

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 66.095.26

**СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
НАНОКОНТЕЙНЕРОВ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ АНИОННЫХ
ПОЛИСАХАРИДОВ, СШИТЫХ ИОНАМИ ДВУХВАЛЕНТНЫХ
МЕТАЛЛОВ, С ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПРЕПАРАТОМ
ДОКСОРУБИЦИНОМ**

**Алина Радиковна Лукманова¹, Виктория Сергеевна Кусая², Василий
Владимирович Спиридонов², Александр Анатольевич Ярославов²**

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет наук о материалах, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

Автор, ответственный за переписку: Алина Радиковна Лукманова,
lukmanovaalina@mail.ru

Аннотация. В работе представлены полимер-коллоидные наноконтейнеры на основе водорастворимых, биосовместимых, биоразлагаемых анионных полисахаридов: альгината натрия и гиалуроната натрия, сшитых ионами кальция и магния. В качестве лекарственного препарата для иммобилизации полученными наноконтейнерами был использован доксорубицин, характеризующийся флуоресцентными свойствами. Предложен подход к количественному определению термодинамических констант связывания доксорубицина с наноконтейнерами и линейными полисахаридами, который основан на способности наноконтейнеров к тушению флуоресценции доксорубицина при их взаимодействии. Предложенный подход позволил количественно оценить способность наноконтейнеров удерживать иммобилизованный доксорубицин.

Ключевые слова: полисахариды, наноконтейнеры, доксорубицин

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2025-66-4-303-309

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 23-23-00156).

Для цитирования: Лукманова А.Р., Кусая В.С., Спиридонов В.В., Ярославов А.А. Способ количественной оценки взаимодействия наноконтейнеров на основе природных анионных полисахаридов, сшитых ионами двухвалентных металлов, с лекарственным препаратом доксорубицином // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2025. Т. 66. № 4. С. 303–309.

ORIGINAL ARTICLE

APPROACH TO QUANTITATIVE ASSESSMENT OF INTERACTION OF
NANOCONTAINERS BASED ON NATURAL ANIONIC POLYSACCHARIDES
CROSS-LINKED WITH DIVALENT METAL IONS AND DOXORUBICINAlina R. Lukmanova¹, Victoria S. Kusaia², Vasily V. Spiridonov²,
Alexander A. Yaroslavov²¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Material Science, Moscow, Russia² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, Russia**Corresponding author:** Alina R. Lukmanova, lukmanovaalina@mail.ru

Abstract. Herein, we report about polymer-colloid drug carriers based on water-soluble, biocompatible, biodegradable anionic polysaccharides such as sodium alginate and sodium hyaluronate cross-linked with calcium and magnesium ions. Doxorubicin characterized by fluorescent properties was used as a drug for immobilization by the prepared nanocontainers. An approach to quantitative determination of thermodynamic constants of doxorubicin binding to nanocontainers and linear polysaccharides was proposed, which is based on the ability of nanocontainers to quench fluorescence of doxorubicin during interaction. The proposed approach allowed to quantitatively assessing the ability of nanocontainers to retain doxorubicin immobilized.

Keywords: polysaccharides, nanocontainers, doxorubicin

Financial Support. The work was supported by the Russian Science Foundation (project 23-23-00156).

For citation: Lukmanova A.R., Kusaia V.S., Spiridonov V.V., Yaroslavov A.A. Approach to Quantitative Assessment of Interaction of Nanocontainers Based on Natural Anionic Polysaccharides Cross-Linked with Divalent Metal // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Khimiya. 2025. T. 66. № 4. S. 303–309.

Направленный транспорт и доставка лекарственных препаратов – один из ключевых этапов терапии различных заболеваний. Основным достоинством направленной доставки является концентрирование лекарственного препарата в определенном органе или живой ткани, а также предотвращение рассеивания лекарства по организму. В результате уменьшается доза введенного препарата и устраняются побочные явления от воздействия терапевтических средств на здоровые клетки [1, 2].

Направленный транспорт лекарственных препаратов невозможен без молекулярных контейнеров, способных предварительно иммобилизовать лекарство. Вместе с тем контейнеры, способные иммобилизовать лекарственный препарат, должны быть биосовместимыми и биodeградируемыми. Среди материалов для создания молекулярных контейнеров, одновременно характеризующихся перечисленными свойствами, особое внимание привлекают полисахариды природного происхождения – альгинат и гиалу-

ронат натрия. Эти полимеры являются биосовместимыми, нетоксичными, неиммуногенными и биоразлагаемыми, что делает их подходящими кандидатами для биомедицинского применения [3]. Альгинат натрия и гиалуронат натрия привлекают внимание для использования в системах контролируемого высвобождения лекарств, поскольку они обеспечивают: легкость внедрения, контролируемое и прогнозируемое высвобождение лекарства в течение определенного времени, а также минимизацию возможности неблагоприятных побочных эффектов по сравнению с классическими системами доставки [4, 5].

В целях создания таких наноконтейнеров линейные макромолекулы анионных полисахаридов сшивают ионами поливалентных (двух-, трех-, четырехвалентных металлов). В результате взаимодействия линейных макромолекул (альгината, гиалуроната) со сшивающими ионами формируются композиты, характеризующиеся трехмерной пространственной гидрогелевой структурой [6, 7].

Такие композиты представляют собой полимерные наноконтейнеры, способные удерживать в большом количестве воду и лекарственный препарат в объеме трехмерной сетки [8, 9]. При этом каркасная структура таких наноконтейнеров может оказывать существенное влияние на удержание лекарств, а следовательно, и на предотвращение рассеивания лекарств в ходе их транспорта к органам или тканям [10, 11].

В настоящей статье описан способ получения наноконтейнеров на основе таких природных полисахаридов, как альгинат натрия и гиалуронат натрия, с применением в качестве сшивающих агентов ионов двухвалентных металлов: Ca^{2+} и Mg^{2+} (Alg-Ca^{2+} (Mg^{2+}) и Hyal-Ca^{2+} (Mg^{2+}) соответственно) для последующей иммобилизации противоопухолевого препарата доксорубин (DOX) (рис. 1). Кроме того, в работе предложен способ количественного определения параметров связывания DOX с полученными наноконтейнерами. Для приготовления наноконтейнеров Alg-Ca^{2+} (Mg^{2+}) использовали следующий подход. К 5 мл 0,1%-го раствора альгината натрия добавляли 16,2 мкл раствора, содержащего 0,28 мг хлорида кальция (или 17,6 мкл раствора, содержащего 0,3 мг сульфата магния) и перемешивали в течение 24 ч. Для приготовления наноконтейнеров Hyal-Ca^{2+} (Mg^{2+}) использовали аналогичный подход. К 5 мл 2%-го раствора гиалуроната натрия добавляли 1 мл раствора, со-

державшего 3,3 мг хлорида кальция (или 3,75 мг сульфата магния) и перемешивали в течение 24 ч. В результате были получены соединения, представляющие собой наноконтейнеры с молярным соотношением между анионными звеньями (карбоксильными группами) полисахаридов, альгината и гиалуроната, и катионами сшивающих ионов кальция (магния),

$$[\text{Alg}]/[\text{Ca}^{2+}] = [\text{Alg}]/[\text{Mg}^{2+}] = [\text{Hyal}]/[\text{Ca}^{2+}] = [\text{Hyal}]/[\text{Mg}^{2+}], \text{ равным } 10/1.$$

С помощью метода лазерного микроэлектрофореза установлено, что все полученные соединения, а также исходные линейные полисахариды (Alg-Na и Hyal-Na) характеризуются отрицательными значениями zeta-потенциалов (табл. 1). Методом динамического рассеяния света установлено, что размеры (гидродинамические диаметры) полученных наноконтейнеров существенно меньше размеров макромолекулярных клубков исходных полисахаридов и составляют от 120 до 200 нм (табл. 1).

Взаимодействие линейных полисахаридов со сшивающими ионами происходит в результате электростатического взаимодействия карбоксильных групп в составе анионных полисахаридов с противоположно заряженными ионами двухвалентных металлов. В результате этого взаимодействия происходит формирование частиц, характеризующихся пространственной

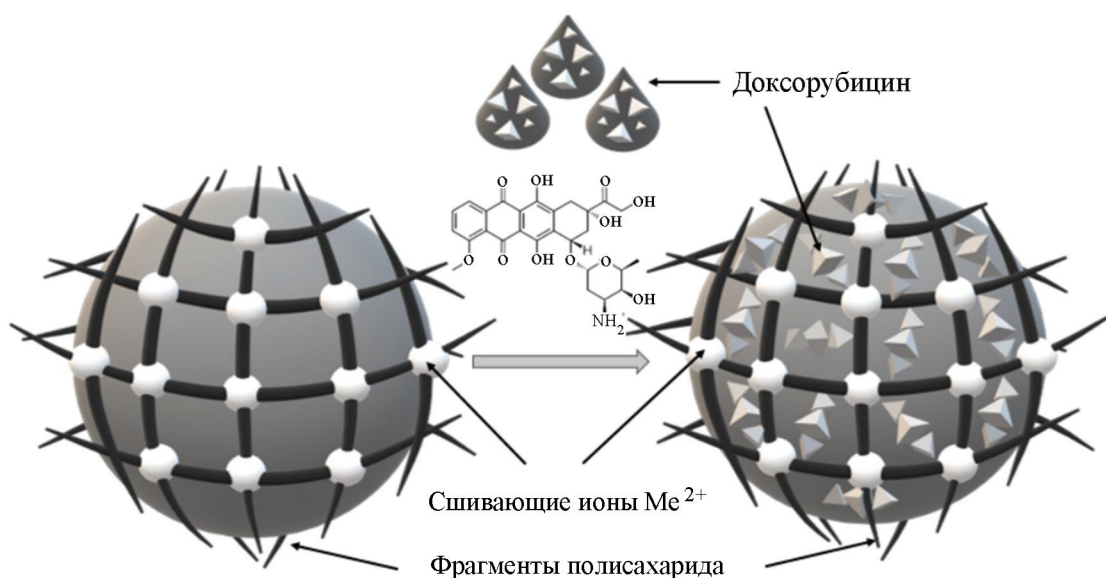


Рис. 1. Иммобилизация DOX наноконтейнерами на основе анионных полисахаридов, подшитых ионами двухвалентных металлов

Т а б л и ц а 1

Гидродинамические и электрокинетические характеристики наноконтейнеров, содержащих альгит и гиалуронат

Показатель	Alg	[Alg]/[Ca ²⁺]	[Alg]/[Mg ²⁺]	Hyal	[Hyal]/[Ca ²⁺]	[Hyal]/[Mg ²⁺]
<i>D_h</i> , нм	630	190	220	330	220	270
ЭФП, мкм/с/В/см	−3,8	−2,10	−3,40	−4,8	−3,6	−4,0

трехмерной структурой. При этом функциональные группы полисахаридов, не участвующие в связывании ионов двухвалентных металлов, экспонированы наружу и обеспечивают отрицательный заряд, а следовательно, растворимость синтезированных соединений.

Использование полученных соединений в качестве наноконтейнеров продемонстрировано с помощью DOX. Для приготовления наноконтейнеров Alg-Ca²⁺ (Mg²⁺), заполненных DOX, использовали следующий подход. К 1 мл 0,1%-го раствора Alg-Ca²⁺ (Mg²⁺) добавляли 137 мкл раствора, содержащего 0,273 мг DOX и перемешивали в течение 24 ч. Для приготовления наноконтейнеров Hyal-Ca²⁺ (Mg²⁺), заполненных DOX, использовали аналогичный подход. В результате молярное соотношение карбоксильных групп в составе исследуемых наноконтейнеров для каждого образца было следующим:

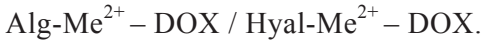
[Alg]/[DOX] = [Hyal]/ [DOX] = 10.

Полученные растворы тройных наноконтейнеров Alg-Me²⁺ – DOX / Hyal-Me²⁺ – DOX диа-

лизировали против бидистиллированной воды и лиофилизировали. Затем высушенные тройные гидрогели растворяли в буферном растворе TRIS (pH 7,0). Формирование тройных композитов



подтверждали с помощью методов УФ-спектрофотометрии и флуориметрического титрования. Были зарегистрированы УФ-спектры растворов DOX и серии наноконтейнеров



Типичный УФ-спектр растворов DOX в присутствии и в отсутствие наноконтейнеров Alg-Ca²⁺ представлен на рис. 2. Аналогичная картина была зафиксирована для всех остальных исследуемых в работе наноконтейнеров.

УФ-спектры доксорубина в присутствии наноконтейнеров Alg-Me²⁺ и Hyal-Me²⁺ демонстрируют уменьшение интенсивности полосы при значении λ, равном 234, 250 и 290 нм. Полученный результат указывает на электростатическое взаимодействие доксорубина (через протони-

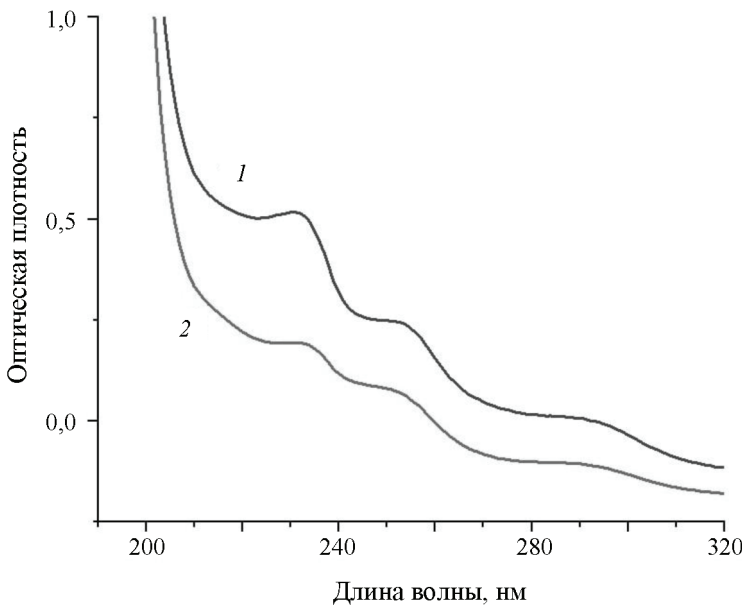


Рис. 2. УФ-спектр растворов DOX в присутствии и в отсутствие наноконтейнеров Alg-Ca²⁺: 1 – DOX; 2 – (Alg-Ca²⁺ – DOX)

рованные аминогруппы) и наноконтейнера (через заряженные карбоксильные группы), а также на образование комплексов $\text{Alg-Me}^{2+} - \text{DOX}$ и $\text{Hyal-Me}^{2+} - \text{DOX}$.

Флуориметрическое титрование проводили на спектрофлуориметре Hitachi F-3000 (Hitachi, Япония). Для этого к 1×10^{-5} М раствору доксорубина последовательно добавляли по 20 мкл водного раствора двухкомпонентного наноконтейнера Alg-Me^{2+} концентрацией $2 \cdot 10^{-3}$ мг/мл, по 25 мкл водного раствора двухкомпонентного наноконтейнера Hyal-Me^{2+} концентрацией $1 \cdot 10^{-1}$ мг/мл. Аналогичным образом были добавлены также растворы линейных полисахаридов: альгината и гиалуроната натрия.

На основании полученных результатов построены зависимости I_0/I от C , где (I_0 – интенсивность флуоресценции доксорубина при длине волны 590 нм, I – интенсивность флуоресценции доксорубина при длине волны 590 нм в присутствии тушителей флуоресценции (линейных полисахаридов и наноконтейнеров на основе альгината и гиалуроната, содержащих ионы Ca^{2+} или Mg^{2+} , C – концентрация индивидуальных частиц тушителя флуоресценции в растворе, моль/л).

Типичная зависимость I_0/I от C представлена на рис. 3 для системы $\text{Alg-Ca}^{2+} - \text{DOX}$. Представленная зависимость содержит участки линейного роста значения I_0/I и выход его на предел. Количественной характеристикой взаимодействия наноконтейнеров, а также линейных макромолекул с доксорубином является константа тушения флуоресценции.

Для определения константы тушения доксорубина линейный участок аппроксимировали с помощью уравнения Штерна – Фольмера и определяли тангенс угла наклона [12], константа тушения ДОКС соответствовала константе устойчивости комплекса $\text{Alg-Me}^{2+} - \text{DOX}$. Аналогичным образом были определены константы устойчивости комплексов остальных наноконтейнеров и линейных полисахаридов, которые были исследованы в работе. Полученные результаты представлены в табл. 2, 3.

Полученные результаты свидетельствуют о существенной разнице в связывании ДОХ линейными полисахаридами и наноконтейнерами на их основе. Особенно эта разница проявляется в случае систем, содержащих альгинат. Это можно объяснить, если принять во внимание, что тушение флуоресценции ДОХ происходит при его самоорганизации в стэкинг-структуры. Следует отметить также влияние сшивающих ионов металлов на компактизацию полученных наноконтейнеров. Поскольку сшивка линейных полисахаридов ионами Ca^{2+} или Mg^{2+} приводит к получению более компактных частиц, происходит увеличение плотности карбоксильных групп в объеме частиц наноконтейнеров и электростатическое взаимодействие флуорофора с наноконтейнерами оказывается более выраженным. Разница в значениях констант связывания систем на основе гиалуроната и альгината обусловлена, в свою очередь, различной линейной плотностью заряда на гиалуронате и альгинате. Так, в случае гиалуроната натрия карбоксильные группы содержат каждое второе звено в составе макромолекулы, а альгинат

Т а б л и ц а 2

Константы связывания доксорубина в наноконтейнерах $\text{Alg-Ca}^{2+} - \text{DOX}$ / $\text{Hyal-Ca}^{2+} - \text{DOX}$

$\text{Ca}^{2+} \div \text{Alg/ Hyal}$	Линейные макромолекулы	Наноконтейнеры
Константа тушения $K, \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Alg)	27 ± 5	1030 ± 100
Константа тушения $K, \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Hyal)	$1,7 \pm 0,5$	$7,5 \pm 0,6$

Т а б л и ц а 3

Константы связывания доксорубина в наноконтейнерах $\text{Alg-Mg}^{2+} - \text{DOX}$ / $\text{Hyal-Mg}^{2+} - \text{DOX}$

$\text{Mg}^{2+} \div \text{Alg/ Hyal}$	Линейные макромолекулы	Наноконтейнеры
Константа тушения $K, \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Alg)	27 ± 5	450 ± 50
Константа тушения $K, \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Hyal)	$1,7 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,3$

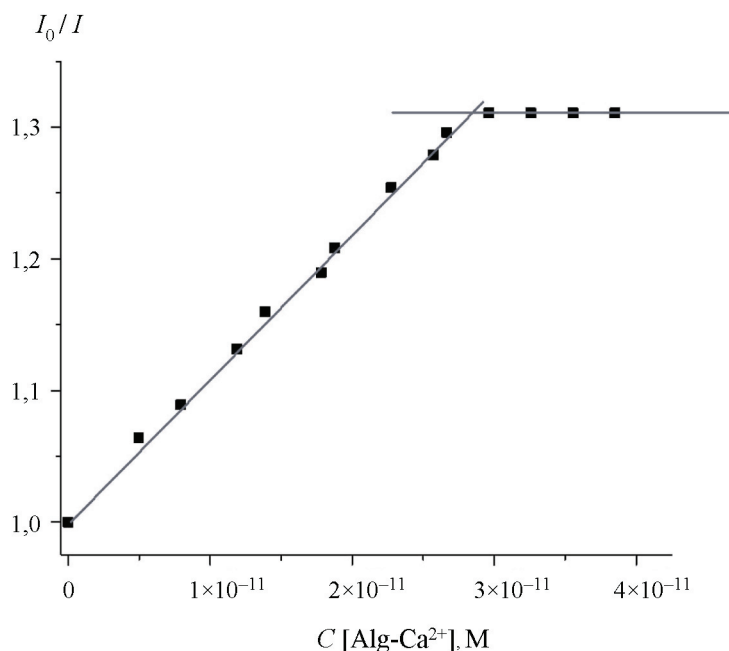


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации наноконтейнера Alg-Ca²⁺

натрия характеризуется наличием карбоксильной группы в каждом звене. Поэтому линейная плотность заряда выше в случае альгината натрия, что приводит к более сильному электростатическому взаимодействию между макромолекулами альгината и доксорубина.

Таким образом, сшивка анионного альгината и гиалуроната натрия катионами двухвалентных металлов в водном растворе приводит к формированию компактных частиц наноконтейнеров,

которые могут включать и удерживать катионный противоопухолевый антибиотик DOX. Показано, что константы связывания DOX синтезированными наноконтейнерами выше, чем соответствующие величины для исходных линейных полисахаридов. Эти результаты могут быть использованы в целях применения наноконтейнеров для количественного инкапсулирования и направленной доставки биологически активных и лекарственных веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tamargo J., Le Heuzey J.-Y., Mabo P. // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2015. Vol. 71. P. 549.
2. Meng X., Yang D., Keyvan G., Michniak-Kohn B., Mitra S. // *Colloids Surf. B.* 2012. Vol. 92. P. 213.
3. Pelletier S., Hubert P., Lapique F., Payan E., Delacherie E. // *Carbohydrate Polymers*, 2000. Vol. 43. N 4. P. 343.
4. Yuanping H., Weiping Z., Zhanyi S., Demeng Z., Kunyan S., Peili S., Peifeng L., Qihui Z. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. Vol. 183. P. 1978.
5. Radulescu M., Holban A.-M., Mogoanta L., Balceanu T.-A., Dan Mogosanu G., Savu D., Popescu R.-C., Fufa O., Grumezescu A.-M., Bezirtzoglou E., Lazar V., Chifiriuc M.-C. // *Molecules*, 2016. Vol. 21. P. 761.
6. Chan L. W., Jin Y., Heng P. W. S. // *Int. J. Pharm.*, 2002. Vol. 242. P. 255.
7. Kolosova O. Yu., Shaikhalie A. I., Krasnov M. S., Bondar I. M., Sidorskii E. V., Sorokina E. V., Lozinsky V. I. // *Gels*, 2023. Vol. 9. N 2. P. 113.
8. Yang H., Shena L., Bu H., Li G. // *Carbohydrate Polymers*, 2019. Vol. 222. P. 114974.
9. Lozinsky V. I. // *Gels*, 2018. Vol. 4. N 3. P. 77.
10. Evans B. C., Fletcher R. B., Kilchrist K. V., Dailing E. A., Mukalel A. J., Colazo J. M., Oliver M., Cheung-Flynn J., Brophy C. M., Tierney J. W., Isenberg J. S., Hankenson K. D., Ghimire K., Lander C., Gersbach C. A., Duvall C. L. // *Nat. Commun.*, 2019. Vol. 10. P. 5012.
11. Popova E. V., Morozova P. V., Uspenskaya M. V., Radilov A. S. // *Russ. Chem. Bull.*, 2021. Vol. 70. 1335.
12. Fraiji L.K., Hayes D.M., Werner T.C. // *J. Chem. Educ. ACS Publications*, 1992. Vol. 69. N 5. P. 424.

Информация об авторах

Лукманова Алина Радиковна – студентка факультета наук о материалах МГУ имени М.В. Ломоносова (lukmanovaalina@mail.ru);

Виктория Сергеевна Кусая – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (kusaya.vika@yandex.ru);

Василий Владимирович Спиридонов – доцент кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук, (vasya_spiridonov@mail.ru);

Александр Анатольевич Ярославов – зав. кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, чл.-корр. РАН (alexuyaroslavov@yandex.ru).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 20.03.2024;
одобрена после рецензирования 22.05.2024;
принята к публикации 25.12.2024.