

УДК 541.64:547.995.12

ВОДОРАСТВОРИМЫЙ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ХИТОЗАН И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ПОЛИСТИРОЛСУЛЬФОНАТНЫМ АНИОНОМ¹

© 2011 г. М. Ю. Горшкова*, И. Ф. Волкова*, С. Г. Алексева**, Н. Н. Молоткова**,
Е. Е. Скорикова***, В. А. Изумрудов****

*Учреждение Российской академии наук

Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН

119991 Москва, Ленинский пр., 29

** Научно-исследовательский институт пластических масс им. Г.С. Петрова

111024 Москва, Перовский пр., 35

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

*Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского*** и*

*Химический факультет*****

119991 Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 29.03.2010 г.

Принята в печать 12.08.2010 г.

Взаимодействием хитозана с глицидилтриметиламмоний хлоридом осуществлено селективное алкилирование первичных аминогрупп полисахарида с одновременным введением в каждое алкилированное звено кватернизованной аминогруппы, что обеспечивает положительный заряд и растворимость полимера во всем диапазоне рН. Структура модифицированного хитозана подтверждена методами ИК-Фурье спектроскопии, ЯМР и ПМР. Данные потенциометрического титрования растворов исходного полисахарида, его модифицированного производного и их смесей с полистиролсульфонатным анионом, а также результаты измерения ζ -потенциала и турбидиметрическое титрование смесей полимеров выявили способность вторичной аминогруппы модифицированного хитозана, связанного в комплекс, протонироваться в слабо кислых средах, что представляет особый интерес для разработки биосовместимых и биodeградируемых средств доставки генетического материала и лекарственных веществ в клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Хитозан представляет собой продукт деацетилирования полисахарида хитина – одного из наиболее распространенных биополимеров, источника сырья которого практически неограниченны и возобновляемы. Хитозан отличается высокой биосовместимостью [1], биodeградируемостью [2] и широким спектром биологической активности. Помимо традиционного использования в фармацевтике и пищевой промышленности в виде гелей и пленок [3–5] хитозан в последнее время все активнее привлекается для решения задачи доставки в клетки биологически активных веществ, в том числе пептидов [6] и генетического материала [7]. Возможность применения хитозана в качестве носителя во многом определяется наличием первичных аминогрупп в цепи, которые при физиологических значениях рН частич-

но ионизованы. Однако практическому использованию препятствует нерастворимость хитозана в подавляющем большинстве органических растворителей и весьма ограниченная растворимость в водно-солевых средах при физиологических условиях. Первое из указанных обстоятельств делает проблематичными переработку и химическую модификацию хитозана в гомогенных системах, а второе затрудняет его использование в средах, благоприятных для функционирования биополимеров.

Проблема разработки универсального метода получения однородного по структуре, высокозаряженного и хорошо растворимого хитозана становится все более актуальной ввиду необходимости использования этого полисахарида для фундаментальных исследований и решения важных практических задач. Предложенные многочисленные способы улучшения растворимости полисахарида в водных средах имеют существенные недостатки. Так, изменением степени деацетилирования исходного хитина или снижением ММ хитозана [8] можно несколько повысить его растворимость, но при этом уменьшается количество

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 10-03-00019-а).

заряженных групп в цепи, что отрицательно влияет на собственную биологическую активность, затрудняет получение конъюгатов хитозана с биологически активными веществами и дестабилизирует полиэлектролитные комплексы на его основе. Модификация хитозана полимерными или низкомолекулярными лигандами [9–11] также приводит к снижению количества аминогрупп в цепях.

Производные хитозана, растворимые во всем диапазоне рН, получают алкилированием его первичных аминогрупп [12, 13]. Реакцию проводят в органических растворах или в водно-органических смесях при достаточно высоких температурах (60–90°C). Гетерогенность систем и повышенные температуры приводят к образованию продуктов, отличающихся композиционной неоднородностью и невысокими ММ, а параллельное протекание реакции метилирования по кислороду ухудшает их растворимость [14, 15]. Триметилхитозан без побочных О-метилованных производных получали алкилированием хитозана в гомогенных условиях в присутствии гидроксида натрия, используя специально подобранный растворитель, представляющий собой смесь ДМФА и воды [16]. Сравнительно высокий выход продукта удавалось достичь последовательным повторением процесса обработки (несколькими циклами по 48 ч). Сократить время алкилирования нагреванием смеси не представлялось возможным, поскольку при повышенных температурах возрастала скорость гидролиза метилирующего агента. Помимо длительности синтеза существенным недостатком подхода явилась композиционная неоднородность продуктов, представляющих собой смесь диметилированных и триметилированных производных.

Качественно иной путь решения проблемы получения растворимого хитозана заключается во введении готовой четвертичной аминогруппы в его цепь. Так, взаимодействием хитозана с бетаином в водно-метанольных смесях при комнатной температуре в присутствии конденсирующих агентов получали полимер, растворимый во всем диапазоне рН [17]. Авторы синтезировали образцы различной, в том числе относительно высокой (до 50%), степени модификации, которые обладали достаточно большой ММ, однако в ходе побочной реакции накапливалось значительное количество N-этоксикарбонильных производных хитозана. Повысить селективность алкилирования можно защитой реакционноспособных групп хитозана [18], но многостадийность процесса, обусловленная многократным (до пяти циклов) установлением и снятием защиты, существенно осложняет модификацию и приводит к снижению ММ продукта.

Введение четвертичной аминогруппы в цепь полисахарида можно осуществлять алкилированием аминогрупп хитозана глицидилтриметил-

аммоний хлоридом (ГТМАХ) [19, 20]. Реакция проходит в одну стадию и позволяет получать четвертизированный модифицированный хитозан, растворимый во всем диапазоне рН. Успех модификации во многом определяется чистотой используемого алкилирующего агента и правильно подобранными соотношениями реагентов, поскольку ГТМАХ нестабилен и достаточно быстро разлагается при комнатной температуре. Кроме перечисленных выше преимуществ взаимодействие с ГТМАХ наделяет хитозан свойством, которое может оказаться особенно полезным при комплексообразовании с биополимерами, в частности нуклеиновыми кислотами. Алкилирование сопровождается трансформацией первичной аминогруппы хитозана во вторичную аминогруппу, способную (де)протонироваться при изменении кислотности среды, что может быть востребовано при конструировании носителей биологически активных веществ. Известно [21], что протонирование аминогрупп носителя при попадании в слабо кислую среду эндосом и лизосом обеспечивает выход полиплекса (полиэлектролитного комплекса катионного носителя с нуклеиновой кислотой) в цитоплазму, что составляет ключевой момент трансфекции, т.е. доставки целевой нуклеиновой кислоты или олигонуклеотида в клетки. Успешное продвижение в этой области тесно связано с усовершенствованием методики модификации полисахарида и проведением модельных исследований взаимодействия модифицированного хитозана с полианионами, что и явилось целью данной работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Хлорид калия (“Лабтех”, Россия) квалификации ч.д.а., глицидилтриметиламмоний хлорид (>95%) (“Fluka”, США), буферы TRIS, HEPES и MES (“Aldrich”, США) использовали без дополнительной очистки.

Препарат хитозана производства Закрытого акционерного общества “Биопрогресс” (степень деацетилирования хитина 90%, массовая доля золя менее 5%) осаждали из кислых растворов раствором NaOH и лиофильно высушивали, как описано в работе [22]. Характеристическая вязкость $[\eta]$ полученного образца, измеренная в 2%-ном растворе уксусной кислоты в присутствии 0.2 М ацетата натрия [23], составила 3.9 дл/г, что соответствует $M_{\eta} = 1.8 \times 10^5$.

Модифицированный хитозан получали обработкой хитозана по методике [19], адаптированной для решения поставленной задачи. Для этого к 0.8 г (5.0 ммоль) хитозана, диспергированного в 16 мл дистиллированной воды, добавляли ГТМАХ тремя равными порциями по 1 мл

(5 ммоль) с интервалом 2 ч при 80°C и непрерывном перемешивании. Через 10 ч реакционную смесь высаживали в 30 мл ацетона, выдерживали 12 ч при температуре 4°C, затем ацетон декантировали, гелеобразный продукт растворяли в 25 мл смеси вода : метанол = 2 : 1, фильтровали и осаждали в 75 мл смеси ацетон : этанол = 4 : 1. Осадок собирали на фильтре Шотта, экстрагировали двое суток этанолом в аппарате Сокслета и высушивали в вакууме. Водный раствор модифицированного хитозана диализовали 48 ч на мембране "Spectra/Por CE MWC0500" против бидистиллированной воды и лиофильно высушивали. Характеристическая вязкость полученного образца, измеренная в 2%-ном растворе уксусной кислоты в присутствии 0.2 М ацетата натрия, равна 1.6 дл/г.

Полианионами служили фракции полистиролсульфоната натрия (ПСС) фирмы "Du Pont" (Франция – США). Использовали образцы со степенью полимеризации 9, 21, 39, 87, 170 и 360, которые ниже обозначены соответственно ПСС₉, ПСС₂₁, ПСС₃₉, ПСС₈₇, ПСС₁₇₀ и ПСС₃₆₀.

Для приготовления растворов брали бидистиллированную воду, дополнительно очищенную на системе Milli-Q ("Millipore", США).

Полиэлектролитные комплексы получали смешением соответствующих объемов растворов полиэлектролитов в 0.02 М растворе выбранного буфера. Буферные растворы готовили из навесок TRIS, HEPES и MES с последующим добавлением концентрированной щелочи или кислоты до значений pH 9.0, 7.2 и 5.5. Состав смесей $Z = [S] : [N]$ или $Z = [S] : [N_q]$ выражали в терминах отношения мольных концентраций сульфонатных групп S полианиона и аминогрупп N хитозана (или кватернизованных аминогрупп N_q модифицированного хитозана).

Критическую концентрацию соли $[KCl]_{кр}$, соответствующую диссоциации комплексов ПСС и модифицированного хитозана, определяли титрованием смесей полиэлектролитов состава $Z = [S] : [N_q] = 2.0$ раствором 4 М KCl до полного

растворения. Опыты проводили при постоянном перемешивании с интервалом 5 мин между введениями порций титранта.

Методы

Для потенциометрических измерений использовали pH-метр "Beckman Ф-70" с комбинированным электродом "Futura Plus" (США). Растворы навесок хитозана и модифицированного хитозана в воде с добавлением соляной кислоты смешивали с раствором ПСС при разных соотношениях компонентов и титровали 0.1 М раствором щелочи с интервалом 3 мин между введениями порций титранта при постоянном перемешивании в токе аргона и температуре 20°C.

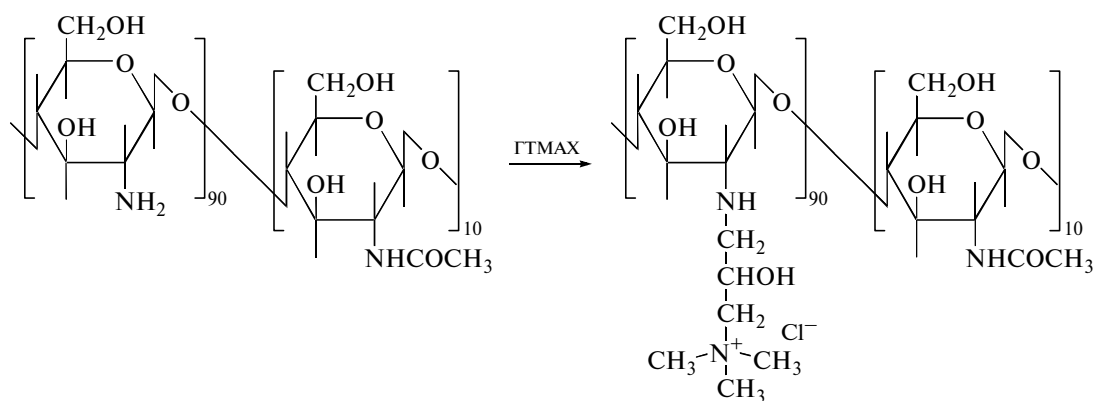
Измерения ζ-потенциала частиц, образующихся в смесях полимеров, проводили при 25°C на приборе "Zetasizer Nano-ZD" "Malvern Instruments" в 0.01 М растворах буферов TRIS, HEPES и MES при pH 9.0, 7.2 и 5.5. Концентрация сульфонатных групп в растворе до титрования ПСС раствором модифицированного хитозана была постоянной и равной 6.0×10^{-5} осново-моль/л.

ИК-спектры порошков исходного хитозана и модифицированного хитозана регистрировали на приборе "Perkin Elmer Spectrum One" (США), оснащенном универсальной приставкой ATR с однократным отражением от поверхности кристалла Diamant Zn–Se.

ЯМР-спектры растворов хитозана и модифицированного хитозана соответственно в дейтерированной соляной кислоте и D₂O регистрировали на спектрометре "Gemini 300" ("Varian", США) с рабочей частотой 300 МГц на ядрах ¹H и 75 МГц на ядрах ¹³C. Хим. сдвиги измеряли относительно остаточных протонов растворителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация хитозана глицидилтриметил-аммоний хлоридом представлена на схеме



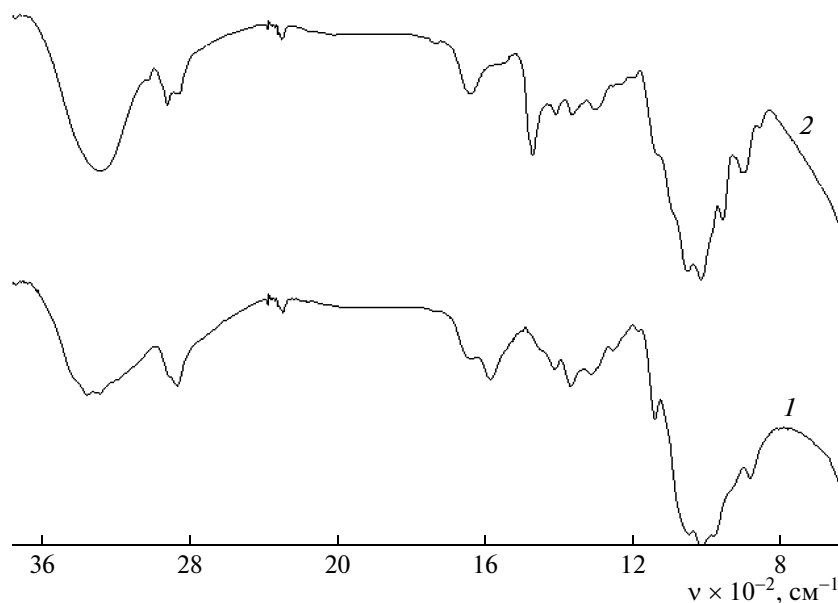


Рис. 1. ИК-Фурье спектры хитозана (1) и его модифицированного производного (2).

Взаимодействие хитозана с эпоксидными соединениями происходит с раскрытием эпоксидного цикла и в условиях модификации обеспечивается аминогруппами [20]. В результате образуется модифицированный хитозан, каждый из N-(2-окси-3-триметиламмоний) пропильных фрагментов которого содержит кватернизованную и вторичную аминогруппы.

Следует отметить, что в условиях реакции (при трехкратном избытке алкилирующего агента) в принципе может осуществляться дальнейшее алкилирование вторичных аминогрупп до третичных и кватернизованных аминогрупп. Однако такое протекание реакции должно осложняться действием стерического фактора. Маловероятно, что весьма объемная молекула алкилирующего агента ГТМАХ может беспрепятственно подходить не только к первичной аминогруппе, расположенной в непосредственной близости от цепи исходного хитозана, но и к уже образованной вторичной аминогруппе, которая экранирована столь же объемным N-(2-окси-3-триметиламмоний) пропильным фрагментом. Соответственно вероятность образования третичных аминогрупп должна существенно снижаться, а их дальнейшее превращение в кватернизованные аминогруппы становится практически невозможным из-за тех же стерических затруднений, которые в этом случае особенно выражены. Весомым аргументом в пользу того, что алкилирование практически прекращается после образования вторичных аминогрупп, являются данные элементного анализа модифицированного хитозана (по содержанию хлора, который вводится в полисахарид в виде противоиона кватернизованной аминогруппы

ГТМАХ). Найденное значение 9.4 ± 0.3 удовлетворительно совпало с величиной 9.42, рассчитанной в предположении 90% кватернизованных аминогрупп (от общего количества пиранозных звеньев) и с учетом присутствия воды в образце, содержание которой определяли методом ДСК. Если бы алкилирование осуществлялось и далее, количество упомянутых кватернизованных аминогрупп, а следовательно, и ионов хлора должно было бы возрастать, чего не наблюдается в эксперименте.

Структуру модифицированного хитозана исследовали методами ЯМР и ИК-Фурье спектроскопии. Сравнительный анализ ИК-Фурье спектров исходного хитозана и модифицированного хитозана (рис. 1) подтверждает структуру продукта, представленную на схеме. Основным доказательством введения четвертичных аммонийных групп в молекулу хитозана является появление в спектре модифицированного хитозана полосы (1477 см^{-1}), относящейся к метильным группам при аммонийном атоме азота [19, 20, 24, 25], что согласуется с ИК-спектром глицидилтриметиламмоний хлорида. Существенное уменьшение интенсивности полосы 1590 см^{-1} (первичный амин) указывает на практически полное исчезновение первичных аминогрупп в результате их превращения во вторичные. Деформационные колебания N—H вторичной аминогруппы проявляются в области $1580\text{--}1490 \text{ см}^{-1}$ [25]. Однако в этой же области присутствует полоса 1550 см^{-1} , соответствующая деформационным колебаниям N—H (Амид II) и валентным колебаниям C—N амидной связи в ацетильной группе, причем ее

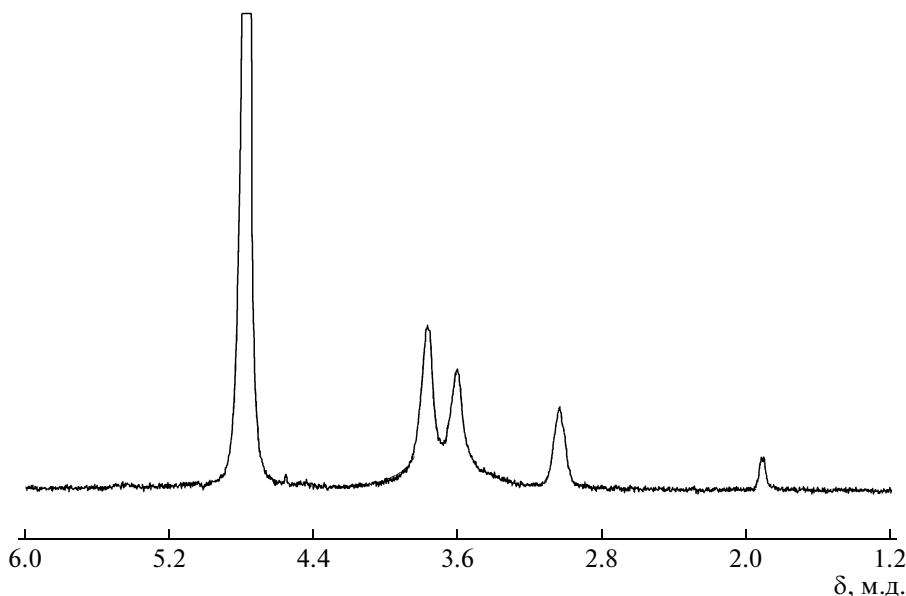


Рис. 2. Спектр ЯМР ^1H раствора хитозана в дейтерированной соляной кислоте.

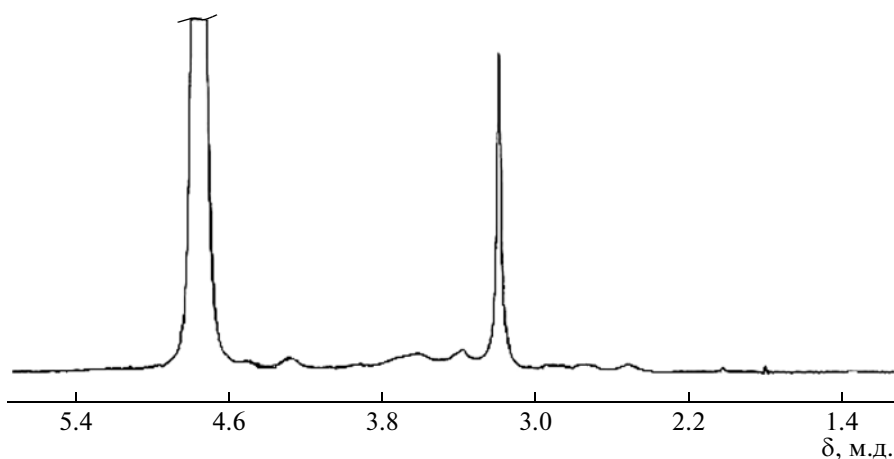


Рис. 3. Спектр ЯМР ^1H раствора модифицированного хитозана в D_2O .

интенсивность достаточно велика, что затрудняет идентификацию вторичной амногруппы.

В спектре модифицированного хитозана проявляется полоса 1646 см^{-1} , относящаяся к валентным колебаниям карбонильных групп $\text{C}=\text{O}$ (Амид I), входящих в состав ацетильных групп [25], которые не участвуют в модификации. Возрастание интенсивности широкой полосы в области 3300 см^{-1} , соответствующей гидроксильным группам, указывает на увеличение их количества в модифицированном хитозане, поскольку взаимодействие первичной аминогруппы хитозана с алкилирующим агентом приводит к раскрытию эпоксидного цикла с образованием гидроксильной группы. Интенсивность полос в области $1025\text{--}1060\text{ см}^{-1}$, относящихся к валентным коле-

баниям эфирных групп, а также пиранозного кольца ($900\text{--}930\text{ см}^{-1}$ и $840\text{--}900\text{ см}^{-1}$) остается практически неизменной; это свидетельствует о том, что пиранозные кольца основной цепи не затрагиваются в процессе модификации. Наблюдаемое незначительное перераспределение интенсивностей полос в данной области спектра может быть обусловлено появлением объемного заместителя в модифицированном звене и/или вкладом гидроксильной группы.

Дополнительным подтверждением структуры модифицированного хитозана служит сравнение спектров ЯМР ^1H растворов хитозана (рис. 2) и модифицированного хитозана (рис. 3), полученных соответственно в дейтерированной соляной кислоте и D_2O . О наличии четвертичного атома

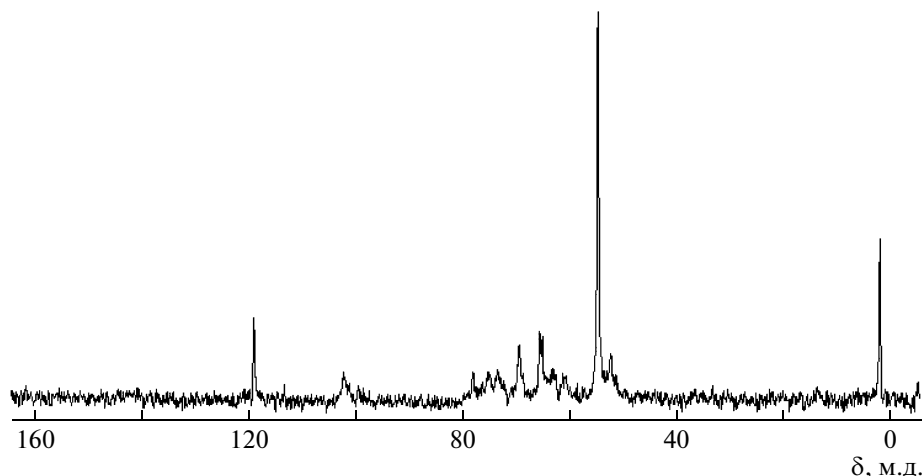


Рис. 4. Спектр ЯМР ^{13}C раствора модифицированного хитозана в D_2O .

азота в звене модифицированного хитозана свидетельствует появление интенсивного пика с хим. сдвигом 3.2 м.д. (рис. 3), соответствующего метильным протонам кватернизированной аминогруппы [26]. Удельные интенсивности пиков протонов метильных групп кватернизированного звена и ацетильной группы (рис. 3, 2.0 м.д.) соотносятся как 30 : 1, что согласуется со значением степени деацетилирования исходного хитина (90%) и свидетельствует о практически полном алкилировании первичных аминогрупп хитозана.

Полученные нами данные ИК-Фурье и ПМР-спектроскопии хорошо согласуются с опубликованными ранее результатами изучения структуры модифицированного хитозана теми же методами [27, 28].

Для ответа на вопрос о том, насколько селективно осуществляется алкилирование хитозана, проводили детальный анализ структуры модифицированного хитозана методом спектроскопии ЯМР ^{13}C . При отнесении пиков использовали литературные данные [26, 29] и расчетные спектры, отвечающие всем возможным присоединениям ГТМАХ. Наличие в спектре модифицированного хитозана (рис. 4) сигнала метильных групп с хим. сдвигом 54.5 м.д., относящегося к углеродам триметиламмониевой группы, указывает на присоединение ГТМАХ. Отсутствие в спектре модифицированного хитозана сигналов с хим. сдвигами 48 и 42 м.д., отвечающих присоединению ГТМАХ по гидроксилу метилольной группы при атоме углерода С5 и гидроксилу при атоме С3, убедительно свидетельствует о высокой селективности алкилирования, которое не осложняется замещением по гидроксильной группе. В спектре присутствуют пик с хим. сдвигом 22.0 м.д., соответствующий углеродам метильных групп ацетильных звеньев, а также пик с хим. сдвигом 102 м.д., отвечающий аномерному атому углерода С1, что

указывает на устойчивость ацетильных звеньев и пиранозных колец к алкилированию. Превращение первичной аминогруппы во вторичную подтверждается наличием в спектре ЯМР ^{13}C модифицированного хитозана сигнала с хим. сдвигом 52.10 м.д., соответствующего углеродам метиленовой группе при вторичном атоме азота.

Полученные результаты позволяют утверждать, что в ходе алкилирования хитозана происходит селективное присоединение ГТМАХ по атому азота с практически полной конверсией первичной аминогруппы во вторичную, которая протекает без изменения структуры основной цепи полисахарида. В результате образуется высокозаряженный поликатион, несущий в модифицированных звеньях четвертичную аминогруппу и вторичную аминогруппу, способную (де)протонироваться при изменении рН. Этот вывод находит свое подтверждение в экспериментах по взаимодействию модифицированного хитозана с ПСС-анионом.

Взаимодействие модифицированного хитозана с ПСС-анионом

Специфичность структуры модифицированного полисахарида накладывает свой отпечаток на его комплексобразование с полианионами, в частности, ПСС-анионом. Наличие в деацетилированных звеньях полностью заряженных кватернизированных аминогрупп существенно влияет на ионизацию соседних вторичных аминогрупп поликатиона, а значит, и на стабильность полиэлектролитных комплексов модифицированного хитозана.

Иллюстрацией такого влияния служит кривая потенциометрического титрования раствора модифицированного хитозана (рис. 5, кривая 1), которая располагается по оси ординат существенно

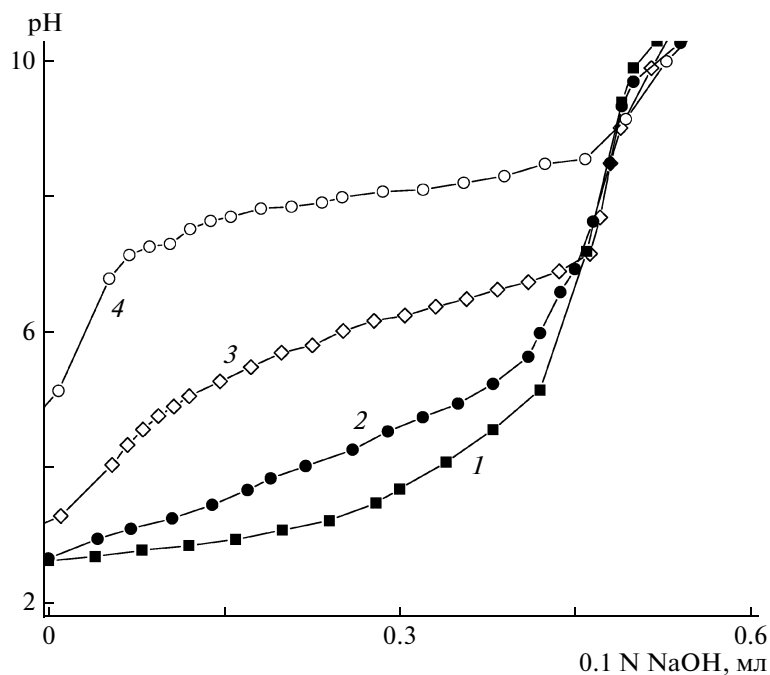


Рис. 5. Кривые потенциметрического титрования растворов модифицированного хитозана (1), хитозана (3) и смесей раствора ПСС₃₆₀ с раствором модифицированного хитозана (2) и хитозана (4). $[S] = [N_q] = [N] = 5 \times 10^{-3}$ моль/л.

ниже кривой титрования исходного хитозана (рис. 5, кривая 3). Рассчитанное из кривой 3 значение pK_a близко к $pK_a = 6.3$, известной для хитозана, тогда как величина pK_a для модифицированного хитозана, определенная из кривой 1, оказывается гораздо меньше и составляет 3.30. Наблюдаемый сдвиг кривой 1 по отношению к кривой 3 можно объяснить известным уменьшением величины pK_a при замене первичных аминогрупп поликатиона на вторичные (или третичные). Так, для разветвленного полиэтиленimina, содержащего первичные, вторичные и третичные аминогруппы в соотношении 1 : 2 : 1, значения pK_a составляют соответственно 9.7, 8.6 и 7.5 [30]. Однако большая разница в кривых титрования 1 и 3 указывает на дополнительное влияние на pK_a полисахарида других факторов, среди которых наиболее весомым может оказаться воздействие кватернизованных аминогрупп модифицированного хитозана на кислотно-основное равновесие. Наличие в цепи полисахарида большого числа положительно заряженных четвертичных атомов азота затрудняет подход протонов и препятствует ионизации вторичных аминогрупп, которая осуществляется только в сильно кислых средах. В пользу данного предположения свидетельствует ход кривой титрования смеси модифицированного хитозана и ПСС₃₆₀ состава $[S] : [N_q] = 1.0$, где на каждую кватернизованную аминогруппу N_q приходится одна стиролсульфонатная группа S. Из сравнения кривых 1 и 2 на рис. 5 следует, что

“блокировка” четвертичных аминогрупп модифицированного хитозана нейтрализацией их зарядов вводимым полианионом действительно приводит к поднятию кривой титрования полисахарида. Однако кривая титрования этой смеси также располагается под кривой титрования хитозана, что можно отнести к отмеченному выше различию в значениях pK_a первичных аминогрупп хитозана и вторичных аминогрупп модифицированного хитозана.

Дальнейшее увеличение относительного содержания полианиона в смеси ПСС и модифицированного хитозана качественно изменяет ход кривых титрования (рис. 6, кривая 3). На них появляется плато, закономерно расширяющееся, а при составах смесей, содержащих большой избыток стиролсульфонатных групп ($[S] : [N_q] \geq 2.0$), ход кривых остается практически неизменным (рис. 6, кривые 4 и 5). Возникновение плато и его относительное расположение обусловлены наличием в смесях избыточных количеств заряженных стиролсульфонатных групп, которые не титруются, но оказывают влияние на кислотно-основное равновесие. Как известно [31], присутствие сильно заряженной матрицы (в нашем случае ПСС-аниона) способствует ионизации противоположно заряженного слабого полиэлектролита. Соответственно в смеси состава $[S] : [N_q] = 1.5$, содержащей половину избыточных (т.е. не связанных с кватернизованными аминогруппами) стиролсульфонатных групп, примерно половина кривой

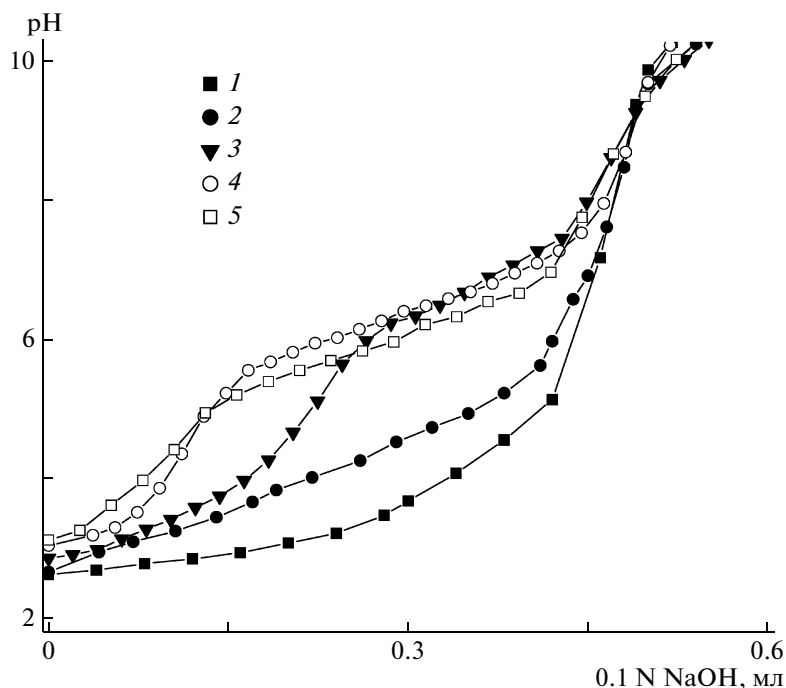


Рис. 6. Кривые потенциметрического титрования раствора модифицированного хитозана (1) и смесей растворов PSS₃₆₀ и модифицированного хитозана различного состава Z. Z = 1.0 (2), 1.5 (3), 2.0 (4) и 3.0 (5). [N_q] = 5 × 10⁻³ моль/л.

титрования полисахарида располагается в слабo-кислых и нейтральных средах, а при [S] : [N_q] = 2.0 практически все титрование осуществляется в этой области. Очевидно, что увеличение относительного содержания ПСС сверх указанного значения не должно изменять ход кривой титрования, как это и наблюдается в опытах. Аналогичным образом ведут себя смеси растворов ПСС и немодифицированного хитозана, в частности при составе [S] : [N] = 1.0, когда на каждую первичную аминогруппу N приходится одна стиролсульфонатная группа S (рис. 5, кривая 4). В данном случае плато на кривых титрования находится выше по оси ординат, что согласуется с более высоким значением pK_a первичных аминогрупп хитозана по сравнению с вторичными аминогруппами модифицированного хитозана.

Итак, присутствие сильно заряженного ПСС-аниона приводит к сдвигу ионизации вторичных аминогрупп модифицированного полисахарида в слабо кислую и нейтральную области. Есть все основания полагать, что аналогичное действие на модифицированный хитозан будут оказывать нуклеиновые кислоты, которые представляют собой полианионы с высокой плотностью ионизованных фосфатных групп на цепях. Это обстоятельство может быть важно для разработки биосовместимых и биodeградируемых носителей, способных доставлять генетический материал и лекарственные средства в клетки. Как известно, одним из ключевых моментов доставки целевой

нуклеиновой кислоты или олигонуклеотида в ядро клетки (так называемой трансфекции) является своевременный выход полиплекса (полиэлектrolитного комплекса катионного носителя с нуклеиновой кислотой), захваченного эндосомой или лизосомой, в цитоплазму. Если при попадании

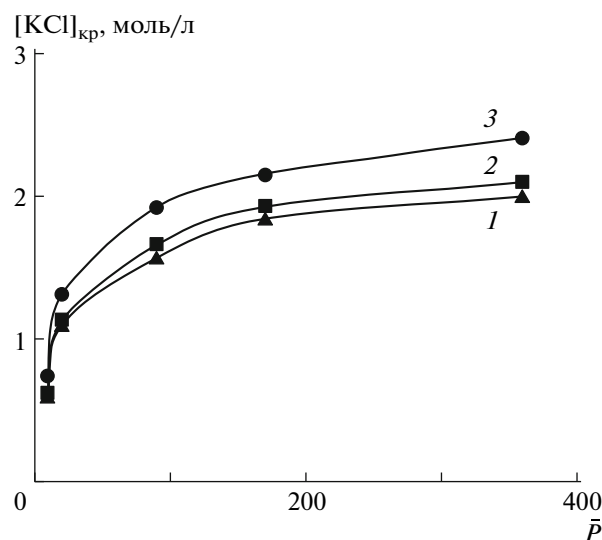


Рис. 7. Зависимость критической концентрации соли [KCl]_{кр}, соответствующей полному растворению смеси модифицированного хитозана и ПСС состава Z = 2.0 от степени полимеризации ПСС P̄ при pH 9.0 (1), 7.2 (2) и 5.5 (3).

полиплекса в слабо кислую среду, характерную для эндосом или лизосом, аминогруппы катионного носителя протонируются (как это происходит с вторичными аминогруппами модифицированного хитозана в присутствии сильно заряженного полианиона), может реализоваться механизм “протоновой губки” [20]. Его суть заключается в том, что ионизация аминогрупп влечет за собой приток низкомолекулярных противоионов (анионов), в результате чего резко повышается осмотическое давление внутри эндосом или лизосом, вызывающее их разрушение, что способствует выходу полиплекса в цитоплазму.

Протонирование вторичных аминогрупп модифицированного хитозана, обусловленное присутствием ПСС-аниона, приводит к образованию дополнительных ионных пар, что находит свое отражение в стабилизации комплекса. Определенная турбидиметрическим титрованием критическая концентрация соли $[KCl]_{кр}$, соответствующая полному растворению суспензии смеси модифицированного хитозана и ПСС состава $[S] : [N_q] = 2.0$, зависит от рН среды (рис. 7). При уменьшении рН от 9.0 до 7.2 наблюдается незначительная стабилизация комплекса, тогда как дальнейшее снижение рН до 5.5 сопровождается заметным увеличением значения $[KCl]_{кр}$. Такое поведение присуще смесям модифицированного хитозана со всеми изученными ПСС-анионами, различающимися степенью полимеризации (рис. 7). Стабилизация комплексов осуществляется в полном соответствии с результатами потенциометрического титрования смеси того же со-

става $[S] : [N_q] = 2.0$ (рис. 6, кривая 4), которые свидетельствуют о значительном возрастании степени ионизации вторичных аминогрупп модифицированного хитозана при понижении рН от 7.2 до 5.5.

Еще одним весомым аргументом в пользу действия электростатического поля ПСС-аниона, смещающего ионизацию связанного в комплекс модифицированного хитозана в слабо кислые среды, служат данные по измерению ζ -потенциала (рис. 8). Перезарядка комплексных частиц (нулевое значение ζ -потенциала) достигается при добавлении к раствору ПСС определенного количества модифицированного хитозана, которое в свою очередь зависит от рН среды. Поскольку на начальном этапе титрования вводимый полисахарид попадает в окружение полианионов, содержащих заведомо избыточное количество групп S по отношению к аминогруппам модифицированного хитозана, поведение системы можно сравнивать с данными потенциометрического титрования смесей полимерных компонентов, содержащих избыточные количества ПСС-аниона. Как и следовало ожидать, в слабо щелочных средах (рис. 8), когда вторичные аминогруппы практически не ионизованы, перезарядка осуществляется вблизи точки эквивалентности сульфатных групп и кватернизованных аминогрупп ($[S] \approx [N_q]$). Титрование в нейтральных средах происходит аналогичным образом, что согласуется с очень незначительным увеличением количества вторичных аминогрупп, способных ионизоваться в этих условиях (рис. 6, кривая 5). Ситуа-

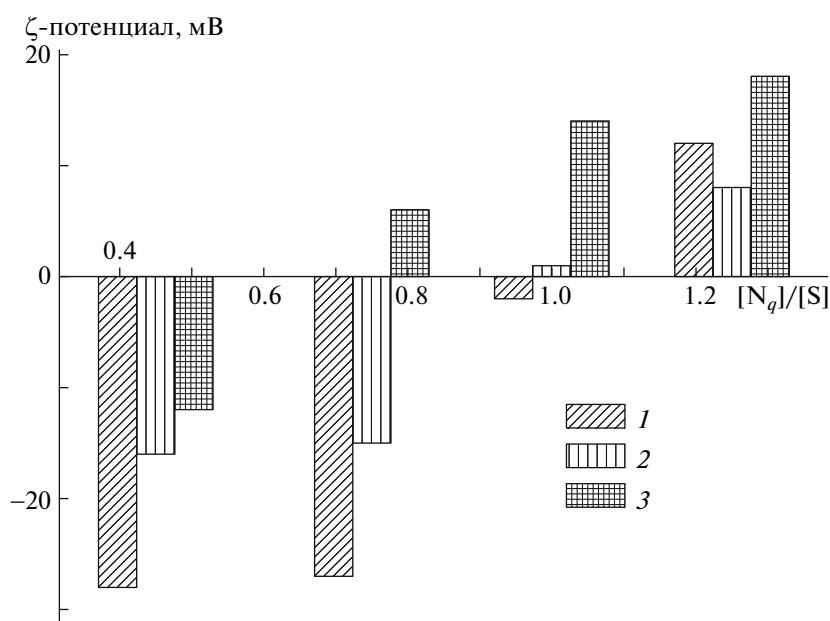


Рис. 8. ζ -потенциал частиц, образующихся при титровании раствора ПСС₃₆₀ раствором модифицированного хитозана при рН 9.0 (1), 7.2 (2) и 5.5 (3).

ция кардинально меняется при переходе к слабо кислым средам, в которых добавление половинного количества модифицированного хитозана оказывается достаточным для полной нейтрализации ПСС-аниона. Очевидно, что существенное повышение эффективности нейтрализации обусловлено протонированием вторичных аминогрупп модифицированного хитозана, связанного в комплекс, и находится в хорошем соответствии с данными потенциометрического титрования.

Таким образом, совокупность результатов, полученных в настоящей работе различными методами, подтверждает структуру модифицированного хитозана. Обнаруженная способность модифицированного хитозана связываться с высокозаряженным полианионом и при этом ионизоваться в слабо кислых средах может представлять особый интерес для разработки биосовместимых и биодеградируемых средств доставки генетического материала и лекарственных веществ в живые клетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vande Vord P.J., Matthew H.W.T., DeSilva S.P., Mayton L., Wu B., Wooley P.H.* // J. Biomed. Mater. Res. 2002. V. 59. № 3. P. 585.
- Onishi H., Mashida Y.* // Biomaterials. 1999. V. 20. № 2. P. 175.
- Lui Q., Dunn E.T., Grandmaison E.W., Goosen M.F.* // Application of Chitin and Chitosan / Ed. by M.F.A Goosen. P.A Lancaster: Technomic Publ., 1997. P. 3.
- Dutta P.K., Tripathi S., Mehrotra G.K., Dutta J.* // Food Chem. 2009. V. 114. № 4. P. 1173.
- Bégin A., Van Calsteren M.R.* // Int. J. Biol. Macromol. 1999. V. 26. № 1. P. 63.
- Bernkop-Schnurch A.* // Int. J. Pharm. 2000. V. 194. № 1. P. 1.
- Liu W.G., Yao K.D.* // J. Control. Rel. 2002. V. 83. № 1. P. 1.
- Strand S.P., Danielsen S., Christensen B.E., Varum K.M.* // Biomacromolecules. 2005. V. 6. № 6. P. 3357.
- Kean T., Roth S., Thanou M.* // J. Control. Rel. 2005. V. 103. № 3. P. 643.
- Varum K.M., Smidsrod O.* // Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility / Ed. by S. Dumitriu. New York: Marsel Dekker, 2004. P. 625.
- Danielsen S., Strand C., Davies C.L., Stokke B.T.* // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1721. № 1. P. 44.
- Domard A., Rinaudo M., Terrassin C.* // Int. J. Biol. Macromol. 1986. V. 8. № 4. P. 175.
- Le Dung P., Milas M., Rinaudo M., Desbrieres J.* // Carbohydrate Polymers. 1994. V. 24. № 3. P. 209.
- Snyman D., Hamman J.H., Kotze J.S., Rollings J.E., Kotze A.F.* // Carbohydrate Polymers. 2002. V. 50. № 2. P. 145.
- Polnok A., Borchard G., Verhoef J.C., Sarisuta N., Junginger H.E.* // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004. V. 57. № 1. P. 77.
- Runarsson O.V., Holappa J., Jonsdottir S., Steinsson H., Masson M.* // Carbohydrate Polymers. 2008. V. 74. № 3. P. 740.
- Stepnova E.A., Tikhonov V.E., Babushkina T.A., Klimova T.P., Vorontsov E.V., Babak V.G., Lopatin S.A., Yamskov I.A.* // Eur. Polym. J. 2007. V. 43. № 6. P. 2414.
- Holappa J., Nevalainen T., Savolainen J., Soininen P., Elomaa M., Safin R., Suvanto S., Pakkanen T., Masson M., Loftsson T., Jarvinen T.* // Macromolecules. 2004. V. 37. № 8. P. 2784.
- Lim S.H., Hudson S.M.* // Carbohydrate Research. 2004. V. 339. № 2. P. 313.
- Loubaki E., Sicsic S., Le Goffic F.* // Eur. Polym. J. 1989. V. 25. P. 379.
- Boussif O., Lezoualch F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 7297.
- Chavasit V., Kienzle-Sterzer C., Torres J.A.* // Polym. Bull. 1988. V. 19. № 3. P. 223.
- Гамзада А.И., Шлимак В.М., Скляр А.М., Штыкова Э.В., Павлова С.А., Розожин С.В.* // Acta Polymerica. 1985. V. 36. № 8. P. 420.
- Беллами И.* Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул. М.: Мир, 1971. С. 300.
- Nakanishi K.* // Infrared Absorption Spectroscopy. San-Francisco: Holden-Day Inc.; Tokio: Nankodo Comp. Lim, 1962.
- Леви Г., Нельсон Г.* Руководство по ЯМР ¹³C для химиков-органиков. М.: Мир, 1975.
- Loubaki E., Ourevitch M., Sicsic S.* // Eur. Polym. J. 1991. V. 27. № 3. P. 311.
- Nam C.W., Kim Y.H., Ko S.W.* // J. Appl. Polym. Sci. 1999. V. 74. № 9. P. 2258.
- Le Roy F., Jolinson, Jankowski W.G.* Carbon C 13 NMR Spectra. New York; London; Sidney, Toronto: Wiley, 1972.
- Baliff J.B., Lerf C., Schlapfer C.W.* // Chimia. 1994. V. 48. P. 336.
- Кабанов В.А.* // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 183.