

Інститут біології клітини  
Національна академія наук України

Інститут біології клітини  
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

МАНЬКО НАЗАР ОЛЕГОВИЧ

УДК 579.23:582.282.23]:577.322.047

## ДИСЕРТАЦІЯ

# ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У КОМПЛЕКСАХ З ФРАГМЕНТАМИ ХІТОЗАНУ І ПОХІДНИМИ ПОЛІВІНІЛПРОЛІДОНУ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ПРОКАРІОТИЧНИХ ТА ЕВКАРІОТИЧНИХ КЛІТИН

091 - біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Н.О. Манько

Науковий керівник: Стойка Ростислав Степанович, доктор біологічних наук,  
професор

Львів - 2021

ЗМІСТ.....	2
АНОТАЦІЯ .....	5
SUMMARY .....	11
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ .....	16
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	17
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	20
ВСТУП .....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	26
Застосування природних і синтетичних полімерів у біології і медицині.....	26
1.1. Хітозан: загальна характеристика і біомедичні аспекти його застосування.....	27
1.1.1. Хітозан у лікуванні ран та опіків.....	30
1.1.2. Протимікробні властивості хітозану.....	32
1.1.3. Використання хітозану як платформи для доставки ліків.....	37
1.2. Полівінілпіролідон.....	39
1.2.1 Фізико-хімічні властивості полівінілпіролідону.....	40
1.2.2. Біологічні властивості полівінілпіролідону.....	41
1.2.3. Використання полівінілпіролідону як платформи для доставки ліків.....	43
1.3. Пептидоміметики у біології і медицині.....	45
1.3.1. Походження пептидоміметиків і джерела їх отримання.....	45
1.3.2. Модифікація пептидів та їх застосування.....	46
Підсумок огляду літератури.....	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	50
2.1. Визначення середньої молекулярної маси продуктів гідролізу хітозану методом віскозиметрії.....	50
2.2. Спектроскопічне дослідження методом FTIR спектроскопії.....	50

2.3. Спектрофотометричне дослідження методом UV-vis спектроскопії.....	51
2.4. Аналіз розподілу молекул хітозану за молекулярною масою методом електрофорезу.....	51
2.5 Культура клітин та визначення цитотоксичності за допомогою тесту з використанням МТТ .....	53
2.6 Визначення протибактерійної активності методом МТТ.....	54
2.7 Вивчення протигрибкової активності за допомогою визначення колонієутворюючих одиниць .....	55
2.8 Методика детекції FITC мічених носіїв.....	56
2.9 Детекція АФК за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням DCFDA.....	56
2.10 Отримання нормальних лімфоцити людини та їх культивування <i>in vitro</i> .....	57
2.11 Приготування хітозан-етакридинового комплексу.....	58
2.12 Вивчення фармакокінетики комплексу хітозан-етакридин.....	58
2.13 Фарбування клітин нейтральним червоним та Hoechst 33342 .....	58
2.14 Виявлення білків-мішеней комплексу P4P за допомогою мас-спектрометрії .....	59
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	62
3.1. Хітозан і його похідні.....	63
3.1.1. Отримання і характеристика хітозану з різних джерел.....	63
3.1.2. Вплив хітозану та його похідних на еукаріотичні клітини.....	78
3.1.3. Протимікробні властивості хітозану та його похідних.....	82
3.1.4. Імобілізація етакридину хітозаном та біологічні властивості отриманого комплексу .....	96
3.2. Кон'югати на основі похідних полівнілпіролідону.....	100

3.2.1. Кон'югування пептидів з похідними полівінілпіролідону.....	100
3.2.2. Вивчення властивостей трипептиду сироватки крові людини і його синтетичних аналогів .....	102
3.2.3. Вплив кон'югату трипептиду Сер-Про-Цис з полівінілпіролідом на життєздатність і виживаність клітин ссавців.....	104
3.2.4. Механізми проникнення кон'югату трипептиду Сер-Про-Цис з полівінілпіролідом в клітини ссавців та його локалізація в клітинах-мішенях.....	114
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	120
ВИСНОВКИ.....	128
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРА.....	130
ДОДАТОК 1.....	156

## АНОТАЦІЯ

*Манько Н.О.* Вплив біологічно активних речовин у комплексах з фрагментами хітозану і похідними полівінілпіролідону на життєздатність прокаріотичних та еукаріотичних клітин. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 «Біологія» (09 – Біологія). - Інститут біології клітини НАН України. - Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2021.

Дисертація присвячена дослідженню в галузі використання полімерів та їх похідних в медицині та біотехнології.

У фармацевтиці використовують все більше медикаментів, іммобілізованих на різноманітних носіях. На роль таких носіїв претендують як природні, так і синтетичні полімери, здатні розширити можливості застосування ліків, зменшити їхню загальну токсичність, пролонгувати дію медикаментозних препаратів в організмі людини, чи прискорити детоксикацію організму. Полімери використовують не лише як каркас для приєднання різноманітних компонентів із певною біологічною активністю, наприклад, ензимів чи ліків, але й як такі, що мають власну біологічну активність.

Хітозан, що є основним похідним хітину, вважають одним із найбільш перспективних полімерів природного походження. Він є нетоксичним, біосумісним і біодеградабельним біополімером. Протягом останніх кількох років хітозан привертає особливу увагу як перспективний і відносно дешевий матеріал для широкого застосування, зокрема в медицині. Встановлено, що хітозан володіє протибактерійною, кровозупинною, хелатуючою і фунгіцидною дією.

Основним джерелом для отримання хітину з метою наступного приготування хітозану є морські безхребетні організми. Іншим джерелом хітину часто служать комахи, які можуть бути шкідниками (сарана) чи

використовуються в промисловості (тутовий шовкопряд). В Україні перспективним промисловим джерелом можуть виступати медоносні бджоли (*Apis mellifera*), а точніше весняний підмор (тіла бджіл, загиблих після зимівлі).

Важливою властивістю хітозану є позитивний заряд, що надає йому високої адгезивності і дозволяє використовувати його як носій чи біо-фільтр. Дану речовину застосовують в експериментальній біології як носій ДНК, а препарат «Селох» використовують також у військовій медицині як кровоспинний засіб. Раніше показано можливості застосування хітозану в аграрній галузі і ветеринарії, а також в екології як біо-фільтр для очищення стічних вод.

Полівінілпіролідон є синтетичним полімером, який первинно використовувався як замітник плазми крові, а зараз застосовується у фармацевтиці та косметології. Він добре розчинний у полярних розчинниках і спиртах. Полівінілпіролідон, кон'югований з біологічно активними речовинами, зменшує їхню токсичність щодо людських клітин і забезпечує стабільність і розчинність у воді.

Зважаючи на вказані аргументи, дослідження впливу згаданих природного і синтетичного полімерів є актуальним і дозволить не лише розширити спектр речовин для зв'язування з біологічно активними речовинами, зокрема медикаментозних препаратів, але й створити на їхній основі нові препарати полімерів як носіїв ліків, так і полімерів із самостійною дією.

Метою даної роботи було охарактеризувати фізико-хімічні і біологічні властивості фрагментів хітозану і його комплексів із різними біологічно активними речовинами, а також визначити вплив комплексу модифікованого полівінілпіролідону зі специфічними пептидами на мікроорганізми, нормальні та пухлинні лінії клітин ссавців.

У дисертаційній роботі розроблено оригінальну методику отримання хітозану із хітину тіл бджіл та панцирів крабів, описані умови його стерилізації

та зберігання. Встановлено значну гетерогеність отримуваних зразків хітозану з різних джерел, включаючи промислові зразки.

Здійснене вивчення протимікробних властивостей хітозану відносно таких штамів мікроорганізмів як *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*. Продемонстровано високу перспективність хітозану як протигрибкового препарату, у т.ч. проти штамів *C. albicans* із мультирезистентністю до антибіотиків.

Встановлено, що зменшення молекулярної маси хітозану спричиняє підвищення його розчинності, але в той же час призводить до зниження його цитотоксичної дії на дріжджі *Candida albicans*, і, навпаки, фракції хітозану з більшою молекулярною масою володіють вищою протигрибковою активністю.

У роботі розроблено методику розчинення хітозану з використанням гліколевої кислоти, що дозволило отримувати розчинні зразки хітозану з високою молекулярною масою при нейтральному рН.

Розроблено оригінальну методику отримання хітозан-меланінового комплексу із підмору бджіл. Вивчено активність даного комплексу щодо штамів *C. albicans* ATCC 885-655, і клінічного ізоляту *C. albicans* N12, з мультирезистентністю до протигрибкових препаратів. Продемонстровано вищу активність хітозан-меланінового комплексу відносно штаму N12 з мультирезистентністю порівняно з такою активністю хітозану. Виявлено загибель дріжджових клітин *C. albicans* N12 при контакті з молекулами хітозану.

Показано низьку токсичність цього комплексу, а також хітозану щодо клітин ссавців за дози 0,2 мг/мл, у тому числі, щодо нормальних лімфоцитів периферичної крові людини, що свідчить про його біо-сумісність.

Дані результати свідчать про високу перспективність використання хітозан-меланінового комплексу для пригнічення резистентних до антибіотиків грибкових інфекцій з мінімальною шкодою для організму.

Розроблено оригінальну методику отримання хітину із плодових тіл базидіальних грибів, як ще одного перспективного джерела для отримання хітозану в промислових масштабах. Проведене спектральне дослідження хітозану, отриманого з грибів.

Створено комплекс хітозану краба з етакридину лактатом й обґрунтовано використання хітозану як носія медикаментозних препаратів. Встановлено вивільнення етакридину лактату з його комплексу з хітозаном, що забезпечило пролонгацію перебування етакридину лактату в крові піддослідних щурів у порівнянні з вільним етакридину лактатом. Отримані результати свідчать про можливість пролонгації дії медикаментозних препаратів у кровоносному руслі за допомогою їх кон'югування з хітозаном.

Здійснено ковалентне кон'югування мономерної форми трипептиду Сер-Про-Цис з похідними полівінліпіролідону, що дозволило створити кон'югати з різною біологічною активністю. Проведено скринінгове дослідження даних кон'югатів і вибрано модифікацію з найвищою цитотоксичною активністю *in vitro* щодо злоякісних клітин ліній MCF7 і HCT116 за дози кон'югату, який складався з полімеру (1,66 мг\мл) і ковалентно зв'язаного пептиду (0,13 мг\мл). Встановлено інгібування росту злоякісної лімфоми NK/Ly мишей пухлиноносіїв лінії C57/Black за кумулятивної дози 30 мг/кг протягом введення кон'югату *in vivo*. Разом з тим, дана комплексна сполука має відносно малу токсичність щодо псевдонормальних клітин лінії HEK293 ембріона нирки людини й активованих нормальних лімфоцитів периферичної крові людини.

Встановлено, кон'югат P4P із флуоресцентною міткою FITC у діапазоні 2-6 год проникає в клітини лінії MCF7 карциноми молочної залози людини і накопичується у везикулах клітин, але не потрапляє в їхнє ядро.

Доведено утворення активних форм кисню (за допомогою барвника DCFDA, що виявляє пероксид водню) за дії комплексу P4P на клітини лінії MCF7 карциноми молочної залози людини.



Розроблено оригінальний підхід для отримання білків-мішеней дії різних чинників з використанням магнітних частинок. За допомогою MALDI-TOFF мас-спектрометрії вперше ідентифіковано внутрішньоклітинні білки, які взаємодіють з комплексом P4P в клітинах мишачої лімфоми NK/Ly і можуть слугувати його молекулярними мішенями. Серед ідентифікованих білків знаходяться структурні білки клітин (актин, кератин цитоскелету, цитоплазматичний бета-актин, міозин) і сироватковий альбумін.

Результати проведеного дослідження комплексу P4P підтверджують перспективність застосування модифікованих похідних полівінілпіролідону для ковалентного кон'югування з молекулами біологічного генезу для створення нових медикаментозних препаратів. Важливим наслідком таких модифікацій є підвищення біологічної активності створеного кон'югату.

У дисертаційній роботі пояснені причини неоднозначних результатів, отриманих у різних лабораторіях під час тестування біологічної активності хітозану різного походження. Це розширює медичні, біотехнологічні та фармакологічні можливості застосування даного полімера і його похідних як носія та самостійного препарату. Розроблені оригінальні методики отримання хітозану дозволяють запропонувати його похідні у промислове виробництво на території України. Для цього можна використати місцеву сировину для виготовлення кровоспинних і протигрибкових препаратів.

Всі дослідження, представлені у дисертаційній роботі, було виконано особисто або за безпосередньої участі здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведений аналіз наукової літератури, виконана основна частина експериментальної роботи і статистична обробка даних. Планування роботи, аналіз та обговорення отриманого матеріалу, приготування рукописів статей проводилося з науковим керівником член-кор. НАН України, Стойкою Р. С. та науковими консультантами д.б.н., проф. Луциком М.Д, д.б.н., Котом Ю.Я, д. фарм. н., проф. Антонюком О.В.

Мас-спектрометрію білків проводили під керівництвом проф. Сергія Сушельницького в Національному Катарському Університеті (м. Доха, Катар)

в рамках гранту Фольцвагген (Німеччина). Мікроорганізми для дослідження протимікробної активності були отримані від кафедри генетики та біотехнології Університету імені Івана Франка

**Ключові слова:** хітозан, полімер, комплекс, полівінліпіролідон, дріжджі, *Candida albicans*, токсичність, білки мішені, лінії клітин пухлин.

## SUMMARY

*Manko N.O.* The influence of biologically active substances in complexes with fragments of chitosan derivatives and polyvinylpyrrolidone on the viability of prokaryotic and eukaryotic cells. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy 091 "Biology" (09 - Biology). Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine. - Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2021.

This research focuses on the use of polymers and their derivatives in medicine and biotechnology.

In the pharmaceutical industry uses more drugs immobilized on various carriers. The role of such carriers is claimed by both natural and synthetic polymers that can expand the possibilities of drug use, reduce their overall toxicity, prolong the action of drugs in the human body, or accelerate the detoxification of the body. Polymers are used not only as a framework for attaching various components with a certain biological activity, such as enzymes or drugs, but also as having their own biological activity.

Chitosan, which is the main derivative of chitin, is considered one of the most promising polymers of natural origin. It is a non-toxic, biocompatible and biodegradable biopolymer. Over the past few years, chitosan has attracted special attention as a promising and relatively cheap material for widespread use, particularly in medicine. It is established that chitosan has antibacterial, hemostatic, chelating and fungicidal action.

The main source for the production of chitin for the subsequent preparation of chitosan are marine invertebrates. Another source of chitin is often insects, which can be pests (locusts) or used in industry (mulberry silkworm). In Ukraine, a promising industrial source may be honey bees (*Apis mellifera*), or rather the spring plague (the bodies of bees that died after winter).

An important property of chitosan is a positive charge, which gives it high adhesion and allows it to be used as a carrier or bio-filter. This substance is used in

experimental biology as a DNA carrier, and the drug "Celox" is also used in military medicine as a hemostatic agent. Previously, the possibilities of using chitosan in agriculture and veterinary medicine, as well as in ecology as a bio-filter for wastewater treatment.

Polyvinylpyrrolidone is a synthetic polymer that was originally used as a substitute for blood plasma and is now used in pharmaceuticals and cosmetology. It is well soluble in polar solvents and alcohols. Polyvinylpyrrolidone, conjugated to biologically active substances, reduces their toxicity to human cells and provides stability and solubility in water.

In view of these arguments, the study said the impact of natural and synthetic polymers are relevant and will not only expand the range of materials for binding biologically active substances, including medicinal drugs, but also to create on their basis of new drugs polymers as carriers of drugs and polymers with independent action.

The aim of this study was to characterize the physicochemical and biological properties of chitosan fragments and its complexes with various biologically active substances, as well as to determine the effect of a complex of modified polyvinylpyrrolidone with specific peptides on microorganisms, normal and tumor mammalian cell lines.

In the dissertation work the original method of obtaining chitosan from chitin of bee bodies and crabs' shells is developed, the conditions of its sterilization and storage are described. Significant heterogeneity of the obtained samples of chitosan from different sources, including industrial samples, was established.

Realized study the antimicrobial properties of chitosan against such strains as *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*. The high promise of chitosan as an antifungal drug, including against strains of *C. albicans* with multidrug resistance.

Decrease molecular weight chitosan causes increase its solubility, but at the same time it reduces the cytotoxic effects on yeast *Candida albicans*, and, conversely, chitosan fractions with higher molecular weight have higher antifungal activity.

The method of dissolving chitosan using glycolic acid was developed in the work, which allowed to obtain soluble samples of chitosan with high molecular weight at neutral pH.

An original method of obtaining a chitosan-melanin complex from bee stings has been developed. The activity of this complex against strains of *C. albicans* ATCC 885-655, and clinical isolate of *C. albicans* N12, with multidrug resistance to antifungal drugs was studied. The higher activity of the chitosan-melanin complex against strain N12 with multidrug resistance was demonstrated compared to that of chitosan. The death of yeast cells of *C. albicans* N12 upon contact with chitosan molecules was detected.

The low toxicity of this complex, as well as chitosan against mammalian cells at a dose of 0.2 mg / ml, including against normal human peripheral blood lymphocytes, has been shown, indicating its biocompatibility.

These results indicate the high prospects for the use of chitosan-melanin complex to suppress antibiotic-resistant fungal infections with minimal harm to the body.

An original method for obtaining chitin from the fruiting bodies of basidiomycetes has been developed as another promising source for obtaining chitosan on an industrial scale. A spectral study of chitosan derived from fungi was performed.

A complex of chitosan crab with ethacridine lactate was created and the use of chitosan as a carrier of drugs was substantiated. The release of ethacridine lactate from its complex with chitosan was established, which ensured the prolongation of ethacridine lactate in the blood of experimental rats in comparison with free ethacridine lactate. The results indicate the possibility of prolonging the action of drugs in the bloodstream by conjugating them with chitosan.

Covalent conjugation of the monomeric form of the tripeptide Ser-Pro-Cis with polyvinylpyrrolidone derivatives was performed, which allowed to create conjugates with different biological activity. A screening study of these conjugates and selected the modification with the highest cytotoxic activity *in vitro* against

malignant cells of the MCF7 and HCT116 lines at a dose of conjugate consisting of polymer (1.66 mg/ml) and covalently bound peptide (0, 13 mg/ml).

Inhibition of NK/Ly malignant lymphoma growth was observed in tumor-bearing mice of the C57/Black line at a cumulative dose of 30 mg/kg during in vivo administration of the conjugate. However, this complex compound has relatively low toxicity to pseudonormal cells of the HEK293 line of the human kidney embryo and activated normal human peripheral blood lymphocytes.

It was found that the P4P conjugate with a FITC fluorescent label in the range of 2-6 h penetrates the cells of the MCF7 line of human breast cancer and accumulates in the vesicles of cells, but does not enter their nucleus.

An original approach has been developed to obtain target proteins of various factors using magnetic particles. Using MALDI-TOFF mass spectrometry was first identified intracellular proteins that interact with the complex P4P cells in mouse lymphoma NK / Ly and it can serve as molecular targets. Among the identified proteins are structural proteins of cells (actin, cytoskeleton keratin, cytoplasmic beta-actin, myosin) and serum albumin.

The results of the study of the P4P complex confirm the prospects of using modified polyvinylpyrrolidone derivatives for covalent conjugation with molecules of biological genesis to create new drugs. An important consequence of such modifications is an increase in the biological activity of the resulting conjugate.

The dissertation explains the reasons for the ambiguous results obtained in different laboratories during testing of the biological activity of chitosan of different origin. This expands the medical, biotechnological and pharmacological possibilities of using this polymer and its derivatives as a carrier and a stand-alone drug. Developed original methods of obtaining chitosan allow to offer its derivatives in industrial production in Ukraine. You can use local raw materials for the manufacture of hemostatic and antifungal drugs.

All studies presented in the dissertation were performed in person or with the direct participation of the applicant. The author of the dissertation independently analyzed the scientific literature, performed the main part of the experimental work

and statistical data processing. Work planning, analysis and discussion of the received material, preparation of manuscripts of articles was carried out with the supervisor of the corresponding member. NAS of Ukraine, Stoika RS and scientific consultants Dr., prof. Lootsik MD, Dr., Kit Yu.Ya., Dr., prof. Antonyuk OV.

Mass spectrometry of proteins was performed under the guidance of prof. Serhiy Sushelnytsky at the National University of Qatar (Doha, Qatar) under a grant from Volkswagen (Germany). Microorganisms for the study of antimicrobial activity were obtained from the Department of Genetics and Biotechnology, Ivan Franko University

Key words: chitosan, polymer, complex, polyvinylpyrrolidone, yeast, *Candida albicans*, toxicity, target proteins, tumor cell lines.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

### Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації

1. Manko N, Starykovych M, Bobak Y, Stoika R, Richter V, Koval O, Lavrik I, Horák D, Souchelnytskyi S, Kit Y. / The purification and identification of human blood serum proteins with affinity to the antitumor active RL2 lactaptin using magnetic microparticles. // Biomed Chromatogr. – 2019 Vol.33 P.46-47.
2. Paiuk O, Mitina N, Slouf M, Pavlova E, Finiuk N, Kinash N, Karkhut A, Manko N, Gromovoy T, Hevus O, Shermolovich Y Stoika R, Zaichenko A / Fluorine-containing block/branched polyamphiphiles forming bioinspired complexes with biopolymers. // Colloids Surf B Biointerfaces. – 2019. Vol.174. P.393-400.
3. Antonyuk V.O., Panchak L.V., Manko N.O., Stoika R.S. / Chitosan of peppery milky cap fungi (*Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr): isolation, study of its physicochemical properties and biological activity // Revista de chimie – 2020. Vol.71.
4. M. Lootsik, N. Manko, O. Gromyko, S. Tistechok, M. Lutsyk (jr.) ,R. Stoika / Honey bee chitosan-melanin complex: Isolation and investigation of its antimicrobial activity. // Ukr. Biochem. J. – 2020. Vol. 92. P.143-153

### *Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:*

1. Lootsik M. Antifungal activity of honeybee chitosan-melanin complex and its fragment / M. Lootsik, N. Manko, R. Stoika // Bridges 14th Annual Scientific, Bratislava, Slovak Republic, April 10-14, 2019: Book of abstracts. – Bratislava, 2019. – P. 140.
2. Manko N. Isolation of honeybee chitosan-melanin fragments and their effects on the viability of bacterial, fungi, and mammalian cells in vitro / N. Manko, M. Lootsik, S. Tistechok, O.Gromyko, R. Stoika // RECOOP



- 10<sup>th</sup> Annual Project Review Meeting, October 11-12, 2019 : Book of abstracts. – Wroclaw, 2019. – P. 80
3. Manko N. Effect of honeybee chitosan-melanin fragments upon viability in vitro of bacterial, fungi, and mammalian cells / N. Manko, M. Lootsik, S. Tistechok, O. Gromyko, R. Stoika // 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, Yaremche, Ukraine, 18-21 June 2019: Book of abstracts. – Yaremche, 2019. – P. 40
  4. Manko N. Biological activity of Ser-Pro-Cys peptide and its conjugates with synthetic functional polymers / N. Manko, M. Starykovich, O. Zaichenko, N. Mitina, O. Paiuk, R. Stoika, Y. Kit // XII Український біохімічний конгрес, Тернопіль Україна, 30 вересня – 04 жовтня 2019 р., Медична та клінічна хімія. Т. 21, № 3 (додаток) : Збірник тез. – Тернопіль, 2019. – С
  5. Kit Yu. Biological activity of Ser-Pro-Cys peptide and its nanoconjugates with synthetic polymers / Yu. Kit, N. Manko, A. Zaichenko, N. Mitina, O. Paiuk, M. Starykovich, R. Stoika. // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. Bratislava, Slovak Republic, October 11-14, 2018. Bratislava, 2018. P. 38
  6. Manko N. Biological activity of human blood serum peptide Prosercin and its synthetic analog Ser-Pro-Cys: N. Manko comparative analysis / N. Manko, M. Starykovich, S. Myronovsky, T. Negruch, N. Negruch, M. Shorobura, V. Richter, R. Panchuk, R. Stoika, Yu. Kit. // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. Bratislava, Slovak Republic, October 11-14, 2018. Bratislava, 2018. P. 70
  7. Lootsik M. Antimicrobial activity of honeybee chitosan-melanin complex and its hydrolytic fragments / M. Lootsik, N. Manko, M. Lutsyk (Jr.), R. Stoika. // International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology” Lviv. Ukraine, October 29-31, 2018. Lviv, 2018. – P.24
  8. Lootsik M. Studies on the antibacterial activity of honeybee chitosan and its derivatives / M. Lootsik, N. Manko, A. Karmash, R. Stoika // 7th

International Weigl Conference. September 26-29, 2017. Lviv, Ukraine.  
Abstracts Book. – 2017. – P. 46.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Сер-Про-Цис – трипептид з амінокислот серин, пролін, цистеїн

DDA(DD) – ступінь деацетиляції

Да – дальтон (міра ваги у полімерів,  $1.66053904 \times 10^{-27}$  кілограмма )

MW, MM – молекулярна маса

NMW – висока молекулярна маса

LMW – низька молекулярна маса

мол.м – молекулярна маса

ПВП - Полівінілпіролідон

FDA - Управлінням з контролю за продуктами та ліками

K - коефіцієнт в'язкості (відносно полівінілпіролідону)

PVP-I - повідонйодид

ЕС - етилцелюлозі

SEM – скануюча електронна мікроскопія

XRD - рентгенодіакційний аналіз

GLP-1 - глюкагоноподібний пептид-1

АДГ - антидіуретичний гормон

МТТ - (3- [4,5-диметилтіазол-2-іл] -2,5-дифенілтетразолію бромід; тіазоліл синій)

DCFDA – ( 2',7 )- Дихлорфлуорисцеїн диацетат

ХМК - хітозан-меланіновий комплекс

Dox, Dx- доксорубіцин

K(C) - контроль

ЛНМ - луго-нерозчинний матеріал (сирий хітин)

ЗФР – забуферений фосфатний розчин

## ОСНОВНА ЧАСТИНА

### ВСТУП

#### Обґрунтування вибору теми дослідження

##### Актуальність теми

У фармацевтиці використовують все більше медикаментів, іммобілізованих на різноманітних полімерних носіях. На роль таких носіїв претендують як природні, так і синтетичні полімери, здатні розширити можливості застосування ліків, зменшити їхню загальну токсичність, пролонгувати дію медикаментозних препаратів в організмі людини, чи прискорити детоксикацію організму. Полімери використовують не лише як каркас для приєднання різноманітних компонентів із певною біологічною активністю, наприклад, ензимів чи ліків, але й як такі, що мають власну біологічну активність.

Хітозан вважають одним із найбільш перспективних полімерів природного походження [13]. Він є нетоксичним, біодеградабельним і біосумісним біополімером. Протягом останніх кількох років, похідні хітину, особливо хітозан, отримали підвищену увагу як перспективний, відносно дешевий полімерний матеріал для широкого застосування [14]. Встановлено, що він володіє протибактерійною, кровозупинною, хелатуючою і фунгіцидною дією [13].

Важливою характеристикою цього біополімеру є його позитивний заряд, що надає йому високої адгезивності і дозволяє використовувати його як носій чи фільтр. Дану речовину застосовують в експериментальній біології як носій ДНК [47], а препарат Celox використовують також у військовій медицині як кровоспинний засіб [20]. Раніше виявлено можливості застосування хітозану в аграрній галузі і ветеринарії, а також в екології як ефективний фільтр для очищення стічних вод [41– 57].

Основним джерелом для отримання хітозану є морські безхребетні організми. Іншим джерелом хітину для очищення хітозану служить весняний

підмор бджіл, що є особливо перспективним джерелом для промислового отримання хітозану в Україні [16].

Полівінілпіролідон є синтетичним полімером, який використовують як замітник плазми крові, а в подальшому він отримав застосування у фармацевтиці, косметології і харчових технологіях [98]. Полівінілпіролідон добре розчинний у полярних розчинниках і спиртах. Використання полівінілпіролідону як каркасу для біологічно активних речовин може зменшувати токсичність різних сполук для людських клітин і забезпечити розчинність біологічно активних речовин, нерозчинних у воді.

Зважаючи на вказані аргументи дослідження впливу згаданих природних і синтетичних полімерів дозволить не лише розширити спектр носіїв, які можна використовувати для іммобілізації біологічно активних речовин, зокрема медикаментозних препаратів, але й створити на їхній основі нові препарати як у формі полімерів із самостійною дією, так і як носіїв для ліків. А також зробити висновки про перспективи застосування кожної із груп.

**Мета роботи і завдання дослідження** – охарактеризувати фізико-хімічні і біологічні властивості фрагментів хітозану і його комплексів із різними біологічно активними речовинами, зокрема їхню антимікробну активність, а також визначити вплив комплексу модифікованого полівінілпіролідону зі специфічними пептидами на бактерії, мікроскопічні гриби і нормальні та пухлинні лінії клітин ссавців.

**Об'єктом дослідження** є полімери природного і синтетичного походження та їхні нековалентні і ковалентні похідні.

**Предметом досліджень** є біологічні властивості полімерів природного і синтетичного походження та їхніх похідних і вплив цих речовин на життєздатність клітин еукаріотичних і прокаріотичних організмів.

**Методи досліджень** культивування еукаріотичних клітин, оцінювання життєздатності клітин, робота з мікробіологічними об'єктами, флуоресцентна мікроскопія, робота з лабораторними тваринами, мас-спектрометрія,

віскозиметрія, FTIR-спектроскопія, афінна хроматографія білків, електрофорез в градієнті концентрації акриламідю.

1. Розробити і вдосконалити способи отримання та характеристики зразків хітозану та його похідних з різних джерел (панцир крабів, тіла бджіл, базидіальні гриби);
2. Оцінити вплив фрагментів хітозану та хітозан-меланінового комплексу на життєздатність еукаріотичних клітин *in vitro* (HEK293, MCF7, J774.2, HEP2, нормальні лімфоцити людини);
3. Визначити протимікробну активність фрагментів хітозану та його похідних щодо мікроорганізмів (*C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*);
4. Визначити можливість застосування хітозану для пролонгації дії медикаментозних препаратів;
5. Здійснити комплексування пептида Сер-Про-Цис та похідних полівініпіролідону і визначити ефективність дії таких комплексів на еукаріотичні клітини ссавців;
6. Здійснити ідентифікацію молекулярних мішеней дії комплексів полівініпіролідону зі специфічними пептидами.

### **Зв'язок даної роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційну роботу виконано на базі Інституту біології клітини НАН України в рамках теми відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу «Підвищення ефективності дії лікарських препаратів *in vitro* та *in vivo* шляхом їх іммобілізації нанорозмірними носіями та поєднання з антиоксидантами» (№ державної реєстрації 0117U000786, 2017-2021 р.р.) і позабюджетної теми відділу в рамках гранту фірми Фольксваген (Німеччина) «Щодо розуміння сигнальних мереж, залучених у загибель клітин за дії лактаптину» (2016-2019 рр.).

## Наукова новизна отриманих результатів

У дисертаційній роботі розроблено оригінальну методику отримання хітозану з тіла бджіл, вивчені умови його стерилізації та зберігання. Здійснене системне вивчення властивостей похідних хітозану з бджіл у порівнянні з властивостями хітозану з крабів. Встановлено підвищення розчинності хітозану зі зменшенням його молекулярної маси, тоді як його біологічна активність щодо грибів роду *C. albicans* знижується, і навпаки, протигрибкова активність є вищою у фракцій хітозану з більшою молекулярною масою.

Розроблено оригінальну методику отримання хітозану із плодових тіл грибів.

Продемонстровано ефективність застосування хітозану як носія медикаментозних препаратів для покращення фармакокінетики шляхом пролонгації перебування цих препаратів у кровоносному руслі.

За допомогою іммобілізації мономерної форми трипептиду Сер-Про-Цис на похідних полівінлпіролідону створено пептидоміметик, що володіє протипухлинною активністю *in vitro* щодо клітин лінії MCF7, HCT116, HEPG2 та *in vivo* щодо лімфоми NK/Ly у мишей лінії C57/Black. Ця комплексна сполука має відносно малу токсичність щодо псевдонормальних ліній клітин ембріональної нирки людини HEK293, та клітин мишачих макрофагів J774.2. В подальшому найбільш активний комплекс PN5 (комплекс модифікованого полівінлпіролідону з трипептидом) після ідентифікації структури за допомогою ЯМР був офіційно названий P4P

Підтверджено наявність комплексу P4P-FITC (Комплекс модифікованого полівінлпіролідону з трипептидом з приєднаної молекулою FITC) в везикулах (лізосомах) клітин лінії MCF7. Доведена роль АФК у цитотоксичній активності комплексу P4P.

Розроблено оригінальний прийом отримання білків мішеней за допомогою магнітних частинок. Визначені внутрішньоклітинні білки мішені комплексу P4P. Отримані білкові мішені – структурні білки клітини (актин, кератин, цитоплазматичний бета актин) та сироватковий альбумін

## **Практичне значення отриманих результатів**

Створено хітозан-меланіновий комплекс з високою антигрибковою активністю щодо *C. albicans*, зокрема щодо клінічного штаму цього грибка з множинною медикаментозною резистентністю. Показано низьку токсичність цього комплексу щодо клітин ссавців, у т.ч. нормальних клітин крові, що свідчить про його біосумісність. Підтверджена можливість застосування хітозану в якості носія для пролонгації перебування речовини у руслі крові.

Підтверджено можливість застосування похідних полівінілпіролідону в якості носіїв пептидних молекул.

Продемонстровано високий потенціал комплексу трипептиду Про-Сер-Цис з полівінілпіролідонем як протипухлинного засобу типу пептидоміметика. Визначено білки мішені та виявлено внутрішньоклітинну локалізацію комплексу P4P, та підтверджено роль реактивних форм кисню у цитотоксичній активності комплексу P4P.

## **Особистий внесок здобувача**

Всі дослідження, представлені у дисертаційній роботі, було виконано особисто або за безпосередньої участі здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведений аналіз наукової літератури, виконана основна частина експериментальної роботи і статистична обробка даних. Планування роботи, аналіз та обговорення отриманого матеріалу, приготування рукописів статей проводилося з науковим керівником член-кор. НАН України, Стойкою Р. С. та науковими консультантами доктором д.б.н., проф. Луциком М.Д, доктором д.б.н., проф. Котом Ю.Я, доктором д.ф.н., проф. Антонюком О.В. Аналіз за допомогою білкового Масс-спектрометра проводилася за під керівництвом проф. Сергія Сушельницького, в Національному Катарському Університеті, міста Доха, Катар, в рамках гранту Фольцваген. Мікроорганізми для дослідження протимікробної активності були отримані від кафедри генетики та біотехнології Університету імені Івана Франка. Всі розділи дисертації написані автором самостійно.



## **Апробація результатів дисертації**

Основні та додаткові положення дисертації було апробовано на засіданнях відділу регуляції клітинного циклу та апоптозу Інституту біології клітини НАН України. Результати досліджень було також представлено на 7 фахових міжнародних конференціях:

- 1)7th International Weigl Conference. September 26-29, 2017.
- 2)RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. Bratislava, Slovak Republic, October 11-14, 2018.
- 3)“Advances in Microbiology and Biotechnology” Lviv. Ukraine, October 29-31, 2018. Lviv, 2018. – P.24.
- 4)Bridges 14th Annual Scientific, Bratislava, Slovak Republic, April 10-14, 2019.
- 5)RECOOP 10<sup>th</sup> Annual Project Review Meeting, October 11-12, 2019.
- 6)6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, Yaremche, Ukraine, 18-21 June 2019.
- 7)XII Український біохімічний конгрес, Тернопіль Україна, 30 вересня – 04 жовтня 2019 р.

## **Публікації**

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 4 статті: 3 статті у міжнародних виданнях з кваліфікаціями Q1-Q2, а також 1 статтю в українському фаховому журналі з кваліфікацією Q4.

## **Структура та обсяг роботи**

Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку цитованої літератури, та додатку 1

Дисертацію викладено на 158 сторінках машинного тексту, вона містить 43 рисунків та 7 таблиць, 239 пунктів цитованої літератури

# РОЗДІЛ 1

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### Застосування природних і синтетичних полімерів у біології і медицині

Для ліків розроблено багато способів введення в організм, найбільш поширеним серед яких є пероральне введення, яке є високоефективним, викликає мінімальні побічні ефекти і просте у застосуванні [1]. Ін'єкційне введення речовин дозволяє уникнути обробки препарату травною системою і для цього застосовують різні типи введення: внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньом'язово та внутрішньоартеріально [2]. Трансдермальне введення означає введення через слизову оболонку, включаючи тканини слизової оболонки носа і ротової порожнини [3].

Однак транспортування ліків в організмі супроводжується численими перешкодами, пов'язаними із складністю системи кровообігу, травної системи та імунною відповіддю на чужорідну речовину в організмі [4]. При потраплянні ліків в організм, їх концентрація швидко знижується завдяки короткому періоду напіввиведення, швидкому очищенню і неможливості досягти місця захворювання, що призводить до відсутності чи зниження прояву бажаних ефектів [5]. Ідеальний препарат повинен бути здатним досягти місця патології та накопичуватися там до ефективної концентрації [6].

Біологічні препарати, такі як білки та нуклеїнові кислоти, також, піддаються деградації специфічними ензимами *in vivo* [7]. Описані різні методи подолання цих проблем доставки ліків, включно з використанням наноматеріалів як засобів транспортування ліків [8].

Нанотехнології розширили можливості терапії і діагностики захворювань [9]. Під час доставки ліків наноматеріали можуть покращити загальне та клітинне засвоєння препаратів погано розчинних у воді [10]. Вони також підвищують біодоступність препарату в необхідних ефективних дозах, яких раніше було важко досягти. Показано, що як геометрія наночастинок, так і їхній розмір відіграють важливу роль у доставці ліків [11]. Геометрія

наночастинок може суттєво вплинути на швидкість вивантаження ліків та їх транспортування, а баланс між розміром і геометрією є критичним для досягнення високої ефективності доставки ліків. Крім того, упаковані в наноматеріали ліки продовжують циркулювати в кров'яному руслі значно довше, тим самим покращуючи їх біорозподіл і фармакодинаміку [12].

Для іммобілізації ліків використовуються як прості хімічні носії, так і полімерні сполуки. В основному застосовують синтетичні сполуки та їх похідні. Вони відносно легко і передбачливо створюються і модифікуються, їх легко отримати в промислових кількостях і простіше зберігати.

Використання синтетичних полімерів дозволяє відносно легко контролювати структуру, молекулярну масу і кількість іммобілізованого препарату. Разом з тим, вони мають суттєві недоліки, зокрема можуть бути токсичними як для організму в цілому, так і для конкретних клітин, тканини чи органів, при цьому не виводитися з організму, вступати в перехресні реакції з іншими речовинами та препаратами, а також викликати сильну імунну відповідь.

Натомість у нанобіотехнології розвивається напрямок використання біополімерів (природних полімерів). Природні полімери зустрічаються в навколишньому середовищі і їх отримують з природних джерел, але для їх цільового використання часто піддаються незначним хімічним чи фізичним впливам. Наприклад, це стосується деяких варіантів целюлози, лігніну, хітину та інші [16].

### **1.1. Хітозан: загальна характеристика і біомедичні аспекти його застосування**

Хітозан є лінійним, напівкристалічним полісахаридом, що складається з одиниць 2-аміно-2-дезоксид-β-D-глюкозани (D-глюкозамін) [13]. Хітозан не зустрічається у природі в чистому вигляді - тим не менш, він може бути легко отриманий за допомогою часткового деацетилювання природного полімера - хітину. Для того, щоб бути названим хітозаном, деацетилюваний хітин повинен містити, щонайменше 60% D-глюкозаміних залишків [14].

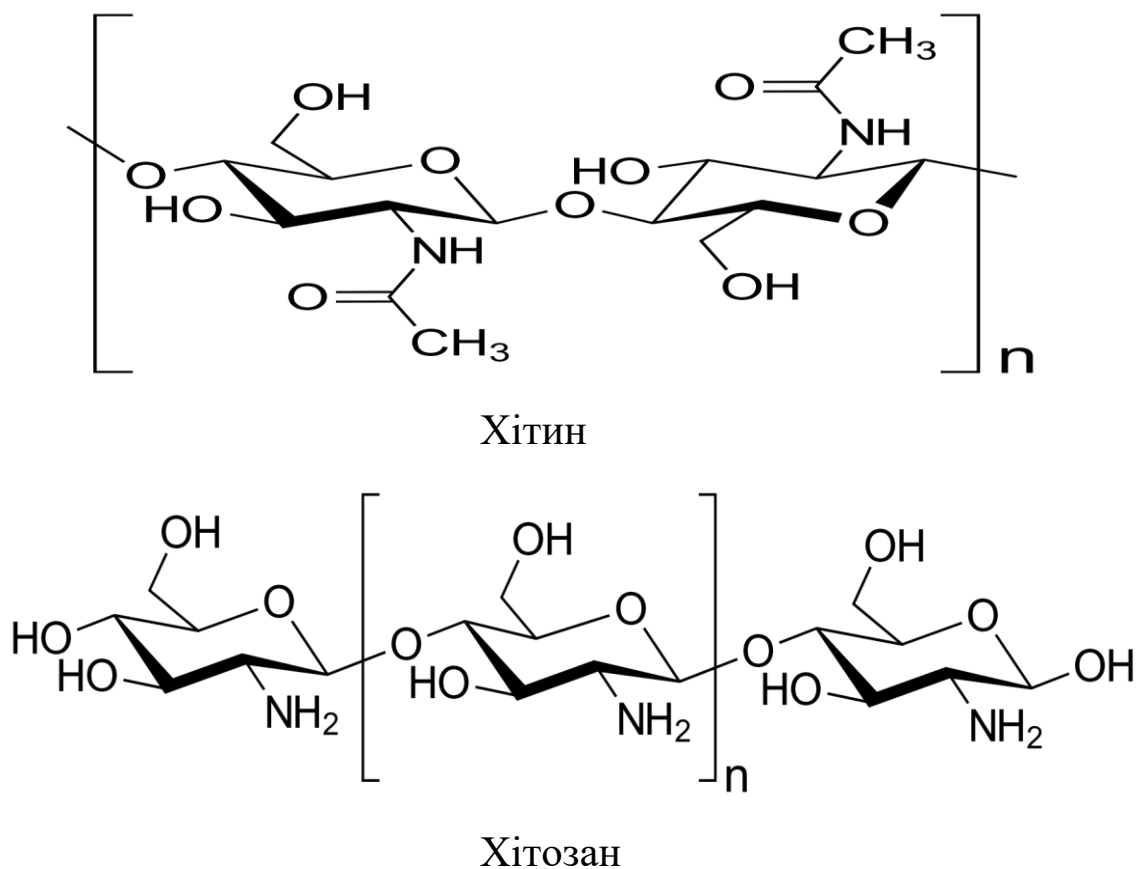


Рис.1.1. Схематичне зображення структури хітину і хітозану

Деацетилювання хітину проводять шляхом хімічного гідролізу в жорстких лужних умовах або шляхом ферментативного гідролізу в присутності ферментів деацетилаз. Хітин, як і целюлоза, є другим найбільш поширеним біополімером, і зазвичай зустрічається у безхребетних: в панцирі ракоподібних або кутикулі комах, а також наявний в деяких грибах, стінках клітин зелених водоростей та дріжджів [15]. Зазвичай, молекулярна маса хітозану знаходиться в діапазоні від 300 до 1000 кДа, залежно від джерела і шляху отримання [16]. Хітин і хітозан є біосумісними полімерами, але є докази того, що хітозан є кращим для клінічного використання, ніж хітин. У той час як число позитивних зарядів збільшується, взаємодія між клітинами та хітозаном також збільшується, що призводить до поліпшення біосумісності [17]. Матеріали, засновані на використанні хітозану, є нетоксичними і не проявляють про-алергічного ефекту на живі організми.

Основним біомедичним застосуванням хітозану досі є його використання як кровоспинного препарату. В медицині використовують

різноманітні форми: бинти, пов'язки, присипки, гелеві перев'язочні матеріали і ін.

Хоча конкретний механізм дії хітозану на коагуляцію крові залишається нерозкритим, але дані свідчать про те, що існують три можливі способи впливу хітозану на зупинку кровотеч, завдяки: 1) сорбції плазми, 2) згортанню еритроцитів і 3) адгезії тромбоцитів, агрегації і їх активації.

Сорбція плазми є ключовим фактором у застосуванні хітозану як гемостатика. Швидкість сорбції залежить від молекулярної маси і ступеня деацетилювання, а також від фармацевтичної форми застосування хітозану. [18].

Коагуляція еритроцитів безпосередньо пов'язана із гемостатичними властивостями хітозану. Вони зв'язані один з одним за допомогою полімерних ланцюгів хітозану, внаслідок чого утворюється решітка, яка захоплює клітини крові, що призводить до виникнення штучного тромбу [18].

Під час контакту з хітозаном в крові відбувається зміна морфології еритроцитів. Було припущено, що низький рівень рН розчину хітозану викликає гемолітичну активність в еритроцитах людини, але нейтралізація цих розчинів збільшує індекс гемаглютинації [19].

Ще однією причиною кровоспинної активності хітозану є адгезія тромбоцитів, їх агрегація і активація. Було показано, що хітозанові плівки можуть індукувати адгезію тромбоцитів і запускати природне згортання крові [20].

Було доведено, що агрегація пов'язана з зростанням концентрації тромбоцитів в плазмі [21].

Хітозан може генерувати внутрішньоклітинні каскади сигналу, які активують глікопротеїни IIb / IIIa і розрядити тромбоксан A2 / АДФ. Ці сигнали підвищують гематокоагулюючу активність тромбоцитів і сприяють зміцненню адгезії [22]. Також виявлено підвищення рівня інтегрини  $\beta^2$  у тромбоцитів, які приєдналися до хітозану [23].

### 1.1.1. Хітозан у лікуванні ран та опіків

Хітозан часто застосовують у лікуванні ран різної етіології, а також опіків. Біомедичне застосування препаратів хітозану є дуже різноманітним, нижче приведено короткий список досліджень різних препаратів хітозану, деякі з них уже ввійшли в медичну практику, інші знаходяться на стадії розробки. Також хітозан застосовують як носій для інших медичних засобів, і в як каркас для іммобілізації стовбурових клітин [17].

Один із перших біологічних ефектів, що досліджували, був вплив похідних хітозану на загоєння відкритої шкірної рани. Одним із таких досліджень було вивчення впливу катіонних волокон з хітозаном (DDA=18%), щодо прискорення процесу грануляції в експериментальних відкритих шкірних ранах собак на ранній стадії загоєння [24].

Аналогічне дослідження проводили Окамото і ін. [29] з нанесенням хітину і хітозану у формі порошка на рани собак.

Також вивчали ефект хітозан-ацетатного бинта (пов'язка HemCom) на загоєння ексцизійної рани у мишей, які були інфіковані або неінфіковані *S.aureus* [30]. Вивчали ефективність фіксування на рані і стимулюючих ефектів хітозан-ацетатної пов'язки. Після нанесення рани, на місце ураження поміщали пов'язку, яку потім видаляли з місця рани на період від 1 год до 9 днів. Застосування пов'язки протягом 3 днів дало найшвидше загоєння рани. Крім того, хітозан-ацетатна пов'язка зменшувала кількість запальних клітин в рані на 2 і 4 день, і має загальний позитивний ефект на загоєння ран, особливо в ранній період, коли антимікробна дія перев'язочних матеріалів є найбільш важливою.

Цинь і ін. вивчали вплив застосування хітозан поліфенольного комплексу хітозану на загоєння поранень в раневій моделі щурів [31]. Результати дослідження показали, що групи тварин, котрі піддавалися лікуванню, виявляють підвищену міцність на розрив рани у місці розрізу, та вищий відсоток зменшення площі рани порівняно з контролем.

У дослідженні Коджма і співавт. з використанням щурячої моделі шкірної інсцизійної рани оцінювали вплив хітину і хітозану на синтез колагену в процесі загоєння ран [37]. Виявлено, що вищі концентрації хітину і хітозану (10 мг/мл), індукують стабільний синтез колагену в рані протягом ранозагоювального процесу. При дослідженні впливу хітозану і похідних на загоєння хірургічних ран, досліджувались також хітозанові плівки для шовної фіксації тканин [32].

У дослідженнях впливу на загоєння опіків з використанням щурів, Джин і ін. вивчали ефекти хітозану з гепарином на ранньому розширенні опіків [33]. Гістологічне дослідження через 72 год показало, що ступінь опіку у груп обробленим хітозаном була менш обтяжливою, ніж у контрольній групі. Отже, хітозан запобігає розширенню зони опіків на ранній стадії.

Досліджено ранозагоювальну ефективність хітозану з різною молекулярною масою і різним діапазоном DD щодо опіків у щурів [27]. Найвищу швидкість загоєння ран було виявлено в групі, яку обробляли хітозаном з високою молекулярною вагою і високою DDA хітозану. Опіки, які обробили високомолекулярним хітозаном, містили значно більше епітеліальної тканини і виявляли кращу реепітелізацію.

Застосовано хітозановий гель з 1% сульфадіазином срібла для лікування опікової рани у щурів [36], його наносили кожні 48 год після опіку. В опіках, оброблених таким гелем показано вищий рівень утворення фібробластів і кращий ангиогенез, ніж у піддослідних тварин, які отримували гель хітозану без сульфадіазину срібла або з 1% кремом сульфадіазину срібла, який застосовували через кожні 24 год, хоча статистичних відмінностей між піддослідними групами під час лікування не виявлено.

В результаті досліджень хітозанового гідрогелю *in vitro* встановлено, що він сприяв адгезії і проліферації клітин [34]. Дослідження на тваринах показали, що гідргель і його побічні продукти, які утворюються під час деградації гелю нетоксичні. Макроскопічний аналіз виявив, що

тваринні опіки, оброблені хітозановим гідрогелем, були значно меншими, порівняно із необробленими опіками у контрольних тварин. [34].

В подібному дослідженні, хітозановий гідрогель був розділений на твердішу частину і водну, його застосовували для лікування опіків у собак [35]. Результати показали, що хітозаномісні матеріали добре переносяться і сприяють хорошій регенерації тканин. Вони індукують запальну міграцію клітин і розвиток кровоносних судин, що сприяє загоєнню рани. На 22-й день активно синтезувався колаген типу I і IV з грануляційної тканини, спостерігалось утворення дермально-епідермального з'єднання.

Проведено багато клінічних досліджень, в одному з яких вивчали можливість застосування хітозанової мембрани як ранозагоювальної і перев'язочної тканини [38]. Мембрани отримували з хітозану креветок (DDR = 75%) з менш ніж 1% білків і вміст мінеральних речовин з молекулярною масою  $1.5 \cdot 10^6 \pm 0,1$  Да. Клінічні дані свідчать про те, що сітка хітозанової мембрани сприяє ефективному контакту, гемостазу та повторній епітелізації рани.

Проводене рандомізоване контрольоване дослідження, метою якого було визначити ефективність гелю хітозан/декстран на гемостаз і загоєння ран після ендоскопічної хірургії [36]. До даного дослідження було залучено 40 пацієнтів, які перенесли ендоскопічну операцію гайморової пазухи при хронічних риносинуситах. Хітозан/декстран гель забезпечив швидку зупинку кровотечі із середнім часом відновлення гемостазу в 2 хв, порівняно з 10 хв в контролі. Було відмічено значно менше спайок у всіх тимчасових точках з хітозан/декстранами гелю, порівнюючи з контролем.

### **1.1.2. Протимікробні властивості хітозану**

Хітозан містить три типи реакційно здатних функціональних груп: аміногрупи в положенні C-6, а також первинні і вторинні гідроксильні групи в положенні C-6 і C-3 відповідно. Вміст аміногруп є різним у структурі хітину і хітозану, що забезпечує відмінність їх фізико-хімічних властивостей і біологічних функцій [37, 38]. Хітозан володіє сильними плівкоутворюючими



властивостями. Хітозанові плівки виявляють сильні бар'єрні властивості в сухому стані, що робить їх придатним матеріалом для проектування харчових покриттів і пакувальних конструкцій [39, 40]. Хітозан пригнічує ріст широкого спектра грибів, дріжджів і бактерій [41– 48], хоча має відносно меншу активність щодо останніх [41, 48].

Хітозан є слабкою основою і не розчиняється у воді та органічних розчинниках. Проте, він розчинний в кислих водних розчинах ( $\text{pH} < 6,5$ ) [49, 50, 51]. Хітозан демонструє антибактеріальну активність тільки в кислому середовищі, оскільки хітозан погано розчиняється при високому  $\text{pH}$  [52, 53].

Існує 4 теорії механізму антибактерійної дії хітозану:

- 1) позитивно заряджені молекули хітозану перешкоджають негативно зарядженим залишкам, що містяться на поверхні бактерій. Хітозан взаємодіє з мембраною бактерій і спричиняє зміну клітинної проникності [54, 55, 56].
- 2) взаємодія дифузних продуктів гідролізу з мікробною ДНК призводить до пригнічення мРНК і синтезу білка [57–60].
- 3) хітозан також може пригнічувати ріст мікроорганізмів шляхом хелатування поживних речовин і життєво необхідних неорганічних сполук [54, 61].
- 4) хітозан може утворювати полімерну мембрану на поверхні клітини, яка запобігає метаболізму клітини бактерії [60, 64, 52] або діє як кисневий бар'єр, який може пригнічувати ріст аеробних бактерій [59].

Визначено основні фізико-хімічні фактори, які впливають на антибактерійну активність хітозану, першим з яких є вплив  $\text{pH}$ . Хітозан - полікатион і при  $\text{pH} < 6$  легко взаємодіє з негативно зарядженими речовинами, такими як білки, аніонні полісахариди, жирні кислоти, жовчні кислоти і фосфоліпіди у зв'язку з високою щільністю аміногруп, присутніх на полімері [65, 66]. Висловлено припущення, що позитивний заряд на групі  $\text{NH}_3^+$  з глюкозаміну мономера при  $\text{pH} < 6,3$  дозволяє взаємодіяти з негативно зарядженими групами на клітинних мембранах мікроорганізмів, що призводить до витоку внутрішньоклітинних складових [55, 64]. Антимікробна активність хітозану вища при низькому  $\text{pH}$  і це пов'язано з тим, що аміногрупи

хітозану іонізуються при  $\text{pH} < 6$  [59, 67]. У дослідженні Юнес і співавт. [68] показано, що при зниженні  $\text{pH}$ , адсорбція хітозану на бактеріальних клітинах буде збільшена, що, ймовірно пов'язане зі збільшенням позитивного заряду хітозану.

При більш високому  $\text{pH}$  ( $> 6$ ) хітозан втрачає свій заряд і може випадати в осад з розчину внаслідок депротонування аміногрупи [69–71]. Куликов, та інші. [72] повідомили, що антибактеріальна активність хітозану проти *Klebsiella pneumoniae* тісно пов'язана з його полікатіонною природою і залежить від ступеня протонування аміногруп хітозану, який, в свою чергу, був залежний від ступеню полімеризації і значення  $\text{pH}$  середовища. Також встановлено [59], що нативний хітозан був значно активніший щодо *Candida lambica* при  $\text{pH}$  4,0, ніж при  $\text{pH}$  6,0. Крім того, показано [74], що антибактеріальна активність хітозану проти *Mucor racemosus* вища при більш низькому  $\text{pH}$ . В іншому дослідженні, протимікробну активність хітозан-ацетатних плівок проти росту *Staphylococcus aureus* досліджували при  $\text{pH}$  6,2 і  $\text{pH}$  7,4 [74]. Ці випробування, проведені при більш низькому  $\text{pH}$ , тобто 6,2, показали зменшення кількості бактерій, що вказують на більш сильний протибактеріальний ефект; цей висновок пов'язаний з конкретною  $\text{pKa}$  цього біополімера (тобто 6,4), який близький до  $\text{pH}$  6,2. При цьому  $\text{pH}$  кількість позитивно заряджених аміногруп (активних груп) близька до 75%, тоді як в хітозану при  $\text{pH}$  7,4 ця величина зменшується до 10%.

Важливим критерієм для протимікробної дії є молекулярна маса хітозану. Хітозан можна класифікувати за його молекулярною масою (MW) на хітозан з високою молекулярною масою (HMW), хітозан з низькою молекулярною масою (LMW) і олігохітозан (хітозан з коротким ланцюгом) [75]. Численні дослідження показали кореляцію між бактерицидною активністю хітозану і його молекулярною масою. HMW хітозан не може проникнути через мембрани мікроорганізмів і, отже, утворює плівку на поверхні клітини, яка блокує перенесення поживних речовин в мембрану мікробної клітини, що призводить до її лізису [63, 76]. Крім того, молекули

дисоційованого хітозану в розчині з більш низькою молекулярною масою (<5000 кДа), можуть зв'язуватися з ДНК та інгібувати синтез мРНК через проникнення в сторону нуклеусів мікроорганізмів [54, 62, 72].

У той час як в формі НМВ, молекули хітозану можуть взаємодіяти з мембраною клітини для зміни проникності клітин [77, 78]. Було повідомлено, що плівка НМВ хітозану була більш ефективною проти *L. monocytogenes*, ніж хітозанові плівки середньої молекулярної маси.

Проведено дослідження антибактерійної активності розчину хітозану з молекулярною масою 3, 50 і 1000 кДа [63]. Їх результати показали, що хітозан пригнічує ріст *E. coli*, зокрема хітозан з молекулярною масою 50 кДа показав найбільш ефективне інгібування росту бактерій. Продемостровано, що 0,1% хітозан з молекулярними масами (мол.м = 1671, 1106, 746, 470, 224 і 28 кДа) показав більш сильні бактерицидні ефекти проти грампозитивних бактерій, ніж щодо грамнегативних бактерій. Для грамнегативних бактерій, хітозан 746 кДа виявився найбільш ефективним проти *E. coli* і *Pseudomonas fluorescens*, порівняно з хітозаном 470 кДа проти *Salmonella typhimurium* і *Vibrio parahaemolyticus*. Хітозан з мол.м = 1106 і 224 кДа мають слабкий або взагалі не проявляли антибактеріальної активності (молекулярна маса = 28 кДа) проти *S. typhimurium*. На відміну від грамнегативних бактерій, ріст грампозитивних бактерій був майже або повністю пригнічений хітозаном з різними молекулярними масами [79-80].

Хітозани з різними молекулярними масами (5,5 - 15,5 кДа) і в різних концентраціях (20, 50, 100, 200, 500 і 1000, мікрограм на мл) були використані для оцінки залежності молекулярної маси і концентрації хітозану проти *E. coli*. Їх результати показали, що всі зразки хітозану з м.м. від 5,5 - 15,5 кДа мали хорошу протимікробну активність при високих концентраціях (більше 200 мікрограм на мл), а всі зразки при низькій концентрації (20 мікрограм на мл) не впливали на інтенсивність росту *E. coli*. [81]. Дослідження антимікробної активності бавовняних тканин, оброблених різними концентраціями хітозану [60] показали, що максимальна антимікробна активність була отримана, коли

бавовняні тканини обробляли 0,5-0,75% хітозану з молекулярною масою 1,5-5 кДа і з збільшенням концентрації хітозану до 1% призводить до зменшення антимікробної активності.

Ступінь деацетилювання хітину також впливає на антибактерійні властивості хітозану. В процесі деацетилювання, ацетильну групи від ланцюга хітину видаляється з утворенням аміногрупи. Відомо, що ступінь деацетилювання є однією з найбільш важливих хімічних характеристик, які можуть впливати на ефективність використання хітозану в багатьох сферах [81]. Чим більше DD (deacetylation degree, ступінь деацетилювання), тим вищою є розчинність за кислого рН. Як правило, хітозан з більш високим DD, має більш високий позитивний заряд і можна очікувати, що матиме сильнішу антибактеріальну активність [82].

При дослідженні ефекту гетеро-хітозану і олігосахаридів хітозану на ріст трьох грамнегативних і п'яти грампозитивних бактерій встановили, що антимікробна активність гетеро-хітозану і олігосахаридів хітозану відрізняється залежно від тестованих бактерій: 25% ацетилований хітозан (75% деацетилований хітин) мав високу інгібуючу активність, в порівнянні з активністю 10% і 50% ацетилованого хітозану [83]. Досліджено антимікробну активність гетеро-хітозану і вплив умов деацетилювання (вакуум, азот і регуляція атмосфери) на антимікробну активність хітозаном щодо *E. coli*, *S. aureus* і *C. albicans* [84]. Показано, що препарати хітозану, отримані при стандартних умовах, мають високу антимікробну дію, тоді як препарати хітозану, отримані в атмосфері азоту, володіють найменшою антимікробною активністю щодо усіх тестованих мікроорганізмів. Проведено дослідження впливу DD хітозану на інгібування росту *S. aureus*. Показано, що хітозан з більш низьким DD успішно пригнічує ріст *S. aureus* [85].

Важливим фактором, що впливає на антибактерійну активність хітозану, є джерело його отримання. Хітозан знайдено у ракоподібних, таких як креветки, краби і раки [86]. Також показано можливість отримання хітозану з грибів. Зокрема, хітозан екстрагували з клітинної стінки міцеліальних грибів

– *R. oryzae* і вивчали антимікробні властивості цього хітозану щодо *E. coli*, *K. pneumoniae* і *S. aureus*. Показано, що антимікробна активність хітозану, виділеного з грибів, була нижчою, ніж у хітозану, виділеного з криля. Проте хітозан, виділений з грибів, має деякі схожі властивості з хітозанами виділеними з ракоподібних, зокерма він активніше сповільнює ріст грампозитивних бактерій порівняно із грамнегативними [87].

Встановлено, що хітин з оболонок панцирів крабів не проявляє антимікробну активність, а хітин з грибів родини *Marasmiaceae* демонструє кращу інгібуючу дію на ріст бактерій, ніж хітин з панцирів крабів[54]. Продемонстровано, що хітозан виділений із основи ноги краба і всієї оболонки ноги краба мають відмінності в їх фізико-хімічних і функціональних характеристиках. Наприклад, хітозан отриманий з основного корпусу має значно більший вміст азоту, ступінь деацетилювання, розчинності, в'язкості і вищу антибактерійну активність, ніж хітозан, отриманий з усієї оболонки карапаку [88].

Досліджено антибактерійну активність олігомерних і полімерних хітозанів, виділених з різних джерел (креветки, краби та інші) щодо харчових патогенних бактерій [86]. На підставі отриманих результатів зроблено висновок, що джерело отримання хітозану, DD і розмір молекул хітозану повинні бути враховані.

### **1.1.3. Використання хітозану як платформи для доставки ліків**

Наночастинки мають різні переваги, такі як малий розмір частинок, велика площа поверхні і широкі можливості модифікації поверхні, які запобігають ферментативній деградації препаратів. Вони можуть використовуватись як системи оральної доставки для полінуклеотидів, білків та макромолекул [87]. Завдяки своїм мукоадгезійним властивостям хітозан сприяє всмоктуванню. Крім того, взаємодія між хітозаном (позитивно зарядженим) і муцином (негативно зарядженим) призводить до збільшення часу контакту між препаратом та поверхнею. Хітозан збільшує час перебування препарату на слизовій [88].

Здатність хітозану до збільшення проникності мембрани залежить від ступеня його деацетилювання і молекулярної маси. При зростанні ступеня деацетилювання, щільність заряду хітозану також збільшується, що покращує транспортування препарату, а також збільшує проникність епітелію [89]. Висока молекулярна маса хітозану також підвищує проникність епітелію. Барбієрі та ін. [90] розробили наночастинки на основі хітозану та фосфоліпідів, навантажені тамоксифеном. Коли цей препарат вводили перорально, спостерігалось збільшення проникності в 1,5–9 разів за відсутності або в присутності панкреатину або ліпази відповідно [91].

Фенг та ін. [20] створили наночастинки доксорубіцину гідрохлориду з хітозаном та карбоксиметилхітозаном, які використовуються для лікування раку. Створені наноструктури збільшували кишкову абсорбцію доксорубіцину гідрохлориду по всій тонкій кишці.

Доставка ліків до легенів має різні переваги, такі як швидкість, висока ефективність, уникнення деградації та виведення ліків системами організму. Основними факторами, що сприяють ефективній доставці ліків через легені - є велика поверхня легенів, тонкий бар'єр для поглинання та висока судинність [92]. Ферро у своєму огляді [93] стверджує, що доставку препаратів до легенів також можна досягти за допомогою наночастинок на основі хітозану.

Джафарінежад застосував хітозан для створення наночастинок для легеневої доставки ітраконазолу [95]. Вони іммобілізували цей протигрибковий препарат з хітозаном, лактозою, манітом і лейцином, що покращило його аерозольні властивості.

Хітозан та його похідні посилюють всмоктування гідрофільних молекул, білкові та пептидні препарати, тим самим допомагаючи поліпшити доставку до слизової. Слиз складається з високогідратованих глікопротеїнів (солі, лізоцими та муцини), які відповідають за його в'язкопружні властивості [96,97].

Хітозан діє, відкриваючи міжклітинні тісні сполучення, що викликають парацелюлярний транспорт високомолекулярних препаратів [98]. Механізми

дії хітозану, включають взаємодію його позитивного заряду з білками транспортерами плазматичної мембрани [98,99]. Також можна використовували мукоадгезивні властивості хітозану для доставки siРНК через поверхні слизової оболонки після місцевого введення [100].

Злоякісні пухлини характеризуються високим ступенем адаптивності і високою інтенсивністю росту [101]. З розвитком хіміотерапії раку намагаються перейти до ціленапрявленого лікування, що націлене на підвищення ефективності природнього (власного) імунітету (фактор-рецептор), замість виключної дії токсичних ліків [102].

Есфадіопур-Бороджені та ін. використали куркумін, який був завантажений на фолієво-модифіковані-наночастинки з хітозану для лікування раку молочної залози. Базуючись на отриманих результатах, вони дійшли висновку, що дані наночастинки є потенційними носіями у таргетній терапії для доставки куркуміну до ракових клітин [103].

Анна Ванесса та ін. [104] використали епідермальний фактор росту, як вектор, спрямований на рецептори пухлинних клітин, для аналізу хітозанових наночастинок з іммобілізованим цисплатином у лікуванні тварин з модельним раком легені, стійким до цисплатину. Наночастинки на основі хітозану ефективні при доставці ліків та для посилення терапевтичної ефективності препаратів. [105] Їх використовують для пероральної доставки ліків, оскільки це відкриває щільні стики слизової оболонки і посилює всмоктування.

## **1.2. Полівінілпіролідон**

Полівінілпіролідон (ПВП), полівідон або повідон, є біорозкладаним, водорозчинним синтетичним полімером, отриманим з його мономеру N-вінілпіролідону.

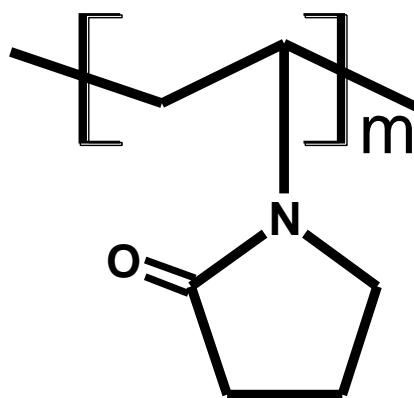


Рис.1.2. Схема хімічної формули мономеру N-вінілпіролідону

Окрім гідрофільності полімер ПВП має добру розчинність у розчинниках різних полярностей, хороші властивості зв'язування і здатність стабілізувати суспензії та емульсії [106]. ПВП є біосумісним і нетоксичним полімером, визнаним безпечним Управлінням з контролю за продуктами та ліками (FDA) США. З цієї причини, крім харчової галузі ПВП широко використовують в косметичці, а також у фармацевтиці та біомедицині [107–111]. ПВП має унікальні фізичні і хімічні властивості, наприклад, він по суті хімічно інертний, безбарвний, термостійкий і стабільний до змін рН. ПВП розрізняють за молекулярною масою за значеннями К (коефіцієнт в'язкості), наприклад, К12 (3100–5700 Да), К17 (7900–10 800 Да), К25 (23000–32000 Да), К30 (35 000–51 000) та К90 (900 000–1 300 000 Да) [112].

ПВП використовують у різних системах доставки ліків, для преорального, місцевого та трансдермального введення. Крім того, ПВП використовують для доставки генетичних матеріалів [103–117]. У поєднанні з металевими частинками їх застосовують у регенераційній медицині [118–120] та для цільової доставки різних біологічно активних речовин [121,122].

### 1.2.1 Фізико-хімічні властивості полівінілпіролідону

Зразки ПВП з більшою молекулярною масою утворюють у воді розчини, що мають гідроксильну та карбонільну кінцеві групи [123]. Шляхом полімеризації можна отримати поперечно зшиті продукти ПВП [124]. Ці



полімери відомі як кросповідони. У суміші з низкою діючих речовин ПВП може утворювати досить стійкі комплекси та асоціації сполук. Один із найвідоміших хімічних комплексів ПВП є повідонйодин (Рис.1.3.), який використовують як універсальний йодний антисептик [125].

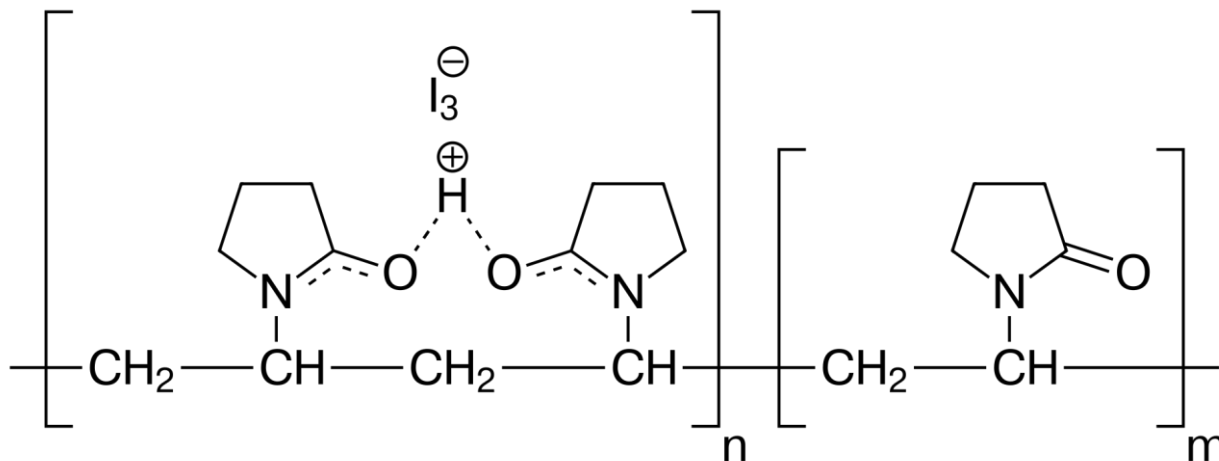


Рис.1.3. Схема хімічної формули повідонйодину

У сухому вигляді ПВП - це білий або жовтувато-білий гігроскопічний порошок з частинками різних розмірів [126], який поглинає до 40% води за своєю вагою [127]. Розчинений у водному розчині, він немає власного запаху та смаку [128].

### 1.2.2. Біологічні властивості полівінілпіролідону

ПВП - один із найвідоміших хімічно інертних полімерів, який не викликає патологічних фізіологічних реакцій. При пероральному застосуванні низькомолекулярна маса ПВП (наприклад, К 12, що відповідає середній молекулярній маси  $1,7 \times 10^3$  г моль), виводиться швидко і повністю через нирки [129].

Встановлено, що поглинання ПВП в організмі є мінімальним і обернено пов'язаним з його молекулярною масою (або величиною К), залишок ПВП з низькою молекулярною масою рідко перевищує кілька відсотків [125]. При парентеральному введенні встановлено, що молекулярний розмір безпосередньо корелює з кліренсом сечі, великі молекулярні маси не усуваються через нирку і можуть призвести до значної затримки в тканинах

[129]. Менша молекулярна маса ПВП добре переноситься внутрішньочеревно, внутрішньом'язово та внутрішньовенними маршрутами введення [125]. Він не є подразником для очей або шкіри.

Повідон є одним із найважливіших інгредієнтів у виробництві таблеток, так як є сполучною речовиною, яка здатна вмістити всі компоненти разом і запобігає розпаданню таблетки поки вона не досягне шлунку і тоді він швидко розчиняється, щоб вивільнити ліки [130].

Завдяки хорошій розчинності в різних органічних розчинниках і сумісності з полімерними покривними матеріалами, ПВП є одним із найбільш часто використовуваних засобів утворення пор мембрани для контролю за вивільненням лікарських засобів [131, 132]. У дослідженнях, проведені Ян та ін. про використання ПВП, як сполучного та пороутворювального агента в етилцелюлозі (ЕС) були створені гранули з важко водорозчинним топірамом (TRM). Аналіз вмісту препарату показав, що ПВП впливає на ефективність та безперебійність процесу вивільнення препарату TRM з гранули шляхом зміни кристалічного стану препарату та його розчинності [132]. ПВП також використовують як ефективну добавку для інгібування кристалізації ліків у трансдермальній формі системи доставки [133, 134]. Він утворює аморфні осади [135,136] або адсорбується на зростаючих кристалічних поверхнях і гальмує кристалізацію ліків у суспензіях [137].

Діас дель Консуело та ін. розробив біоадгезійні плівки ПВП для доставки фентанілу [138]. Вони дійшли висновку, що ПВП-плівки з площею поверхні 1–2 см<sup>2</sup> забезпечують еквівалентний терапевтичний ефект відносно трансдермального пластиру 10 см<sup>2</sup> зі значно меншим часом затримки, роблячи ці системи більш вигідними [138]. Нановолокна ПВП, отримані за допомогою методу електровідтиску, були використані в тканинній інженерії як: біосумісний позаклітинний матрикс та надгідрофобні нановолокна для загоєння ран [139], суміш нановолокна з емодіном ПВП мембрани для доставки ліків і прискореного загоєння ран [140]. Б.-Л. Ван та співавт.

повідомляли про виготовлення Ag NP ліговані плівки хітозану/ПВП, які демонстрували швидку та тривалу бактерицидну активність щодо золотистого стафілокока та кишкової палички [141]. Припущено, що такі плівки можуть значно зменшити кількість інфекцій, пов'язаних з медичними виробами [141].

Оскільки ПВП біосумісний, неканцерогенний та неантигенний, він застосовується у формі наночастинок, нано- та мікрогелів, багат шарових плівок тощо для безпечної доставки генів/ліків [142, 143].

**1.2.3. Використання полівінілпіролідону як платформи для доставки ліків**  
ПВП є одним із найбільш часто використовуваних для досягнення стабільних носіїв [144–154]. Більше того, ПВП використовують як маскуючий засіб проти запахів, а також як стабілізуючий засіб або захисний агент для активної сполуки і для запобігання її окислення та дезактивації. ПВП широко використовують для отримання мікрокапсул [144] і мікросфер [145, 155, 148, 151, 156–166]. Композитні наночастинок також отримували з використанням ПВП як носія [167, 168].

Наночастинок на основі ПВП можуть бути використані для цільової доставки препарату для вибіркового знищення пухлинних клітин [169, 170, 171]. Наприклад наночастинок ( $Fe_3O_4$ , магнетит) покривали ПВП, щоб забезпечити магнітну цільову доставку ліків. [169].

Мікрочастинок на основі ПВП готували за допомогою різних методів, найбільш типовим з яких є розпилювальна сушка [145, 147, 148, 172, 173].

Подібний вплив даного співвідношення на розчинення активної сполуки з частинок також спостерігали в інших дослідженнях [147, 148, 152, 156, 157, 160,], в яких використовували як розпилювальну сушку, так й інші технології мікронізації. У деяких випадках низький вміст ПВП у висушених розпиленням частинках не призводив до поліпшення розчинення активної речовини сполуки [147, 148], як це також траплялося за використання інших методів [154, 160].

Для отримання частинок ПВП, завантажених лікарськими засобами, використовують такі методи як сублімаційне сушіння [174], атомізація [146,

149] та спільний помол [168]. Наприклад, індометацин сушили ліофільно разом з ПВП, зокрема порошок ПВП з лікарським препаратом був інкапсульований у розплавлену стеаринову кислоту за допомогою ультразвукового розпилення [174].

Застосування волокон полівінілпіролідону набуло значного інтересу в декількох областях, головним чином для доставки ліків, для пов'язок на рани та тканинної інженерії [175–180]. Щодо фармацевтичної та біомедичної сфери то можна виготовляти навантажені ліками волокна для поліпшення біодоступності активної речовини [175, 181, 182]. Однак погана стійкість до вологи може бути одним з основних питань, пов'язаних із використанням волокон при доставці ліків та застосування в медицині [183].

Гідрогелі - це полімерні мережі, які можуть поглинати величезну кількість води завдяки гідрофільній групі, що викликає явище набряку. Однак структура гідрогелів зберігається шляхом зшивання між полімерними ланцюгами [184–185]. Гідрогелі були запропоновані у фармацевтичній та біомедичній областях як система доставки ліків для трансдермального введення та місцеві застосування (наприклад, пов'язки на рани), а також назальний та очний шлях введення (наприклад, контактні лінзи) та імплантанти [185–190]. Один із способів виготовлення пов'язки на основі гідрогелю - це методи полімеризації та зшивання [191]. Ці пов'язки виробляли з суміші природних та синтетичних полімерів, у тому числі ПВП [192]. Утворення водневих зв'язків між двома полімерами можна спостерігати за допомогою FT-IR (ІЧ-перетворення, Фур'є аналіз). Вивільнення препарату вивчали при різних значеннях рН (1,4–7,4), при вищому значенні рН спостерігали швидше вивільнення препарату. [193]

### **1.3. Пептидоміметики у біології і медицині**

Природні пептиди володіють перспективними лікарськими властивостями, але часто обмежені в застосуванні через швидкий протеоліз та низьку проникність через мембрани.

Одним із перших терапевтичних застосувань пептидів в медицині є перше лікування дитини з діабетом за допомогою очищеного інсуліну з бичачої підшлункової залози здійснене ще в 1920-х роках [194]. Спочатку лікування хвороби людини пептидами було складним через проблеми синтезу пептидів, які включали знижений вихід та чистоту, низьку стабільність і складні методи доставки. Різноманітні досягнення в хімії пептидів призвели до появи можливості синтезувати синтетичні пептиди і ретельніше їх очистити. Крім того, методи оптимізації пептиду для внутрішнього застосування також стали більш широко доступними [195].

За проведеними оцінками, в світі близько 60-ти пептидів схвалено для використання, а додатково ще 140 пептидних терапевтичних препаратів перебувають на різних стадіях клінічного випробування, при чому, багато з яких засновані на природних амінокислотних послідовностях [196]. У 2010 році лише чотири пептидні лікарські засоби забезпечили щорічний обсяг продаж, що перевищує 1 мільярд доларів США [197].

Об'єм ринку пептидних терапевтичними препаратів продовжує зростати. Проте, залишається й ряд проблем, пов'язаних з природними ендогенними пептидними препаратами, запропонованими як терапевтичні засоби [198].

Обмеження пов'язані з терапевтичними використанням пептидів, долають шляхом модифікації існуючих пептидних послідовностей для створення пептидоміметиків, тобто пептидів, що містять модифіковані амінокислоти або їхні хімічні модифікації [199].

### **1.3.1. Походження пептидоміметиків і джерела їх отримання**

Часто пептиди є лігандами для ендогенних рецепторів, завдяки чому пептидоміметики на основі ендогенних пептидів є більш перспективними сполуками порівняно з антитілами. Як правило, ендогенні пептиди-попередники розщеплюються для генерування біологічно активних метаболітів. Цією природною обробкою можна скористатися, щоб розробити терапевтичні засоби, засновані на активній формі пептидів [200, 201].

Хоча традиційно вважають, що пептиди регулюють клітинну відповідь як рецепторні ліганди, отримано дані, які свідчать, що для регуляції клітинних подій природні пептиди також можуть діяти на внутрішньоклітинні мішені [202].

В еволюційно далеких від ссавців видів тварин пептиди також є цінним джерелом пептидоміметиків. При меншій гомології ці пептиди часто є нерозпізнані або менш ефективно деградуються пептидазами та протеазами людини. Наприклад, ексенатид, гомолог глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), який був виявлений в ящірки (Аризонський отрутозуб), приблизно 50% гомологічний до людського GLP-1. Відмінності в амінокислотних послідовностях ексенатиду і GLP-1 допускають, що препарат з ящірки є більш метаболічно стійкішим, що призводить до більш тривалого періоду його напіввиведення (2,5 год), порівняно з GLP-1 людини (4–5 хв) [203].

### **1.3.2. Модифікація пептидів та їх застосування**

У природі, більшість амінокислот існує в L-конфігурації. Конфігурація D-амінокислот, хоча і нечаста у людей, присутня в інших видів, таких як слимаки, жаби та бактерії [204]. Включення D-амінокислот до біологічно активних пептидів може покращити метаболічну стабільність порівняно з L-амінокислотами, враховуючи, що мало людських ензимів гідролізує пептидні зв'язки за участю D-амінокислот [204].

Вазопресин, або антидіуретичний гормон (АДГ), регулює осмоляльність плазми та контролює затримку води та звуження судин, одночасно виступаючи нейромедіатором [205]. Існує кілька синтетичних похідних вазопресину - терліпресин, аргінін вазопресин (аргіпресин) і десмопресин.

Антидіуретична активність десмопресину вдсятеро більша, ніж вазопресину, але його активність як судинозвужувального препарату є в 1500 разів меншою. В результаті, десмопресин повільно метаболізується порівняно з вазопресином і його можна вводити назально, внутрішньовенно, або у вигляді таблеток для перорального використання [206].

Інші приклади заміни амінокислот з L- на D-форму можна знайти в серед антибіотиків. Даптоміцин - антибактерійний ліпопептид, який використовують для лікування системних інфекцій, викликаних грампозитивними бактеріями, через механізм дії, відмінний від інших антибіотиків, які ефективні щодо бактерій на будь-якій фазі їхнього росту. [207].

Афамеланотид - синтетичний аналог природного походження меланокортиновий пептид-альфа-меланоцитостимулюючий гормон ( $\alpha$ -MSH), що спричиняє засмагу шкіри. Афамеланотид індукує вироблення темного шкірного пігменту за допомогою меланогенезу, зменшуючи пошкодження сонцем світлої шкіри. Період напіввиведення афамеланотид з плазми становить 100 хв, що набагато більше, ніж період напіввиведення природнього пептиду - 20 хв [208].

Включення неприродних (D-конфігурації) амінокислот у пептидні аналоги або пептидоміметики може покращити метаболічну стабільність, зберігаючи при цьому вибірковість та ефективність терапевтичних пептидів. Захищаючи їх від протеолізу і зв'язування [209]. Неприродні амінокислоти є цінним інструментом в хімічній біології для підтримки біо-ортогональної хімії (реакції всередині організмів, які не впливають на їх біологічні процеси) для здійснення селективного зшивання [210], а також для збирання кон'югатів антитіло-лікарський засіб [211].

Неприродні амінокислоти використовують в карбетоцині, який є циклічний восьми-амінокислотний аналог окситоцину, що використовується для обмеження післяпологової кровотечі (особливо під час кесаревого розтину), насамперед через вплив на периферичні рецептори окситоцину. [212].

Зазвичай, пептиди не перетинають біліпідний шар клітинної мембрани. Як результат, гідрофільні сполуки, до яких належать і пептиди, не можуть подолати мембрану шляхом звичайної дифузії. Один із підходів для подолання

даного обмеження - це використовувати пептиди, здатні до проникнення в клітину (домени трансдукції білка) [213].

Ще один важливий підхід для доставки пептидів та збільшення періоду їх напіввиведення - це кон'югація із жирними кислотами. Як приклад збільшення таким шляхом періоду напіввиведення пептидів можна навести ліраглутид, порівняно з екзенатидом або нативним GLP-1. Дана модифікація дозволяє препарату зв'язувати альбумін, захищаючи тим самим пептид від деградації та уповільнювати виведення даного препарату [214–215].

Додаткові перспективні способи доставки пептидів включають: назальне, трансмукозне, під'язикове, трансдермальне та місцеве введення [216–218].

Пептидні та пептидоміметичні терапії продовжують привертати все більший інтерес з боку науковців і фармацевтів. Пептиди представляють групу потужних та специфічних, але безпечних кандидатів для розробки ліків. Наприклад – кендерітид. Він був розроблений для амбулаторного лікування гострої серцевої недостатності після госпіталізації [219], циленгітид - пептид розробляється для лікування гліобластоми та гліоми [220–223].

Пептиди Сето-Шиллера (СС) дана група має широкі можливості застосування для лікування захворювань, пов'язаних з окислювальним стресом, наприклад, діабетичної ретинопатії, і в даний час він оцінюється у понад 10-ти клінічних випробуваннях [224-228].

### **Підсумок огляду літератури**

Численні результати щодо властивостей біополімеру хітозану свідчать про перспективність його застосування у біомедицині. Але результати вивчення біологічних властивостей хітозану є доволі фрагментарними і при проведенні літературного пошуку виявлено, що дані суттєво відрізняються в різних авторів. Крім того, незважаючи на численні варіації модифікацій хітозану, лише декілька з них застосовується, і то у доволі вузькому терапевтичному діапазоні.



Полімер полівінілпіролідон є поширеним компонентом різних фармацевтичних препаратів. Його властивості є доволі зручними як для хімії так і для фармакології, але отримані нами модифікації раніше не вивчалися. Тому було вирішено більш детально вивчити кореляцію між фізико-хімічними характеристиками хітозану та його біологічною активністю, так як в літературі немає однозначних свідчень щодо протимікробної активності та механізму дії хітозану. Отримання відповіді на дані питання дозволять розширити сферу застосування хітозану в біотехнології та медицині.

В даному огляді представлено декілька прийомів застосування пептидів та шляхи подолання проблем, пов'язаних з імунними реакціями. Застосування полівінілпіролідону є альтернативним способом подолання цих проблем, а також підвищує стабільність білкових молекул. Перевірка прийомів іммобілізації дозволить нам використовувати досліджувані носії для нових пептидних молекул та препаратів.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Визначення середньої молекулярної маси продуктів гідролізу хітозану методом віскозиметрії

Наважки хітозану суспендували у 1 мл 3% оцтової кислоти і залишали розчинятися протягом 4 годин. Отримані розчини розбавляли водою у три рази. Окрім цього готували робочий розчин (0,2 М NaCl та 1% оцтова кислота у пропорції 1:2). Для визначення в'язкості використовували віскозиметр ВПЖ-4 (Союзнауцприбор, СРСР). Густину визначають при 25 °С, порівнювали час протікання робочого ( $t_{\text{solvent}}$ ) та експериментальних ( $t_{\text{solution}}$ ) розчинів. Для цього вираховували величини відносної густини ( $z_r = t_{\text{solution}} / t_{\text{solvent}}$ ), специфічної густини ( $z_s = z_r - 1$ ) та внутрішньої густини  $[\eta] = z_s / C$  при  $C = 0$ . Після проведення вимірювань, знаючи концентрації експериментальних розчинів, будували графік залежності  $z_s / C$  від концентрації ( $C$ ) розчинів хітозану. Шляхом екстраполяції визначали значення  $z_s / C$  при  $C = 0$  і отримують  $[\eta]$ . Середню молекулярну масу  $\bar{M}$  визначали за формулою:

$$\log [\eta] = \log K + a \cdot \log \bar{M},$$

де  $K$  і  $a$  є константами  $1,8 \cdot 10^{-3}$  та  $0,93$  відповідно.

#### 2.2. Спектроскопічне дослідження за допомогою методу FTIR спектроскопії

Досліджуваний зразок у вигляді порошку масою 2 мг вносили у KBr 200 мг і перетирали на агатовій ступці до гомогенної субстанції. Перетертий порошок поміщали в заготовку і за допомогою гідравлічного пресу стискали до прозорої таблетки. Таблетку помішали у FTIR-спектрофотометр Vertex X70 і запускали аналіз. Отримані дані порівнювали таблицями спектрів і літературними даними.

### **2.3. Спектрофотометричне дослідження методом UV-vis спектроскопії**

Досліджуваний зразок розчиняли у 3% оцтовій кислоті до концентрації 1 мг на мл. Розчин (1 мл) поміщали у кварцеву кювету, яку переносили у тримач прилада (СФ-42 ЛОМО). Отримані дані порівнювали.

### **2.4. Аналіз розподілу молекул хітозану за молекулярною масою методом електрофорезу**

Електрофоретичний аналіз препаратів хітозану проводили у ПААГ зі ступеневим градієнтом концентрації акриламідру (2,5, 5, 10, 15, 20% АА).

Для проведення електрофорезу готували буфер для гелю (Буфер А) – до 4,8 мл 1 Н КОН, додавали 1,72 мл концентрованої оцтової кислоти, 0,4 мл ТЕМЕД та 3,08 мл дистильованої води, і доводили рН до 4,5. Також готували розчин акриламідру (АА 30%) – 3,0 г акриламідру (АА) та 0,06 г біс-акриламідру (БАА) розчиняли у 10 мл води (співвідношення АА/БАА = 50/1). Окрім 30% готували також 10% розчин акриламідру для 2,5% гелю – 1 г акриламідру та 0,067 г біс-акриламідру розчиняли у 10 мл води (співвідношення АА/БАА = 15/1). Також для приготування гелю необхідний свіжоприготовлений 1% розчин персульфату амонію (ПСА).

Для електрофоретичного аналізу використовували камеру розміром 9\*12 см, у яку заливали гель зі ступеневим градієнтом концентрації акриламідру (2,5, 5, 10, 15, 20 % АА). Із вищевказаних реактивів готували три типи гелю – Гель 1, Гель 2 та Додатковий гель із 2,5% концентрацією акриламідру. Рецептuru приготування цих гелів вказана у Таблиці 2.1.

Табл. 2.1.

Рецептура для приготування гелів для ЕФ зі ступеневим градієнтом  
концентрації акриламідy.

Гель 1		Гель 2		Додатковий гель 2,5%	
Ак	0,6 мл	Ак	0,6 мл	Ак	0,3 мл
АА	3,15 мл	АА	0,8 мл	аа*	0,6 мл
Вода	0,75 мл	Вода	3,0 мл	Вода	1,2 мл
ПСА	0,25 мл	ПСА	0,35 мл	ПСА	0,3 мл
Об'єм	4,75 мл	Об'єм	4,75 мл	Об'єм	2,4 мл
% АА	19,8	% АА	5,04	% АА	2,5

Після приготування розчини цих гелів відповідним чином вносили у камеру для полімеризації, щоб утворилися шари із різними концентраціями акриламідy. Ці розчини вносили у камеру згідно із схемою, вказаною у Таблиці 2.2.

Табл. 2.2.

Послідовність заливки гелів у електрофоретичну камеру для утворення шарів із різними концентраціями акриламідy.

№ шару	Гель 1, (мл)	Гель 2, (мл)	Об'єм шару, (мл)
1	2,5	0	2,5
2	1,5	0,75	2,25
3	0,75	1,5	2,25
4	0	2,5	2,5
Разом	4,75	4,75	9,5

Після полімеризації цих шарів гелю зверху заливали додатковий гель із 2,5% концентрацією акриламідy, вставляли гребінку для формування лунок та залишали на кілька годин для полімеризації.

Електрофорез проводили з використанням буферної системи Рейсфельда ( $\beta$ -аланін–оцтова кислота, рН 4,5) при поступовому підвищенні градієнту потенціалу від 2,5 в/см до 7 в/см протягом 7-12 годин у залежності від стосовного градієнту потенціалу. Електрофореграми забарвлювали розчином амідю чорного 10 Б ( 0,1 мг/мл) у розчиннику метанол:оцтова кислота:вода 4:1:5, після чого гель промивали чистим розчинником. Кількісну інтерпретацію електрофореграм проводили за допомогою програми «Image J».

## **2.5 Культура клітин та визначення цитотоксичності за допомогою тесту з використанням МТТ**

Клітини культивували в модифікованому середовищі Дульбекко і Ігла (DMEM, Sigma, США), доповненому 10% фетальною бичачою сироваткою (Sigma, USA). Клітини вирощували в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> та 95% вологості, і їх повторний посів проводили у співвідношенні 1:5 раз на 2-3 дні.

### *Оцінка антипроліферативної активності досліджуваних речовин*

Скринінг протипухлинної активності сполук щодо ракових та псевдонормальних клітинних ліній вимірювали за допомогою МТТ-тесту з барвником 3- (4,5-диметилтіазол-2-іл) -2,5-дифенілтетразолію бромідом (Sigma-Aldrich, США). Клітини пухлини висівали протягом 24 годин у 96-лункові планшети по 100 мкл при концентрації 5000 клітин/лунка. Після цього клітини інкубували протягом наступних 72 годин з різними добавками. МТТ додавали до досліджуваних клітин згідно з протоколом виробника (Sigma-Aldrich, США). Продукти реакції визначали за допомогою зчитувача поглинання BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Inc., США).

Після медикаментозного впливу частину життєздатних клітин визначали методом МТТ (3- [4,5-диметилтіазол-2-іл] -2,5-дифенілтетразолію бромід; тіазоліл синій) згідно з рекомендаціями виробника (Sigma, США ). Фіолетовий продукт реакції (кристали формагану, розчинені в ДМСО) кількісно вимірювали в багатоканальному мікрофотометрі BioTek 76 883 (BioTek, США) при довжині хвилі 630 нм [229].

## 2.6 Визначення протибактерійної активності за допомогою методу МТТ

Для дослідження протибактерійних властивостей досліджуваних нами полімерів було модифіковано методику, що базується на використанні барвника МТТ. Причиною такого рішення було те, що дослідженню рідин, які містять полімери, перешкоджає мутність зразків, що не дозволяє отримувати достовірні результати. Використання методу з підрахунком колонієутворюючих одиниць (CFU) при значному числі проб є незручним і дуже витратним. Визначення колонієутворюючих одиниць було застосовано для аналізу протигрибкової активності використаних препаратів

Експерименти проводились при рН 5,8, 6,5 та 7,2 для того, щоб дослідити вплив рН на активність КМЦ. Приготування бактеріальної суспензії в середовищах з різними значеннями рН проводили наступним чином. Подальшу бактеріальну культуру в логарифмічній фазі росту в середовищі Сабуро, рН 7,2, центрифугували 10 хв при 500 г, осад бактерій промивали стерильним фізіологічним розчином і ресуспендували в невеликому об'ємі стерильного сольового розчину. Визначений об'єм цієї суспензії вводили в середовище Сабуро з різним рН 5,8, 6,5 або 7,2 для досягнення OD 0,4-0,6 при 590 нм (оптичний шлях 1,0 см). По 100 мкл кожної суспензії вводили в серії з пробірками Еппендорф об'ємом 2 мл, а потім інокулювали 10, 5 і 2 мкл досліджуваного розчину зразка. Кожен пункт повторювали 3 рази. Пробірки інкубували 4 години при 37°C. Потім вводили 10 мкл розчину МТТ (5 мг/мл) і інкубацію продовжували протягом 1 години. Клітини збирали центрифугуванням 5 хв при 1500 г, надосадову рідину відкидали, невеликий осад суспендували в 1 мл ДМСО. Після інкубації протягом 1 години при 37°C OD рідини вимірювали при 580 нм на спектрофотометрі ULAB 102 UV, (Україна). Вплив досліджуваної речовини на життєздатність бактерій порівнювали з ефектом у контролі та обчислювали за формулою:  $(OD \text{ зонда} / OD \text{ контрольного}) \times 100\%$  [230].

## 2.7 Вивчення протигрибкової активності за допомогою визначення колонієутворюючих одиниць

Протигрибкову активність вивчали на штаммах *C. albicans* методом КУО із застосуванням середовища Сабуро. Якість пептону як компонента середовища Сабуро та контроль рН мають велике значення для відтворюваності результатів. В експериментах ми використовували ферментний пептон (Київ, Україна), який забезпечував швидкий ріст *C. albicans* та появу виразних колоній через 24 години інкубації при 37°C.

Суспензію *C. albicans*, що містить  $10^7$  клітин / мл, готували шляхом суспендування клітин, взятих з колоній, вирощених на агарі Сабуро, рН 5,8. Кількість клітин підраховували в гемоцитометричній камері Горяєва, оскільки розмір клітин *Candida* (2,5-4 мкм) дозволяв робити це точно. Досліджуваний розчин в обсязі 10, 5 та 2,5 мкл вводили в 3 пробірки з круглим дном типу Еппендорф, а потім додавали 100 мкл суспензії клітин *Candida*. Були підготовлені дві контрольні пробірки: на початку (час 0) та наприкінці (4 год) інкубації. Пробірки інкубували протягом 4 год при 37°C (за винятком контролю 0, що зберігався при 4°C). По закінченні інкубації з кожної пробірки після ретельного перемішування відбирали 10 мкл аліквоти, розбавляли водою в 10000 разів і 0,2 мл цього розведення розподіляли на поверхні агаризованого середовища Сабуро, рН 5,8, у чашці Петрі. Чашки інкубували при температурі 37°C, і після чіткого утворення колоній (зазвичай через 24 год) зображення сканували і колонії підраховували за допомогою програми Photoshop. Кількість колоній в контрольній пробірці за 0 год має бути близько  $200 \pm 50$  на чашку, в контролі через 4 год інкубації кількість колоній повинна бути в 1,5-2,5 раза вище. Вплив досліджуваної речовини на життєздатність клітин *Candida* виражали як процентне відношення кількості колонії в експериментальних пробах до контрольних (час 0), обчислене за формулою:

$$\frac{\text{кількість колоній в експериментальній пробірці}}{\text{кількість колоній під контролем (на момент 0)}} \times 100 \%$$

Індекс нижче 100% розглядався як кандидацидний ефект, тоді як вище 100%, але менше, ніж у контролі, через 4 год інкубації класифікували як інгібування росту, а вищий, ніж у контролі, через 4 год інкубації вказував на стимулювання росту [230].

## **2.8 Методика детекції FITC-мічених носіїв**

Аналіз локалізації можливих локусів для зв'язування у клітин *in vitro*, полімерного носія з пептидом міченим FITC.

Клітини MCF-7 у концентрації  $1 \cdot 10^5$  клітин у мл, вирощували на покривних скельцях у 12 лунковому планшеті, в продовж 2 годин, після цього до клітин додавали препарат полімерного носія з пептидом міченим FITC та діяли ним у продовж двох годин. Після цього клітини відмивали PBS від культурального середовища та препарату. Скельця з клітинами виймали з лунок та аналізували за допомогою флуоресцентного мікроскопа Carl Zeiss AxioImager A1, обладнаного камерою Carl Zeiss AxioCam MRm при відповідних довжинах хвилі збудження та емісії для виявлення флуоресценції. При необхідності можна застосовувати додаткове фарбування.

## **2.9 Детекція АФК за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням DCFDA**

Для оцінки продуктів супероксидних радикалів аденокарциноми клітинної лінії молочної залози людини MDA-MD-231 висівали на предметне скло в 24-лункову пластину, додаючи по 10 мкМ DCFDA на лунку на 30 хвилин. Потім додавали тестовану сполуку в різній концентрації.

Після інкубації покриття предметних скелець з клітинами негайно аналізували за допомогою флуоресцентного мікроскопа Zeiss AxioImager A1 (Carl Zeiss, Німеччина) при довжинах хвиль 495/529 нм та фотографували за допомогою цифрової камери



## **2.10 Отримання нормальних лімфоцитів людини та їх культивування *in vitro***

Венозна кров відбирається у присутності антикоагулянта (Етичний протокол № 2 27.01.2019). На 20 мл крові 200 мкл нерозведеного свіжого гепарину (1/100). Під ламінаром стерильну кров розводять 2 рази 0,9% NaCl. Розділення проводять у градієнті щільності фікол-верографіну (Lymphoprep, NYCOMED PHARMA AS, Осло, Норвегія). Крім фракції лімфоцитів є моноцити і тромбоцити.

У пробірки, наливаємо по 3 мл розчину фіколу-верографіну і наносимо 6-7 мл розведеної крові (щоб не змішалися). Стерильні закриті пробірки центрифугують на роторі (типу Бакет) при 2000 об / хв протягом 25 хвилин. Після цього промити 3 рази фізіологічним розчином при 1500 об / хв протягом 5 хвилин. Для відділення тромбоцитів останній раз центрифугують при 1000 об / хв, тромбоцити зависають у супернатанті. Отримані лімфоцити ресуспендують у середовищі RPMI-1640, культивують протягом декількох днів (живуть до 10 днів). Якщо необхідно відокремити лімфоцити від моноцитів, тоді залиште суспензію клітин на 24 год, а потім перенесіть лімфоцити в іншу карель. Моноцити приєднуються, а лімфоцити знаходяться в суспензії. Для стимулювання проліферації, ми покрили пластикову пластину антитілами CD3+ в концентрації 10 мкг / мл і інкубували при 50°C через ніч перед додаванням клітин. Клітини культивували в середовищі RPMI-1640 з 20% FBS.

## **2.11 Приготування хітозан-етакридинового комплексу**

Для приготування комплексу хітозан-етакридин 100 мг хітозану перемішували з 4 мл 1% розчину NaHCO<sub>3</sub>. Для поліпшення змочування порошку хітозану цю суміш перемішували протягом 20 хв на гарячій водяній бані при 60 - 70°C. Суміш центрифугували, супернатант видаляли, додавали 4

мл 2% водного розчину етакридину лактату. Через 2 год інкубації в пробірці етакридин лактат, не пов'язаний з частинками хітозану, вимивали один раз 10 мл дистильованої води, потім кілька разів 10 мл 6% водного розчину NaCl до знебарвлення супернатанту, вкінці промивали 10 мл 90% етанолу. Отриманий жовтий порошок комплексу хітозан-етакридин сушили в сушильній шафі при 55°C. Вміст етакридину в отриманому комплексі визначали спектрофотометрично, вимірюючи екстинкцію розчину в 1% оцтовій кислоті при 364 нм.

## **2.12 Вивчення фармакокінетики комплексу хітозан-етакридин**

Фармакокінетику комплексу хітозан-етакридин вивчали у щурів масою 200 ± 20 г. Тваринам внутрішньочеревно вводили 0,6 мл 1% розчину комплексу хітозану, що містить 10% лактату етакридину, розчиненого в 0,15 М ацетатному буферному розчині, рН 6,5. Паралельно мишам внутрішньочеревно вводили 0,6 мл 0,1% розчину етакридину лактату. В обох експериментах через ті ж проміжки часу збирали 0,4 - 0,8 мл крові в 1,0 мл забуференого сольового розчину, що містив 2% цитрату натрію для захисту від гемолізу - 30 хв, 4 год, 8 год, 20 год, 48 год, 72 год, 96 год. Еритроцити видаляли центрифугуванням, надосадову рідину розводили до 2,0 мл і кількість етакридину визначали флуориметрично на флуориметрі Quantech Fluorimetr UV-VIS моделі QNT (США, Thermo Fisher Scientific) із використанням SC 535 (поглинальний фільтр) і NB 440 (фільтр збудження).

## **2.13 Фарбування клітин нейтральним червоним та Hoechst 33342**

Спостереження за культурами клітин та оцінку живих, апоптотичних та мертвих клітин проводили на мікромедичному мікроскопі Mick Med - 12 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Росія) при збільшенні ~ 400 разів. В області збудження 320-390 нм та випромінювання 420-480 для Hoechst 33342 та збудження 550-600 нм та випромінювання 750 нм для нейтрального червоного. Тестові кон'югати, мічені FITC, додавали в лунки для культури згідно експериментальних схем і інкубували протягом 2, 4 та 6 годин. Використовували Hoechst 33342 при кінцевій концентрації 0,5 мкг / мл,

нейтральний червоний - при кінцевій концентрації ~ 0,1 мг / мл Фторхром додавали до клітин до кінця експерименту та інкубували протягом 20-30 хвилин. За цих умов клітини відрізнялися контурами або формою цитоплазми та морфологією ядер.

Фотографування проводили на флуоресцентному мікроскопі Zeiss (Carl Zeiss, Німеччина) за допомогою камери AxioImager A1, яка входить до складу мікроскопа, із збільшенням ~ 400 разів у відповідних зонах збудження та випромінювання.

#### **2.14 Виявлення білків-мішеней комплексу Р4Р за допомогою масс-спектрометрії**

У рамках гранту фірми Фольцвагген (Німеччина) «Щодо розуміння сигнальних мереж, залучених у загибель клітин за дії лактаптину» (2016-2019 рр.). у нас була можливість провести дослідження на білковому Масс спектрометрі в Катарському національному університеті в місті Доха, Катар.

Даним методом виявлено які із білків клітини зв'язуються з досліджуваним препаратом. Представлена методика розроблена за безпосередньої участі дисертанта і є дослідницькою складовою представленої дисертації.

Схему першого етапу такого дослідження було апробовано на поліпептиді лактаптині, який є фрагментом білка казеїну з грудного молока і володіє протипухлинними властивостями. Для цього використовували магнітні частинки, покриті полімером, до якого ковалентно був приєднаний лактаптин (цей фрагмент роботи був виконаний у співпраці з доктором Д. Гораком (Інститут макромолекулярної хімії Чеської АН, Прага, Чеська Республіка). Ці частинки інкубували з плазмою крові і за допомогою магніту виділяли плазмові білки, які зв'язувалися з афінним сорбентом (Рис. 2.1). Зв'язані білки елюювали 4 М сечовиною і розділяли за допомогою електрофезу в поліакриламідному гелі.

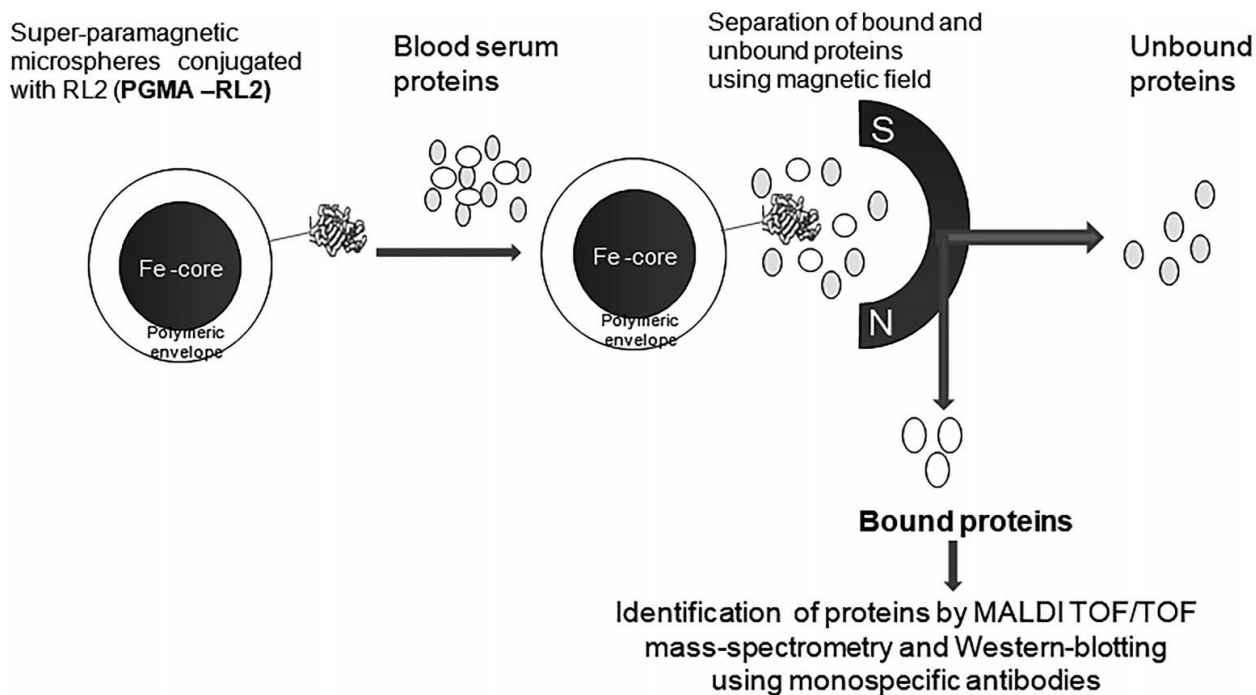


Рис. 2.1. Схематичне зображення методики отримання білків мішеней.

У подальшому електрофоретичний гель фарбувався барвником кумасі. Отримані білкові фракції вирізалися і поміщалися в епандорфи для подальшого зберігання та транспортування. Отримані зразки є доволі стійкими для транспортування та добре зберігаються тривалий період.

Наступним кроком було висушування і відмивання отриманих зразків від фарби і гелю. Для визначення складу білків, після висушування їх трипсинізували високо очищеним трипсином. Отримані зразки змішували з  $\alpha$ -ціано-4-гідроксицинамічною кислотою, і наносили на спеціальний металічний планшет.

Подальший аналіз проводили на мас-спектрометрі (UltrafleXstreme instrument Bruker, Germany). Внаслідок дії кислоти утворювалися кристали протеїнів (амінокислот), вони піддавалися дії енергетичного потоку фотонів (лазера), і проводилася детекції «вібруючої» відповіді, так як кожна амінокислота має свою структуру то сигнал був різний, що дозволяло визначити амінокислотний склад протеїнів. Для аналізу потрібно було вибрати кристали середньої величини, так як великі могли давати невірні результати

(накладання піків), а невеликі кристали давали недостатню довжину амінокислотного ланцюга для аналізу.

Отримані дані аналізувалися за допомогою професійних приватних програм мас-спектрометра, дані порівнювалися з відомими послідовностями протеїнів в базі даних NCBI. Основним критерієм для підтвердження достовірності результату була так звана унікальність послідовності.

Під унікальністю розглядається параметр не випадкового складання білка. Тому отримані результати порівнюють з імовірнісною моделлю випадкової послідовності. Дана модель є результатом повністю випадкового складання послідовності певних амінокислот чи нуклеотидів певної вибірки. Тобто, яку випадкову кількість варіацій амінокислот необхідно взяти, щоб отримати точно таку ж послідовність. Даний показник в графіках позначається «probability» і не повинен бути нижче 1Е, (показник Е вираховується програмою FASTA, і є показником імовірності). Ще одним показником є Est'dZ. Даний показник не повинен бути менше 1 і свідчить про імовірність визначення точного білка в суміші зразка. Ще одним параметром вказаним в таблиці є номер реєстрації білка в міжнародній базі даних.

За цим номером легко знайти виявлений білок [231].

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У сучасній медицині і фармацевтиці застосування полімерів, як носіїв та елементів препаратів стає все більш зручним і ефективним. Таким чином, одним із ключових завдань для науковців є не тільки розробка нових препаратів, а також розширення прийомів та методів їх застосування.

Використання полімерів та наночастинок дозволяє зменшити токсичність, збільшити терапевтичне вікно препаратів, полегшити введення чи пролонгувати їх дію. Ефективність і доцільність застосування різних полімерів може сильно відрізнятись. У даній роботі проведено дослідження двох типів полімерів – природних (хітозан) і штучних (похідні полівінілпіролідону).

При опрацюванні літератури щодо використання препаратів хітозану встановлено, що незважаючи на перспективність цього полімера в біології і медицині, його властивості вивчені фрагментарно, а отримані результати часто суперечливі й не співпадають в різних роботах. Зокрема, біологічна активність хітозану, його комплексування з іншими субстанціями, ад'ювантні властивості часто розбіжні в декілька разів. Враховуючи ці обставини, нами було прийнято рішення розробити оригінальну методику отримання хітозану з підмору бджіл та інших джерел, а також дослідити властивості отриманих зразків хітозану, порівнявши їх з властивостями хітозанів інших виробників.

Хітозан отримували на лабораторній базі відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України під керівництвом доктора біол. наук Луцика М.Д. і доктора фарм. наук Антонюка В.О.

Препарати полівінілпіролідону, використані в нашій роботі для іммобілізації пептидних структур і створення пептидоміметиків, були синтезовані на кафедрі органічної хімії Національного Університету «Львівська Політехніка»

### 3.1. Хітозан і його похідні

Нами розроблено оригінальні методики для отримання хітозану з різних джерел: 1) з крабів (найближче джерело до класичної системи отримання хітозану з крилю); 2) з підмору бджіл (перспективне джерело для промислового отримання хітозану в Україні); 3) з плодових тіл грибів.

#### 3.1.1 Отримання і характеристика хітозану з різних джерел

Подрібнені сухі панцирі крабів кип'ятили протягом 2 год в колбі з водою. Очищений матеріал обробляли 5% соляною кислотою при кімнатній температурі. Після декальцинації соляною кислотою панцирі кілька разів промивали водою та кип'ятили у 5% розчині NaOH упродовж 2 год. Нерозчинний залишок промивали водою і ще двічі обробляли кислотою та лугом, як описано вище. Отриманий таким чином хітин є легкою масою, слабо забарвленою у рожевий колір.

Очищений хітин подрібнювали до пудри із розміром частинок 0,1 мм за допомогою електричних подрібнювачів і просіювання через сито 100 меш.

Деацетилювання хітину проводили шляхом гідролізу 40% NaOH при 110 °C. Порцію хітину (10 г) суспендували у 7-8 об'ємах (70-80 мл) розчину NaOH, поступово додаючи хітин до потрібного об'єму лугу. Змішування проводили у фарфоровій ступці, щоб уникнути утворення згустків, до набуття суспензією густої консистенції. Суспензію переносили із ступки у колбу, яку заповнювали майже повністю, залишаючи невеликий об'єм повітря. Колбу закривали тefлоновим корком, поміщали у автоклав і нагрівали протягом 3 год при 110 °C та тиску 160 кПа. Необхідно, обережно проводити маніпуляції з лугом при підвищеній температурі та тиску. Після охолодження реакційної суміші її розводили двома об'ємами дистильованої води і центрифугували 15 хвилин при 1700 g. Осад промивали водою ще двічі, збираючи його центрифугуванням, після чого суспендували у двох об'ємах дистильованої

води і концентрованою оцтовою кислотою доводили рН до 10-11. Осад збирали центрифугуванням тривалістю 15 хв при 1500 g.

Осад хітозану розмішували у 3% розчині оцтової кислоти. Розчинений хітозан зумовлює високу в'язкість суспензії, тому об'єм розчину оцтової кислоти має бути достатнім для забезпечення належної в'язкості суспензії. Суспензію перемішували механічно за допомогою мішалки протягом 12 год, центрифугували при 2700 g протягом 20-25 хв і збирали в'язку прозору надосадову рідину. Осад розмішували у 3% розчині оцтової кислоти і перемішували протягом 6 год, центрифугували і відбирали надосадову рідину. До отриманого осаду знову додавали 3% оцтову кислоту, перемішували протягом 3-4 год, центрифугували і збирали надосадову рідину. Нерозчинний осад зберігали для повторного гідролізу.

Об'єднану надосадову рідину нейтралізували до рН 9 шляхом пропускання аміаку (газу) через розчин. Хітозан осаджувався у формі крупних пластівців, які збирали центрифугуванням при 1500 g протягом 10 хв. Осад промивали рівним об'ємом води і проводили обробку для отримання хітозану. До гелеподібного осаду додавали 20% оцтову кислоту при перемішуванні до розчинення речовини, яке починається при рН 5,0 і нижче. Розчинення здійснювали протягом кількох годин, для його прискорення суспензію пропускали через гомогенізатор Поттера-Ельвейема. До в'язкої суспензії додавали при перемішуванні 25% гідроокис амонію до рН 5,5. Суспензію центрифугували 15 хв при 2700 g і збирали в'язкий прозорий супернатант. Супернатант доводили до рН 6,1-6,3 за допомогою 25% гідроокису амонію, який додавали по краплях при інтенсивному перемішуванні. До отриманого розчину додавали етанол при постійному перемішуванні до кінцевої концентрації 25%. Желеподібний осад відділяли центрифугуванням при 1500 g, і позначали як «фракція 1». До прозорої надосадової рідини додавали етанол до кінцевої концентрації 55-60% і підлужнювали 10% розчином гідроокису амонію до рН 6,7-6,8. Суміш витримували кілька годин або протягом ночі у холодильнику, після чого осад збирали центрифугуванням при 1500 g



протягом 10 хв і позначали як «фракція 2». Обидва осади (фракція 1 і 2) наносили тонким шаром на скляні пластини і залишали при кімнатній температурі до повного висихання. Сухий матеріал збирали зі скла, подрібнювали до порошку, просівали через сито 60 меш (розмір частинок 0,25 мм і менше) і зберігали у ексікаторі над  $\text{CaCl}_2$ .

Одним із наших завдань було отримати препарати хітозану із підмору бджіл. Для цього нами було розроблено нижче приведені методики.

Бджолиний підмор місцевого походження (Львівська область, Україна) очищали від воску та сторонніх домішок і промивали шляхом суспендування у киплячій воді. Після охолодження рідину продавлювали через тканину, а твердий матеріал знову промивали киплячою водою. Процедура повторюють 3-4 рази, після чого рештки рідини видаляють під пресом. Вологий матеріал сушать при кімнатній температурі і зберігають в герметично закритій посудині, до якої кладуть шматок вати, просоченої хлороформом для запобігання росту цвільових грибів.

Відмитий матеріал подрібнюють до грубого порошку (розмір частинок менше 1 мм) за допомогою кавомолки та сита. Для елімінації ліпідних сполук та воску порошок навантажують в колонку та просочують петролейним ефіром у пропорції 1 об'єм розчинника до 1 об'єму матеріалу. Заміну петролейного ефіру проводять 3-4 рази. Наприкінці розчинник відсмоктують з колонки насосом, матеріал видаляють та залишають для випаровування решток ефіру.

Матеріал далі подрібнюють до частинок розміром менше 0,25 мм. Подрібнення проводять у водній суспензії, оскільки пил, що утворюється у процесі, здатний подразнювати дихальні шляхи. Знежирений матеріал суспендують у водопровідній воді. Отриману густу суспензію подрібнюють у гомогенізаторі (MPW, Poland), використовуючи ніж типу «ножиці» та пропускають через сито з розміром отворів 60 меш (0,25 мм). Частинки, що пройшли крізь сито залишають на 60-90 хв. для осідання. Процес повторюють багато разів для отримання необхідної кількості матеріалу. Зрештою, частинки

збирають на лійці Бюхнера, промивають водою та висушують або зберігають у вигляді пасти у закритій ємності.

Декальцинацію проводять шляхом суспендування певної наважки порошку (наприклад 100 г) або вологої пасти у 2,5-3,0 % розчині ЕДТА (400-500 мл). Після цього суспензію доводять до рН 3,5-4,0 та залишають при кімнатній температурі на 24 години. Твердий осад збирають фільтрацією на лійці Бюхнера через щільну тканину з поліаміду (капрону) у якості фільтра та відмивають водою. Отриманий матеріал суспендують у 400 мл дистильованої води при температурі 80 °С. До суспензії додають певну кількість NaOH до кінцевої концентрації 5%, після чого нагрівають на водяній бані до 70 °С, час від часу перемішуючи, та залишають для охолодження. Суміш центрифугують 15 хв при 2000 об/хв, після чого мутний коричневий супернатант зливають, а щільний чорний осад збирають. Осад відмивають трьома об'ємами дистильованої води та центрифугують 15 хв при 2000 об/хв. Процедуру відмивання повторюють три рази. Обробку осаду 5% NaOH при 70°C та його відмивання проводять ще раз, після чого отриманий матеріал збирають фільтрацією на лійці Бюхнера із використанням тканини з поліаміду (капрону), як фільтра. Отриманий матеріал забарвлений у чорний колір завдяки наявності меланіну.

Для відбілювання бджолиного хітину використовують гіпохлорит натрію. Процес знебарвлення проводять у пластиковій ємності, що герметично закривається і має трубку з клапаном або краном для додавання реактивів, не відкриваючи при цьому ємність.

Наважку гіпохлориту кальцію (40 г, вміст хлору 25-28%) подрібнюють в ступці з додаванням 40 мл води. До цієї суспензії додають 28 г карбонату натрію, розчиненого у 60 мл води. Отриману масу ретельно перемішують до її розрідження та залишають на кілька годин у герметично закритій ємності. Після цього масу фільтрують через щільну тканину, а отриману рідину (близько 70 мл) – через фільтрувальний папір. Концентрація хлору в розчині становить 7,0-7,5 % (визначають йодометричним методом).

40 г вологого матеріалу, отриманого після обробки 5% NaOH, завантажують у пластикову ємність, додають 20 мл дистильованої води та 80 мл розчину гіпохлориту натрію та закривають. Під час перемішування, маса починає нагріватися, тому посудину треба охолоджувати на льодяній бані, щоб не допустити підняття температури вище 40°C. Після 20 хв в посудину через трубку додають 2,5 мл 2N HCl і перемішують масу. Додавання HCl повторюють двічі з інтервалом 20 хв. Після 20-30 хв після останнього додавання соляної кислоти масу фільтрують на лійці Бюхнера з використанням насоса та тканини з поліаміду (капрону), у якості фільтра та відмивають дистильованою водою. Темний коричневий фільтрат зливають, а масу, що лишилася на фільтрі повертають до пластикової ємності, додають 15 мл дистильованої води та 40 мл розчину гіпохлориту натрію. Через 15-20 хв протікання реакції маса змінює колір з коричневого на світло-жовтий і її відфільтровують, як описано вище. Нерозчинний залишок промивають дистильованою водою та 0,2% оцтовою кислотою (pH 3,0-3,5).

Залишковий хлор видаляють шляхом суспендування отриманої маси у дистильованій воді та титруванням 5% розчином натрій сульфату, контролюючи при цьому pH суміші. Початкове додавання натрій сульфату призводить до закислення суспензії до pH 2,0 завдяки утворенню HCl під час виділення хлору. Після нагромадження хлору подальше додавання натрій сульфату призводить до зрушення pH в лужний бік. Після досягнення pH 6,0 суспензію залишають на кілька годин, після чого частинки хітину збирають фільтруванням, промивають 0,2% оцтовою кислотою, етанолом та висушують при кімнатній температурі.

Отриманий хітин подрібнюють в порошок із розміром частинок менше 0,25 мм, використовуючи кавомолку та сито з розміром отворів 60 меш. Наважку порошку (10 г) в ступці змішують з 80 мл 40% NaOH, суміш переносять в колбу і закривають тефлоновим корком. Гідроліз проводять при 115 °C протягом 2,5-3,0 годин. При роботі обов'язково дотримуватися правил техніки безпеки. Після охолодження суміш розводять двома об'ємами

дистильованої води та центрифугують 15 хв при 4000 об/хв. Коричневий супернатант збирають та зберігають для подальшої обробки, тоді як осад суспендують двома об'ємами дистильованої води та концентрованою оцтовою кислотою доводять рН суміші до 10. Суміш також центрифугують 15 хв при 4000 об/хв. Осад промивають ще раз та позначають, як головну фракцію хітозану. Супернатанти об'єднують, концентрованою оцтовою кислотою доводять рН до 10 та центрифугують 15 хв при 4000 об/хв. Отриманий осад позначають, як додаткову фракцію хітозану.

Головну фракцію хітозану суспендують у 3% оцтовій кислоті, шляхом перемішування суспензії протягом 1 години на механічній мішалці. Частина нерозчинного матеріалу видаляється шляхом центрифугування протягом 20 хв при 4500 об/хв. Через чисту надосадову рідину пропускають аміак (газ) до рН 9 та збирають осад, що при цьому утворюється. Осад суспендують у двох об'ємах дистильованої води, суміш гомогенізують кількома рухами товкачика у гомогенізаторі Поттера-Ельвейема, 10% оцтовою кислотою доводять до рН 4,8 та залишають принаймні на 1 год для повного розчинення хітозану. Після цього хітозан очищають за допомогою фракційного осадження при різних значеннях рН. Зміни рН досягають додаючи 10% розчин гідроксиду амонію. Отримують три фракції хітозану: фракція А, що осідає при рН 6,4, фракція В – при рН 7,0, та фракція С – при рН 8,6. Осади збирають центрифугуванням 10 хв при 1000 g, відмивають водою з рН їх преципітації, розмащують тонким шаром на скляній пластині та висушують. Аналогічним чином очищають хітозан із додаткової фракції. Сухий матеріал збирають, подрібнюють в порошок з розміром частинок менше 0,25 мм (визначають за допомогою просіювання через сито 60 меш) та зберігають у ексікаторі над безводним  $\text{CaCl}_2$ .

Проведено обмежений гідроліз хітозану, що дозволив отримати фракції з різною молекулярною масою. Обмежений гідроліз хітозану проводили у двох варіантах: 1) 1% розчин хітозану у 5%, 10% та 20% оцтовій кислоті (у розчин з 20% оцтовою кислотою додавали соляну кислоту до концентрації 0,4

М) інкубували протягом 30, 60, 90 хв при температурі 70 °С, 90 °С; 2) 100 мг порошку хітозану суспендували у 2 мл ацетону з добавкою 0,1 або 0,2 мл оцтової кислоти. Суміш залишали у чашці до випаровування ацетону, залишок порошку запаювали в ампули та нагрівали до 90 °С протягом 30 та 60 хв.

Після остигання суміш нейтралізували розчином аміаку до рН 6, давали відстоятися і центрифугували протягом 15 хв при 3000 об/хв. Осад відбирали і позначали як «Фракція А», а надосадову рідину доводили до рН 7 і знову центрифугували 15 хв при 3000 об/хв. Осад збирали і позначали як «Фракція В», а надосадову рідину доводили до рН 8,5 і знову центрифугували 15 хв при 3000 об/хв. Отриманий осад позначали як «Фракція С». Осади, позначені як фракції А, В і С промивали водою, та висушували на скляних пластинах. Після висихання, речовину збирали, подрібнювали до порошку з розміром частинок менше 0,25 мм та зберігали у ексікаторі над безводним  $\text{CaCl}_2$

Також розроблено оригінальний метод отримання хітозану з плодових тіл грибів. Це джерело хітозану є доступним, оскільки плодові тіла грибів можна як вирощувати, так і заготовляти на лісництвах. Однак виділення хітозану з представленого джерела має деякі недоліки, зокрема отримані зразки часто забруднені вуглеводами, видалення яких є доволі складним. Нижче описана методика його отримання і очистки.

Плодові тіла хряща-молочника пергаментного та інших грибів використаних в роботі (дубовика оливково-бурого - *Boletus luridus* Fr.; моховика зеленого - *Xerocomus subtomentosus* (Fr.) Quel.; гливи звичайної - *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm; трутовика лускатого - *Polyporus squamosus* Huds.: Fr.) збирали у мішаному лісі у Сколівському районі Львівської області під час їх масової появи. Гриби впродовж 6 годин доставляли в лабораторію для подальшої переробки.

Частину зібраних плодових тіл грибів висушували у сушильній шафі при  $+52 \pm 3^\circ\text{C}$  і використовували для одержання хітину і хітозану.

Іншу частину плодових тіл грибів, зокрема, з *L. pergamenus*, подрібнювали на м'ясорубці і сік витискали на потужному пресі. Сік можна

використовувати для одержання лектину, а вичавки висушували і екстрагували метанолом. Метанольний екстракт фракціонували органічними розчинниками і проводили хроматографію на колонці силікагелю і таким чином одержали фракції, що містили сесквітерпени, фталати, стеаринову кислоту. Вичавки після екстракції метанолом повторно висушували і використовували для одержання хітину і хітозану.

*Одержання «сирого хітину».* Очистку хітину з плодових тіл грибів та вичавок плодових тіл *L. pergamenus* здійснювали за методикою, описаною для одержання хітину глив [15]. Цей продукт можна назвати «сирим хітином» або «луго-нерозчинним матеріалом» (ЛНМ) через велику кількість баластних речовин.

Висушені плодові тіла грибів та вичавки *L. pergamenus* порошокували в електроміксері і просівали через сито з розміром пор 0,5 мм. Далі поміщали в скляну посудину і заливали 0,1 н. розчином NaOH у співвідношенні сировина – екстрагент 1:10. Суспензію розмішували на механічній мішалці і перемішували при кімнатній температурі протягом 4-х годин. Після цього екстракт видаляли, осад промивали дистильованою водою на воронці Бюхнера до нейтральної реакції промивних вод (рН 7,0 – 7,6), далі одержаний матеріал, збагачений на хітин, обробляли 0,6 М розчином соляної кислоти при постійному перемішуванні протягом 4-х годин при кімнатній температурі для очистки від мінеральних речовин. Після цього нерозчинний матеріал промивали дистильованою водою на лійці Бюхнера до нейтральної реакції промивних вод (рН 7,0 – 7,6), потім промивали 95° етанолом та ЛНМ висушували в сушильній шафі при температурі 60°C.

Для одержання хітозану ЛНМ, одержаний з грибів, заливали 50 % розчином NaOH у співвідношенні 1:10 і поміщали на киплячу водяну баню на 60 хв. Після цього оброблений таким способом порошок хітину промивали дистильованою водою до тих пір, поки промивні води не втрачали колір. Хітозан із вичавок, оброблених таким способом, екстрагували 2 % розчином оцтової кислоти при інтенсивному перемішуванні суміші протягом 30 хв.

Обробку вичавок 2 %-ним розчином оцтової кислоти повторювали ще раз. Надосадову рідину обох екстракцій об'єднували і хітозан осаджували 0,1 н. розчином NaOH при доведенні рН до 9,5 – 10,0. Осад хітозану промивали водою, далі 96% етанолом, ацетоном, диетиловим ефіром і висушували при кімнатній температурі.

Нами проводилося визначення вмісту хітину у ЛНМ. Для визначення вмісту хітину у ЛНМ точну наважку (2,5 г) добре подрібненого ЛНМ з плодкових тіл грибів (*Lactarius pergamenus*, *Boletus luridus* та *Pleurotus ostreatus*), одержаного за методикою, описаною нижче і для порівняння хітину креветок (фірми “Sigma”), розчиняли в 50,0 мл 36 % HCl шляхом перемішування на льодяній бані протягом години. Надосадову рідину відділяли від осаду шляхом центрифугування. Хітин осаджували після обережного підлужнення розчину на льодяній бані до рН 10,0, не допускаючи нагрівання розчину вище 5°C. Його промивали декілька разів дистильованою водою, далі 95% етанолом, ацетоном, диетиловим ефіром та висушували в сушильній шафі при температурі 60°C, після чого зважували.

Оптимальні результати визначення хітину у грибному матеріалі були одержані при безперервному перемішуванні суміші ЛНМ грибів ( $d < 1$  мм) у співвідношенні 1:40 протягом двох годин з 36 % HCl та наступним осадженням кислоторозчинного матеріалу лугом. Нейтралізацію лугом кислоторозчинного матеріалу слід проводити обережно, додаючи до розчину лід і проводячи нейтралізацію повільно, краплями при перемішуванні не допускаючи нагрівання суміші. Осад хітину, який випадає при цьому, звільнений від пігментів, світлого кольору. Його промивають двічі водою, потім спиртом, ацетоном та диетиловим ефіром [234]. Результати досліджень представлені в табл. 3.1.

## Вихід хітину (в %) від маси луго-нерозчинного матеріалу

№ п/п	Джерело хітину	Маса до розчинення в 36 % НСІ (в мг)	Маса хітину після осадження лугом (в мг)	% хітину від маси ЛНМ
1	Хітин креветок (фірми "Sigma")	500,0	471,5	94,3
2	Висушені плодові тіла <i>Lactarius pergamenus</i>	42009	1930	4,6
3	Сухі вичавки плодових тіл <i>Lactarius pergamenus</i>	2504	224	8,96
4	Висушені плодові тіла <i>Boletus luridus</i>	27070	947	3,48
5	Висушені плодові тіла <i>Xerocomus subtomentosus</i>	2512	205	8,16
6	Висушені плодові тіла <i>Pleurotus ostreatus</i>	20 000	876	4,38

Таким чином, ці дослідження вказують на те, що вміст хітину в плодових тілах справжніх грибів коливається від 3,48 до 8,16 %.

Із хітину, одержаного таким способом, можна одержати хітозан. Однак, через великий розхід кислоти та лугу це робити недоцільно. Даний експеримент нами було здійснено лише з метою встановлення вмісту хітину у луго-нерозчинному матеріалі.

Простіше і дешевше одержувати хітозан шляхом прямого лужного гідролізу «Сирого хітину» плодових тіл грибів, як описано вище.

Молекулярну масу одержаних продуктів визначали за допомогою віскозиметричного методу. В'язкість вимірювалась при 25°C за допомогою віскозиметра Уббебольда типу ВПЖ-4 (ВПЖ-4, Союзнауцприбор, СРСР) з діаметром капіляра = 0,82 мм. Вимірювання в'язкості розчинів хітозану проводили в суміші 0,17 М оцтова кислота: 0,2 М NaCl (1:2).



Таблиця 3.2

Вихід хітозану (в %) від маси ЛНМ

№ п/п	Джерело хітозану	Маса ЛНМ	Маса одержаного хітозану	% хітозану від маси ЛНМ
1.	Висушені плодові тіла <i>Lactarius pergamenus</i>	42,01	1,51	3,59
2	Сухі вичавки плодових тіл <i>Lactarius pergamenus</i>	10,0	0,627	6,27
3	Висушені плодові тіла <i>Boletus luridus</i>	34,80	0,825	2,37
4	Висушені плодові тіла <i>Pleurotus ostreatus</i>	20,03	0,661	3,30
5	Висушені плодові тіла <i>Polyporus squamosus</i>	34,8	0,821	2,36

Згідно реакції гідролізу з хітину теоретично можна одержати  $\approx 81$  % хітозану, однак практично нами було одержано меншу кількість (від 68,1 % для *B. luridus* до 78,0 % для *L. pergamenus*) (табл. 3.1. і 3.2.).

Як контроль використовували розчини поліетиленгліколю різної концентрації з молекулярною масою 40 кДа, виходячи з припущення, що константи у рівнянні Штаудінгера для обох речовин є близькі.

Таблиця 3.3.

Молекулярна маса хітозану різних грибів визначена віскозиметрично

№ п/п	Джерело одержання	Мол. маса (в кДа)
1	Хітозан плодових тіл <i>Lactarius pergamenus</i>	72 $\pm$ 3
2	Хітозан плодових тіл <i>Polyporus squamosus</i>	36 $\pm$ 3
3	Хітозан плодових тіл <i>Pleurotus ostreatus</i>	97 $\pm$ 3
4	Хітозан фірми Тяньші	249 $\pm$ 5
5	Хітозан, одержаний з хітину креветок	625 $\pm$ 10

Таким чином, середні молекулярні маси хітозанів базидіомікотових грибів значно відрізняються між собою (гіпотетично причиною є хітин

глюканові комплекси). В той же час хітозани цих грибів мають значно меншу молекулярну масу, ніж хітозан, одержаний з креветок [234].

Також проводили визначення молекулярної маси бджолиного хітозану, а також промислового хітозану за допомогою віскозиметрії (Табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Молекулярна маса досліджуваних зразків

<b>Препарати хітозану</b>	<b>Молекулярна маса (кДа)</b>
Бджолиний хітозан, фракція А і В	280±30
Бдожилиний хітозан, фракція С	125±17
Хітозан із панцирів крабів	620±55
Хітозан (Celox)	500±55
Хітозан (Aldrich) серед.мол.мас	360±30
Хітозан (Organica) Canada	150±14

З отриманих результатів можна зробити висновок, що хітозан є гетерогенною сполукою, в якій можуть знаходитися фрагменти з різною молекулярною масою. Також підтверджено значення джерела хітозану.

Проведено спектральне дослідження хітозану, зокрема визначено UV-віс спектри отриманих зразків (рис. 3.1.).

В ультрафіолетовій ділянці спектра виявили виражене збільшення поглинання світла до 230 нм з невеликим тінювим піком при 280-300 нм в

обох лініях, хітозану з медоносних бджіл і з краба. Можна припустити, що цей пік може бути викликаний поглинанням слідів поліпептидів, тісно зв'язаних з хітозаном. Як і очікувалося, у зразках, забруднених меланіном, виявлене різке збільшення поглинання УФ.

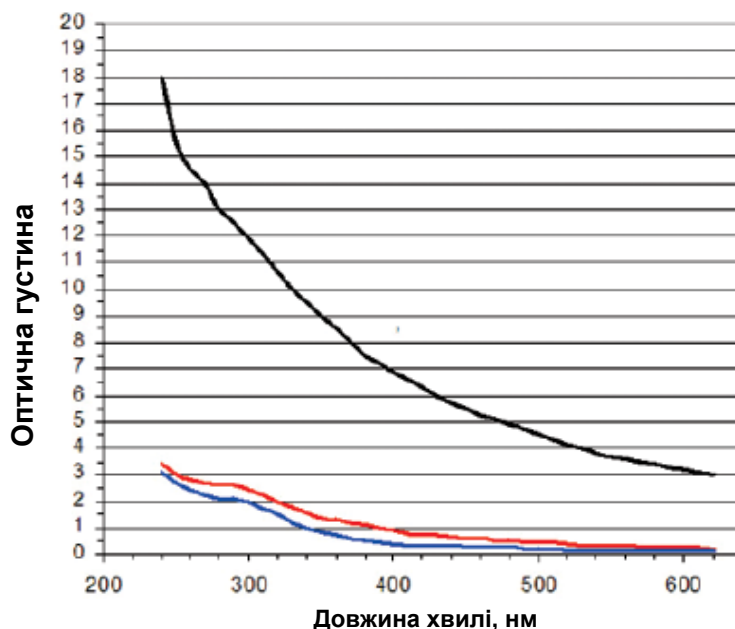


Рис. 3.1. Спектри хітозану в ділянці ультрафіолету. Червона лінія – бджолиний хітозан, синя лінія – крабовий хітозан, чорна лінія – хітозан-меланіновий комплекс

Отримані сполуки також досліджували за допомогою FTIR спектроскопії. Аналіз проводили на базі кафедри неорганічної хімії в Університеті Дуйсбург-Ессен (ФРН) під час 1-місячного стажування автора роботи в рамках стипендії DAAD під керівництвом професора Матіаса Еппле. Порівняння спектру поглинання в інфрачервоній ділянці випромінювання отриманих нами зразків хітозану з спектром хітозану фірми Sigma (рис. 3.2.) дозволяє стверджувати, що очищена нами речовина дійсно є хітозаном [113].

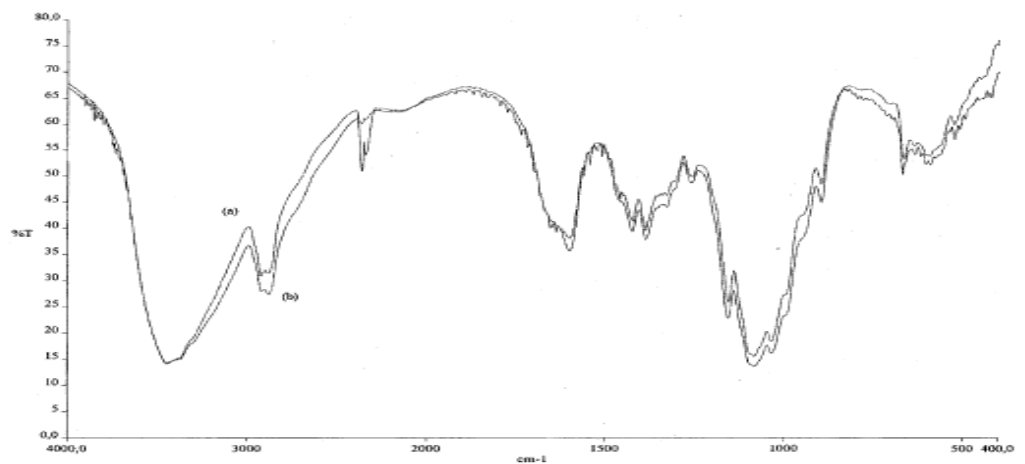
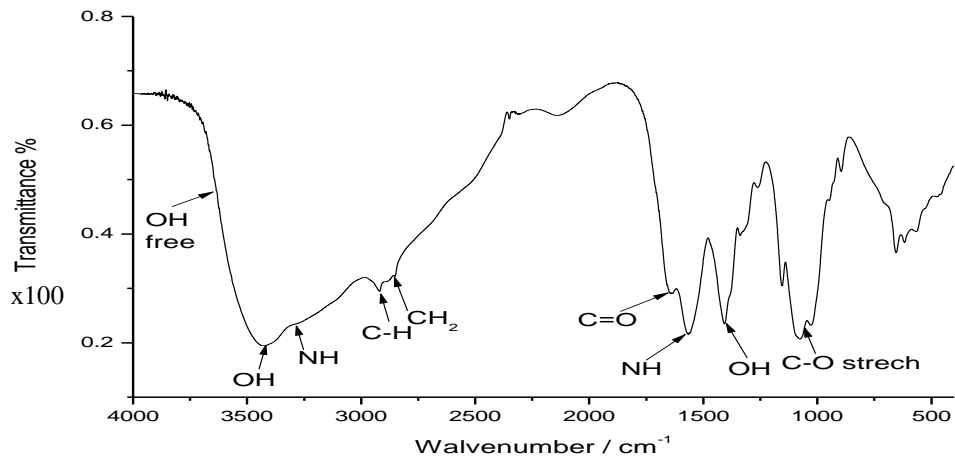


Fig. 5. IR spectra for fully deacetylated chitosan (sample 1): (a) dried state; and (b) hydrated sample.

Рис. 3.2. FTIR-спектри бджолиного хітозану (1) і хітозану, виділеного з морських організмів [Sigma] (2)

Одну із отриманих фракцій хітозану було розділено на хроматографічній колонці, наповненій акриламідом Acrylex P150 для того, щоб перевірити можливість отримання фракцій із меншим вмістом різних високо- і низькомолекулярних фрагментів хітозану, тобто фракцій із більш дискретною молекулярної масою молекул хітозану. Отримані результати представлені на Рис. 3.3.

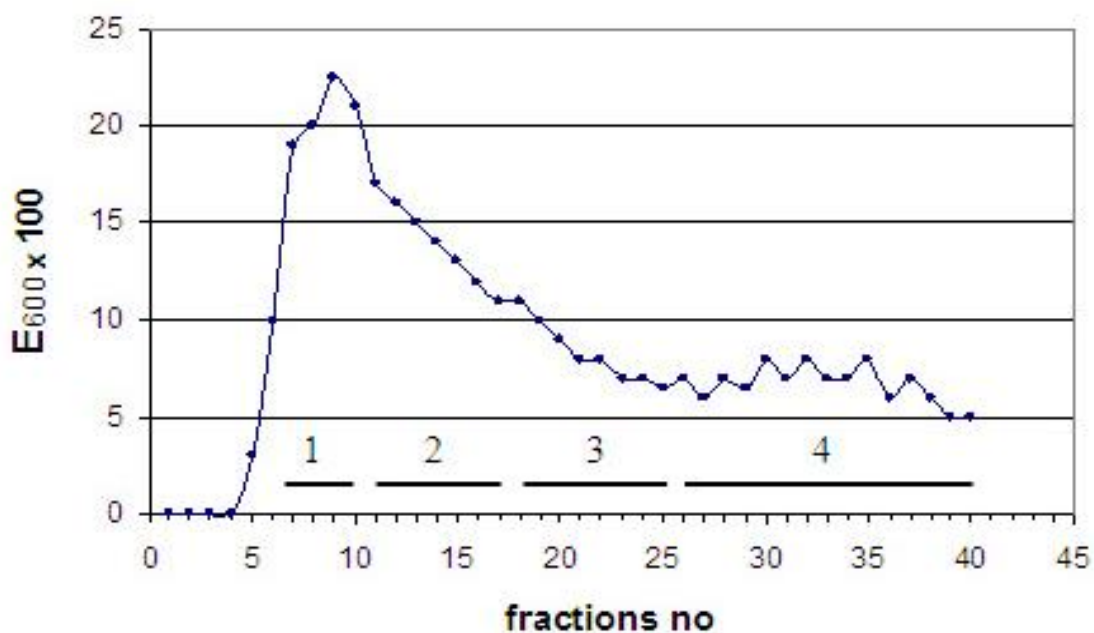


Рис. 3.3. Хроматограма гель-фільтрації бджолиного хітозану (Молекулярна маса  $280 \pm 30$ кДа) на колонці з гель-акриламідом Acrylex P 150 (колонка 2.8 x 100 см, об'єм сорбента 615 мл, V0 155 мл, розчинник - 0.05 М ацетат амонію, рН 6.0. Вносили 50 мг хітозану у 4 мл буферу, об'єм фракцій - 7 мл. Отримані фракції позначені пронумерованими горизонтальними рисками.

Отримані результати свідчать про ефективність представлених вище методик отримання хітозану. Також підтверджують припущення щодо гетерогенності отриманих фракцій (детальніше рис.18, в розділі 3.1.3) [239].

Відмінності в біологічній активності різних фракцій хітозану детально представлені у наступному розділі.

### Підсумки до розділу:

Розроблено оригінальну методику отримання хітозану із підмору бджіл *Apis mellifera*. Вперше очищено і охарактеризовано хітозан із базидіального гриба *L. pergamenus*. Проведено спектрометричний аналіз FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) очищених хітозанів і визначено їхню молекулярну масу. Представлені вище результати опубліковано у статті [234]

## Вплив хітозану та його похідних на еукаріотичні клітини

При вивченні властивостей антимікробних речовин важливо знати, якою є їхня токсичність щодо клітин тварин і людини. Дана проблема є надзвичайно актуальною, оскільки більшість речовин із перспективними антимікробними властивостями є одночасно токсичними щодо нормальних клітин організму. Експерименти з вивчення загальної токсичності в основному проводять на пухлинних лініях клітин та іморталізованих лініях псевдонормальних клітин. Такі лінії легко підтримувати *in vitro*, вони не потребують внесення додаткових стимуляторів росту, крім сироватки крові (Fetal Bovin Serum), яка є обов'язковим компонентом їх поживного середовища. Натомість дослідження з використанням нормальних клітин потребує донорського біоматеріалу і спеціальних стимуляторів поділу клітин чи імітації середовища, наявного в організмі.

З джерел літератури відомо, що хітозан не виявляє високої токсичності щодо нормальних клітин, зокрема клітин епітелію. Хітозан уже застосовують для зупинки кровотечі та обробки ран (Celox). Ми перевірили отримані нами зразки хітозану щодо їхньої токсичності для клітин ссавців Рис.3.4.

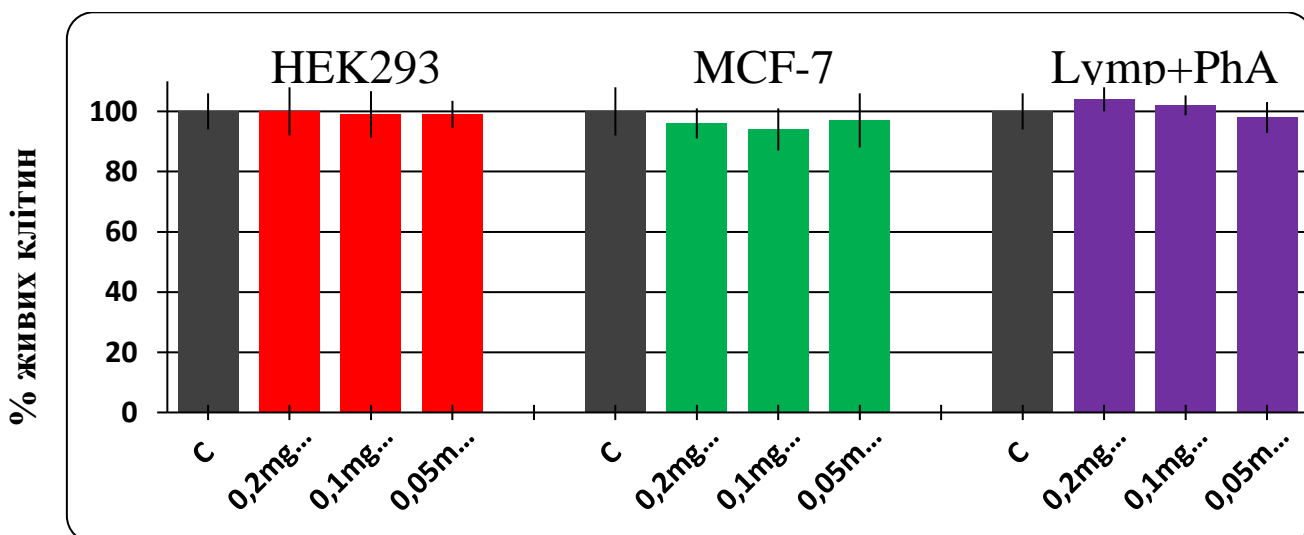


Рис.3.4. Токсичність фрагментів ХМК щодо клітин лінії HEK293 (ембіональна нирка людини), лінії MCF7 (карцинома молочної залози) та

щодо активованих нормальних лімфоцитів людини. Дія чинників тривала 72 год.

Отримані результати свідчать про відсутність токсичності ХМК в концентраціях що відповідають ефективним протигрибковим (Рис.3.4). Дані щодо токсичності ХМК для нормальних лімфоцитів людини є особливо важливими, бо цей тип клітин рідше застосовують через трудомісткість отримання таких клітин і складність у виконанні дослідження. На рис. 3.5 показано дані порівняння токсичності крабового хітозану і ХМК щодо клітин ліній J774.2 (псевдонормальні мишачі макрофаги) і HEP2 (карцинома печінки людини). Достовірної токсичності крабового хітозану відносно контролю не виявлено.

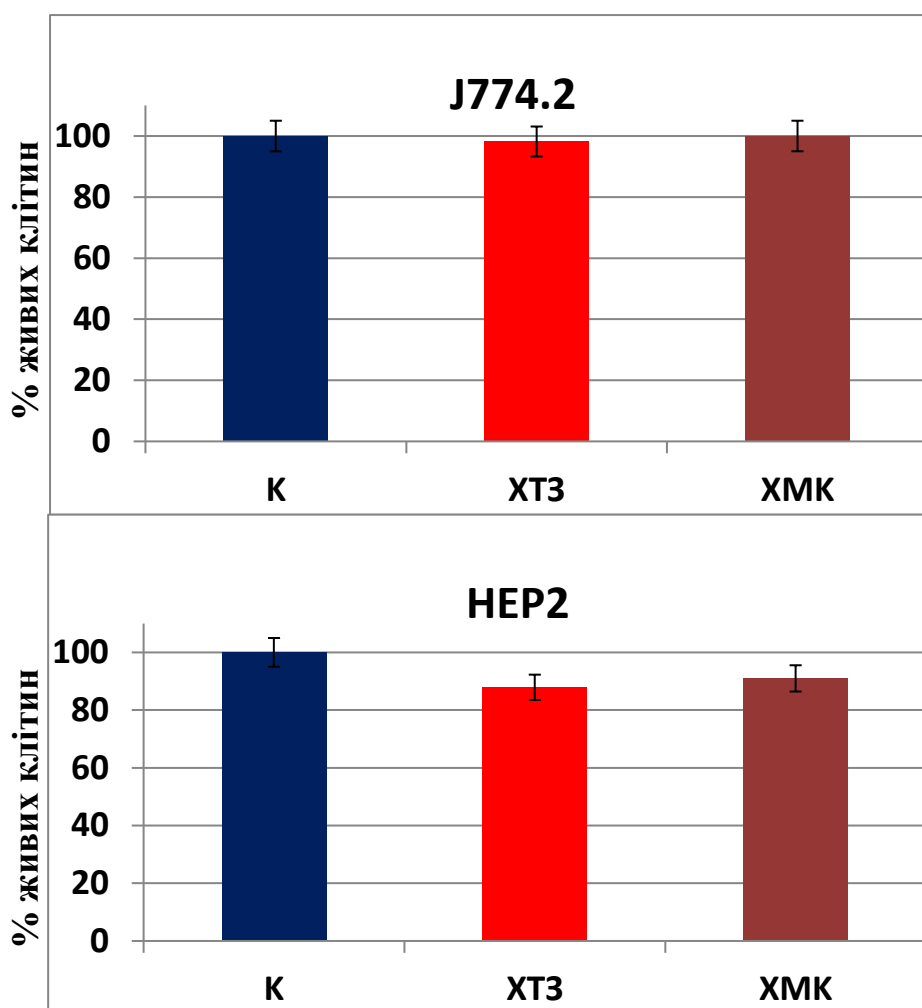
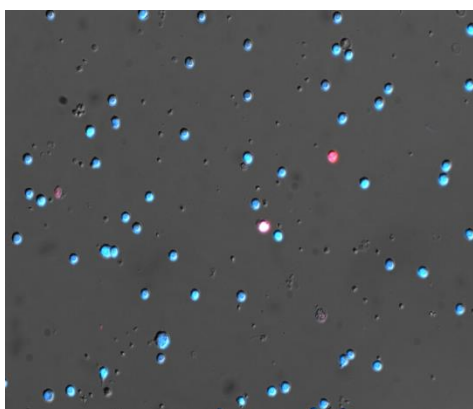
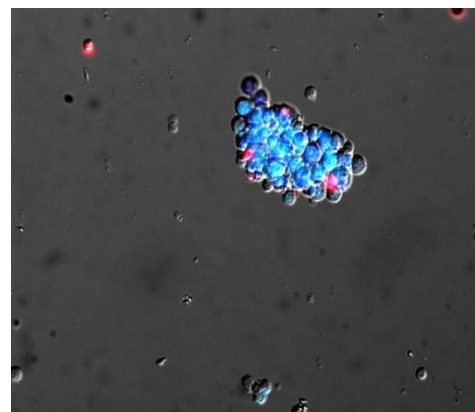


Рис. 3.5. Токсичність фрагментів ХМК і крабового хітозану (концентрація хітозану 0,2 мг/мл) відносно клітин ліній J774.2 (псевдонормальні мишачі макрофаги) HEP2 (карцинома печінки людини). Дія чинників тривала 72 год.

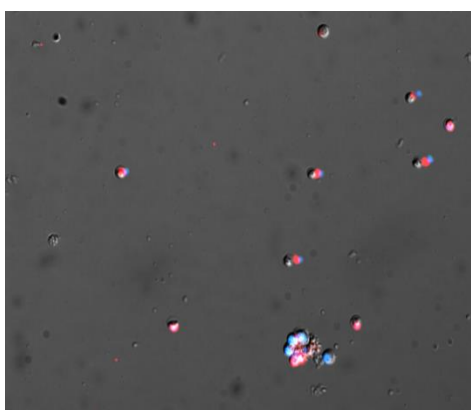
Нами також досліджено цитотоксичність ХМК з використанням флуоресцентної мікроскопії після фарбування активованих нормальних лімфоцитів людини барвниками Hoechst-33342 і етидію бромідом (EtBr), які селективно мітять хроматин живих клітин, а етидію бромідом мітять мертві клітини червоним.



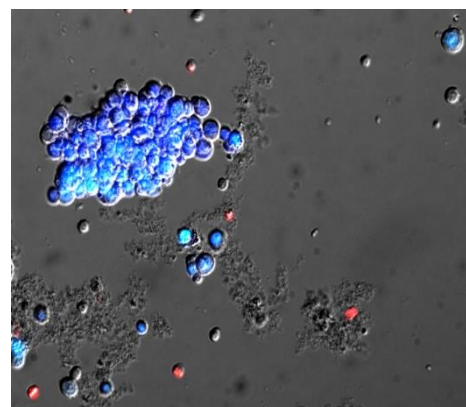
Лімфоцити ФГА-



Лімфоцити ФГА+



Dox



ХМК

Рис. 3.6. Вплив ХМК на лімфоцити людини, ФГА- - інтактні лімфоцити ФГА+ лімфоцити активовані фітогемаглютиніном (інкубація 72 год, концентрації ХМК 0,5 мг\мл, Dox 1 мкМ), фарбування Hoechst-33342 і EtBr.

З даних, представлених на рис.3.6, видно активацію лімфоцитів з утворенням конгломератів і збільшенням розмірів клітин. Червоне свічення мертвих клітин відбувається внаслідок накопичення ними EtBr через втрату цілісності плазматичної мембрани. Ми не виявили значної кількості мертвих



клітин за дії ХМК. Живі клітини демонструють флуоресценцію в синьому діапазоні. Позитивним контролем цитотоксичності слугував протипухлинний чинник доксорубіцин.

На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що хітозан краба і ХМК не володіють токсичною дією в ефективних концентраціях. Це дозволяє припускати перспективність щодо їх застосування як носія ліків і як самостійного препарату.

**Підсумок до розділу:**

Виявлено низьку токсичність хітозану та ХМК за дози 0,2 мг/мл щодо псевдонормальних клітин лінії НЕК293 (нирка ембріона людини) і активованих мітогеном нормальних лімфоцитів крові людини

### 3.1.3. Протимікробні властивості хітозану та його похідних

На кінцевих етапах отримання хітозану з бджіл видаляють меланін, який зв'язаний з хітином і забезпечує темну пігментацію цих комах. У нашій роботі було вирішено не відмивати частину хітозану від меланіну, що дозволило отримати хітозан-меланіновий комплекс (ХМК). Цей крок виявився вдалим, бо ХМК володів значно вищою протимікробною активністю, ніж активність очищеного хітозану (Рис. 3.7.).

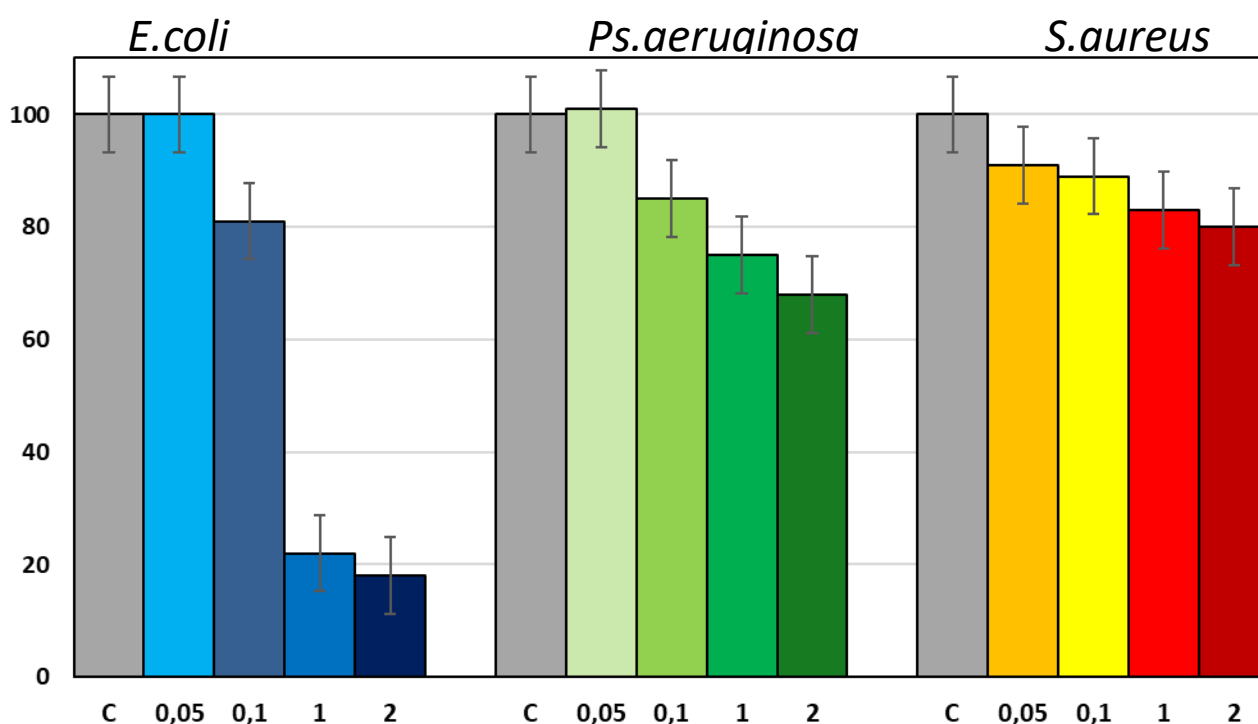


Рис. 3.7. Протимікробна активність хітозан-меланінового комплексу (ХМК) виділеного з *Apis mellifera*. Концентрація хітозану (вісь абсцис) представлена в мг\мл, вісь ординат - % живих бактерій. У верхній частині рисунку вказані мікроорганізми, яких піддавали дії, сірим кольором позначений контроль(С), з зменшенням інтенсивності забарвлення стовпчика на графіку зменшується концентрація досліджуваної речовини

Дослідження протибактерійної активності показало, що для досягнення ефективної дії ХМК необхідно використати досить високі концентрації цього чинника і при цьому запобігти агрегації фрагментів ХМК. В роботі було

вивчено протигрибкову активність чистого хітозану, ХМК і меланіну, отриманого під час очищення хітозану з бджіл (Рис. 3.8.).

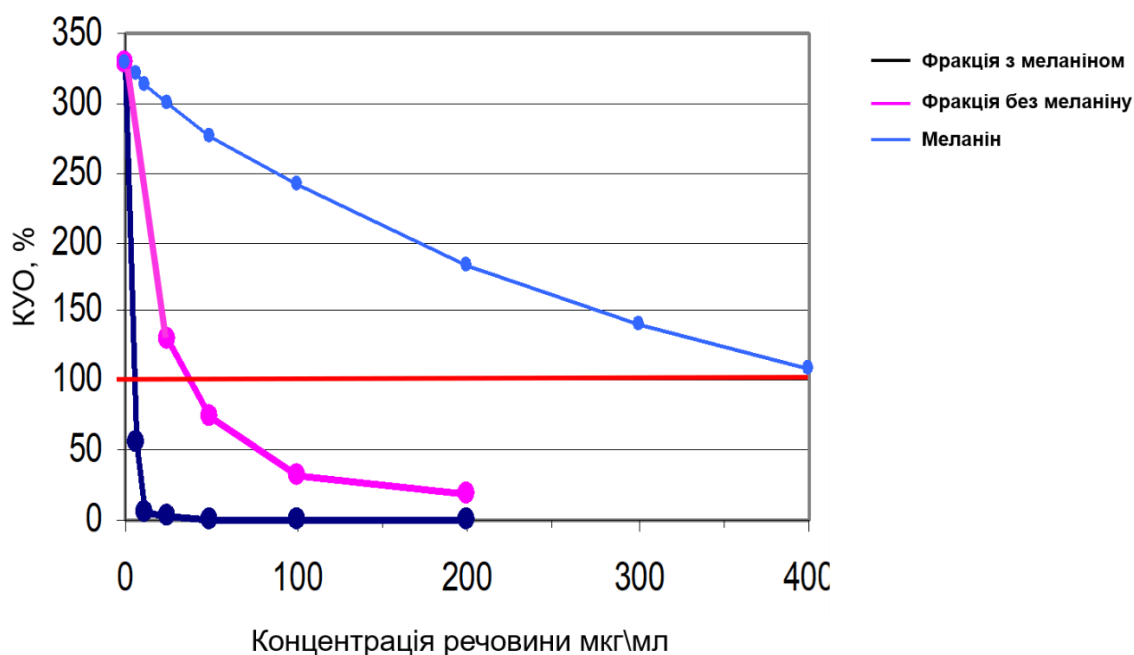


Рис. 3.8. Протимікробна активність хітозан-меланінового комплексу (ХМК), хітозану, і меланіну відносно *C. albicans* N12. Червоною лінією позначено 100% вихідної кількості дріжджів, тобто точка, яка лежить нижче червоної лінії, означає, що при даній концентрації спостерігається фунгіцидний ефект, якщо вище то ефект інгібування росту.

Фрагменти хітозану з меланіном (ХМК) проявили найвищу протигрибкову активність, сам меланін не володіє вираженою активністю, а лише в комплексі з хітозаном. Хоча чистий хітозан і проявляє певну протигрибкову активність, але вона нижча, ніж така активність його комплексу з меланіном. У даному експерименті використовували суміш фрагментів ХМК різної молекулярної маси [230].

У наступному експерименті було проведено хроматографічне розділення фрагментів ХМК і протестовані зразки хітозану з різними молекулярними масами (Рис. 3.9).

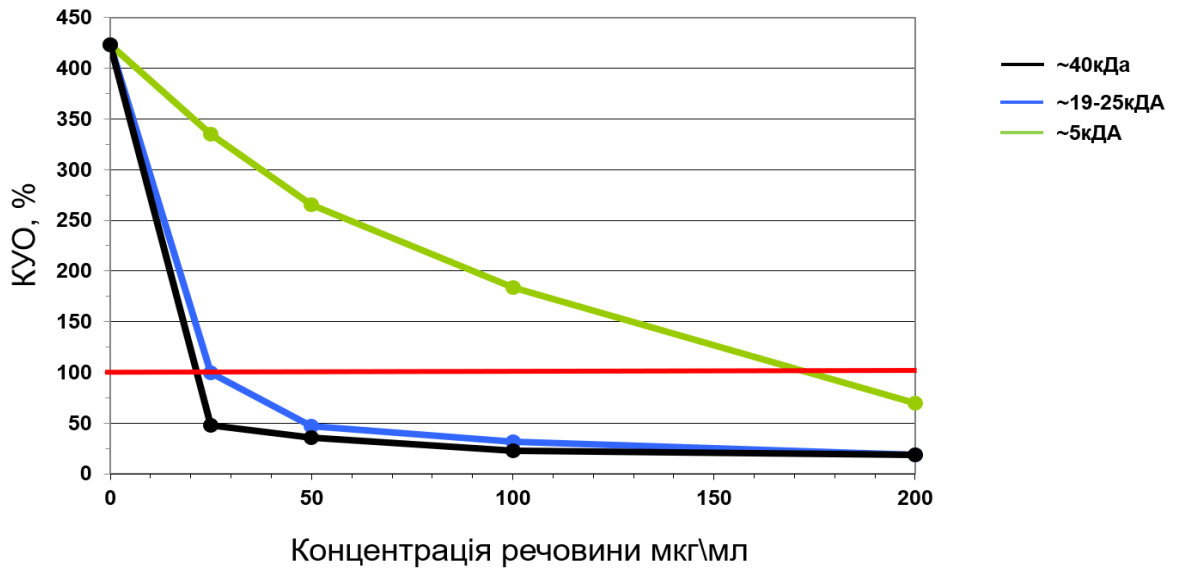


Рис. 3.9. Протимікробна активність фрагментів хітозану з різною молекулярною масою (вказана справа на рисунку) відносно дріжджів *S. albicans* N12. Червоною лінією позначено 100% вихідної кількості дріжджів, тобто точка, яка лежить нижче червоної лінії, означає, що при даній концентрації спостерігається фунгіцидний ефект, якщо вище ефект то ефект інгібування росту.

Ми виявили, що зменшення молекулярної маси хітозану спричиняє зниження протигрибкової активності його комплексу з меланіном. Разом з тим, слід відзначити, що при незначному зниженні молекулярної маси хітозану зростає його розчинність, що позитивно впливає на активність ХМК. Тому фрагменти із середньою молекулярною масою є оптимальними для їх застосування як протигрибкових чинників.

У наступній серії дослідів було перевірено, чи дія ХМК - спричиняє загибель грибкових клітин (*S. albicans* N12), чи іммобілізує їх, запобігаючи утворенню колоній. Для цього використано флуоресцентну фарбу DAPI, яка проникає лише в мертві клітини і флуоресцює в синьому діапазоні спектра. Фарбування дріжджових клітин здійснювали аналогічно, як фарбування

клітин ссавців. Для аналізу використовували нефракціоновану суміш ХМК. Позитивним контролем слугував етанол (Рис. 3.10).

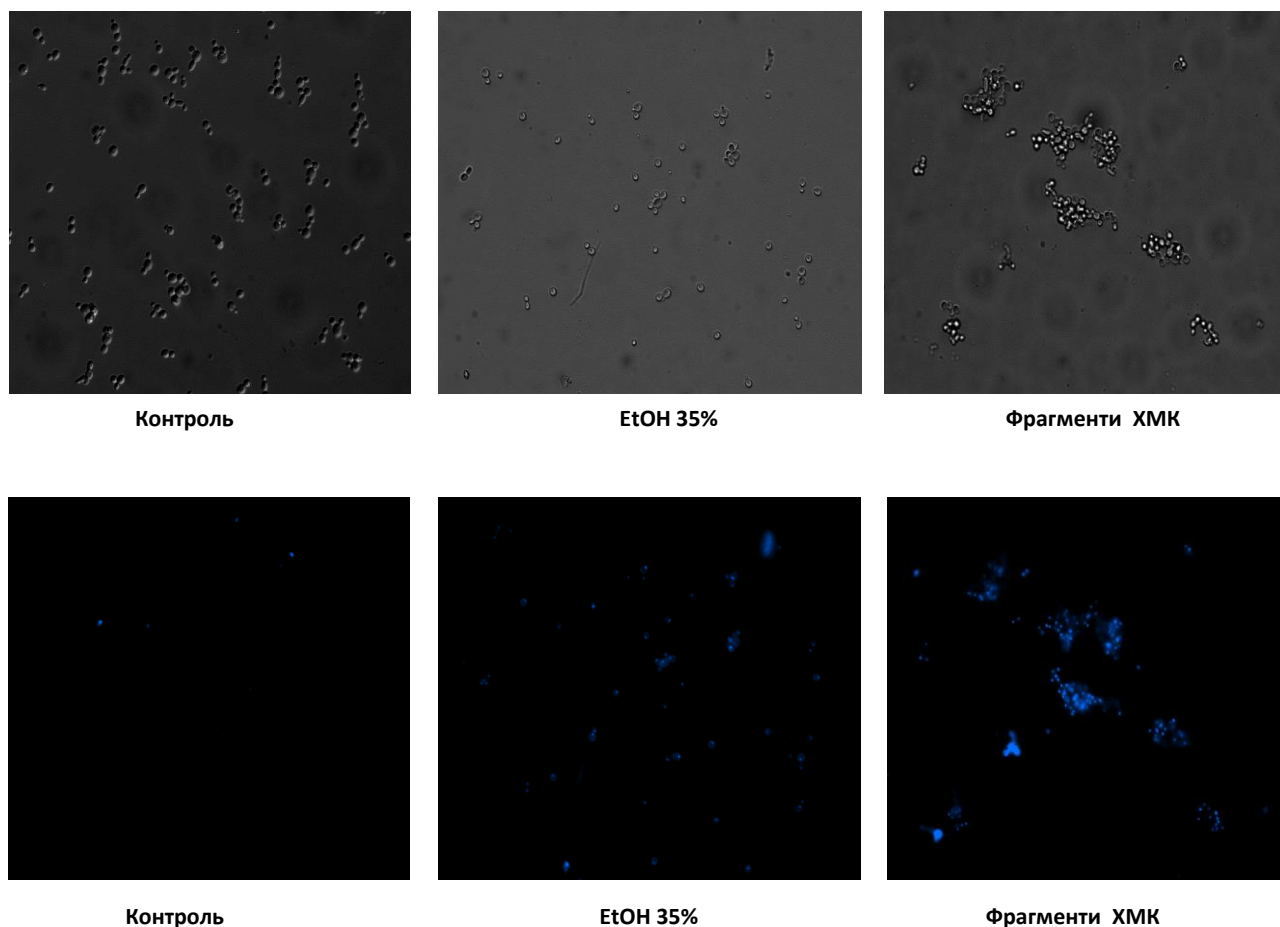


Рис. 3.10. Фунгіцидний ефект ХМК на клітини дріжджів (*C. albicans* N12), при фарбуванні DAPI. Позитивним контролем слугував етанол (EtOH)

У верхньому ряді представлені фотографії клітин, без флуоресцентного фільтра. На даних зображеннях чітко видно зміну морфології клітин дріжджів. Порівняно з контролем, у зразку з етанолом немає гіфів, а кількість клітин є значно нижчою. У зразку з ХМК спостерігається іммобілізація клітин грибків. Даний ефект був очікуваним і його міг спричинити сильний позитивний заряд аміногруп хітозану.

У нижньому ряду представлені фотографії із накладеним флуоресцентним фільтром. Мертві клітини дріжджів світяться синім кольором. На першому фото майже відсутнє свічення. На фото зразка з етанолом чітко видно мертві клітини дріжджів. За дії ХМК видно, що в

імобілізовані клітини проникає фарба DAPI, тобто ці клітини є мертвими, а не знерухомленими.

Підсумовуючи отримані результати, можна вважати, що ХМК дійсно спричиняє загибель грибкових клітин.

У наступних дослідженнях було використано два штами - лабораторний штам *C. albicans* ATCC 885-655, який є стандартним для бактеріологічних лабораторій, і штам *C. albicans* N12, який є нечутливим до багатьох медикаментозних препаратів. Дані штами отримані при співпраці з кафедрою генетики та біотехнології Львівського національного Університету імені Івана Франка.

Ми протестували ХМК і хітозан на лабораторному штамі та мультирезистентного штаму *C. albicans* N12 (рис.3.11)

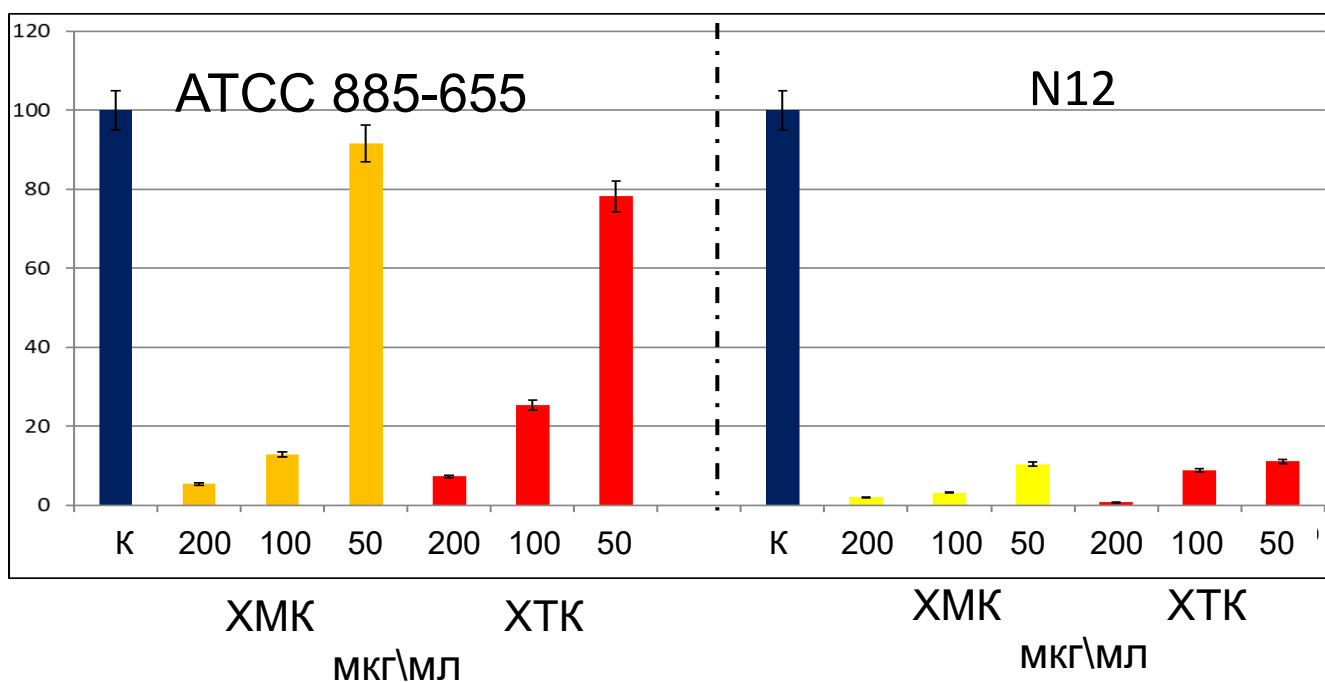


Рис. 3.11. Фунгіцидна активність хітозан-меланінового комплексу (ХМК) та хітозану за дії на лабораторний штам *C. albicans* ATCC 885-655 та штаму N12. На вісі ординат представлено кількість живих клітин, % відносно контролю.

Лабораторний штам *C. albicans* ATCC 885-655 є чутливим до всіх протигрибкових препаратів. Натомість штам *C. albicans* N12 є чутливим лише до амфотерицину та ністатину. Вивчення впливу на штами мікроорганізмів із

MDR є важливим завданням при тестуванні нових ліків, оскільки мультирезистентні штами зустрічаються все частіше, ефективних шляхів подолання таких інфекцій з кожним роком все менше, а негативні побічні ефекти від використаних препаратів є все сильнішими [230].

Фунгіцидна активність ХМК відносно резистентного штаму *C. albicans* вищою, що дозволяє припустити перспективність ХМК для біомедичного застосування.

Однією із проблем використання ХМК є складність його отримання. Збір матеріалу, очистка та виділення такого хітозану, хоч і є подібним до того, що використовують для отримання крабового хітозану, масштабування даного процесу в промисловості є вартісним завданням. Тому ми додатково отримали хітозан із крабів, щоб провести порівняльне вивчення впливу фізико-хімічних властивостей хітозану на його активність. Виявлені кореляції можна застосувати і відносно ХМК.

Ми розділили ХМК і хітозан виділеного з хітину крабів на фракції і порівняли їхню фунгіцидну активність. Хроматографічне розділення проводили з використанням сорбенту Toyopearl HW60 (Рис. 3.12.).

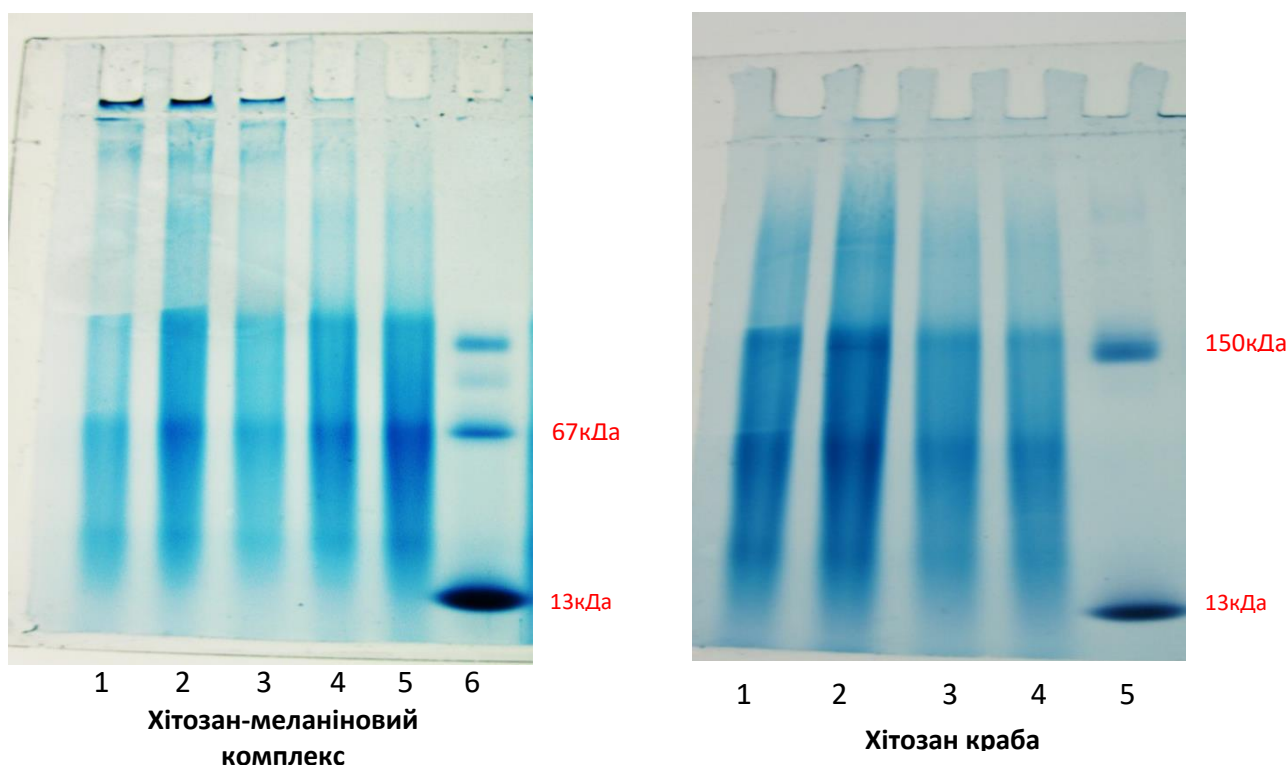


Рис.3.12. Електрофоретичний профіль фракцій ХМК і хітозану краба, отриманих в результаті хроматографії на сорбенті Toyopearl HW60. Використано ступеневий градієнт пористості акриламідного гелю (2,5 / 3,5 / 5/10 / 15/20% акриламідну). 1,2,3,4,5 номер хроматографічної фракції, 6(5) - маркери мол. маси: IgG (150 кДа), альбумін (67 кДа), цитохром С (13 кДа).

Отримані фракції тестували на лабораторному і мультирезистентному штамі *C. albicans*. Для тестування вибрали 1, 2 і 4 фракції хітозан-меланінового комплексу, а також 1, 2 і 3 фракції крабового хітозану. Отримані результати представлені на Рис. 3.13.

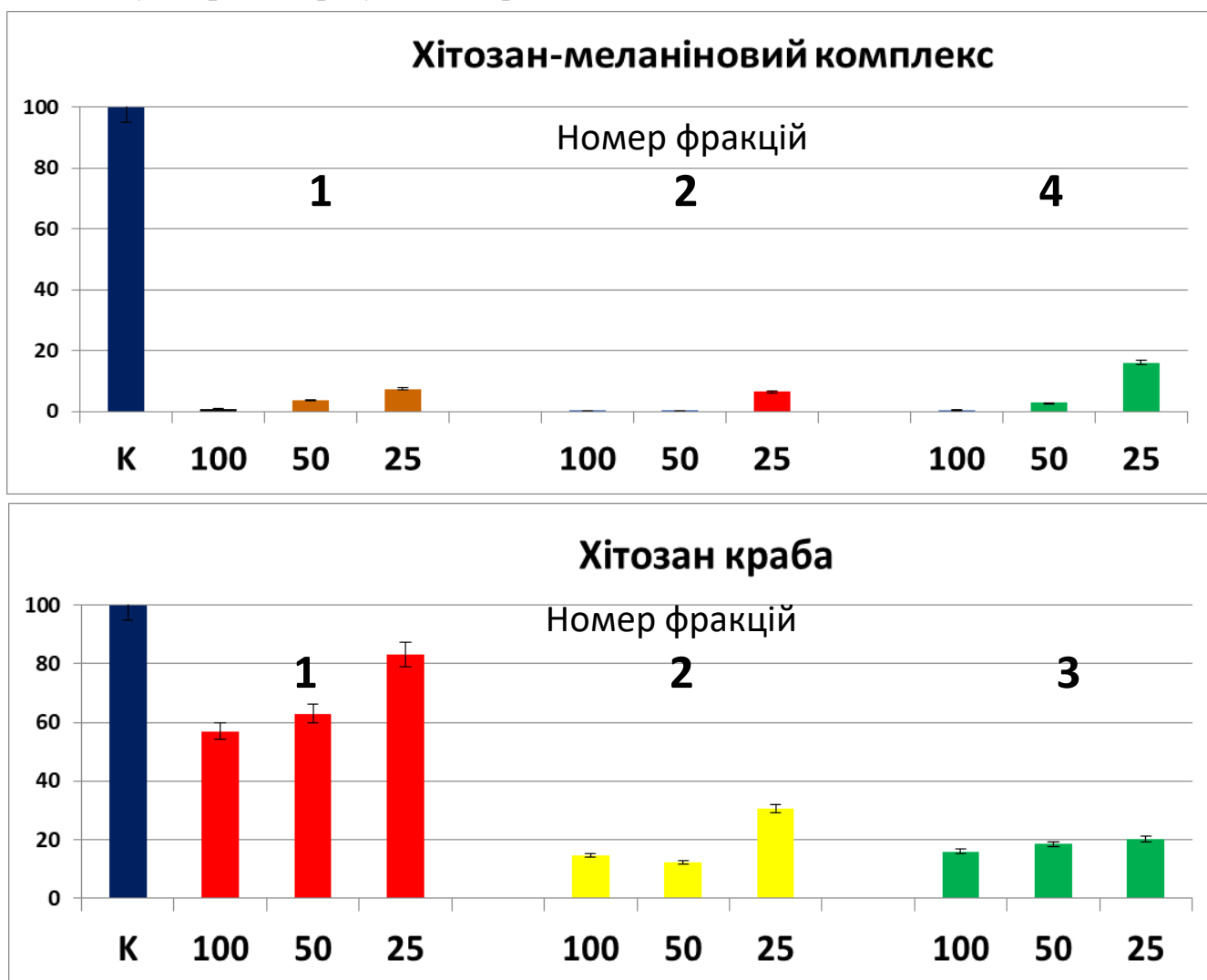


Рис. 3.13. Порівняння протигрибкової дії хітозан-меланінового комплексу і крабового хітозану щодо резистентного штаму *C. albicans* N12. Концентрації знизу представлені в мкг на мл



Результати з визначення протигрибкової активності фракцій хітозану краба дозволили виявити, що з підвищенням вмісту високомолекулярних фрагментів у фракціях зростає їхня протигрибкова активність.

Результати представлені на електрофореграмі на рис.3.12 свідчать, що промислові зразки хітозану є гетерогенними тобто наявні фрагменти з різною молекулярною масою. Ці результати дозволяють припустити причину відмінностей в різних роботах з використанням хітозану. Оскільки молекулярну масу хітозану визначали за допомогою візкозиметрії, кількість фрагментів при однаковій середній молекулярній масі може відрізнитися.

Тобто якщо в хітозані є фрагменти з високою і низькою молекулярною масою, то низькомолекулярні фрагменти будуть взаємодіяти з патогенами, тоді як високомолекулярні фрагменти можуть агрегувати та не взаємодіяти з бактеріями чи дріжджами. І навпаки, якщо всі фрагменти будуть з середньою молекулярною масою, то їхня активність буде помірною [230].

Наведені результати свідчать про високу протигрибкову ефективність ХМК і, хоча використані фракції є доволі високомолекулярними, ми не виявили між ними значних відмінностей.

Використання флуоресцентних міток є поширеним прийомом у вивченні проникнення та локалізації досліджуваної речовини в клітинах, чи тканинах і органах. Однією із найбільш зручних є мітка FITC (Fluorescein isothiocyanate), оскільки її зв'язування є доволі простим, а позбутися її надлишку можна за допомогою діалізу. Ця мітка має стійке інтенсивне світіння в зеленому спектрі.

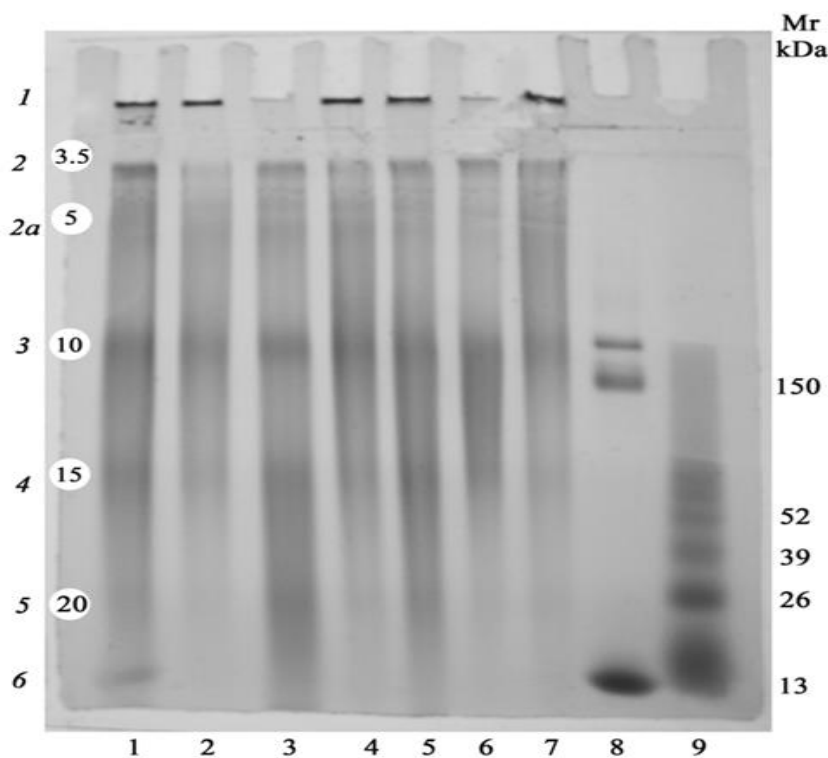
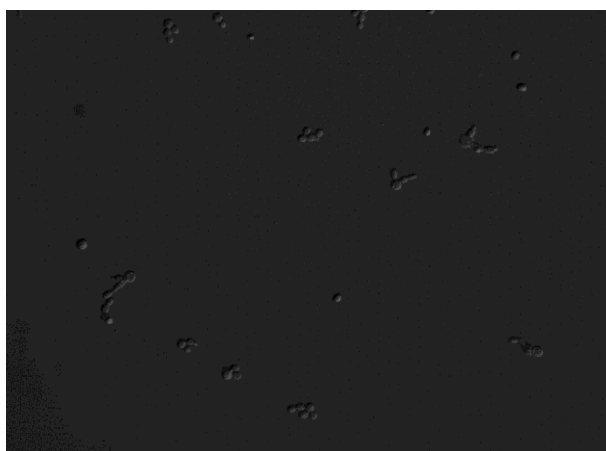
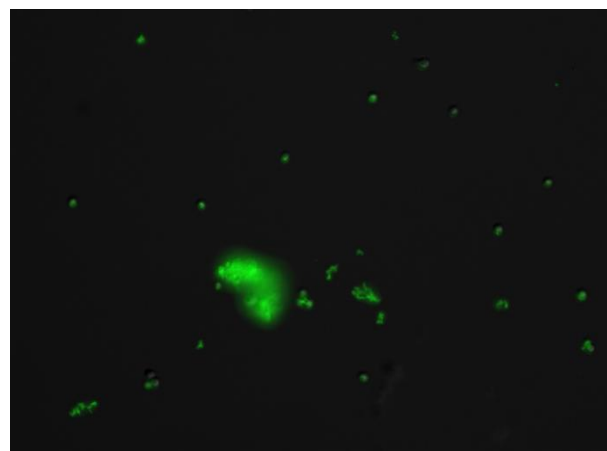


Рис.3.14. 1. "Aldrich" (low mol. mass); 2. "Celox"; 3. "Organica"; 4. "Tjan-shi"; 5. Бджолиний хітозан; 6. Бджолиний хітозан після видалення хітозан меланінового комплексу за допомогою колонки Bio-Gel P-300; 7. Хітозан краба; 8. Цитохром С і IgG як молекулярні маркери; 9. Олігомери цитохрому С отримані за допомогою глутарового альдегіду.

Ми приєднали флуоресцентну мітку FITC до хітозану, щоб перевірити припущення про мембранні ефекти в механізмах дії хітозану.



**Контроль**



**ХТЗ + FITC**

Рис. 3.15. Флуоресцентна мікроскопія дріжджів *Candida albicans* за дії хітозану з FITC міткою при дозі 0,1 мг на мл.

На рис. 3.15. видно свічення флуоресцентної мітки на мембрані дріжджів, а також скупчення фрагментів хітозану. Ці дані підтверджують припущення щодо мембранних ефектів, викликаних хітозаном.

Властивості хітозану можуть значно залежати від багатьох умов, зокрема від температури і кислотності, які також впливають на розчинність хітозану у воді, що є серйозною перешкодою його використання в медицині. Переважно, для розчинення хітозану використовують оцтову кислоту. У нашій роботі для розчинення хітозану було використано гліколеву кислоту, яку часто застосовують у косметології. Гліколева кислота добре розчинна у воді і спирті.

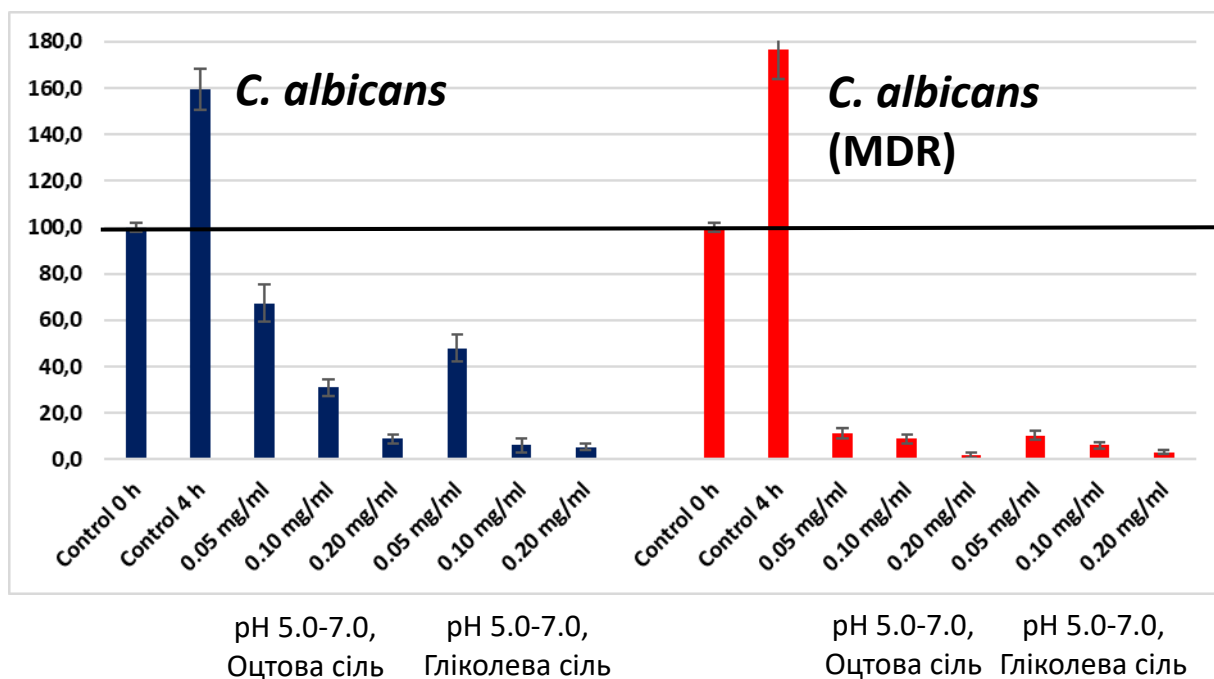


Рис. 3.16. Протигрибкова дії ацетатної і гліколевої солі хітозан-меланінового комплексу щодо лабораторного та мультирезистентного штаму *C. albicans*. Чорною лінією відзначено стартова кількість КУО. На вісі ординат представлена кількість КУО в процентному вираженні де 100% це стартова кількість КУО.

Дія ХМК на життєздатність лабораторного штаму *C. albicans* залежить від розчинника: при концентрації 0,1 мг/мл, активність ХМК як гліколевої солі майже втричі більша за дію ХМК, як ацетату. У той же час, дія ХМК щодо мультирезистентного штаму *C. albicans* є доволі сильною і не залежить від розчинника. У даному експерименті використовували загальну фракцію ХМК [230].

Можна припустити, що причиною результатів, представлених на Рис. 3.16, є збільшення позитивно заряджених груп при зростанні розчинності хітозану, бо фрагменти хітозану, очевидно, гірше утворюють агрегати, у яких «екрановані» позитивно заряджені групи.

Для подальших досліджень було використано хітозан з крабів, гідролізований і розділений на фракції з різною молекулярною масою (Рис. 3.17).

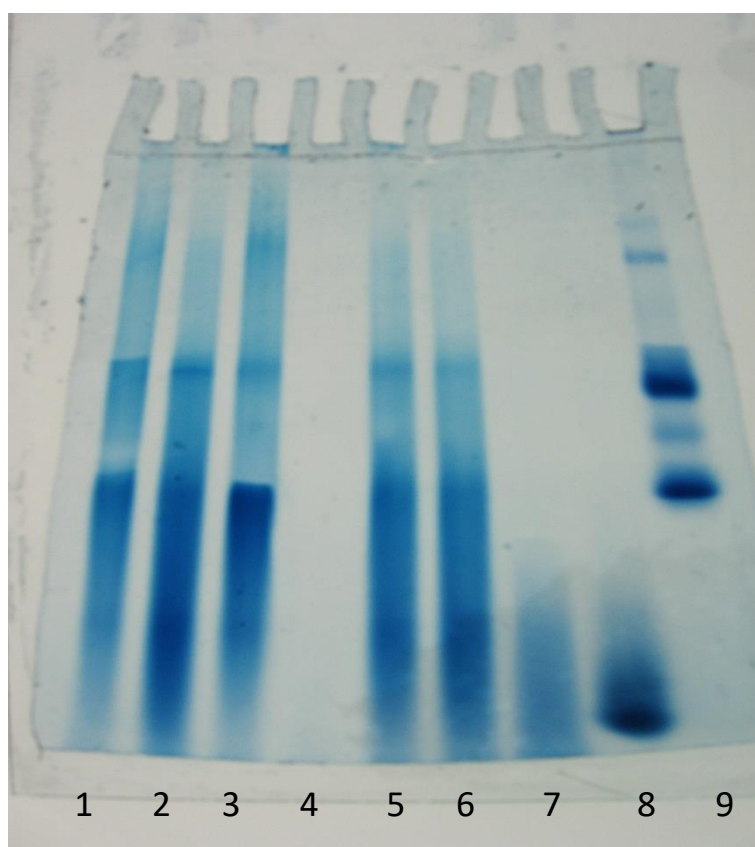


Рис. 3.17. Електрофоретичний профіль фракцій хітозану краба після хроматографії на сорбенті Тоуорепарл НW60. Ступеневий градієнт пористості акриламідного гелю (2,5 / 3,5 / 5/10 / 15/20% акриламідну).

1 - гідроліз 45 хв, 2 - гідроліз 90 хв., 3 - фракція 45 хв., осаджена в межах рН 5.0-6.0., 4 - 3-тя фракція 45 хв., осаджена в межах рН 6.2-7.5, 5 - 3-тя фракція 90 хв, осаджена в межах рН 5.0-6.0, 6 - 3-тя фракція 90 хв, осаджена в межах рН 6.2-7.5, 7 - очищений фрагмент хітозану 25 кДа, 8 - цитохром с (13 кДа), 9 - іммуноглобулін людини.

Після розділення ми отримали 3 фракції хітозану краба – з молекулярною масою 300 кДа, 80 кДа, 25 кДа і 5 кДа, які розчиняли за допомогою гліколевої кислоти. Отримані фракції було протестовано щодо їх фунгіцидної активності відносно мультирезистентного штаму *C. albicans*.

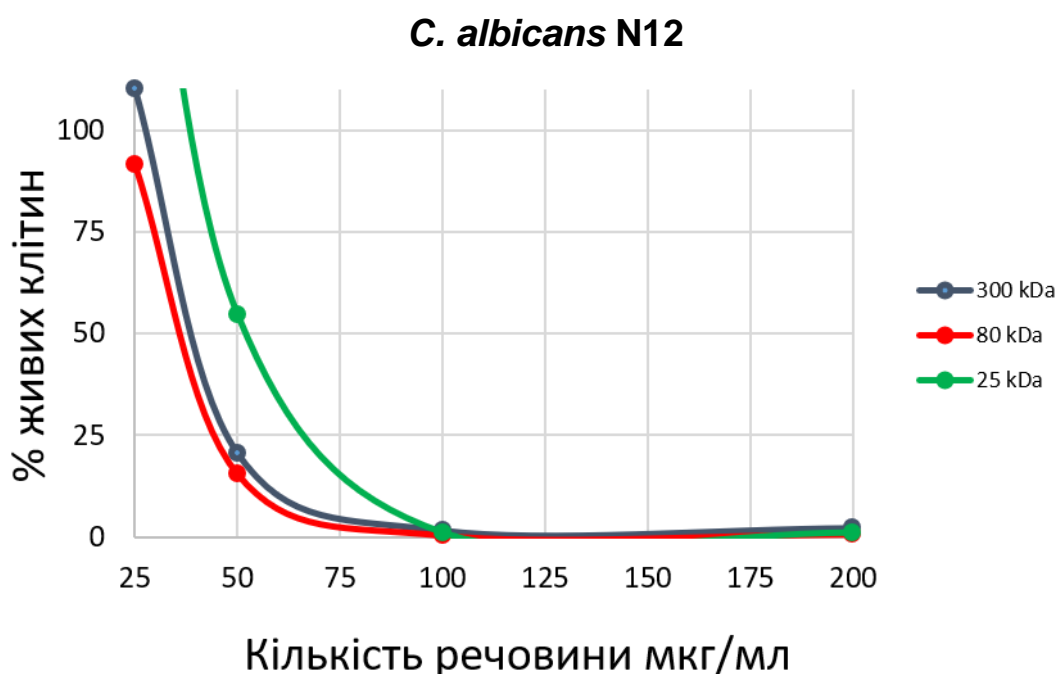


Рис. 3.18. Фунгіцидна активність водорозчинних зразків хітозану краба з різною молекулярною масою хітозану ( 300 kDa, 80 kDa, 25kDa) відносно мультирезистентного штаму *C. albicans*.

З графіку, наведеному на рис. 3.18. видно, що використання гліколевої кислоти як розчинника, дозволяє використовувати фрагменти хітозану краба з нижчою молекулярною масою при такій же фунгіцидній активності. Ми не виявили достовірної різниці між зразками з молекулярною

масою 300 і 80 кДа щодо їхньої фунгіцидної активності. Проте зразок хітозану з молекулярною масою 25 кДа проявляє нижчу фунгіцидну активність, а зразок з молекулярною масою 5кДа не виявляє її взагалі.

Підсумовуючи, можна сказати що використання гліколевої кислоти як розчинника, дозволяє послабити вплив молекулярної маси на активність хітозану. Найбільш імовірно, причиною цього є зміна структури агрегатів хітозану у водному розчині, що залишає на поверхні фрагментів більше активних позитивно заряджених груп.

Ще одним показником, що впливає на активність хітозану, є середовище для культивування мікроорганізмів. Вплив даного фактора є доволі важливим, оскільки після додавання зразка хітозану в пробу із суспензією мікроорганізмів, внаслідок зміни рН, хітозан може випасти в осад і такі результати будуть хибно негативні.

У нашій роботі перевірено зміну активності ХМК розчиненого в оцтовій кислоті при рівнях рН 5,8 і 7,0. Такі рівні рН вважають фізіологічними для дріжджів і бактерій, відповідно (Рис. 3.19.).

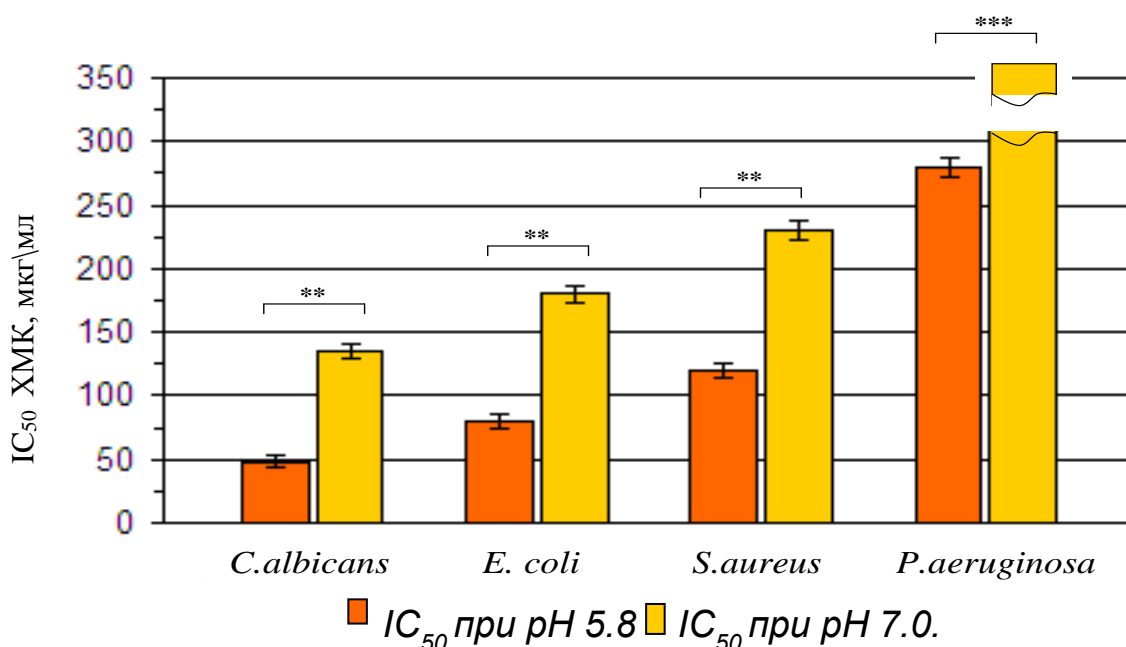


Рис. 3.19. IC<sub>50</sub> за дії ХМК на досліджувані мікроорганізми та його залежність від рН середовища.

Ми виявили, що при кислому рН фунгіцидна активність хітозану зростає. Тобто при кислому рН розчинність ХМК є вищою, що призводить до зростання кількості позитивно заряджених груп на поверхні фрагментів. Це вірно для дріжджів, які добре функціонують у слабкокислому рН(5,4-5,6). У бактерій така кислотність спричиняє стрес, який враховували при аналізі результатів, тобто токсичність порівнювали щодо контролю, в якому мікроорганізми росли при такому ж рН (5,4-5,6) [230].

#### **Підсумки до розділу:**

Із підмору бджіл одержано хітозан-меланіновий комплекс (ХМК) з біологічною активністю, відмінною від активності очищеного хітозану. Встановлено, що ХМК володіє вираженою фунгіцидною дією контактного типу, яка зменшується зі зниженням молекулярної маси цього комплексу і залежить від вмісту в ньому меланіну. ХМК є токсичним щодо грибів *Candida albicans* як штаму С88 дикого типу, так і штаму N12 із мультирезистентністю. Представлені вище результати опубліковано у статті[230].

### **3.1.4. Імобілізація етакридину хітозаном та біологічні властивості отриманого комплексу**

Нами досліджено можливість застосування хітозану, як носія, здатного поступово вивільняти терапевтичні препарати. Для цього було використано імобілізацію на хітозані «репортерної» речовини, яку зручно виявляти в біологічних системах. У наших досліджах необхідно було визначати кількість даної речовини у сироватці крові піддослідних тварин, а репортерною речовиною вибрано етакридин лактат. Етакридин лактат – ароматична сполука, похідне акридину, що первинно застосовували як антисептик.

Створення комплексу хітозан-етакридин здійснювалося шляхом змішування порошку хітозану «Тяньші» (Китай) з етакридину лактатом у лужному середовищі.

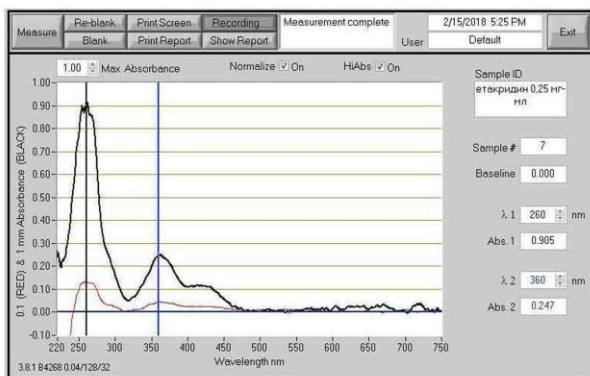
Спектроскопічні профілі досліджуваних речовин вважають формальним «паспортом» отриманих комплексів. Дані результати є важливим підтвердженням успішної імобілізації етакридину лактату на хітозані (Рис. 3.20).

Спектроскопічне дослідження проводили на базі Університету «Львівська політехніка».

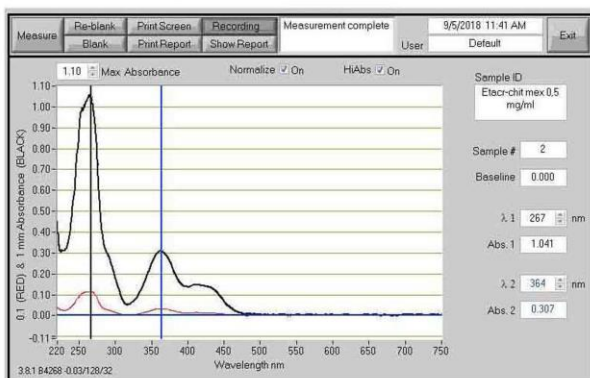
Наступним кроком у дослідженні було вивчення процесу вивільнення етакридину лактату з його комплексу з хітозаном. Для цього шурам був введений чистий етакридин лактат і його комплекс з хітозаном. Перевагаю етакридину є те, що його можна відносно легко виявити в плазмі крові, навіть у невисоких концентраціях. Кров у щурів відбиралася з різними інтервалами, експеримент тривав 3 доби. Кров центрифугували й отримували плазму.



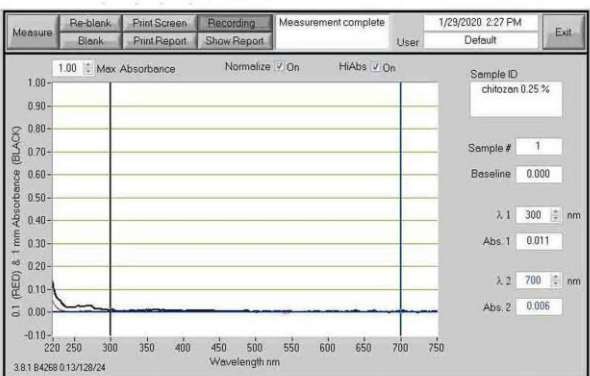
### UV absorption spectrum



A. UV absorption spectrum of 0.025 % of ethacridine lactate solution in 1% acetic acid



B. UV absorption spectrum of ethacridine-chitosan adduct.



C. UV absorption spectrum of 0.25 % chitosan in 1% acetic acid.

### IR spectrum

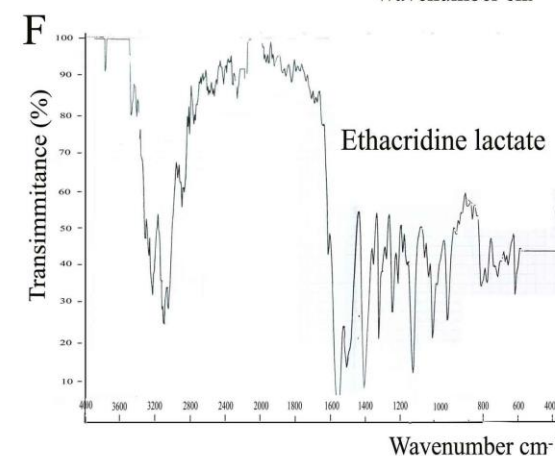
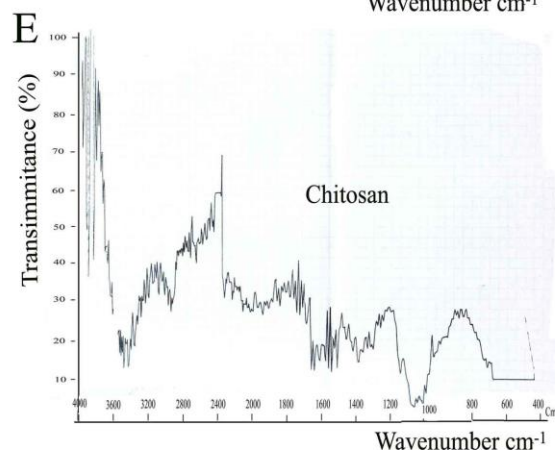
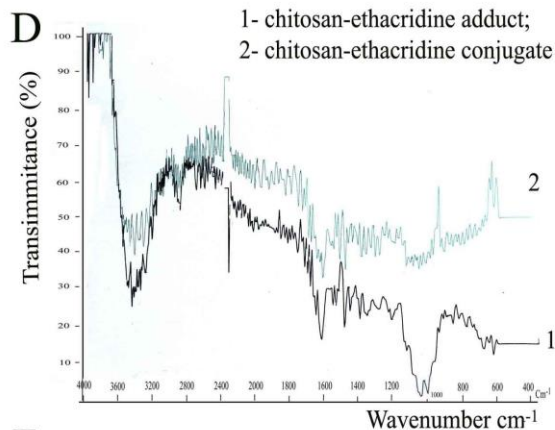


Рис. 3.20. Інфрачервоні та ультрафіолетові спектри хітозану, етакридину лактату та їх комплексів.

На рис. 3.21. представлено графічно динаміку зменшення кількості етакридину лактату в крові піддослідних щурів. Як видно, після 20-ї години експерименту можна виявити лише залишкові кількості цієї репортерної сполуки.

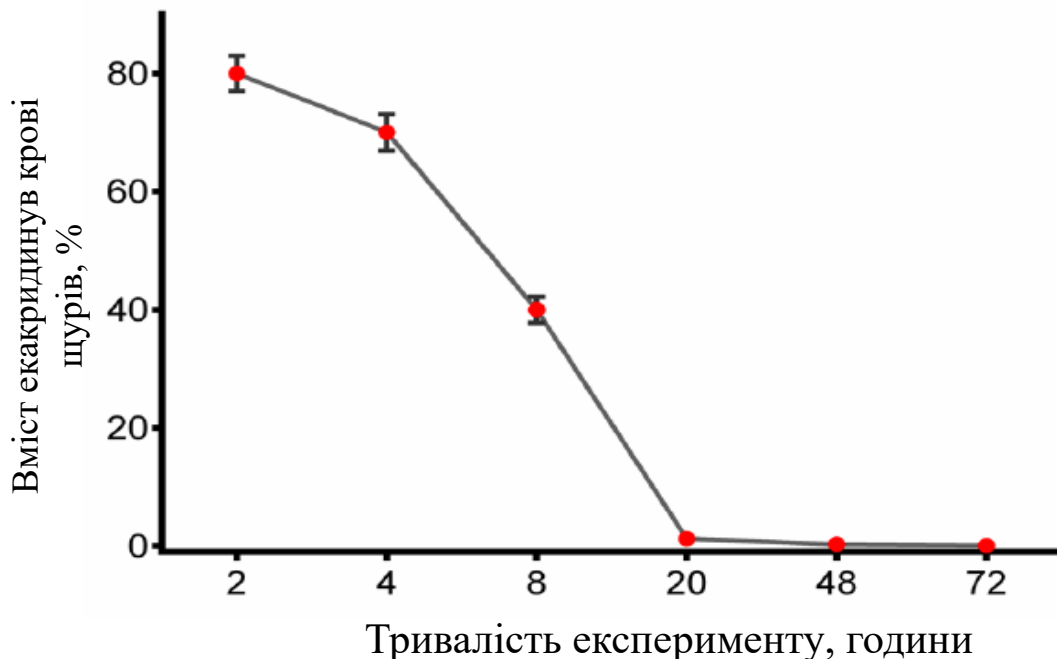


Рис. 3.21. Кінетика вивільнення етакридину лактату в крові мишей після введення його у вільному (неімобілізованому) стані. Представлено в процентному співвідношенні від стартової кількості введеної речовини.

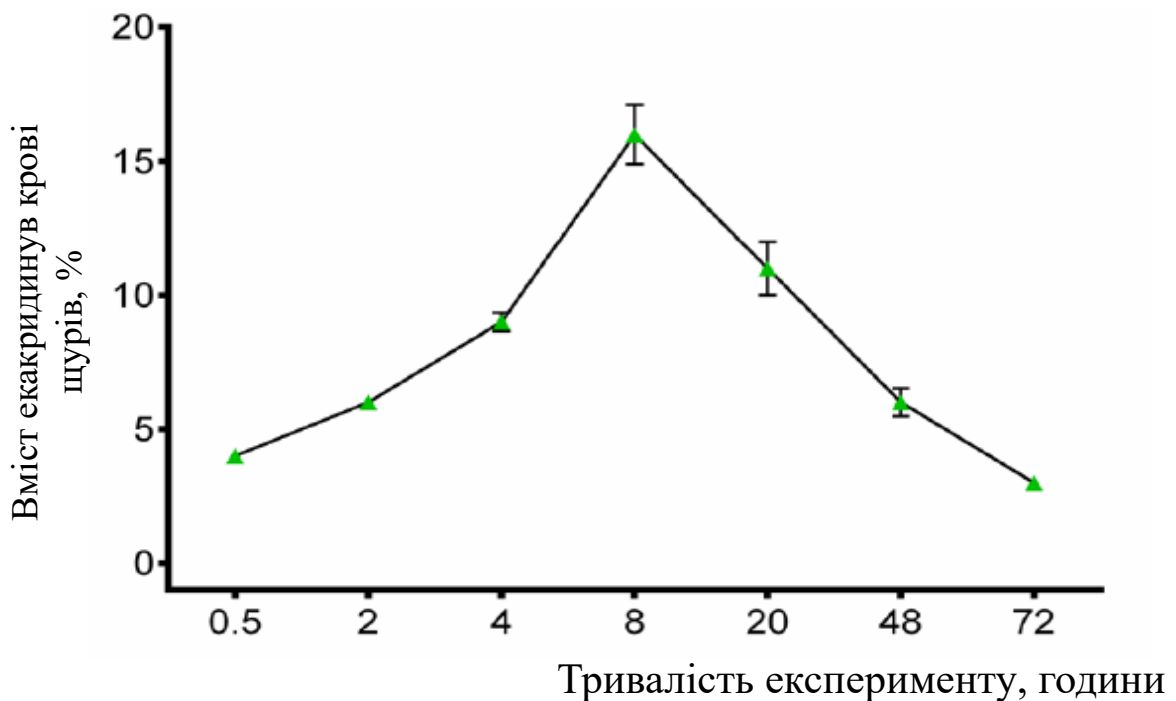


Рис. 3.22. Кінетика вивільнення етакридину лактату в крові мишей після введення його комплексу з хітозаном. Представлено в процентному співвідношенні від стартової кількості введеної речовини.

Натомість при використанні комплексу, створеного на основі хітозану (Рис. 3.22.), через 8 год після його введення спостерігається наростання накопичення етакридину лактату в крові й поступове вивільнення цієї речовини до 72 год. Варто зауважити, що кількість етакридину в комплексі є невеликою, тому вісь ординат доходить лише до 18 % (відносно введеного вільного етакридину). Такий характер вивільнення може бути спричинений здатністю організму поступово розкладати хітозан, що забезпечує повільне вивільнення репортерної речовини з комплексу.

Отримані дані свідчать про ефективність хітозану як носія для пролонгації дії медичних препаратів. Оскільки іммобілізація препаратів та їх введення часто є складними, необхідно продовжити дослідження такого використання хітозану і прийомів іммобілізації ним біологічно активних речовин.

#### **Підсумки до розділу:**

Антисептик етакридину лактат іммобілізовано на хітозані краба. Показано, що таке комплексування пролонгує дію цього антисептика в організмі піддослідних мишей.

## **3.2. Кон'югати на основі похідних полівінілпіролідону**

### **3.2.1. Кон'югування пептидів з похідними полівінілпіролідону**

Пептиди та білки є спеціалізованими молекулами для виконання багатьох фізіологічних функцій, таких як ензимний каталіз, рецепторна дія на плазматичній мембрані, внутрішньо- та міжклітинне «риштування» і сигналювання, клітинна рухливість та ін. [16]. Імобілізація білків на носіях визначається їх фізико-хімічними властивостями, такими як здатність до конформації та самоасоціації, що в свою чергу, визначає біологічну активність, імуногенність, фармакокінетику і фармакодинаміку, а також дозування і швидкість доставки визначеного білка [16, 17]. Конформаційна зміна пептидно-білкових структур є критичним фактором, що визначає ефективність дії пептиду на мішені [16].

Перед імобілізацією трипептида спочатку було відпрацьовано таку імобілізацію на білку лізоцимі і синтезовано кон'югат лізоциму з модифікованим полівінілпіролідонем.

Лізоцим - це білок з антимікробною активністю, який є ензимом, що здатен лізувати клітинну стінку більшості грампозитивних бактерій [18]. Відомо, що досить часто після іобілізації ензимів знижується або повністю втрачається їхня каталітична активність [16, 17]. Натомість ПВП часто використовують як стабілізатор у фармацевтичній промисловості, до того ж він є нетоксичним і забезпечує хорошу розчинність лігандів. До речі, сам лізоцим також застосовують у медицині для пригнічення бактерійних інфекцій. Зокрема, його розглядають як один із чинників для вирішення проблеми мультирезистентності бактерій, у даному випадку, грампозитивних, що може виникати через неконтрольоване вживання антибіотиків у ветеринарії та медицині.

За результатами проведеного хімічного аналізу отриманих кон'югатів можна стверджувати переважну гідрофобну взаємодію лізоциму з гідрофобними полі(ФМА)-блоками молекул ко-полімера. Нами встановлено, що неіонний поліамфіфільний полі- (F8MA)-блок-полі(NVP)-CGE підвищує

антибактерійну активність лізоциму щодо *S. aureus*, який є грампозитивним мікроорганізмом (Рис. 3.23)

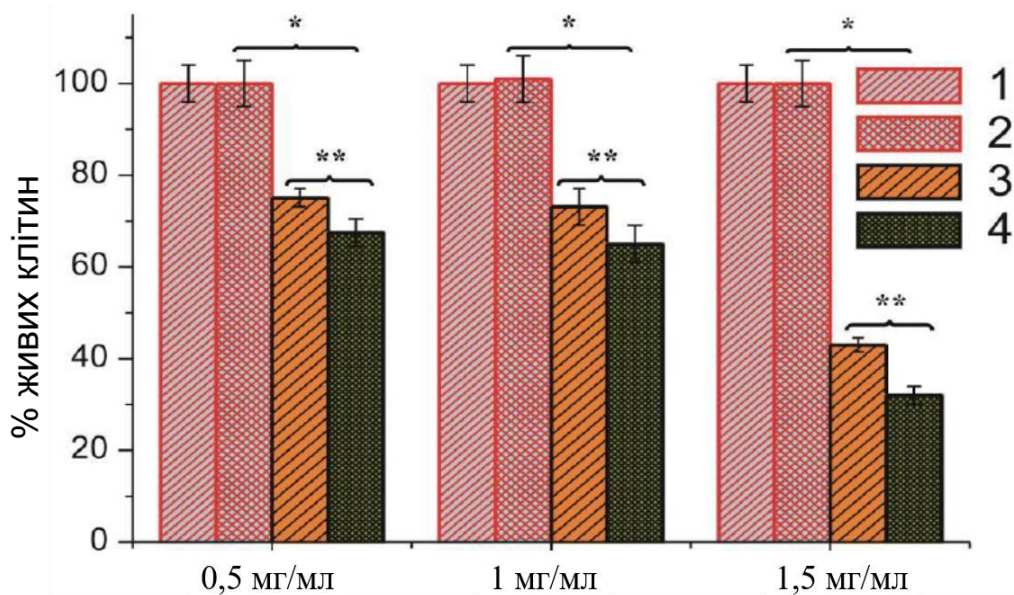


Рис. 3.23. Дозозалежна протибактерійна (*S. aureus*) активність лізоциму та його комплексу з ПВП. 1 – контроль 2 – полі(F8МА)-блок-полі(NVP)-CGE 3 – лізоцим 4 – полі(F8МА)-блок полі(NVP)-CGE і лізоцим (полімер/лізоцим 0,5 м) \*  $P < 0,05$  для 4 порівняно з 2; \*\*  $P < 0,05$  для 4 порівняння 3.

Як видно з даних на Рис. 3.23 і лізоцим, і його комплекс з полімерним носієм знижують життєздатність бактеріальних клітин, завдяки дії лізоциму як глікозидгідролази. Однак, такий ефект іммобілізованого лізоциму краще виражений ( $P < 0,05$ ), ніж ефект вільного ензиму, що утворює самоагрегати. Таким чином, комплексоутворення лізоциму з досліджуваними полімерами посилює його антибактерійну активність щодо *S. aureus*. Механізм такого ефекту полі (F8МА)-блок-полі (NVP)-CGE, очевидно, пояснюється впливом блок-кополімеру на роз'єднання агрегатів лізоциму в розчині. Базуючись на отриманих результатах, стало можливим використати похідні полівінлпіролідону для іммобілізації трипептиду Pro-Ser-Cys. [229]

### 3.2.2. Визначення впливу трипептиду сироватки крові людини і його синтетичних аналогів на згортання крові

Короткі пептиди часто відіграють роль регуляторів клітинних та міжклітинних процесів. Виявлення в сироватці крові та вивчення властивостей таких коротких пептидів у пацієнтів із системними та неінфекційними захворюваннями дозволяє коригувати хіміотерапію й уточнювати прогнози стану здоров'я, попереджувати прогресування захворювання.

Трипептид Прозерцин (Prosercin), вперше виявлений в сироватці хворих на автоімунні захворювання групою доктора біологічних наук Кота Ю.Я. Даний трипептид запобігає згортанню крові (рис 3.25.), чим і зацікавив нашу дослідницьку групу.

Для його детальнішого вивчення було синтезовано трипептид Сер-Про-Цис схематично представлений на рисунку 3.24.

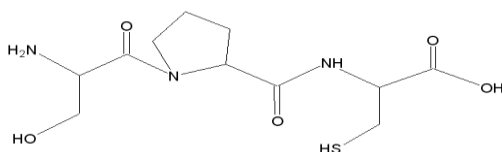


Рис. 3.24. Мономерна форма трипептиду Сер-Про-Цис

Отримані синтетичні пептиди також гальмують згортання крові. При експерименті осадження проводили двічі, щоб підтвердити відсутність лізису еритроцитів, який може виглядати як відсутність утворення тромбу (Рис. 3.25.).

Введення подібного неімуногенного препарату в медицину є перспективним на фоні зростання серцевосудинних захворювань. Основною проблемою є те, що подібні пептиди мають короткий період півжиття, і швидко розпадаються у руслі крові.

Після підтвердження ефективності іммобілізації на носіях на базі полівінілпіролідону було прийнято рішення створити ряд комплексів з синтетичним трипептидом.

Для цього було створено кон'югат ПВП з мономерною формою трипептиду (SPC) Сер-Про-Цис, який було протестовано за типом дії пептидоміметиків.

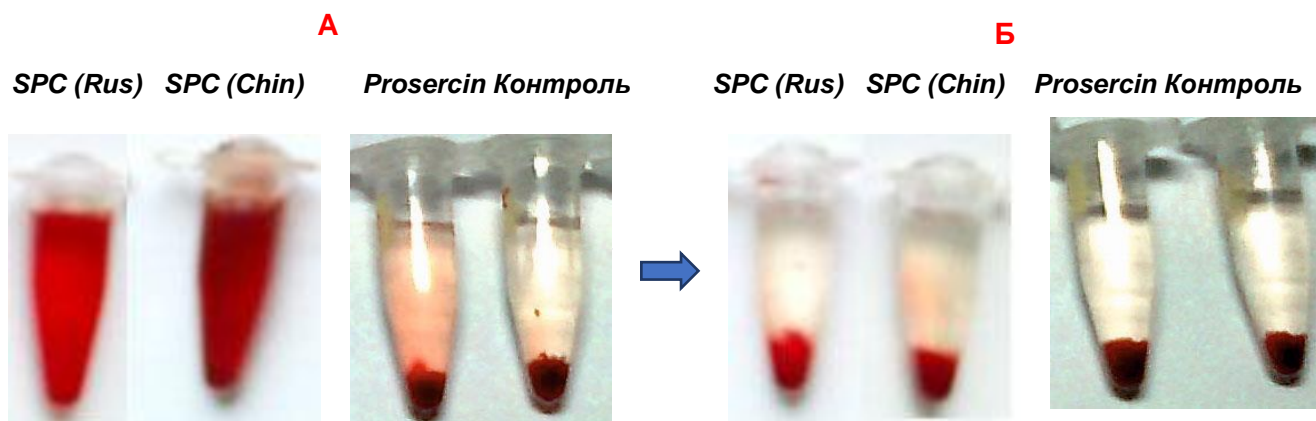


Рис. 3.25. Вплив Сер-Про-Цис -пептиду на згортання крові

А - 5 мкл водного розчину пептидів розчиняли в 2-кратному ЗФР(забуферений фосфатний розчин) і додавали 20 мкл свіжої донорської крові. Розчин перемішували і інкубували впродовж 20 хв при 37<sup>0</sup>С після чого до розчину додавали 200 мкл ЗФР і перемішували. Б – зразки центрифугували 3 хв при 1000 об/хв.

### 3.2.3. Вплив кон'югату трипептиду Сер-Про-Цис з полівінілпіролідонем на життєздатність і виживаність клітин ссавців

Пептидоміметики – це препарати на основі білкових молекул як є модифікованими чи іммобілізованими формами природних білків. У більшості випадків, такі препарати є високоефективними і низькотоксичними. Першим пептидоміметиком можна вважати інсулін.

Отримані нами препарати було проаналізовано за допомогою XRD (рентгеноструктурний аналіз). На рис. 3.26 представлено схематичне зображення формул сполук, досліджених у нашій роботі. Більшість з цих речовин аналізували щодо їхньої протибактерійної і протипухлинної активності.

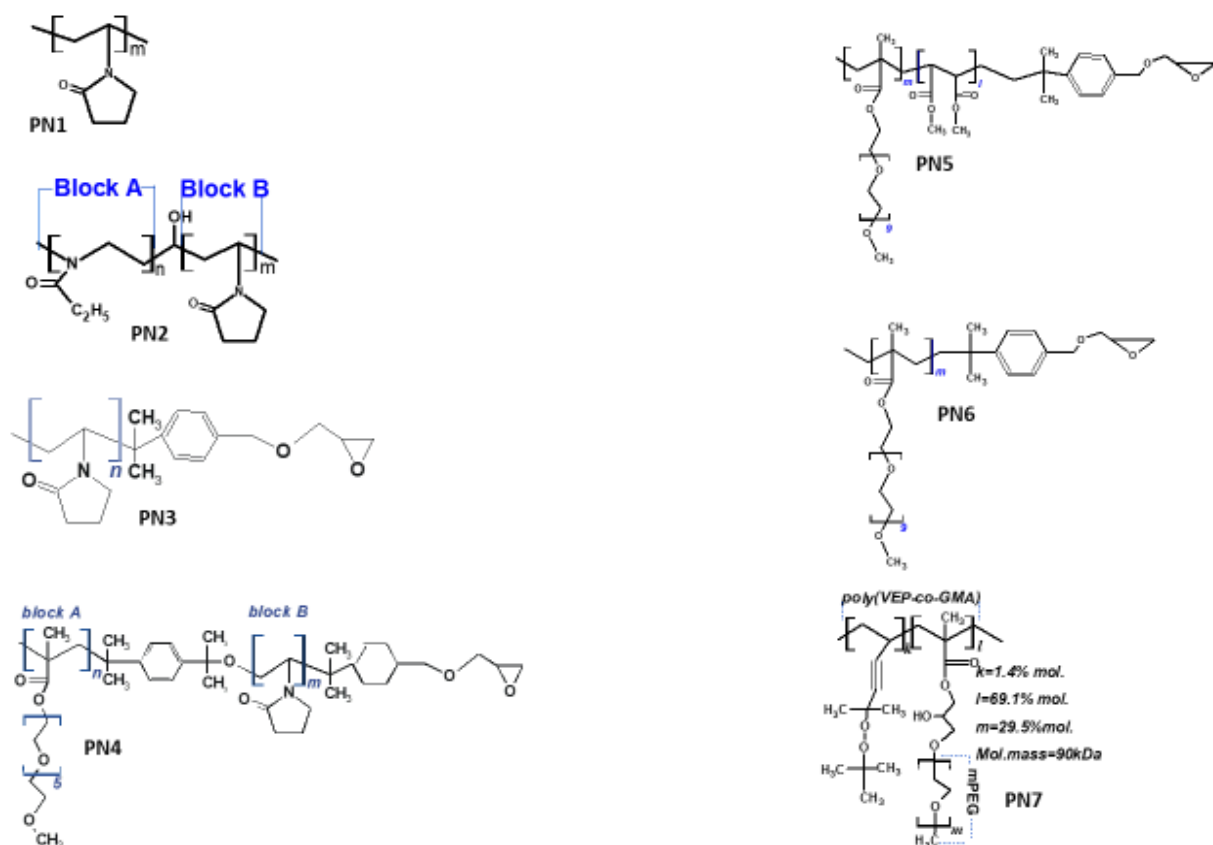


Рис. 3.26 Схематичне зображення формул отриманих сполук. **PN1** - Полівінілпіролідон (NBП)  $M_n = 12100$  Да, **PN2** - поліетиллоксазолін –блок-поліNBП  $M_n 20000$  Да (блок-кополімер поліетиллоксазоліну та полівінілпіролідону), **PN3** - полі NBП-КГЕ (КГЕ9)  $M_n 14000$  Да (полівінілпіролідону з кінцевою



епоксидною групою, **PN4** - ПЕГ(246)метакрилат-блок полі NBП-КГЕ Mn-7000 Да (*NKGE*)3 (блок кополімер поліПЕГ(246) метакрилату та полівінілпіролідону з кінцевою епоксидною групою, **PN5** Полі(ПЕГМА(475)-ко-диметилмалеїнат)- КГЕ, Mn-10000 Да (*475DMMep-1*) (кополімер поліПЕГ(475)метакрилату і диметилмалеїнату з кінцевою епоксидною групою), **PN6** - Полі(ПЕГМА(475))- КГЕ, Mn-12000 Да (*475CGE-3*) (полі(ПЕГметакрилат) з кінцевою епоксидною групою), **PN7** - Полі (ВЕП-ко-ГМА-графт-ПЕГ750 (A24ПЕГ) Mn-90000 Да.

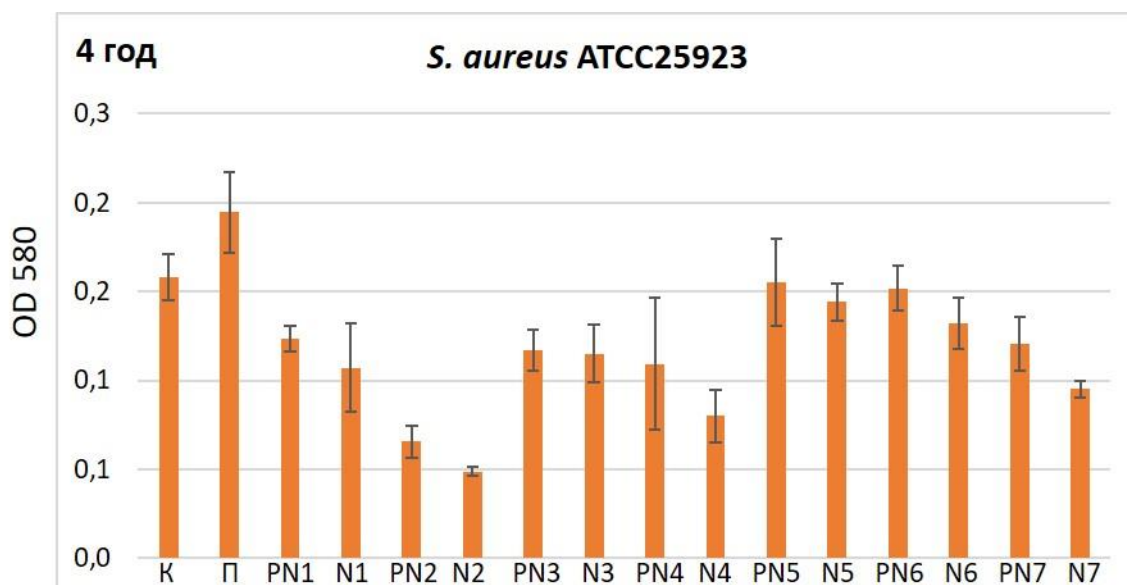


Рис. 3.27. Протибактерійна активність отриманих конюгатів щодо *S. aureus* ATCC25923. Доза PN – 1,6 мг\мл (носій) 0,13 мг\мл (пептид) Доза N – 1,6 мг\мл (носій) Доза П – 0,1 мг\мл(пептид).

Для подолання резистентності бактерій до ліків пропонують використання різних носіїв. Це дозволяє використовувати добре вивчені антибіотики, знижуючи резистентність бактерій, враховуючи також, що розробка і виробництво нових антибіотиків є дуже затратним.

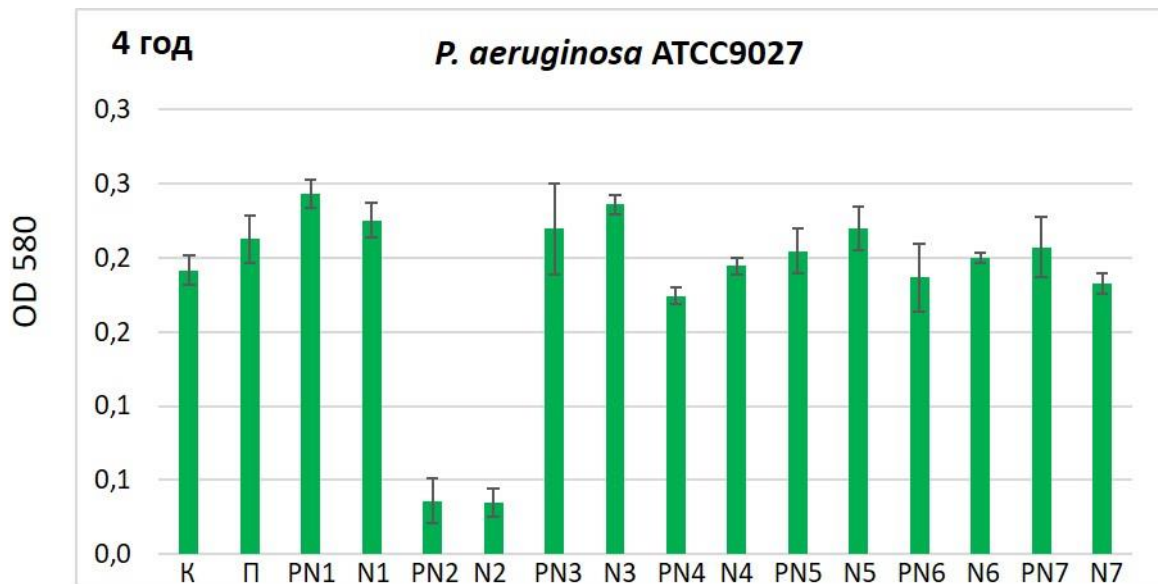


Рис. 3.28. Протибактерійна активність отриманих кон'югатів щодо *P. aeruginosa* ATCC9027. PN – 1,6 мг\мл (носій), 0,13 мг\мл (пептид) N – 1,6 мг\мл (носій) П – 0,1 мг\мл (пептид).

Встановлено, що речовини PN2 і N2, N4 проявляють протибактерійну активність щодо *S. aureus* ATCC25923 (рис. 3.27), речовини PN2 і N2 також володіють протибактерійною дією щодо *P. aeruginosa* ATCC9027 (рис. 3.28).

Подальше вивчення носія N4 слід вважати доволі перспективним, але для кон'югування потрібно застосовувати різні антибіотики синтетичного і природного походження, а не пептиди, які залишаються мало вивченими. Тому для подальших досліджень протибактерійної дії необхідно отримання кон'югатів з антибіотиками.

На наступному етапі наших досліджень вивчали протипухлинну активність отриманих кон'югатів. Для цього їх та їхні носії тестували на лініях пухлинних клітин різної етіології. У тестуванні використовували метод МТТ, при максимально можливій концентрації речовини в експерименті.

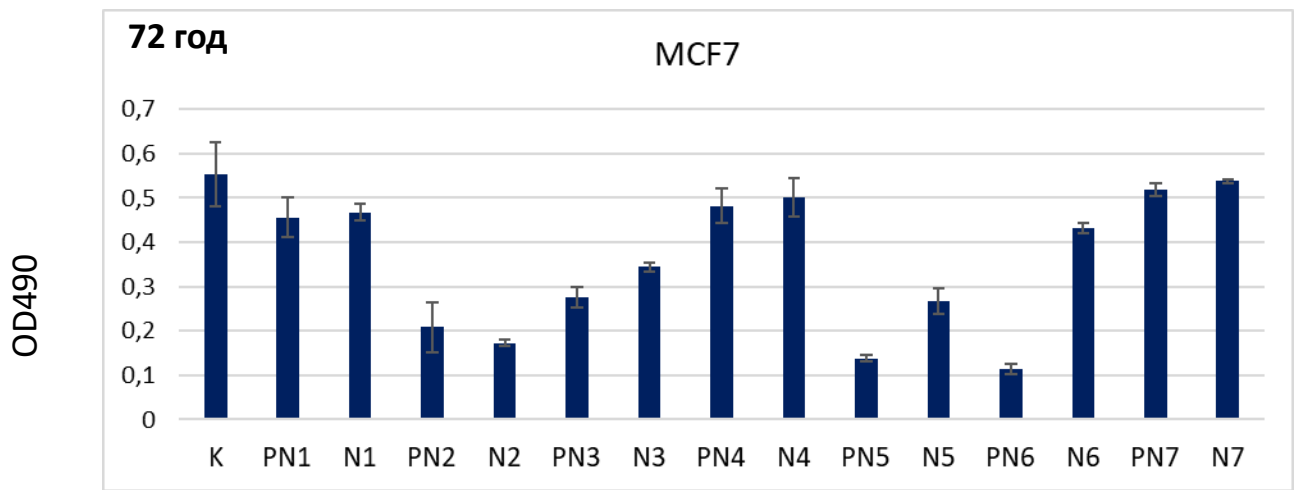


Рис. 3.29. Цитотоксичність кон'югатів з різними носіями щодо клітин лінії MCF7 карциноми молочної залози людини. PN – 1,6 мг\мл (носій), 0,13 мг\мл (пептид) N – 1,6 мг\мл (носій).

На Рис. 3.29 наведені результати тестування клітин лінії MCF7 карциноми молочної залози людини. Загибель близько 80% відсотків пухлинних клітин лінії MCF7 свідчать про виражену протипухлинну активність кон'югатів PN5, PN6. Кон'югат PN2 і його носій N2, також проявили доволі високу активність, хоч і дещо нижчу, ніж у кон'югатів PN5, PN6. Носій N5 також проявив протипухлинну активність.

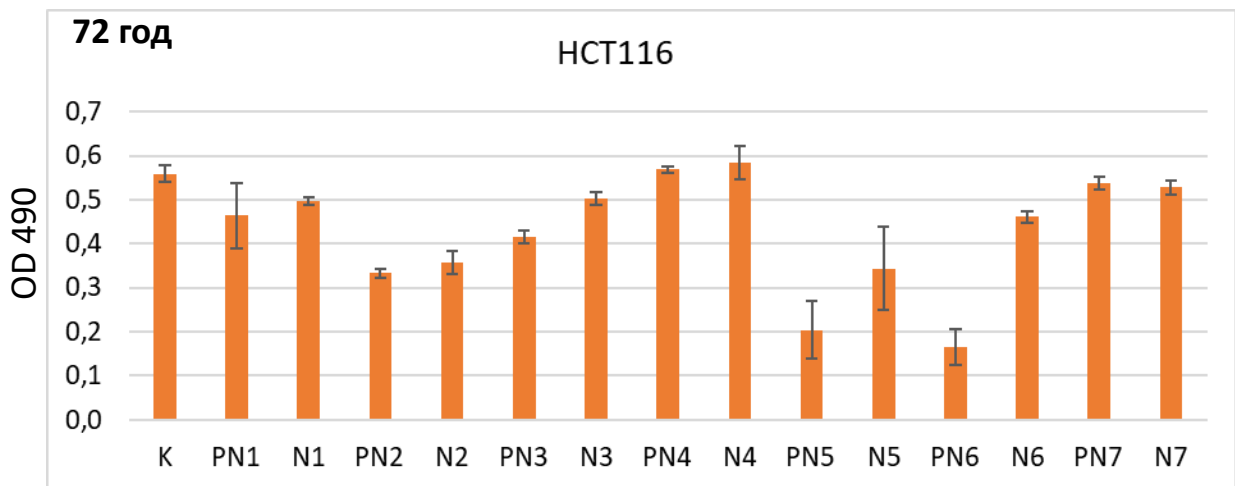


Рис. 3.30. Цитотоксичність кон'югатів з різними носіями щодо клітин лінії HCT116 колоректального раку прямої кишки людини. PN – 1,6 мг\мл (носій), 0,13 мг\мл (пептид) N – 1,6 мг\мл (носій)

Протипухлинна активність кон'югатів щодо клітин лінії НСТ116 колоректального раку прямої кишки людини (Рис. 3.30) відрізняється від такої активності, наведеної вище для клітин лінії МСF7 (Рис. 3.29). Спостерігали нижчу активність кон'югату РN2, тоді як активність сполук РN5, РN6 перебувала на такому ж рівні.

Важливим показником перспективності протипухлинних препаратів є їхня низька токсичність щодо клітин здорових тканин і органів. Даний параметр є критичним при впровадженні нових препаратів у протипухлинну хіміотерапію. Тому наступної лінією клітин для тестування було вибрано лінію НЕК293 псевдонормальних клітин з ембріона нирки людини (Рис 3.31). Хоча ці клітини є іморталізованими, але їм не властиві деякі типові ознаки пухлинних клітин.

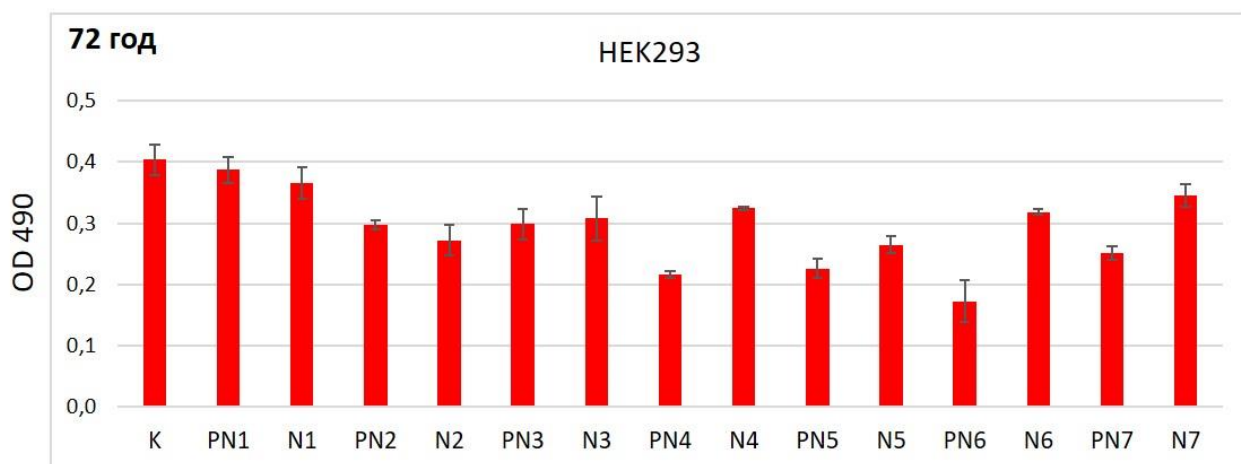


Рис. 3.31 Цитотоксичність кон'югатів з різними носіями щодо псевдонормальних клітин лінії НЕК293 з ембріональної нирки людини. РN – 1,6 мг\мл (носій), 0,13 мг\мл (пептид) N – 1,6 мг\мл (носій).

Отримані результати свідчать про певну селективність отриманих кон'югатів щодо пухлинних і псевдонормальних клітин. На підставі цих результатів для подальших досліджень були вибрані кон'югати РN5, РN6, РN2 та їхні носії. Ці речовини було протестовано на двох лініях клітин - J774.2

(лінія макрофагів з подібністю до лімфоцитів) і Hep-G2 (гепатоцелюлярна карциноми людини).

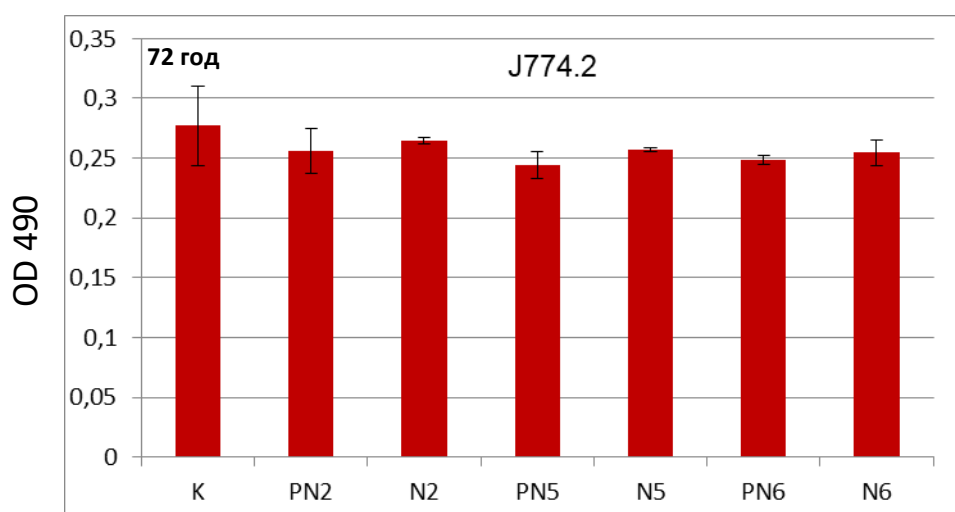


Рис. 3.32 Цитотоксичність кон'югатів з різними носіями щодо псевдонормальних мишачих макрофагів лінії J774.2. PN – 1,6 мг\мл (носій), 0,13 мг\мл (пептид) N – 1,6 мг\мл (носій).

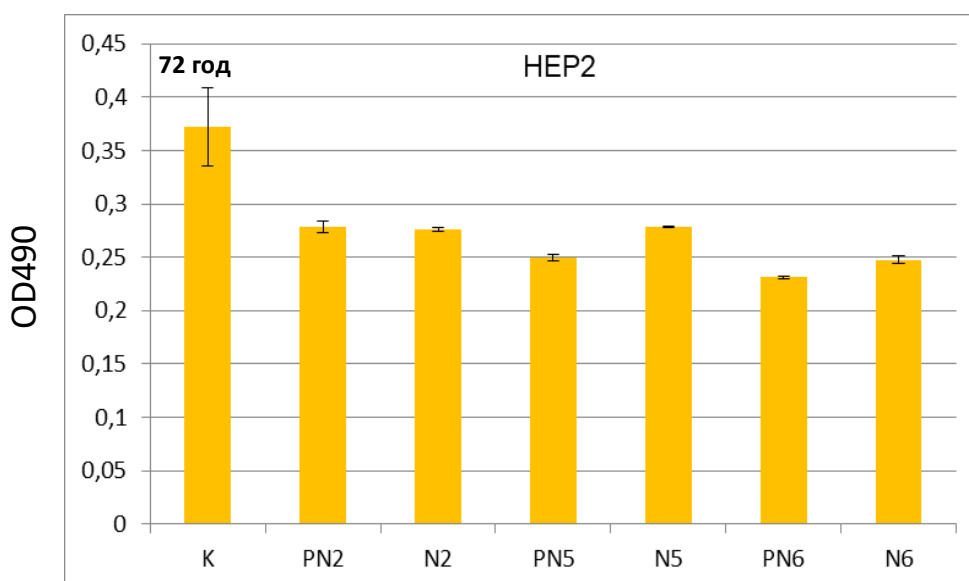


Рис. 3.33 Цитотоксичність кон'югатів з різними носіями щодо клітин лінії HepG2 гепатоцелюлярної карциноми людини. PN – 1,6 мг\мл (носій), 0,13 мг\мл (пептид) N – 1,6 мг\мл (носій).

Нами не виявлено вираженої цитотоксичної активності вибраних кон'югатів щодо клітин ліній J774.2 і HepG2 (рис.3.32-33). Отже, використані

препарати діють на пухлинні клітини лише певної етіології, тобто їхнє застосування є відносно спеціалізованим, але досить ефективним.

Для подальших досліджень нами був вибраний кон'югат PN5. Групою хіміків даний кон'югат був синтезований ще раз і проведено підтвердження його структури за допомогою методу ядерно-магнітного резонансу.

Кінцевою назвою даного кон'югату вибрано P4P, а його модифікованого полімера P4. Схема кон'югату та результати ЯМР (ядерно-магнітного резонансу) представлено на рисунку 3.34.

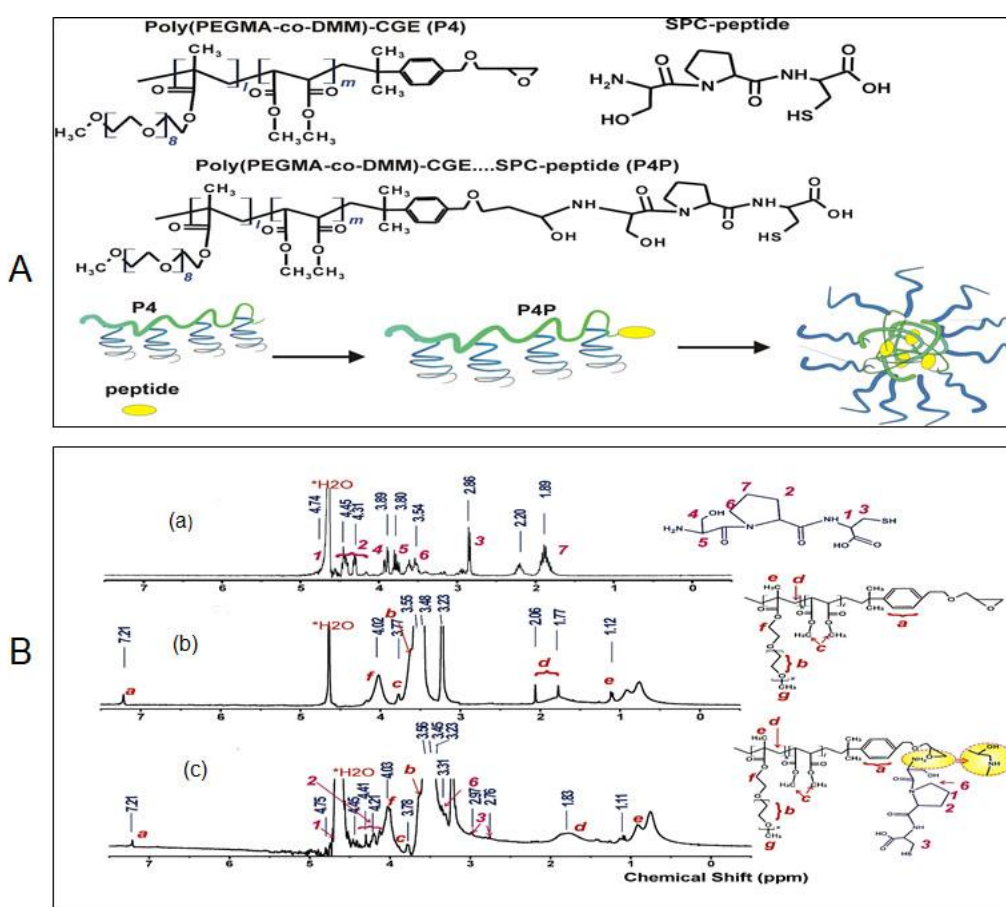


Рис. 3.34 Схема цитотоксичного комплексу(A) та підтвердження його структури за допомогою ЯМР(B). На рисунку B позначені піки відповідають позначеним структурам кон'югату.

Після підтвердження структури було проведено додаткові дослідження цитотоксичності сполуки відносно пухлинних, псевдонормальних та нормальних клітинних ліній (Рис.3.35).

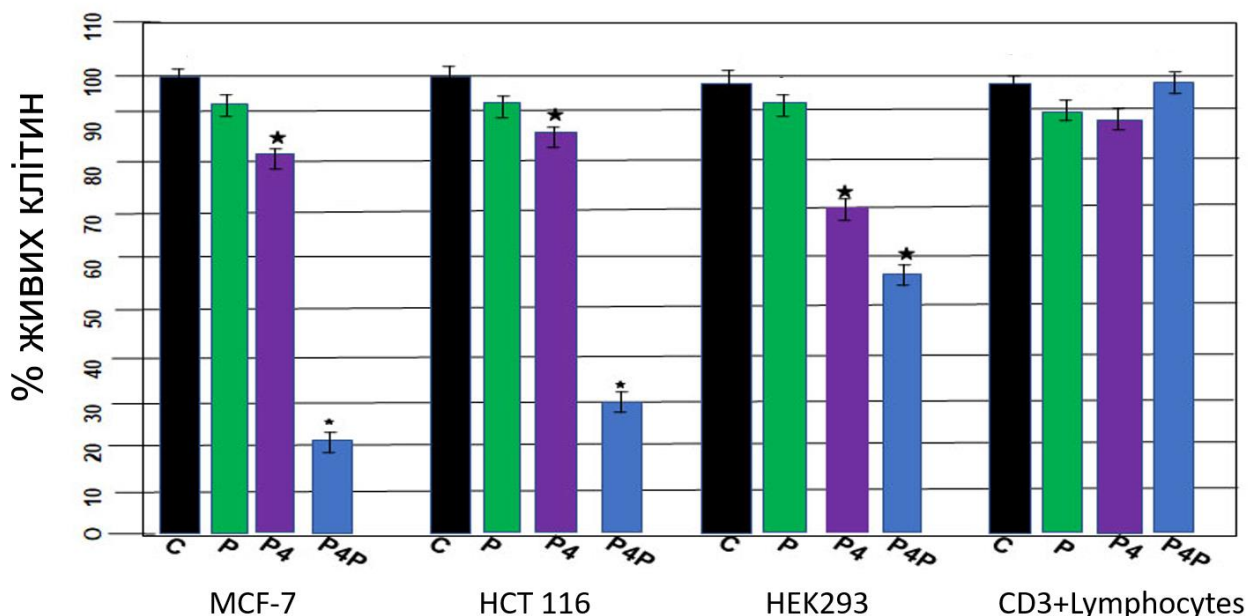


Рис.3.35 Цитотоксичний ефект кінцевого кон'югату (P4P), чистого пептиду(P) та модифікованого полімеру(P4) на 72 годину інкубації, відносно пухлинних клітин лінії MCF7 карциноми молочної залози людини, клітин лінії HCT116 колоректального раку прямої кишки людини, псевдонормальних клітин лінії HEK293 з ембріональної нирки людини активованих антитілами CD3+ нормальних лімфоцитів людини.

Підтверджено цитотоксичність даного кон'югату відносно пухлинних ліній клітин, а також, що важливіше, виявлено відсутність токсичного ефекту відносно нормальних лімфоцитів людини.

Базуючись на результатах визначення цитотоксичності, проведено тестування *in vivo* на мишах лінії C57\Black. Моделлю пухлини була вибрана лімфома Немет-Келнер (NK/Ly). Для тестування *in vivo* був вибраний найбільш активний кон'югат P4P, який також не проявляв токсичності щодо

псевдонормальних клітини. Позитивним контролем слугував доксорубіцин. Отримані результати представлені на рис. 3.36 і 3.37.

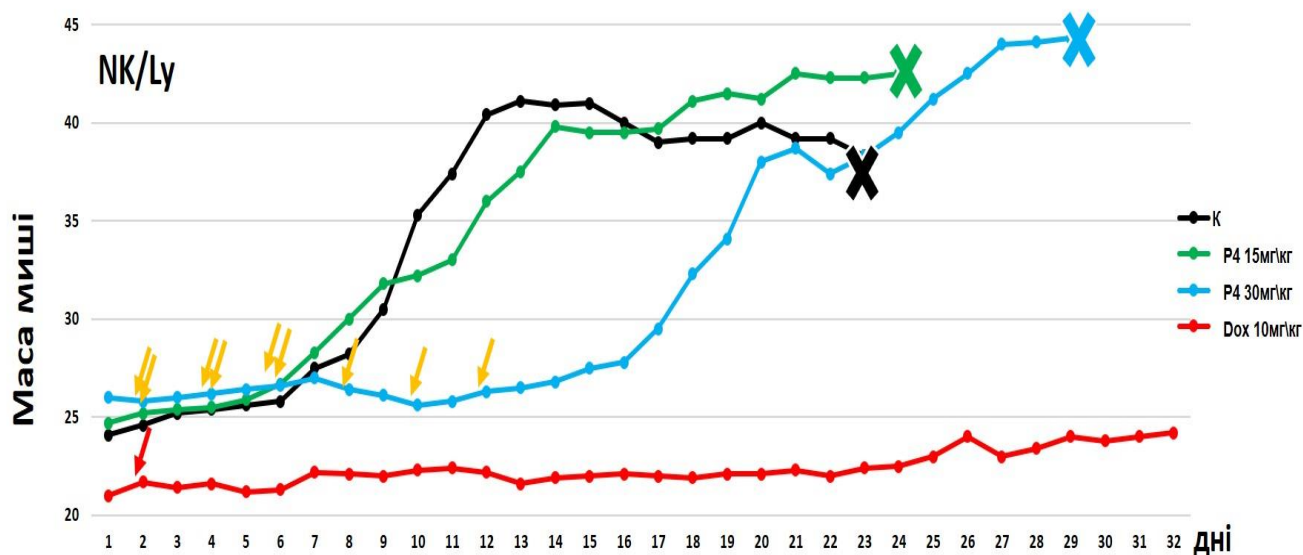


Рис. 3.36. Криві виживання мишей лінії C57\Black з пухлиною NK/Ly. Стрілками позначені дні введення препарату доксорубіцину(червона стрілка) і носія Р4 (жовті стрілки) в дозах 15 і 30 мг/кг. Хрестами позначена загибель тварини.

З даних на рис. 3.36 видно дозозалежний вплив носія. При дозуванні 30 мг\кг носія Р4 спостерігається платоподібне наростання маси лімфоми. Після введення нижчої дози спостерігали стрімке наростання маси пухлини у тварин, з показниками близькими до контролю. Тривалість життя тварин при більшій дозі носія Р4 продовжувалася на 7 днів, що становить близько на 20-25% в порівнянні з контролем. Дія доксорубіцину забезпечувала повне видужання мишей-пухлиноносіїв.

На рис. 3.37 видно подібні ефекти кон'югату Р4Р, але на відміну від носія плато наростання маси за дози 30 мг/кг є більш пологим, а також введення нижчої кількості препарату (15 мг/кг) призвело до продовження життя мишей на 20-25%, порівнянно з контролем, що співмірно за дози носія 30 мг/кг, незважаючи на те, що наростання маси пухлини було доволі



стрімким. Різниця у виживання тварин, які отримували дози кон'югату Р4Р 15 і 30 мг/кг, становить всього 1 день.

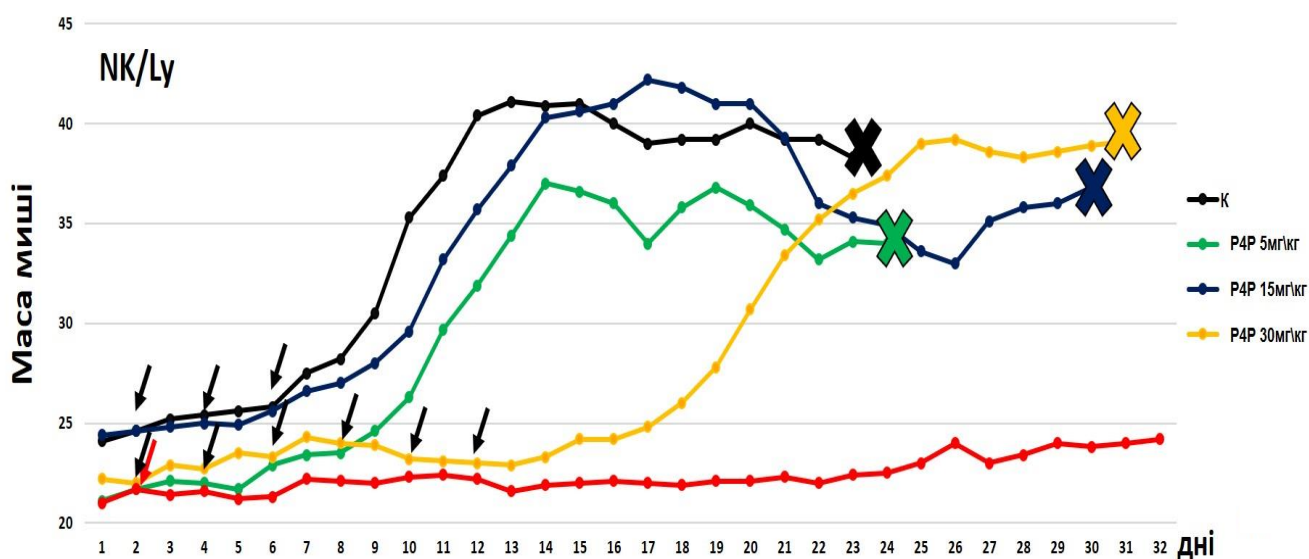


Рис. 3.37. Криві виживання мишей лінії C57\Black з пухлиною NK/Ly. Стрілками позначені дні введення доксорубіцину (червона стрілка) і кон'югату Р4Р (чорні стрілки) в дозах 5, 15 і 30 мг/кг. Хрестами позначена загибель тварини.

Базуючись на отриманих даних, можна стверджувати, що кон'югування пептиду Сер-Про-Цис на носій (похідне полівінілпіролідону) значно покращує протипухлинні властивості носія. Імовірно, що приєднаний пептид забезпечує таргетність дії його кон'югату з носієм щодо лімфомної пухлини. Перспективність даного кон'югату базується на можливості уникнення резистентності щодо даного пептидоміметика, на відміну від класичних протипухлинних препаратів.

#### Підсумки до розділу:

На модифікованому синтетичному полімері на основі похідних полівінілпіролідону ковалентно приєднано трипептид Сер-Про-Цис. Встановлено, що така іммобілізація суттєво підвищує токсичність цього трипептида щодо пухлинних клітин. Комплекси трипептиду Сер-Про-Цис із

вказаним носієм гальмують ріст лімфоми NK/Ly у мишей лінії C57\Black. Представлені вище результати опубліковано у статті [229]

### **3.2.4 Механізми проникнення кон'югату трипептиду Сер-Про-Цис з полівінілпіролідом в клітини ссавців і його локалізація в клітинах-мішенях**

Критичним моментом доказової медицини і сучасної біотехнології та фармакології є визначення механізмів дії нових препаратів, їхня фармакінетика і фармадинаміка. Тому наступним етапом нашої роботи було визначення потенційних механізмів дії та шляхи проникнення в клітину кон'югата Р4Р. Для цих цілей використано кон'югат Р4Р мічений флуоресцентним барвником FITC (ізотіоціанат флуоресцеїну).

Основною робочою гіпотезою щодо механізму проникнення даної речовини в клітини був везикулярний транспорт її молекул із позаклітинного середовища. Під час флуоресцентної мікроскопії використовували й інші барвники: нейтральний червоний – діазиновий барвник, похідне феназину, флюоресценція якого відбувається при емісії 750 нм. Однією з причин вибору даного барвника була відсутність перекривання його спектру випромінювання зі спектром FITC, що дозволило перевірити можливість проникнення даної речовини в клітини шляхом ендоцитозу.

Проведено мікроскопічне дослідження FITC-міченого кон'юганту PN5. Дослідження проводили на клітинах лінії MCF7 карциноми молочної залози людини. В експерименті використовували додаткове фарбування клітин нейтральним червоним для детекції внутрішньоклітинних везикул і лізосом, та Hoescht-33342 для детекції нуклеїнових кислот. Цей прийом має високу ефективність, бо він дозволяє підтвердити проникнення міченої речовини в клітину, а також дізнатись про стан клітин за дії препарату. Накладання кольорів вказує на внутрішньоклітинну локалізацію міченої речовини.

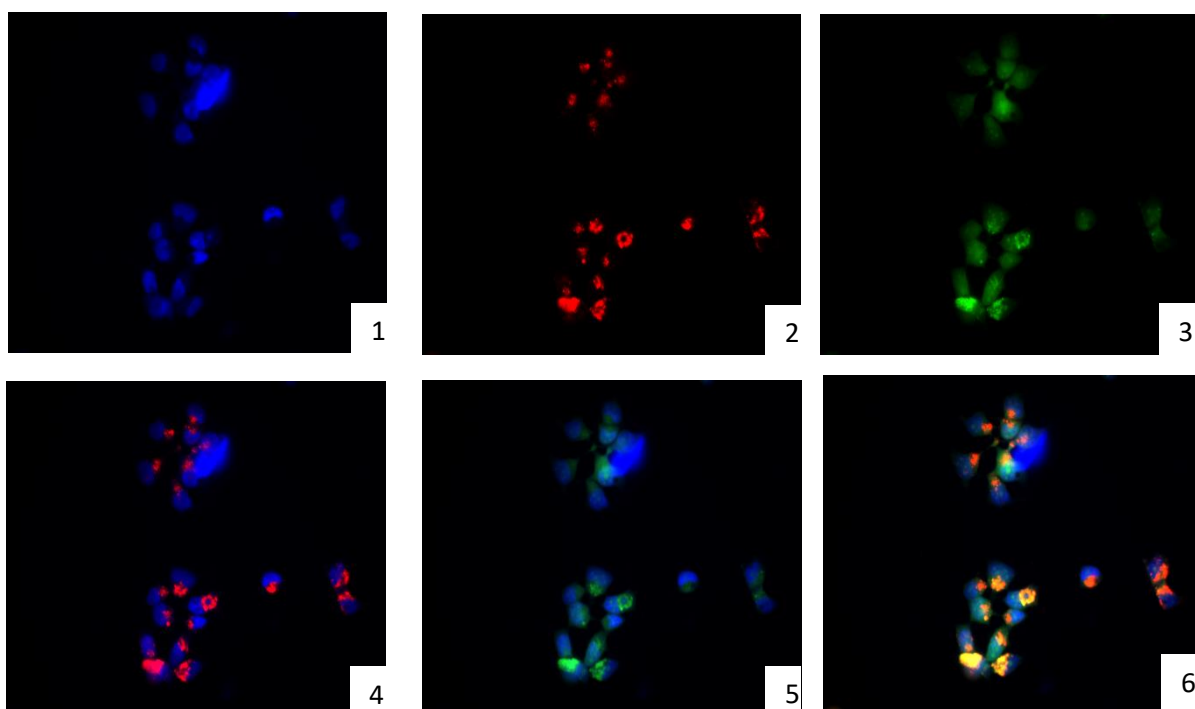


Рис. 3.38. Флуорестцентна мікроскопія клітин карциноми молочної залози MCF7 за дії кон'югату Р4Р, міченого FITC. Використані барвники: Hoechst-33342 (синій - ДНК), нейтральний червоний (червоний - везикули та лізосоми) FITC (зелений – досліджувана речовина).

На рис. 3.38 на зображеннях за номерами 4, 5, 6 позначено накладання флуоресценції різних барвників. У випадку фото за номером 5 не спостерігали накладання зеленого (досліджувана речовина) та синього (нуклеїнові кислоти) кольорів. На підставі цих результатів можна стверджувати, що після 2 год інкубації клітин кон'югат не проникає в їхнє ядро. У випадку зображення 6 виявлено появу жовтого кольору, що спричинене накладанням червоного (везикули та лізосоми) і зеленого (досліджувана речовина) кольорів.

Підсумовуючи, можна стверджувати, що на 2-гу годину інкубації клітин кон'югат знаходиться в їхніх везикулах або лізосомах. Це дозволяє припустити, що він потрапляє в клітину шляхом ендоцитозу. Даний шлях є доволі поширеним під час дії різних чинників на клітини. Переважно, цей процес призводить до дезактивації медичних препаратів, на відміну від дії досліджуваного кон'югату, який проявляє протипухлинну дію.

Утворення в клітинах активних форм кисню (АФК) є важливим механізмом захисту організму від зовнішніх та внутрішніх загроз. Підтримання редокс-балансу клітин є основою для забезпечення їхньої нормальної життєдіяльності. При онкологічних захворюваннях даний баланс порушується внаслідок надмірного росту пухлинних клітин, хоча клітини намагаються його збалансувати. Пухлинні клітини є доволі вразливими до терапій, які збільшують кількість АФК, тоді як у нормальних клітин цей фактор викликає стрес, але не обов'язково призводить до їх загибелі, натомість у пухлинах він часто індукує апоптоз.

Для визначення кількості активних форм кисню часто використовують проточну цитометрію з барвником DCFDA. Особливість даної фарби полягає в тому, що сам барвник не флуоресцює, але за дії на нього перексиду водню ( $H_2O_2$ ), з'являється його окиснена форма, що володіє зеленою флуоресценцією. Ця властивість DCFDA дозволяє використовувати його і в флуоресцентній мікроскопії. Тобто ми не отримуємо співвідношення реактивних форм кисню за дії препарату щодо контролю, але це дозволить нам підтвердити роль  $H_2O_2$  в механізмах дії препарату.

Експерименти проведено на лінії клітин MCF7 раку молочної залози людини.

Після 30 хв інкубації клітин з кон'югатом виявлено інтенсивне свічення пухлинних клітин, що вказує на роль АФК в механізмах цитотоксичної дії досліджуваного кон'югату (Рис. 3.39).

На підставі даних про проникнення кон'югатів поліпептида P4P в клітини-мішені, закономірно виникло питання, з якими білками всередині клітин вони взаємодіють. Відповідь на це питання вдалося отримати в два етапи: 1) афінна хроматографія внутрішньоклітинних білків на магнітних мікрочастинках та їх електрофоретичне розділення; 2) мас-спектрометрія електрофоретичних білкових фракцій [231].

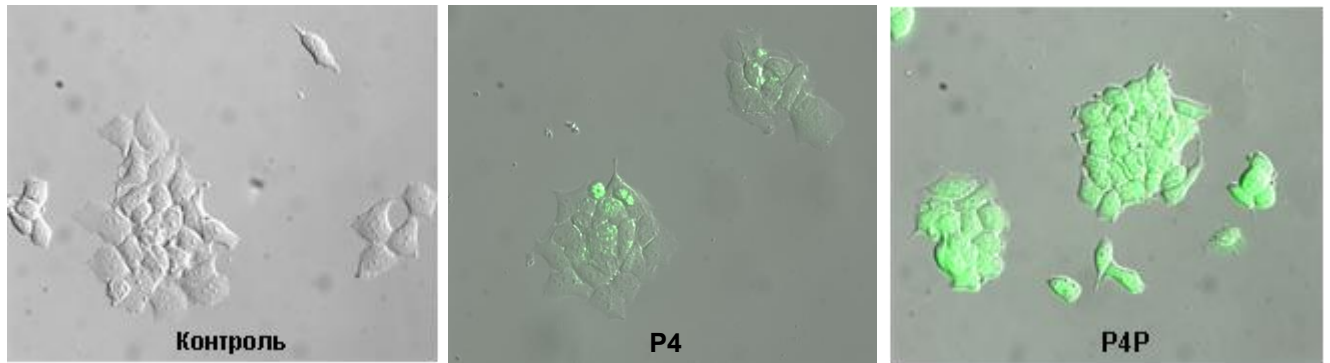


Рис. 3.39. Результат флюорестцентної мікроскопії клітин лінії MCF7 раку молочної залози людини за дії кон'югату (P4P – 1,66 мг\мл (носій), 0,13 мг\мл (пептид), P4 – 1,66 мг\мл (носій) за присутності барвника DCFDA (0,05M) на 6 годину інкубації.

Вирощування і забір клітин, а також афінна хроматографія внутрішньоклітинних білків на магнітних мікрочастинках та їх електрофоретичне розділення проводилося в Україні. В подальшому смуги білків отримані при розділенні, вирізалися разом з гелем і зберігалися при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Підготовка і аналіз білків отриманих смуг білків проводили за допомогою мас-спектрометрії в при співпраці з групою проф. Сергія Сушельницького, в Національному Катарському Університеті, міста Доха, Катар в рамках міжнародного проекту гранту Фольцвагген. Цифрову обробку виявлених послідовностей амінокислот проводили за допомогою програм та обладнання вище названого університету.

Отже, нами виявлено внутрішньоклітинні білки, які взаємодіють з комплексом P4P клітин лінії NK/Ly. Серед ідентифікованих білків знаходяться структурні білки клітин (актин, кератин цитоскелету, цитоплазматичний бета актин, міозин) та сироватковий альбумін в табл. 3.5.

Отримані нами результати мас-спектрометрії білків клітин лінії NK/Ly, які взаємодіють з комплексом достатньо для їх ідентифікації, але недостатньо для верифікації.

Таблиця 3.5

Білкові компоненти цитоскелету клітини, які взаємодіють з комплексом Р4Р і виявлені за допомогою MALDI-TOFF

Білок	Ідентифікаційний код	Імовірність	Est'dZ	Покриття послідовності (%)
<b>ACTB protein, partial</b> (Actin, cytoplasmic 1)	AAN12854.1	1.0e+000	1.61	<b>46</b>
<b>beta actin variant</b>	BAD96752.1	1.0e+000	1.61	<b>44</b>
<b>keratin, type II cytoskeletal 1</b>	NP_006112.3	1.0e+000	1.23	<b>27</b>
<b>MYO1C variant pro</b>	BAE06097.1	1.0e+000	1.23	<b>20</b>
<b>Serum albumin</b>	AAN17825	1.0e+000	2.25	<b>26</b>

### Підсумки до розділу:

Встановлено, що трипептид Сер-Про-Цис, ковалентно кон'югований із полівінілпіролідоним похідним, міченим FITC, проникає через 2-6 год в клітини лінії MCF7 карциноми молочної залози людини і накопичується у везикулах (лізосомах), але не потрапляє у ядро клітин.

Підтверджено роль  $H_2O_2$  в механізмі цитотоксичної дії комплексу Р4Р щодо пухлинних клітин лінії MCF7.

За допомогою MALDI-TOFF мас-спектрометрії вперше ідентифіковані внутрішньоклітинні білки, які взаємодіють з комплексом Р4Р в клітинах мишачої лімфоми NK/Ly і можуть слугувати його молекулярними мішенями. Серед ідентифікованих білків знаходяться структурні білки клітин (актин, кератин цитоскелету, цитоплазматичний бета актин, міозин) та сироватковий альбумін.

Представлені вище результати опубліковано у статті[231].

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальні результати нашої дисертаційної роботи дозволяють запропонувати ряд висновків щодо особливостей біологічної дії хітозану та його похідних та полівінілпіролідону та його похідних.

Головною проблемою протибактерійної терапії вважають виникнення резистентності патогених бактерій до медикаментозних чинників. Причиною такої резистентності найчастіше є безконтрольне вживання антибіотиків, переривання курсу лікування і халатне відношення пацієнтів до лікування. До того ж множинна резистентність до антибіотиків може мати різні причини. Окремою групою небезпечних бактерій є так звані супербактерії, що володіють множинною резистентністю до більшості протибактерійних препаратів. У 2019 вперше виявлено пацієнтку зі штамом *Neisseria gonorrhoeae*, стійким до усіх відомих видів антибіотиків.

Тому існує доволі гостра необхідність у розробці не просто нових антибіотиків, а принципово нових протибактерійних препаратів. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є застосування речовин з фізичними механізмами дії. Стійкість до такого впливу майже ніколи не є повною, або взагалі не виробляється [232].

Ми вважаємо, що отримані нами препарати хітозанів, особливо їхні похідні, такі як хітозан-меланіновий комплекс, є перспективними протимікробними засобами. Відомо що хітозан володіє як протигрибковою, так і протибактерійною активністю, але результати досліджень часто відрізняються в кілька разів, що було незрозумілим, і потребувало детального дослідження. Крім того, механізми дії хітозану, зокрема антимікробні, залишалися мало вивченими, і припущення щодо цих механізмів, представлені в огляді літератури, базувались здебільшого на теоретичних розрахунках [54-64].



Тому одним із завдань нашої роботи було визначити причини виявлених розбіжностей щодо біологічної активності хітозанів і розглянути можливі механізми їхньої дії (припущення висунуто в розділі 3.1.3, рисунок 3.15).

Необхідно відмітити що у літературі не зустрічається випадків резистентності мікроорганізмів щодо дії хітозану.

Крім протигрибкової активності отриманих нами препаратів хітозанів щодо лабораторних штамів дріжджів *Candida albicans*, ми вивчили їхню активність щодо мультирезистентного штаму цих дріжджів, отриманого від клінічного пацієнта (в рамках співпраці з кафедрою генетики та біотехнології Львівського національного університету ім. Івана Франка).

Результати проведеного нами дослідження свідчать про високу ефективність дії ХМК на мультирезистентний штам *C. albicans*. Отже, створений нами препарат (ХМК, хітозан-меланінового комплекс) на основі хітозану може бути рекомендований як засіб пригнічення мультирезистентних до ліків мікроорганізмів. Також необхідно обговорити питання і проблеми, пов'язані з джерелами хітину для отримання хітозану. Переважно, для цього використовують панцирі морських членостоногих [13-16]. Інші джерела хітину такі як тутовий шовкопряд, саранча та інші є слабо досліджені й інформація на цю тему є дуже фрагментарною [17-29]. Тому ці джерела вважають мало перспективними через складність введення такої сировини у масове виробництво.

Ми вважаємо, що отримання хітину і далі хітозану та його похідних з тіл мертвих бджіл є одним із найбільш перспективних в Україні, якщо мова йде про промислові масштаби. Враховуючи, що первинний матеріал становить відходи бджільництва, яке високорозвинене в Україні, кількість весняного підмору для отримання хітину є значною. Разом з тим, використання такого джерела має й певні встановлені нами недоліки, пов'язані з необхідністю використання під час очистки хітину значної кількості петролейного ефіру для відмивання восків, якими покрите тіло бджіл.

Ще одним джерелом отримання хітину і в подальшому хітозану, також використаним у нашій роботі, є плодові тіла грибів: дубовик оливково-бурий - *Boletus luridus* Fr.; моховик зелений - *Xerocomus subtomentosus* (Fr.) Quel.; глива звичайна - *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm; трутовик лускатий - *Polyporus squamosus* Huds.: Fr. Це джерело поширене в Україні, при необхідності ці гриби легко культивувати на відходах деревообробної промисловості, хоча прийоми для очистки хітину тут є доволі складними, внаслідок наявності значної кількості похідних вуглеводів в плодових тілах грибів. Тому дане джерело є більш вартісним в очистці хітину, хоч і доволі цікавим, завдяючи на деякі унікальні властивості хітозанів, очищених з грибів [234].

Важливим показником, який необхідно враховувати під час вивчення і використання нових біологічно активних речовин, особливо, в медицині, є токсичність цих речовин щодо клітин людини. Зважаючи на це, ми протестували дію зразків хітозану та ХМК на клітини ссавців, зокрема на лінії пухлинних і трансформованих клітин людини. Нами не виявлено вираженого цитотоксичного ефекту цих препаратів в концентраціях, ефективних для їхньої протимікробної активності.

Подібні дослідження часто критикують через відсутність у дослідженні нормальних клітин людини як контрольних. Тому ми також використали як мішень для дії різних препаратів хітозанів лімфоцити периферичної крові людини. Необхідно зауважити що для отримання достовірних результатів необхідно активувати лімфоцити мітогеном. Виділені із крові лімфоцити знаходяться в інтактному стані, тому вони будуть слабочутливі дії чинників та препаратів. В якості мітогену найчастіше використовуються антитіла CD3+, а також фітогемаглютинін. Активацію лімфоцитів ми підтверджували за допомогою мікроскопії. При активації клітини лімфоцитів збільшуються в розмірах, а також утворюють скупчення, «розетки». Дану культуру клітин можна використовувати для тестування речовин не більше ніж 6 днів після виділення лімфоцитів з крові.

Ми не виявили цитотоксичного впливу ХМК і хітозану на активовані лімфоцити. Крім того, було досліджено дію комплексу хітозану з етакридин лактатом, що є ароматичною сполукою, похідним акридину. Цей чинник застосовують як антисептик [235], а в деяких країнах - для абортів на пізніх стадіях [236]. Основною причиною нашого вибору була можливість спектрофотометричного детектування етакрину лактату у сироватці крові. Як носій етакридину лактату використовували хітозан, очищений з креветок.

Динаміка вмісту етакридину лактату у сироватці крові з максимумом через 8 год і поступовим зменшенням протягом 72 год (див. Рис 3.21-22.) свідчить про те, що в комплексі з хітозаном пролонгується перебування цього чинника в руслі крові. Це вказує на перспективність використання хітозану як носія медикаментозних препаратів.

У нашій роботі також успішно вирішені деякі методичні проблеми, пов'язані з низькою розчинністю хітозану та його гетерогенністю, що є важливим для ефективного застосування хітозану і його похідних як самостійних біологічно активних чинників.

Використання для розчинення хітозану гліколевої кислоти дозволило нам використовувати стабільні розчини високомолекулярного хітозану.

Подолання проблеми пов'язаних з хітозаном дозволить сильно розширити застосування хітозану у медицині. Наприклад, застосовувати розчин хітозану для подолання генералізованих внутрішньочеревних інфекцій без загрози виникнення резистентності до хітозану. Проводити обробку термічних та хімічних уражень поверхні шкіри та м'яких тканин, запобігаючи розвитку інфекцій, обробка післяопераційних ран та швів.

Окремо варто виділити перспективи застосування хітозану при лікуванні трофічних язв різного генезу, так як крім протимікробної дії, хітозан має кровоспинний ефект, що дозволить запобігати потраплянню крові і ексудату в рану, що забезпечить сповільнення процесу некротизації.

Крім того в літературі є чимало підтверджень щодо регенеративних властивостей хітозану (детальніше представлено у розділі 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ у підрозділі 1.1.1), що спільно з результатами моєї дисертаційної роботи дозволить розглядати хітозан як препарат для прискорення загоювання ран. Причиною такої біологічної активності в літературі вказують стимуляції росту фіброblastів, що дозволяє прискорити закриття рани.

Підсумовуючи обговорення фрагменту дисертаційної роботи яка стосується хітозану і його похідних, можна чітко стверджувати що представлені в роботі результати не тільки вирішують проблеми пов'язані з застосуванням та отриманням хітозану, але і відкривають нові перспективні напрямки досліджень щодо процесів загоєння інфікованих та звичайних ран та опіків, удосконалення застосування хітозану як структури для депонування лікарських препаратів, імуно ад'ювантних досліджень для створення вакцин та інших.

Важливим завданням дисертаційної роботи було вивчення синтетичних похідних полівініліпролідонів як носіїв біологічно активних речовин, зокрема пептидів. У первинних експериментах використовували лізоцим, що є білком із антимікробною активністю, який здатен лізувати клітинну стінку більшості грампозитивних бактерій [18]. Імобілізація лізоциму на похідних полівініліпролідону не зменшила його протибактерійну активність, зокрема ми спостерігали збільшення протибактерійної активності при високих концентраціях даного комплексу. Причиною даного зростання активності на нашу думку є те що внаслідок кон'югування з модифікованим полімером молекули лізоциму не агрегують у високих концентраціях.

Використання даного прийому дозволить підвищити ефективність застосування лізоциму для подолання грампозитивних інфекцій, що при широкому поширенні резистентності у бактерій буде корисним у медицині.

Базуючись на попередніх дослідженнях ми використали подібні похідні для кон'югації синтетичного трипептида Сер-Про-Цис. Цей трипептид, виділений із крові пацієнтів, хворих на автоімунні хвороби, запобігає

утворенню кров'яного згустка (див. Рис. 3.25), що вказує на його перспективність для медицини.

Створення комплексів похідних полівінілпіролідону із синтетичним трипептидом Сер-Про-Цис здійснене в рамках співпраці з групою д.х.н. Заїченка О.С. на кафедрі органічної хімії Національного Університету «Львівська Політехніка». Встановлено, що із колекції синтезованих кон'югатів комплекс PN5 (в подальшому P4P) володів найвищою протипухлинною активністю *in vitro*, а також незначною токсичністю щодо ліній псевдонормальних і нормальних клітин людини.

Тому цей комплекс (P4P) був вибраний як найбільш перспективний для подальших досліджень. Для встановлення внутрішньоклітинної локалізації досліджуваного комплексу було створено FITC-мічений комплекс P4P.

За результатами флуоресцентної мікроскопії можна стверджувати, що через 2 год дії на клітини лінії MCF7 карциноми молочної залози людини досліджуваний кон'югат локалізується в лізосомах і/чи везикулах, на що вказує жовта флуоресценція через накладання червоного (нейтральний червоний) і зеленого (мічений FITC кон'югант P4P). Цей кон'югат не виявлено в ядрі клітин-мішеней. Можна припустити, що проникнення кон'югату в клітини відбувається шляхом його ендцитозу, однак це питання вимагає додаткового дослідження.

Відомо, що АФК відіграють важливу роль в механізмах цитотоксичної дії різних екстремальних, у т.ч. протипухлинних ліків. Одним із методів напівкількісної оцінки вмісту АФК в клітинах є використання флуоресцентного барвника DCFDA, окиснена форма якого володіє зеленою флуоресценцією [237]. Нами показано, що за дії кон'югату P4P на клітини лінії MCF7 раку молочної залози людини в цих клітинах суттєво зростає свічення DCFDA, що вказує на потенційну роль АФК, а конкретніше пероксиду водню, в механізмі дії цього кон'югату.

У роботі було дуже важливо отримати інформацію про молекулярні мішені дії кон'югату P4P. Завдяки співпраці відділу регуляції проліферації

клітин і апоптозу, де виконувалася наша робота, з науковою групою професора С.І. Сушельницького з Катарського національного університету в м. Доха (Катар) таку інформацію було отримано, чому також сприяла фінансова підтримка в рамках проекту фірми Фольцвагген (Федеративна Республіка Німеччина). Наукова група професора С.І. Сушельницького в Катарському університеті надала нам можливість провести дослідження з використанням методу мас-спектрометрії білків.

Білки клітин лінії NK/Ly, що взаємодіють з комплексом P4P і виявлені за допомогою мас-спектрометрії MALDI-TOFF, представлені у таблиці 3.5. Більшість білків є білками клітинного цитосклету. Білки клітинного цитосклету беруть участь у внутрішньоклітинному транспорті речовин і клітинних везикул. Вони є відповідальними за підтримання форми поверхні клітини. Порушення роботи даної системи клітини призводить до перфорації її поверхні й ускладнює передачу внутрішньоклітинних і міжклітинних сигналів. Як свідчать результати проведеної нами флуоресцентної мікроскопії (Рис.3.38) саме у внутрішньоклітинних везикулах чи лізосомах через 2 год накопичується комплекс P4P.

Базуючися на цих результатах, можна припустити певну аналогію в дії комплексу P4P і протипухлинного препарату вінбластину. Механізм дії останнього полягає в його зв'язуванні з бета-тубуліном і запобіганні добудови його поліпептидного ланцюга. Відомо, що вінбластин широко використовують для лікування лейкемій [238] тоді як комплекс P4P, за результатами нашого дослідження пригнічує ріст клітин мишачої лімфоми NK/Ly (Рис. 3.37).

Підсумовуючи результати даної дисертаційної роботи можна зробити висновки щодо перспективності застосування полімерів природнього та синтетичного походження.

Використання природніх полімерів забезпечує високу біосумісність, низьку токсичність, та біологічну активність самих полімерів та їх похідних. Натомість недоліками даних полімерів є складність отримання, складнощі у

використанні та стандартизації та труднощі щодо хімічної модифікації.

Використання полімерів синтетичного походження забезпечує можливість швидкого отримання їх в промислових масштабах, легкі та доступні процеси стандартизації, а також широку можливість щодо хімічних модифікацій. Але токсичність, інертність щодо організму, імуногенність спричиняють значні перешкоди щодо їх застосування.

Таким чином використання полімерів різного походження повинно бути продиктовано конкретною медичною, біотехнологічною та технологічною задачами.

## ВИСНОВКИ

У фармацевтиці використовують все більше медикаментів, іммобілізованих на різноманітних носіях. На роль таких носіїв претендують як природні, так і синтетичні полімери, здатні розширити можливості застосування ліків, зменшити їхню загальну токсичність, пролонгувати дію медикаментозних препаратів в організмі людини, чи прискорити детоксикацію організму. Полімери використовують не лише як каркас для приєднання різноманітних компонентів із певною біологічною активністю, наприклад, ензимів чи ліків, але й як такі, що мають власну біологічну активність. Модифікація полімерів і подальше кон'югування з медичними препаратами може забезпечити подолання резистентності як бактерій так і пухлин, також принципово змінити біологічну активність молекул різного генезу.

1. Розроблено оригінальну методику отримання хітозану із підмору бджіл *Apis mellifera*. Проведено спектрометричний аналіз (FTIR, Fourier-transform infrared spectroscopy), визначено молекулярну масу. Також очищено і охарактеризовано хітозан із базидіального гриба *L. pergamenus*.
2. Виявлено низьку токсичність хітозану та ХМК за дози 0,2 мг/мл щодо псевдонормальних клітин лінії НЕК293 (нирка ембріона людини) і активованих мітогеном нормальних лімфоцитів крові людини.
3. Одержано хітозан-меланіновий комплекс (ХМК) із підмору бджіл з біологічною активністю, відмінною від активності очищеного хітозану. Встановлено, що ХМК володіє вираженою фунгіцидною дією контактного типу, яка залежить від молекулярної маси цього комплексу і вмісту в ньому меланіну. Зі зниженням молекулярної маси фрагментів ХМК, його фунгіцидна активність суттєво послаблюється. ХМК є токсичним щодо дріжджів *Candida albicans* штаму дикого типу С88 і цих дріжджів штаму N12 із мультирезистентністю.



4. Антисептик етакридин лактат іммобілізовано на хітозані краба. Показано, що таке комплексування пролонгує дію цього антисептика в організмі піддослідних щурів.
5. На модифікованому синтетичному полімері на основі похідних полівінілпіролідону ковалентно приєднано трипептид Сер-Про-Цис. Встановлено, що така іммобілізація суттєво підвищує токсичність цього трипептида щодо пухлинних клітин. Комплекси трипептиду Сер-Про-Цис із вказаним носієм гальмують ріст лімфоми NK/Ly у мишей лінії C57\Black.
6. Встановлено що трипептид Сер-Про-Цис, ковалентно кон'югований із полівінілпіролідоновим похідним, міченим FITC, проникає через 2-6 год в клітини лінії MCF7 карциноми молочної залози людини і накопичується у везикулах (лізосомах), але не потрапляє у ядро клітин. Підтверджено роль  $H_2O_2$  в механізмі цитотоксичної дії комплексу P4P щодо пухлинних клітин лінії MCF7.
7. За допомогою MALDI-TOFF мас-спектрометрії вперше ідентифіковані внутрішньоклітинні білки, які взаємодіють з комплексом P4P в клітинах мишачої лімфоми NK/Ly і можуть слугувати його молекулярними мішенями. Серед ідентифікованих білків знаходяться структурні білки клітин (актин, кератин цитоскелету, цитоплазматичний бета актин, міозин) та сироватковий альбумін.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ghaffarian, R.; Herrero, E.P.; Oh, H.; Raghavan, S.R.; Muro, S. Chitosan-Alginate Microcapsules Provide Gastric Protection and Intestinal Release of ICAM-1-Targeting Nanocarriers, Enabling GI Targeting In Vivo. // *Adv. Funct. Mater.* – 2016. – Vol.26. – P. 3382–3393.
2. Gu, Z.; Aimetti, A.A.; Wang, Q.; Dang, T.T.; Zhang, Y.; Veiseh, O.; Cheng, H.; Langer, R.S.; Anderson, D.G. / Injectable nano-network for glucose-mediated insulin delivery. // *ACS Nano* –2013.– Vol.7. P.4194–4201.
3. Engkagul, V.; Klaharn, I.Y.; Sereemasapun, A.; Chirachanchai, S. Chitosan whisker grafted with oligo (lactic acid) nanoparticles via a green synthesis pathway: Potential as a transdermal drug delivery system. // *Nanomedicine* –2017.–, Vol.13. P. 2523–2531
4. Almalik, A.; Benabdelkamel, H.; Masood, A.; Alanazi, I.O.; Alradwan, I.; Majrashi, M.A.; Alfadda, A.A.; Alghamdi, W.M.; Alrabiah, H.; Tirelli, N.; et al. / Hyaluronic Acid Coated Chitosan Nanoparticles Reduced the Immunogenicity of the Formed Protein Corona. // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol.7. P.10542–10551
5. Rajitha, P.; Gopinath, D.; Biswas, R.; Sabitha, M.; Jayakumar, R. / Chitosan nanoparticles in drug therapy of infectious and inflammatory diseases. // *Expert Opin. Drug Deliv* – 2016. – Vol.13. P.1177–1194.
6. Morgan, C.E.; Wasserman, M.A.; Kibbe, M.R. / Targeted Nanotherapies for the Treatment of Surgical Diseases. // *Ann. Surg.* – 2016. – Vol.263. P.900–907
7. Yang, Y.; Zhu, H.; Wang, J.; Fang, Q.; Peng, Z. Enzymatically Disulfide Crosslinked Chitosan/Hyaluronic Acid Layer-by-Layer Self-Assembled Microcapsules for Redox-Responsive Controlled Release of Protein. // *ACS Appl. Mater. Interfaces* – 2018. –, Vol.10. P.33493–33506
8. Pelgrift, R.Y.; Friedman, A.J. // Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2013. –, Vol.65. P.1803–1815
9. Vasquez Marcano, R.; Tominaga, T.T.; Khalil, N.M.; Pedroso, L.S.; Mainardes, R.M. // Chitosan functionalized poly (epsilon-caprolactone)

nanoparticles for amphotericin B delivery. *Carbohydr. Polym.* – 2018. – Vol.202. P.345–354.

10. Bhavsar, C.; Momin, M.; Gharat, S.; Omri, A. Functionalized and graft copolymers of chitosan and its pharmaceutical applications. // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2018. – Vol.14. P.1189–1204

11. Wang, Z.; Luo, T.; Cao, A.; Sun, J.; Jia, L.; Sheng, R. Morphology-Variable Aggregates Prepared from Cholesterol-Containing Amphiphilic Glycopolymers: Their Protein Recognition/Adsorption and Drug Delivery Applications. // *Nanomaterials* – 2018. – Vol.8. P.136

12. Sohail, M.F.; Hussain, S.Z.; Saeed, H.; Javed, I.; Sarwar, H.S.; Nadhman, A.; Huma, Z.E.; Rehman, M.; Jahan, S.; Hussain, I.; et al. Polymeric nanocapsules embedded with ultra-small silver nanoclusters for synergistic pharmacology and improved oral delivery of Docetaxel. // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol.8. P.13304–13314.

13. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications // *Prog. Polym. Sci.* – 2006. – Vol. 31.– P. 603 – 632.

14. Madihally S.V., Matthew H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering // *Biomaterials* – .1999. – Vol. 20. – P. 1133 – 1142.

15. Aranaz I, Harris R, Heras A. Chitosan amphiphilic derivatives // *Chemistry and applications. Curr Org Chem.* – 2010 - vol.14. P.308–30.

16. Liu X, Ma L, Mao Z, Gao C. Chitosan-based biomaterials for tissue repair and regeneration. *Chitosan for biomaterials II*. In: Jayakumar R, Prabakaran M, Muzzarelli RAA, editors. // *Advances in polymer science*. Heidelberg: Springer Berlin. – 2011. – P .81 –127.

17. Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films // *Biomaterials* – 2000. – Vol. 22. – P. 261–268.

18. Arand A.G, Sawaya R. Intraoperative chemical hemostasis in neurosurgery // *Neurosurg.* – 1986. – Vol. 18. – P.223.

19. Jefferson Muniz de Lima, Ronaldo Rodrigues Sarmiento, Joelma Rodrigues de Souza, et al. Evaluation of Hemagglutination Activity of Chitosan

Nanoparticles Using Human Erythrocytes, // BioMed Research International – 2015.

20. Fan W., Yan W., Xu Z., Ni H. / Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system // Colloids Surf B Biointerfaces. – 2012. – Vol.95. – P.258 – 65

21. Shen E.C., Chou T.C., Gau C.H., Tu H.P., Chen Y.T., Fu E. / Releasing growth factors from activated human platelets after chitosan stimulation: a possible biomaterial for platelet-rich plasma preparation. // Clin Oral Impl Res. – 2006. – Vol.17. – P.572–578.

22. Wu CC, Ko FN, Hung TF, Teng CM. / Mechanism sregulated platelet spreading after initial platelet contact with collagen. // Biochem Biophys Res Com. –1996. – Vol.220. – P.388 – 393.

23. Megan SL, Bill C, Simon J. McCarthy, MoonSun J, John MW. / The modulation of platelet adhesion and activation by chitosan through plasma and extracellular matrix proteins. // Biomaterials. – 2011. – Vol.32 – P.6655 – 6662.

24. Ueno H, Yamada H, Tanaka I, et al. / Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. // Biomaterials. –1999. – P.1407–1414.

25. Kojima K, Okamoto Y, Kojima K, et al. Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. // J Vet Med Sci. – 2004. – Vol.66 – P.1595–1598. [PubMed: 15644615].

26. Nascimento EG, Sampaio TB, Medeiros AC, et al. Evaluation of chitosan gel with 1% silver sulfadiazine as an alternative for burn wound treatment in rats. // Acta Cir Bras. – 2009. – Vol.24(6). – P.460–465. [PubMed: 20011831]

27. Alsarra IA. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. // Int J Biol Macromol. – 2009. – P.16–21. [PubMed: 19447254]

28. Azad AK, Sermsintham N, Chandkrachang S, et al. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application. // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. – 2004. – P.216–222. [PubMed: 15116411]

29. Okamoto Y, Shibasaki K, Minami S, et al. / Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. // *J Vet Med Sci.* – 1995. – Vol.57(5) – P.851–854. [PubMed: 8593291]
30. Burkatovskaya M, Castano AP, Demidova-Rice TN, et al. /Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice. // *Wound Repair Regen.* – 2008. – Vol. 16(3) – P.425–431. [PubMed: 18471261]
31. Qin Y, Wang HW, Karuppanapandian T, et al. Chitosan green tea polyphenol complex as a released control compound for wound healing. // *Chin J Traumatol.* – 2010. – Vol.13(2) – P.91–95. [PubMed:20356444]
32. Lauto A, Stoodley M, Marcel H, et al. In vitro and in vivo tissue repair with laser-activated chitosan adhesive. // *Lasers Surg Med.* – 2007. – Vol.39 – P.19–27. [PubMed: 17066480]
33. Jin Y, Ling PX, He YL, et al. Effects of chitosan and heparin on early extension of burns. // *Burns.* – 2007. – P.1027–1031. [PubMed: 17614208]
34. Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. // *Wound Repair Regen.* – 2009. – P.817–824. [PubMed: 19903303]
35. Boucard N, Viton C, Agay D, et al. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. // *Biomaterials.* – 2007. – Vol.28(24). – P.3478–3488. [PubMed: 17482258]
36. Valentine R, Athanasiadis T, Moratti S, et al. The efficacy of a novel chitosan gel on hemostasis and wound healing after endoscopic sinus surgery. // *Am J Rhinol Allergy.* – 2010. – Vol.24(1) – P.70–75.
37. Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. // *Food Hydrocolloids,* – 2010. – Vol.25 – P.170 – 179.
38. Xia, W. S. Physiological activities of chitosan and its application in functional foods. // *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,* – 2003. – Vol.3 – P.77-81.

39. Caner, C. / The effect of edible eggshell coatings on egg quality and consumer perception. // *Journal of the Science of Food and Agriculture*, –2005. – Vol.85 – P.1897-1902.
40. Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, P. K. / Physicochemical and bioactivity of crosslinked chitosan-PVA film for food packaging applications. // *International Journal of Biological Macromolecules* – 2009. – Vol.45 – P.372-376.
41. Lekjing, S. / A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. // *Meat Science*, –2016. – Vol.111 – P.192–197.
42. Yuan, G., Lv, H., Tang, W., Zhang, X., & Sun, H. / Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage // *Food Control*, – 2016. – Vol.59 – P.818-823.
43. Severino, R., Ferrari, G., Vu, K. D., Donsi, F., Salmieri, S., & Lacroix, M. / Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on green beans. // *Food Control*, – 2015. – Vol.50 – P.215–222.
44. Fernandez-Pan, I., Mate, J. I., Gardrat, C., & Coma, V. / Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. // *Food Hydrocolloids* – 2015. – Vol.51 – P.60-68.
45. Ali, A., Noh, N. M., & Mustafa, M. A. /Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. // *Food Packaging and Shelf Life*, – 2015. – Vol.3 – P.56-61.
46. Yang, H., Zheng, J., Huang, C., Zhao, X., Chen, H., & Sun, Z. / Effects of combined aqueous chlorine dioxide and chitosan coatings on microbial growth and quality maintenance of fresh-cut bamboo shoots (*phyllostachys praecox* f. *prevernalis*.) during storage. // *Food and Bioprocess Technology*, – 2015. – Vol.8 – P.1011–1019

47. Dehnad, D., Emamjomee, Z., Mirzaei, H.A., and Jafari, S.M, Dadashi, S. Optimisation of physical and mechanical properties for chitosan-nanocellulose biocomposites. // *Carbohydrate Polymers*, – 2014b. – Vol.105 – P.222-228.
48. Ziani, K., Fernandez-Pan, I., Royo, M., & Mate, J. I. Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. // *Food Hydrocolloids* – 2009. – Vol.23 – P.2309-2314.
49. Tsai, G.-J., Wu, Z.-Y., & Su, W.H. / Antibacterial activity of a chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. // *Journal of Food Protection*, – 2000. – Vol.63 – P.747-752.
50. Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. / Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. // *Chemical Reviews*, – 2004. – Vol.104 – P.6017–6084.
51. Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., & Du, Y. / Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. // *Carbohydrate Polymers*, – 2006. – Vol.63– P.367-374.
52. Liu, H., Du, Y., Yang, J., & Zhu, H. / Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan/betain derivative complex. // *Carbohydrate Polymers*, – 2004. – Vol.55 – P.291–297.
53. No, H. K., Lee, S. H., Park, N. Y., & Meyers, S. P. / Comparison of physicochemical, binding, and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process. // *Journal of Agricultural Food Chemistry*, -- 2003. – Vol.51– P.7659–7663.
54. Chien, R.-C., Yen, M.-T., & Mau, J.L. / Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. // *Carbohydrate Polymers*. –2015.  
doi:10.1016/j.carbpol.2015.11.061.
55. Li, Z., Yang, F., Yang, R. / Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dualantibacterial functional groups. // *International Journal of Biological Macromolecules*, – 2015. – Vol.75 – P.378–387

56. Xing, K., Chen, X. G., Kong, M., Liu, C. S., Cha, D. S., & Park, H. J. / Effect of oleoylchitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. // *Carbohydrate Polymers*, – 2009. – Vol.76 – P.17–22.
57. Yuan, G., Lv, H., Tang, W., Zhang, X., & Sun, H. / Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. // *Food Control*, – 2016. – Vol.59 – P.818–823.
58. Chen, S., Wu, G., & Zeng, H. / Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan- Ag<sup>+</sup> complex. // *Carbohydrate Polymers*, –2005. – Vol.60 – P.33–38.
59. Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. / Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. // *Food Microbiology*, – 2004. – Vol.21– P.703–714.
60. El-tahlawy, K. F., El-bendary, M. A., Elhendawy, A. G., & Hudson, S. M. The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan. // *Carbohydrate Polymers*, – 2005. –Vol.60 – P.421–430.
61. Yuan, G., Lv, H., Tang, W., Zhang, X., & Sun, H. / Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. // *Food Control*, – 2016. – Vol.59– P.818–823.
62. Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D. / Antibacterial action of chitosan. // *Food Biotechnology*, –1992. – Vol.6 – P.257–272.
63. Li, L.-H., Deng, J.-C., Deng, H.-R., Liu, Z.-L., & Li, X.-L / Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films. // *Chemical Engineering Journal*, – 2010. – Vol.160 – P.378–382.
64. Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. / Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. // *International Journal of Food Microbiology*, – 2001. – Vol.71 – P.235–244
65. Knorr, D. Use of chitinous polymers in food- A challenge for food research and development. // *Food Technolgy*, –1984. – Vol.38 – P.85–97.



66. Muzzarelli, R. A. A. Chitosan-based dietary foods. // Carbohydrate Polymers, – 1996. – Vol.29 – P.309–316.

67. Wicken, A. J., & Knox, K. W. / Cell surface amphiphiles of gram-positive bacteria. // Toxicon, – 1983. – Vol.3 – P.501–512.

68. Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. / Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. // International Journal of Food Microbiology, – 2014. – Vol.185– P.57–63.

69. Holappa, J., Hjalmarsdottir, M., Masson, M., Runarsson, O., Asplund, T., Soininen, P., et al. / Antimicrobial activity of chitosan N-betainates. // Carbohydrate Polymers, –2006. – Vol.65- P.114–118.

70. Yang, T.-C., Chou, C.C., & Li, C.-F. / Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. // International Journal of Food Microbiology, – 2005. – Vol.97 – P.237–245.

71. Guzey, D., & McClements, D. J. Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. // Food Hydrocolloids, –2006. – Vol.20 – P.124–131.

72. Kulikov, S. N., Tikhonov, V. E., Bezrodnykh, E. A., Lopatin, S. A., Varlamov, & V. P. / Comparative evaluation of antimicrobial activity of oligochitosans against *Klebsiella pneumoniae*. // Russian Journal of Bioorganic Chemistry, –2015. – Vol.41 – P.57–62.

73. Roller, S., & Covill, N. / The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple Juice. // International Journal of Food Microbiology, – 1999. – Vol.47 – P.67–77.

74. Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J. M., & Ocio, M. J. / Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. // Food Hydrocolloids, – 2009. – Vol.23– P.913–921.

75. Kulikov, S. N., Lisovskaya, S. A., Zelenikhin, P.V., Bezrodnykh, E. A., Shakirova, D.R., Blagodatskikh, I.V., & Tikhonov, V. E. / Antifungal activity of

oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: Molecular weight-activity relationship. // *European Journal of Medicinal Chemistry*, – 2014. – Vol.74 – P.169–178.

76. Tokura, S., Ueno, K., Miyazaki, S., & Nishi, N. / Molecular weight dependent antimicrobial activity of chitosan. // *Macromolecular Symposia*, –1997. – Vol.120 –P.1–9

77. Kong, M., Chen, X. G., Liu, C. S., Liu, C. G., Meng, X. H., & Yu, L. J. / Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E.coli*. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, – 2008. – Vol.65 – P.197–202.

78. Leuba, J. L., & Stossel, P. / Chitosan and other polyamines: antifungal activity and interaction with biological membranes. In R. A. A. Muzarelli, C. Jeuniaux & G. W. Graham (Eds.), // *Chitin in Nature and Technology*. –1986. – P. 215–222

79. No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., & Meyers, S. P. / Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. // *International Journal of Food Microbiology*, – 2002. – Vol.74 – P.65 –72.

80. Lim, S.-H., & Hudson, S. M. / Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. // *Carbohydrate Research*, – 2004. – Vol.339 – P.313 –319.

81. Tauken, P., Canesap, H., & IOen, M. / The effect of degree of deacetylation on the radiation induced degradation of chitosan. // *Radiation Physics and Chemistry*, -2014.- Vol.94- P.236-239.

82. Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazia, M., Alagui, A. / Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. // *Polymer*, – 2003. – Vol.44 – P.7939 –7952.

83. Park, P.-J., Je, J.-Y., Byun, H.-G., Moon, S.-H., & Kim, S.-K. / Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. // *Journal of microbiology and biotechnology*, – 2005. – Vol.14 – P.317-323.

84. Hongpattarakere, T., & Riyaphan, O. / Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). // Songklanakarin Journal of Science and Technology, – 2008. –Vol.30 – P.1–9.

85. Takahashi, T., Imaia, M., Suzuki, I., Sawai, J. / Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. // Biochemical Engineering Journal –2008. – Vol.40 – P.485–491.

86. Sukmark, T., Rachtanapun, P., Rachtanapun, C. / Antimicrobial activity of oligomer and polymer chitosan from different sources against foodborne pathogenic bacteria. // Kasetsart Journal: Natural Science, – 2011. –Vol.45 – P.636 – 643.

87. Palacio J, Agudelo NA, Lopez BL. /PEGylation of PLA nanoparticles to improve mucus-penetration and colloidal stability for oral delivery systems. // Curr Opin Chem Eng. – 2016. P.11.

88. Sailaja A.K., Amareshwar P., Chakravarty P. / Chitosan nanoparticles as a drug delivery system.// Res J Pharm Biol Chem Sci. – 2010. P.84.

89. Schipper N.G., Olsson S., Hoogstraate J.A., deBoer A.G., Varum K.M., Artursson P. / Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. // Pharm Res. – 1997. P. 14.

90. Barbieri S., Buttini F., Rossi A., Bettini R., Colombo P., Ponchel G. et al. /Ex vivo permeation of tamoxifen and its 4-OH metabolite through rat intestine from lecithin/chitosan nanoparticles. // Int J Pharm. – 2015. P. 491(1-2).

91. Gao P., Xia G., Bao Z., Feng C., Cheng X., Kong M. et al. / Chitosan based nanoparticles as protein carriers for efficient oral antigen delivery. // Int J Biol Macromol. – 2016 P.91.

92. Ruge C.A., Kirch J., Lehr C.M. / Pulmonary drug delivery: from generating aerosols to overcoming biological barriers-therapeutic possibilities and technological challenges. // Lancet Respir Med. – 2013. P.1(5).

93. Islam N., Ferro V. / Recent advances in chitosan-based nanoparticulate pulmonary drug delivery. // Nanoscale. - 2016. P. 8(30).

94. Rawal T., Parmar R., Tyagi R.K., Butani S. /Rifampicin loaded chitosan nanoparticle dry powder presents an improved therapeutic approach for alveolar tuberculosis. // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2017. P.154.
95. Jafarinejad S., Gilani K., Moazeni E., Ghazi-Khansari M., Najafabadi A.R., Mohajel N. / Development of chitosan-based nanoparticles for pulmonary delivery of itraconazole as dry powder formulation. // *Powder Technol.* – 2012. P. 222.
96. Wang J., Tauchi Y., Deguchi Y., Morimoto K., Tabata Y., Ikada Y. / Positively charged gelatin microspheres as gastric mucoadhesive drug delivery system for eradication of H pylori. // *Drug Deliv.* – 2000. - P. 237.
97. Deacon M.P., McGurk S., Roberts C.J., Williams P.M., Tendler S.J., Davies MC. et al. / Atomic force microscopy of gastric mucin and chitosan mucoadhesive systems. // *Biochem.* – 2000. - P. 348.
98. Dodane V., Amin Khan M., Merwin J.R. / Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. // *Int J Pharm.* -1999. - P. 182.
99. Fang N, Chan V, Mao H.Q., Leong K.W. / Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. // *Biomacromolecules*. – 2001. P. 2(4).
100. Thanou M, Verhoef J.C., Verheijden J.H., Junginger H.E. / Intestinal absorption of octreotide using trimethyl chitosan chloride: studies in pigs. // *Pharm Res.* – 2001. - P.18(6).
101. Martirosyan A., Olesen MJ, Howard KA. /Chitosan-based nanoparticles for mucosal delivery of RNAi therapeutics. // *Adv Genet.* – 2014. - P.88.
102. Dominietto M., Tsinoremas N., Capobianco E. / Integrative analysis of cancer imaging readouts by networks. // *Mol Oncol.* – 2015. P. 9(1):1–16.
103. Esfandiarpour-Boroujeni S., Bagheri-Khoulenjani S., Mirzadeh H., Amanpour S. / Fabrication and study of curcumin loaded nanoparticles based on folate-chitosan for breast cancer therapy application. // *Carbohydr Polym.* – 2017. – P.168:14–21.

104. Nascimento A.V., Singh A., Bousbaa H., Ferreira D., Sarmiento B., Amiji M.M. / Overcoming cisplatin resistance in non-small cell lung cancer with Mad2 silencing siRNA delivered systemically using EGFR-targeted chitosan nanoparticles. // *Acta Biomater.* – 2017. P. 47:71–80.

105. Tiyafoonchai W. / Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. // *Naresuan University Journal* – 2003. - 11(3). P.51–66.

106. Foltmann, H.; Quadir, A. / Polyvinylpyrrolidone (PVP) - One of the most widely used excipients in pharmaceuticals: An overview. *Drug Deliv.// Technol.* -2008. P. 22–27.

107. Bothiraja, C.; Shinde, M.B.; Rajalakshmi, S.; Pawar, A.P. / Evaluation of molecular pharmaceutical and in –Vivo properties of spray - Dried isolated andrographolide - PVP. *J. Pharm. // Pharmacol.* – 2009. P.1465–1472.

108. Martins, R.M.; Pereira, S.V.; Siqueira, S.; Salomão, W.F. / Freitas, L.A.P. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. // *Food Res. Int.* – 2013. P. 657–663.

109. Rasekh M.; Karavasili C.; Soong, Y.L.; Bouropoulos, N. Morris, M. Armitage, Fatouros D.G.; Ahmad, Z. /Electrospun PVP–indomethacin constituents for transdermal dressings and drug delivery devices. // *Int. J. Pharm.* – 2014. P. 95–104.

110. Fogaça R.; Catalani L.H. / PVP hydrogel membranes produced by electrospinning for protein release devices. // *Soft Mater.* – 2013. P. 61–68.

111. Del Consuelo I.D.; Falson F.; Guy R.H.; Jacques Y. / Ex vivo evaluation of bioadhesive films for buccal delivery of fentanyl. // *J. Control. Release.* – 2007. P.135–140.

112. Robinson B.; Sullivan F.; Borzelleca J.; Schwartz, S. / PVP: A Critical Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinylpyrrolidone (Povidone) // Lewis Publisher: Chelsea, MI, USA. - 1990.

113. Zheng X.; Zhang T.; Song X.; Zhang L.; Zhang C.; Jin S.; Xing J.; Liang X.-J. / Structural impact of graft

and block copolymers based on poly (N-vinylpyrrolidone) and poly (2-dimethylaminoethyl methacrylate) in gene delivery. // *J. Mater. Chem.* – 2015. P. 4027–4035.

114. Zhang L.; Liang Y.; Meng L.; Wang C. / Characterization of complexation of PVP copolymer with DNA. // *Polym. Adv. Technol.* – 2009. P. 410–415.

115. Song Y.; Zhang T.; Song X.; Zhang L.; Zhang C.; Xing J.; Liang X.-J. / Polycations with excellent gene transfection ability based on PVP-g-PDMAEMA with random coil and micelle structures as non-viral gene vectors. // *J. Mater. Chem.* – 2015. P. 911–918.

116. Saxena A.; Mozumdar S.; Johri A.K. / Ultra-low sized cross-linked polyvinylpyrrolidone nanoparticles as non-viral vectors for in vivo gene delivery. // *Biomaterials.* -2006. P. 5596–5602.

117. Sheu S.-J.; Chou L.-C.; Bee Y.-S.; Chen J.-F.; Lin H.-C.; Lin P.-R.; Lam H.-C.; Tai M.-H. / Suppression of choroidal neovascularization by intramuscular polymer-based gene delivery of vasostatin. // *Exp. Eye Res.* – 2005. P. 673–679.

118. Hu M.; Li C.; Li X.; Zhou M.; Sun J.; Sheng F.; Shi S.; Lu L. / Zinc oxide/silver bimetallic nanoencapsulated in PVP/PCL nanofibres for improved antibacterial activity. // *Artif. CellsNanomed. Biotechnol.* -2018. P.1248–1257.

119. Hecold M.; Buczkowska R.; Mucha A.; Grzesiak J.; Rac-Rumijowska O.; Teterycz H.; Marycz K. / The effect of PEI and PVP-stabilized gold nanoparticles on equine platelets activation: Potential application in equine regenerative medicine. // *J. Nanomater.* – 2017.

120. Goetten de Lima, G.; de Lima D.W.; de Oliveira M.J.; Lugão, A.B. Alcántara, M.S.; Devine, D.M.; de Sá. / Synthesis and in vivo behaviour of PVP/CMC/Agar hydrogel membranes impregnated with

silver nanoparticles for wound healing applications. // ACS Appl. Bio Mater. – 2018. P. 1842–1852.

121. Ramalingam V.; Varunkumar K.; Ravikumar V.; Rajaram R. / Target delivery of doxorubicin tethered with PVP stabilized gold nanoparticles for effective treatment of lung cancer. // Sci. Rep. – 2018. P. 1–12.

122. Rose P.A.; Praseetha P.; Bhagat M.; Alexander P.; Abdeen S.; Chavali M. / Drug embedded PVP coated magnetic nanoparticles for targeted killing of breast cancer cells. // Technol. Cancer Res. Treat. – 2013. P. 463–472.

123. Atkins, B.L.; Bashaw, R.N.; Harper, B.G. / Absorbent product containing a hydrocelluloidal composition. // U.S. Patent 3669103 A. - 1972.

124. Haaf, F.; Sanner, A.; Straub, F. / Polymers of N-vinylpyrrolidone: synthesis, characterization and uses. // Polym. J. –1985. P. 143–152.

125. Sneader, W. / Drug Discovery. // Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd. - 2005.

126. Buhler, V. Kollidon / Polyvinylpyrrolidone Excipients for the Pharmaceutical Industry. // BASF - The Chemical Company, Ludwigshafen, Germany. – 2008.

127. Kariduraganavar M.Y.; Kittur A.A.; Kamble R.R. / Chapter 1 - Polymer synthesis and processing. / Sangamesh, K.; Cato, L.; Meng, D. eds.

128. Foltmann, B.H.; Quadir, /A. Excipients in pharmaceuticals: An overview.// Drug Deliv. Technol. – 2008, 8, 22–27.

129. Schwarz, W. PVP: A Critical Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinylpyrrolidone (Povidone), CRC Press: Boca Raton, FL, –1990.

130 Patel, H.A., Shah, S.; Shah, D.O.; Joshi, P.A. / Sustained release of venlafaxine from venlafaxine–montmorillonite–polyvinylpyrrolidone composites. // Appl. Clay Sci. – 2011, Vol.51, 126–130.

131. Verma, R. / Development and evaluation of extended release formulations of isosorbide mononitrate based on osmotic technology. // *Int. J. Pharm.* –2003. Vol.263. P.9–24.
132. Yang, M.; Xie, S.; Li, Q.; Wang, Y.; Chang, X.; Shan, L.; Sun, L.; Huang, X.; Gao, C. / Effects of polyvinylpyrrolidone both as a binder and pore-former on the release of sparingly water-soluble topiramate from ethylcellulose coated pellets.// *Int. J. Pharm.* –2014. Vol.465. P.187–196.
133. Jain, P.; Banga, A.K. / Inhibition of crystallization in drug-in-adhesivetype transdermal patches. // *Int. J. Pharm.* –2010. Vol.394, P.68–74.
134. Banerjee, S.; Chattopadhyay, P.; Ghosh, A.; Datta, P.; Veer, V. / Aspect of adhesives in transdermal drug delivery systems. // *Int. J. Adhes. Adhes.* – 2014. Vol.50. P.70–84.
135. Ohm, A. / Interaction of Bay t3839 coprecipitates with insoluble excipients. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* –2000. Vol.49. P.183–189.
136. Gong, K.; Viboonkiat, R.; Rehman, I.U.; Buckton, G.; Darr, J.A. / Formation and characterization of porous indomethacin-PVP coprecipitates prepared using solvent-free supercritical fluid processing. // *J. Pharm. Sci.* –2005. Vol.94. P.2583–2590.
137. Raghavan, S.; Trividic, A.; Davis, A.; Hadgraft, J. /Crystallization of hydrocortisone acetate: influence of polymers. // *Int. J. Pharm.* –2001, Vol.212. P.213–221
138. Diaz del Consuelo, I.; Falson, F.; Guy, R.H.; Jacques, Y. /Ex vivo evaluation of bioadhesive films for buccal delivery of fentanyl. // *J. Contr. Rel.* –2007, Vol.122, P.135–140
139. Wang, M.; Fang, D.; Wang, N.; Jiang, S.; Nie, J.; Yu, Q.; Ma, G. / Preparation of PVDF/PVP core–shell nanofibers mats via homogeneous electrospinning. // *Polymer (Guildf)* –2014. Vol.55(9). P.2188–2196.



140. Dai, X.-Y.; Nie, W.; Wang, Y.-C.; Shen, Y.; Li, Y.; Gan, S.-J. / Electrospun emodin polyvinylpyrrolidone blended nanofibrous membrane: a novel medicated biomaterial for drug delivery and accelerated wound healing. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* –2012, Vol.23. P.2709–2716.
141. Wang, B.-L.; Liu, X.-S.; Ji, Y.; Ren, K.-F.; Ji, J. / Fast and long-acting antibacterial properties of chitosan-Ag/polyvinylpyrrolidone nanocomposite films. // *Carbohydr. Polym.* –2012. Vol.90, P.8–15.
142. Liu, C.; Nan, J.; Zuo, X.; Xiao, X.; Shu, D. / Synthesis and electrochemical characteristics of an orthorhombic LiMnO<sub>2</sub> cathode material modified with poly(vinyl-pyrrolidone) for lithium ion batteries. // *Int. J. Electrochem. Sci.* –2012. Vol.7 (8). P.7152–7164.
143. Meng, F.; Hennink, W.E.; Zhong, Z. / Reduction-sensitive polymers and bioconjugates for biomedical applications. // *Biomaterials* –2009. Vol.30. P.2180–2198.
144. Savjani, K.T.; Gajjar, A.K.; Savjani, J.K. / Drug solubility: Importance and enhancement techniques. // *ISRN Pharm* –2012. Vol.2012.
145. Bothiraja, C.; Shinde, M.B.; Rajalakshmi, S.; Pawar, A.P. / Evaluation of molecular pharmaceutical and in—Vivo properties of spray—Dried isolated andrographolide—PVP. // *J. Pharm. Pharmacol.* –2009. Vol.61. P.1465–1472.
146. Dowding, P.J.; Atkin, R.; Vincent, B.; Bouillot, P. Oil core/polymer shell microcapsules by internal phase separation from emulsion droplets. II: Controlling the release profile of active molecules. // *Langmuir* –2005. Vol.21. P.5278–5284.
147. Paradkar, A.; Ambike, A.A.; Jadhav, B.K.; Mahadik, K. / Characterization of curcumin–PVP solid dispersion obtained by spray drying. // *Int. J. Pharm.* –2004. Vol.271. P.281–286.
148. Thybo, P.; Pedersen, B.L.; Hovgaard, L.; Holm, R.; Müllertz, A. / Characterization and physical stability of spray dried solid dispersions of probucol and PVP-K30. // *Pharm. Dev. Technol.* –2008. Vol.13. P.375–386.

149. Gun, W.J.; Routh, A.F. / Formation and characterization of pH-responsive liquid core microcapsules. // *Langmuir* –2013. Vol.29. P.12541–12548.
150. Chhouk, K.; Kanda, H.; Kawasaki, S.-I.; Goto, M. / Micronization of curcumin with biodegradable polymer by supercritical anti-solvent using micro swirl mixer. // *Front. Chem. Sci. Eng.* –2018. Vol.12. P.184–193.
151. Prosapio, V.; Reverchon, E.; De Marco, I. / Incorporation of liposoluble vitamins within PVP microparticles using supercritical antisolvent precipitation. // *J. CO2 Util.* –2017. Vol.19. P.230–237.
152. Ha, E.-S.; Kim, J.-S.; Baek, I.-H.; Hwang, S.-J.; Kim, M.-S. / Enhancement of dissolution and bioavailability of ezetimibe by amorphous solid dispersion nanoparticles fabricated using supercritical antisolvent process. // *J. Pharm. Invest.* –2015. Vol.45. P.641–649.
153. Majerik, V.; Charbit, G.; Badens, E.; Horváth, G.; Szokonya, L.; Bosc, N.; Teillaud, E. / Bioavailability enhancement of an active substance by supercritical antisolvent precipitation. // *J. Supercrit. Fluids* –2007. Vol.40. P.101–110.
154. Park, J.; Cho, W.; Cha, K.-H.; Ahn, J.; Han, K.; Hwang, S.-J. / Solubilization of the poorly water soluble drug, telmisartan, using supercritical anti-solvent (SAS) process. // *Int J Pharm.* –2013. Vol.441(1-2) P.50-5.
155. Prosapio, V.; De Marco, I.; Reverchon, E. / PVP/corticosteroid microspheres produced by supercritical antisolvent coprecipitation. // *Chem. Eng. J.* –2016. Vol.292. P.264–275.
156. Adami, R.; Di Capua, A.; Reverchon, E. / Supercritical Assisted Atomization for the production of curcumin-biopolymer microspheres. // *Powder Technol.* –2017. Vol.305. P.455–461.
157. Di Capua, A.; Adami, R.; Reverchon, E. / Production of luteolin/biopolymer microspheres by supercritical assisted atomization. // *Ind. Eng. Chem. Res.* –2017. Vol.56. P.4334–4340.

158. Di Capua, A.; Bejarano, A.; Adami, R.; Reverchon, E. / Preparation and characterization of Chilean propolis coprecipitates using Supercritical Assisted Atomization. // *Chem. Eng. Res. Des.* –2018. Vol.136. P. 776–785.
159. Di Capua, A.; Adami, R.; Cosenza, E.; Jalaber, V.; Crampon, C.; Badens, E.; Reverchon, E. / Carotene/PVP microspheres produced by Supercritical Assisted Atomization. // *Powder Technol.* –2019. Vol.346. P.228–236.
160. Uzun, I.N.; Sipahigil, O.; Dinçer, S. / Coprecipitation of Cefuroxime Axetil–PVP composite microparticles by batch supercritical antisolvent process. *J. Supercrit. Fluids* –2011. Vol.55. P.1059–1069.
161. Prosapio, V.; Reverchon, E.; De Marco, I. / Formation of PVP/nimesulide microspheres by supercritical antisolvent coprecipitation. // *J. Supercrit. Fluids* –2016. Vol.118. P.19–26.
162. Prosapio, V.; De Marco, I.; Scognamiglio, M.; Reverchon, E. / Folic acid–PVP nanostructured composite microparticles by supercritical antisolvent precipitation. // *Chem. Eng. J.* –2015. Vol.277. P.286–294.
163. Prosapio, V.; Reverchon, E.; De Marco, I. / Coprecipitation of polyvinylpyrrolidone/\_-carotene by supercritical antisolvent processing. // *Ind. Eng. Chem. Res.* –2015. Vol.54. P.11568–11575.
164. Matos, R.L.; Lu, T.; Prosapio, V.; McConville, C.; Leeke, G.; Ingram, A. / Coprecipitation of curcumin/PVP with enhanced dissolution properties by the supercritical antisolvent process. // *J. CO2 Util.* –2019. Vol.30. P.48–62.
165. Franco, P.; Reverchon, E.; De Marco, I. / PVP/ketoprofen coprecipitation using supercritical antisolvent process.// *Powder Technol.* –2018. Vol.340. P.1–7.
166. Ozkan, G.; Franco, P.; Capanoglu, E.; De Marco, I. / PVP/flavonoid coprecipitation by supercritical antisolvent process. // *Chem. Eng. Process.* –2019. Vol.146, P.107689.
167. Rose, P.A.; Praseetha, P.; Bhagat, M.; Alexander, P.; Abdeen, S.; Chavali, M. / Drug embedded PVP coated magnetic nanoparticles for targeted

killing of breast cancer cells. // Technol. Cancer Res. Treat. –2013. Vol.12. P.463–472.

168. Nkansah, P.; Antipas, A.; Lu, Y.; Varma, M.; Rotter, C.; Rago, B.; El-Kattan, A.; Taylor, G.; Rubio, M.; Litchfield, J. / Development and evaluation of novel solid nanodispersion system for oral delivery of poorly water-soluble drugs. // J. Control. Release –2013. Vol.169. P.150–161

169. Ramalingam, V.; Varunkumar, K.; Ravikumar, V.; Rajaram, R. / Target delivery of doxorubicin tethered with PVP stabilized gold nanoparticles for effective treatment of lung cancer. // Sci. Rep. –2018. Vol.8. P.1–12.

170. Qin, X.; Guo, Z.; Liu, Z.; Zhang, W.; Wan, M.; Yang, B. / Folic acid-conjugated graphene oxide for cancer targeted chemo-photothermal therapy. // J. Photochem. Photobiol. –2013. Vol.120, P.156–162.

171. Xu, H.; Hou, Z.; Zhang, H.; Kong, H.; Li, X.; Wang, H.; Xie, W. / Trojan delivery of tetrandrine by poly (N-vinylpyrrolidone)-block-poly (ε-caprolactone) (PVP-b-PCL) nanoparticles shows enhanced apoptotic induction of lung cancer cells and inhibition of its migration and invasion. // Int. J.Nanomedicine. – 2014. Vol.9 P.231-42

172. Paudel, A.; Loyson, Y.; Van den Mooter, G. / An investigation into the effect of spray drying temperature and atomizing conditions on miscibility, physical stability, and performance of naproxen–PVP K 25 solid dispersions. // J. Pharm. Sci. – 2013. P. 1249–1267.

173. Paudel, A.; Van den Mooter, G. / Influence of solvent composition on the miscibility and physical stability of naproxen/PVP K 25 solid dispersions prepared by cosolvent spray-drying. // Pharm. Res. – 2012. P. 251–270.

174. Cavallari, C.; Luppi, B.; Di Pietra, A.M.; Rodriguez, L.; Fini, A. / Enhanced release of indomethacin from PVP/stearic acid microcapsules prepared coupling co-freeze-drying and ultrasound assisted spray-congealing process. // Pharm. Res. – 2007. P. 521–529.

175. Quan, J.; Yu, Y.; Branford-White, C.; Williams, G.R.; Yu, D.-G., Nie, W., Zhu, L.-M. / Preparation of ultrafine fast-dissolving feruloyl-oleyl-glycerol-loaded polyvinylpyrrolidone fiber mats via electrospinning. // *Colloids Surf. B.* – 2011. P. 304–309.
176. Suwantong, O.; Pankongadisak, P.; Deachathai, S.; Supaphol, P. / Electrospun poly (L-lactic acid) fiber mats containing crude *Garcinia mangostana* extracts for use as wound dressings. // *Polym. Bull.* – 2014. P. 925–949.
177. Shen, X.; Yu, D.; Zhu, L.; Branford-White, C.; White, K.; Chatterton, N.P. / Electrospun diclofenac sodium loaded Eudragit®L 100-55 nanofibers for colon-targeted drug delivery. // *Int. J. Pharm.* – 2011. P. 200–207.
178. Yoshimoto, H.; Shin, Y.; Terai, H.; Vacanti, J. / A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. // *Biomaterials.* – 2003. P. 2077–2082.
179. Theron, S.; Zussman, E.; Yarin, A. / Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. // *Polymer.* – 2004. P. 2017–2030.
180. Chen, Y.Z.; Peng, P.; Guo, Z.X.; Yu, J.; Zhan, M.S. Effect of hyperbranched poly (ester amine) additive on electrospinning of low concentration poly (methylmethacrylate) solutions. // *J. Appl. Pol. Sci.* – 2010. P. 3687–3696.
181. Wang, L.; Chang, M.-W.; Ahmad, Z.; Zheng, H.; Li, J.-S. / Mass and controlled fabrication of aligned PVP fibers for matrix type antibiotic drug delivery systems. *Chem. Eng. J.* 2017, 307, 661–669.
182. Jiang, Y.-N.; Mo, H.-Y.; Yu, D.-G. / Electrospun drug-loaded core-sheath PVP/zein nanofibers for biphasic drug release. // *Int. J. Pharm.* – 2012. P. 232–239.
183. Saheb, D.N.; Jog, J.P. / Natural fiber polymer composites: A review. *Adv. Polyme. // Technol.* – 1999. P. 351–363.

184. Homan, A.S. / Hydrogels for biomedical applications. // *Adv. Drug Del. Rev.* – 2012. P. 18–23.
186. Ghasemiyeh, P.; Mohammadi-Samani, S. / Hydrogels as Drug Delivery Systems. // *Pros and Cons. Trends Pharm.Sci.* – 2019. P. 7–24.
187. Rosiak, J.M.; Yoshii, F. / Hydrogels and their medical applications.// *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B* –1999. Vol.151 P.56–64.
188. Peppas, N. / Devices based on intelligent biopolymers for oral protein delivery. // *Int. J. Pharm.* –2004. Vol.277. P.11–17.
189. Mozalewska, W.; Czechowska-Biskup, R.; Olejnik, A.K.; Wach, R.A.; Ulański, P.; Rosiak, J.M./ Chitosan-containing hydrogel wound dressings prepared by radiation technique.// *Radiat. Phys. Chem.* –2017. Vol.134. P.1–7.
190. Szafulewa, K.; Wach, R.A.; Olejnik, A.K.; Rosiak, J.M.; Ulański, P. /Radiation synthesis of biocompatible hydrogels of dextran methacrylate. // *Radiat. Phys. Chem.* –2018. Vol.142 P.115–120
191. Rosiak, J.; Rucinska-Rybus, A.; Pekala, W./ Method of Manufacturing Hydrogel Dressings. N-4,871,490, –1989.
192. Fogaça, R.; Catalani, L.H. / PVP hydrogel membranes produced by electrospinning for protein release devices. // *Soft Mater.* –2013, Vol.11, P.61–68
193. Franco P, De Marco I. / The Use of Poly(*N*-vinyl pyrrolidone) in the Delivery of Drugs: A Review. // *Polymers (Basel)*. –2020. Vol.12(5) P.1114
194. Banting, F.G. et al. / Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. // *Can. Med. Assoc. J.* –1922. Vol.12, P.141–146
195. White, C.J. and Yudin, A.K. /Contemporary strategies for peptide macrocyclization. // *Nat. Chem.* –2011. Vol.3. P.509–524
196. Craik, D.J. et al. / The future of peptide-based drugs. // *Chem. Biol. Drug Des.* –2013 Vol.81. P.136–147
197. Sachdeva, S. / Peptides as ‘drugs’: the journey so far. // *Int. J. Pept. Res. Ther.* – 2016 P.1–12
198. Otvos, L., Jr and Wade, J.D. / Current challenges in peptide-based drug discovery. // *Front. Chem.* –2014. Vol.2, P.62

199. Bock, J.E. et al. / Getting in shape: controlling peptide bioactivity and bioavailability using conformational constraints. // ACS Chem. Biol. –2013 Vol.8. P.488–499
200. Anthony, L. and Freda, P.U. / From somatostatin to octreotide LAR: evolution of a somatostatin analogue. // Curr. Med. Res. Opin. –2013 Vol.25. P.2989–2999
201. Ovadia, O. et al. / Improvement of drug-like properties of peptides: the somatostatin paradigm. // Expert Opin. Drug Discov. –2010. Vol.5. P. 655–671
202. Ferro, E.S. et al. / Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. // J. Neurochem. 2004 Vol.91. P.769–777
203. Amiram, M. et al. / Injectable protease-operated depots of glucagon-like peptide-1 provide extended and tunable glucose control. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. –2013. Vol.110. P.2792–2797
204. Gentilucci, L. et al. / Chemical modifications designed to improve peptide stability: incorporation of non-natural amino acids, pseudo-peptide bonds, and cyclization. // Curr. Pharm. Des. – 2010 Vol.16. P.3185–3203
205. Stoop, R. et al. / New opportunities in vasopressin and oxytocin research: a perspective from the amygdala. // Annu. Rev. Neurosci. –2015. Vol.38. P.369–388
206. Ozgonenel, B. et al. / How do you treat bleeding disorders with desmopressin? // Postgrad. Med. J. –2007. Vol.83. P.159–163
207. Gonzalez-Ruiz, A. et al. / Daptomycin: an evidence-based review of its role in the treatment of Gram-positive infections. // Infect. Drug Resist. –2016. Vol.9. P.47–58
208. Kim, E.S. and Garnock-Jones, K.P. / Afamelanotide: a review in erythropoietic protoporphyria. // Am. J. Clin. Dermatol. –2016. Vol.17. P.179–185
209. Roxin, A. and Zheng, G. / Flexible or fixed: a comparative review of linear and cyclic cancer-targeting peptides. // Future Med. Chem. –2012. Vol.4. P.1601–1618

210. Furman, J.L. et al. / A genetically encoded aza-Michael acceptor for covalent cross-linking of protein-receptor complexes. // *J. Am. Chem. Soc.* –2016. Vol.136, P.8411–8417
211. Hallam, T.J. et al. / Antibody conjugates with unnatural amino acids. // *Mol. Pharm.* –2015. Vol.12. P.1848–1862
212. Gruber, C.W. et al. / Exploring bioactive peptides from natural sources for oxytocin and vasopressin drug discovery. // *Future Med. Chem.* –2012. Vol.4. P.1791–1798
213. Lonn, P. and Dowdy, S.F. / Cationic PTD/ CPP-mediated macromolecular delivery: charging into the cell. // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2015. Vol.12. P.1627–1636
214. Madsbad, S. / Exenatide and liraglutide: different approaches to develop GLP- 1 receptor agonists (incretin mimetics)-preclinical and clinical results. // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* –2009. Vol.23, P.463–477
215. Kim, D. et al. / Effects of once-weekly dosing of a long-acting release formulation of exenatide on glucose control and body weight in subjects with type 2 diabetes. // *Diabetes Care* –2007. Vol.30. P.1487–1493
216. Veuillez, F. et al. / Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* –2001. Vol.51, P.93–109
217. Morishita, M. and Peppas, N.A. / Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? // *Drug Discov. Today* –2006. Vol.11. P.905–910
- 218 Prausnitz, M.R. et al. / Current status and future potential of transdermal drug delivery. // *Nat. Rev. Drug Discov.* –2004. Vol.3, P.115–124
219. von Lueder, T.G. and Krum, H. / New medical therapies for heart failure. // *Nat. Rev. Cardiol.* –2015. Vol.12. P.730–740
- 220 Mas-Moruno, C. et al. / Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. // *Anticancer Agents Med. Chem.* –2010. Vol.10. P.753–768



221. Becker, A. et al. / Metabolism and disposition of the alpha-integrin b3/b5 receptor antagonist cilengitide, a cyclic polypeptide, in humans. // *J. Clin. Pharmacol.* –2015 Vol.55. P.815–824
222. Gilbert, M.R. et al. / Cilengitide in patients with recurrent glioblastoma: the results of NABTC 03-02, a phase II trial with measures of treatment delivery. // *J. Neurooncol.* –2012. Vol.106. P.147–153
223. Khasraw, M. et al. / Cilengitide with metronomic temozolomide, procarbazine, and standard radiotherapy in patients with glioblastoma and unmethylated MGMT gene promoter in ExCentric, an open-label phase II trial. // *J. Neurooncol.* –2016. Vol.128. P.163–171
224. Zhao, K. et al. / Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. // *J. Biol. Chem.* –2004. Vol.279. P.34682–34690
225. Szeto, H.H. / Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury. // *Antioxid. Redox Signal.* –2008. Vol.10. P.601–619
226. Chen, M. et al. / Mitochondria-targeted peptide MTP-131 alleviates mitochondrial dysfunction and oxidative damage in human trabecular meshwork cells. // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* –2011. Vol.52. P.7027–7037
227. Li, J. et al. / Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 attenuates high glucose-induced injury on human retinal endothelial cells. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* –2011. Vol.404. P.349–356
228. Nir Qvit, Samuel J.S. Rubin, Travis J. Urban, Daria Mochly-Rosen and Eric R. Gross / Peptidomimetic therapeutics: scientific approaches and opportunities // *Drug Discovery Today* – 2017. Vol.22. P.454-462
229. Paiuk O, Mitina N, Slouf M, Pavlova E, Finiuk N, Kinash N, Karkhut A, Manko N, Gromovoy T, Hevus O, Shermolovich Y, Stoika R, Zaichenko A / Fluorine-containing block/branched polyamphiphiles forming bioinspired complexes with biopolymers. // *Colloids Surf B Biointerfaces.* –2019. Vol.174 P.393-400.

230. M. Lootsik, N.Manko, O. Gromyko, S. Tistechok, M. Lutsyk (jr.), R. Stoika / Honey bee chitosan-melanin complex: Isolation and investigation of its antimicrobial activity. // Ukr.Biochem.J. –2020; Vol.92. P.143-153
231. Manko N, Starykovich M, Bobak Y, Stoika R, Richter V, Koval O, Lavrik I, Horák D, Souchelnyskyi S, Kit Y. / The purification and identification of human blood serum proteins with affinity to the antitumor active RL2 lactaptin using magnetic microparticles. // Biomed Chromatogr. –2019. Vol.33 P.46-47
232. Roberto Vivas, Ana Andréa Teixeira Barbosa, Silvio Santana Dolabela, Sona Jain/ Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview // Microb Drug Resist . –2019. Vol.25(6) P.890-908.
233. Liliana Scorzoni, Ana C. A. de Paula e Silva, Caroline M. Marcos, Patrícia A. Assato, Wanessa C. M. A. de Melo, Haroldo C. de Oliveira, Caroline B. Costa-Orlandi, Maria J. S. Mendes-Giannini, and Ana M. Fusco-Almeida / Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis // Front Microbiol. –2017. Vol.8. P.36.
234. Chitosan of peppery milky cap fungi (*Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr): isolation, study of its physicochemical properties and biological activity Antonyuk V.O., Panchak L.V., Manko N.O., Stoika R.S. // Revista de chimie – 2020. Vol.71. P.230-241
235. Junka A, Bartoszewicz M, Smutnicka D, Secewicz A, Szymczyk P. / Efficacy of antiseptics containing povidone-iodine, octenidine dihydrochloride and ethacridine lactate against biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* measured with the novel biofilm-oriented antiseptics test. // Int Wound J. –2014. Vol.6. P.730-400.
236. Gupta S, Sachdeva L, Gupta R. / Ethacridine lactate -- a safe and effective drug for termination of pregnancy. // Indian J Matern Child Health. – 1993. Vol.4(2). P. 59-61.

237. Asensio-López MC, Soler F, Pascual-Figal D, Fernández-Belda F, Lax A. / Doxorubicin-induced oxidative stress: The protective effect of nicorandil on HL-1 cardiomyocytes. // PLoS One. –2017. Vol.12(2)

238. Krivit W, Anderson J, Chilcote R, Pyesmany A, Chard R, Hammond D. A study of the cross-resistance of vincristine and vindesine in reinduction therapy for acute lymphocytic leukemia in relapse. / A report for Children's Cancer Study Group. // Am J Pediatr Hematol Oncol. –1980. Vol.2(3) P.217-21.

239. Lootsik M. D., Bilyy R. O., Lutsyk M. M., Manko N. O., Navytka S.A., Kutsiaba V. I., Stoika R. S. / Honeybee (*Apis mellifera*) chitosan: purification, heterogeneity and hemocoagulating activity. // Biotechnologia Acta. – 2016; Vol.9(6) P.39 -49.

## ДОДАТОК 1

### Список публікацій здобувача

#### **Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації**

1. Manko N, Starykovych M, Bobak Y, Stoika R, Richter V, Koval O, Lavrik I, Horák D, Souchelnytskyi S, Kit Y. / The purification and identification of human blood serum proteins with affinity to the antitumor active RL2 lactaptin using magnetic microparticles. // Biomed Chromatogr. – 2019 Vol.33 P.46-47.
2. Paiuk O, Mitina N, Slouf M, Pavlova E, Finiuk N, Kinash N, Karkhut A, Manko N, Gromovoy T, Hevus O, Shermolovich Y Stoika R, Zaichenko A / Fluorine-containing block/branched polyamphiphiles forming bioinspired complexes with biopolymers. // Colloids Surf B Biointerfaces. – 2019. Vol.174. P.393-400.
3. Antonyuk V.O., Panchak L.V., Manko N.O., Stoika R.S. / Chitosan of peppery milky cap fungi (*Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr): isolation, study of its physicochemical properties and biological activity // Revista de chimie – 2020. Vol.71.
4. M. Lootsik, N. Manko, O. Gromyko, S. Tistechok, M. Lutsyk (jr.) ,R. Stoika / Honey bee chitosan-melanin complex: Isolation and investigation of its antimicrobial activity. // Ukr. Biochem. J. – 2020. Vol. 92. P.143-153

#### ***Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації***

1. Lootsik M. Antifungal activity of honeybee chitosan-melanin complex and its fragment / M. Lootsik, N. Manko, R. Stoika // Bridges 14th Annual Scientific, Bratislava, Slovak Republic, April 10-14, 2019: Book of abstracts. – Bratislava, 2019. – P. 140.

2. Manko N. Isolation of honeybee chitosan-melanin fragments and their effects on the viability of bacterial, fungi, and mammalian cells in vitro / N. Manko, M. Lootsik, S. Tistechok, O. Gromyko, R. Stoika // RECOOP 10<sup>th</sup> Annual Project Review Meeting, October 11-12, 2019 : Book of abstracts. – Wroclaw, 2019. – P. 80
3. Manko N. Effect of honeybee chitosan-melanin fragments upon viability in vitro of bacterial, fungi, and mammalian cells / N. Manko, M. Lootsik, S. Tistechok, O. Gromyko, R. Stoika // 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, Yaremche, Ukraine, 18-21 June 2019: Book of abstracts. – Yaremche, 2019. – P. 40
4. Manko N. Biological activity of Ser-Pro-Cys peptide and its conjugates with synthetic functional polymers / N. Manko, M. Starykovich, O. Zaichenko, N. Mitina, O. Paiuk, R. Stoika, Y. Kit // XII Український біохімічний конгрес, Тернопіль Україна, 30 вересня – 04 жовтня 2019 р., Медична та клінічна хімія. Т. 21, № 3 (додаток) : Збірник тез. – Тернопіль, 2019. – С
5. Kit Yu. Biological activity of Ser-Pro-Cys peptide and its nanoconjugates with synthetic polymers / Yu. Kit, N. Manko, A. Zaichenko, N. Mitina, O. Paiuk, M. Starykovich, R. Stoika. // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. Bratislava, Slovak Republic, October 11-14, 2018. Bratislava, 2018. P. 38
6. Manko N. Biological activity of human blood serum peptide Prosercin and its synthetic analog Ser-Pro-Cys: N. Manko comparative analysis / N. Manko, M. Starykovich, S. Myronovsky, T. Negruch, N. Negruch, M. Shorobura, V. Richter, R. Panchuk, R. Stoika, Yu. Kit. // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. Bratislava, Slovak Republic, October 11-14, 2018. Bratislava, 2018. P. 70
7. Lootsik M. Antimicrobial activity of honeybee chitosan-melanin complex and its hydrolytic fragments / M. Lootsik, N. Manko, M. Lutsyk (Jr.), R.

Stoika. // International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology” Lviv. Ukraine, October 29-31, 2018. Lviv, 2018. – P.24

8. Lootsik M. Studies on the antibacterial activity of honeybee chitosan and its derivatives / M. Lootsik, N. Manko, A. Karmash, R. Stoika // 7th International Weigl Conference. September 26-29, 2017. Lviv, Ukraine. Abstracts Book. – 2017. – P. 46.