одновременно протекающих процессов: первого – случайной (или более ориентированной, в случае барабанного коллектора) укладки волокон на плоскость осадительного электрода, и второго – замыкающего электрическую цепь искрового газового разряда между осадительным электродом и образующимся на нем полимерным слоем [19].

Для удаления паров растворителя, выделяющихся в окружающее пространство при отверждении струи, и обеспечения безопасных условий работы всё оборудование установки размещается в непрерывно вентилируемой камере. По этому принципу разрабатываются все типы приборов для электроспиннинга, как лабораторные, так и промышленные.

На Рисунке 1.17 изображены конусы Тэйлора и струи полимерного раствора, возникающие в процессе электроспреинга (слева) и электроспиннинга (справа).

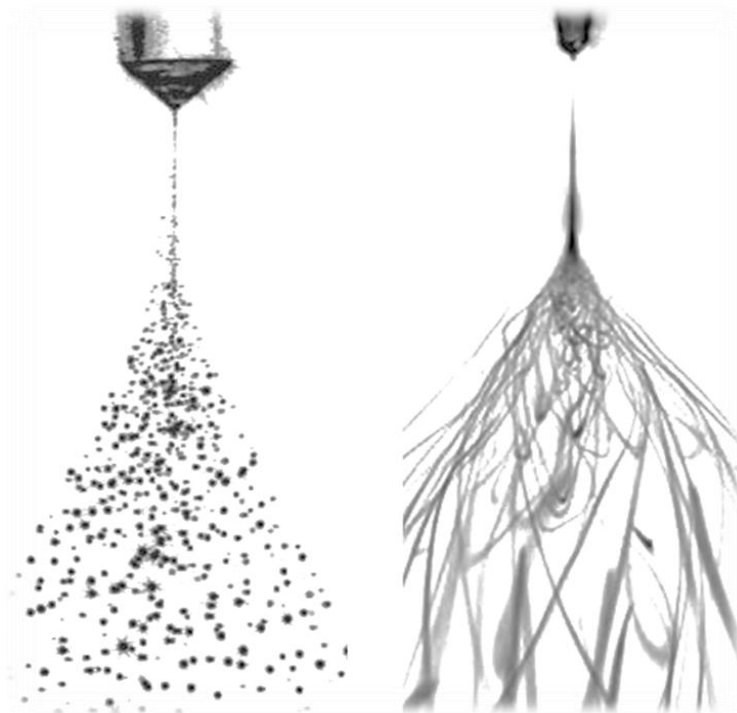


Рисунок 1.17 – Конусы Тэйлора и струи полимерного раствора

### 1.6.2 Влияние различных параметров на характеристики нановолокон

В связи с детальной изученностью процесса электроформования волокон далее будет рассмотрено влияние основных параметров на процесс электроспиннинга и, соответственно, на морфологию получаемых волокон. К таким параметрам относятся параметры раствора полимера, технологические параметры, а также параметры окружающей среды. Стоит отметить, что эти же параметры схожим образом влияют на процесс электроспреинга, однако до настоящего времени обзорных публикаций на эту тему не встречается.

Параметры, влияющие на процесс ЭФ, рассмотрены в Таблице 1.8.

Таблица 1.8 Параметры электроспиннинга и их влияние на морфологию получаемых нановолокон [21, 22]

| Параметр                    | Влияние на характеристики нановолокна  |
|-----------------------------|--|
| <b>1 Параметры раствора</b> |  |
| 1.1 Вязкость ( $\eta$ )     | Низкая вязкость приводит как к образованию отдельных капель, так и к образованию «бусинок» на волокнах. С ростом вязкости растёт диаметр волокон |
| 1.2 Концентрация            | С увеличением концентрации полимера увеличивается диаметр нановолокон  |



Продолжение Таблицы 1.8

| <b>Параметр</b>                                      | <b>Влияние на характеристики нановолокна</b>  |
|--|---|
| 1.3 Молекулярная масса (ММ) полимера                 | Число дефектов («бусинок», пузырьков) уменьшается с ростом ММ полимера  |
| 1.4 Электропроводность                               | С ростом электропроводности раствора происходит уменьшение диаметра волокон   |
| 1.5 Поверхностное натяжение                          | С увеличением поверхностного натяжения возможно возникновение неустойчивости струи  |
| <b>2 Технологические параметры</b>                   |   |
| 2.1 Приложенное напряжение                           | С увеличением напряжения уменьшается диаметр образующихся нановолокон   |
| 2.2 Расстояние между иглой и осадительным электродом | При слишком близком расположении, равно как и при слишком большой удалённости, происходит образование дефектов – «бусинок», а также отдельных капель. Для получения однородных волокон требуется минимальное расстояние |
| 2.3 Скорость подачи раствора                         | Наблюдается прямая зависимость диаметра нановолокон от расхода раствора полимера. При этом слишком большая скорость подачи может приводить к дефектам   |
| <b>3 Параметры окружающей среды</b>                  |   |
| 3.1 Влажность воздуха                                | Высокая влажность провоцирует возникновение многочисленных пор на волокне   |
| 3.2 Температура                                      | Увеличение температуры приводит к уменьшению диаметра получаемых нановолокон  |

Указанные в Таблице 1.8 правила соблюдаются не всегда. Так, авторы статьи [23] не наблюдали явной зависимости диаметра нановолокон от приложенного напряжения (см. Рисунок 1.18).

Авторы объясняют это тем, что при увеличении напряжения одновременно возникает два конкурирующих процесса: с одной стороны, происходит увеличение интенсивности биений (вибраций, колебаний) образующейся полимерной струи, с другой – увеличение массового расхода раствора полимера. Последнее, в свою очередь, приводит к увеличению диаметра волокон, но при недостаточной скорости подачи раствора происходит «вырывание» раствора из иглы, процесс при этом прерывистый.

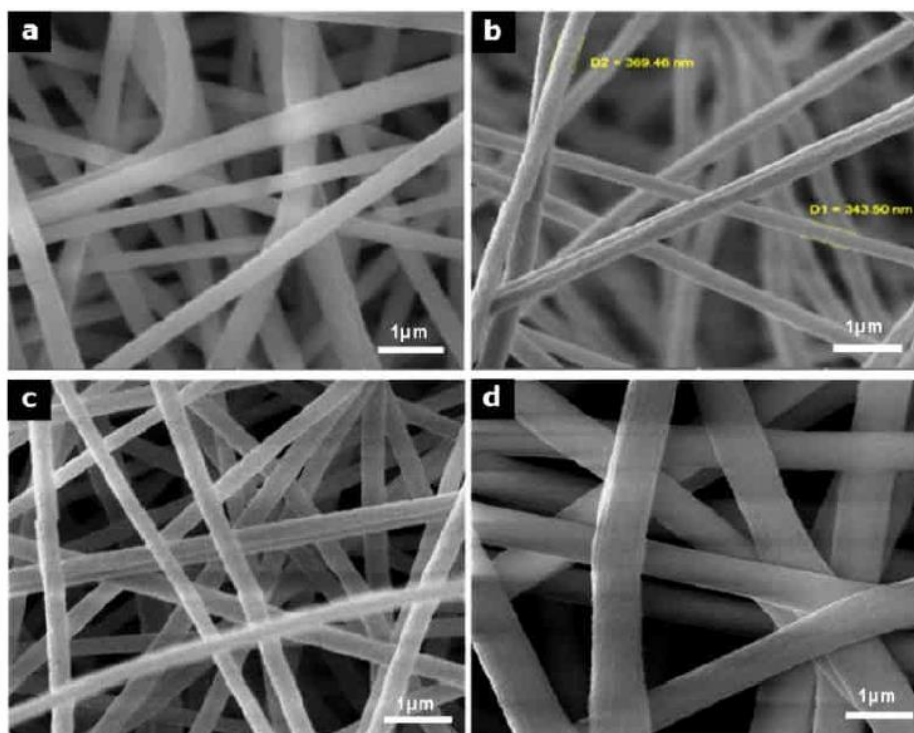


Рисунок 1.18 – Зависимость диаметра нановолокон, получаемых из 10% раствора ПАН в ДМФА, от приложенного напряжения, где (а) 18 кВ, (b) 19 кВ, (c) 20 кВ, (d) 21 кВ

Стоит отметить, что за счёт присутствия функциональных групп, водные растворы ГК обладают высоким значением электропроводности, что вместе с высокой вязкостью, высоким поверхностным натяжением раствора и низкой скоростью испарения воды значительно ухудшает прядимость раствора. Тем не менее, исследователи применяют различные способы для получения волокон: сложные системы растворителей, модифицирующие полимеры, например, поливиниловый спирт (ПВС) и полиэтиленоксид (ПЭО) [24].

## Глава 1.7. Основные характеристики прибора NANON-01A

### 1.7.1. Общее описание прибора

Установка для электроспиннинга NANON-01A разработана компанией MECC CO., LTD. совместно с Технологическим Институтом Киото (Япония) и Национальным Университетом (Сингапур), ведущими научными центрами в области исследования нановолокон. Универсальная установка NANON-01A предоставляет широкие возможности для получения нановолокон из различных полимеров в лабораторных условиях.

Возможности прибора NANON-01A:

- получение ориентированных и неориентированных волокон;
- получение полых волокон;
- получение коаксиальных волокон;
- получение отдельных частиц;
- получение нановолокон из полимерно-керамических материалов;
- получение образцов с различной степенью пористости;
- получение сверхтонких нановолокон.

Фотография прибора представлена на Рисунке 1.19. Основные технологические параметры прибора NANON-01A, доступные для изменения пользователем, приведены в Таблице 1.9.



Рисунок 1.19 – Фотография прибора NANON-01A (фронтальный вид)

Таблица 1.9. Основные параметры электроспиннинга

| Параметр электроспиннинга                              | Значение                |
|--|-------------------------|
| Напряжение между иглой и осадительным электродом, кВ   | 0,5 ÷ 30,0<br>(шаг 0,5) |
| Расстояние между иглой и осадительным электродом, мм   | 50 ÷ 150                |
| Скорость передвижения прядильного узла, мм/с           | 0 ÷ 300                 |
| Скорость вращения осадительного электрода, об/мин:     |                         |
| - барабанный коллектор                                 | 150 ÷ 3000              |
| - коллектор с сердечником                              | 50 ÷ 500                |
| Скорость подачи прядильного раствора (расход), мл/ч    | 0,1 ÷ 60                |
| Объем совместимых шприцев типа Luer-lock, мл           | 2.5; 5.0; 10.0          |
| Производительность вытяжной системы, м <sup>3</sup> /ч | ≥ 12                    |

### 1.7.2. Комплектация прибора NANON-01A

К основным комплектующим прибора NANON-01A, установленного в лаборатории, относятся различные типы коллекторов (осадительных электродов) и прядильных головок (фильер):

- плоский коллектор (см. Рисунок 1.20a), предназначенный для отработки технологии электроспиннинга (оптимизации условий электроспиннинга) и получения малого количества материала (например, для оптической и электронной микроскопии);
- барабанный коллектор  $D = 200$  мм, шириной 200 мм (см. Рисунок 1.20b), предназначен для получения ориентированных и неориентированных волокон. При этом максимальный размер полотна составляет  $200 \times 600$  мм;
- прядильная головка с пружинным зажимом (см. Рисунок 1.20c). Вмещает одновременно три питающих линии (три иглы), что позволяет выпускать одновременно три нити, в том числе, из трёх разных полимеров.
- коаксиальная фильера (см. Рисунок 1.20d). Помимо коаксиальных волокон, позволяет выпускать полые волокна (в этом случае необходимо задействовать только внешний питающий узел).

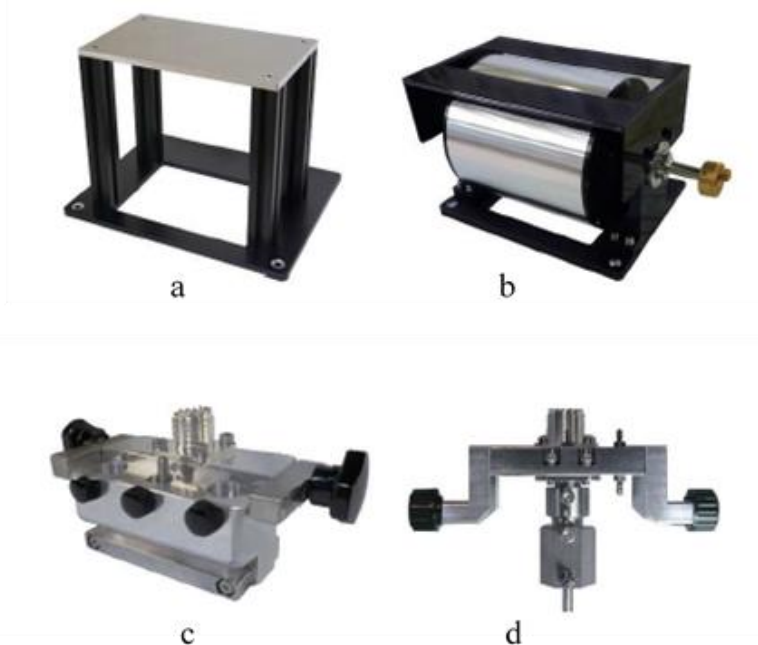


Рисунок 1.20 – Комплектация прибора NANON-01A, где (a) плоский коллектор, (b) барабанный коллектор, (c) фильера с зажимом, (d) коаксиальная фильера

Помимо основных комплектующих, для работы прибора необходимы следующие расходные материалы:

- шприцы типа Luer-lock объёмом 2.5, 5.0 и 10.0 мл (см. Рисунок 1.21). Данные шприцы имеют специальную резьбу, за счёт которой обеспечивается плотное крепление иглы или соединительной тефлоновой трубки к шприцу и предотвращается возможное отсоединение при повышении давления внутри питающей системы;

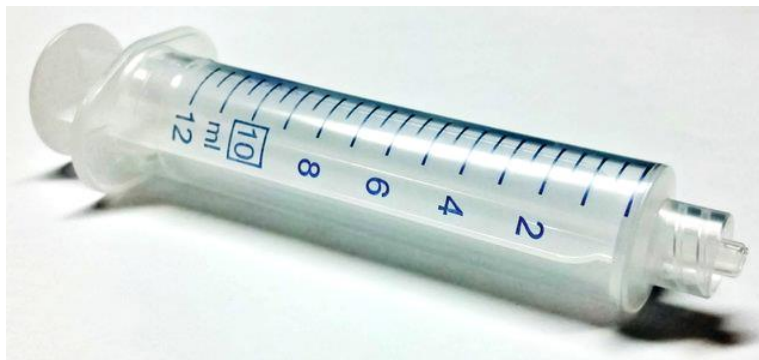











Рисунок 1.21 – Шприц типа Luer-lock

- дозирующие иглы с тупым концом (см. Рисунок 1.22). Иглы различаются по наружному диаметру G (шкала Gauge), а также по длине. В Таблице 1.10 приведены характеристики игл в зависимости от значения G.



Рисунок 1.22 – Дозирующие иглы

Таблица 1.10. Номенклатура игл и их основные параметры

| Калибровочный размер (G) | Номинальный наружный диаметр иглы, мм | Цвет  |
|--------------------------|---------------------------------------|---|
| 30G                      | 0,30                                  |  жёлтый                |
| 29G                      | 0,33                                  |  красный               |
| 28G                      | 0,36                                  |  лазурный              |
| 27G                      | 0,40                                  |  светло-серый          |
| 26G                      | 0,45                                  |  коричневый            |
| 25G                      | 0,50                                  |  оранжевый             |
| 24G                      | 0,55                                  |  светло-фиолетовый     |
| 23G                      | 0,60                                  |  синий                 |
| 22G                      | 0,70                                  |  черный                |
| 21G                      | 0,80                                  |  темно-зелёный         |
| 20G                      | 0,90                                  |  жёлтый                |
| 19G                      | 1,10                                  |  кремовый              |
| 18G                      | 1,20                                  |  розовый               |
| 17G                      | 1,40                                  |  алый                  |
| 16G                      | 1,60                                  |  белый                |
| 15G                      | 1,80                                  |  серо-голубой        |
| 14G                      | 2,10                                  |  бледно-зелёный      |
| 13G                      | 2,40                                  |  пурпурный           |
| 12G                      | 2,70                                  |  голубой             |
| 11G                      | 3,00                                  |  жёлто-зелёный       |
| 10G                      | 3,40                                  |  оливково-коричневый |

- металлический коннектор M-539-055A (см. Рисунок 1.23а). Необходим для соединения дозирующей иглы с соединительной тефлоновой трубкой, а также для передачи напряжения от прядильной каретки к раствору полимера и, соответственно, к игле.



Рисунок 1.23 – Коннекторы: (a) metal connector M-539-055A, (b) Luer-lock connector VRF106

- коннекторы типа Luer-lock VRF106 (см. Рисунок 1.23b). Необходимы для соединения шприца с соединительной трубкой, а также соединительной трубки с металлическим коннектором. Один из самых хрупких элементов системы – при присоединении тефлоновой трубки узкая часть коннектора может деформироваться. Для предотвращения деформации рекомендуется перед присоединением тефлоновой трубки слегка её разогреть над пламенем горелки (зажигалки и т. п.);
- соединительная тефлоновая трубка. Предназначена для передачи прядильного раствора полимера от шприца к фильере. Рекомендуется слегка разогреть концы трубки над пламенем горелки перед соединением с коннектором VRF106. Также рекомендуется, по возможности, использовать более гибкую трубку.
- верёвка для системы очистки иглы. Натягивается между направляющими и регулируется таким образом, чтобы очищать только кончик иглы без сильного воздействия на саму иглу;
- угольный фильтр перед системой отведения воздуха из камеры. Абсорбирует органические растворители и предотвращает попадание их паров из камеры прибора в атмосферу лаборатории.

## **Глава 1.8. Экспериментальная часть**

### **1.8.1. Получение микрочастиц на основе гиалуроновой кислоты**

Для получения частиц на основе ГК необходимо приготовить три раствора с концентрацией биополимера в пределах от 0,20 до 1,30 мас.% с равным шагом (например, 0,20; 0,40 и 0,60; или 0,30; 0,70 и 1,10 и т.п.). Растворы готовят на магнитной мешалке при температуре не более 50 °С путём постепенного добавления навески ГК в необходимый объём воды. После добавления всей навески полимера продолжить перемешивание до полного его растворения (в случае использования концентраций полимера более 1,0 мас.% рекомендуется перемешивать раствор не менее 24 ч для предотвращения закупорки питающей системы NANON-01A нерастворенными кусочками полимера).

Для удобства приготовления растворов и дальнейшего их переноса в питающую систему прибора NANON-01A рекомендуется готовить растворы объёмом 20-40 мл.

В случае использования добавок в виде гидрофильных БАВ последние необходимо предварительно растворить в воде, и только после их полного растворения при постоянном перемешивании вводить в раствор ГК. В случае использования гидрофобных БАВ необходимо



использовать растворы, содержащие дистиллированную воду и апротонный растворитель (ДМСО, ДМФА) в объёмном соотношении 50:50. При этом раствор готовится следующим образом: отдельно в органическом растворителе растворяется БАВ, отдельно растворяется ГК в воде. После полного растворения к раствору ГК при перемешивании и охлаждении добавляется раствор БАВ. После совмещения растворов необходимо продолжить перемешивание до образования однородной смеси.

Полученные растворы оставляют в покое при комнатной температуре на 30-60 минут для стабилизации и деаэрации. После этого растворы по одному переносят в дозирующий шприц и производят электроспреинг при следующих технологических параметрах:

- напряжение 30 кВ;
- скорость подачи 1,0 мл/ч;
- стальные иглы типоразмера 27G;
- плоский стальной коллектор 150×200 мм;
- расстояние между иглой и коллектором 150 мм;
- скорость перемещения прядильного узла 50 мм/с.

**Не допускается самостоятельная работа студентов на установке электроспиннинга NANON-01A!**

Электроспреинг производится на предметные стёкла размерами 25×75×1 мм и кремниевые пластинки размером 10×10 мм в течение 10 минут. После окончания процесса электрораспыления образцы оставляют в камере прибора ещё на 10 минут для удаления неиспарившихся растворителей. После сушки образцы необходимо поместить в кейс с крышкой для дальнейшего анализа методом микроскопии (оптической с интерференционным контрастированием или сканирующей электронной).

### **1.8.2. Получение микрофотографий, их цифровая обработка, а также статистическая обработка результатов**

Для оценки морфологических характеристик получаемых полимерных частиц используется два метода: оптическая микроскопия в отражённом свете и сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).

Для получения микроснимков методом оптической микроскопии в отражённом свете применяется микроскоп Olympus STM6. Учитывая высокую степень прозрачности частиц на основе ГК, необходимо применять метод дифференциально-интерференционного контрастирования.

Сканирующая электронная микроскопия производится с помощью сканирующего электронного микроскопа MERLIN Carl Zeiss. Использование данного метода является предпочтительным.



Вне зависимости от применяемого метода необходимо для каждого образца сделать серию снимков (5-8 микрофотографий) для корректного проведения последующей статистической обработки.

Цифровую обработку и определение размеров частиц производят с помощью программы ImageJ, National Institutes of Health [25]. Данная программа позволяет отображать, редактировать, анализировать, обрабатывать, сохранять и печатать изображения с различной степенью цветности. Программа распознаёт наиболее распространённые форматы изображений: TIFF, PNG, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS, а также RAW (формат без сжатия и потери качества). Помимо этого, ImageJ поддерживает серии изображений, которые объединены в одном окне.

В ImageJ можно вычислять площади, статистические показатели пиксельных значений различных областей.

Программа может измерять расстояния, углы, диаметры. Она может создавать гистограммы плотности и прорисовывать профили линий.

ImageJ поддерживает стандартные функции обработки изображений: логические и арифметические операции между изображениями, манипуляции с контрастностью и яркостью, свертки, Фурье-анализ, повышение резкости, сглаживание, обнаружение границ и медианный фильтр.

Программа позволяет производить различные геометрические преобразования: масштабирование, поворот и отражение.

Помимо этого, новые версии программы обладают способностью самостоятельно определять число и характеристики контрастных областей (клеток, частиц и т. д.).

Программа легка в использовании, не требует наличия мощного аппаратного обеспечения и может быть рекомендована для проведения лабораторных работ для студентов.

Общий вид интерфейса программы представлен на Рисунке 1.24.

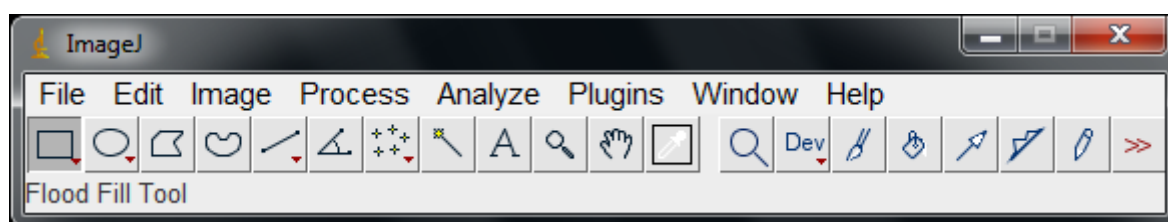


Рисунок 1.24 – Интерфейс программы ImageJ

Для начала цифровой обработки необходимо открыть изображение (File → Open), или перетащить файл непосредственно в главное окно программы. При этом будет открыто отдельное окно с изображением (см. Рисунок 1.25).

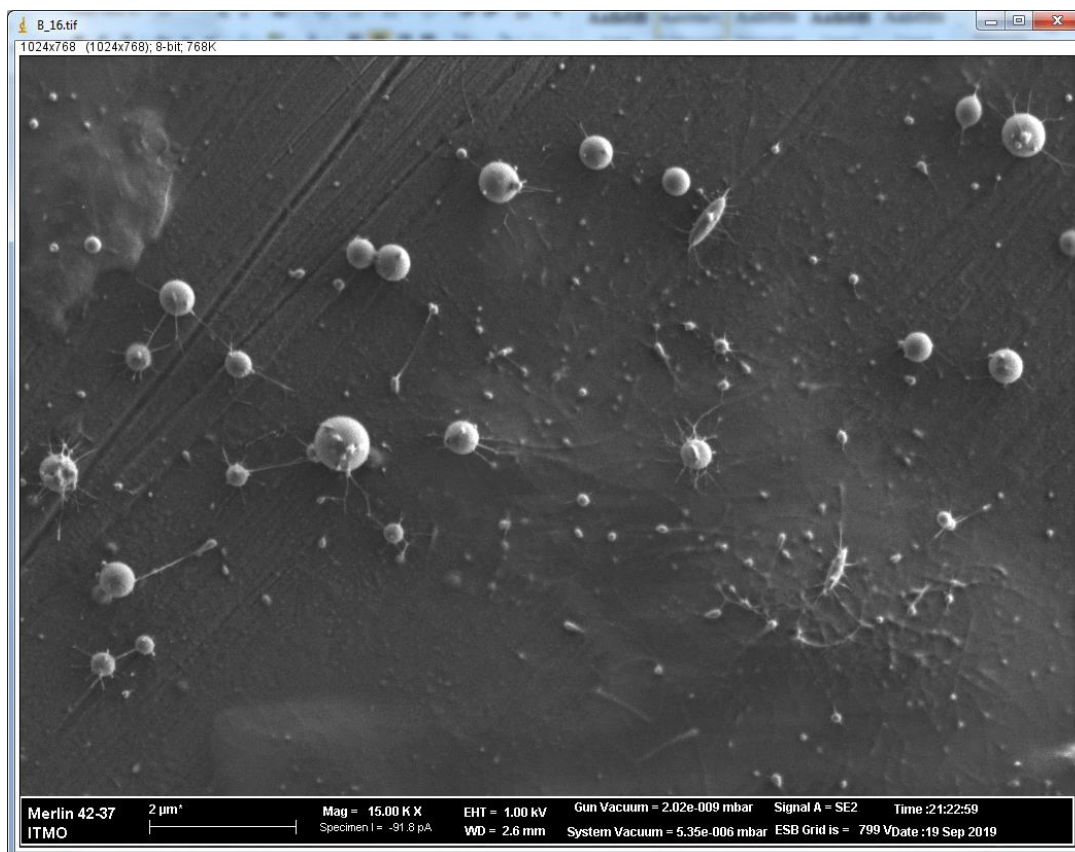


Рисунок 1.25 – Открытое окно с графическим изображением

До начала измерения диаметров частиц необходимо задать масштаб. Для этого выбирают инструмент \*Straight\* (см. Рисунок 1.26).

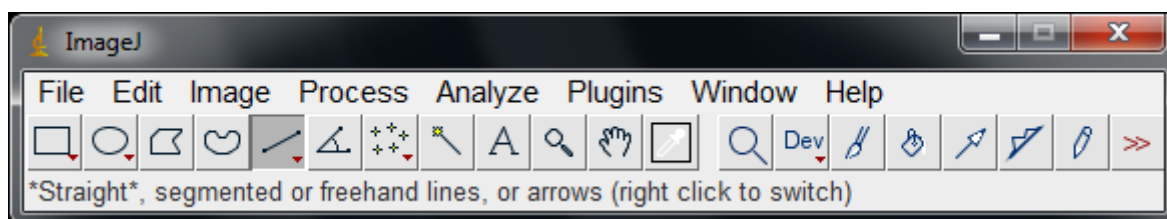


Рисунок 1.26 – Выбор инструмента \*Straight\*

После этого переходят на окно с микрофотографией и проводят линию, соответствующую масштабной линейке изображения (Рисунок 1.27).

После произведённых действий можно задать масштаб изображения: Analyze → Set Scale. В появившемся окне (Рисунок 1.28) в поле “Known distance” вводят значение масштаба (только цифру, в примере это 2), а в поле “Unit of length” – единицу измерения (в приведённом примере – “um”).

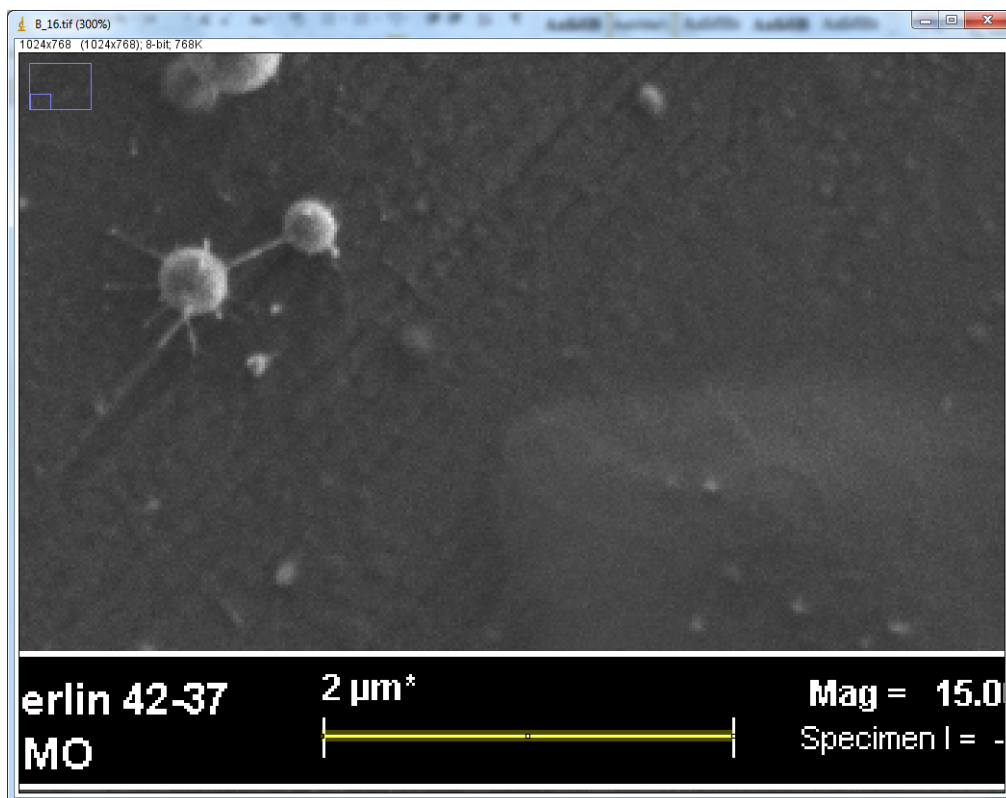


Рисунок 1.27 – Линия, соответствующая масштабной линейке изображения

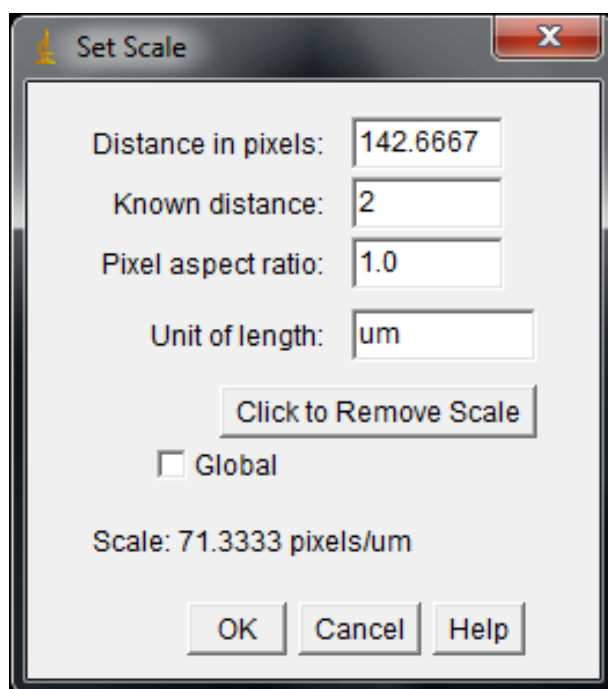


Рисунок 1.28 – Окно выставления масштаба с заполненными полями

После установления масштаба выбирают инструмент \*Oval\* (Рисунок 1.29), в разделе "Analyze", подпункте "Set Measurements..." задают измеряемый параметр "Fit Ellipse" (Рисунок 1.30), после чего

производят измерение каждой частицы в отдельности путём «подгонки» эллипса под размеры каждой частицы (Рисунок 1.31), а затем нажимают на клавишу клавиатуры “M” (Measure). После первого измерения появляется таблица с результатами (“Results”, Рисунок 1.32), данные из которой после измерения необходимо сохранить для последующей статистической обработки.

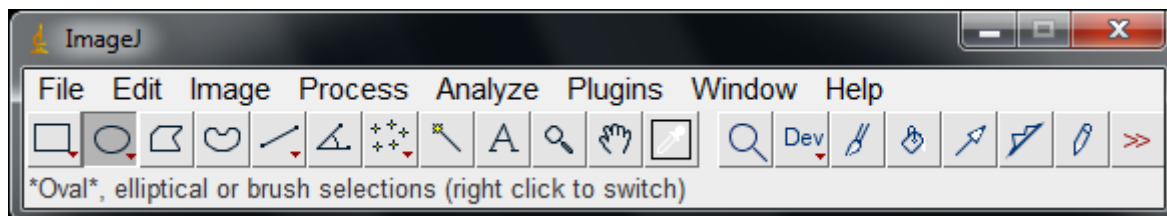


Рисунок 1.29 – Выбор инструмента \*Oval\*

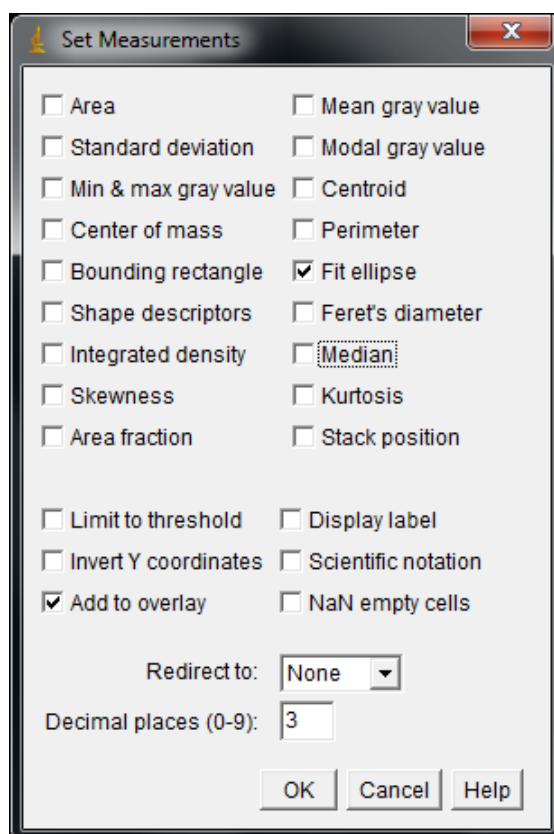


Рисунок 1.30 – Выбор параметров измерения

Для получения корректной статистики для каждого образца необходимо произвести не менее 100 измерений в каждой серии образцов. Для более точного анализа необходимо усреднить полученные минимальные (Minor) и максимальные (Major) значения размеров эллипса.

После получения массива данных их необходимо обработать с помощью любой программы. Рекомендуется использовать пакет OriginPro компании OriginLab.

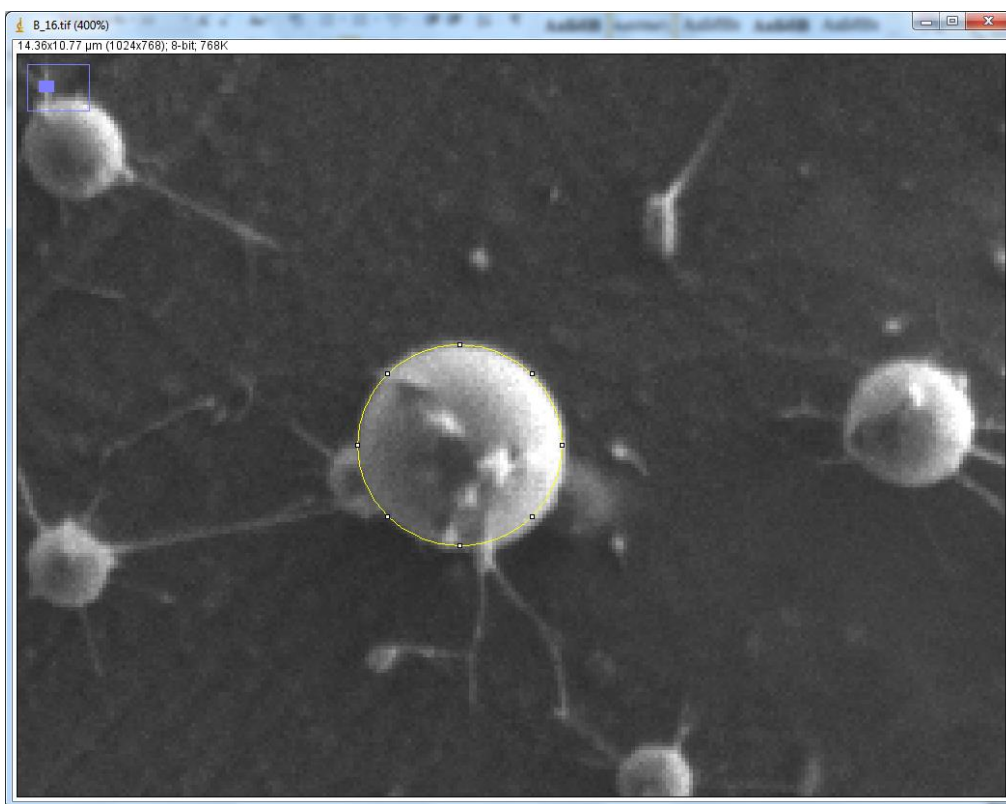


Рисунок 1.31 – «Подгонка» эллипса под размеры каждой частицы

A screenshot of the 'Results' window in OriginPro. It contains a table with the following data:

|   | Major | Minor | Angle |
|---|-------|-------|-------|
| 1 | 0.744 | 0.730 | 0     |

Рисунок 1.32 – Таблица с результатами измерений, появляющаяся после первого измерения

Примеры микрофотографий, полученных с использованием оптического микроскопа, а также гистограммы распределения приведены на Рисунках 1.33 – 1.35.



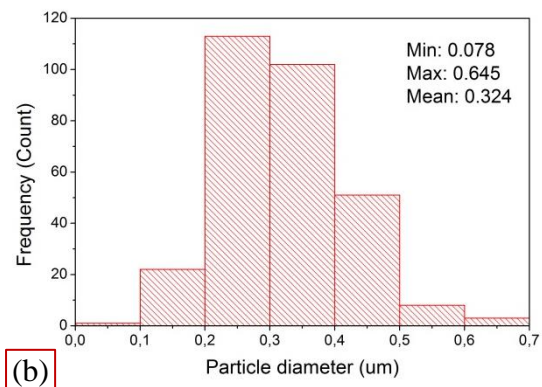
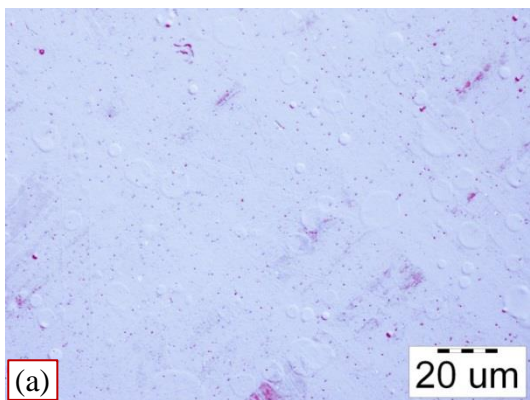


Рисунок 1.33 – Микрофотография (а) и гистограмма распределения диаметров частиц (b), полученных из раствора с концентрацией полимера 0.5%

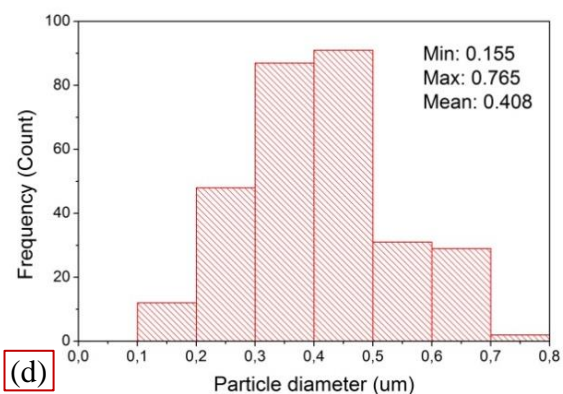
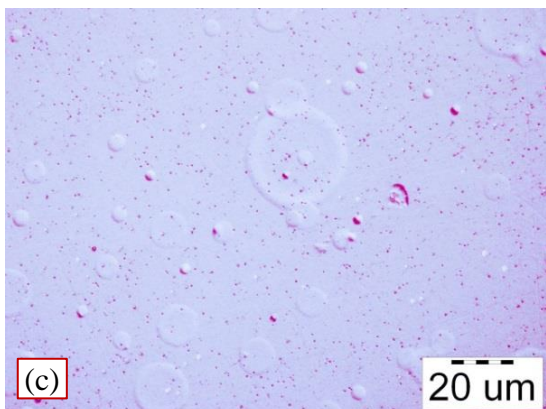


Рисунок 1.34 – Микрофотография (с) и гистограмма распределения диаметров частиц (d), полученных из раствора с концентрацией полимера 1.0%

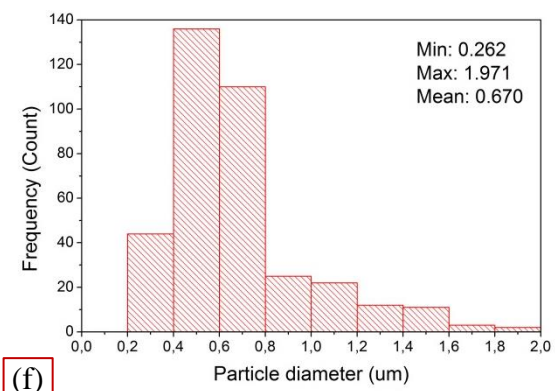
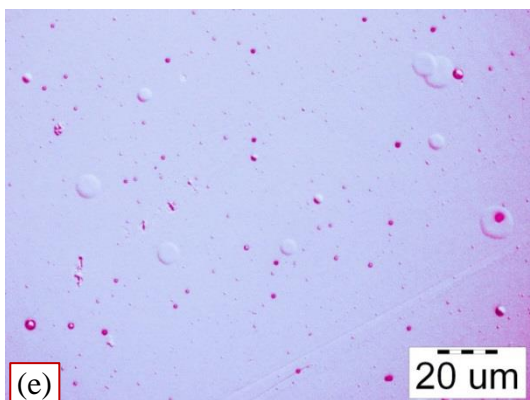


Рисунок 1.35 – Микрофотография (е) и гистограмма распределения диаметров частиц (d), полученных из раствора с концентрацией полимера 1.5%

Примеры микрофотографий, полученных с использованием СЭМ, а также соответствующие гистограммы распределения приведены на Рисунках 1.36 – 1.38. Отметим, что статистический анализ произведён с использованием серии фотографий.

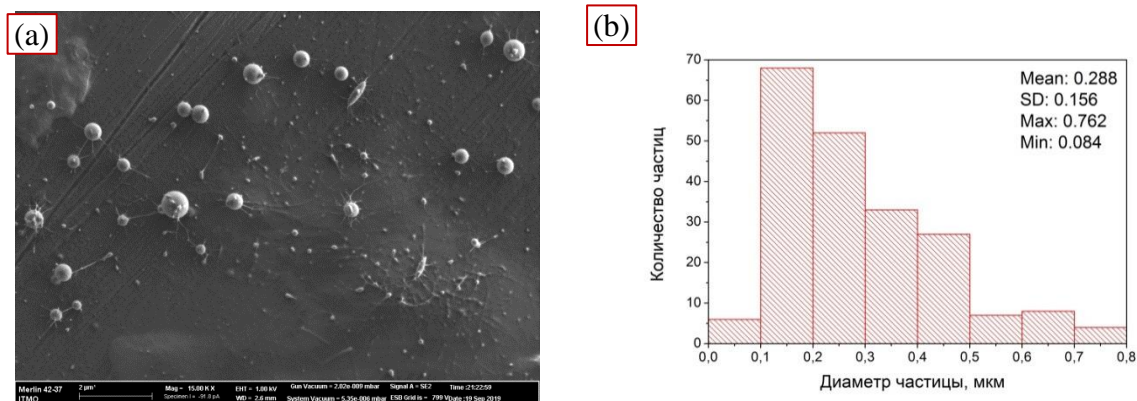


Рисунок 1.36 – Микрофотография (a) и гистограмма распределения диаметров частиц (b), полученных из раствора с концентрацией ГК 0.5%

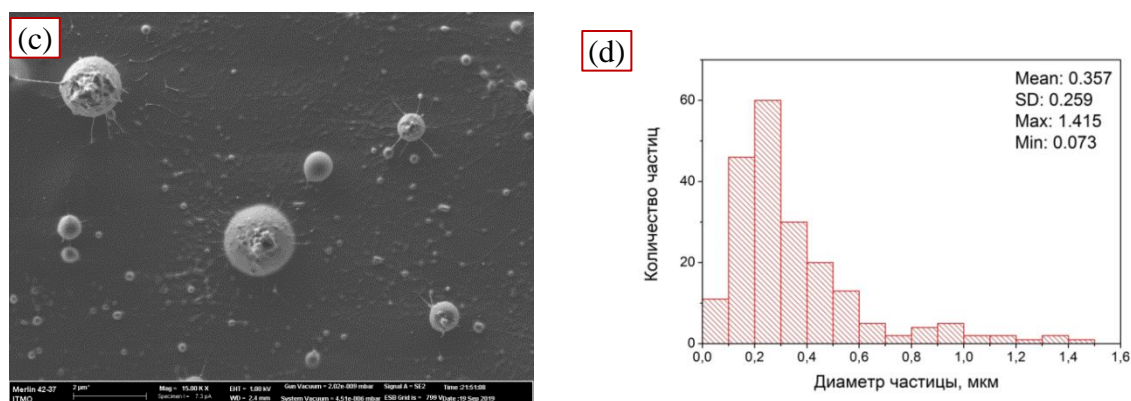


Рисунок 1.37 – Микрофотография (c) и гистограмма распределения диаметров частиц (d), полученных из раствора с концентрацией ГК 1.0%

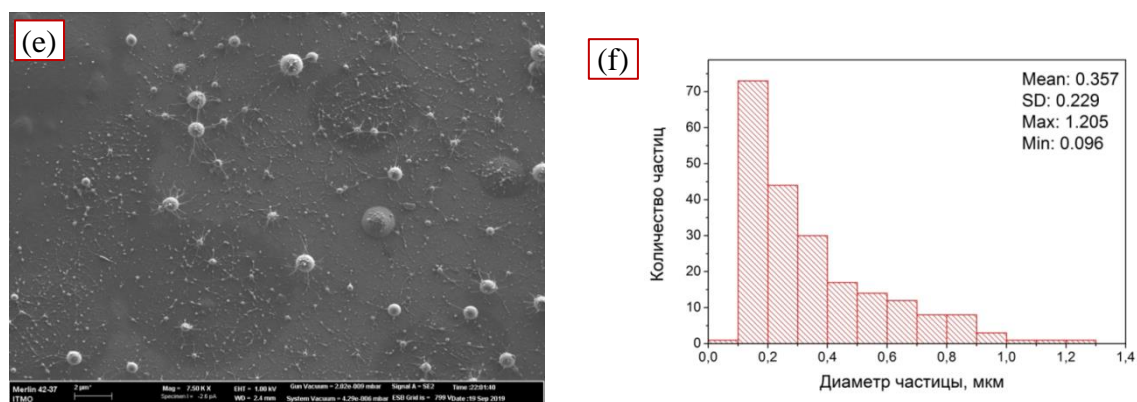


Рисунок 1.38 – Микрофотография (e) и гистограмма распределения диаметров частиц (d), полученных из раствора с концентрацией ГК 1.5%

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Из остатков каких сахаридов состоит составное повторяющееся звено ГК?
2. Между какими функциональными группами ГК возможно образование водородных связей? Какую роль могут выполнять молекулы воды при образовании таких связей?
3. Какую форму принимают полимерные цепи ГК в растворе? С чем связано увеличение вязкости раствора при концентрации выше 1.0%?
4. Опишите основные источники получения ГК. Какие их преимущества и недостатки?
5. Опишите два основных механизма деструкции (деполимеризации) ГК. Какие конечные продукты образуются в результате полной деполимеризации?
6. Для чего необходимо применять сшивку ГК?
7. Опишите, по каким функциональным группам ГК можно проводить сшивку.
8. Можно ли, используя один и тот же сшивающий агент (кросс-линкер) производить реакции по разным функциональным группам? За счёт чего?
9. Опишите схематично процесс электрогидродинамического распыления жидкости.
10. Какие параметры и как они влияют на процесс электроформования и характеристики получаемых полимерных структур (нановолокон и наночастиц)?
11. Опишите причины, по которым электроформование волокон и частиц из растворов ГК затруднено.

### **ЧАСТЬ 2. Биологически активные соединения растительного происхождения: выделение, свойства и некоторые методы их инкапсулирования в полимерные матрицы**

#### **Глава 2.1. Введение**

Современные синтетическая и комбинаторная химия позволяют синтезировать миллионы потенциальных кандидатов биологически активных препаратов в относительно короткие сроки [26]. В сочетании с высокой способностью скрининга потенциальных лекарственных средств обширные библиотеки биологически активных соединений могут быть протестированы в течение достаточно короткого периода времени. Стоит подчеркнуть, что 50% современных фармацевтических препаратов, одобренных в последние годы, являются природными продуктами или их производными.



Кроме того, последняя версия «словаря природных соединений» включает более 293000 соединений, которые обладают биологической активностью и поэтому являются потенциальными кандидатами для широкого спектра терапевтических целей [27].

За последние 30 лет примерно 40% разработанных терапевтических средств, одобренных Управлением по контролю за продуктами питания и лекарствами США (FDA), являются природными продуктами, их производными или их синтетическими имитаторами. По сравнению с обширными синтетическими библиотеками кандидатов лекарственных средств это показывает, что потенциал природных соединений еще далеко не исчерпан сегодня в качестве будущих терапевтических препаратов. При сравнении современного подхода химии природных продуктов комбинаторный подход довольно неэффективен.

Синтез энантиомерно чистых молекул, особенно со многими хиральными центрами, является очень важной и сложной задачей для химиков-синтетиков, поскольку хиральность является ключевым свойством для успешного связывания с целевыми мишенями (рецепторами, ферментами). В результате у природы были миллионы лет, чтобы разработать такие сложные пути создания энантиомерно чистых природных продуктов посредством эволюции.

Общей проблемой при разработке фармацевтических средств являются их потенциально неблагоприятные побочные эффекты, которые обусловлены неселективным действием в организме человека. Они, как правило, хорошо контролируются соблюдением дозировки активного фармацевтического ингредиента (API) и адресной доставкой препарата [28]. Это дало толчок развитию наномедицины, которая фокусируется на целевой доставке лекарственного препарата – загрузка в наносистему, которая улучшает эффективность лечения, а также эффективная концентрация значительно ниже порога токсической дозы для пациентов [29].

## **Глава 2.2. Усниновая кислота**

Важным направлением медицинской химии, позволяющим получать новые, эффективные противоопухолевые препараты, является использование синтетических трансформаций растительных метаболитов. Усниновая кислота (УК) является метаболитом лишайников, она обладает широчайшим спектром биологической активности и привлекает внимание исследователей как потенциальный низкомолекулярный биорегулятор для целого ряда направлений в фармацевтике.

За последние два десятилетия возобновился и растет интерес к лишайникам как источнику новых фармакологически активных

биомолекул. Из сотен известных вторичных метаболитов лишайников производная дибензофурана – УК, без сомнения, наиболее изучена. УК широко распространена у видов *Cladonia* (*Cladoniaceae*), *Usnea* (*Usneaceae*), *Lecanora* (*Lecanoraceae*), *Ramalina* (*Ramalinaceae*), *Evernia*, *Parmelia* (*Parmeliaceae*) и других родов лишайников. Лишайники производят много УК, до 8% от сухого веса таллома. Содержание УК в талломе претерпевает широкие сезонные колебания, достигая максимума в конце весны и начале лета и низкого уровня осенью и зимой. Оно зависит от географического местоположения, коррелирующего со временем летнего солнцестояния, инсоляцией и температурой. Так как *Usnea spp.* синтезирует и выделяет УК в ответ на воздействие окружающей среды, возможно искусственное увеличение содержания УК до 31%.

УК – это вещество с интересными и разнообразными биологическими свойствами. Она обладает антибактериальной, противовирусной, противоопухолевой, фунгицидной, антиоксидантной, инсектицидной и другими активностями. Она влияет на живые организмы, в основном благодаря своим цитотоксическим и антиоксидантным свойствам. Эти эффекты, вероятно всего, определяются различными фрагментами молекулы УК (Рисунок 2.1).

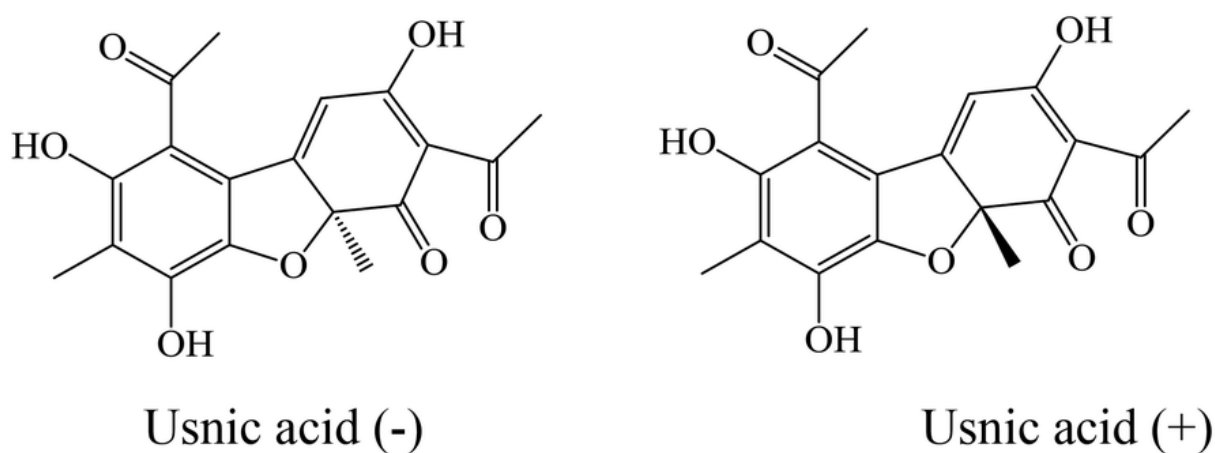


Рисунок 2.1 – Энантиомеры усниновой кислоты

Ранее были проведены расчеты возможных таутомеров и показано, что наиболее вероятно равновесие между тремя таутомерными формами **1a-1c**, из которых наиболее стабилен таутомер **1b** (Рисунок 2.2).

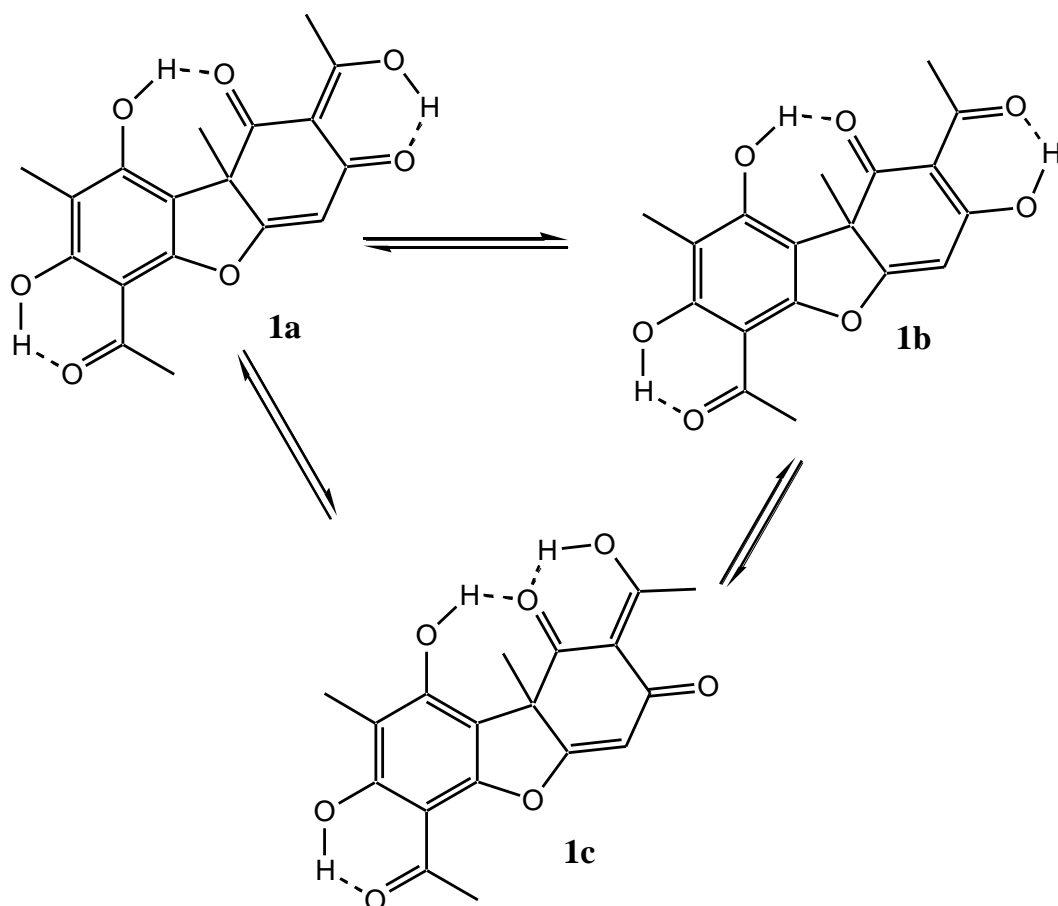


Рисунок 2.2 – Таутомерия усниновой кислоты

Антиоксидантное действие УК связано с фенольным фрагментом, ответственным за гашение свободных радикалов. Считается, что основным механизмом, опосредующим бактерицидное действие УК, является ингибирование окислительного фосфорилирования вследствие разобщающего действия на мембрану, и эта особенность приписывается «трикетонному» фрагменту. Антибактериальная активность УК наиболее выражена в отношении грамположительных микроорганизмов. Более низкая активность по отношению к грамотрицательным видам, по-видимому, связана с более низкой проницаемостью мембран для липофильных молекул УК, поскольку они имеют гидрофильные каналы. Дополнительными факторами являются повреждение клеточной стенки и искажение чувствительности микробного биома.

Не все клеточные эффекты могут быть объяснены мембраноразобщающим действием УК. Существует мало доказательств эффектов УК на уровне молекулярных взаимодействий. Умеренная ингибирующая активность в отношении определенных вирусов, по-видимому, связана со способностью УК подавлять процесс вирусной транскрипции, а антипротозойная активность УК связана с её свойствами как индуктора перекисного окисления липидов.

Проведены исследования, в которых противовоспалительную активность УК сравнивали с активностью ибупрофена с использованием анализа отека лапы крысы (острые эффекты) и теста с хлопковыми шариками (хронические эффекты). Обезболивающий эффект и жаропонижающее действие на гипертермию, вызванную липополисахаридом, которые обеспечивались действием УК, были подтверждены в тестах на мышцах, проведенных Окуяма и коллегами. УК уменьшает сокращение гладкой мускулатуры аорты у крыс и продольной мышцы подвздошной кишки морской свинки, вызванное КС1 и фенилэфрином, на 63–67% для аорты крысы и на 81–85% для морских свинок. Механизм действия, возможно, связан с ингибированием притока ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ) в клетку. Также взаимодействие УК с ионоселективными каналами связано с наблюдаемым уменьшением продолжительности потенциала действия при 50% и 90% реполяризации в тканях желудочка сердца крысы.

Таким образом, исследования указывают на потенциальную антимикробную, противовоспалительную, анальгетическую, антиоксидантную, антипротозойную, противовирусную, ларвицидную и другие активности УК. Два кратких, но обширных обзора опубликованы почти одновременно в 2002 году с изложением того, что было известно о биологическом потенциале УК. Однако в тот же период в некоторых исследованиях сообщалось о токсичности УК для печени. Широкое использование УК в пищевых добавках вызвало несколько случаев интоксикации, и исследования были сосредоточены на её токсичности. В 2008 году Гуо с соавторами опубликовал подробный обзор этой проблемы. Исследования токсичности показали, что УК токсична *in vitro* при низких микромолярных концентрациях. Обработка 5 мкМ УК в течение 16 часов в первичных гепатоцитах мыши приводила к гибели 98% клеток. Подобные механизмы опосредуют цитотоксический и антибактериальный эффекты. Они включают разобщение цепи окислительного фосфорилирования путем искажения мембранного потенциала в эукариотических митохондриях и в грамположительных бактериях, которые не имеют митохондрий, но имеют мезосомы, которые выполняют сходные функции. Токсичность УК обеспечивается трикетоновой частью молекулы, которая ответственна за потерю потенциала митохондрий. Из-за кислотной группы в молекуле УК может диффундировать через митохондриальные мембраны и вызывать утечку протонов. Липофильность УК позволяет ей проникать через мембрану митохондрий путем пассивной диффузии. Недавние исследования механизма токсичности УК показали, что УК вызывает дисрегуляцию клеточного цикла, повреждение ДНК и окислительный стресс.

Более глубокие исследования показали, что токсичность, наблюдаемая в экспериментах с клетками, была гораздо менее выражена в

тестах *in vivo*, и что интоксикация требует длительного приема больших доз УК. Четырнадцатидневные исследования острой токсичности показали, что УК является гепатотоксичным веществом как для крыс, так и для мышей, подвергшихся воздействию в дозах 100 или 200 мг/кг/день, однако более низкие дозы хорошо переносятся. УК поражает в основном «энергоёмкие» органы, вызывая стресс эндоплазматического ретикулума. Показано, что индуцированное УК повреждение клеток происходит, по крайней мере частично, через активацию  $Ca^{2+}$  канала входа кальция. Недавние исследования показали, что тератогенный эффект УК на крысах наблюдается в достаточно высоких дозах (25 мг/кг и более). Также в отношении УК исследователи подтвердили отсутствие генотоксичности при лечении УК в концентрациях до 200 мкг/мл.

Хотя публикация вышеупомянутого исследования привела к строго ограниченному применению УК в качестве фармакологического вещества, УК по-прежнему является привлекательной для исследования факторов, влияющих на ее биологическую активность: ее легко получить, и была доказана ее эффективность *in vitro* и *in vivo*. Неуклонно растёт внимание исследователей к этому соединению, что отражается в значительном количестве работ, посвященных УК, появившимся в последние пять лет, и в серии новых обзоров [30].

Для поиска более безопасных и активных фармакологических аналогов УК были разработаны методы для модификации УК. Это привело к синтезу многих аналогов УК. Производные УК могут использоваться в качестве антибактериальных и ранозаживляющих, противотуберкулезных, противомаларийных, противогриппозных и ферментных агентов, а также для лечения различных видов рака.

Показано, что УК эффективно ингибирует ангиогенез *in vivo* в анализе хориоаллантаисных мембран куриных эмбрионов и на модели ангиогенеза роговицы у мышей, индуцированного эндотелиальным сосудистым фактором роста. В модели опухоли ксенотрансплантата мыши УК подавляла рост опухоли молочной железы Vcap-37 и ангиогенез, не влияя на массу тела мыши. В эксперименте *in vitro* УК не только значительно ингибировала пролиферацию, миграцию и образование эндотелиальных клеток, но и также вызывала морфологические изменения и апоптоз в эндотелиальных клетках.

Энантиомер (+) - УК известен как ингибитор пролиферации опухоли и более цитотоксичен по сравнению с (-) - энантиомером УК [31].

### **2.2.1. Направленная (таргетная) доставка усниновой кислоты**

Плохая растворимость УК в воде препятствует широкому применению УК в качестве многообещающего терапевтического агента, что отражается в отсутствии коммерчески доступных продуктов,

содержащих УК в качестве активного вещества, за исключением редкого количества продуктов для местного применения, содержащих это соединение в качестве активного ингредиента, наряду с несколькими другими видами соединений.

Возобновление интереса к УК в последние годы нашло отражение не только в росте числа публикаций, но и в нескольких обзорных статьях, посвященных ее химическим и биологическим свойствам, ее токсичности, а также ее потенциалу в фармацевтической индустрии. Также существуют обзоры различных способов направленной (таргетной) доставки УК к органам-мишеням, целью которых является описание пути преодоления заявленных недостатков, тем самым увеличивая терапевтический индекс этого лекарства за счет повышения эффективности и/или снижения токсичности. Учитывая растущий научный интерес к разработке нано- и микроразмерных полимерных носителей, особенно в области препаратов на основе природных лекарственных соединений, особый интерес представляют нано- и микрочастицы, содержащие УК [32].

### **2.2.2. Липосомы**

В целом липосомы являются наиболее успешными носителями для таргетной доставки среди всех исследованных наноносителей. Из всех модификаций липосом большинство из них было посвящено пассивному нацеливанию, позволяющему увеличить накопление лекарственного средства в ткани-мишени посредством так называемого эффекта усиленного проникновения и удержания (enhanced permeability and retention - EPR). Кроме того, липосомы исследованы на предмет активного нацеливания, стимулированного реагирования, контролируемого высвобождения, а также на предмет усиления проникновения в клетки и увеличения растворимости малорастворимых в воде лекарств.

УК была включена в липосомы, главным образом для улучшения антимикробной активности (отдельно или в комбинации с антибиотиками), используя обычные или поверхностно-функционализированные липосомы. Позднее липосомы, содержащие УК, также исследованы с целью усиления антиоксидантной активности. Кроме того, липосомы, загруженные УК, включенной в тонкие пленки на полимерной основе, были исследованы в качестве потенциальных повязок на рану.

### **2.2.3. Наноэмульсии**

Наноэмульсии представляют собой термодинамически нестабильные смеси масла и воды, при этом одна из жидкостей диспергируется в другой (вода-в-масле или масло-в-воде), образуя очень маленькие (субмикронные) капли, стабилизированные поверхностно-активным веществом. Таким

образом, наноэмульсии типа «масло в воде» чаще используются в качестве носителей лекарственных средств с целью инкапсулирования липофильных лекарственных средств в водной среде. В последние годы наблюдается растущий интерес к исследованиям наноэмульсий из-за их потенциала высокой растворимости в отношении гидрофобных соединений, защиты нестабильных соединений и улучшенных свойств доставки и проникновения в ткани, связанных с хорошей стабильностью и относительной простотой приготовления.

Эта тема была исследована Мукерджи и др., которые создали наноэмульсии, содержащие УК, диспергированную в коричном масле (соотношение 1:4), которое использовалось в качестве масляной фазы. Наноэмульсии готовили с помощью ультразвукового эмульгирования (на основании предыдущего исследования растворимости смеси коричневого масла и УК); Tween 80 и этанол были выбраны в качестве поверхностно-активного вещества и вспомогательного поверхностно-активного вещества соответственно. Варьировалось соотношение между поверхностно-активным веществом и вспомогательным поверхностно-активным веществом, чтобы получить оптимальный состав наноэмульсии. Таким образом, состав, содержащий 4% коричневого масла, 1% УК, 37% поверхностно-активного вещества: смесь вспомогательных поверхностно-активных веществ и 58% деионизированной воды в качестве фазы, использовался в дальнейших экспериментах на основе самого низкого размера капель ( $96,39 \pm 2,38$  нм) и самого высокого процента пропускания (99,76%) среди исследованных образцов. В исследовании высвобождения УК из наноэмульсии, выполненном с использованием диффузионных ячеек Франца с мембраной из ацетата целлюлозы (среда представляет собой фосфатный буферный раствор с pH 5,5), через 8 ч эксперимента было достигнуто плато высвобожденной УК (93,19%). Наноэмульсия была стабильна в течение шести месяцев наблюдения с определенным изменением размера глобулы, дзета-потенциала и индекса полидисперсности.

#### **2.2.4. Полимерные микро- и наноносители**

Были предприняты попытки инкапсуляции УК в полимерные носители нано- и микроразмера с целью усиления ее противоопухолевой и противовоспалительной активности и/или снижения гепатотоксичности. В меньшем количестве исследований изучалась загрузка УК в несферические наночастицы (нановолокна) или микрочастицы для улучшения антимикробной активности.

Полимерные наночастицы включают наносферы и нанокапсулы. Наносферы – это матричные системы, весь объем которых заполнен полимером и лекарственным веществом, которые либо диспергированы,

либо растворены в этой полимерной матрице, либо адсорбированы на поверхности наносферы. С другой стороны, нанокapsулы представляют собой систему ядро-оболочка, состоящую из масляной или водной сердцевины, окруженной полимерной мембраной, в которой лекарственный субстрат находится либо в ядре, либо в оболочке нанокapsулы.

В двух исследованиях большая липофильность УК преодолена путем инкапсуляции в масляную полость полимерных нанокapsул в качестве стратегии повышения ее растворимости, клеточного поглощения и противоопухолевой эффективности. Поэтому нанокapsулы готовили с полилактид-со-гликолидом (PLGA 50:50), соевым маслом в качестве масляного ядра и соевым фосфатидилхолином и полоксамером F68 в качестве поверхностно-активных веществ путем межфазного осаждения предварительно сформированного полимера на поверхности эмульсии с последующей лиофилизацией. Таким образом, нанокapsулы PLGA (средний диаметр =  $324 \pm 88$  нм), содержащие УК (1,0 мг/мл), получены с соотношением лекарственное средство : полимер 1:15 и соотношением лекарственное средство : масло 1:10. Содержание УК ( $101,7 \pm 1,7\%$ ) и эффективность инкапсуляции ( $99,4 \pm 0,2\%$ ) определяли с помощью ВЭЖХ, которая также использовалась для долговременного исследования стабильности, показывающего снижение содержания УК ( $77,0 \pm 3,6\%$ ) через 36 месяцев хранения при  $4^\circ\text{C}$ . Профиль высвобождения УК из нанокapsул PLGA *in vitro*, оцененный с использованием метода диализа, выявил начальный выброс  $15,1 \pm 0,1\%$  (при-писанный фракции лекарственного средства, адсорбированной на поверхности частиц) с последующим медленным и постепенным выделением, достигающим  $78,30 \pm 0,08\%$  от общего содержания УК в нанокapsулах, оставляя около 20% захваченного лекарственного средства в качестве типичной особенности этих наносистем ядро-оболочка.

УК была впервые включена в микросферы PLGA в исследовании Рибейро-Коста и соавторов в попытке максимизировать терапевтическую активность при уменьшении побочных эффектов этого проверенного противоракового препарата [33]. На основании исследования предварительной рецептуры микросферы PLGA (лекарственное средство: полимер = 1:45) получали методом двойной эмульсии с добавлением полиэтиленгликоля (PEG) и поливинилового спирта (PVA) в качестве стабилизатора с последующей лиофилизацией. Это позволило получить микросферы размером  $7,02 \pm 2,74$  мкм с высокой эффективностью улавливания (около 100%) и приемлемыми уровнями содержания УК (90%) в течение 7 месяцев хранения при  $4^\circ\text{C}$ . Выделение УК *in vitro* из PLGA-микросфер выявило типичный бимодальный паттерн (первоначальный взрывной эффект с последующим постепенным выделением УК, достигающим  $92,0\% \pm 0,04\%$  в течение 5 дней).



Инкапсуляция УК по сравнению с ее свободной формой не вызывала значительных различий в анализе цитотоксичности *in vitro* в клеточной линии эпидермоидной карциномы гортани (HEp-2), тогда как значения IC<sub>50</sub> ненагруженной и загруженной микросферой УК были одинаковыми. Однако внутрибрюшинное введение инкапсулированной УК способствовало увеличению активности ингибирования опухоли (21% по сравнению со свободной УК) у мышей против опухолей саркомы-180. Кроме того, гистопатологический анализ опухолей и печени умерщвленных животных выявил обширный некроз после лечения свободной, но не капсулированной УК. Исследование *in vivo* показали, что инкапсуляция УК в микросферы PLGA сводит к минимуму ее гепатотоксический потенциал во время беременности. Сравнивая результаты исследования Рибейро-Коста с соавторами (2004) к ранее обсужденным выводам о нанокапсулах PLGA, нагруженных УК, принимая во внимание одну и ту же экспериментальную установку в обоих исследованиях, можно сделать вывод, что инкапсуляция в наноносители может считаться более эффективной, чем инкапсуляция в микроносители, в усилении противоопухолевой активности этого препарата. Такое открытие может быть связано с более быстрым проникновением нанокапсул (<200 нм), чем микросфер (7 мкм), в опухолевую ткань, подчеркивая важность размера частиц для биодоступности УК [33].

### 2.2.5. Получение усниновой кислоты

#### Экстракция из лишайников

Лишайники – это группа низших растений, образованных симбиозом гриба (микобионт) или водоросли или цианобактерии (фитобионт). Лишайники могут существовать даже в самых неблагоприятных условиях, благодаря их симбиотической природе они могут получать питание из осадков, частиц пыли, туманов, из почвы. С помощью грибницы лишайники получают воду и минеральные вещества из почвы, а водоросли продуцируют органические вещества посредством фотосинтеза. Таким образом, для лишайников характерны оба типа питания – и автотрофное, и гетеротрофное. Благодаря этим особенностям данная группа растений широко распространена и встречается практически повсеместно.

Лишайники известны разнообразием вторичных метаболитов, которые зачастую называют лишайниковыми веществами, которые производит только микобионт. УК – это наиболее известный метаболит лишайника, который продуцируется в *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia*, *Parmelia* и у других родов. УК обеспечивает лишайникам защиту от микробных инфекций, ультрафиолетового излучения и высыхания. УК была впервые выделена из *Ramalina* и *Usnea* в 1843 г, годом позже была

охарактеризована как индивидуальное вещество, и только через девять десятилетий было установлено ее химическое строение.

К традиционным методам выделения биологически активных веществ из сырья растительного происхождения относится экстракция органическими растворителями. Экстракционные методы делятся на статические – настаивание (мацерация) и динамические с постоянной фильтрацией экстрагента через сырье (перколяция). Для экстракции лишайников используют различные растворители: этанол, ацетон, гексан, петролейный эфир, хлороформ или смеси органических растворителей. Эти методы просты в исполнении, но имеют большой ряд недостатков: большой расход растворителей, повышенное содержание примесей в экстракте, высокая токсичность экстрагентов. Классическая экстракция до сих пор находит применение, особенно в модифицированном виде. Например, с использованием сверхвысокочастотного излучения (СВЧ).

Помимо традиционных методов, используются более современные методы, к таким относится экстракция субкритическими растворителями, сверхкритическая флюидная экстракция и ускоренная экстракция жидкими растворителями. Данные методы позволяют выделять целевые вещества из растительного сырья, не приводя к их разрушению.

Ранее был проведен сравнительный анализ различных методов экстракции УК из лишайников, в качестве основной сравнительной характеристики был использован выход УК. Объектом исследования являлись лишайники из рода *Cladonia stellaris*. Данный лишайник произрастает на субарктической территории России, а образцы для исследования были собраны на острове Русский Кузов в Белом море.

Исходя из литературных данных, современные методы экстракции намного более эффективны в сравнении с традиционными.

Экстракция с помощью мацерации в течение 30 минут приводила к выходу от массы сухого лишайника – всего 0,27% (экстрагент – этанол). При использовании аппарата Соклслета выход УК в этаноле составил 0,09%, в ацетоне – 0,20%, а в хлороформе достигал 0,31% при продолжительности перколяции 30-60 минут. Это можно объяснить тем, что при традиционных методах экстракции растительная клетка не разрушается.

При экстракции этиловым спиртом с использованием СВЧ-поля с удельной мощностью 350 Вт/ч в течение 10 минут выход УК составил 1,36% от массы сухого сырья. Однако продолжительность СВЧ-экстракции находится не в прямой зависимости с выходом целевого продукта, это можно видеть на Рисунке 2.3.

Метод ускоренной экстракции показал отличные результаты, при использовании ацетона и этанола выход УК достигал 2,77-2,82%. На рисунке показана диаграмма зависимости выхода УК от используемого растворителя и температуры ускоренной экстракции (Рисунок 2.4).

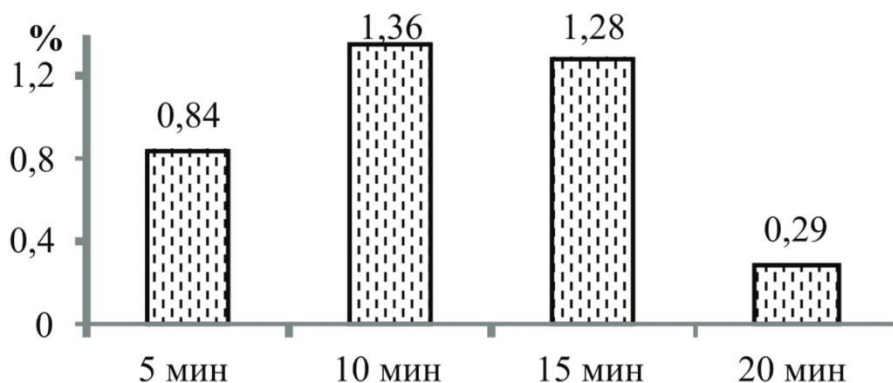


Рисунок 2.3 – Выход УК при изменении времени СВЧ-экстракции

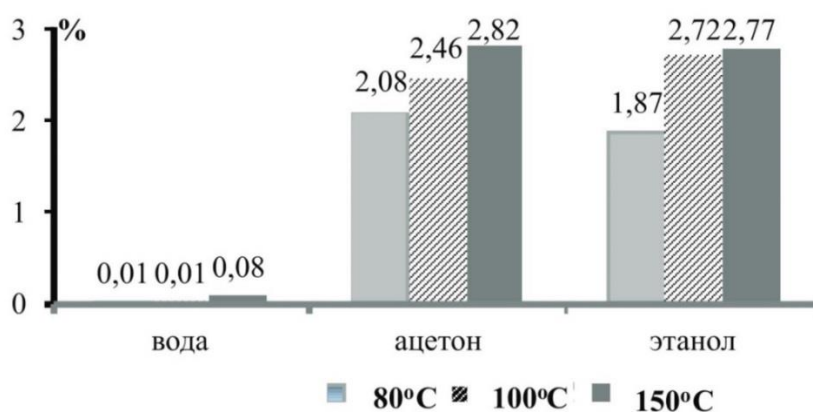


Рисунок 2.4 – Зависимость выхода УК от температуры и экстрагента

Исключительный результат показала сверхкритическая экстракция диоксидом углерода. Получаемый экстракт содержал 90-100% УК, а ее выход от массы лишайника составлял до 2,39% при давлении в 35 МПа при 80°C, понижение давления и температуры ведет к уменьшению выхода целевого вещества. Таким образом, современные методы экстракции показывают очень хорошие результаты, которые во многом превосходят традиционные.

#### Химические методы получения УК

Химические методы синтеза не находят широкого практического применения, так как являются экономически нецелесообразными. Ниже приведены несколько схем, исходя из которых понятно, что экстракция из лишайников, которые являются очень доступным сырьем, имеет намного больше преимуществ перед трудоемким синтезом.

УК может быть получена в две стадии с помощью окислительного сочетания соединения **1** под действием ферроцианида калия, образующееся соединение **2** обрабатывали концентрированной серной кислотой и получали целевое соединение с выходом всего 2% (**3**) (Рисунок 2.5).

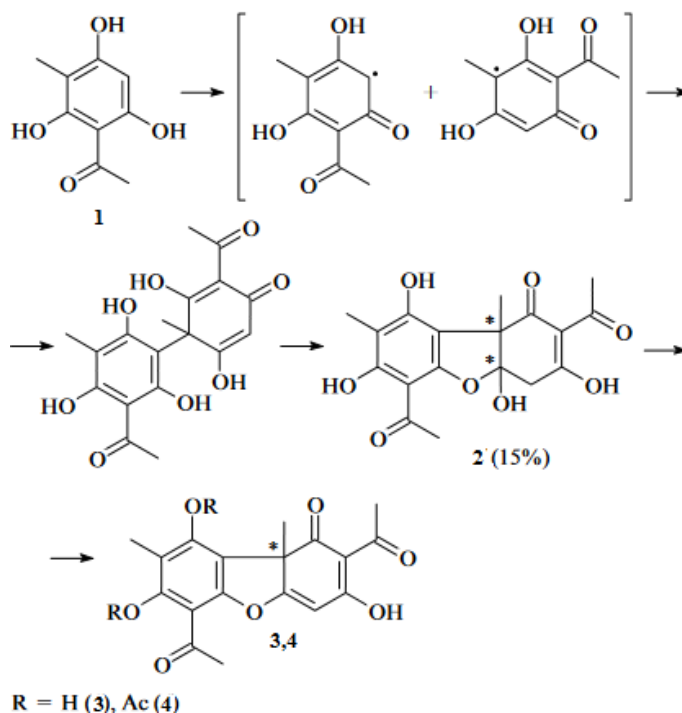


Рисунок 2.5 – Синтез УК

В исследовании [34] рассматривается хемоферментативный синтез УК. Исходным соединением является 2,4,6-тригидроксиацетофенон, который является коммерчески доступным реагентом. На первой стадии происходит метилирование соединения **5** с получением 3-метил-2,4,6-тригидроксиацетофенона (**2**) с выходом 45%. Затем продукт подвергают воздействию пероксидазы хрена и пероксида водорода. В результате образуется гидратированная УК **3** с выходом 40%. Если на стадии воздействия пероксидазы хрена и перекиси добавить уксусный ангидрид и серную кислоту, то в смеси продуктов обнаруживается УК, однако авторами работы не заостряется внимание на оптической активности полученных соединений и выходе УК (Рисунок 2.6).

Как видно из приведенных выше данных, химические методы получения УК являются дорогостоящим, трудоемким процессом с низким выходом целевого соединения. Именно поэтому имеется мало исследований, посвященных данным методам, а те, которые имеются, представляют в большей степени научный интерес и не находят практического применения.

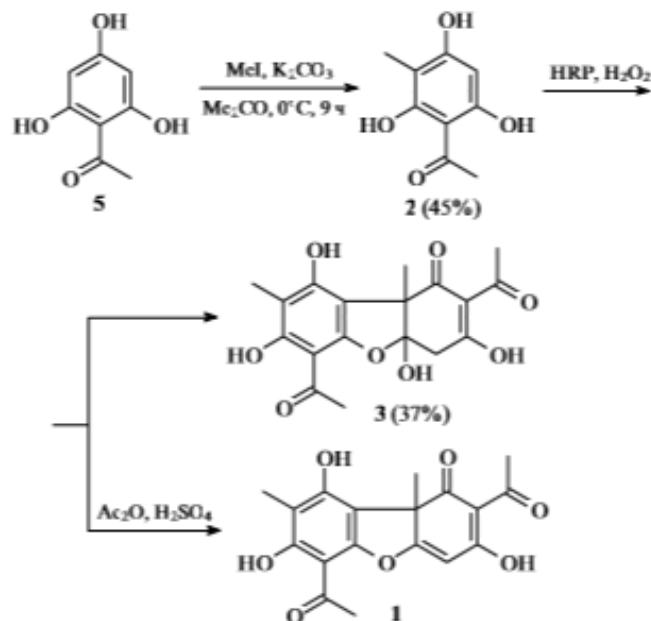


Рисунок 2.6 – Хемоферментативный синтез УК

### Глава 2.3. Мангиферин

Одним из наиболее широко встречающихся гликозилксантонов, который приобретает всё большую популярность, является мангиферин. Мангиферин – это полифенольный С-гликозид, который в основном получают из коры стебля, листьев и плодов дерева манго (*Mangifera indica* из семейства *Anacardiaceae*). Мангиферин привлек внимание ученых со всего мира благодаря своим многочисленным фармакологическим свойствам: помимо того, что мангиферин действует как антиоксидант, он также обладает противовирусным, иммуномодулирующим, противовоспалительным, обезболивающим, противодиабетическим и многими другими свойствами. Известна способность мангиферина ингибировать раковые клетки, вызывая апоптоз. На различных моделях животных показано, что мангиферин может действовать как мощный антиоксидант, который уменьшает количество свободных радикалов, которые предотвращают возможное повреждение ДНК. На данный момент мангиферин находится на стадии доклинических исследований и должен пройти ряд клинических исследований в недалеком будущем. Благодаря легкодоступности и многочисленной фармакологической активности мангиферин привлек интерес многочисленных исследователей к разработке эффективных методов выделения и экстракции мангиферина, которые могли бы привести к его максимальному выходу. Главным источником мангиферина служит манговое дерево, которое в природе встречается в изобилии.

Несмотря на то, что на рынке постоянно появляются различные противоопухолевые препараты, которые являются частью различных систем доставки, каждое из них связано с жизненно важными проблемами низкой биодоступности, высокой стоимости и связанных с ними нежелательных побочных эффектов. Антиоксиданты привлекли внимание исследователей к их химиопрофилактическому применению против рака. На протяжении многих десятилетий раковые заболевания поражают человечество. Основными мишенями этого разрушительного заболевания являются такие важные органы как, печень, легкие, толстая кишка, грудная клетка, пищевод, простата и желудок. Окислительный процесс – это ключевой процесс, который значительно усугубляет рак. Для борьбы с этой смертельной болезнью проведено огромное количество исследований. По сути, антиоксиданты обладают одним из важных свойств, а именно, способностью удалять свободные радикалы, прерывая окислительные цепные реакции.

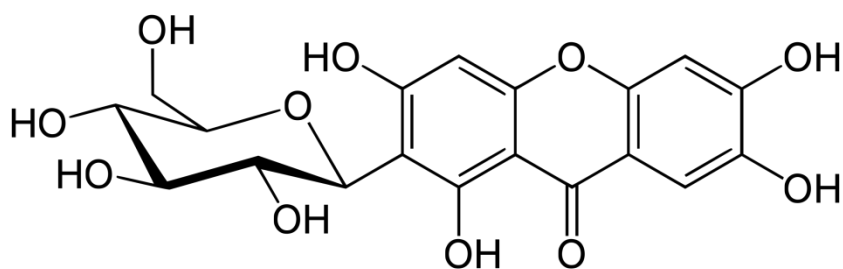


Рисунок 2.7 – Химическая структура мангиферина

Мангиферин (Рисунок 2.7) представляет собой природный С-гликозид ксантон [2-С-β-D-глюкопиранозил-1,3,6,7-тетрагидро-ксантон] с молекулярной формулой  $C_{19}H_{18}O_{11}$  (Mw 422,35) и температурой плавления  $271^{\circ}C$ . Данное соединение содержится в различных частях растения рода *M. indica*: плод, кора ствола, листья, сердцевина и корни дерева. Мангиферин также содержится среди различных семейств папоротников и покрытосеменных и широко распространен в семействах Gentianaceae и Anacardiaceae, а особенно, в коре и листьях.

Агликоновая часть представляет собой фенольное соединение, которое формируется из двух различных способов ароматизации, а именно шикимате (атомы углерода  $C_{4b}$ ,  $C_5$ ,  $C_6$ ,  $C_7$ ,  $C_8$ ,  $C_{8a}$ ) и кетат (атомы углерода  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_{4a}$ ,  $C_{8b}$ ) соответственно.

Ксантоны – это известные природные компоненты микроорганизмов и растений, которые были досконально изучены на предмет их антиоксидантных, противовоспалительных и противоопухолевых свойств. Как известно, структура мангиферина удовлетворяет всем четырём

требованиям Липинского, которые, как известно, способствуют высокой биодоступности при пероральном введении: молекулярная масса менее 500 Дальтон, имеет менее 5 донорных функций для водородных связей и менее 10 акцепторных функций для водородных связей, а также благоприятный коэффициент распределения октанол/вода ( $\log P$  мангиферин: +2,73).

#### Биологическая активность мангиферина

Несмотря на то, что мангиферин обладает ярко выраженным терапевтическим эффектом, большую часть его биологических свойств еще только предстоит изучить. Мангиферин характеризуют как соединение, которое обладает сильными иммуномодулирующими свойствами и ингибирует рост опухоли как на ранних, так и поздних стадиях. Также он может противодействовать свободным радикалам при различных заболеваниях. Например, сообщалось о том, что мангиферин обладает сильными антигенотоксичными и цитопротекторными свойствами в клетках НерG<sub>2</sub> против CdCl<sub>2</sub>-индуцированной токсичности, что объясняется уменьшением уровня активных форм кислорода. Также известно, что листья мангового дерева полезны при диабете. Мангиферин может улучшить функцию почек и подавить прогрессирование диабетической нефропатии. Lemus Molina et al. показали, что экстракт мангиферина является эффективным нейропротектором при эксцитотоксической гибели нейронов, что говорит о наличии терапевтического потенциала для профилактики нейродегенеративных расстройств.

#### Мангиферин-содержащие полимерные системы

Для разработки транспортных полимерных систем для мангиферина было использовано несколько методов, включая метод распылительной сушки, простое испарение растворителя, испарение эмульсионного растворителя, сверхкритические антирастворительные губки, тонкопленочное зондирование, наноэмульсию и золь-гель синтез.

В 2013 году Хосе Роберто R.de Souza и др. опубликовали исследование распылительной сушки упаковки мангиферина в различных полисахаридных полимерных материалах, включая лимонный пектин, тыквенный пектин и хитозан.

Чтобы улучшить растворимость и проницаемость мангиферина путем создания фосфолипидного комплекса, Nequn Ma et al., 2014, сообщили об увеличении пероральной биодоступности мангиферина в комплексе в 2.3 раза по сравнению с чистым мангиферином [35].

Rungkan Boonnattakorn et al., 2016, опубликовали исследование по интеграции мангиферина в сополимер этиленвинилацетата и винилацетата [36]. В данном исследовании авторы сравнили влияние сложноэфирного активного вещества сорбитана (Span ® 20) и Плуороника ® P 123 на

характеристики эмульсионных продуктов, создаваемых сочетанием мангиферина с растворами этиленвинилацетата, содержащими различные содержание винилацетата (12, 18, 25 и 40%). Качество матриц продукта проверялось в следующих аспектах: эффективность диспергирования мангиферина, температура плавления, кислородопроницаемость, степень кристаллизации, температура стеклования, прочность на растяжение, относительное удлинение при разрыве, сцепление, а также антиоксидантная активность, профиль высвобождения мангиферина, антиоксидантная активность.

Известно о физических и химических свойствах, а также об оценке антитопоизомеразной активности поли(молочно-со-гликолевых) наночастиц (PLGA), содержащих мангиферин.

В 2017 году опубликовано использование сверхкритического антирастворительного процесса с одним соплом (SAS1) и двумя соплами (SAS2) для получения микронного мангиферин-ацетатцеллюлозного фталата в различных соотношениях материалов (от 1:1 до 1:10).

В начале 2019 года Мария Плегесуэлос-Вилла разработала эмульсии мангиферина и ГК со значительным терапевтическим потенциалом для лечения дерматитов и регенерации кожи [37]. Различные количества ГК (различной молекулярной массы) были инкапсулированы с Транскутолом-Р или без него.

Команда Athit Pipattanawarothai в 2019 году объявила о разработке контролируемой мангиферин-распределительной системы с использованием метода золь-гель синтеза [38]. Полимерные биоактивные гидрогелевые композиции были сформированы за счет загрузки мангиферина в различные системы поливинилового спирта, хитозана и желатина, включая бинарные (поливиниловый спирт, хитозан), тройные (поливиниловый спирт, хитозан и желатин) и гибридно-тройные (тройная система, связанная с силоксаном). Полимеры испытывали на высвобождение мангиферина при значениях pH 5,5 и pH 10,0 в течение 8 часов.

Santi Thanitwatthanasak и др. использовали тонкопленочный метод соникации для инкапсуляции двух полифенолов, включая мангиферин и кверцетин, в смеси сополимеров Плюроники F127 (F127), Плюроники p123 (P123) и витамина E TPGS (TPGS) [39].

## Глава 2.4. Куркумин

Куркумин – полифенольное соединение, которое извлекают из корневища куркумы (*Curcuma longa*). Это тропическое растение Юго-Восточной Азии, известное в основном своим использованием в качестве специи. Куркума содержит эфирные масла, белки и смолы, а также класс



соединений, известных как куркуминоиды, различные смеси моно- и бисдиметокси- производных куркумина. Около 2-5% порошка содержит куркумин, и интерес к этой смеси на протяжении многих столетий вызван его применением в аюрведической медицине.

У куркумина обнаружены противовоспалительная, антиоксидантная, химиотерапевтическая, химиопрофилактическая и химиосенсибилизирующая активности [40,41].

Структура куркумина представляет собой бис- $\alpha$ ,  $\beta$ -ненасыщенный  $\beta$ -дикетон и в растворе существует в равновесии с его енольной таутомерной формой (Рисунок 2.8).

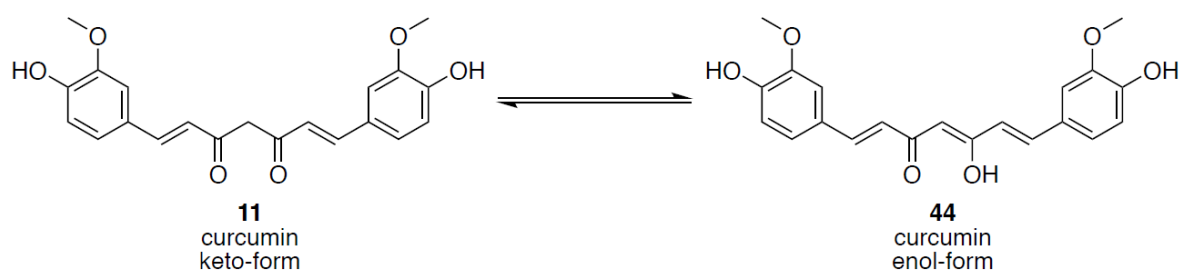


Рисунок 2.8 – Структура кето- и енольной форм куркумина

Протяженная сопряженная система куркумина делает его оранжево-желтым как в растворе, так и в твердой кристаллической форме. Его липофильная природа приводит к плохой растворимости в воде, и соединение склонно к деградации в основной среде.

Куркумин, называемый иногда в иностранной литературе турмериком, получают из экстракта корней куркумы, содержащих куркумин, около 5% летучих масел желтого цвета, крахмал, клетчатку и смолы. Он представляет кристаллическое вещество желто-оранжевого цвета с температурой плавления 183°C; не растворим в воде и слабо растворим в диэтиловом эфире, растворим в этаноле, метаноле, ацетоне, а также в ледяной уксусной кислоте. Он растворяется в водных растворах щелочей, сообщая им красно-коричневую окраску, которая при подкислении переходит в светло-желтую. Куркумин — один из самых первых реагентов на борную кислоту.

Проведен большой объем исследований биологической активности куркумина и механизмов его действия [42]. За последние пять лет было зарегистрировано множество патентов, основанных на терапии с использованием куркумина. В последнее десятилетие в ходе нескольких исследований установлено, что он может модулировать различные связанные с раком мишени или пути, которые могут быть ответственны за его эффективность в борьбе с раковыми заболеваниями.

### Цитотоксическая активность куркумина

Механизм действия куркумина включает модуляцию фермента цитохром P450 (CYP450) путем повышения различных факторов транскрипции, таких как стимулирование аутофагической гибели клеток, которая является важным индуктором смерти в устойчивых к апоптозу раковых клетках [43]. Кроме того, обнаружено, что куркумин действует как разрушитель мембранного потенциала митохондрий, что приводит к дерегуляции миграции анионов и катионов через мембраны.

Интересно отметить хемосенсибилизирующую способность куркумина к клиническим противоопухолевым препаратам, таким как паклитаксел (таксол) и доксорубин (докс), а также его синергический эффект при использовании в сочетании с другими природными соединениями. Эти аспекты могут быть использованы в качестве эффективной стратегии преодоления резистентности опухоли и уменьшения рецидива.

Несколько исследований показали, что свободный куркумин не является цитотоксичным по отношению к здоровым клеткам, включая гепатоциты, эпителиальные клетки молочной железы, лимфоциты и другие, проявляя при этом активность по отношению к раковым клеткам. Тем не менее, поскольку существуют ограничения из-за его липофильности, было реализовано несколько стратегий для улучшения его биодоступности, включая использование менее липофильных аналогов, ограничение метаболизма куркумина путем глюкуронирования и, наконец, его включение в наносистемы [44].

### Инкапсулирование куркумина

В качестве раннего примера было обнаружено, что сшивка куркумина с ГК усиливает стабилизацию наноформы [45-47].

Авторы сообщили, что структура этих наномицелл состоит из внешней оболочки ГК и куркумина, образующих внутреннюю оболочку, следовательно, они способны взаимодействовать с гидрофобными лекарственными средствами, такими как доксорубин, посредством гидрофобных взаимодействий. Авторы также сообщили, что наномицеллы с куркумином показали повышенную противораковую активность за счет улучшенного проникновения в опухолевую клетку. Кроме того, система проявляла чувствительность к кислотам, что подтверждало более низкие значения pH, играющие важную роль в высвобождении лекарств в клетке.

Другие системы ГК и куркумина были разработаны также с конъюгациями через этерификацию Steglich с использованием DCC и DMAP или DCC и гидроксibenзотриазолгидрата (HOBt), что привело к образованию наномицелл [48].

## Глава 2.5. Бетулиновая кислота

Бетулиновая кислота (БК) 9(3В, гидрокси-луп-20(29)-ен-28-овая кислота) является продуктом окисления бетулина, который является преобладающим лупаном в бересте белой берёзы. На протяжении веков он использовался в народной медицине как природное лекарственное средство.

БК, как и другие пентациклические тритерпены (урсаны, олеананы и другие лупаны), проявляют интересные биологические свойства. Например, показано, что БК является мощным ингибитором вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), а также является противовоспалительным, противоопухолевым и противомаларийным природным лекарством [49]. При раке молочной железы БК и ряд других терпеноидов показали свою активность в отношении клеточных линий рака молочной железы, поэтому эти пентациклические тритерпены являются интересными мишенями для изучения, связанного с поиском активных веществ в разработке фитотерапевтических препаратов. Кроме того, показано, что производные БК, такие как 20,29-дигидро-бетулиновая кислота, обладают повышенной активностью против роста новых кровеносных сосудов в опухолях (ангиогенез) по сравнению с нативной БК.

Противоопухолевая активность БК связана с её способностью индуцировать апоптотическую гибель клеток в раковых клетках [50]. Апоптоз – это запрограммированная гибель клеток, которая происходит в каждой клетке и регулируется определенными сигнальными путями. Внутренний (митохондриальный) путь апоптоза запускается при лечении терапевтическими агентами, однако он также может быть индуцирован повреждением ДНК или клеточными стрессовыми реакциями. Выяснение его механизма действия было предметом многочисленных исследований [50].

БК взаимодействует с различными цитотоксическими стимулами для подавления роста опухоли при использовании вместе с другими лекарственными средствами.

Это показывает, что БК может быть использован в качестве сенситизатора в комбинированных режимах для повышения эффективности противоопухолевой терапии и что она обладает синергетическими эффектами.

Недостатком использования БК в качестве лекарственной молекулы является то, что её содержание в коре берёзы крайне низкое. Это оказалось весьма проблематичным, поскольку её терапевтические свойства можно было изучить только после долгих и утомительных экстракций, где в итоге можно было выделить лишь небольшое количество БК. Между тем, родственный БК бетулин (3b-луп-20(29)-ен-3,28-диол), встречается в

существенно больших количествах, которые могут достигать 10-35 мас.% от общей сухой массы наружной коры.

Окисление бетулина является более эффективным крупномасштабным методом синтеза БК. Интересно отметить, что бетулин имеет историческое значение в химии природных продуктов, так как он был одним из первых природных соединений, выявленных и выделенных из растений в 1788 году.

### 2.5.1. Выделение бетулина и синтез бетулиновой кислоты

#### Бетулин из коры березы

Бетулин или полученные из него вещества могут обладать противовоспалительными свойствами, антибиотическим и противовирусным действием, противоопухолевой активностью, гепатопротекторными свойствами, способностью ингибировать процессы ангиогенеза, являются антиоксидантами, проявляют фунгицидную активность. Многими полезными свойствами обладает бетулиновая кислота и её производные. Так, на её основе синтезированы соединения с анти-HIV активностью, а сама кислота эффективна при лечении меланомы.

На основе бетулина возможен синтез как веществ с альдостероноподобным действием, так и антагонистов альдостерона.

Хорошим источником для выделения бетулина служит кора березы.

Структурная формула бетулина приведена на Рисунке 2.9.

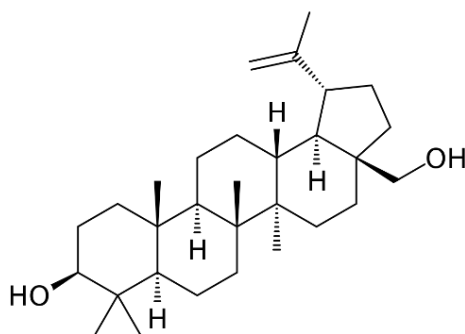


Рисунок 2.9 – Бетулин  $C_{30}H_{50}O_2$   $M = 442$

Сухую измельченную кору березы экстрагируют хлороформом до отрицательной реакции Либермана-Бурхарда (метод для определения стеролов); испытываемое вещество растворяют в ледяной уксусной кислоте и добавляют смесь уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (50:1), Через некоторое время развивается окраска от розовой до зеленой и синей), экстракт фильтруют через бумажный фильтр, растворитель отгоняют в вакууме. 100 г сухого экстракта кипятят с 700 мл

4%-ного раствора едкого кали, нерастворившуюся часть отфильтровывают, а затем дважды кипятят с 2,0 л воды. Полученное вещество сушат при 70°C, затем растворяют в 250 мл пиридина. Добавляют 450 мл уксусного ангидрида, реакционную смесь нагревают на кипящей водяной бане 2 ч, после чего оставляют на ночь при комнатной температуре. Выпавший осадок отфильтровывают на фильтре Шотта, промывают небольшим количеством уксусной кислоты, а затем кристаллизуют из уксусной кислоты. Осадок отфильтровывают, промывают на фильтре этанолом, кристаллизуют из смеси хлороформ-метанол. Получают 12-15 г диацетата бетулина с температурой плавления 221-222°C,  $[\alpha]_D +24$  (c=0,2; CHCl<sub>3</sub>). Дополнительное количество этого вещества можно получить при обработке маточных растворов, однако для получения препарата с высокой температурой плавления требуется хроматографическая очистка.

Полученный диацетат бетулина суспендируют в 400 мл этилового спирта, содержащего 16,0 г едкого кали, реакционную смесь кипятят 1,5 ч. Выпавший осадок отфильтровывают и кристаллизуют несколько раз из смеси хлороформ-метанол. Получают 8-10 г бетулина с температурой плавления 258-259°C.

В кислой среде бетулин может подвергаться различным перегруппировкам, наиболее интересной из них является способность превращаться в производные аллобетулина. Последний служит промежуточным соединением при синтезе тараксастерина – тритерпена, обладающего противовоспалительным и противотуберкулезным действием.

### 2.5.2. Синтез бетулиновой кислоты

Структурная формула бетулиновой кислоты приведена на Рисунке 2.10.

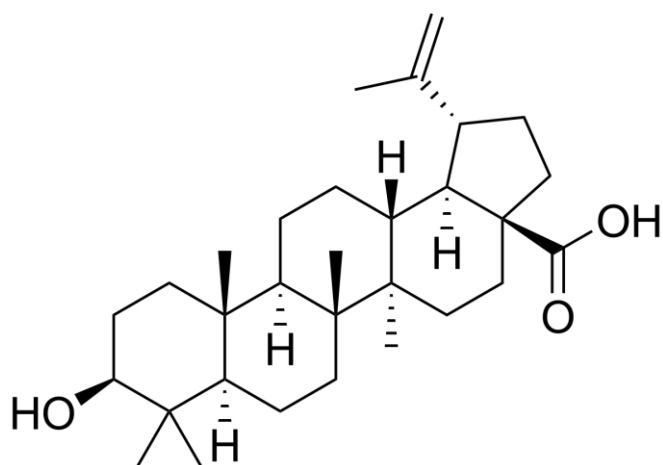


Рисунок 2.10 – Бетулиновая кислота

### **3-О-ацетат бетулина**

К раствору 3,0 г диацетата бетулина в 40 мл смеси хлороформ-метанол (1:1) добавляют 2,1 г гидроокиси кальция, реакцию смесь перемешивают 24 ч. Осадок отфильтровывают, растворитель удаляют на ротационном испарителе. Продукты реакции очищают флэш-хроматографией на колонке с 50 г силикагеля, элюируя смесью петролейного и диэтилового эфиров. Выделяют не прореагировавший диацетат бетулина (1,1 г, 25%), 3-ацетат бетулина (1,9 г, 89%, после перекристаллизации из смеси ацетон-хлористый метилен с температурой плавления 259-261°C) и бетулин (0,2 г, 10%).

### **Ацетат бетулиновой кислоты**

К взвеси 5,0 г 3-ацетата бетулина в 200 мл уксусной кислоты добавляют при 25° С раствор 5,0 г трехоксида хрома в 20 мл 50%-ной уксусной кислоты. Реакционную смесь интенсивно перемешивают при этой температуре 20 мин, а затем выливают в 300 мл 5%-ного водного раствора хлористого натрия. Продукты реакции экстрагируют 300 мл хлороформа. Полученный экстракт промывают дважды равным объемом воды, сушат сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывают, растворитель удаляют на ротационном испарителе, остаток кристаллизуют из этилацетата (1:5). Получают 2,5-3,0 г ацетата бетулиновой кислоты с температурой плавления 286-288°C.

### **Бетулиновая кислота**

К раствору 3,0 г метилата натрия в 50 мл этанола добавляют 1,0 г ацетата бетулиновой кислоты, реакцию смесь перемешивают 3 ч при 40°C, затем охлаждают до комнатной температуры, подкисляют соляной кислотой до pH = 1 и выливают при перемешивании в 300 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре Шотта до нейтральной реакции промывных вод, сушат на воздухе, а затем кристаллизуют из метанола. Получают 0,5-0,7 г бетулиновой кислоты с температурой плавления 298-301°C.

### **Трифторацетат аллобетулина**

Аллобетулин (Рисунок 2.11) и его эфиры обладают противогерпесной активностью, являются промежуточными соединениями для получения других групп биологически активных веществ.

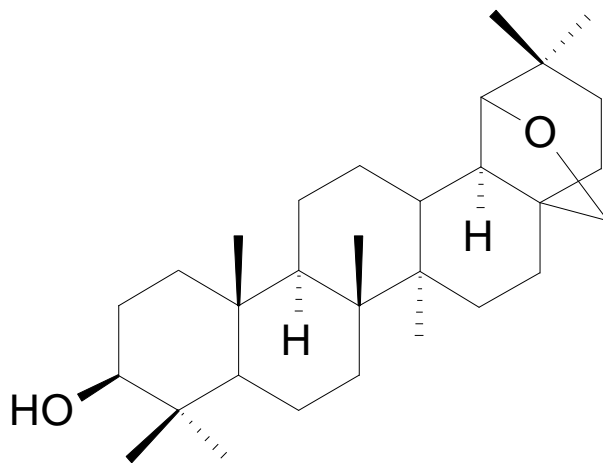


Рисунок 2.11 – Аллобетулин

К взвеси 2,0 г бетулина в 50 мл хлористого метилена добавляют 5,0 мл трифторуксусной кислоты, реакционную смесь перемешивают при 4-5°C до растворения осадка и оставляют на 48 ч при той же температуре, а затем выливают в 100 мл 3%-ного раствора бикарбоната натрия. Органическую фазу отделяют, водную экстрагируют двумя порциями хлористого метилена по 50 мл. Органические экстракты дважды промывают равным объемом 3%-ного раствора бикарбоната натрия, равным объемом воды, сушат сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывают, растворитель удаляют на роторном испарителе, остаток кристаллизуют из смеси хлороформ-метанол. Получают 1,4-1,6 г трифторацетата аллобетулина с температурой плавления 271-272,5° С.

Масс-спектр, m/z (I,%): 538 (100), 507 (33), 467 (73), 424 (33), 409 (9), 381 (6), 355 (13), 342 (6), 330 (7), 316 (40), 303 (27), 273 (6), 257 (5), 245 (9), 233 (7), 219 (31), 203 (44), 189 (59), 177 (46).

## Глава 2.6. Метилловый эфир глицирретовой кислоты

Глицирретовая кислота и её гликозиды влияют на водно-солевой обмен подобно стероидному гормону альдостерону. На основе глицирретовой кислоты созданы препараты с противовоспалительным, противоязвенным, антиаллергическим, антибактериальным, противовирусным и противоопухолевым действием, а также другими важными свойствами. Основным источником для получения глицирретовой кислоты и её эфиров служит солодка голая, в которой основным тритерпеновым компонентом является глицирризиновая кислота. Гидролиз последней под действием соляной кислоты в метаноле позволяет получить метилловый эфир глицирретовой кислоты (Рисунок 2.12).

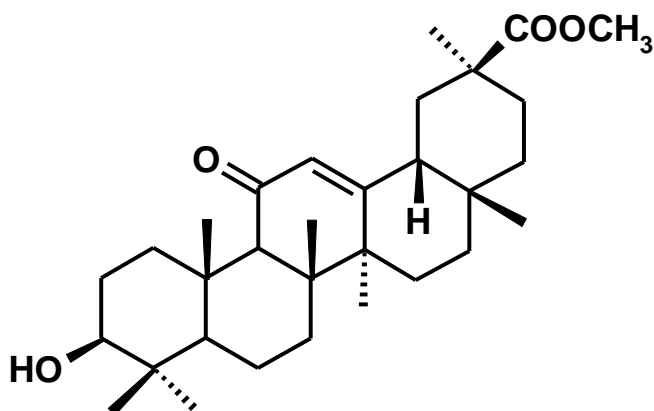


Рисунок 2.12 - Метилловый эфир глицирретовой кислоты

1,0 кг сухого экстракта солодкового корня растворяют в минимальном количестве 1%-ного водного раствора едкого натра. После охлаждения, при тщательном перемешивании, добавляют небольшими порциями серную кислоту до pH = 1. Через сутки выпавший осадок отделяют центрифугированием, промывают его на фильтре холодной водой, сушат при комнатной температуре. Полученный порошок (около 400 г) измельчают, растворяют в 1200 мл метанола, добавляют 250 мл конц. HCl и кипятят в колбе с обратным холодильником 3 ч. Выпавший после охлаждения раствора осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают 50 мл холодного метанола, а затем растворяют в 1,0 л бензола. Раствор фильтруют через бумажный фильтр, переносят в делительную воронку и дважды промывают сначала равным объемом воды, а затем пятикратно равными объемами 5%-ной двууглекислой соды. Затем бензольный раствор промывают водой до нейтральной реакции и сушат сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывают, растворитель удаляют на роторном испарителе, остаток кристаллизуют из смеси хлороформ-метанол (1:6). Перекристаллизации продолжают до получения метилового эфира глицирретовой кислоты с температурой плавления 255-257°C,  $[\alpha]_D^{+106^\circ}$  (C=0,2, CHCl<sub>3</sub>). Выход 20-25 г. Метилловый эфир глицирретовой кислоты легко идентифицировать по спектру ЯМР <sup>13</sup>C: 39.1 (C-1), 27.3 (C-2), 78.8 (C-3), 39.1 (C-4), 54.9 (C-5), 17.5 (C-6), 32.8 (C-7), 43.2 (C-8), 61.8 (C-9), 37.1 (C-10), 200.2 (C-11), 128.5 (C-12), 169.1 (C-13), 45.4 (C-14), 26.4 (C-15), 26.4 (C-16), 31.8 (C-17), 48.4 (C-18), 41.1 (C-19), 44.0 (C-20), 31.1 (C-21), 37.7 (C-22), 28.1 (C-23), 15.6 (C-24), 16.4 (C-25), 18.7 (C-26), 23.4 (C-27), 28.3 (C-28), 28.5 (C-29), 176.9 (C-30), 51.8 (CH<sub>3</sub>O).



## Глава 2.7. Эхиноцистовая кислота из мари противоглистной

Эхиноцистовая кислота (Рисунок 2.13) обладает противовоспалительным и противоязвенным действием, служит подходящим соединением для получения модифицированных тритерпеноидов с избирательными биологическими свойствами. Хорошим источником этого соединения служит растение мари противоглистной.

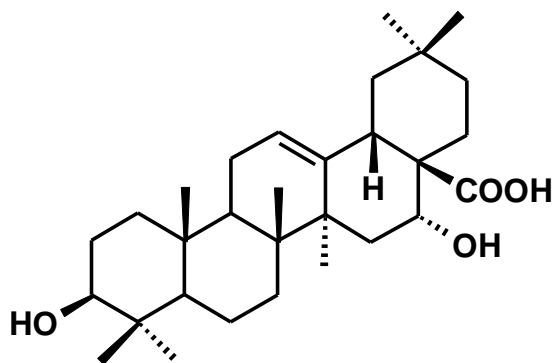


Рисунок 2.13 – Эхиноцистовая кислота

3 кг сухих размолотых корней мари противоглистной заливают 10,0 л этилового спирта, смесь кипятят в колбе с обратным холодильником 2 ч. После охлаждения смеси раствор декантируют, экстракцию повторяют в тех же условиях ещё 4 раза. Объединенные вытяжки фильтруют, затем концентрируют на роторном испарителе до объема 3,0 л. Добавляют 300 мл конц. HCl, кипятят в колбе с обратным холодильником 4 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и выливают при перемешивании в 10,0 л воды. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре водой до нейтральной реакции промывных вод, сушат на воздухе, а затем помещают в аппарат Сокслетта. Экстракцию проводят эфиром до отрицательной реакции Либермана-Бурхарда. Эфирные вытяжки обрабатывают равным объемом 3%-ного водного раствора едкого кали, при этом в водном слое выпадает обильный осадок солей кислот. Его отфильтровывают и растворяют в минимальном объеме горячего 60%-ного водного раствора этанола, нерастворившуюся часть отфильтровывают и отбрасывают. Раствор подкисляют 1%-ной соляной кислотой до pH 1, выпавшую эхиноцистовую кислоту отфильтровывают на воронке Бюхнера и несколько раз кристаллизуют из метанола до достижения температуры плавления 312-313°C,  $[\alpha]_D +37^\circ$ . Выход чистой эхиноцистовой кислоты зависит от источника сырья и колеблется от 5 до 15 г.

## Глава 2.8. Выделение урсоловой кислоты из толокнянки (*Uvae ursi*)

Урсоловая кислота (Рисунок 2.14) широко распространена в мире растений, она обладает противовоспалительной, гепатопротекторной, противовирусной, гиполипидемической, цитопротекторной активностью, является ингибитором ароматазы, проявляет противоартритное действие, индуцирует процессы апоптоза, блокирует ангиогенез и т.д.

Впервые этот тритерпеноид выделили из толокнянки *Uvae ursi*.

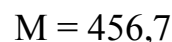
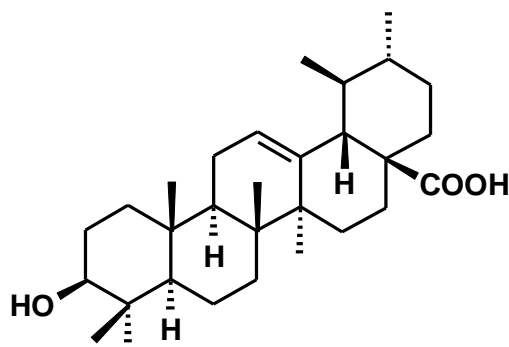


Рисунок 2.14 – Урсоловая кислота

### Метод 1.

1,0 кг высушенных измельченных листьев толокнянки экстрагируют хлороформом до отрицательной реакции Либермана-Бурхарда в экстракте. Растворитель удаляют на роторном испарителе, остаток растворяют в 1,0 л диэтилового эфира, полученный раствор три раза экстрагируют равным объемом 1,0%-ного едкого натра. Щелочной экстракт фильтруют через бумажный фильтр, затем подкисляют соляной кислотой до pH = 1,5-2,0. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре до нейтральной реакции промывных вод, сушат на воздухе. Полученное вещество растворяют в минимальном количестве кипящего этилового спирта, к которому добавляют 2,0 г активированного угля. Через несколько минут уголь удаляют, фильтруя горячий раствор. Растворитель удаляют на роторном испарителе. Высушенный на воздухе остаток растирают с 10,0 г «кислого» оксида алюминия, полученную смесь наносят на колонку, содержащую 90 г того же адсорбента. Элюируют хлороформом, собирая фракции, содержащие урсоловую кислоту. Контроль осуществляют методом ТСХ на пластинах «Силуфол» в системе растворителей гексан-этилацетат 2:1. Фракции, содержащие целевой тритерпеноид, объединяют, растворитель удаляют на роторном испарителе, остаток кристаллизуют из

этилового спирта. Получают 0,8-1,1 г урсоловой кислоты, т. пл. 287-289°C,  $[\alpha]_D +72$  (c=0,5;  $\text{CHCl}_3$ ).

Для упрощения идентификации тритерпеновых кислот часто получают их метиловые эфиры. Так, для синтеза метилового эфира урсоловой кислоты к раствору 100 мг тритерпеноида в 10 мл метанола добавляют эфирный раствор диазометана, полученный лаборантом из 0,3 г нитрозометилмочевины, реакцию смесь оставляют на сутки в вытяжном шкафу. Затем избыток диазометана разлагают медленным прибавлением уксусной кислоты. (Внимание! Диазометан токсичен и взрывоопасен, все работы с ним проводить только в вытяжном шкафу под контролем преподавателя). Реакционную смесь выливают в 100 мл воды, продукты реакции экстрагируют 50 мл эфира. Эфирный раствор экстрагируют двумя порциями по 50 мл 2%-ного едкого калия, затем промывают водой до нейтральной реакции и сушат сульфатом натрия. Сушитель отфильтровывают, растворитель удаляют на роторном испарителе, остаток кристаллизуют из смеси спирт-вода. Кристаллизация проходит очень медленно, иногда для получения хороших кристаллов требуется 3-4 недели. Температура плавления метилового эфира урсоловой кислоты 168-170°C,  $[\alpha]_D +68$  (c=0,5;  $\text{CHCl}_3$ ).

Урсоловую кислоту можно идентифицировать по спектру ЯМР  $^{13}\text{C}$ , снятому в пентадегидропиридине ( $\delta$ , м.д.): 39.2 (C-1), 28.2 (C-2), 78.2 (C-3), 39.6 (C-4), 55.9 (C-5), 18.8 (C-6), 33.7 (C-7), 40.1 (C-8), 48.1 (C-9), 37.5 (C-10), 23.7 (C-11), 125.7 (C-12), 139.3 (C-13), 42.6 (C-14), 28.8 (C-15), 25.0 (C-16), 48.1 (C-17), 53.6 (C-18), 39.5 (C-19), 39.4 (C-20), 31.1 (C-21), 37.4 (C-22), 28.8 (C-23), 16.5 (C-24), 15.7 (C-25), 17.5 (C-26), 24.0 (C-27), 179.7 (C-28), 17.5 (C-29), 21.4 (C-30).

## Метод 2.

1,0 кг сухих измельчённых листьев толокнянки трижды экстрагируют 3,0 л этилового спирта в течение 2 суток, экстракты объединяют, спирт удаляют под вакуумом. К остатку добавляют 500 мл петролейного эфира (температура кипения 40-70°C), смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1,0 ч, после чего растворитель удаляют декантацией. Экстракцию окрашенных примесей петролейным эфиром повторяют ещё раз. Оставшуюся массу растворяют в 800 мл диэтилового эфира, добавляют 500 мл 3%-ного раствора едкого натра в воде. Темно-коричневый осадок, находящийся на границе раздела фаз, отфильтровывают, промывают водой и растворяют в 600 мл этанола. К полученному раствору добавляют, при сильном перемешивании, 10%-ный раствор соляной кислоты до pH = 1,0. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре водой до нейтральной реакции промывных вод, а затем сушат на воздухе. После кристаллизации осадка из смеси

хлороформ-этанол получают 0,9-1,1 г урсоловой кислоты с температурой плавления 283-284°C.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Приведите примеры лекарственных препаратов из растительных источников.
2. В чем состоит сложность при создании синтетических соединений, обладающих биологической активностью?
3. Как обычно выделяют природные соединения из растительных источников?
4. В чем состоит сложность в выделении природных молекул?
5. Как доказывают структуру соединений?
6. Какие методы используют для определения чистоты соединения?
7. К какому классу соединений принадлежит бетулин?
8. В чем уникальность потенциальных лекарственных препаратов на основе природных соединений?
9. Какие виды активности проявляет УК?
10. Какой основной источник бетулина?
11. Какие источники бетулиновой кислоты?
12. Перечислите функциональные группы в УК, мангиферине, бетулиновой кислоте и какую роль они играют в проявлении биологической активности?
13. Перечислите полимерные матрицы, обычно использующиеся для инкапсулирования соединений?
14. Какие недостатки у большинства природных соединений?
15. В чем преимущество систем доставки на основе полимерных матриц?
16. Как определяют высвобождение препарата из полимерной матрицы?
17. Какие методы контроля используют для определения включения соединений в полимерный носитель?
18. За счёт какого эффекта наноматериалов достигается лучшее проникновение в клетки опухоли?

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meyer, K. The polysaccharide of the vitreous humor / K. Meyer, J.W. Palmer // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1934. – Vol. 107, nr 3. – P. 629–634.
2. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия: учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 416 с.: ил. – ISBN 978-5-9704-5415-2
3. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer / P. Snetkov, K. Zakharova, S. Morozkina, R. Olekhnovich [et al.] // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12. – P. 1800.
4. Cowman, M.K. Experimental approaches to hyaluronan structure / M.K. Cowman, S. Matsuoka // *Carbohydrate Research*. – 2005. Vol. 340, nr 5. – P. 790–809.
5. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review / J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar // *Veterinarni Medicina*. – 2008. – Vol. 53, nr 8. – P. 397–411.
6. Химическая модификация ГК и её применение в медицине / Н.Н. Сигаева, С.В. Колесов, П.В. Назаров, Р.Р. Вильданова // *Вестник Башкирского университета*. – 2012. – Т. 17, № 3. – С. 1220–1241.
7. Scott, J.E. Secondary structure of hyaluronate in solution. A  $^1\text{H}$ -n.m.r. investigation at 300 and 500 MHz in  $[\text{2H}_6]$ dimethyl sulphoxide solution / J.E. Scott, F. Heatley, W.E. Hull // *The Biochemical Journal*. – 1984. – Vol. 220, nr 1. – P. 197–205.
8. Atkins, E.D.T. The conformation of the mucopolysaccharides. Hyaluronates / E.D.T. Atkins, C.F. Phelps, J.K. Sheehan // *The Biochemical Journal*. – 1972. – Vol. 128, nr 5. – P. 1255–1263.
9. Ribitsch, G. Investigation of the solution structure of hyaluronic acid by light scattering, SAXS, and viscosity measurements / G. Ribitsch, J. Schurz, V. Ribitsch // *Colloid and Polymer Science*. – 1980. – Vol. 258, nr 12. – P. 1322–1334.
10. Хабаров, В.Н. ГК: получение, свойства, применение в биологии и медицине / В.Н. Хабаров, П.Я. Бойков, М.А. Селянин. – М.: Практическая медицина. 2012. – 224 с.: ил. – ISBN 978-5-98811-210-5
11. Curcumin/Usnic Acid-Loaded Electrospun Nanofibers Based on Hyaluronic Acid / P. Snetkov, S., Morozkina, R. Olekhnovich [et al.] // *Materials* / – 2020. – Vol. 13. – P. 3476.
12. Ibuprofen-Loaded Hyaluronic Acid Nanofibrous Membranes for Prevention of Postoperative Tendon Adhesion through Reduction of Inflammation / C.-T. Chen, C.-H. Chen, C. Sheu, J.-P. Chen // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – P. 5038.

13. The application of hyaluronic acid in bone regeneration / P. Zhai, X. Peng, B. Li [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 151. – P. 1224–1239.
14. Patent US 4582865. Cross-linked gels of hyaluronic acid and products containing such gels / E.A. Balazs, A. Leshchiner. Declared 06.12.1984. Published 15.04.1986.
15. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications / C.E. Schantéa, G. Zuber, C. Herlinb, T.F. Vandamme // *Carbohydrate Polymers*. – 2011. – Vol. 85, nr 3. – P. 469–489.
16. Электроформование нановолокон из раствора хитозана (обзор) / Н.Р. Прокопчук, Ж.С. Шашок, Д.В. Прищепенко, В.Д. Меламед // *Полимерные материалы и технологии*. – 2015. – Т. 1, № 2. – С. 36–56.
17. Перепелкин, К.Е. Физико-химические основы процессов формования химических волокон / К.Е. Перепелкин. – М: Химия, 1976. – 320 с.
18. Матвеев, А.Т. Получение нановолокон методом электроформования: Учебное пособие для студентов по специальности «Композиционные наноматериалы» / А.Т. Матвеев, И.М. Афанасов / под ред. В.В. Авдеева, А.Ю. Алентьева, Б.И. Лазорьяк, О.Н. Шорниковой. – М.: Издательство МГУ. 2010. – 83 с.: ил.
19. Филатов, Ю.Н. Электроформование волокнистых материалов (ЭФВ-процесс) / Под редакцией проф. В.Н. Кириченко. – М.: ГНЦ РФ НИФХИ им. Л.Я. Карпова, 2001. – 231 с.
20. Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity / L.T.K. Ngan, S. Wang, Đ.M. Hiep [et al.] // *Research on Chemical Intermediates*. – 2014. – Vol. 40. – P. 2165–2175.
21. Bhardwaj, N. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique / N. Bhardwaj, S.C. Kundu // *Biotechnology advances*. – 2010. – Vol. 23, nr 3. – P. 325–347.
22. Ibrahim, H.M. Chitosan as a biomaterial – structure, properties, and electrospun nanofibers / H.M. Ibrahim, E.M.R. El-Zairy // *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials* / Bobbarala, V., Ed. Science, Technology and Medicine. – London, UK: – 2015. ISBN: 978-953-51-2232-6
23. Morphology, mechanical properties and surface characteristics of electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofiber mats / Z. Khan, F. Kafiah, H.Z. Shafi [et al.] // *International Journal of Advanced Engineering and Nano Technology (IJAENT)*. – 2015. – Vol. 2, nr 3. – P. 15–22.
24. Hyaluronan-Based Nanofibers: Fabrication, Characterization and Application / P. Snetkov, S. Morozkina, M. Uspenskaya, R. Olekhovich // *Polymers*. – 2019. – Vol. 11. P. 2036.
25. Pérez, J.M.M. Image Processing with ImageJ / J.M.M. Pérez, J. Pascau. – Packt Publishing Ltd: Birmingham, UK. – 2013. ISBN 978-1-78328-395-8

26. *Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity in Drug Discovery*. Edited by Eric M. Gordon and James F. Kerwin, Jr.. Wiley-Liss: New York. 1998. 516 pp. ISBN 0-47-15518-7
27. *Dictionary of Natural Products* // Taylor & Francis Group : [сайт]. – 2020. – URL: <http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml> (дата обращения 25.12.2020)
28. *Controlled Drug Delivery Vehicles for Cancer Treatment and Their Performance* / S. Senapati, A.K. Mahanta, S. Kumar, P. Maiti // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2018. – Vol. 3, nr 1. – P. 1–19.
29. *Hyaluronic Acid-Coated Nanomedicine for Targeted Cancer Therapy* / K. Kim, H. Choi, E.S. Choi [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 11, nr 7. – P. 1–22.
30. *Review of the biological properties and toxicity of usnic acid* / A.A.S. Arajo, M.G.D. de Melo, T.K. Rabelo, [et al.] // *Natural Product Research*. – 2015. – Vol. 29, nr 23. – P. 2167–2180.
31. *Galanty, A. Enantioselective Activity of Usnic Acid: A Comprehensive Review and Future Perspectives* / A. Galanty, P. Paško, I. Podolak // *Phytochemistry Reviews*. – 2019. – Vol. 18, nr 2. – P. 527–548.
32. *Zugic, A. Nano- and Microcarriers as Drug Delivery Systems for Usnic Acid: Review of Literature* / A. Zugic, V. Tadic, S. Savic // *Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 12. – P. 156.
33. *In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres* / R.M. Ribeiro-Costa, A.J. Alves, N.P. Santos [et al.] // *Journal of Microencapsulation*. – 2004. – Vol. 21. – P. 371–384.
34. *Matkowski, A. Mangiferin – a bioactive xanthonoid, not only from mango and not just antioxidant* / A. Matkowski, P. Kus // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2013. – Vol. 13, nr 3. – P. 439–455.
35. *Improving permeability and oral absorption of mangiferin by phospholipid complexation* / H. Ma, H. Chen, L. Sun [et al.] // *Fitoterapia*. – 2014. – Vol. 93. – P. 54–61.
36. *Boonnattakorn, R. Antioxidant Microemulsion-based Ethylene Vinyl Acetate Film Containing Mangiferin and Surfactants* / R. Boonnattakorn, A. Sane, V. Chonhenchob // *MATEC Web Conf.* – 2016. – Vol. 67. – P. 06101.
37. *Mangiferin nanoemulsions in treatment of inflammatory disorders and skin regeneration* / M. Pleguezuelos-Villa, A. Nácher, M.J. Hernández [et al.] // *The International Journal of Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 564. – P. 299–307.
38. *Development of Polymeric Hydrogels for Potential Biomedical Applications: Sol-Gel Synthesis and in Vitro Release of Mangiferin* / A. Pipattanawarothai, A. Athipornchai, P. Sriprechasak, T. Trakulsujaritchok // *Burapha Science Journal*. – 2019. – Vol. 24, nr 3. – P. 885–900.
39. *Thanitwatthanasak, S. Pluronic F127/Pluronic P123/vitamin E TPGS mixed micelles for oral delivery of mangiferin and quercetin: Mixture-design*

- optimization, micellization, and solubilization behavior / S. Thanitwatthanasak, L. Sagis, P. Chitprasert // *Journal of Molecular Liquids*. – 2019. – Vol. 274. – P. 223–238.
40. Kocaadam, B. Curcumin, an Active Component of Turmeric (*Curcuma Longa*), and Its Effects on Health / B. Kocaadam, N. Şanlıer // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2017. – Vol. 57, nr 13. – P. 2889–2895.
  41. Mishra, A. Curcumin as an Anti-Human Papillomavirus and Anti-Cancer Compound / A. Mishra, B.C. Das // *Future Oncology*. – 2015. – Vol. 11, nr 18. – P. 2487–2490.
  42. Anticancer Activity of Curcumin and Its Analogues: Preclinical and Clinical Studies / A. Allegra, V. Innao, S. Russo [et al.] // *Cancer Investigation*. – 2017. – Vol. 35, nr 1. – P. 1–22.
  43. Sordillo, P.P. Curcumin and Cancer Stem Cells: Curcumin Has Asymmetrical Effects on Cancer and Normal Stem Cells / P.P. Sordillo, L. Helson // *Anticancer Research*. – 2015. – Vol. 35, nr 2. – P. 599–614.
  44. Cross-Linking of Hyaluronic Acid by Curcumin Analogue to Construct Nanomicelles for Delivering Anticancer Drug / F. Bai, Y. Wang, Q. Han [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2019. – Vol. 288. – P. 111079.
  45. Manju, S. Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability / S. Manju, K. Sreenivasan // *The Journal of Colloid and Interface Science*. – 2011. – Vol. 359. – P. 318–325.
  46. A Potential Carrier for Anti-Tumor Targeted Delivery-Hyaluronic Acid Nanoparticles / J. Cai, J. Fu, R. Li [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – Vol. 208. – P. 356–364.
  47. Co-Assembly of Doxorubicin and Curcumin Targeted Micelles for Synergistic Delivery and Improving Anti-Tumor Efficacy / W. Ma, Q. Guo, Y. Li [et al.] // *The European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2017. – Vol. 112. – P. 209–223.
  48. Anti-Inflammation and Joint Lubrication Dual Effects of a Novel Hyaluronic Acid/Curcumin Nanomicelle Improve the Efficacy of Rheumatoid Arthritis Therapy / Z. Fan, J. Li, J. Liu [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2018. – Vol. 10, nr 28. – P. 23595–23604.
  49. Discovery of Betulinic Acid as a Selective Inhibitor of Human Melanoma That Functions by Induction of Apoptosis / E. Pisha, H. Chai, I.-S. Lee [et al.] // *Nature Medicine*. – 1995. – Vol. 1, nr 10. – P. 1046–1051.
  50. Fulda, S. Betulinic Acid for Cancer Treatment and Prevention / S. Fulda // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2008. – Vol. 9, nr 6. – P. 1096–1107.



Морозкина Светлана Николаевна  
Олехнович Роман Олегович  
Снетков Петр Петрович

**Некоторые биологически-активные вещества природного  
происхождения и системы их доставки  
на основе гиалуроновой кислоты**

**Учебное пособие**

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе