әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

ӘОЖ 544.777 Қолжазба құқығында

ЕРЛАН ГҮЛЖАН ЕРЛАНҚЫЗЫ

Полисахарид гельдерінде инсулинді иммобилизациялау

8D05301 - Химия

Философия докторы (PhD) дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Ғылыми кеңесшілері:
химия ғылымдарының кандидаты,
доцент
Тюсюпова Б.Б.

химия ғылымдарының докторы,
М.И. Ломоносов атындағы
Мәскеу Мемлекеттік университетінің
доценті Балабушевич Н.Г.

Қазақстан Республикасы
Алматы, 2024

МАЗМҰНЫ

НОРМАТИВТІ СІЛТЕМЕЛЕР 4
АНЫҚТАМАЛАР 5
БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР 6
КІРІСПЕ 7
1 ӘДЕБИ ШОЛУ 12
1.1 Қант диабетінің таралуы мен емі 12
1.2 Инсулинді пероралды жеткізу жолындағы кедергілер 13
1.3 Ақуызды препараттарды пероралды жеткізу жолдары 15
1.4 Мукоадгезивті полисахарид матрицалары 22
1.5 Альгинат 24
1.6 Альгинат – хитозанды капсулалар 26
1.7 Хитозан 27
1.8 Полимерлі матрицаларды тігу процесі, тігуші агенттер 30
1.8.1 Табиғи тігуші агенттер 34
1.8.2 Ферменттер тігуші агент ретінде 35
1.8.3 Гидрогельдер өндірісіндегі «клик химия» 35
1.8.4 Макромолекулалық тігуші агенттер 36
1.9 Дәрілік заттардың полимерлі тасымалдаушылардан босап шығу процесі .. 37
2.0 Гидрогельдер, ақуызды полисахаридті полиэлектролитті комплекстер 37
2.1 Биополимерлер 39
2 ТӘЖІРИБЕЛІК БӨЛІМ 42
2.1 Зерттеу нысандары 42
2.2 Зерттеу әдістері 42
2.2.1 Ионотропты гель түзілу әдісі арқылы альгинат бөлшектерін алу 42
2.2.2 Модельді асқазан ішек жолы шарттарындағы бөлшектердің ісіну кинетикасы 42
2.2.3 Альгинат бөлшектерін желатинмен қаптау 43
2.2.4 Желатин үлдірімен қапталған альгинат бөлшектеріне инсулинді иммобилизациялау 43
2.2.5 ИҚ спектроскопия 43
2.2.6 Атомдық күш микроскопиясы 43

2.2.7 Инсулиннің босап шығу кинетикасы 43
2.2.8 Желатин негізіндегі үлдірлерді алу 44
2.2.9 Желатин негізіндегі үлдірлердің модельді асқазан ішек жолы ортасындағы өзгерістерін анықтау 44
2.2.10 Желатин негізіндегі үлдірлердің үзілу күші мен созылуын анықтау әдісі 44
2.2.11 Гибридті тасымалдау жүйелерінің матрицалық дизайны және инсулинді иммобилизациялауға арналған матрицаларды алу жолдарын оптимизациялау 45
2.2.12 Оптимизацияланған матрицаларға инсулинді иммобилизациялау 45
2.2.13 Стереомикроскопия 46
2.2.14 Сканерлеуші электронды микроскопия 46
2.2.15 Гибридті матрицаға иммобилизацияланған инсулиннің инкапсуляция эффективтілігін анықтау 46
2.2.16 Молекулалық динамикалық модельдеу 46
2.2.17 Инсулиннің босап шығуына фермент әсерін зерттеу 47
2.2.18 Инсулиннің босап шығу диффузиясы 47
3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛДАУ 48
3.1 Ионотропты гель түзілу әдісі арқылы альгинат бөлшектерін алу жолы 48
3.2 Модельді асқазан ішек жолы шарттарындағы бөлшектердің ісіну және инсулиннің босап шығу кинетикасын талдау 48
3.3 Альгинатты бөлшектерді ИҚ спектроскопиялық талдау 54
3.4 Атомдық күштік микроскопиялық зерттеу 55
3.5 Желатин негізіндегі үлдірлерді алу және олардың реологиялық қасиеттерін талдау 57
3.6 Гибридті тасымалдау жүйелерінің матрицалық дизайны және инсулинді иммобилизациялауға арналған матрицаларды алу жолдарын оңтайландыру 65
3.7 Оңтайландырылған матрицаларға инсулинді иммобилизациялау, инкапсуляция эффективтілігі және стереомикроскопия, СЭМ талдаулары 68
3.8 Молекулалық динамикалық моделін құрастыру 73
3.9 Инсулинмен жүктелген гибридті матрицаның ИҚ талдауы 75
3.10 Инсулиннің босап шығуы және диффузиясына фермент әсерін талдау 79
ҚОРЫТЫНДЫ 87
ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ 90

НОРМАТИВТІ СІЛТЕМЕЛЕР

Диссертацияда келесі стандарттарға сілтемелер қолданылды:

МемСТ 7.1-2003 - Библиографиялық жазба. Библиографиялық сипаттау.

МемСТ 7.54-88 - Ғылыми-техникалық құжаттамаларда заттар мен материалдардың қасиеттері туралы сандық мәліметтер.

МемСТ 8.417-81 - Өлшем бірліктерді қамтамасыз ететін мемлекеттік жүйе. Физикалық шамалардың бірліктері.

МемСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) - Зертханалық өлшегіш шыны ыдыстар. Цилиндрлер, мензуркалар, колбалар, сынауықтар. Жалпы техникалық шарттар.

МемСТ 7.12-93 - Ақпараттық, кітапханалық және баспа жұмыстары бойынша стандарттар жүйесі. Ғылыми-зерттеу жұмысы бойынша есеп. Пішіндеудің құрылымы мен ережесі.

МемСТ 6709-72 - Дистилденген су.

МемСТ 4517-87 – Реактивтер. Талдауда қолданатын қосымша реактивтер мен ерітінділерді дайындау.

АНЫҚТАМАЛАР

Қант диабеті – инсулин гормонының жеткіліксіздігі салдарынан глюкозаның сіңуінің бұзылуынан пайда болатын эндокриндік сырқат түрі.

Инсулин – ұйқы безінде түзілетін, ағзадағы көмірсу алмасуын реттеп, глюкозаның жалпы қан ағымынан жасушаларға өтуіне ықпал ететін ақуызды гормон.

Гипогликемия – қандағы глюкоза деңгейінің қалыпты нормадан төмендеуі.

Layer by layer – қатты бетке қарама-қарсы зарядталған иондарды лезде орналастыру үшін оң және теріс зарядталған бөлшектермен кезектесіп әсер ету әдісі.

Мукоадгезивтілік – кейбір материалдардың адам немесе жануарлар ағзасындағы шырышты тіндердің бетіне жабысу (адгезия) қабілеттілігі.

In vitro – тәжірибелер жасанды шарттарда, табиғи ортадан немесе организмнен тыс жағдайларда өткізілетін әдістеме.

In vivo – тәжірибелерді тірі организмдегі тірі тіндерде, тірі ағзаның ішінде жүргізу.

Иммобилизация – дәрілік зат қатты тасымалдаушы бетінде немесе ішінде фиксацияланып, гетерогенді иммобилизацияланған жүйе түзетін процесс.

Тігуші агент – полимерлер немесе олигомерлер молекуласын қатты, ерімейтін торлы полимерлерге айналдыратын заттар.

Дәрілік заттың босап шығуы – дәрілік заттың ағзаға еніп, белсенді ингредиентті босатуы жүретін процесс.

Полиэлектролитті комплекс – қарама - қарсы зарядталған полиэлектролиттердің (полианиондар мен поликатиондар) реакциясының нәтижесінің өнімі.

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

ПЭК – полиэлектролитті комплекс
LbL – layer by layer әдісі
WP – сарысу ақуызы
ALG – натрий альгинаты
Gel – желатин
Ins – инсулин
GA – глутарь альдегиді
PCL-PEG-PCL – поликапролактон-полиэтиленгликоль-поликапролактон
γ-CD – γ-циклодекстрин
ПАГ – поли(аллиламин гидрохлориді)
ПСС – поли(стиролсульфонат)
ПВС – поли(винилсульфат)
ДС – декстран сульфат
EDC – 1 - этил - 3 - (3 - диметиламинопропил) карбодиимид
DCC – N,N - дициклогексилкарбодиимид
МБА – N,N-метиленбисакриламид
Cu-AAC – мыс-катализине негізделген азидті-алкинді циклдендіру
DA – Дильс-Альдер реакциялары
NHS эфирлері – гидроксисукцинимидтің күрделі эфирлері
Arg – аргинин
Lys – лизин
Hyl – гидроксилизин
His – гистидин
Glu – глутамин қышқылы
Asp – аспарагин қышқылы
Hyp – гидроксипролин
Ser – серин
Thr – треонин
Ш.б. – шартты бірлік

КІРІСПЕ

Зерттеу жұмысының жалпы сипаттамасы. Зерттеу жұмысы полисахарид гельдерінде инсулинді иммобилизациялау арқылы инсулиннің пероралды формасын алуға; полисахарид матрицасының құрамын және тігу шарттарын оңтайландыру арқылы инсулиннің босап шығуын бақылауға арналған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Қант диабеті дүние жүзінде таралуы бойынша жүрек аурулары мен онкологиялық аурулардан кейін үшінші орын алады. Қазіргі уақытта диабет эпидемиясының мәселесі күрт артуда. 2030 жылы қант диабетімен ауыратын науқастар саны 643 миллионға, ал 2045 жылы 783 миллионға дейін жетуі мүмкін деп болжамдалынуда.

Қант диабеті кезіндегі терапияның негізгі мақсаты қандағы глюкоза деңгейін қалыпқа келтіру арқылы гликемиялық бақылауды жақсарту. Бірінші типті қант диабетімен ауыратын науқастарды, сонымен қатар пероралды дәрі – дәрмекпен, физикалық жаттығулар мен диета арқылы қандағы глюкоза мөлшерін бақылау мүмкін болмаған жағдайда екінші типті қант диабетін емдеудің негізі – инсулинді қолдану болып табылады. Инсулин – жасушалардың глюкозаны сіңіруін реттейтін пептидтер негізіндегі гормон.

Диабеттік науқастар қандағы инсулин деңгейін үнемі бақылап отыруы тиіс, бұл өз кезегінде гиперинсулинемия және липоатрофия тәрізді жағымсыз нәтижелерге алып келуі мүмкін. Қант диабетімен ауыратын науқастарда инъекциялық инсулин терапиясын сақтамау жиі кездеседі, оның себебі көп жағдайда инъекциялық қиындықтармен байланысты.

Инсулинді жеткізудің альтернативті түрлері зерттеліп, көптеген идеялар мен оларды әзірлеу жолдары ұсынылып, клиникалық зерттеулердің әр түрлі фазаларынан өткен препараттардың болуына қарамастан нарықта қазіргі уақытта тек инъекциялық инсулин түрі ғана қолданыста. Дегенмен инсулинді енгізудің табиғи және қолайлы әдісі пероралды форма болатын еді. Себебі, пероралды жеткізу кезінде басқа альтернативті түрлермен салыстырғанда инсулин секрециясын бақылау мүмкіншілігі бар және пероралды форма инъекция, ингаляторларға қарағанда науқастар үшін қолайлы болып табылады. Инсулинді пероралды жеткізу арқылы гипогликемиялық әсердің алдын алу мүмкіндігі бар, себебі оның барысында инсулин ішектен бауырға тікелей бағытталады.

Ақуызды препараттарды алудың липосома, микроэмульсия, эмульсия, аралас мицеллалар түрінде алу тәрізді әдістерінде органикалық ерітінділерді, беттік активті заттарды қолдану, инкапсуляцияның қатаң шарттары тәрізді кемшіліктері инсулин белсенділігінің төмендеуіне алып келуі мүмкін. Осыған орай, инсулиннің жоғары активтілігі сақталынатын полиэлектролитті құрылымды тасымалдаушыларды алу өзекті мәселелердің бірі.

Зерттеу жұмысының мақсаты: инсулинді иммобилизациялауда қолданылатын полисахаридті матрица қоспасының құрамын өзгерту және тігуші агенттерді қолдана отырып, инсулиннің тұрақтылығына қолайлы молекулярлы ортаны анықтау болып табылады.

Міндеттері:

1. Инсулиннің пероралды формасын дайындау үшін ионотропты гель түзілу әдісімен альгинат негізіндегі бөлшектерді алу және бөлшектердің асқазанның қышқыл және сілтілік ортасына деген тұрақтылығын арттыру үшін желатинмен қаптау;
2. Желатиннің құрылымдық – механикалық қасиеттерін жақсарту мақсатында оның композицияларын жасау және олардың модельді асқазан ішек жолдарының әр түрлі pH мәндеріне тәуелділігін зерттеу;
3. Гибридті тасымалдау жүйелеріне матрицалық дизайн жасау және инсулинді иммобилизациялауға арналған матрицаларды алу жолдарын оңтайландыру.
4. Гибридті матрицадан инсулиннің босап шығу кинетикасы мен диффузия коэффициентіне фермент әсерін бағалау.

Зерттеу нысандары: альгинат және желатин негізінде алынған бөлшектер, тігуші агенттер, инсулин, фермент, L - глутамин және лимон қышқылдары, хитозан.

Зерттеу пәні: Ионотропты полисахарид гельдерінде иммобилизацияланған инсулин процестері.

Зерттеу әдістері: ионотропты гель түзу әдісі; ісіну кинетикасы; инсулинді имммобилизациялау; УК спектроскопия (инсулиннің босап шығу кинетикасы); инфрақызыл спектроскопия; атомдық - күштік микроскопия; желатин композицияларының негізінде алынған үлдірлердің реологиясы (МТ 150 машинасы); стереомикроскопия; сканерлеуші электрондық микроскопия, молекулалық динамикалық модельдеу.

Зерттеу жұмысының ғылыми жаңалығы:

1. Желатинмен қапталған ионотропты гель түзу әдісі арқылы алынған альгинат бөлшектерінен pH = 6.86; 9.18 мәндерінде инсулиннің босап шығу кинетикасы есептелініп, мәндері сәйкесінше 50% және 83% құрады. Желатинмен қапталған альгинат бөлшектерінің ісіну кинетикасы pH = 1.0; 4.01; 6.86; 9.18 мәндерінде альгинат бөлшектеріне қарағанда 0.52; 0.74; 1.66; 1.38 мәндеріне жоғары болды.
2. Альгинат бөлшектерінің асқазанның агрессивті ортасына тұрақтылығын арттыру мақсатында желатиннің хитозан, лимон және L - глутамин қышқылдарымен түзген композицияларының құрылымдық - механикалық қасиеттері анықталды. Желатиннің L -глутамин қышқылымен биоүйлесімді

композициясы төмен pH мәндерінде молекулааралық сутектік байланыстардың санының жоғарлауымен, ассоциативтік құрылымдардың түзілуімен байланысты берік құрылым түзіп, асқазанның қышқыл ортасының шарттарына төзетіндігі, ал сілтілік ортада осы жүйенің құрылымдық - механикалық сипаттамалары кеміп, ішек фазасында инкапсуляцияланған инсулиннің босап шығуына қолайлы жағдай тудыратындығы анықталды.

3. Гибридті тасымалдау жүйелеріне матрицалық дизайн жасалынып, тігуші агенттердің ($CaCl_2$, GA; $CaCl_2$ – GA) гибридті матрицаға әсері зерттелінді. Гель түзілу үрдісінде альгинатқа желатинді қосу инсулиннің ағзаға әсерін кемітетін фибрилдену процесін тежейді. Тігуші агенттерді қолдана отырып, беттік морфологиясы, ішкі құрылымы және ісіну кинетикасы бойынша ерекшелінетін құрылымдар алынды.

4. Дизайндалған гибридті ақуыз - полисахарид матрицасына алғаш рет инсулин иммобилизациясы жүргізілді және оның босап шығу кинетикасы мен диффузия коэффициентіне биологиялық катализатор пепсин әсері зерттелінді. ALG; ALG – Gel бөлшектерінен пепсин қатысында инсулиннің босап шығуы сәйкесінше 57.7% және 61.4% құрады. Құрамында екі бірдей Ca^{2+} және GA тігуші агенттердің болуы полимерлі тордың қасиеттерінің ныгаюына оң әсер ететіндіктен, инсулинді тасымалдауда тұрақты матрица ALG – Gel ($CaCl_2$ - GA) негізіндегі матрица болып табылды. Полимерлі матрицалардың потенциалды энергиясы, молекулааралық әрекеттесу механизмдері *Molecular Mechanics 2 (MM2)* бағдарламасы арқылы модельденді. Инсулинді иммобилизациялау кезінде диполь – дипольді әрекеттесулердің басым екендігі анықталынды.

Алынған деректердің негізділігі мен нақтылығы. Зерттеу жұмысының негізділігі мен нақтылығы диссертация тақырыбы бойынша соңғы әдебиет көздеріндегі ақпараттарды қолдана отырып талқылау және ИҚ спектроскопия, УК спектроскопия, атомдық - күштік микроскопия, стереомикроскопия, сканерлеуші электрондық микроскопия, молекулалық динамикалық модельдеу сияқты физика – химиялық талдау құралдарында жасалыну арқылы дәлелденді. Зерттеу әдістемелері сертификатталған әдістемелер болып табылады; зертханалық ыдыстар мен ерітінділер МемСТ бойынша қолданылды және дайындалды; зертханалық құрал – жабдықтар метрологиялық салыстырып тексеруден өтілген; зерттеу материалдары нормативті құжаттарға сәйкес келеді.

Зерттеу тақырыбының ғылыми зерттеу жұмыстарының жоспарымен және әртүрлі мемлекеттік бағдарламалармен байланысы

Диссертациялық жұмыс келесі ғылыми жоба аясында орындалды:

- AP19677207 Табиғи шикізат негізіндегі наноқұрылымдық бионанокомпозиттерді жобалау.

Қорғауға ұсынылған негізгі қағидаттар:

1. Инсулинмен жүктелген альгинат бөлшектерін желатинмен қаптау pH = 4.01 кезінде инсулиннің босап шығу дәрежесін 39%-дан 31%-ға дейін төмендетеді және pH = 9.18 кезінде оны 63%-дан 83%-ға дейін арттырады.

2. Полисахаридті матрицаға желатинді қосу кезінде инсулиннің табиғи (α-спиральді) конформациясы сақталады және оның фибриногенез процесі тежеледі.

3. Гибридті ақуыз - полисахаридті матрицадағы инсулин байланысының негізгі механизмі диполь - дипольді әрекеттесулер болып табылады.

Зерттеу нәтижелерінің практикалық маңыздылығы

Ақуыз – полисахаридті гибридті полимерлі матрицаларды қолдана отырып инсулинді инкапсуляциялау, қант диабетінің емінде қолданылатын гормон - инсулиннің ыңғайлы пероралды формасын алуға және инъекциялық инсулинге балама жасауға мүмкіндік береді.

Диссертация мәліметтері келесі халықаралық конференциялар мен форумдарда баяндалды: «Фараби Әлемі» атты студенттер мен жас ғалымдардың халықаралық конференциясы (Алматы, 2021); «Тенденции, перспективы и инновационные подходы развития химической науки, производства и образования в условиях глобализации» халықаралық ғылыми – тәжірибелік конференциясы (Алматы, 2021); «7th International Conference on New Trends in Chemistry» (Turkey, 2021); «Перспективные направления развития химической науки, технологии и экологии» (Алматы, 2022); «VI Международная конференция по коллоидной химии и физико – химической механике (IC CCPCM) посвященная 125 - летию со дня рождения П.А. Ребиндера» (Казань, 2023).

Жарияланымдар

Диссертациялық жұмыстың тақырыбы бойынша 9 ғылыми еңбек жарияланды, яғни Scopus базасына кіретін «Molecules» журналында (Q1, 83%) 1 мақала, «Eurasian Chemico-Technological Journal» журналында (Q3, 29%) 1 мақала, Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің Білім және ғылым саласындағы сапаны қамтамасыз ету комитеті ұсынған тізімге кіретін «ҚазҰУ хабаршысы» Химия сериясында 2 мақала, сонымен қатар халықаралық ғылыми – тәжірибелік конференцияларда 5 баяндаманың материалдары мен тезистері.

Автордың жеке үлесі. Диссертациялық жұмыста келтірілген барлық тәжірибелік жұмыстарды жүргізу, деректерді жинау, зерттеу жұмыстары кезінде алынған нәтижелерді өңдеу және талдау, нәтижелерді жарияланымға дайындау және жариялау автордың жеке өзімен іске асты. Жарияланған еңбектердің 9-да автор бірінші және 8-де жауапты автор болып табылады.

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі

Диссертациялық жұмыс кіріспеден, әдеби шолудан, тәжірибелік бөлімнен, зерттеу нәтижелерінен, қорытындыдан, қолданылған әдебиет тізімінен және қосымшалардан тұрады. Диссертациялық жұмыс 112 беттен, 299 пайдаланылған әдебиеттер тізімінен, 30 сурет және 4 кестеден тұрады.

1 ӘДЕБИ ШОЛУ

1.1 Қант диабетінің таралуы мен емі

Қазіргі уақытта қант диабеті 537 миллионнан астам адам зардап шегетін, экономикалық және әлеуметтік салдары бар созылмалы аурулардың бірі болып табылады. Бұл көрсеткіш 2030 жылға дейін 643 миллионға және 2045 жылға дейн 784 миллионға дейін жетуі мүмкін деп болжамдалынады [1]. Қант диабетінің таралу жылдамдығы 21 ғасырда пандемиялық масштабтарға жақындап келеді. Бұл жиілігі экспоненциалды түрде артып келе жатқан ғаламдық аурулардың бірі [2]. Таралу жылдамдығы мен организмге тигізетін жанама әсерлеріне байланысты қант диабеті ең қауіпті аурулардың бірі болып саналады. Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының мәліметтері бойынша диабеттің салдарынан әлемде жылына үш миллионға жуық адам қайтыс болады [3].

Қант диабеті қандағы глюкозаның жинақталуымен сипатталынатын глюкоза реттелуінің бұзылуы болып табылады. Глюкозаның деңгейінің бұзылуы эндокриндік ұйқы безінің инсулинді бөліп шығара алмауынан немесе организмнің инсулинді дұрыс пайдалана алмауынан туындауы мүмкін [4]. Қандағы глюкоза деңгейін қалыпқа келтіру арқылы гликемиялық бақылауды жақсарту қант диабеті кезіндегі терапияның негізгі мақсаты болып табылады [5]. Қант диабетінің екі негізгі түрі бар. Инсулинге тәуелді қант диабетінің бірінші түрінде ұйқы безінен инсулиннің бөлінуі бұзылып, нәтижесінде күнделікті инсулинді енгізу қажет болады. Диабеттің екінші түрінде организм бөлінген инсулинді эффективті қолдана алмайды. Қант диабетімен күресудегі тиімді және жиі қолданылатын препарат – инсулин [6]. Пероралды дәрі – дәрмекпен, диета және физикалық жаттығулар арқылы қандағы глюкоза мөлшерін бақылау мүмкін болмаған жағдайда екінші типті қант диабетін емдеудеудің негізі, сонымен қатар бірінші типті қант диабетімен ауыратын науқастар үшін емдік шара инсулинді қолдану болып табылады [7]. Инсулин - жасушалардың глюкозаны сіңіруін реттейтін, моносахаридтердің жасушаға қосылуына ықпал ететін, молекулалық салмағы 5,8 кДа болатын ұйқы безінің полипептидтік гормоны [8]. Қант диабетімен ауыратын науқастардың шамамен 20-30% глюкоза дәрежесін бірқалыпты ұстап тұру үшін күнделікті инсулин инъекцияларын қабылдайды [9]. Инсулинді инъекция түрінде қолдану кезінде бірнеше қиыншылықтар туындайды: физиологиялық стресс, инъекцияны жүктеу қажеттілігі, инсулиннің концентрациясының физиологиялық қажетті мөлшерден ауытқуы, инфекция және т.б. [10]. Қант диабетімен ауыратын науқастар инъекциялық инсулин терапиясын жиі ұстанбайды, оның себебі көп жағдайда инъекциялық қиындықтармен байланысты [11]. Қант диабетінің бастапқы кезеңінде инсулинді қолданудағы негізгі кедергілерінің бірі енгізілетін дәрілік заттың қолайсыздығымен, науқастардың оны қабылдай алмауымен де байланыстырылады. Ал инсулиннің пероралды түрі қолжетімді болған кезде бұндай кедергілер жойылуы мүмкін [12]. Инсулинді пероралды жеткізу әдісі науқастар үшін психиологиялық және әлеуметтік тұрғыдан

қолайлы және қауіпсіз болуы тиіс [13]. Инсулинді пероралды жеткізу барысында инсулин ішектен бауырға тікелей бағытталатын болғандықтан, пероралды форма арқылы гипогликемиялық әсердің алдын алу мүмкіндігі бар [14].

1.2 Инсулинді пероралды жеткізу жолындағы кедергілер

Енгізу қарапайымдылығы мен денсаулық сақтау саласындағы төмен шығындарға байланысты дәрі-дәрмектерді пероральды жеткізу әдісі қолайлы болып табылады. Бірақ, макромолекулалық препараттардың төмен пероралды биожетімділігіне әкелетін асқазан-ішек жолдарының кедергілеріне байланысты пероралды ақуызды композициялар қазіргі уақытта коммерциялық тұрғыдан қол жетімді емес [15]. Төмендегі суретте (1 – сурет) инсулинді пероралды жеткізу кезіндегі негізгі кедергілер келтірілген:



1 - сурет. Инсулинді пероралды жеткізу жолындағы негізгі кедергілер

Ферментативті және химиялық кедергілер ақуызды дәрілік заттардың асқазан ішек жолында сіңуіне кедергі келтіруі мүмкін. Сондай-ақ, ішек эпителийіндегі абсорбциялық кедергілер ақуызды дәрілік заттардың тасымалдануын шектейді. Инсулинді пероралды жеткізудегі химиялық кедергілерге ақуыз препараттарының pH мәнінің өзгерісіне деген сезімталдығы жатады. Асқазан ішек жолындағы pH мәні қышқыл ортадан (pH 1.2–3.0) әлсіз сілтілік (6.5–9.0) ортаға дейін өзгереді. Мұндай pH мәндерінде ақуыздардың гидролизі жүріп, олардың белсенділігінің жоғалуы мүмкін [16]. Ферментативті кедергілерге асқазан ішек жолындағы протеазалар әсерінен ақуыздардың деградацияға ұшырауы жатады. Диффузиялық тосқауыл функциясын атқаратын физиологиялық шырыш ақуызды дәрілік заттардың сіңірілуіндегі алғашқы абсорбциялық кедергі болып табылады [17].

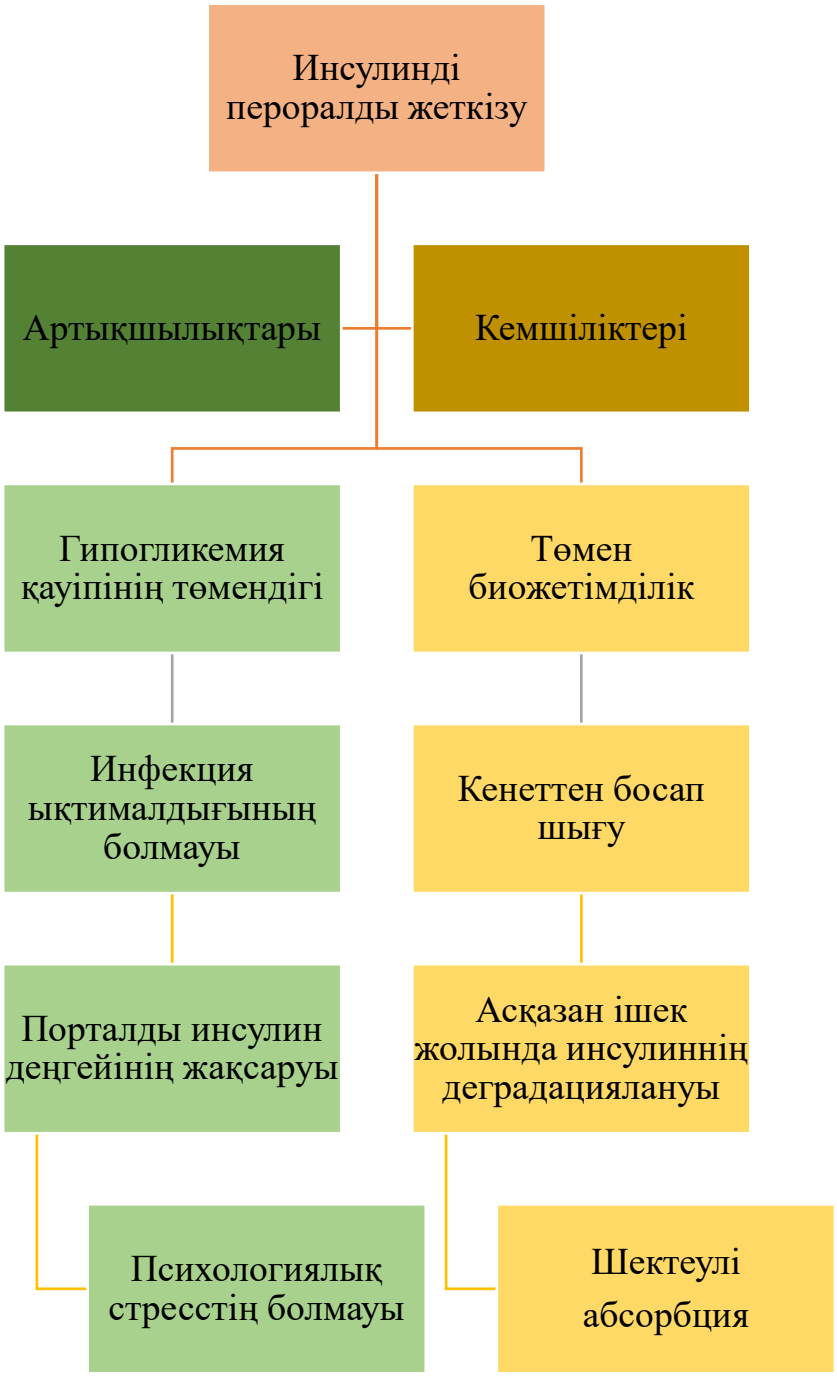
Инсулиннің пероралды түрін құру жолындағы кедергілерді жою үшін химиялық модификация және липидті жүйелер, микросфералар, нанобөлшектер және липосомалар сияқты тасымалдаушыларды қолдану тәрізді көптеген тәсілдер зерттелген [18–20]. Қышқыл ортадағы өзгерістерден

(денатруация/деградация) инсулинді қорғау мақсатында pH сезімтал полимерлер ыңғайлы тасымалдаушы материал ретінде қолданылған [21]. [18] зерттеуде липосомаларға инкапсуляцияланған инсулин жоғары абсорбция және фармакологиялық белсенділік көрсеткен. Бірақ pH, липазалардың және өт тұздарының әртүрлі мәндеріне байланысты асқазан-ішек жолдарындағы тұрақсыздық және инкапсуляция тиімділігінің төмендігі липосоманың негізгі шектеулері болып табылады [22]. Пероралды енгізетін инсулиннің биожетімділігін арттыру үшін [23] жұмыста лецитин липосомаларымен ассоцирленген инсулин – хитозанды полиэлектролитті комплекстер алынған. Липосомалы препаратты диабетті тышқандарға пероралды енгізу кезінде қандағы глюкоза деңгейінің едәуір төмендеуі байқалған.

Нанобөлшектер, поли нанокапсулалар мен коллаген тәрізді материалдар инсулинді жеткізуші және инкапсуляциялаушы агенттер ретінде зерттелінген [24, 25]. Бірақ бұл материалдар төмен кеуектілік салдарынан әлсіз инсулинді жүктеу қабілеттілігін көрсеткен [26].

Инсулинді ферментативті деградациядан қорғау мақсатында крахмал/пектинмен қапталған геллан шайырының микробөлшектері алынған. Алынған жүйе 120 минут аралығында трипсин мен альфа-химотрипсин әсеріне қарсы қорғаныс әсерін көрсеткен. In vivo зерттеу нәтижелері 7 сағат аралығындағы тиімді гипогликемиялық белсенділікті көрсеткен. Бұл зерттеу нәтижелері қолданылған полисахаридтердің көбінесе улы болып табылатын қарапайым фермент ингибиторларын алмастыра алатынын көрсетеді [27].

Инсулиннің пероралды түрін дамыту үшін жоғарыда аталған кедергілердің функциялары мен сипаттамаларын түсіну қажет. Төменде 2 - суретте инсулиннің пероралды түрінің негізгі артықшылықтары мен кемшіліктері келтірілген:



2 - сурет. Инсулиннің пероралды түрінің артықщылықтары мен кемшіліктері

1.3 Ақуызды препараттарды пероралды жеткізу жолдары

Н.Г. Балабушевич және т.б. ақуызды (инсулинді) микроагрегаттарда полианиондардың (декстрансульфат, хитозансульфат) және поликатиондардың (хитозан, протамин) адсорбциясының алмасуы арқылы алынған инсулинді микробөлшектердің қасиеттерін зерттеген [28] және полиэлектролиттер жұптарын түрлендіру, олардың адсорбция циклдерінің саны мен pH ортасын өзгерту арқылы осындай микробөлшектерден инсулиннің бөлініп шығу кинетикасын басқарудың потенциалды тәсілін орнатқан. Зерттеу нәтижелері адам ағзасының асқазан-ішек жолының шарттарына сәйкес келетін қышқыл pH

мәндерінде инсулиннің инактивациясына және pH≥5 кезінде инсулиннің босатылуына қатысты микробөлшектердің қорғаныш әсерін көрсетті.

Келесі зерттеуде [29] инсулинді Ca^{2+} иондарымен гель түзілу процесін қолдана отырып денатураталған сарысу ақуызынан (WP) және альгинаттан (ALG) тұратын микробөлшектерге инкапсуляциялаған және жоғары инкапсуляциялау деңгейіне (85%) қол жеткізілген. Зерттеу нәтижелері инсулин микробөлшектерден қышқыл ортада да, ішекте де диффузия арқылы тез шығарылуы мүмкін екенін көрсетті және WP/ALG микробөлшектері инсулиннің пепсинмен және α-химотрипсинмен ферментативті деградациясына қарсы қорғаныс әсерін көрсетеді. Бұл нәтижелер инсулиннің пероралды формасын WP/ALG микробөлшектеріне инкапсуляциялау арқылы дайындау мүмкіндігіне әкелді.

WP/ALG микробөлшектерін қолдана отырып, биотерапиялық агент ретінде қолданылатын Saccharomycesboulardii тірі жасушаларының иммобилизациясы [30, 31] жұмыстарда зерттелген, ақуыз және альгинатпен жабылған микробөлшектер иммобилизацияланған тірі жасушаларға жақсы қорғаныс әсерін көрсеткен. Бұл жұмыс WP/ALG микробөлшектерін қышқыл ортадағы тірі жасушаларды қорғау үшін қолдануға болатындығын көрсетті.

Француз және үнді ғалымдарының тағы бір жұмысында [32] пероралды инсулин тиол-функционалданған полиметакрил қышқылы, полиэтиленгликоль және хитозан сополимері микробөлшектерінде иммобилизацияланған. In vitro эксперименттері иммобилизацияланған инсулин протеазалардың деструктивті әсеріне төзімді екенін көрсеткен.

Инсулин, кальцитонин және циклоспорин А сияқты ақуыз препараттарын пероралды жеткізу үшін хитозан негізіндегі нанобөлшектер кеңінен зерттеліп, олардың пероралды биожетімділігін арттыру мүмкіндіктері көрсетілген [33].

Циклодекстриндер мен полимерлерден құралған супрамолекулалық гидрогельдер биоүйлесімді, биоыдырағыш және реттелетін дәрі-дәрмек жеткізу жүйелері ретінде кеңінен зерттелуде. Бұл зерттеуде поликапролактон-полиэтиленгликоль-поликапролактон (PCL-PEG-PCL) және γ-циклодекстрин (γ-CD) биоыдырағыш триблок – сополимерлері негізінде алынған супрамолекулалық гидрогелі инсулинді баяу шығаратын инъекция құралы ретінде алынған. Триблок-сополимері PCL-PEG-PCL микротолқынды сәулелендіруді қолдану арқылы, полимерлеу әдісімен синтезделген. Инсулиннің гидрогель жүйесі арқылы шығарылуы in vitro зерттелген. Гель өтімді хроматография нәтижелері және протонды ядролық магниттік резонанс микротолқынды сәулелену PCL-PEG-PCL сополимерін синтездеудің қарапайым және сенімді әдісі екенін көрсеткен. Гель түзілуі бір минут ішінде жүзеге асқан. 20 күн ішінде инсулин 80% - ға дейін босап шығарылған. γ -циклодекстрин мен PCL-PEG-PCL триблок сополимеріне негізделген супрамолекулалық гидрогель терапевтік ақуыздардың ұзақ мерзімді босатылуын қамтамасыз ететін қолайлы жүйе болып табылады [34].

[35] жұмыста биоыдырағыш полимер, поли(ε-капролактон) және дәстүрлі қатты дозалар (мысалы, жабын таблеткалары) рецептураларында қолданылатын

полиакрилді полимер жүйелерінен инсулин нанобөлшектері әзірленген. Полиакрилді полимер поликатионды табиғатына байланысты хитозан тәрізді мукоадгезивті әсер ете алады. Бұл зерттеуде нанобөлшектер негізінен пептидтер мен ақуыздар үшін қос эмульсия әдісімен дайындалған.

N-3-метилхитозан хлоридімен қапталған инсулинмен жүктелген полилактид-ко-гликозид нанобөлшектері инсулинді пероралды сіңірудегі көптеген кедергілерді жою үшін зерттелген. Нанобөлшектер екі эмульсиялы еріткішті буландыру әдісі арқылы дайындалған. Құрамында ферменттері бар модельді асқазан-ішек сұйықтықтарындағы инсулин нанобөлшектерінің тұрақтылығы мен босатылуы N-3-метилхитозан хлориді - полилактид-ко-гликозид нанобөлшектері инсулинді ферменттер деградациясынан қорғай алатынын көрсетті. Бірнеше абсорбциялық кедергілерді бір уақытта еңсеру арқылы нанобөлшектер көмегімен пероралды инсулиннің сіңуі күшейеді. Макромолекулярлық терапевтік заттарды пероралды қабылдау үшін N-метилхитозан хлориді - полилактид-ко-гликозид нанобөлшектері дәрі-дәрмекті жеткізудің перспективті әдісі болуы мүмкін [36].

Инсулин гормонын инкапсуляциялау үшін хитозан-пектин нано және микробөлшектерінің полиэлектролиттік кешенді жүйесі дайындалған. Жұмыстың мақсаты химиялық тігуші агенттерсіз табиғи және биоыдырағыш полисахаридтерге негізделген инсулинді пероралды жеткізуге арналған бөлшектерді алу. Нано және микробөлшектер жалпы заряд пен зарядтардың әртүрлі қатынасында хитозан (ацетилдену дәрежесі әртүрлі: 15.0% және 28.8%) және пектин ерітінділерін қолдану арқылы әзірленген. Инсулиннің бөлінуі модельді асқазан және ішек орталарында in vitro бағаланған. Жүйе әртүрлі орталарда, әсіресе жасанды асқазан сұйықтығында (pH = 1.2) тұрақты болған. Трансмиссиялық электронды микроскопия талдауы жүйеге инсулинді қосу кезінде сфералық бөлшектердің түзілгендігін көрсеткен. Модельді ішек сұйықтығында (pH = 6.8) инсулиннің бақыланып шығарылуы 2 сағат ішінде жүзеге асқан. In vitro сынақтары ұсынылған жүйенің биоактивті пептидтерді пероралды қабылдауға арналған препарат ретінде потенциалды түрде пайдаланылуы мүмкін екендігін көрсеткен [37].

Инсулинмен жүктелген поли-ε-капролактон бөлшектерінің микроқұрылымдық жүйесі қарапайым қос эмульсия процесін және еріткішті буландыру әдісін қолдану арқылы дайындалған. Бұл композиция орташа өлшемі 10 микрометр болатын сфералық микробөлшектерден тұрады. Дәрілік заттың in vitro бөлініп шығуы препараттың шамамен 50 пайызы 2 сағатта бөлініп шығатын тез бөліну мен 48 сағатқа дейінгі ұзақ мерзімді бөліну тәрізді екі фазалы белсенділікті көрсеткен. Бұл зерттеу оңтайландырылған қос эмульсия әдісімен тұрақты шығарылатын инсулин препараттарын одан әрі жақсарту үшін қолдануға болатын, биоүйлесімді полиэпсилон-капролактон микробөлшектерін алуға болатындығын көрсетеді [38].

Полиэлектролиттің қабатты жабындары (LbL) комплекс түзу [39, 40] және биологиялық ұқсастық [41], сутегімен биологиялық байланыстыру [42, 43] әдістерімен полимерлі материалдарды қатты бетке альтернативті және көп

реттік тұндыру жолдарымен алына алады.

Комплекс түзілу әдісімен LbL пленкаларын дайындау теріс және оң зарядталған суда еритін полимерлі материалдардың электростатикалық тартылуына негізделген. Зарядталған бетке поликатиондар немесе полианиондар адсорбцияланғанда беттік зарядтың артық компенсациялануынан қарама-қарсы зарядты жаңа бет түзіледі. Үлбірді қондыруға болатын қатты төсемелердің (полимерлер, керамика, шыны, металдар) кең таралуы комплекс түзілу әдісінің артықшылығы болып табылады. Органикалық ерітінділерді еритін полимерлерден үлбірлерді алу кезінде бұл үлбірлердің тұрақтануы сутектік байланыс пен гидрофобтық әрекеттесулер есебінен жүреді.

Сутектік байланыстары бар layer by layer үлбірлері донорлық және акцепторлық полимерлерді кезек – кезек тұндыру арқылы алынады. Сутектік байланысы бар LbL үлдірлерінің ерекшелігі оларды pH мәні басқарылатын шығарылымы бар препараттарды жасау үшін қолдануға болады [44].

Биологиялық ұқсастық екі заттың, мысалы, антидене мен антиген арасындағы тартылыс күшіне негізделген. Авидин, антиденелер немесе лектин және стрептавидин ферменттік LbL үлдірлерін алу үшін қолданылады. Биополимерлер мен жасушаларды таңбалау үшін авидин қолданылады, өйткені ол ДНҚ, липидтер және ақуыздармен берік байланысады [45].

Жоғарыда келтірілген биологиялық материалдарды қолдану арқылы бүкіл процесті физиологиялық жағдайларда жүргізуге болады. Лектиннің қантқа биологиялық ұқсастығы LbL ферменттік үлдірлерін алу үшін де қолданылған [46].

[47, 48] жұмыстарда куысты микрокапсулалар микросфералардың бетін LbL пленкаларымен жауып, содан кейін негізгі материалды еріту арқылы жасалған. LbL пленкасына негізделген микрокапсулалардың артықшылығы - бүкіл жұмыс процесін сулы ертіндіде жұмсақ жағдайда (яғни бөлме температурасында, бейтарап pH кезінде) жүргізуге болады. Осылайша, ақуыздар мен гендер сияқты тұрақсыз қосылыстары бар микрокапсулаларды алуға болады [49, 50]. pH мәні реттелетін инсулиннің бөлінуін қамтамасыз ету үшін инсулинді LbL пленкаларына полимерлер мен инсулинді альтернативті тұндыру арқылы енгізуге болады [51].

LbL әдісі протеиннің (инсулиннің) биожетімділігі жақсартылған көп функциялы ақуыз-полимерлі микробөлшектерді алу үшін қолданылған. Микробөлшектер инкапсуляцияланған инсулинді құрамында пепсин бар агрессивті асқазан ортасынан қорғаған. Қандағы глюкоза кинетикасын және диабеттік тышқандардағы инсулиннің концентрациясын зерттеу қанға түсетін микрокапсуляцияланған инсулин ішке қабылдағаннан кейін 1, 6 және 24 сағаттан кейін анықталына алатындығын және диабеттік тышқандардағы қандағы глюкоза деңгейін тиімді төмендететінін көрсеткен [52].

Құрамында хитозан мен альгинаты бар бөлшектер полиэлектролиттердің ерімейтін протеин-альгинат кешенінің микроагрегаттарына layer-by-layer адсорбция әдісімен және кері ионотропты гельтүзілу әдісімен алынған. Кері ионотропты гель түзілу әдісі арқылы алынған бөлшектердің өлшемі 450-950 нм

аралығында болған; ақуыз-альгинат кешенінде полиэлектролиттердің LbL адсорбциясы нәтижесінде алынған бөлшектердің өлшемі 30-40 мкм құраған. Хитозанмен қапталған оң зарядты микробөлшектердің мукоадгезиялық қасиеттері беті негізінен альгинатпен қапталған теріс зарядталған нано және микробөлшектерден жоғары болған. Дайындау әдісіне қарамастан, алынған бөлшектер pH 4-5 мәндерінде тұрақты болды және қышқыл және бейтарап ортада ақуызды бөліп шығарған [53].

Құрамында инсулині бар микрокапсулалар поли(аллиламин гидрохлориді) (ПАГ) және поли(стиролсульфонат) (ПСС), поли(винилсульфат) (ПВС) және декстран сульфат (ДС) сияқты полианиондарды құрамында инсулині бар кальций карбонаты ($CaCO_3$) микробөлшектеріне layer-by-layer тұндыру арқылы дайындалған. $CaCO_3$ инсулині бар қуысты микрокапсулаларды алу үшін сұйылтылған HCl ерітіндісінде ерітілген. Микрокапсулалардағы инсулиннің бөлінуі ПАГ зарядының әртүрлі тығыздығына байланысты ерітінділердің қышқыл ортасына қарағанда pH 9.0 және 7.4 мәндерінде жылдам жүзеге асқан. Сонымен қатар, төмен молекулалы салмақты ПАГ қолдану арқылы алынған микрокапсулалардан инсулиннің босап шығуы тежелген, бұл микрокапсула қабықшасының қалыңдығына байланысты болуы мүмкін. Зерттеу нәтижелері инсулинді жеткізу жүйесін дамыту үшін құрамында инсулині бар микрокапсулалардың пайдалану мүмкіндігін көрсетеді [54].

Пероральді препараттарды дайындауда полисахаридті матрицалар маңызды рөл атқарады. Полисахаридтер – гликозидтік байланыстар арқылы түзілетін үлкен полимерлі олигосахаридтері бар көмірсулар класы [55]. Моносахарид бірліктерінің құрамына қарай полисахаридтер гомополимерлер және гетерополимерлер деп жіктеледі [56]. Құрамындағы көптеген функционалды топтардың (гидроксил, амин және карбон қышқылдары топтары) болуына байланысты полисахаридтер биохимиялық немесе химиялық жолмен полисахарид туындыларының көптеген түрлеріне модификацияланa алады [57].

Альгинаттар мен хитозан негізіндегі полисахаридті матрицалар мукоадгезивті, асқазанның қышқылдық ортасында ерімейді және асқазан-ішек жолының жоғарғы бөлігінде ферментативті ыдырауға ұшырамайды. Ішектің аздап сілтілі ортасында полисахаридті гидрогель баяу ери бастайды. Гидрогельдің еру жылдамдығы матрицаның құрамына байланысты. Матрицаның құрамын өзгерту арқылы дәрілік заттардың шығарылу жылдамдығын бақылауға болады [58–60].

Сұйылтылған инсулин ерітінділерін пероралды қабылдау мүмкіндігі [61] жұмыста зерттелген. Қысқа және ұзақ мерзімді тәжірибелердің нәтижелері сұйылтылған инсулин ерітінділерін ішке қабылдау кезінде жануарлардың қан құрамындағы глюкоза деңгейінің мөлшері төмендейтіндігін көрсеткен. Қандағы және бауыр тіндеріндегі инсулин концентрациясы препаратты енгізу тәсіліне байланысты өлшенген. Зерттеу нәтижелері тері арқылы инъекцияға қарағанда пероралды қабылдау кезінде инсулин қанға бауыр арқылы еніп, денеде дұрыс таралуын жүзеге асырады деген қорытынды жасауға мүмкіндік береді.

[62] зерттеу жұмысында егер бөлшектен ішек қабырғасына дейінгі қашықтық үлкен болса, онда инсулин протеолитикалық ферменттердің әсеріне ұзағырақ ұшырайды және осылайша оның гидролиз ықтималдығы артады деген гипотеза ұсынылған. Бұл гипотезаны тексеру үшін имитациялық ішектің қабырғалары арқылы өтетін инсулиннің мөлшері 10, 20 және 30 минут ішінде трипсин протеолитикалық ферменті қатысында және оның қатысынсыз өлшенген. Түтік қабырғалары арқылы өтетін инсулин мөлшері түтіктің ішкі диаметріне тәуелді екені анықталған. Диаметрі 10 мм түтікті пайдалану кезінде қабырғалар арқылы өткен инсулин мөлшері диаметрі 25 мм түтікке қарағанда 1.3-1.4 есе көп болған.

Инсулин протеолитикалық ферменттердің ингибиторларымен модификацияланған полимерлі гидрогельдерде иммобилизацияланған. Протеиназа ингибиторлары көмегімен жасалынған модификация иммобилизацияланған инсулиннің биологиялық белсенділігін өзгертпеген. Инсулиннің пероральді түрінің әсері инъекциялық инсулиннің әсеріне ұқсас екендігін жануарлардың қанындағы глюкоза концентрациясының өзгеру динамикасы көрсеткен. Дегенмен иммобилизацияланған инсулиннің тиімділігіне байланысты сандық айырмашылықтар бар, яғни пероралды инсулин инъекциялық инсулин тиімділігінің 60-70% құраған [63].

[64] зерттеу жұмысында 2 типті қант диабетін емдеуде гликемиялық бақылауды жақсарту үшін терапевтік пептид, эксенатидті пероралды жеткізуге мүмкіндік беретін наноэмульсиялық жүйе ұсынылған. Наноэмульсия жүйесі 37˚С температурада жасалған және 4˚С сақтау температурасында тұрақты. Мұндай жүйенің емдік әсері дәстүрлі инъекциялық терапиядан төмен болғанымен, майлы құрылымы бар наноэмульсия жүйесі инкапсуляцияланған пептидті қорғап, инсулиннің бөлінуін қамтамасыз етіп, антидиабеттік әсер көрсеткен.

Пероралды инсулиннің тасымалдаушылары ретінде нанобөлшектердің үш түрі дайындалып, зерттелген: қарапайым альгинат нанобөлшектері, альгинат-стеарин қышқылының нанобөлшектері және құрамында С18 конъюгаты бар альгинат нанобөлшектері [65]. Аталған нанобөлшектердің ішінде альгинат-С18 нанобөлшектері уыттылықтың төмен деңгейін және шырышты қабатқа жақсырақ енуді, қандағы инсулин деңгейін жоғарылатуды және глюкоза деңгейін төмендетуді көрсеткен. С18 конъюгатының альгинатқа қосылуы нәтижесінде инсулиннің реабсорбциясының тенденциясы төмендеген, себебі COOH/COO-альгинаттың белсенді топтары С18 конъюгатымен түйіндеседі.

Май қышқылдарын коацервациялау әдісі инсулинді және оның аналогтарын пероралды жеткізу құралы ретінде липидті тасымалдаушыларды әзірлеу үшін [66] зерттеуде қолданылған. Эксперименттік нәтижелерге сәйкес, инсулинмен жүктелген липидті тасымалдаушылар бос пептидпен салыстырғанда жоғары ену қабілетін көрсеткен. Ex vivo зерттеулері липидті тасымалдаушылардан инсулиннің ішекте сіңуін көрсеткен, ал in vivo зерттеулері зертханалық тышқандардағы қандағы глюкоза деңгейінің төмендеуін көрсеткен.

Пероралды түрде қабылданатын инсулиннің абсорбциясын жақсарту үшін тасымалдаушылар ретінде pH-сезімтал метилметакрилат/метилен янтарь қышқылы наногельдері пайдаланылған [67]. Наногельдерге инсулинді енгізу полиэлектролитті комплекс түзілу әдісі бойынша жүргізілген. Наногельдер трегалозаның қатысуымен лиофилденген. Лиофилденген наногельдердің тұрақтылығы 5±3˚С температурада 3 ай бойы зерттелген және зерттеу нәтижелері бойынша наногельдер тұрақтылық қасиет көрсеткен. Сондай-ақ наногельдердегі инсулиннің бастапқы құрылымы бұзылмаған.

Овомукоидпен модификацияланған полиакриламидті гидрогельге иммобилизацияланған инсулиннің pH = 2.5; 4.3; 8.0 мәндеріндегі тұрақтылығы [68] жұмыста зерттелген. pH<3.8 және pH >5.5 мәндерінде инсулин гидрогельден өздігінен босап тарай алған, және бөлінген инсулиннің үлесі гидрогель мен оны қоршаған ерітінді көлемінің қатынасына тура пропорционал болған. Гидрогель көлеміндегі инсулиннің концентрациясы 3.8<pH<5.5 диапазонында қоршаған ерітіндідегі инсулин концентрациясымен салыстырғанда жоғары екендігі байқалған, бұның себебі инсулин молекулалары мен овомукоидтың электростатикалық әрекеттесуіне байланысты.

Инсулинді жеткізу жүйелерін құру үшін поли(винил спирті) және 4-меркаптофенилбор қышқылынан глюкозаға сезімтал гидрогельдер жасау жұмыстары жүргізілген. Тотықтырғыш ортада (pH>9) реагенттердің сулы ерітінділерін араластырғанда, фенилбор қышқылы мен поли(винил) спиртінің функционалды топтарындағы 1,2-диолдар арасында дисульфидті байланыстар мен коваленттік байланыстардың түзілуі арқылы полимерлі гидрогельдер алынады. Гидрогельдердегі меркаптофенилбор қышқылының $–B(OH)_2$ топтары және поли(винил спиртінің) 1,2-диолдары арасындағы байланыстар D-глюкозаның қатысында, ал дисульфидті байланыстар L-глутатион ерітінділерінде глюкозаға сезімталдығын көрсете отырып, ыдыраған. Поли(винил спирті) жартылай кристалды полимер, уақыт өте келе макромолекулалық сутектік байланыстардың әсерінен қоюлануы мүмкін болғандықтан, D-глюкоза және L-глутатион ерітінділеріндегі гидрогельдердің толық ыдырауы байқалмаған [69].

Полисахаридтер мен полимерлерге негізделген ақуыздарды жеткізу бойынша көптеген зерттеулерге қарамастан, олардың тек бірнешеуі ғана клиникалық зерттеулерге өткен. Жоғарыда келтірілген ақуызды жеткізудегі тасымалдаушылардың әрқайсысының өз артықшылықтары мен кемшіліктері бар, олар 1 - кестеде келтірілген.

1 - кесте. Ақуыздарды пероралды жеткізуде қолданылатын жүйелердің артықшылықтары мен шектеулері

Жүйе	Артықшылықтары	Шектеулері
Микроэмульсиялар	Ішек тінін зақымдамайды [70]. Ферментативті деградациядан қорғауды арттырады [71].	Фазаларды бөлуде шектеулерге ие [72]. Қоршаған ортаның параметрлері (pH, температура) тұрақтылыққа әсер етеді [73].
Липосомалар	Төмен уыттылық, биоүйлесімділік, биоыдырағыштық [74].	Жоғары құны, төмен дәрілік жүктеме [75].
Ферменттердің ингибиторлары	Ақуыздардың ферменттермен деградациясын баяулатады.	Тағамдық ақуыздардың қалыпты қорытылуына әсер етуі мүмкін [76].
Полимерлі мицеллалар	Ішектегі дәрілік заттардың абсорбциясын арттырады [77].	Полимерлі мицеллаларға жүктелген ақуыздардың жеткіліксіз тұрақтылығы [78].
Нанобөлшектер	Ақуыздардың бақыланып босап шығуы [79].	Ақуыздарды ұстау эффективтілігінің төмендігі [80].
Микросфералар	Бақыланатын және мақсатты ақуызды жеткізу [81].	Дәрілік заттың күрт бөліну ықтималдығы [82].
Абсорбция күшейткіштері	Ақуыздардың биожетімділігін арттырады [83].	Жасушалардың морфологиясын өзгертеді [84].

1.4 Мукоадгезивті полисахарид матрицалары

Мукоадгезивті тасымалдаушыларды дәрілік заттарды тасымалдауда қолдану абсорбция аумағында дәрілік заттардың болу уақытын арттырып, оларды протеолиздік ыдыраудан сақтайтындығын көрсеткен [85]. Биоадгезиялық полимерлер абсорбция уақытын ұзартуға мүмкіндік бере

отырып, дәрілік форма мен ауыз қуысының шырышты қабығының тығыз және ұзақ байланысын қамтамасыз етуде кеңінен қолданылады [86]. pH мәніне, иондық күш, температураға байланысты мукоадгезивті полимерлер өздерінің ісіну қабілеттілігін өзгерте алады [87].

Шырышты қабықшалар арқылы, ауыз қуысы, ішек, мұрын, пульмонарлы, окулярлы жолдар арқылы мукоадгезиялық жеткізу жүйелері бірқатар артықшылықтарды ұсынады: дәрілік зат абсорбция орнына жақын жерде босап шығарылады, ал бұл өз кезегінде жоғары концентрация градиентіне мүмкіндік береді [88]. Мукоадгезивті полимерлер беттік заряды бойынша үш негізгі топқа жіктеледі: аниондық, катиондық және ионсыз. Зарялталған полимерлер ионсыз полимерлерге қарағанда айқын мукоадгезивті қасиеттер көрсетеді [89].

Соңғы кездері дәрілік заттарды тасымалдауда табиғи полимерлер, әсіресе полисахаридтерді қолдану кең зерттелуде [90]. Табиғи полимерлі гидрогельдер биологиялық тұрғыда қауіпсіз, дәрілік заттарға қатысты инертті болып келеді және органикалық ерітінділерді қажет етпейді [91]. Табиғи полисахаридтерге негізделген полимерлі гидрогельдердің бақыланатын ісіну қасиеттері және жоғары су мөлшері сияқты бірегей ерекшеліктері олардың табиғи байланыстырушы тіндерге ұқсастығын қамтамасыз етеді. Полимерлі гидрогельдердің бұл қасиеттері биологиялық белсенді макромолекулаларды (нуклеин қышқылдары, ақуыз препараттары) және төменгі молекулалық қосылыстарды олардың құрылымы мен белсенділігін бұзбай инкапсуляциялауға мүмкіндік береді. Осылайша, полисахаридтік жүйелер сезімтал дәрі-дәрмек жеткізу жүйелерін құруда жоғары потенциалға ие, себебі олар фазалық ауысуларға (золь-гель, ісіну - жиырылу) тез өте алады және дәрілік диффузияны белгілі бір жолмен басқарудың бірегей мүмкіндігін ұсына алады [92].

Дәрілік формаларды дайындау үшін көбінесе анионды полимерлер қолданылады. Бұл олардың жоғары мукоадгезивтілігі және төмен уыттылығымен байланысты. Мұндай полимерлер полимердің pK_a мәнінен жоғары pH аймақтарында жеткізу жүйесінің жалпы теріс зарядын арттыратын карбоксил және сульфат топтарының болуымен сипатталады. Олардың мукоадгезивтілігі негізінен сутектік байланыстар есебінен муцинмен жақсы әрекеттесуіне негізделген [93].

Катионды мукоадгезивті полимерлердің ішінде ең қарқынды зерттелгені хитозан болып табылады. Хитозанның мукоадгезивтілігі ең алдымен муцин сиал қышқылының қалдықтары сияқты теріс зарядталған шырышты құрылымдармен амин топтарының иондық өзара әрекеттесуімен анықталады. Ол шырышты қабатта бір тәуліктен астам уақыт сақталынуға қабілетті. Хитозанның туындысы триметилхитозанның мукоадгезивтік қасиеттері жоғары зарядқа байланысты жақсырақ болуы мүмкін [94].

Биоүйлесімді, мукоадгезивті және биоыдырағыш қасиеттеріне байланысты дәрілік заттарды тасымалдауда, биомедицинада жиі қолданылатын табиғи полисахаридтердің бірі альгинат болып табылады. Эмульгирлеу, гель түзілу әдістерімен алынған альгинаттың микробөлшектері пероралды формада

жеткізуде перспективті тасымалдығыштар бола алады [95]. Реакцияға қабілетті функционалды топтардың көп мөлшерде болуы полисахаридтердің әр түрлі функционалды қызмет етуіне ықпал етеді [96]. Дәрілік заттарды полисахаридтер ішіне инкапсуляциялау жүктелген дәрілік заттардың биологиялық белсенділігі мен құрылымын сақтауға, биотаралу профилін өзгертуге және жанама әсерлерді азайтуға, қоршаған ортаның факторларынан қорғауға мүмкіндік береді [97].

Хитозан, альгинат капсулалары эмульсия коалесценциясы, коацервация және тұндыру, эмульсияны тігу, бүріккіш кептіру, иондық гель түзілу және кері мицелла әдістері көмегімен алынады. Дәрілік заттарды жеткізу үшін коваленттi материалдармен салыстырғанда ионды тігу әдісімен алынған материалдар жиірек қолданылады. Иондық тігуші реагенттерді қолданудың өзіндік артықшылықтары мен кемшіліктері бар. Полимерлерді модификациялауда иондық тігу әдісі ең қарапайым әдіс болып табылады және процесс жұмсақ шарттарда жүреді, сонымен қатар қолданылатын реагенттердің уытты еместігіне байланысты осы жүйеге негізделген материалдарды медицина мен фармацевтикада қолдануға болады. Оларды қолданудың негізгі кемшілігі механикалық беріктігінің төмендігі және pH мәніне тәуелді еруі болып табылады. Коваленттi тігуші реагенттерді қолданудың артықшылығы гельдену уақытын реттеу және берілген физикалық формадағы материалдардың кең спектрін алу мүмкіндігі болып табылады.

Иондық гель түзілу әдісінде полиэлектролит және қарсы ион арасындағы электростатикалық гель түзілу әдісі қолданылады. Альгинат негізіндегі бөлшектердің салыстырмалы жұмсақ гель түзу процесі оларды дәрілік заттарды тасымалдауда потенциалды үміткер ретінде қарастыруға мүмкіндік береді [98].

1.5 Альгинатты дәрілік заттарды тасымалдауда қолдану

Альгинат - D - маннурон және L - гулурон қышқыл қалдықтарының сызықты тізбегінен тұратын, Laminaria және Agarum тұқымдас балдырлардан алынатын табиғи полисахарид. Альгинаттың инкапсуляциялық материал ретінде қолданылуы оның кальций иондарымен электростатикалық өзара әрекеттесіп, гидрогель түзетіндігімен түсіндіріледі [99]. Альгинат β-D-маннурон қышқылы (M) және α-L-гулурон қышқылдарынан тұратын тізбекті полисахарид болғандықтан, оның моносахаридтік қайталануы қайталанатын M қалдықтарының блоктары (MM блоктары), қайталанатын G қалдықтарының блоктары (GG блоктары) немесе аралас M және G қалдықтарының блоктары (MG блоктары) түрінде орналасуы мүмкін [100].

Пероралды түрде қабылдау барысында альгинат уытты емес және катионды индуцирлеуші гель түзу қабілеттілігіне байланысты дәрілік заттардың босап шығуын қамтамасыз етеді [101]. Ионды альгинатты гельдер екі валентті катиондарды қолданып ионды тігу әдісі арқылы түзіледі [102]. Альгинатпен жақсы байланысу қабілеттілігі және қалыпты жағдайда қолдану кезіндегі уытсызығы Ca^{2+} иондарын альгинатты гельдерді алудағы жиі қолданылатын екі валентті катионға айналдырады [103]. Альгинаттың уронатты

блоктары мен кальций иондарының әрекеттесуі арқылы тігу процесі жүзеге асады [104]. Микробөлшектердің түзілу кабілеттілігіне альгинаттың тұтқырлығы әсер етпейтіндігі анықталған [105].

Альгинатты гидрогельдер төмен молекулалы массалы дәрілік заттар мен макромолекулаларды, соның ішінде ақуыздар мен гендерді жеткізудегі қолайлы үміткерлер [106]. Дәрілік заттар альгинат тәрізді тасымалдаушылардың кеуектерінде иммобилизациялануы немесе инкапсуляциялануы мүмкін. Қоршаған ортаның pH мәніне байланысты ALG гельдердің екі түрін құра алады. Төмен pH (асқазан ортасы) кезінде ол жиырылады және инкапсуляцияланған препараттарды шығармайтын вискозды қышқылды гель түзеді. Ішек жолынан өткеннен кейін жоғары pH мәндерінде альгин қышқылының тері тәрізді құрылымы еритін вискоза геліне айналып, полимерлі желінің бұзылуы дәрілік заттардың еруі мен босатылуын тудырады. Гидрогельдің кеуектерінен дәрілік заттың шығарылуы диффузиямен басқарылатын, ісіну кинетикасымен басқарылатын, химиялық бақыланатын және қоршаған орта әсеріне тәуелді босап шығу тәрізді әртүрлі механизмдер арқылы жүзеге асырылады [107]. Диффузиямен басқарылатын босату жүйелерінде резервуар немесе матрицалық құрылғылар гидрогель торынан немесе кеуектерден диффузия арқылы дәрілік заттардың шығарылуын бақылау үшін қолданылады. Резервуарлы жеткізу жүйесі әдетте капсула, шар немесе цилиндр түрінде қол жетімді гидрогельді мембранасы бар ядроны қамтиды. Дәрілік заттың концентрациясы жүйенің орталығында өте жоғары, сондықтан ол дәрінің баяу босап шығуына ықпал етеді [108].

Альгинат карбоксиметилцеллюлоза, полистирол, хитозан сияқты полимерлермен салыстырғанда ең жоғары мукоадгезивті қабілетке ие [109]. Альгинаттың төмен pH мәндерінде (асқазан ортасы) жиырылу қабілеті дәрі-дәрмектердің пероралды формаларын жеткізу жүйесін дамытуда пайдалы болуы мүмкін, өйткені pH мәні төмен ерітінділерде инкапсуляцияланған дәрі-дәрмектердің шығарылуы айтарлықтай төмендейді [110].

Альгинат микрокапсулаларын модельді асқазан шарттарында жақсы өмір сүру бейімділігін көрсететін, пробиотикалық бактерияларды микрокапсуляциялау үшін пайдалануға болады [111]. Тек альгинатпен инкапсуляциялау кезінде ішек pH мәндерінде үлкен молекулалардың "күрт шығарылуы" орын алатындықтан, оны хитозанмен жабу арқылы азайтуға болады [112].

Отандық ғалымдарымыздың зерттеулерінде кальций альгинаты ісікке қарсы циклофосфамид препаратын иммобилизациялау үшін пайдаланылған. Циклофосфамидтің босап шығу кинетикасы in vitro жағдайында зерттелген. Хитозанмен альгинат бөлшектерін модификациялау иммобилизацияланған дәрілік заттың босап шығу жылдамдығын төмендететіндігін көрсеткен. Хитозанның адсорбциялық қабаты хитозан концентрациясының артуымен жоғарылаған [113].

[114] зерттеу жұмысында иммобилизацияланған анальгетик АВ-101 диффузиясын бақылау мақсатында натрий альгинатының құрамындағы

маннурон (M) / гулурон қышқылының (G) әртүрлі арақатынастары таңдалған. Зерттеу нәтижелері бойынша альгинаттағы маннурондық бірліктердің жоғарылауымен альгинат бөлшектерінің кең көлемде ісінетіні анықталған, сонымен қатар нәтижелер G - блоктарымен салыстырғанда M - блоктардың тез диссоциацияланатындығын көрсеткен.

Екі валентті тігуші иондар комбинациясының альгинатты гидрогельдерден дәрілік заттардың бөлініп шығу жылдамдығына әсері [115] жұмыста зерттелген. Ca (II) және Ba (II) тігуші иондарының қоспасын қолдану кезінде дәрілік заттың тиімді босап шығу жылдамдығына қол жеткізуге болады. Тігуші агент ретінде Ba (II) иондарын қолдану кезінде дәрілік заттың ұзақ уақыт ішінде жүзеге асатын баяу босап шығуы, ал Ca (II) иондарын қолдану барысында дәрілік заттың толық ыдырауымен жүзеге асатын жылдам босап шығуы жүзеге асады. Осы екі иондардың арасындағы аралық жағдайға алдын ала есептелген мөлшерде екі ионды қамтитын ерітіндіні пайдалану арқылы қол жеткізуге болады.

1.6 Альгинат – хитозанды капсулалар

Альгинат-хитозан капсулаларын алу үшін эмульгациялау [116], бүріккіш кептіру [117] және коацервация [118] тәрізді әдістер қолданылады. Ұсақ бөлшектерді эмульгация әдісі арқылы алуға болады. Бүріккіш кептіру әдісі арқылы алынған капсулалар өлшемінің үлкенірек болатындығы оларды практикалық қолдану кезінде жанама әсерлерді тудыруы мүмкін [119].

Альгинат, хитозан және пектин тәрізді полисахаридтер ұзақ және тұрақты терапиялық әсер беретін болғандықтан көптеген дәрілік заттарды тасымалдауда қолданылады. Фосфолипидті мицеллаларды инкапсуляциялау үшін хитозан және альгинат қышқылының тұздары негізіндегі қабатты капсулалар алынған. Альгинат қышқылының кальций және барий тұздары хитозан – альгинат капсуласын дайындауда негіз ретінде алынған. pH мәнінің артуымен хитозан ерігіштік қабілеттілігін күрт жоғалтатын болғандықтан, сілтілік ортадағы тұрақтылықты арттыру үшін матрицаға әртүрлі тұтқырлықтағы хитозан енгізілген. Полиқабатты капсулалардан фосфолипидті мицеллалардың бөліну процесін зерттеу барысында алынған мәліметтердің нәтижелері Ca – альгинаты мен тұтқырлығы төмен хитозанның қосындысы ең қолайлы екенін көрсеткен, мұндай капсулалар орта есеппен 210 – 215 минутта еріген. Матрицаға тұтқырлығы орташа хитозанды енгізу жағдайында капсулалардың еруі байқалмаған [120].

Bacillus lentus, Geobacillus thermoglucosidasius және Paenibacillus polymyxa штамдарынан алынған антимикробты заттар натрий альгинаты мен хитозанды қолдану арқылы инкапсуляцияланған. Бұл полимерлі тасымалдаушыларды инкапсуляция үшін таңдау олардың зеңдер мен бактерияларға қарсы белсенділігімен, шығу тегінің табиғи сипатымен түсіндіріледі. Хитозан жабыны бар альгинат түйіршіктері зерттеу жұмыстарының нәтижелері бойынша ыдырауға және микробқа қарсы белсенділікті сақтауға тұрақты және төзімді екені анықталған [121].

[122] жұмыста хитозанмен қапталған альгинатты микрокапсулалар жүйесінде инкапсуляцияланған Bifidobacterium breve пробиотигінің асқазан-ішек жолындағы бейімділігі анықталынып, осы микрокапсулалардың кейбір қасиеттері зерттелінген. Ісіну кинетикасын зерттеу кезінде ісу және еру процестері pH мәніне тәуелді екендігін көрсеткен және микрокапсуланың еруі альгинаттың pK_a мәнінен жоғары pH мәндерінде жүзеге асқан. Құрғақ және ылғалды альгинат микрокапсулалары жасанды асқазан сөлінің әсері кезінде B. Breve пробиотигінің өміршеңдігін жақсартқан. Ал хитозанмен қаптау B. Breve өмір сүру қабілеттілігін одан әрі жақсартқан. Хитозанның әсер ету уақытының жабынның қалыңдығына әсері конфокальды лазерлік сканерлеу микроскопиясы арқылы зерттеліп, оның альгинат матрицасына енуі өте баяу жүретіндігі көрсетілген.

1.7 Хитозан және оның туындылары негізіндегі пероралды жеткізу жүйелері

Хитозан - хитиннің деацетилденген түрі болып табылатын, шаян тәрізділердің қабығында көп мөлшерлерде кездесетін полисахарид. Хитозанды алу жолы жоғары температурада сілтілі гидролиз арқылы хитинді деацетилдеу реакциясына негізделген [123]. Хитозан - катионды полисахарид, терапевті макромолекулалардың ішекке сіңірілуінің қауіпсіз және тиімді нығайтқышы ретінде кеңінен қарастырылады [124]. Сонымен қатар хитозан Escherichia coli тәрізді ішек таяқшаларының бактерияларына қарсы антимикробты агент ретінде де белгілі [125].

Хитозан полиэлектролиттермен ковалентсіз комплекстер түзуге қабілетті, бұл қасиеті хитозанды медицинада дәрілік заттарды инкапсуляциялауда қолдануда үлкен қызығушылық тудырады [126]. Комплекстердің түзілу процесіне полимердің келесі құрылымдық сипаттамалары үлкен әсер етеді: макромолекулалардың конформациясы, молекулалық массасы, полидисперстік дәрежесі, амин топтарының деацетилдену дәрежесі, амин топтарының протондануы, амино- және ацетамино- топтарының полимер тізбегі бойымен таралуы [127].

Амин тобының болуына байланысты хитозан әртүрлі химиялық қасиеттерге ие, бұл полимерді оған қажетті қасиеттерді беріп, модификациялауға мүмкіндік береді [128]. Амин тобы ацилдену, альдегидтермен және кетондармен реакцияларға, алкилдену, полимерге бүйірлік топтарды енгізу, төртіншілік аммоний тұздарының түзілуіне және басқа реакцияларға түсе алады. Осылайша, гипоаллергенділігімен, биологиялық үйлесімділігімен және биоыдырағыштығымен үйлесетін, пайдалы қасиеттерінің жиынтығы бар (бактерияға қарсы, зеңге қарсы, вирусқа қарсы) модификацияланған хитозандарды алуға болады [129]. Хитозанның амин тобынан басқа C2 және C6 атомдарында екі гидроксил тобы бар. Осы топтардың арқасында хитозан үшін бірқатар реакцияларды жүргузі мүмкіндігі пайда болады: этерификация, сополимерлену, сонымен қатар о-ацилдену, полярлы атомдармен сутектік байланыстардың түзілуі [130].

[131] зерттеу жұмысында хитозан және гиалурон қышқылы туындыларына негізделген көп функционалды нанобөлшектердің жүйесі зерттелген. Көп функциялы нанобөлшектерді алу үшін электростатикалық өздігінен құрастырылу технологиясы қолданылған. Зерттеу жұмысының нәтижелері бойынша нанобөлшектерді оңтайландыру гипогликемиялық әсерді жақсартатындығын және жасуша өткізгіштігін арттыратындығын растаған.

Төртіншілік аммоний тұздары мен май қышқылдары инсулинмен жүктелген хитозан нанобөлшектерін оңтайландыруда пайдаланылған. Электростатикалық және гидрофобты әрекеттесу арқылы келесі нанобөлшектер алынған: N-(2-гидрокси)-пропил-3-триметиламмоний хлорид хитозан - лаурин қышқылы; N-(2-гидрокси)-пропил-3-триметиламмоний хлорид хитозан – олеин қышқылы [132]. Алынған нанобөлшектердің екі түрі де жүктелген инсулиннің гипогликемиялық әсерін жақсартқан, алайда лаурин қышқылының нанобөлшектерімен салыстырғанда күштірек беттік гидрофобтылыққа ие олеин қышқылының нанобөлшектері тиімдірек болған.

Инсулинді бақылап жеткізу үшін күрделі коацервация әдісімен хитозан және полиуретан-хитозан нанобөлшектерінің ядросы алынып, қорғаныс қабықшасы ретінде ядро сыртына альгинат және полиуретан-альгинат иондық гельтүзілу әдісі арқылы тігілген [133]. Полиуретанды қосудың тиімділігі in vitro және in vivo зерттеулерінде айтарлықтай жақсартуларды көрсеткен, яғни: диабеттік тышқандардағы глюкоза деңгейінің төмендеуі; инкапсуляция тиімділігі және инсулиннің тұрақты босап шығуы.

Тиолданған хитозан нанобөлшектері арқылы инсулиннің пероралды жеткізу жүйесі in vitro және in vivo жүйелерінде сыналған. In vitro зерттеу нәтижелері pH = 5.3 мәнінде тиолданған хитозан нанобөлшектерінен инсулиннің тұрақты босап шығарылуын көрсеткен. In vivo зерттеуінде байқалған флуоресцентті дақтар пероралды жүйенің асқазан-ішек жолына жеткізілгендігінің дәлелі болып табылады. In vitro және in vivo деректері қант диабетін емдеуде тиолданған хитозан нанобөлшектерін пайдалану мүмкіндігін көрсетеді [134].

Ципрофлоксацинді жеткізу үшін хитозан және хитозан/поли(2-этил-2-оксазолин) негізіндегі үлдірлер қолданылған. Құрамында ципрофлоксацин бар үлдірлер *Escherichia coli* бактериялары мен *Staphylococcus aureus* бактерияларына қарсы жақсы антимикробтық қасиеттер көрсеткен. Үлдірлерден дәрілік заттардың бөлінуі хитозан үлдірлері үшін 42.2% және хитозан/поли(2-этил-2-оксазолин) үлдірлері үшін 56.1% құраған. Бұл нәтижелер үлдірлердің дәрілік заттарды тасымалдаудағы потенциалды қолданылуын көрсетеді [135].

Диабеттік тышқандарға инъекциялық және пероралды инсулиннің әсері [136] зерттеуде зерттелген. Зерттеу деректері инсулиннің инъекциялық түрі тәрізді инсулинмен жүктелген триметилхитозан нанобөлшектерімен пероралды емдеу қандағы глюкоза деңгейін төмендетіп, тышқандардың бүйрек зақымдануын азайтуға мүмкіндік беретіндігін көрсеткен. [137] зерттеу жұмысының нәтижелері диабеттік тышқандардағы липидтер алмасуын түзетуде

инъекциялық инсулинмен салыстырғанда пероралды инсулин нанобөлшектерін енгізудің тиімділігін көрсеткен.

Қышқыл сулы ортада хитозан еригіш, белсенді амин топтары бар және бірнеше иондық заттармен әрекеттесе алады. Хитозанның сулы ортада ерігіштігі ерітіндінің қышқылдығы белгілі бір шекті деңгейден жоғары болғанда ғана мүмкін болады, бұл алмастырылмаған амин топтарының болуымен түсіндіріледі. Қышқыл ортада амин топтарының протонденуы жүреді, полимер оң зарядталады, осы себептен хитозан молекулаларын катионды полиэлектролит ретінде қарастыруға болады. pH > 6 шартында амин топтары депротондалған күйге өтіп, полимер суда ерімейтін болады [129]. Хитозанның ерігіштігі ортаның pH мәніне, амин топтарының деацетилдену дәрежесіне (алмастырылған амин топтары протондана алмайды және хитозан ерігіштігін төмендетеді) [138], N-ацетилденген топтардың полимер тізбегі бойымен таралуына , сондай-ақ полимердің молекулалық массасына тәуелді. Хитозан минералды және органикалық қышқылдарда ериді. Хитозанның еріген кезде түзілетін күрделі тұздары суда ериді. Хитозан құрамында 0.2-100% құмырсқа қышқылы бар сулы жүйелерде жақсы ериді [139]. Еріткіш ретінде көбінесе 1% CH_3COOH ерітіндісі (pH = 4.0) қолданылады. Хитозан 1% HCl және сұйылтылған HNO_3 ериді, бірақ H_2SO_4 және H_3PO_4 тәрізді қышқылдарда ерімейді. Концентрлі CH_3COOH ерітіндісі жоғары температурада деполимеризацияны тудыруы мүмкін [140].

Хитозан және оның көптеген туындылары биохимиялық және физика-химиялық қасиеттерімен медицина және фармацевтикада пайдалы. Сондықтан оның рецептуралары таблеткалар, түйіршіктер және пленкалар сияқты жүктелген заттардың резервуары бола алады. Хитозан көп валентті иондармен иондық тігуге ұшырайды. Аниондық полимерлер хитозанмен электрлік әрекеттесетіндіктен өзара кешендер құра алады. Мұндай тігу хитозанның микро немесе нанобөлшектерін жасау үшін пайдалы [141].

Хитозан нанобөлшектерін алудың негізгі механизмдері - полиэлектролиттік кешендердің түзілуі және гидрофобты түрлендірілген хитозанның өздігінен жиналуы болып табылатын тігу (химиялық немесе физикалық) процесі. Кері мицеллалар, десольвация, тұндыру/коасервация және эмульсия тамшыларының бірігуі басқа потенциалды процестер болып табылады. Хитозанның тігілуі, мысалы хитозан ерітіндісіне тігуші агентті тамшылатып қосу - ақуызды иммобилизациялау немесе әртүрлі молекулаларды инкапсуляциялаудың қарапайым әдісі болып табылады [142].

Хитозан да, альгинат та пептидті, ақуызды дәрілік заттарды тасымалдауда қолданылатын биоыдырағыш полимерлер [143]. Жоғарғы заряд тығыздығына байланысты хитозан, альгинат мукоадгезивті (денедегі шырышты тіндер бетіне жабысуға қабілетті) қасиетке ие, сол арқылы капсуланың босатылу аймағында болу уақытын ұзартады. Бұл қасиеті олардың дәрілік заттарды тасымалдауда қолданылуының тағы бір себебін түсіндіреді [144, 145].

Көптеген зерттеулерде хитозан негізіндегі нанобөлшектер көмегімен дәрілік затпен жүктелген макромолекулаларды қышқылды денатурация мен

ферментативті деградациядан қорғауға, олардың ішекте болу мерзімін ұзартуға және ішек эпителийімен сіңірілуін арттыруға байланысты шаралар жүзеге асырылған [146, 147]. Макромолекулалық препараттардың пероралды сіңірілуі кезінде оның тиімділігін одан әрі арттыру үшін кватернизацияланған хитозан, тиолданған хитозан және карбоксилденген хитозан сияқты хитозан туындылары зерттелген. Сонымен қатар, хитозан мен оның туындыларын гидрофильді макромолекулаларды пероралды жеткізудің тасымалдаушысы ретінде пайдалану саласындағы соңғы жетістіктер мен олардың дәрілік заттарды тасымалдауға әсері зерттелуде.

[148] жұмыста Маяр реакциясымен алынған хитозан туындыларының Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Escherichia coli, Shigella dysenteriae, Salmonella typhimuriumю тәрізді патогендерге қарсы антибактериялық белсенділігі зерттелінген. Бастапқы хитозанмен салыстырғанда хитозан - глюкозамин туындысының салыстырмалы түрде жоғары антибактериялық белсенділігі байқалған.

Көзге арналған препараттарды тасымалдауда тиолданған хитозан синтезделініп, натрий альгинатымен нанобөлшектер дайындалған [149]. Зерттеу нәтижелері жоғары оң заряд пен мукоадгезивті қасиеттеріне байланысты тиолданған хитозан - альгинат нанобөлшектерінің тұрақтылығы мен тиімділігі хитозан бөлшектеріне қарағанда жоғары екенін көрсеткен.

Тиолданған хитозан туындылары меркаптокарбон қышқылдары мен карбодиимид сияқты кейбір улы реагенттерді қолдану арқылы синтезделетінін атап өткен жөн. [150] жұмыста тиолданған хитозан нанобөлшектерін синтездеу екі сатылы реакциядан тұрады. Реакцияның бірінші сатысы меркаптокарбон қышқылының эфирінің пайда болуымен өтеді, келесі сатыда ол хитозанның амин топтарымен әрекеттеседі.

Хитозанның тек қышқыл pH мәндерінде (pH<6) ерігіштігі, шектеулі pH мәндерінде мукоадгезивтілігі - шырышты қабаттар арқылы дәрі-дәрмектерді жеткізудегі хитозанның негізгі кемшіліктері болып табылады [151]. Көптеген ақуыздар мен пептидтерге негізделген препараттар төмен pH мәндерінде тұрақсыз болғандықтан, хитозан тасымалдаушыларының pH мәнін төмендету оның дәрі-дәрмектерді жеткізуде қолданылуын шектейді [152].

Асқазан сұйықтықтарындағы хитозанның жоғары ерігіштігі дәрі - дәрмектерді тоқ ішекке бағыттауда хитозанды шектеп, дәрі-дәрмектің асқазанда күрт босатылуына әкеледі. Қышқыл ортадағы хитозанның ерігіштігін микросфераларды альдегидтермен химиялық тігу арқылы азайтуға болады, бірақ ол инкапсуляцияланған дәрілердің босап шығарылуының алдын алуда тиімсіз [153].

1.8 Полимерлі матрицаларды тігу процесі, тігуші агенттер

Гидрогельдер сұйық емес коллоидты желілер немесе ісіну агенті су болып табылатын полимерлік желілер. Желідегі полимерлік тізбектер ісінеді, бірақ суда ерімейді, өйткені полимер тізбектері түйісу нүктелері арқылы үш өлшемді құрылым түзеді. Түйісу нүктелері физикалық өзара әрекеттесу нәтижесі немесе

химиялық байланыстар нәтижесі болуы мүмкін. Физикалық өзара әрекеттесу физикалық гидрогельдердің түзілуін қамтамасыз етеді, олар температураның, pH мен иондық күштің өзгеруіне сезімтал болады. Сутектік байланыстар, гидрофобты немесе ван-дер-Ваальс күштері макромолекулаларды бірге ұстап тұратын физикалық молекулааралық күштер [154]. Химиялық гидрогельдердегі полимер тізбегі арасындағы химиялық байланыстар, әдетте, тігуші агенттер арқылы жүзеге асады, бұл химиялық гидрогельдерді физикалық гидрогельдерге қарағанда тұрақтырақ етеді. Физиологиялық шарттардағы температураның, pH және иондық күштің өзгеруі химиялық гидрогельдердің ісіну әрекетінің өзгеруіне әкелуі мүмкін, бірақ олар үш өлшемді құрылымды бұзбайды [155]. Химиялық және физикалық тігілу гидрогельдің химиялық және механикалық тұрақтылығын арттыра отырып, биополимер тізбегін қосудағы мүмкін болатын стратегиялардың бірі болып табылады.

Полимер тізбектерін ковалентті немесе ковалентті емес байланыстар арқылы байланыстырып үш өлшемді желілерді түзу тігу процесі деп аталады. Тігу процесі полимерлердің суға төзімділігін, сондай-ақ механикалық қасиеттерін арттырады [156]. Химиялық тігу - сәулелену немесе химиялық реакциялар арқылы полимер тізбектері арасында пайда болатын коваленттік байланыстың нәтижесі, ал физикалық тігілу иондық өзара әрекеттесу, сутектік байланыстар және гидрофобты байланыстар нәтижесі болып табылады. Тігу молекула ішілік немесе молекула аралық бола алады және полимерлерді модификациялаудың негізгі әдістерінің бірі болып табылады [157, 158]. Тігу реакциялары сонымен қатар полисахаридтер мен ақуыздық материалдардың биодеградациясын баяулата алуы мүмкін [159].

Химиялық гель түзілу процесі ионотропты немесе ковалентті тігу арқылы жүзеге асады. Бірінші жағдайда полисахаридтер гель торын құрып, иондар арқылы тігіледі. Екінші жағдайда гельдер қайтымсыз химиялық торлардың түзілуіне әкелетін ковалентті тігу арқылы түзіледі [160].

Иондық гель түзілу полисахарид негізіндегі полиэлектролиттердің концентрацияның және/немесе pH мәнінің белгілі диапазонында қарсы иондардың қатысуымен тігілу мүмкіндігі. Полисахарид тамшыларының сулы ерітіндідегі иондық тігілуі өзара байланысқан нанофибриллярлы торы бар микроқұрылыммен сипатталатын гидрогель бөлшектерін (немесе түйіршіктерді) береді [161]. Ионотропты гель түзілу механизмі полисахаридтердің карбоксилат, сульфат және амин тәрізді белсенді функционалды топтарының қатысуымен жүреді. Қарсы ионның типі мен гель түзілу шарттары полисахаридтің белгілі бір түріне байланысты жеке таңдалуы керек [162].

Ковалентті тігуші агенттермен салыстырғанда иондық тігуші агенттер қарапайым тәжірибелік процедуралары мен жұмсақ дайындалу шарттарына байланысты тиімдірек болып келеді [163]. Иондық тігуші агент полиэлектролитті полисахаридтермен (катиондар және аниондар) олардың қарсы иондары арқылы иондық әрекеттесіп гель түзе алады [164].

Ковалентті тігуші агенттер полимер, көлемді немесе шағын органикалық молекула болуы мүмкін. Тігуші агенттің мөлшеріне байланысты гидрогельдердегі полимерлі тізбек желілері арасындағы ашық кеңістіктерді реттеуге болады. Полимер тізбегі желілерімен түзілген кеңістіктік кедергілер дәрілік заттың босап шығу мерзімін ұзартуы мүмкін, себебі гидрогельдердегі дәрілік заттар диффузиясы Стокс-Эйнштейн теңдеуіне тәуелді болып келеді. Гидрогельдерде кеуекті құрылымның болуы дәрілік заттардың босап шығуына Дарси заңы бойынша әсер етуі мүмкін. Гидрогельдердегі кеуекті құрылым лиофилизация әдісі тәрізді физикалық өңдеу нәтижесінде түзіледі [165]. [166] зерттеуде альгинат негізіндегі гидрогельдерден дәрілік заттың пролонгациялық босап шығуына кеуекті құрылым мен тігуші агенттің әсері қарастырылған. Тігуші агент ретінде дисульфидті тетразин (S-Tz) және дисульфидті малеимид (S-Ma қолданылған, сәйкесінше кеуекті (гидрогель А) және тығыз (гидрогель В) гидрогель құрылымдары алынған. Дәрілік затты жүктеу қабілеттілігі гидрогельдің кеуектілігінің артуымен жоғарылайтындығы көрсетілген. Гидрогель А желідегі бос кеңістіктердің көп болуына байланысты дәрілік заттардың босап шығу мөлшерін жоғарылатқан, ал кеуекті емес гидрогель В тығыз құрылымының себебінен бастапқы мезетте көп мөлшерде дәрілік затты босатудан кейін өте баяу босап шығуға алып келген. Сонымен қатар, кеуекті альгинат А гидрогелі дәрілік заттың 35 күн аралығындағы пролонгациялық тұрақты босап шығуын қамтамасыз ете алған (жалпы шығарылымы 90% дейін).

Ақуыздардың амин топтары күшті нуклеофильді болғандықтан тігу реакцияларының бірнеше түріне қатыса алады. Ферментативті тігу кезінде ақуыздардың тігу механизмі амин және карбоксиамид топтары бойынша жүзеге асады. Ал полисахаридтермен тігілу реакциялары гидроксил немесе карбоксил топтарын қамтиды [167].

Пектин және альгинат (екеуі де полиуронаттар) Ca^{2+} сияқты екі валентті катиондармен тігілетін иондық полисахаридтер. Кальциймен индуцирленген тігілу уронат блоктары (альгинат пен пектиндегі сәйкес гулуронат және галактуронат) мен кальций иондары арасындағы әрекеттесу нәтижесінде жүзеге асады. Түзілген тізбектік құрылымдар «жұмыртқа қорабы» деп аталатын модельмен ұсынылған түйісу аймақтарын құрайды [168].

Лимон қышқылы полисахаридті үлдірлер үшін тігуші агент ретінде қолданылған [169]. Лимон қышқылын тігуші агент ретінде қолданудың бір артықшылығы кез келген реакцияға түспеген лимон қышқылы уытсыз, тағамдық тұрғыдан қолайлы және пластификатор ретінде әсер ете алады. Тігу механизмі полисахаридтің гидроксил топтары мен тігуші агенттің екі карбоксил топтары арасындағы ковалентті молекулааралық диэфир түзілуімен түсіндіріледі [170].

Дәрілік заттарды тасымалдау жүйелерінде физикалық инкапсуляциялау жүктелген дәрілік заттардың биологиялық белсенділігін сақтаудың және бүтін құрылымының артықшылықтарын ұсынады. Ионды гель түзілу, еріткіштерді буландыру әдісі, микро/наноинкапсуляция - полисахарид негізіндегі жүйелерде

дәрілік заттарды физикалық ұстау үшін кеңінен қолданылатын әдістердің бірі [171].

Екі валентті катиондардың көпшілігі ($Ca^{2+,}$ $Sr^{2+,}$ Cd^{2+} , Co^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+} және Zn^{2+}) және кейбір үш валентті катиондар (Fe^{3+}, Cr^{3+}, Al^{3+}, Ga^{3+}, Sc^{3+} және La^{3+}) альгинаттың G-блоктарымен әрекеттесіп, үш өлшемді жүйе құра алады. Әдетте катионның атомдық радиусы неғұрлым үлкен болған сайын, соғұрлым полимерлі матрица күштірек тігілген болады. Ba^{2+} және Sr^{2+} тәрізді иондық радиустары үлкен екі валентті иондар Ca^{2+} ионы негізіндегі бөлшектерге қарағанда берік алгинатты гель бөлшектерін түзуге қабілетті. Ал атомдық радиусы кіші Mg^{2+} ионы альгинатқа тігуші агент бола алмайды [172]. Жасушаларды иммобилизациялауда Ba^{2+} және Sr^{2+} иондарын қолдану кезінде аз концентрация шамасына қарамастан уыттылығы байқалған [173]. Ca^{2+} ионы қалыпты жағдайда қолдану кезіндегі уытсыздығы және альгинатпен жақсы байланысу қабілеттілігіне байланысты альгинатты гидрогельдерді түзуде ең жиі қолданылатын екі валентті катион болып табылады [174].

Глутаральдегид - молекулалық массасы төмен, түссіз, суда, спиртте және органикалық еріткіштерде еритін, өткір иісі бар бифункционалды альдегид. Әдетте pH = 3 - 4 аралығында болатын, сулы ерітінді түрінде болады [175]. Глутаральдегидпен тігу гидрогельдердің физикалық және химиялық қасиеттерін жақсартудың ыңғайлы және тиімді әдісі болып есептеледі, себеі оның амин, имидазол және тиол функционалдық топтарымен байланысуы жоғары. Кейбір зерттеушілер қышқылдық жағдайда гидроксил топтары глутаральдегидпен тігіле алатындығын болжамдаған, себебі қышқыл орта гидроксил және глутаральдегидтің альдегид топтары арасындағы ацетилдеуді катализдей алады [176]. Глутаральдегид пен амин топтарының арасында түзілетін коваленттік байланыстар бастапқы түстің сарыға өзгеруіне әкеледі. Қышқыл ортада глутаральдегидтің амин топтарымен реакциясы амин тобының нуклеофильді шабуылы түрінде жүзеге асады. Протондалған амин топтары карбонилді көміртекке шабуыл жасау қабілетін жоғалтқанымен, қышқылдық жағдайда дегидратация тез жүреді. Амин топтары мен глутаральдегидтің әрекеттесуінен түзілетін Шифф негіздері аса қышқыл ортада тұрақсыз болып келеді, иминдік байланыс гидролизге ұшырап, глутаральдегид пен амин топтарын қайта қалпына келтіре алады. Қыздыру немесе ультрадыбыстық сәулелену бейтарап және қышқыл pH шарттарында глутаральдегидпен тігілген полимерлерді еріте алады [177].

Карбодимидті қосылыстар уытсыз, биоүйлесімді, карбоксил және амин топтары арасындағы амидтік байланыстарды қамтамасыз етеді. Дегенмен глутаральдегидпен салыстырғанда карбодиимид арқылы тігілген матрицалардың механикалық қасиеттері нашар, беткі қабаты жұмсақ және ыдырау уақыты аз болады [178]. Ең көп қолданылатын карбодиимидтер 1-этил-3-(-3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC) және N,N-дициклогексилкарбодиимид (DCC) болып табылады. EDC – қышқыл ортада карбоксил топтарын активациялауға қабілетті суда еритін тігуші агент. EDC көмегімен карбоксил топтарын активациялау үшін оңтайлы pH мәні әлсіз

қышқыл орта шарттары болып табылады. pH < 7 шартында EDC протонданууы және карбоксил топтарының иондануы жүреді. DCC EDC сияқты карбон қышқылдарын амин топтарымен тігеді, бірақ DCC суда ерімейтін болғандықтан негізінен органикалық синтезде қолданылады [179].

Соңғы уақыттарда натрий триметафосфаты табиғи полимерлер үшін тігуші агент ретінде қолданылуда. Полимер тізбегін натрий триметафосфатымен тігу процесі бастапқы pH > 10, бірқалыпты температурада бірнеше сағат бойы араластыруды, содан кейін құю немесе мұздату арқылы кептіруді талап етеді [180]. Полимер тізбектерінің сілтілік ортадағы тұрақтылығын ескеру қажет. Келтірілген шектеуге қарамастан, натрий триметафосфатымен тігілген гидрогельдер жақсы 3D матрицалар болып табылады. Мысалы, натрий триметафосфатымен тігілген пуллулан тізбектері балық терісінен алынған коллагеннің екінші реттік полимер ретінде гидрогельдік матрицаға қосылуына мүмкіндік берген.

Поликарбон қышқылдары полисахаридтер үшін 50 жылдан астам уақыт бойы тігуші агент ретінде қолданылып келе жатыр. Карбон қышқылдары спирттермен әрекеттесіп, күрделі эфирлер түзеді, қосалқы өнім ретінде су молекуласын бөліп шығарады. Барлық полисахаридтердің тізбектерінде карбоксил топтарымен әрекеттесіп, тұрақты күрделі эфир байланыстарын түзетін бірнеше гидроксил топтары болады. Кейбір полисахаридтік тізбектерде гидроксил тобымен қатар карбоксил топтары да болады. Бұл жағдайда тізбек ішілік және тізбек аралық этерификация орын алуы мүмкін [181].

N,N-метиленбисакриламид (МБА) – акрил қышқылы және акриламид негізіндегі гидрогельдер алуда қолданылатын бифункционалды молекула. Соңғы жылдары көптеген зерттеулер МБА көмегімен тігілген полисахаридтер, ақуыз және мономерлер негізіндегі альгинат / хитозан / акриламид және желатин / декстрин / акриламид тәрізді гидрибді материалдарды синтездеуге арналған. Бұл материалдар әдетте бос радикалдар жарық, кернеу, механикалық күш немесе химиялық инициялеу жолдарымен активтендірілетін бос радикалды полимерлеу әдісімен дайындалады. МБА мен полимерден бөлек, термосезімтал инициатор және белсенді орталықтарды мономерлерге көшіру көршілес мономерлермен ары қарай әрекеттесіп, тігулі процесіне және тізбектің жалғасуына алып келеді [182].

1.8.1 Табиғи тігуші агенттер

Құрылымында альдегид тобының болуына байланысты ванилин біріншілік аминдермен әрекеттесіп, Шифф негізін (имин) түзеді. Гидроксил тобының бұрын қалыптасқан Шифф байланысына қатысты пара - орында орналасуы көрші тізбектің бастапқы тізбегінде орналасқан гидроксил немесе амин топтарымен сутектік байланыстың түзілуіне жауап береді [183]. Ванилинмен тігілген хитозан гидрогельдері әдетте қышқыл ортада алынады, себебі хитозан pH<4,5 шамасынан төмен болғанда ғана ериді. Алдымен тігуші агент этанол немесе ацетон сияқты полярлы органикалық еріткіште ерітіледі, содан кейін оны интенсивті араластыру кезінде 2% сірке қышқылындағы хитозан

ерітіндісіне тамшылатып қосады. Осыдан кейін еріткіштің буланып, нәтижесінде сарғыш түсті ванилинмен тігілген хитозан гидрогельдері алынады. Иминдік байланыстардың түзілуін FTIR спектроскопиясы арқылы дәлелдеуге болады, типтік иминдік жолақ 1637 $см^{-1}$ аймағында пайда болады [184].

Таннин қышқылы - ауа өсімдіктерінің ұлпаларында кездесетін табиғи полифенолды қосылыс. Ол бес дигалл қышқылымен эфирленген глюкоза сақинасынан тұрады. Таннин қышқылы молекуласында карбоксил тобы болмаса да, оны қышқылдық сипатына жауап беретін көптеген фенол топтарының болуына байланысты «қышқыл» деп атайды. Тігілу модификациялары негізінен физикалық өзара әрекеттесу немесе химиялық байланыс арқылы жүзеге асады. Таннин қышқылының фенолды гидроксил топтары лизинмен, тирозинмен және цистеинмен оңай әрекеттесе алады. Сол себепті таннин қышқылы желатин мен коллаген үшін ақуыздардың табиғи тігуші агенті ретінде кеңінен қолданылды. Фенолдық қосылыстар мен ақуыздар немесе аминофункционалды полисахаридтер арасындағы коваленттік байланыс фенолдық құрылымдардың сілтілік ортада хинондық аралық өнімдерді беріп, бастапқы тотығуын қамтиды [185].

1.8.2 Ферменттер тігуші агент ретінде

Табиғи процесте ферменттердің бірнеше кластары белоктардың коваленттi байланысын немесе тігілуін катализдейді. Әртүрлі көздерден ферменттерді алу және өндірудегі жетістіктер шығындарды азайтып, гидрогельдердің синтезі үшін ферменттерді перспективті тігуші агент етеді. Табиғи протеиндерге негізделген инъекциялық гидрогельдер адамның миы мен көз тіндерін имитациялай алатын, сонымен бірге сүйек, шеміршек немесе терідегі созылмалы жарақаттарды толтыра алатын жұмсақ матрицаларды алуға арналған. Ферменттік жолмен тігілген гидрогельдердің серпімділік (Юнг) модулі басқа тігуші агенттермен тігілген гидрогельдермен салыстырғанда төмен болады. Трансглутаминаза, тирозиназа, лакказа және сортаза А пероксидазалары тігуші агент ретінде жиі қолданылатын ферменттер болып табылады. Гидрогельдер температура немесе pH шарттарына сезімтал болуы мүмкін екенін ескере отырып, қажетті қасиеттерге қол жеткізу қиын міндет болып табылады. Ақуыздың денатурациясын болдырмау үшін реакция температурасы жұмсақ диапазонда сақталады [186].

1.8.3 Гидрогельдер өндірісіндегі «клик химия»

Алғаш рет Шарплесс және т.б. авторлар 2001 жылы «клик химия» терминін енгізген. Бұл терминді екі молекулалық заттар немесе компоненттер жұмсақ реакция шартында әрекеттесуге ұшырағанда өнімнің жоғары шығымына әкелетін, жылдам, өздігінен жүретін және өте таңдамалы реакциялар класы деп сипаттайды. Гидрогельдердің синтезіне арналған бірнеше белгілі реакциялар «клик химия» тәсіліне сәйкес келеді. Оларды үш топқа бөлуге болады, оларға мыс-катализине негізделген азидті-алкинді циклдендіру (Cu-AAC); мыссыз «клик химия» реакциялары, мысалы, Дильс-Альдер (DA)

реакциялары, радикалды механизммен жүретін тиол-ен және оксим түзілу реакциялары [187]. Соның үшінде ақуыздың және полисахарид негізіндегі гидрогельдердің түзілуіне қатысты кликтік химия реакцияларына тоқталып өтеміз.

Желатиннің физикалық тігілуі сутегінің ішкі және молекулааралық байланыстары арқылы өздігінен индуцирленді, бұл төмен қаттылықтағы гидрогельдердің түзілуіне әкеледі. Осыған байланысты желатин негізіндегі гидрогельдердің механикалық қасиеттерін жақсарту үшін CuAAC, DA және радикалды механизммен жүретін тиол-ен және оксим түзілу реакцияларын қамтитын «клик химия» әдістері қолданылған [188]. Алкинді функционалданған желатиннің диазидтермен CuAAC реакциясы диазидтің желатинге қатынасы және диазидтің механикалық қаттылығы бойынша сәйкес келетін механикалық қасиеттері бар гидрогельді желілерді алуға мүмкіндік берген [189].

Әр түрлі «клик химия» реакцияларын біріктіру арқылы тігілген альгинат гидрогельдері алынған. Ван және т.б. ғалымдар Дильс-Альдер (DA) және радикалды механизммен жүретін тиол-ен және оксим түзілу реакциялары арқылы альгинат негізіндегі гидрогельдерді алған. Біріншіден, натрий альгинатының карбоксил топтары мен фуранның амин топтары арасындағы амидация арқылы фурилмен модификацияланған натрий альгинаты алынған. Содан кейін бималеимидті ПЭГ модифицирленген натрий альгинатымен араластырылып, NaAlg/PEG гидрогелі түзілген. Цистеинінді (HHC10) топпен аяқталатын пептид HHC10-CYS гидрогельге окси-норборнен тобы мен тиол тобы арасына тиол-эн реакциясы арқылы егіліп, нәтижесінде NaAlg/PEG-HHC10 микробқа қарсы гидрогельдері алынған. Гидрогельдің механикалық қасиеттері кернеудің (33,01 кПа) және қысу модулінің (52,53 кПа) ең жоғары мәнін көрсеткен [190].

1.8.4 Макромолекулалық тігуші агенттер

Макромолекулалық тігуші агенттер тізбек соңында функционалдық топтары бар олигомерлер немесе төмен молекулалы массалы полимерлер болып табылады. Тізбектің екі ұшы бірдей функционалды топтан тұратын болса, гомофункционалды деп аталады. Егер екі жақтағы реакцияға қабілетті топтар әртүрлі болса, олар гетерофункционалды деп аталады. ПЭГ және декстран негізіндегі макромолекулалық тігуші агенттер биоүйлесімділігі мен реакциялық қабілеттілігіне байланысты қызығушылық тудыртады. Тізбек соңына бекітілген функционалдық топтар полисахаридтердің (гидроксил, амин және карбоксил топтары) немесе ақуыздардың (амин, қышқыл карбоксил және сульфгидрилді топтары) ішкі функционалдық топтарына қатысты реакцияға қабілетті болуы керек. Біріншілік амин топтарына қатысты жоғары реакциялық қабілеттілігіне байланысты N-гидроксисукцинимидтің күрделі эфирлері (NHS эфирлері) және имидоэфирлер ақуыздарды тігуде жиі қолданылатын функционалды топтарға жатады [191].

1.9 Дәрілік заттардың полимерлі тасымалдаушылардан босап шығу процесі

Полимерлі тасымалдаушыларға қойылатын негізгі талаптардың бірі олардың гидролиз бен ферменттердің әсерінен организмдегі биоыдырағыштығы болып табылады. Полимерлер құрылымына байланысты ыдырайды. Дәрілік заттардың босап шығуы процесі полимер қабықшасының табиғатына тәуелді. Полимер қабықшаларының екі түрі қолданылады:

- сұйық ортадағы төмен молекулалы заттарды өткізбейтін капсула қабықшасы. Микрокапсуланың ішіндегі төмен молекулалы сұйық молекулаларының диффузиясы нәтижесінде капсулаларды ішінен жарып жіберетін осмостық қысым пайда болады. Микрокапсула бұзылған кезде ядроның босауы жүзеге асады.

- ядро өткізгіш капсула қабықшасы. Дәрілік заттың жүйеден босап шығу жылдамдығы полимер қабықшасының қалыңдығы мен ісінуіне, оның кеуектілігіне, кеуек өлшеміне, дәрілік заттың концентрация градиентіне және т.б. тәуелді.

Полимерлер, төмен молекулалы заттар сияқты ағзаға енгізілгенде әр түрлі қасиеттер көрсете алады. Бірінші жағдайда, олар ешқандай өзгеріссіз организмнен бүйрек арқылы өте тез, бір тәулік аралығында шыға алады. Екінші жағдайда, олар ішкі ағзалар мен тіндерге шөгіп, олардан апталар мен айлар бойы бірте-бірте босатылуы мүмкін, кейде жылдар бойы сақталады. Бұл жағдайда патологиялық процестердің пайда болу ықтималдығы жоғары. Үшінші жағдайда, кейбір полимерлер организмде тез метаболизденуі мүмкін, яғни биологиялық ыдырауға ұшырайды, нәтижесінде төмен молекулалық массалы фрагменттері бүйрек арқылы шығарылады. Денсаулық қауіпсіздігіне байланысты ағзаға енгізілген кез келген бөгде зат ақылға қонымды уақыт ішінде ағзадан шығарылуы қажет. Полимерлердің бақыланатын биоыдырауы полимерлердің ағзадан шығарылуын бақылап қана емес, сонымен қатар дәрілік заттың әсер ету орны мен ұзақтығын реттеуге мүмкіндік береді [192].

2.0 Гидрогельдер, ақуызды полисахаридті полиэлектролитті комплекстер

Гидрогельдер суда және сулы ерітінділерде қайтымды ісінуі қабілеттілігі бар гидрофильді макромолекулаларға негізделген құрылымды жүйелер. Үш өлшемді полимерлі тордың болуы гидрогельдерді қатты заттардың серпімділік және беріктік, пішінді сақтау қабілеттілігі және аққыштықтың болмауы тәрізді механикалық қасиеттерімен қамтамасыз етеді [193].

Ақуыздар мен полисахаридтер әр түрлі желілік гель құрылымдарын құра алады: бір-біріне енетін, байланысқан және фаза бойынша бөлінген желілер [194].

Бір-біріне енетін желілер тек физикалық түрде шиеленіскен екі полимерді қамтиды. Бұндай жүйе екі полимер арасындағы химиялық әрекеттесулерді қамтымайды. Байланысқан желілер жағдайында бір желінің пайда болуына ықпал ететін екі полимер арасында өзара әрекеттесу болады. Байланысқан желі

үшін оңтайлы деңгейлер әр полимер тізбегіндегі қосылу аймақтарының санына байланысты. Байланысқан желі сонымен қатар анионның катионмен ассоциациясы немесе коваленттік байланыс арқылы екі бөлек полимер тізбегінің байланысуын көрсетуі мүмкін. Гель түзілу процесі бастапқыда кешендер мен коацерваттардың түзілуіне ұқсас жолмен жүреді, содан кейін кешендердің ұлғаюы мен жүйенің фазалық бөлінуінің орнына торлы құрылымға әкелетін еріген кешендердің өзара әрекеттесуі жүреді. Байланысқан гель желілері альбумин, желатин, натрий альгинаты, лизоцим, каррагенан және т.б. негізіндегі көптеген ақуыз-полисахаридтік жүйелер негізінде түзіле алады [195]. Гельдер фаза бойынша бөлініп, полимерлер бір-бірімен әрекеттеспейтін полимер матрицасын құрайды. Бұндай жүйе басым фазадан (әдетте үздіксіз желі) және «толтырғыш» фазадан (енгізілген полимер) тұрады [196].

Гидрогельдер қатты құйма, жабын, престелген белсенді матрицалар (капсулалар және пероральді таблеткалар алуда қолданылады), микробөлшектер мен түйіршіктер (дәрілік заттың бақыланып босап шығуында дәрілік резервуар ретінде пайдаланылады), инкапсуляцияланған қатты заттар, капсулаланған сұйықтықтар (салқындату немесе қыздыру кезінде гельдерді түзу үшін пайдаланылады), адгезивті агенттер (биоадгезивті тасымалдаушылар мен таңғыштарды дайындау үшін қолданылады) тәрізді әртүрлі физикалық формаларды қабылдауы мүмкін.

Гидрогельдер ісінген күйінде биологиялық тіндермен ұқсастыққа ие және пластикалық пен биоүйлесімділікті сақтай отырып, өте жақсы механикалық қасиеттерді көрсетеді [197].

Ақуыздар сутектік, электростатикалық, иондық және гидрофобты байланыстар арқылы әрекеттесе отырып полисахаридтермен комплекстер түзуде және олардың тұрақтылығын сақтауда айтарлықтай рөл атқарады. Табиғаты бойынша гидрофильді болғандықтан, полисахаридтер әдетте сулы фазада қала алады, сол арқылы олардың реологиялық қасиеттерін бақылауға болады. Орта шартына (pH, температура, молекулалық масса, иондану дәрежесі, иондық күш және биополимерлердің заряд тығыздығы) байланысты ақуыздар мен полисахаридтердің сулы ортадағы өзара әрекеттесуі полиэлектролиттік кешендердің (ПЭК) түзілуіне алып келуі мүмкін [198]. ПЭК макромолекулалар бір-бірімен негізінен электростатикалық әрекеттесу арқылы байланысатын қарама-қарсы зарядты екі биополимерлер арасында түзіледі [199]. Ақуыз-полисахаридті ПЭК негізінен сфероидты формада болады және зарядталған тұрақтандырғыш қабықшаны түзуге мүмкіндік беретін, полиэлектролиттердің біреуінің артық мөлшерімен қоршалған, катиондық және аниондық биополимерлердің стехиометриялық қоспасы бар бейтарап ядродан тұрады [200]. Биологиялық және технологиялық функцияларды жақсартуда ақуыз-полисахаридті композиттер көптеген мүмкіндіктер береді. Ақуыз - полисахаридті композициялық материалдар негізінде зақымдалған мүшелерді қалпына келтіруге арналған жасанды тіндерді, жараларды емдеуде қолданылатын және дәрі-дәрмек жеткізудің тиімді жүйелерін қамтитын заманауи қолданбаларды алуға болады [201].

2.1 Желатин негізіндегі биополимерлі тасымалдағыштар

Биополимерлер синтетикалық полимерлерді жақсы алмастыра алады, синтетикалық полимерлерге байланысты көптеген жанама әсерлерді табиғи полимерлердің көмегімен жақсартуға болады. Биополимерлерге негізделген дәрілік заттардың көп функциялы босап шығу жүйелерінің дамуы биологиялық молекулалардың функционалдығын сақтай алады. Медициналық қолданудағы биополимерлі кешендердің артықшылығы - адам денесі мен полимерлі композиттер арасындағы ұқсастық болып табылады [202].

[203] жұмыста натрий альгинаты мен желатиннің композиттері *Bacillus subtilis* SL-13 микробтық фунгициді эмульсиялау / ішкі гель түзілу әдісімен диспергирленген микронды микрокапсулалларды алуда қолданылған. Натрий альгинатына желатинді қосу барысында микрокапсулалардың ісіну коэффициенті, биодеградациясы мен өлшемі артқан.

Куркуминді инкапсуляциялау және күміс нанобөлшектерін тұрақтандыру үшін GelCurAg терапевтік композитін түзетін желатин қолданылған. Зерттеу нәтижелері 1% желатин ерітіндісінен синтезделген композиттің күшті бактерицидтік және антиоксиданттық қасиеттері бар екенін көрсеткен [204].

[205] зерттеуде хош иісті ұнтақ желатинді, гуммиарабикты қолдана отырып, көп ядролы капсулаларға инкапсуляцияланған. Зерттеу нәтижелері желатин пандан хош иісін гуммуарабикке қарағанда жақсы байланыстыратынын көрсеткен. Жалпы, желатинмен инкапсуляция хош иісті ұнтақтың тұрақтылығын едәуір жақсартқан.

Желатин – коллагеннен гидролиз арқылы алынатын ақуыз қосылысы. Физиологиялық ортадағы биожетімділігі мен биологиялық ыдырағыштығына байланысты желатин медицинада және фармацевтикада гель түзуші ретінде кеңінен қолданылады [206]. Желатин гидроксил және гидрофобты топтары бар, оң және теріс зарядталған табиғи полиамфолит. Желатин макромолекуласының оң заряды аргинин (Arg), лизин (Lys), гидроксилизин (Hyl) және гистидин (His) қалдықтарымен қамтамасыз етіледі, олардың В типті сілтілі желатиндегі концентрациялары 1000 амин қышқылы қалдықтарына шаққанда тиісінше 48-49, 22-28, 4-9 және 4-5 шамасында болады. Концентрациялары 1000-ға шаққанда 72 және 46–48 шамасында болатын глутамин қышқылы (Glu) және аспарагин қышқылы (Asp) қалдықтары теріс зарядтың болуын қамтамасыз етеді. Гидроксил топтары концентрациялары тиісінше 1000-ға шаққанда 92–94, 33–39, 17–19 және 4–5 болатын гидроксипролин (Hyp), серин (Ser), треонин (Thr) және тирозин (Тир) қалдықтарының нәтижесінде түзіледі [207]. Сулы ерітінділерде желатин табиғи ионды полисахаридтермен (альгинат, каррагинан, хитозан және т.б.) комплекстер түзеді, молекулааралық электростатикалық әрекеттесулер нәтижесінде тұрақтанады, тұрақтандыруда көп жағдайда сутектік байланыстар басты рөл атқарады. Гидрофобты әрекеттесулер де комплексті тұрақтандыруда кішігірім үлес қосады [208, 209].

Желатин тін инженериясында жақсы биоүйлесімділік, матрицалық металлопротеиндік деградацияны көрсетеді [210]. Желатиннің молекулалық тізбегіндегі функционалды топтарға әр түрлі химиялық модификацияларды

жасаудың қолжетімділігі дәрілік заттарды тасымалдау жүйесінде пайдалы болып табылады [211]. Желатиннің пептидтік тізбегі жасушаның адгезиясы мен ферментативті деградациясын жеңілдетеді. Медицинада қан көлемін кеңейтуші ретінде қауіпсіздігі, иммуногенділіктің жоқтығы және төмен құны жасушаларды тасымалдауда желатинді қолдануға мүмкіндік береді [212]. Желатин құрылымында аргинилглициласпарт қышқылының (RGD тізбегі) болуы желатиннің биологиялық сипаттамасын басқа синтетикалық полимерлерден ерекшелендіреді, себебі бұл амин қышқылдарының тізбегі жасушаларды анықтай алады және жасуша адгезиясын модульдей алады [213].

Дәрі-дәрмектерді желатинге инкапсуляциялау кезінде ол дәрі-дәрмектің белгілі бір жерлерге жеткізілуін қамтамасыз етіп, тұрақтылығын арттырады және дәрінің босап шығуын бақылайды [214]. Желатин сонымен қатар дәрі-дәрмектердің бақыланып шығарылуы кезінде альгинаттың қасиеттерін жақсарту үшін де қолданылады. [215] зерттеуде альгинат үлдірінің құрамына желатинді қосу дәрілік заттың гомогенді дисперсиясына ықпал еткен. Рентгеноқұрылымдық зерттеулер желатинді үлдірге қосу үлдірде полимер – дәрілік зат кристалды микроагрегаттарының болуын дәлелдеп, үлдірдің кристалдылығын арттыратындығын көрсеткен.

Желатин - гидрогельдер алуда кеңінен қолданылатын ерігіштігі жақсы ақуызды коллоген болып табылады. Теріс зарядталған қышқыл немесе оң зарядталған негіздік желатинді алу мақсатында оның изоэлектрлік нүктесін өндіріс барысында өзгертуге болады. Теориялық тұрғыда бұл зарядталған биомолекула мен қарама қарсы зарядты желатиннің арасында электростатикалық өзара әрекеттесудің жүруіне мүмкіндік береді. Желатиннің осы мүмкіндігі желатин негізіндегі жүйелердің гендік инженерия, дәрілік заттарды тасымалдау тәрізді әр түрлі салаларда қолданылуына алып келді [216]. Желатин - табиғи, уытты емес макромолекула болғандықтан нанобөлшектердің материалы ретінде қолданыста бірнеше артықшылықтарға ие. Әдебиет көздерінде желатин негізіндегі нанобөлшектер безгек ауруына қарсы белгілі дәрілік зат хлорохинфосфатты [217] және рак ауруына қарсы препарат метотрексатты [218] жүктеуде, адреномедуллин генін [219] жеткізуде қолданылғаны келтірілген.

Желатинді анионды полисахаридпен гель түзуші ретінде біріктіру желатинді гельдердің физика-химиялық қасиеттерін, оның ішінде беріктігі мен балқу температурасын өзгертудің тиімді әдісі болып табылады [220].

Альгинат пен желатиннен алынған композициялық матрица екі полимердің де синергетикалық пайдалы аспектілеріне ие. Алынған материалдың суды сіңіру, биоүйлесімділік, жұмсақ антисептикалық және биоыдырағыштық қасиеттерге ие екендігі анықталған [221].

Глутар альдегиді коллагенді материалдарды тұрақтандырудағы жоғары эффективтілігі үшін кең қолданылатын тігішу агенттердің бірі болып табылады [222]. Глутар альдегидінің құрылымындағы (-CHO) альдегид тобы -NH_2, -COOH, -OH тәрізді көптеген функционалды топтармен әрекеттесіп, композиттердің механикалық беріктігін арттыруға мүмкіндік береді [223].

Глутаральдегид танымал бифункционалды қосылыс. Біріншілік амин топтары бар протеин және полимерлермен глутаральдегид өзінің карбонил тобы мен полимердің протондалмаған амин тобының өзара әрекеттесуі арқылы Шифф негізін түзіп, оңай әрекеттеседі [224]. Ерітіндіде глутаральдегид әртүрлі тепе-теңдік күйінде болуы мүмкін. Тепе-теңдік қоспасының құрамына pH мәнін 3.0-ден 4.2-ге дейін жоғарылату іс жүзінде әсер етпейтіндігі, ал pH = 5.6 кезінде диальдегидтің сызықтық формаларының мөлшері артатындығы 13C-ЯМР спектроскопия әдісімен көрсетілген [225]. Дәрілік заттарды жеткізуде қолданылатын желатин/гиалурон қышқылы негізіндегі материалдардың қасиеттерін жақсарту үшін глутаральдегид немесе 1-этил-(3-3-диметиламинопропил)карбодиимидті (EDC) тігуші агент ретінде қолдану қарастырылған. EDC сұйытылған қышқылмен немесе сумен жуу арқылы артық реагентті оңай кетіруге болатын, қауіпсіз және биоүйлесімді тігуші агент болып табылады. Бірақ желатин немесе хитозан матрицасы үшін оның тігу күші төмен [226]. Химиялық тігуше агенттердің ішінде коллагенді материалдарды тұрақтандырудағы жоғары тиімділігіне байланысты глутаральдегид ең көп қолданылатын тігуші агенттердің бірі болып есептеледі.

Глутаральдегидпен химиялық тігу in situ немесе ex situ процестері арқылы жүзеге асады. Глутаральдегидтің сулы ерітіндісі мен биополимерді араластыру барысында in situ процесі деп аталатын бір этапты тігу процедурасы жүреді. Гидрогельді глутаральдегид ерітіндісіне енгізу немесе гидрогельге глутаральдегид буымен әсер ету ex situ процесі деп аталады. Екі әдіс те тұрақты материалдар алуға мүмкіндік береді [227, 228].

Инсулинді пероралды жеткізу кезінде қолданылатын матрица оны асқазан жолындағы деградациядан қорғауы қажет [229]. Асқазанның pH мәніне сәйкес келетін төмен pH мәндерінде тұрақты болып, ішек жолының pH мәндерінде инсулинді босатуы тиіс. Негізгі міндет инсулин активтілігін сақтау және оның ішектен қанға эффективті түрде тасымалдануын қамтамасыз ету, асқазан ішек жолындағы протеазалардан қорғау болып табылады. Биополимерлер негізінде алынған бөлшектер асқазан ішек жолында ұзақ мерзімде болуды қамтамасыз ете алуы керек. Альгинат негізіндегі бөлшектер мукоадгезивті болғандықтан, олардың аш ішекте болу уақыты ұзарады және эпителиймен берік байланыста бола алады [230]. Ал инсулинді пероралды жеткізуге арналған матрицаның құрамында ферменттерге субстрат бола алатын биополиэлектролиттің, яғни желатиннің болуы, алынған бөлшектердің қоршаған ортада осындай ферменттердің әсеріне деген сезімталдығын арттырып, өз кезегінде полиэлектролитті қабықтың инсулинге қатысты өткізгіштігін өзгертуге мүмкіндік беріп, жүктелген инсулинді босатып шығарады. Альгинат негізіндегі бөлшектерді алуда тігуші агент ретінде қолданылатын екі валентті катионға Ca^{2+} глутар альдегидін қосу биополимерлердің ферменттердің протеолитикалық әсеріне деген тұрақтылығын арттыруы қажет.

2 ТӘЖІРИБЕЛІК БӨЛІМ

2.1 Зерттеу нысандары

Натрий альгинаты (19 - 40 kDa, Sisco Research Laboratories, Түркия); желатин (The Kraft Heinz Company, АҚШ); L - глутамин қышқылы (99% + кристалды, Titan Biotech Limited, Үндістан); лимон қышқылы (аса таза, Titan Biotech Limited, Үндістан); кальций хлориді (Fisher Scientific Company, АҚШ); Na КМЦ (таза, ТШ 2231-002-50277563-00, Ресей); хитозан (төмен молекулалы массалы, 103 kDa, деацетилдену дәрежесі 85.6%) Sigma Aldrich (St. Louis, АҚШ);); глутар альдегиді (Sigma - Aldrich CO, Германия); инсулин – протафан (Novo Nordisk A/S, Данияпепсин (Sigma - Aldrich CO, USA).

2.2 Зерттеу әдістері

2.2.1 Ионотропты гель түзілу әдісі арқылы альгинат бөлшектерін алу

Альгинат бөлшектерін ионотропты гель түзілу әдісімен алу үшін натрий альгинатының 1% сулы ерітіндісі дайындалды. Натрий альгинатының ерітіндісі шамамен 15 см биіктіктен диаметрі 0,8 мм TopPette (DLAB Scientific Co., Ltd., Қытай) дозаторы көмегімен тігуші агент ерітіндісіне тамызылды. Тігуші агент ретінде $CaCl_2$ ерітіндісі қолданылды.

Бөлшектерді алу әдісін оптимизациялау мақсатында тігуші агент ерітіндісінің әр түрлі концентрациялы (0.5%; 1.0%; 1.5%; 2.0%) ерітінділері дайындалып, зерттелді. Натрий альгинатының бөлшектері тігуші агент ерітіндісіне 30 мин салынып, 30 мин полимеризациядан кейін түзілген бөлшектер фильтрация көмегімен жиналып, деионизацияланған сумен шайылды.

2.2.2 Модельді асқазан ішек жолы шарттарындағы бөлшектердің ісіну кинетикасы

Бөлшектердің ісіну кинетикасы олардың уақыт бойынша массаларының артуына негізделіп анықталынды. Бөлшектер модельді асқазан ішек жолының ерітінділеріне салынып, олардың массалары әрбір 30 мин сайын 180 мин аралығында өлшенді. Зерттеу кезінде қолданылған модельді асқазан ішек жолы ерітінділері мен олардың pH мәндері төмендегі 2 - ші кестеде көрсетілген.

Ісіну дәрежесі келесі теңдеу бойынша есептелінеді:

$$K = \frac{m_t}{m_0} \qquad (1)$$

Мұндағы, m_t – t уақытындағы бөлшектер массасы, мг; m_0 – бастапқы уақыттағы бөлшектер массасы, мг.

2 - кесте. Модельді асқазан ішек жолының ерітінділері мен олардың pH мәндері [231]

Модельді асқазан ішек жолының ерітінділері	pH мәні
0.1 н HCl	1.0
25℃ қаныққан калий гидрофталаты	4.01
Фосфатты буфер	6.86
0,01 моль/л натрий тетраборатының ерітіндісі	9.18

2.2.3 Альгинат бөлшектерін желатинмен қаптау

Альгинат бөлшектерін қорғаныш желатин үлдірімен қаптау үшін 8% желатиннің сулы ерітіндісі дайындалды. Ионотропты гель түзу әдісімен алынған альгинат бөлшектері желатин ерітіндісіне 30 мин салынды. 30 мин кейін бөлшектер желатин ерітіндісінен фильтрация арқылы бөлініп алынды және деионизацияланған сумен шайылды.

2.2.4 Желатин үлдірімен қапталған альгинат бөлшектеріне инсулинді иммобилизациялау

Инсулинмен жүктелген бөлшектерді алу үшін құрамында 0.28 мг/мл инсулин бар 1% натрий альгинатының 50 мл ерітіндісі тігуші агент болып табылатын 1.5% $CaCl_2$ ерітіндісіне тамшылатып қосылады. 30 мин кейін түзілген бөлшектер фильтрация көмегімен жиналып, желатин үлдірімен қапталынды.

2.2.5 ИҚ спектроскопия

Үлгілердің ИҚ спектрі Cary 660 Agilent ИҚ Фурье спектрометрінде (Agilent Technologies, АҚШ) алынды.

2.2.6 Атомдық күш микроскопиясы

Атомдық күш микроскоп бейнелері Ntegra Therma (NT-MDT, Ресей) атомдық күш микроскопының жартылай контактілі режимінде түсірілді.

2.2.7 Инсулиннің босап шығу кинетикасы

Инсулиннің босап шығу кинетикасы диапазоны 200-1000 нм аралығындағы UV-7504 (Shanghai Hansom Technology & Sales Limited, Қытай) УК-спектрофотометрін қолданып, 280 нм толқын ұзындығында анықталынды.

Инсулинмен жүктелген бөлшектер pH мәндері (pH = 1.0; 4.01; 6.86; 9.18) болатын, асқазан ішек жолының әр түрлі бөліктерінің шарттарын модельдейтін 20 мл буфер ерітінділеріне салынып, 37 °C температурада (100 айналым/мин) инкубацияланды. Белгілі бір уақыт аралығында буферлі ерітінділердің

аликвоталары алынып, инсулин концентрациясы анықталынды. Аликвоталардың мөлшері жаңа буферлі ерітінділердің дәл сондай мөлшерімен компенсацияланды.

2.2.8 Желатин негізіндегі үлдірлерді алу

Желатин негізіндегі үлдірлерді алу үшін желатиннің 8% сулы ерітіндісі және хитозанның (0.25%; 0.50%; 0.75%; 1.0%), лимон қышқылының (0.15%; 0.25%; 0.50%; 0.75%; 1.0%), L-глутамин қышқылының (0.25%; 0.50%; 0.75%; 1.0%) ерітінділері дайындалынды. Хитозан, лимон қышқылы және L-глутамин қышқылының әр түрлі концентрациялы ерітінділері желатиннің 8% сулы ерітіндісімен 1:1 қатынаста V_1:V_2, магниттік араластырғышта 1500 айн/мин шартында 10 минут аралығында араластырылды, қоспаның жалпы көлемі 100 мл болуы тиіс. Араластырылған қоспаны шыны табақтарға құйып, 25˚С термостатта 24 сағат бойы ұсталынды. Түзілген үлдірлерді табақ бетінен бөліп, 12 х 4 см өлшемді үлгі түрінде кесіп, олардың серпімділік модулі және беріктік қасиеттері анықталынды.

2.2.9 Желатин негізіндегі үлдірлердің модельді асқазан ішек жолы ортасындағы өзгерістерін анықтау

Желатин негізіндегі үлдірлердің pH мәніне байланысты өзгерістері анықталынды. Модельді асқазан ішек жолының ерітінділеріне желатин негізіндегі үлдірлерді 12 х 4 см өлшемді үлгі түрінде кесіп, 30 мин уақытқа салады. 30 мин өткеннен кейін үлдірлер ерітіндіден алынып, кептірілді және олардың құрылымдық - механикалық қасиеттерін анықталынды.

2.2.10 Желатин негізіндегі үлдірлердің үзілу күші мен созылуын анықтау әдісі

Үлдірлердің беріктігі МТ-150 (Ресей) үзілуді сынау машинасында анықталынды. МТ үзілуді сынау машиналары зерттеу үлгілерінің созылу, сығу, серпімділік тәрізді қасиеттерін анықтау кезіндегі деформация және жүктеу күшін өлшеуге арналған. Құралдың жұмыс істеу принципі күш өлшеуші тензорезистрлік сенсордың зерттелінетін үлгіге түсірілген кернеу күшін электр сигналына түрлендіруге негізделген. Зерттеуге ұзындығы 12 см, ал ені 4 см болатындай үлгі дайындалады. Сынақ жұмысын жүргізу барысында үлгінің созылу мәні – мм өлшем бірлігінде және жүктеу күшінің максималды мәні – кг өлшем бірлігінде индикатор бетінде көрсетіледі. Осы алынған мәліметтер бойынша үлдірдің деформация, беріктік және серпімділік модулі сипаттамалары анықталынды.

$$\delta = \frac{F}{S} \qquad (2)$$

мұндағы δ - беріктік, [кПа]; F - үлдірдің үзілу күші, [Н]; S - үлдірдің ауданы, [м^2].

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l} \qquad (3)$$

мұндағы ε- деформация; Δl - үлдірдің созылуы, [мм]; l - үлдірдің бастапқы ұзындығы, [мм].

$$E = \frac{\delta}{\varepsilon} \qquad (4)$$

мұндағы E - серпімділік модулі, [кПа]; δ - беріктік, [кПа]; ε - деформация.

2.2.11 Гибридті тасымалдау жүйелерінің матрицалық дизайны және инсулинді иммобилизациялауға арналған матрицаларды алу жолдарын оптимизациялау

Инсулинді иммобилизациялауға арналған матрицаны оптимизациялау мақсатында натрий альгинаты, натрий альгинаты – желатин жүйесі таңдалынып, тігуші агент ретінде 1.5% $CaCl_2$; 25% глутарь альдегиді (GA); 1.5% $CaCl_2$ – 25% GA қоспасының ерітінділері зерттелінді.

Альгинат матрицалары 1% ALG ерітіндісін шприцтік насос (New Era Pump Systems NE - 300, Inc., АҚШ) көмегімен ультрадыбыстық сандық ваннасына ((VWR, АҚШ) f=35 кГц жұмыс жиілігімен және ультрадыбыстық энергияның айналмалы мөлшерімен (50%, 100%) орналастырылған тігуші агент ерітінділеріне тамшылатып енгізу арқылы алынды. Альгинат үшін тігуші агенттер 1.5% $CaCl_2$; 1.5% $CaCl_2$ – 25% GA қоспасы болды. Алынған ALG бөлшектері тігуші агенттердің ерітінділерінде 30 мин ұсталып, кейін түзілген бөлшектер фильтрация көмегімен жиналып, деионизацияланған сумен шайылды.

ALG – Gel матрицасы 1% ALG және 8% Gel ерітінділерін 1:1 (V_1:V_2) қатынасында араластырып, шприцтік насос көмегімен ультрадыбыстық сандық ваннасына ((VWR, АҚШ) f=35 кГц жұмыс жиілігімен және ультрадыбыстық энергияның айналмалы мөлшерімен (50%, 100%) орналастырылған тігуші агент ерітінділеріне тамшылатып енгізу арқылы алынды. ALG – Gel матрицасы үшін тігуші агенттер 1.5% $CaCl_2$; 25% GA; 1.5% $CaCl_2$ – 25% GA қоспасы болды. Алынған ALG – Gel бөлшектері тігуші агенттердің ерітінділерінде 30 мин ұсталынып, кейін түзілген бөлшектер фильтрация көмегімен жиналып, деионизацияланған сумен шайылды.

2.2.12 Оптимизацияланған матрицаларға инсулинді иммобилизациялау

Алынған матрицаларға инсулинді иммобилизациялау үшін құрамында 0.28 мг/мл инсулин бар 50 мл ALG ерітіндісін; 50 мл ALG – Gel қоспасын шприцтік насос көмегімен ультрадыбыстық сандық ваннасына ((VWR, АҚШ) f=35 кГц жұмыс жиілігімен және ультрадыбыстық энергияның 100% мөлшерімен орналастырылған тігуші агент ерітінділеріне тамшылатып енгізілді.

ALG үшін тігуші агенттер: $CaCl_2$; $CaCl_2$ - GA. ALG - Gel жүйесі үшін тігуші агенттер: $CaCl_2$; GA; $CaCl_2$ - GA.

30 мин кейін түзілген бөлшектер фильтрация көмегімен жиналып, деионизацияланған сумен шайылды.

2.2.13 Стереомикроскопия

Стереокескіндерді алу үшін полимер бөлшектері түзу жүзі бар зертханалық пышақтың көмегімен екі бөлікке кесілді. Алынған полимер матрицаларының құрылымы SMZ-171 TLED (ESD) стереомикроскопының көмегімен зерттелді.

2.2.14 Сканерлеуші электронды микроскопия

Бастапқы және инсулинмен жүктелген үлгілер түзу жүзі бар зертханалық пышақтың көмегімен екі бөлікке кесіліп, «Ted Pella» көміртекті бетке бекітілді және вакуумдық эксикаторда кептірілді. Одан кейін үлгілер EMS 150T ES Coater құрылғысында (Quorum Technologies, Ұлыбритания) шашырату арқылы жұқа алтын қабатымен қапталды және SIGMA FE-SEM өрістік эмиссиялық сканерлеуші электронды микроскопында (ZEISS Sigma, Германия) зерттелді.

2.2.15 Гибридті матрицаға иммобилизацияланған инсулиннің инкапсуляция эффективтілігін анықтау

Инкапсуляция эффективтілігі 275 нм толқын ұзындығында фосфатты буфердегі инсулин концентрациясын өлшеу арқылы анықталынды. Өлшеу жұмыстары UV-VIS-NIR HR2000+ спектрометрінде (Ocean Insights, Орландо, Флорида, АҚШ) және жарық көзі ретінде M275L4 275 нм тереңдіктегі ультракүлгін жарық диодын (Thorlabs, Ньюарк, Нью-Джерси, АҚШ) қолдану арқылы орындалды.

Дайындалған гидрогель түйіршіктеріндегі инсулинді инкапсуляциялау тиімділігі келесідей анықталды: инсулинмен жүктелген бөлшектердің 10 данасы ішкі көлемі 5 мл, натрий фосфаты буферімен толтырылған (pH = 7.4) стандартты спектрофотометриялық кварц кюветасына (Hellma GmbH, Мюльхайм, Германия) орналастырылып, тефлонды бетпен жабылып, 37˚C температурда магниттік араластырғышқа орнатылып, инкубацияланды. Инкубациядан кейін ерітіндінің 275 нм толқын ұзындығында жұтылуы өлшенді. Инсулинді инкапсуляциялау эффективтілігі ерітіндіге бөлінген инсулиннің инкапсуляцияланған инсулин мөлшеріне қатынасын есептеу арқылы бағаланды.

2.2.16 Молекулалық динамикалық модельдеу

Модельдеуге арналған Molecular Mechanics 2 (MM2) (ChemOffice Ultra, PerkinElmer, Waltham, Массачусетс, АҚШ) бағдарламалық құралы молекулааралық өзара әрекеттесулерді зерттеу мақсатында гидроколлоидтық матрицалардың потенциалдық энергиясын модельдеу үшін пайдаланылды. Модельдеу процесі молекулалардың атомдық үлгілерін құрудан, байланыстың

созылуын, бұрыштың иілуін, бұралу деформацияларын және байланыссыз әрекеттесулерді (ван дер Ваальс және электростатикалық күштер) қамтитын ММ2 есептеулерін жүргізуден тұрады. Инкапсуляциялық матрица компоненттерінің жүктелген инсулин молекулаларымен жұптық өзара әрекеттесуі жүйелі түрде талданды. Бұл тәсіл молекулалық құрылымдық өзгерістердің матрицалардың қасиеттеріне әсерін сандық бағалауға мүмкіндік береді, бұл өз кезегінде алынған тасымалдау жүйесіндегі инсулин конформациясының механизмдерін түсіну үшін өте маңызды.

2.2.17 Инсулиннің босап шығуына фермент әсерін зерттеу

Инсулиннің фермент әсерінен босап шығу кинетикасы диапазоны 198-1000 нм аралығындағы Jenway - 6305 ук-спектрофотометрін қолданып (Jenway, Англия), 280 нм толқын ұзындығында анықталынды.

Инсулинмен жүктелген ALG – Gel бөлшектері асқазан жолының шарттарын модельдейтін pH = 1.0 ерітіндісіне салынды және 37°C температурада (100 айналым/мин) инкубацияланды. Одан кейін бөлшектер pH = 1.0 ерітіндісінен алынып, pH = 7.4 болатын ішек жолының шарттарын модельдейтін 20 мл буфер ерітіндісіне салынды және 37°C температурада (100 айналым/мин) инкубацияланды. Зерттеу жұмыстары фермент – пепсин (0.1 мг/мл) қатысында жүзеге асырылды. 12 сағат бойы белгілі бір уақыт аралығында буферлі ерітінділердің аликвоталары алынып, инсулин концентрациясы анықталынды. Аликвоталардың мөлшері жаңа буферлі ерітінділердің дәл сондай мөлшерімен компенсацияланды.

2.2.18 Инсулиннің босап шығу диффузиясы

Матрицалық типтегі жүйелер үшін дәрілік заттың босап шығуы концентрация градиентімен байланыстағы Фик диффузиясы арқылы жүреді. Сол себепті инсулиннің босап шығу диффузиясы Фиктің екінші заңы арқылы келесі теңдеумен есептелді:

$$\mathrm{F} = \frac{6}{r_0}\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \qquad (5)$$

Мұндағы, F – t уақыттағы бөлінген дәрілік заттың мөлшері; r_0 – бөлшектің радиусы, см; t – уақыт, сек; D – диффузия коэффициенті.

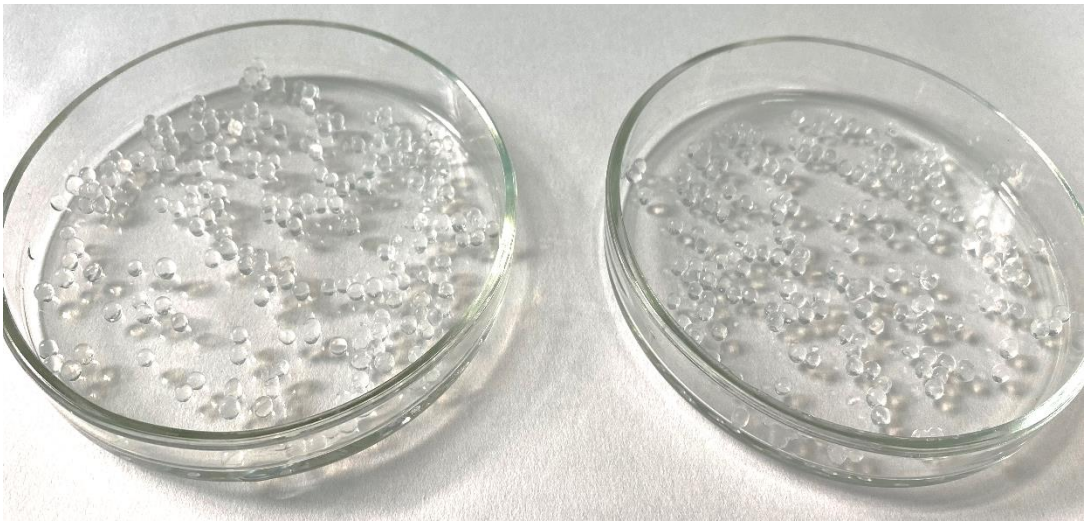
Бөлшектердің радиусы ImageJ кескіндерді өңдеу мен анализдеуге арналған ашық бастапқы кодты бағдарламада анықталды.

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛДАУ

3.1 Ионотропты гель түзілу әдісі арқылы альгинат бөлшектерін алу жолы

Альгинаттың Ca^{2+} тәрізді екі валентті катиондармен әрекеттесуі кезіндегі гель түзе алу қабілеттілігі оның ең маңызды қасиеттерінің бірі болып табылады. Альгинат бөлшектерін альгинат ерітіндісін тігуші агент ерітіндісіне тамшылатып тамызу арқылы алады [232]. Альгинаттың қарсы иондармен иондық тігілуі, сол иондармен қатайған альгинатты түйіршіктердің түзілуіне алып келеді [233]. Альгинатты бөлшектер ішке қабылдағанда уытты емес және асқазан-ішек жолдарының жоғарғы бөлігінің шырышты қабығына қорғаныш әсер етеді. Альгинат негізіндегі бөлшектер басқарылатын дәрі-дәрмек шығару жүйелері үшін қолданыла алады, өйткені кептірілген альгинат бөлшектері қайта ісіну қасиетіне ие [101]. Сондықтан инсулинді иммобилизациялау үшін матрица ретінде натрий альгинаты таңдалды.

Ионотропты гель түзу әдісімен бөлшектерді алу тәсілін оңтайландыру мақсатында $CaCl_2$ тігуші агентінің әр түрлі концентрациялы (0.5%; 1.0 %; 1.5%; 2.0%) ерітінділері қолданылды. Ca^{2+} иондарының түзілген натрия альгинатының бөлшектеріне әсері үлкен. Ca^{2+} иондарының концентрациясының жоғарылауымен натрия альгинатының бөлшектері тұрақты агрегаттар түзіп бастады. Тұрақтылығы жоғары бөлшектер $CaCl_2$ тігуші агентінің 1.5% және 2% концентрациялы ерітінділерін қолдану барысында алынды (3 - сурет).



3 - сурет. Ионотропты гель түзілу әдісімен алынған альгинат бөлшектері

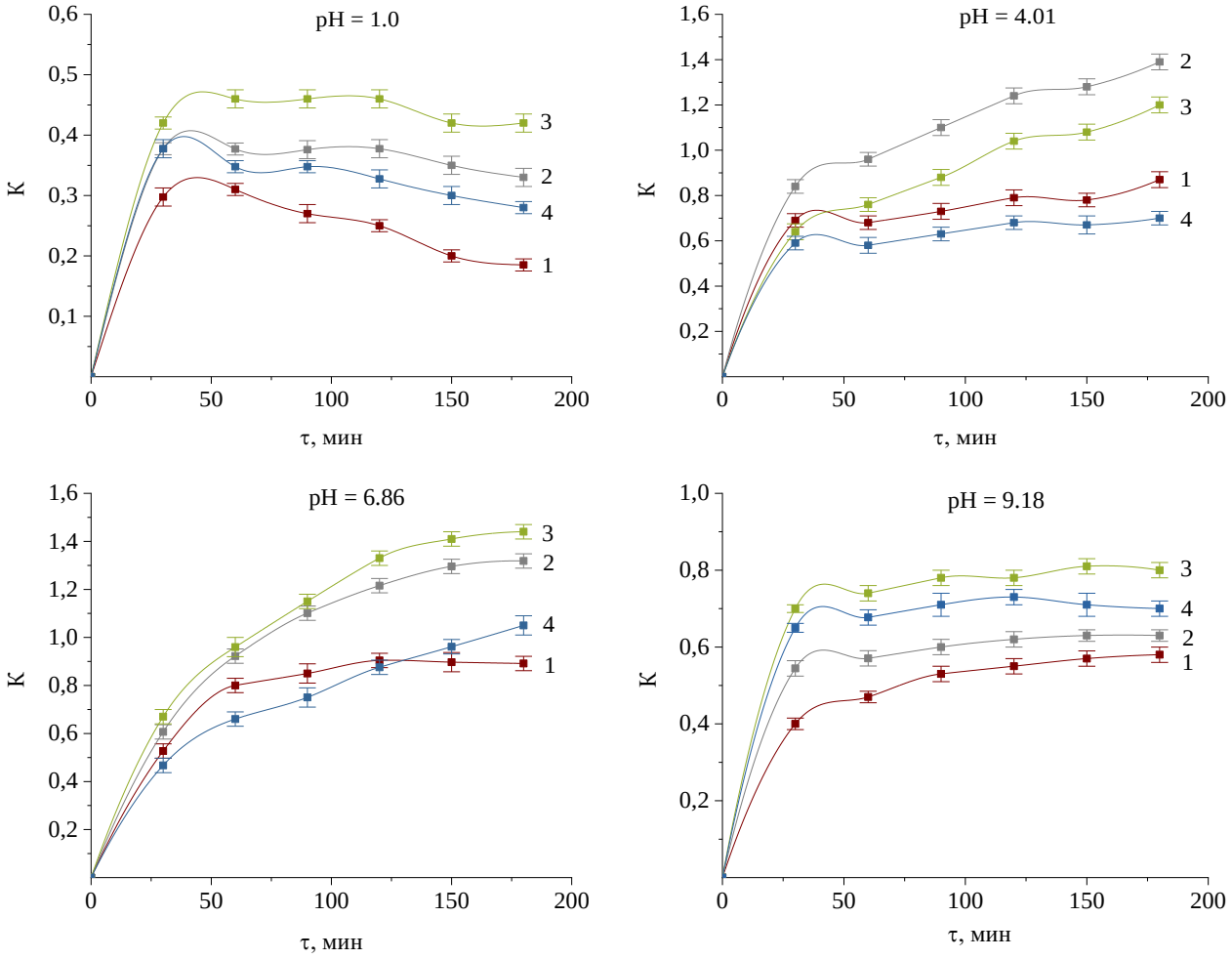
3.2 Модельді асқазан ішек жолы шарттарындағы бөлшектердің ісіну және инсулиннің босап шығу кинетикасын талдау

Дәрілік затты полимерлі матрицаға бірқалыпты дисперсиялау кезінде соңғы өнім ісінген микросфералар түрінде немесе қарапайым таблеткалар түрінде болуы мүмкін. Бұндай системалардан дәрілік заттың босап шығуы ісіну арқылы диффузия жолымен және матрицаның еруімен жүзеге асады [234].

Альгинат гидрофильді полимер болғандықтан, кальций альгинатының гелі сулы ортада ісініп, ыдырайды [235].

Ионотропты гель түзілу әдісімен алынған альгинатты бөлшектердің ісіну кинетикасы олардың асқазан ішек жолдарындағы өзгерістерін бақылау мақсатында зерттелді. Тігуші агент ретінде $CaCl_2$ ерітіндісінің әр түрлі концентрациялары (0.5%; 1.0%; 1.5%; 2.0%) алынды және олардың альгинат бөлшектерінің ісіну кинетикасына әсері бағаланды.

Натрий альгинаты негізіндегі бөлшектердің модельді асқазан ішек жолының әр түрлі pH (1.00; 4.01; 6.86; 9.18) мәндеріндегі ісіну дәрежесі (К) 4-ші суретте көрсетілген.



1 - $CaCl_2$ (0.5 %); 2 - $CaCl_2$ (1 %); 3 - $CaCl_2$ (1.5 %); 4 - $CaCl_2$ (2 %)

4 - сурет. Асқазан ішек жолының әр түрлі бөлімдерін модельдейтін шарттардағы альгинат бөлшектерінің ісіну кинетикасы

4 - ші суреттегі мәліметтер pH = 1 мәнінде альгинатты бөлшектер 60 мин аралығында ісініп, одан кейін ісіну дәрежесінің төмендегенін және сол арқылы

бөлшектердің жартылай ерітиндігін көрсетеді. Ал бұл процесс 1.5% $CaCl_2$ ерітіндісі үшін 120 мин аралығында байқалды.

pH = 4.0 және pH = 6.86 ерітінділерінде альгинатты бөлшектер $CaCl_2$ ерітіндісінің барлық концентрацияларында 180 мин аралығында ісінуін жалғастырады. Бірақ, 1.0%; 1.5% $CaCl_2$ ерітінділері негізіндегі альгинатты бөлшектердің ісіну дәрежесі 0.5%; 2.0% $CaCl_2$ ерітінділерімен салыстырғанда pH = 4.0 мәнінде 0.36 - 0.69 шартты бірлікке артатындығы, сәйкесінше pH = 6.86 мәнінде ісіну дәрежесі 0.26 – 0.55 шартты бірлікке артатындығы анықталды.

pH = 4.0 және pH = 6.86 мәндерімен салыстырғанда альгинатты бөлшек pH=9.18 мәнінде төмен ісіну дәрежесін көрсетті, яғни 0.29–0.76 ш.б. төмен. Яғни, бұл бөлшектердің аш ішекке өткен мезеттен бастап ери бастайтындығын растайды.

Жоғарыда келтірілген мәліметтерден $CaCl_2$ ерітінділерінің негізінде алынған альгинатты бөлшектердің жоғары ісіну дәрежесін көрсеткен 1.5% концентрациялы ерітіндісі оптималды деп таңдап алынды.

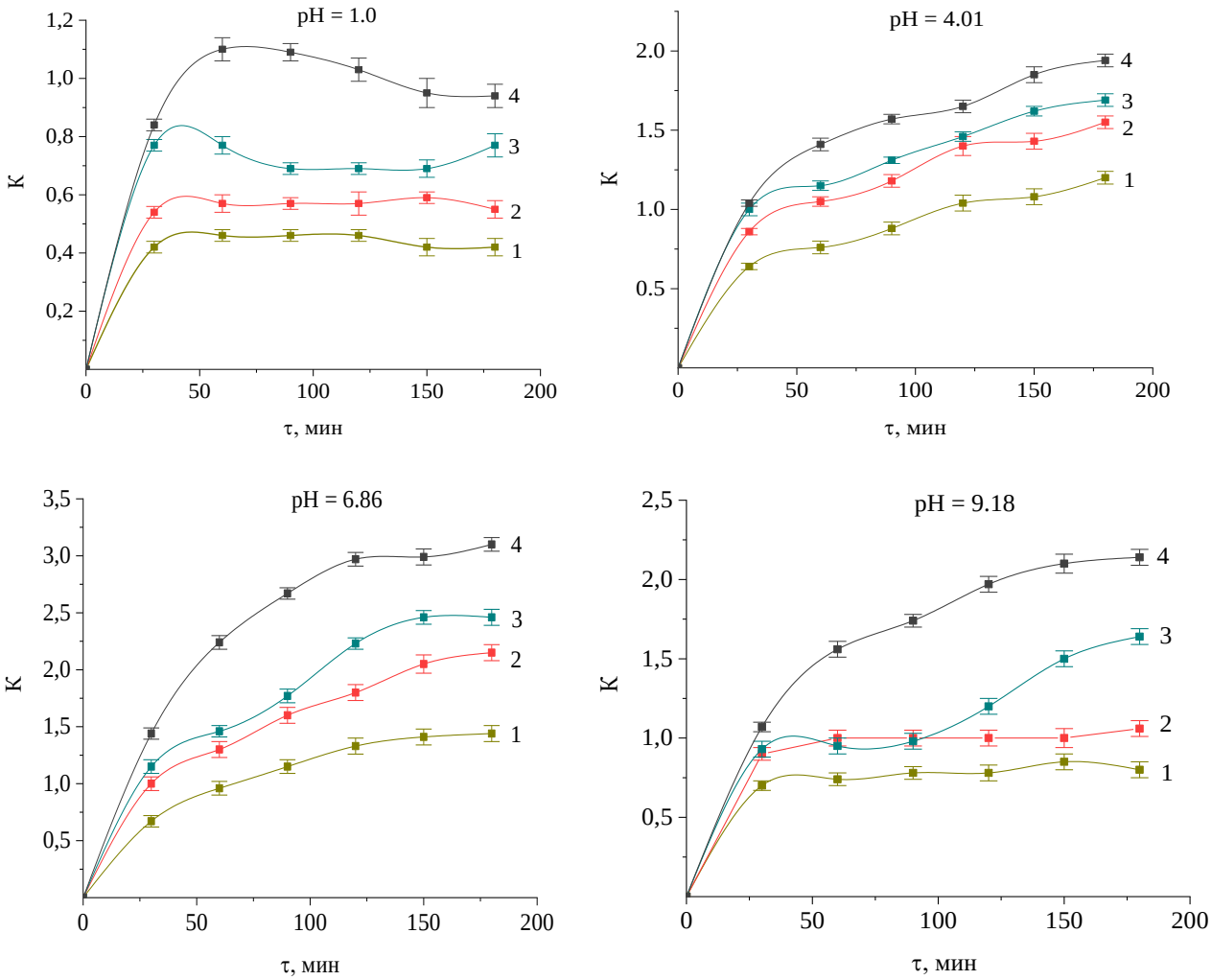
Полиэлектролитті гельдер сулы ортада қатты ісіне алады [236] және олардың суды қайта сіңіру қабілеттілігі фармацевтика мен косметика салаларында қолданылады [237]. Тігілген полимер гельдері ионсыз бейтарап полимер гельдеріне қарағанда жоғары ісіну қабілеттілігіне ие. Сонымен қатар олар аралық фазалық ауысуларға ұшырайды және олардың бұл қасиеттері теориялық және қолданбалы зерттеулерде қызығушылық тудырады. Полиэлектролитті гельдердегі бұндай фазалық ауысулар дәрілік заттар мен гендерді тірі организмдер жасушаларына тасымалдауда қолданылады [238].

Көптеген жұмыстарда хитозан биомедициналық қолданыстар үшін зерттелген [53, 58, 90, 112, 116, 117, 119, 239–241]. Хитозан хитинді қышқылды ортада деацетилдеу арқылы алынады, сол себепті хитозан сұйытылған сірке қышқылында ерігіш, жартылай синтетикалық табиғи полисахарид болып табылады [242]. Хитозан жара таңғыштарының құрамдас бөліктерінің бірі ретінде сыртқы қолдануға рұқсат етілгеніне және уытсыз полимер ретінде таңылғандығына қарамастан [243], [244] зерттеуде әр түрлі сипаттамалы хитозандар CCRF – CEM (лейкоздық лимфобласттар) және L132 (адамның өкпе эпителийінің жасушалық желісі) жасушаларына қарсы кішігірім цитотоксикалық әсер көрсеткен.

Хитозанның кемшіліктерінің бірі оның pH 5.5-7.4 мәндерінде ерігіштігінің төмендігі болып табылады. Хитозанның ерігіштігін арттыруға бағытталған химиялық модификациялар молекуланың уыттылығына әсер етуі мүмкін, бұл өз кезегінде оның медицинада қолданылуына кедергі болады. Сол себепті желатин, целлюлоза, агар – агар, пектин, крахмал және т.б. сияқты табиғи полимерлер олардың биоыдырауы мен биоүйлесімділігіне байланысты биомедицинада қолданылуда перспективті болып есептелінеді.

Осы келтірілген мәліметтерді қорытындылай келе, альгинатты бөлшектердің қышқыл және сілтілік ортадағы тұрақтылығын арттыру

мақсатында олар желатинді мембранамен (2%; 5%; 8% желатин ерітінділерімен) қапталынып, олардың ісіну кинетикасы зерттелінді (5 - сурет).



1 - ALG 1 %; 2 – (ALG) Gel - 2%; 3 - (ALG) Gel - 5%; 4 - (ALG) Gel - 8%

5 - сурет. Желатинмен қапталынған альгинат бөлшектерінің модельді асқан ішек жолы ерітінділеріндегі ісіну кинетикасы

Зерттеу нәтижелері бойынша альгинат - желатин бөлшектерінің ісіну дәрежесі альгинат бөлшектерімен салыстырғанда pH = 1.00 мәнінде 0.52 ш.б., pH = 4.01 мәнінде 0.74 ш.б., pH = 6.86 мәнінде 1.66 ш.б., pH = 9.18 мәнінде 1.38 ш.б. жоғары болды. pH = 1 мәнінде бөлшектердің ісіну дәрежесінің төмендеуі, альгинаттың қышқылды гель қасиетіне ($pK_a \approx 3.5$) байланысты болуы мүмкін және қышқылды гельдің күші протон концентрацияларының артуымен жоғарылайды [245].

pH = 4.0 және pH = 6.86 мәндерінде бөлшектердің ісінуі 180 мин аралыққа созылды. Ал, pH = 9.18 мәнінде бөлшектер pH = 4.0 және pH = 6.86 мәндерімен салыстырғанда 0.05 - 1.84 ш.б. төмен ісіну дәрежесін көрсетті.

Альгинат – желатин бөлшектерінің қышқыл ортада ісіну дәрежесінің төмендеуі H^+ иондарының қатысында альгинат макромолекуласындағы карбоксил топтарының диссоциациясының төмендеуімен түсіндіріледі.

pH = 9.18 шамасында ісіну коэффициентінің төмендеуі натрий альгинатындағы - COONa топтарының диссоциациясының төмендеуімен байланысты.

Бұл нәтижелер бөлшектердің ас ішекке түскен мезеттен бастап еруінің бірден бір дәлелі бола алады. pH = 9.18 еру себебі, бөлшек ішіндегі көмертегі топтарымен кальцийді байланыстыру үшін асқазан сөлінің бір валентті тұздарының өзара бәсекелестігі болуы мүмкін [246]. Бөлшектер қышқыл ортада тұрақты, яғни ерімеу керек. Себебі, бұл олардың бастапқы мезетте асқазанның қышқыл ортасында иммобилизацияланған инсулинді босатпауының кепілі болып табылады. Демек, желатинді жабын альгинат бөлшектерінің қышқыл ортада ерігіштігін төмендетеді және асқазан-ішек жолдарының агрессивті ортасына деген төзімділігін арттырады.

Әсер етуші заттың оптималды дозасын таңдау және осы препараттардың эффективтілігін, қауіпсіздігін қамтамасыз ету үшін дәрілік заттың босап шығу сипаттамаларын түсіну маңызды.

Дәрілік заттын босап шығуы полимердің ісінуі мен деградациясының әсерінен немесе дәрілік заттың диффузиясының әсерінен болады. Полимерлі матрица негізіндегі дәрілік заттарды тасымалдаудың негізгі механизмі полимердің деградациясы мен ісінуі болып табылады [247].

Полимерлердің қарама - қарсы зарядталған топтармен әрекеттесуі нәтижесінде дәрілік заттарды [248, 249], ақуыздарды [250] және гендерді [251] тасымалдауға арналған полиэлектролитті комплекстер түзіледі. Протеиндер мен пептидтерді полиэлектролитті комплекстерге инкапсуляциялау олардың деградациясынан қорғауды қамтамасыз етеді [252]. Осыған байланысты альгинат бөлшектерінің тұрақтылығын арттыру мақсатында олардың құрамына желатин енгізілді.

Бөлшектер асқазан ішек жолдары арқылы өту барысында бірінші асқанның төмен pH мәндерінің әсеріне, ал ішекке түсу кезінде жоғары pH мәндерінің әсеріне ұшырайды. Инсулиннің босап шығуы инсулиннің асқазан ішек жолының әр түрлі аймақтарындағы биожетімділігін анықтау үшін зерттелінді.

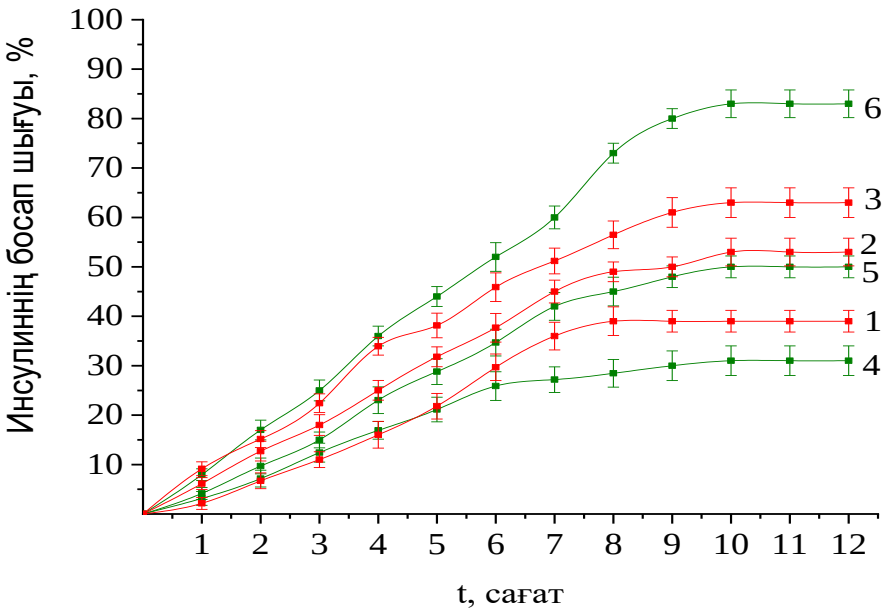
Инсулиннің босап шығу кинетикасы оның ерітіндідегі концентрациясының өзгеріс жылдамдығымен анықталынды:

$$К = \frac{C_t}{C_\infty} \times 100\ \% \qquad (6)$$

Мұндағы, C_t – t уақытында босап шыққан инсулин концентрациясы; C_∞ - инсулиннің максималды мүмкін болатын концентрацясы.

pH=6.86 мәнінде альгинат бөлшектері үшін инсулиннің босап шығуы 53%, желатинмен қапталған альгинат бөлшектері үшін 50% құрайды. pH=9.18 мәнінде альгинат бөлшектері үшін 63%, желатинмен қапталған альгинат

бөлшектері үшін 83% болды (6 - сурет). Әлсіз қышқыл pH=4.01 ортада инсулиннің босап шығуы альгинат бөлшектері үшін 39%, желатинмен қапталған альгинат бөлшектері үшін 31% болды. Ал, pH=1.0 мәнінде инсулиннің босап шығуы басқа pH орталарымен салыстырғанда мүлдем байқалмады. Сілтілі ортада желатинмен қапталған альгинат бөлшектерінен инсулиннің босап шығуының артуын pH>6 шартында альгинат және желатиннің полиэлектролитті комплексі желатиннің депротонданыуынан тұрақсызданып, сол арқылы инсулиннің босап шығуын арттырады деген болжам жасауға болады. pH=1.0 және pH=4.01 мәндерінде бөлшектер инсулиннің ерте шығуын болдыртпай, асқазанда ерімей тұрақты болуы шартты. Желатинмен қапталған альгинат бөлшектерімен салыстырғанда тек альгинаттан тұратын бөлшектер ішек ерітіндісіне түспестен бұрын қышқылды ортада инсулиннің кенеттен бөлінуін тудыруы мүмкін. pH = 9.18 ерітіндісінде альгинат бөлшектеріне қарағанда желатинмен қапталған альгинат бөлшектерінен инсулиннің босап шығу мөлшері артық. Оның себебі желатинмен қапталған кезде альгинаттың еру уақытының азаюында болуы мүмкін.



Альгинат бөлшектері үшін pH мәндері: 1 - 4.01; 2 - 6.86; 3 - 9.18
Желатинмен қапталған альгинат бөлшектері үшін pH мәндері:
4 - 4.01; 5 - 6.86; 6 - 9.18

6 - сурет. Модельді асқазан ішек жолы шарттарындағы альгинат және желатинмен қапталған альгинат бөлшектерінен инсулиннің босап шығу кинетикасы

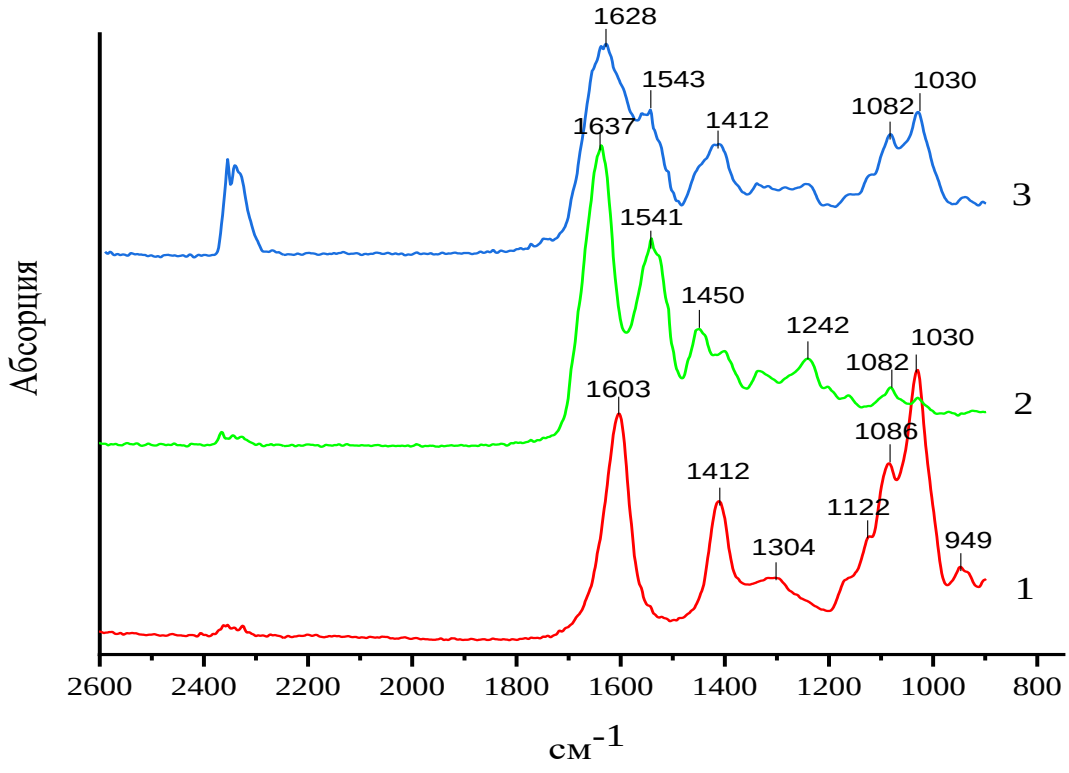
Тәжірибе барысында алынған мәліметтер pH = 2 - 7 аралығында ерітінділердің лайлылығының жоғарылауын көрсетеді, бұл желатиннің аминтоптары мен альгинаттың карбоксил топтарының электростатикалық

әрекеттесуінің нәтижесінде түзілетін полиэлектролитті комплекстердің болуын дәлелдейді. Бұл өз кезегінде альгинатты бөлшектерді алуда шешуші рөл атқарады, себебі альгинат пен желатиннің өзара әрекеттесуі асқазан арқылы өткен сәттен басталуы керек (pH = 2-7).

3.3 Альгинатты бөлшектерді ИҚ спектроскопиялық талдау

Полиэлектролитті комплекстің түзілетіндігін нақтылау мақсатында альгинат, желатин және желатинмен қапталған альгинат бөлшектерінің ИҚ спектрлері зерттелді (7- сурет).

Натрий альгинатының спектрі карбоксильді функционалды топтарға қатысты маңызды жұтылу жолақтарын көрсетті. Карбоксилат тұзды топтарының (-COONa) асимметриялық және симметриялық созылмалы тербелістері 1603 $см^{-1}$ және 1412 $см^{-1}$ аралықтарында байқалды [253]. 1122 және 949 $см^{-1}$ аралықтарындағы жолақтар пиранозил сақинасының C-O созылмалы тербелуіне, сондай ақ C-C-H және C-O-H деформацияларының үлестері бар C-O созылуына жатқызылды [254]. 1086 $см^{-1}$ және 1030 $см^{-1}$ тербелістері оның сахаридтік құрылымын түсіндіретін гликозидтік байланыстарға (C-O-C созылуы) жатқызыла алады [255].



7 - сурет. ALG (1), Gel (2) және желатинмен қапталған ALG (3) ИҚ спектрлері

Желатиннің спектрі үш аймақта сипаттамалық пиктерді көрсетті: 1637 $см^{-1}$ (амид I), 1541–1450 $см^{-1}$ (амид II) и 1242-1030 $см^{-1}$ (амид III) [256]. Амид I жұтылуы C = O пептидті байланыстың карбонильді созылуын көрсетеді. Амид II жұтылуы C-N байланысының валентті тербелуі мен N-H байланысының иілу режиміне байланысты жүзеге асады. C-C және C = O байланыстарының

жазықтықтағы иілуінен болатын N-H топтарының жазықтықтағы иілуімен біріктірілген C-N валентті тербелістері амид III жұтылуын тудырады [257].

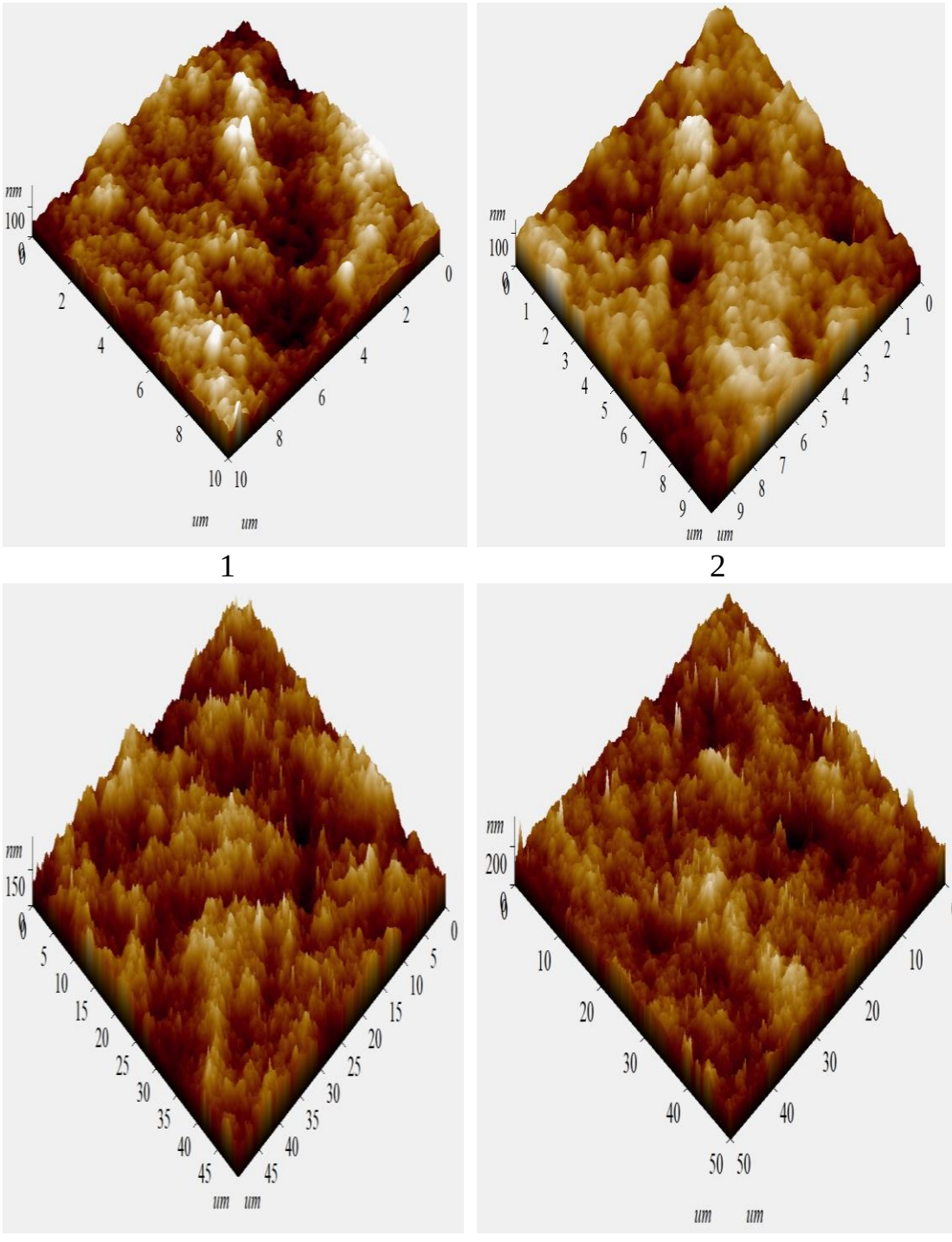
Желатинмен қапталған альгинат бөлшектерінің ИҚ спектрі 1082 $см^{-1}$ және 1030 $см^{-1}$ аймақтарындағы полисахаридтің гликозидтік байланыстарына (C-O-C созылу) жатқызылатын тербелістерді көрсетті. 1412 $см^{-1}$ аймағында натрий альгинатының спектріне тән келетін карбоксилат тұзадарының (-COONa) тербелістері байқалды. C-N байланысының валентті тербелістерінен 1543 $см^{-1}$ аймағында желатиннің ИҚ спектрінде де кездескен амид II топтарына сәйкес жұтылу жолақтары алынды. 1628 $см^{-1}$ аймағындағы пик CO валентті тербелісінен туындайтын, ақуыз спектріне сәйкес келетін амид I жұтылуына жатқызылады.

Альгинат, желатин және желатинмен қапталған альгинат бөлшектерінің ИҚ спектрлерін талдаудан альгинатты бөлшекті желатинмен қаптау кезінде инсулинді иммобилизациялауға негіз болатын полиэлектролитті комплекс түзілетіндігін растауға болады.

3.4 Атомдық күштік микроскопиялық зерттеу

Желатинмен қапталған альгинат бөлшектерінен pH = 6.86 және pH = 9.18 мәндерінде, яғни ішек жолдарында инсулиннің босап шығу профилі атомдық күштік микроскопия әдісімен бөлшектердің кедір бұдырлығы мен морфологиясын анықтау арқылы нақтыланды. Атомдық күштік микроскопия кескіндерінде үлгілердің беттік морфологиясында өзгешеліктер байқалады (8 - сурет).

Зерттеу нәтижесі бойынша АКМ кескіндерінде альгинат және желатинмен қапталған альгинат үлгілерінің беткі қабатында және үлгі көлемінде орналасқан глобулалар көрінеді. Глобулярлы бөлшектердің өлшемі шамамен 100 нм. Желатинмен қапталған альгинат үлгілерінің pH = 6.86 және pH = 9.18 мәндеріндегі беткі қабаттың бастапқы үлгімен салыстырғандағы өте кедір бұдырлығы бөлшектердің ерігендігін көрсетеді. Желатинмен қапталған альгинат үлгісінің (2) АКМ кескінінде беттік қабаттың кедір бұдырлығы 100-130 нм шамасында, ал осы үлгінің pH = 6.86 мәніндегі (3) АКМ кескініндегі кедір бұдырлық шамасы 150 нм шамасында, pH = 9.18 мәнінде (4) 200 нм. Желатинмен қапталған альгинат үлгісінің (2) АКМ кескінінде глобулярлы түзілімдерді байқауға болады. Осы үлгінің pH = 6.86 және pH = 9.18 мәндеріндегі кескіндерінде өлшемі 80-100 нм болатын кедір - бұдырлық байқалады. Кеуектілік (кеуекті құрылым) екі үлгіде де байқалады, бірақ pH=6.86 мәнімен салыстырғанда, pH=9.18 мәнінде кішірек кеуекті түзілімдерді байқауға болады. Кеуектілік үлгінің өлшемін үлкейтіп, соңында оның ішек фазасында еруіне әкеледі. Үлгілердің кедір-бұдырлығы мен морфологиясын атомдық-күштік микроскопия арқылы анықтау бөлшектердің морфологиясының инсулинді босатып шығару үшін қолайлы екендігін растайды [258].



1 2

3 4

ALG (1); желатинмен қапталған ALG (2);
pH = 6.86 мәніндегі желатинмен қапталған ALG (3);
pH = 9.18 мәніндегі желатинмен қапталған ALG (4)

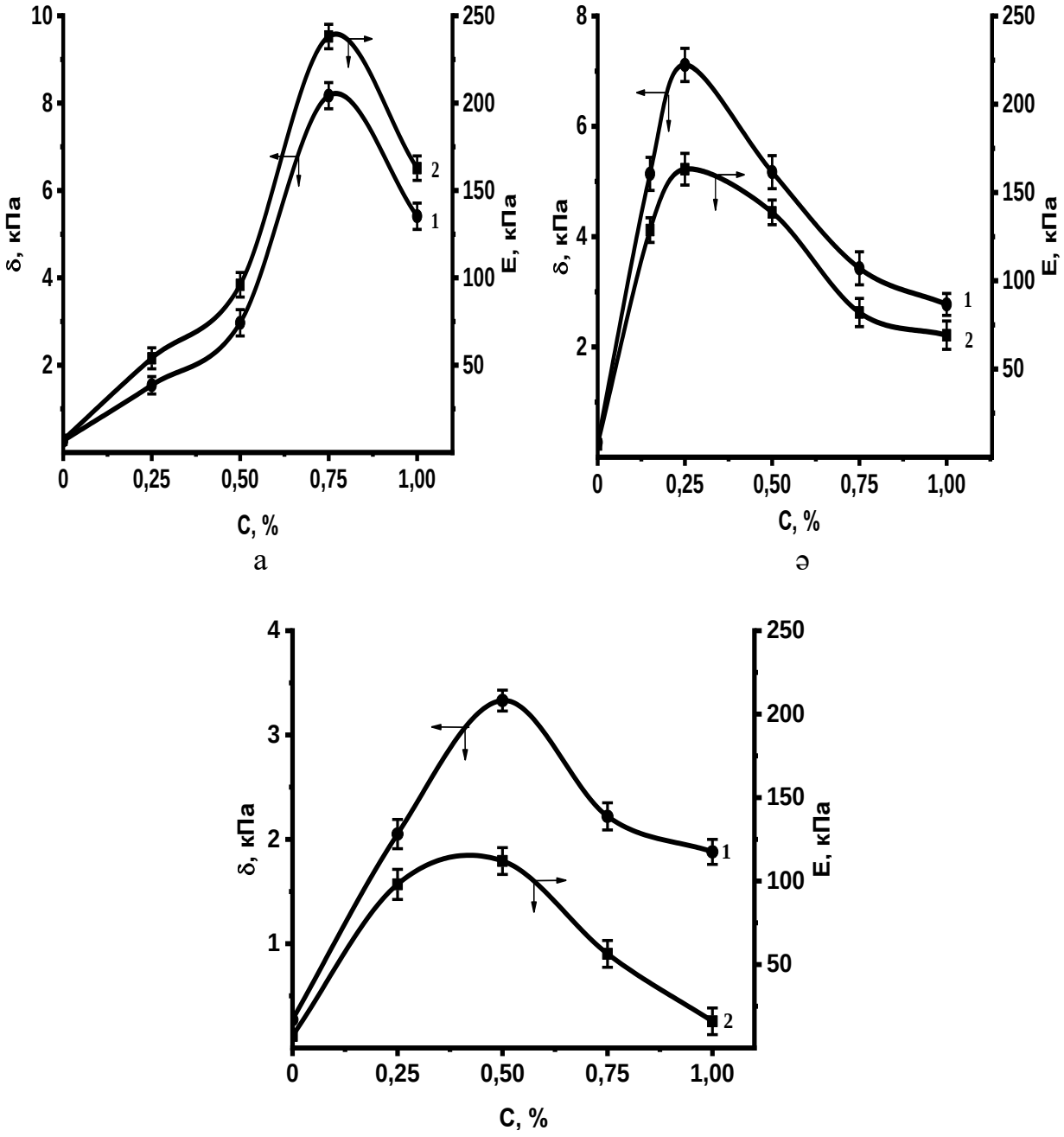
8 – сурет. Альгинат және желатинмен қапталған альгинат бөлшектерінің АКМ кескіндері

3.5 Желатин негізіндегі үлдірлерді алу және олардың реологиялық қасиеттерін талдау

Өнімдердің физика-химиялық сипаттамалары фармацевтика өнеркәсібінде оларға қойылатын негізгі талаптардың бірі болып табылады. Дәрілік үлдірлердің реологиялық қасиеттерін анықтап, арнайы мақсатта өзгерту жолдарын білу үлдірлердің кейбір сипаттамаларын реттеу үшін қажет.

Ешқандай модификациясыз желатиннің тек өзін қолдану желатин қатысындағы полимерлік материалдардың төмен физика - механикалық қасиет көрсетуіне алып келеді және олардың пайдалану аясын шектейді. Осы себептерге байланысты, желатиннің лимон және L-глутамин қышқылдарымен және хитозанмен композициялық үлдірлерін алу қарастырылған. Соңғы кездері лимон қышқылы биоыдырағыш полимерлер өндірісінде тігуші агент ретінде кеңінен қолданылады [259], сонымен қатар бактериялардың өмір сүруін тежейтін агенттердің бірі болып табылады [260]. L - глутамин қышқылы фармацевтикада кеңінен қолданылатын [261], табиғатта L - пішініндегі негізгі аминқышқылы. L - глутамин қышқылы жасуша тіндеріндегі гликолиз процесстеріне, ақуыздар мен көмірсулардың алмасуына қатысады [262]. [263] жұмыста глутамин қышқылы хитозан гидрогельдерін гамма сәулелену арқылы егу сополимеризациясы әдісімен алуда мономер ретінде қолданылған. Зерттеу нәтижесінде хитозанның глутамин қышқылымен гидрогельді түйіршіктері алынып, қатерлі ісікке қарсы дәрілік заттарды тасымалдау жүйесінде қолданылған және қатерлі ісік жасушаларына қарсы тиімді әсер көрсеткен.

Желатин – хитозан, желатин – лимон қышқылы және желатин – L-глутамин қышқылы үлдірлерінің беріктік және серпімділік модулінің концентрацияларға тәуелділік қисықтары 9-шы суретте келтірілген. Желатин негізіндегі үлдірлерге хитозанды, лимон және L-глутамин қышқылдарын енгізгенде желатин үлдірінің беріктігін және серпімділік модулін арттыратындығы байқалды. 9 (а) суретте хитозан концентрациясының 0.75% дейін артуынан беріктік және серпімділік модулінің жоғарылап, одан кейін төмендейтіндігі анықталды. Хитозанның 0.75% концентрациясында желатин үлдірінің беріктігі 0.27 Па шамасынан 8.17 кПа-ға, ал серпімділік модулі 7.22 кПа мәнінен 238.16 кПа мәніне дейін жоғарылады. 9 (ә) суреттен желатин – лимон қышқылы негізіндегі үлдірлер үшін лимон қышқылының оптималды концентрация 0.25% екендігін байқауға болады. Лимон қышқылының 0.25% ерітіндісі желатин негізіндегі үлдір беріктігін 0.27 кПа-дан 7.11 кПа-ға, ал серпімділік модулін 7.22 кПа-дан 163.21 кПа мәніне арттырып, жоғары шамада төмендетеді. 9 (б) суретте L-глутамин қышқылының 0.5% ерітіндісі 0.25%; 0.75%; 1.0% ерітінділерімен салыстырғанда желатин негізіндегі үлдір беріктігін 0.27 кПа-дан 3.33 кПа-ға, ал серпімділік модулін 7.22 кПа-дан 112.00 кПа шамасына дейін жоғарылатты.



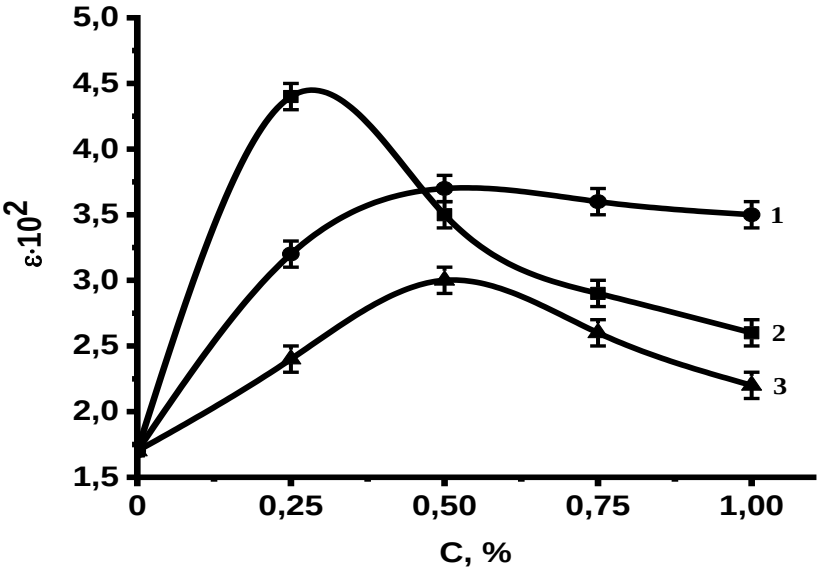
1 - беріктік; 2 - серпімділік модулі

9 - сурет. Желатин - хитозан (а), желатин - лимон қышқылы (ә) және желатин - L - глутамин қышқылы (б) негізінде алынған үлдірлердің беріктігі мен серпімділік модулінің хитозан, лимон және L - глутамин қышқылдарының концентрацияларына тәуелділігі

Зерттеу нәтижелерінен хитозан, лимон қышқылы және L - глутамин қышқылдарының желатин негізіндегі үлдірдің түзілуіне әсері оңтайлы және әр түрлі екендігі байқалды.

Тігуші агенттердің ең төменгі 0.25% концентрациясында хитозан мен L - глутамин қышқылына қарағанда, лимон қышқылы қатысында үлдірдің беріктік және серпімділік модулі жоғары мәндерге ие болатындығы анықталды.

Осы жүйелердің деформациялану қисықтары 10-шы суретте келтірілген. Бұл қисықтардан да, лимон қышқылы қатысында 0.25% концентрацияда жоғары деформациялану байқалады.



10 – сурет. Желатин - хитозан (1), желатин - лимон қышқылы (2) және желатин - L - глутамин қышқылы (3) негізіндегі үлдірлердің деформациясының концентрацияға тәуелділігі

Желатиннің әсіресе, лимон қышқылының қатысында жоғары деформация және жоғары беріктік мәндеріне ие болуы, желатинннің протонданған амин топтарының және диссоциацияланған карбоксил топтарының санының артуынан электростатикалық әрекеттесуі болуы мүмкін [264, 265]. Бұл байланыстарды тұрақтындыруда сутектік байланыстар мен полярлы емес тізбектер арасындағы гидрофобтық әрекеттесулердің маңыздылығы зор. Олай болса, хитозан молекуласының құрамындағы OH және CH_2OH, L-глутамин қышқылының N-H және C=O топтарының арасындағы сутектік байланыс желатин қатысындағы үлдірдің құрылым түзуіне әсер ететін негізгі фактор болуы мүмкін. Желатинге лимон қышқылын қосу көлденең тігістің түзулуіне алып келіп, полимерлі материалдың гидрофильділігін теңестіріп, сутектік байланыстардың түзілуін қамтамасыз етеді деген болжам жасауға болады.

Желатин - хитозан, желатин - лимон қышқылы және желатин - L - глутамин қышқылы үлдірлерінің реологиялық қасиеттеріне әр түрлі pH мәндерінің әсерін байқау олардың асқазан ішек жолындағы өзгерістері туралы мәліметтерді анықтауға мүмкіндік береді.

Хитозанның 0.75%, лимон қышқылының 0.25% және L - глутамин қышқылының 0.5% концентрацияларында беріктік, серпімділік модулінің жоғары болуына байланысты осы концентрацияларын оптималды деп алып,

ары қарай ең негізгі қажетті зерттеу - ортаның pH мәніне байланысты құрылымдық - механикалық қасиеттерінің өзгерістері анықталды. Зерттеуге алынған үлгілердің pH мәніне байланысты реологиялық қасиеттерінің өзгерістері 11, 12-ші суреттерде келтірілген.

Хитозанның 0.75% ерітіндісі негізіндегі желатин үлдірлерінің серпімділік, беріктік қасиеттері pH = 6.86 мәнінде жоғары, ал pH = 1.0; pH = 4.01 мәндерінде төмендейтіндігін байқауға болады (11 (а) - сурет).

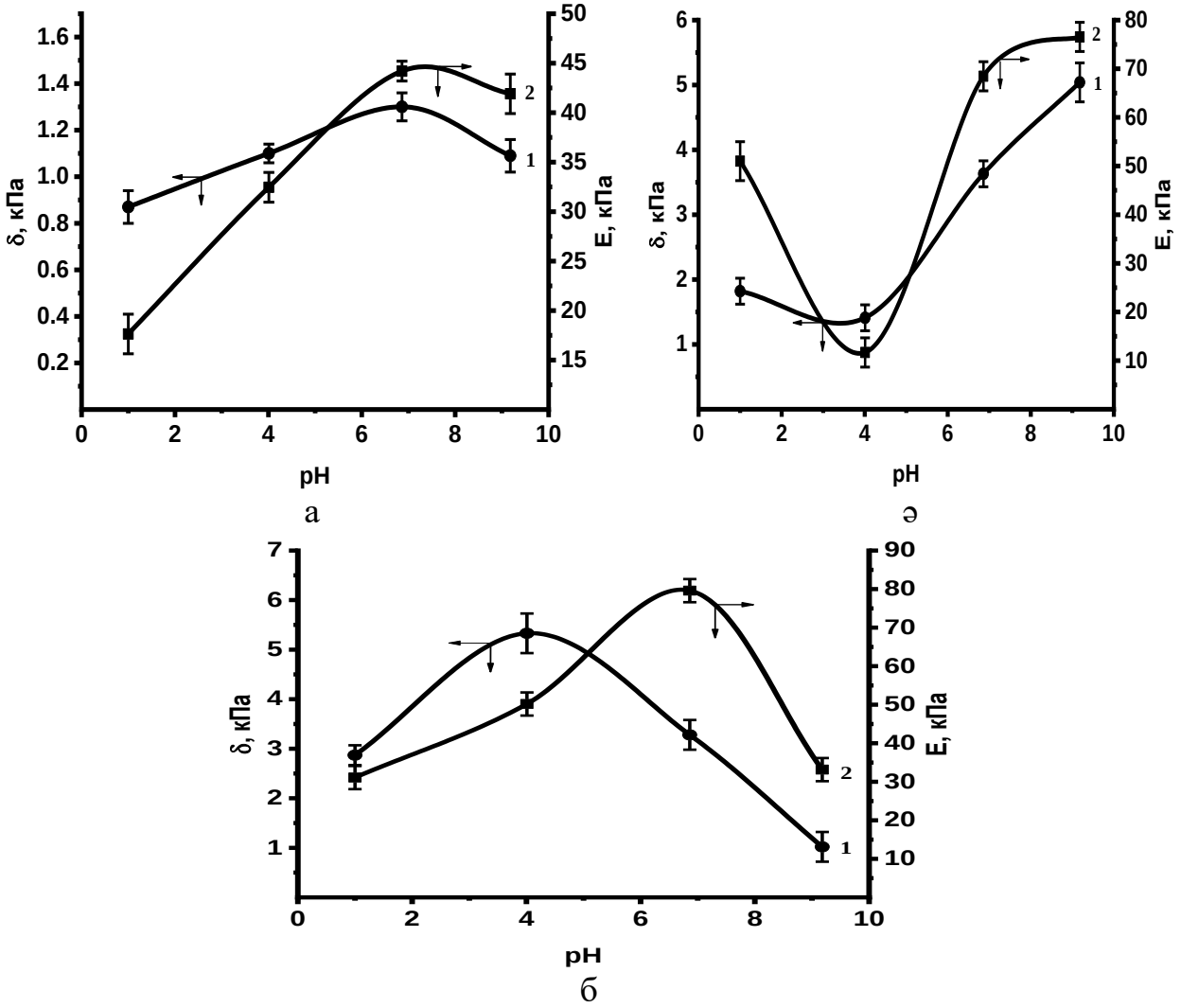
Орта pH-ның хитозанның реакциялану қабілетіне әсері өте зор. Себебі, хитозанның реакциялану қабілетін арттыратын функционалды амин тобы сутегі иондарының белсенділігіне байланысты әртүрлі қасиеттерге ие болады. Сулы қышқылдық ортада хитозан еріп, нәтижесінде $-NH_3^+$ топтары есебінен оң зарядқа ие болады. Хитозанның аминополисахаридінің протондаған түрі суда еритінін ескере отырып, желатин мен хитозанның комплекстенуі нәтижесінде суда еритін және ерімейтін өнімдері түзілуі мүмкін. Ал полиэлектролиттік кешеннің түзілуін хитозанның амин және желатиннің карбоксил топтарының арасында пайда болатын пептидтік немесе амидтік байланыстың негізінде түсіндіруге болады.

Қышқыл ортада хитозан - желатин үлдірінің серпімділік модулі мен беріктік шамаларының азаюын, хитозанның амин топтарының иондану дәрежесінің төмендеуімен байланыстыруға болады. Ал, pH = 6.86 мәнінде жоғары беріктік және серпімділік модулінің артуы карбоксил топтарының иондану дәрежесінің артуынан болуы мүмкін. Яғни, ортада OH^- иондарының жоғарылауынан ортаның иондық күші өсіп, желатиннің макромолекуласының шырмалануына байланысты деуге болады.

Лимон қышқылының 0.25% концентрациялы ерітіндісі қатысында алынған үлдірдің серпімділік және беріктік қасиеттерінің pH мәніне тәуелділік қисығында жоғарғы серпімділік модулі pH = 6.86 мәнінде, ал жоғарғы беріктік pH = 9.18 мәнінде байқалды. pH = 1.0; pH = 4.01 мәндерінде беріктік және серпімділік шамасы төмен (11 (ә) - сурет). Бұның себебі, біріншіден лимон қышқылының қышқылдығымен байланысты. H^+ иондарының көбеюі ортаның иондық күшін көбейтіп, электростатикалық әрекеттесулерді азайтуы мүмкін. Екіншіден, желатин бетіне лимон қышқылының гидрофобтық немесе сутектік әрекеттесулер арқылы адсорбциясы полимер бетінде диссоцияланған карбоксил топтарын арттырып, гидрофильді қасиетін көбейтіп, бөлек фазаға шығу мүмкіндігін және құрылымдануын бәсендетеді.

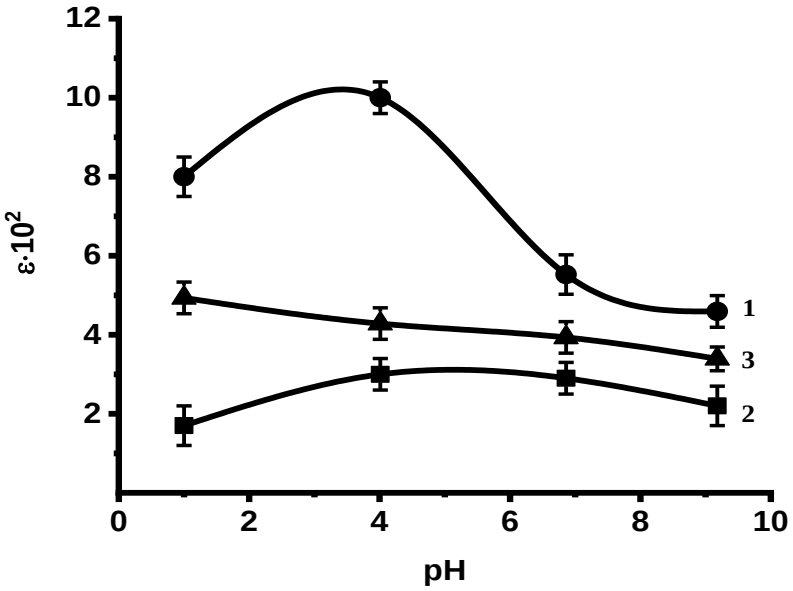
Және 11 (б) мен 12-ші суреттерден көрініп тұрғандай экстремалды қисықтар алынды. 0.5% L - глутамин қышқылы және желатин негізіндегі үлдірдің, желатиннің лимон қышқылы және хитозан қатысында алынған үлдірлерінің серпімділік модулі, деформация және беріктік қасиеттерімен салыстырсақ, келтірілген қисықтардағы өзгеше заңдылықты байқауға болады. L - глутамин қышқылы - желатин үлдірінің деформация, беріктік және серпімділік модулі қасиеттері pH = 4.01 мәнінде жоғары шамаларға, ал pH = 6.86; pH = 9.18 мәндерінде төмен шамаларға иеленетіндігі байқалады. Орта pH-ның төмен мәндерінде реологиялық сипаттамалары артады. Ол молекулааралық

сутектік байланыстардың санының жоғарылауымен және ассоциативтік құрылымдардың түзілуімен байланысты болуы мүмкін.



1 - беріктік; 2 - серпімділік модулі

11 – сурет. Желатин - хитозан (а), желатин - лимон қышқылы (ә) және желатин - L - глутамин қышқылы (б) негізіндегі үлдірлердің беріктік және серпімділік қасиеттеріне орта pH-ның әсері

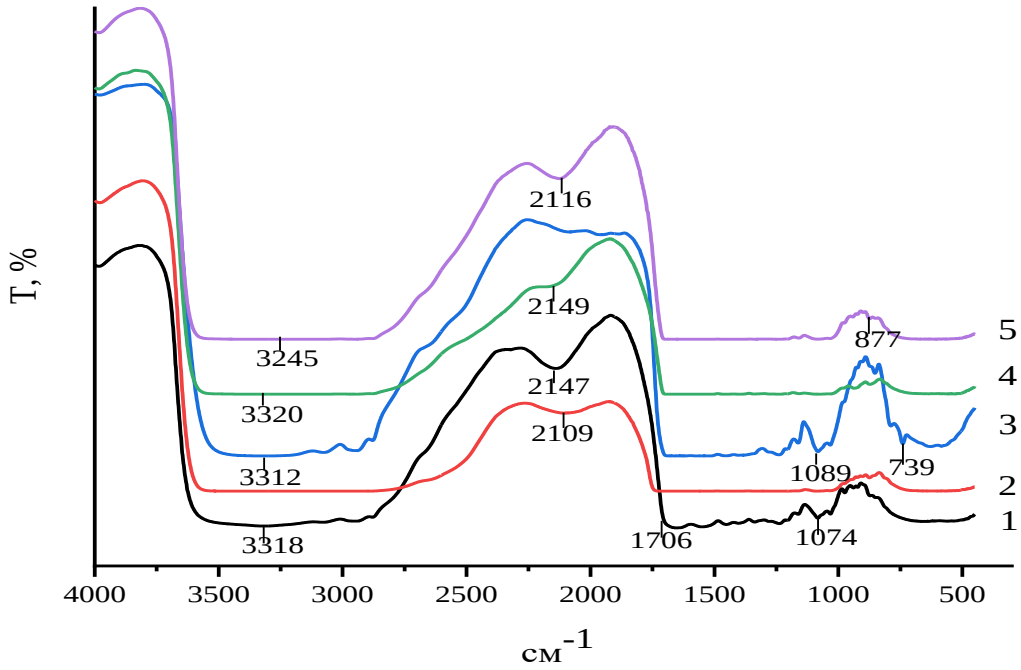


12 – сурет. Желатин - хитозан (1), желатин - лимон қышқылы (2) және желатин - L - глутамин қышқылы (3) негізіндегі үлдірлердің деформациясына орта pH-ның әсері

Әр түрлі pH мәндеріндегі желатин негізіндегі үлдірлердің құрылымдық - механикалық қасиеттерін зерттеу хитозан, лимон қышқылы және L - глутамин қышқылдарының желатинмен қоспаларының модельді асқазан ішек жолындағы өзгерістері жайлы мәліметтер береді. Тәжірибе нәтижелерінен L - глутамин қышқылының желатинмен қоспасы төмен pH мәндерінде берік құрылым түзіп, асқазанның қышқыл ортасының шарттарына төзетіндігін, ал сілтілік ортада L - глутамин қышқылы - желатин қоспасының құрылымдық қасиеттері әлсіреп, ішек фазасында инкапсуляцияланған инсулиннің босап шығуына қолайлы жағдай жасайтындығын көруге болады [266]. Осы реологиялық сипаттамалардың нәтижелерін нақтылауда ИҚ спектроскопия әдісі қолданылды.

Әр түрлі pH мәнінде дайындалған желатин-хитозан, желатин-лимон қышқылы және желатин-L-глутамин қышқылы негізіндегі үлдірлердің ИҚ спектрлері алынды.

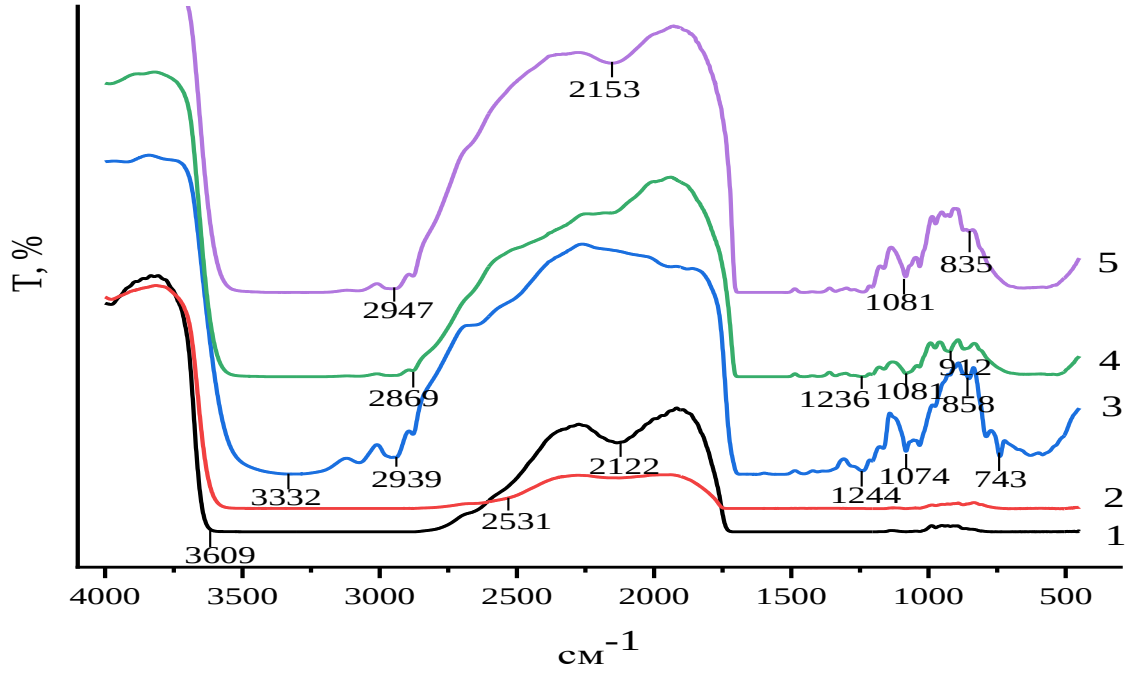
Желатин - хитозан негізінде алынған үлдірдің және оған әр түрлі pH мәндерінің (pH = 1.0; 4.01; 6.86; 9.18) әсерін бақылау кезінде алынған үлдірлердің ИҚ спектрлерінде (13 - сурет) 3245, 3312, 3318, 3320 $см^{-1}$ аймақтарында хитозан молекуласындағы OH, NH_2 топтарының жолақтары байқалды [267]. 2109, 2116, 2147, 2149 $см^{-1}$ толқын ұзындығында C-H тобына сәйкес келетін жолақтар жатқызылады [268]. Желатин молекуласының құрылымымен түсіндірілетін C=O тобына сәйкес жолақ 1706 $см^{-1}$ толқын ұзындығында байқалды. Желатин - хитозан және pH = 4.01 ИҚ спектрлеріндегі 1074, 1089 $см^{-1}$ аймақтарындағы жолақтар алифатты аминдердің C - N созылуына жатқызылды [23]. pH = 4.01; 9.18 ортасына салынған үлдірлердің ИҚ спектрлерінде 739, 877 $см^{-1}$ аймақтарында біріншілік және екіншілік аминдерге сәйкес N-H жолақтары байқалды [268].



1 - желатин - хитозан; 2 - pH = 1; 3 - pH = 4.01; 4 - pH = 6.86; 5 - pH = 9.18

13 – сурет. Желатин - хитозан негізінде алынған үлдірдің орта pH-ның өзгерісіндегі алынған ИҚ спектрлері

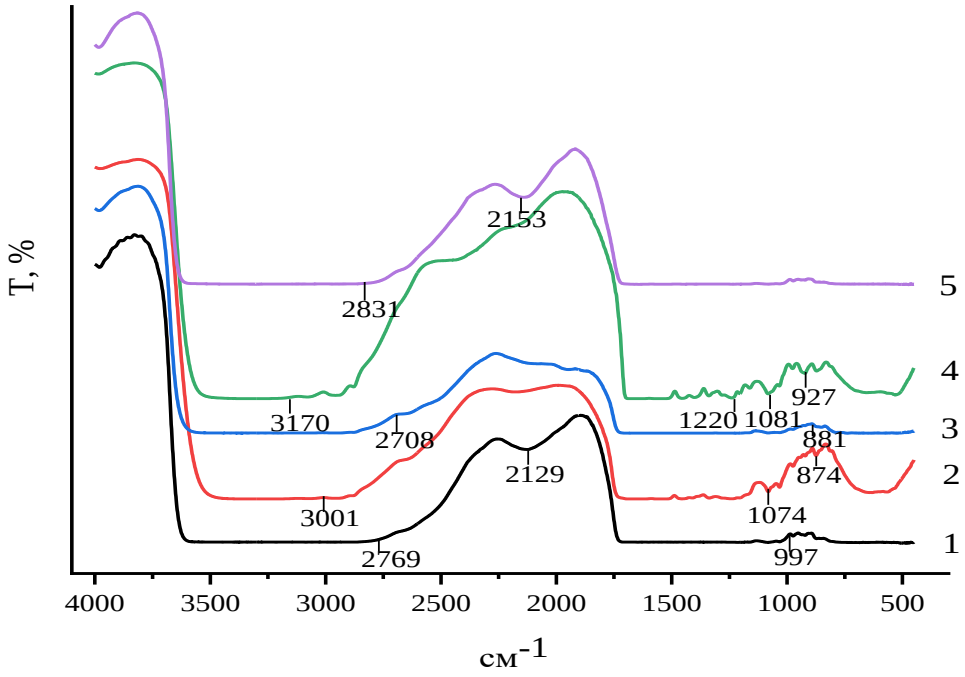
Желатин - лимон қышқылы негізінде алынған үлдірдің ИҚ спектрлерінде (14-сурет) лимон қышқылындағы - ОН тобына сәйкес жолақтар 3609, 3332 $см^{-1}$ аймақтарында пайда болды. 2869, 2939, 2947 $см^{-1}$ толқын ұзындығына сәйкес келетін әлсіз жолақтар валентті С-Н тербелістеріне жатқызылады [269]. 2531 $см^{-1}$ аймағында карбон қышқылының ОН тобы байқалды. Желатин - лимон қышқылы негізінде алынған үлдірге әр түрлі pH мәндерінің әсерін бақылау кезінде алифатты аминдердің С - N созылуына сәйкес келетін жолақтар 1074, 1081, 1236, 1244 $см^{-1}$ аймақтарында (pH = 1.0; 4.01; 6.86; 9.18 ИҚ спектрлерінде) пайда болды [270]. pH = 4.01; 6.86; 9.18 ИҚ спектрлерінде біріншілік және екіншілік аминдерге сәйкес N-H жолақтары 743, 835, 858, 912 $см^{-1}$ толқын ұзындықтарында көрінді [268].



1 - желатин - лимон қышқылы; 2 - pH = 1.0; 3 - pH = 4.01; 4 - pH = 6.86; 5 - pH = 9.18

14 – сурет. Желатин - лимон қышқылы негізінде алынған үлдірдің орта pH-ның өзгерісіндегі алынған ИҚ спектрлері

Желатин - L - глутамин қышқылы негізінде алынған үлдірдің ИҚ спектрлерінде (15 - сурет) 3001, 3170 $см^{-1}$ толқын ұзындықтарындағы жолақтар OH, NH_2 топтарына сәйкестелді, бұл L - глутамин қышқылының екі негізді амин қышқылдығымен түсіндіріледі. 2708, 2769, 2831 $см^{-1}$ аймақтарындағы жолақтар асимметриялық және симметриялық CH валенттілік тербелістеріне сәйкес келеді [271]. Желатин - L - глутамин қышқылы негізінде алынған үлдірдің ИҚ спектрлерінде де 1074, 1081, 1220 $см^{-1}$ толқын ұзындықтарында pH = 1.0; 4.01 ИҚ спектрлерінде алифатты аминдердің C - N созылуына сәйкес келетін жолақтарды байқадық. pH = 1.0; 4.01; 6.86 және желатин - L - глутамин қышқылы үлдірінің ИҚ спектрлерінде 874, 881, 927, 997 $см^{-1}$ аймақтарындағы жолақтар біріншілік және екіншілік аминдердің N-H тербелісіне сәйкестенген.



1 - желатин - L - глутамин қышқылы; 2 - pH = 1.0; 3 - pH = 4.01; 4 - pH = 6.86; 5 - pH = 9.18

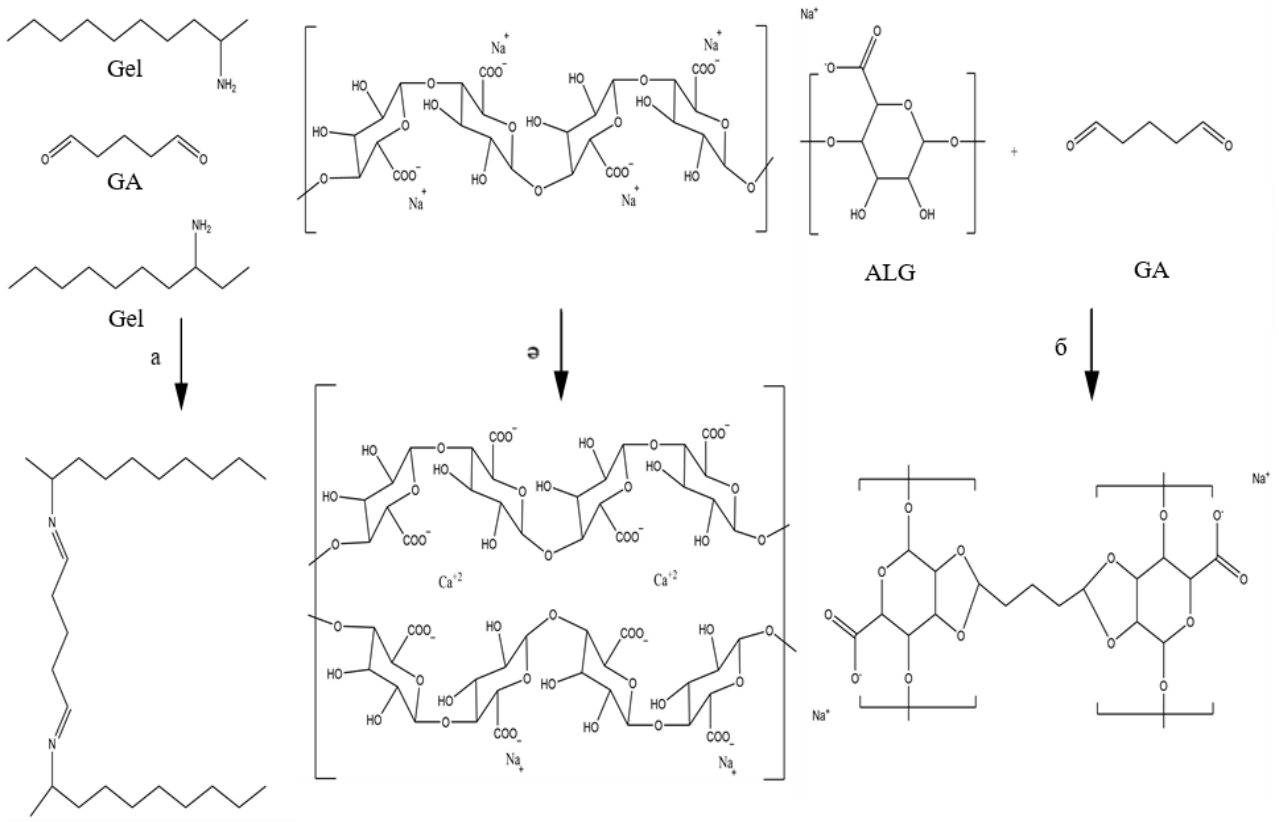
15 – сурет. Желатин - L - глутамин қышқылы негізінде алынған үлдірдің орта pH-ның өзгерісіндегі алынған ИҚ спектрлері

ИҚ спектроскопия әдісі бойынша алынған мәліметтердің нәтижелерін салыстырсақ, желатин - хитозан, желатин - лимон қышқылы және желатин - L-глутамин қышқылы жүйелерінің қатысында алынған үлдірлерге әр түрлі pH мәндерінің (pH = 1.0; 4.01; 6.86; 9.18) әсерін бақылау кезінде үш жүйеде де C - N созылуына және біріншілік, екіншілік аминдердің N-H тербелісіне сәйкес келетін жаңа жолақтар пайда болды. ИҚ спектрлердегі бұндай өзгерістер үлдірлерді әр түрлі pH орталарына салу барысында C-H, C-OH, C=O, C-N, N-H, $CH(NH_2)$, CH_2OH байланыс сандарының өзгерісінен болуы мүмкін.

3.6 Гибридті тасымалдау жүйелерінің матрицалық дизайны және инсулинді иммобилизациялауға арналған матрицаларды алу жолдарын оңтайландыру

Тігілу реакциялары ақуызды материалдардың биоыдырауын баяулатуы мүмкін [272]. Салыстырмалы түрде жұмсақ иондық гель түзілу процесінің негізінде альгинатты микросфералар биомедицинада қолдануда потенциалды үміткерлер болып табылады. Дәрілік затты тасымалдауға биополимерлі матрицалардың екі моделі таңдалынды: натрий альгинаты матрицаны құраушы гель түзуші негізгі агент және желатин қосымша гель түзуші агент. Ионотропты гель түзу мен ковалентті тігуді әр түрлі комбинацияда біріктіру бізге бірнеше тасымалдаушы матрицаларды жобалауға мүмкіндік береді.

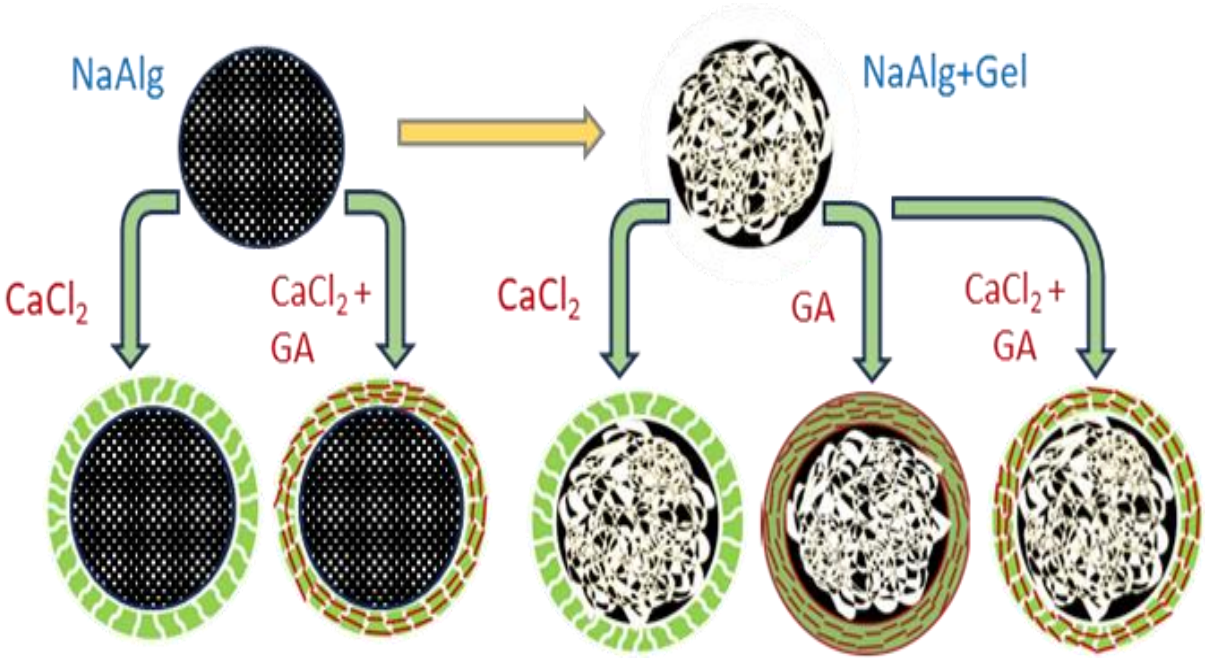
16-шы суретте полимерлі матрицаларды Ca^{2+} және GA иондарының қатысында тігу механизмі келтірілген.



16 – сурет. Полимерлі матрицалардың Ca^{2+} ионымен GA қатысында тігілу механизмдері

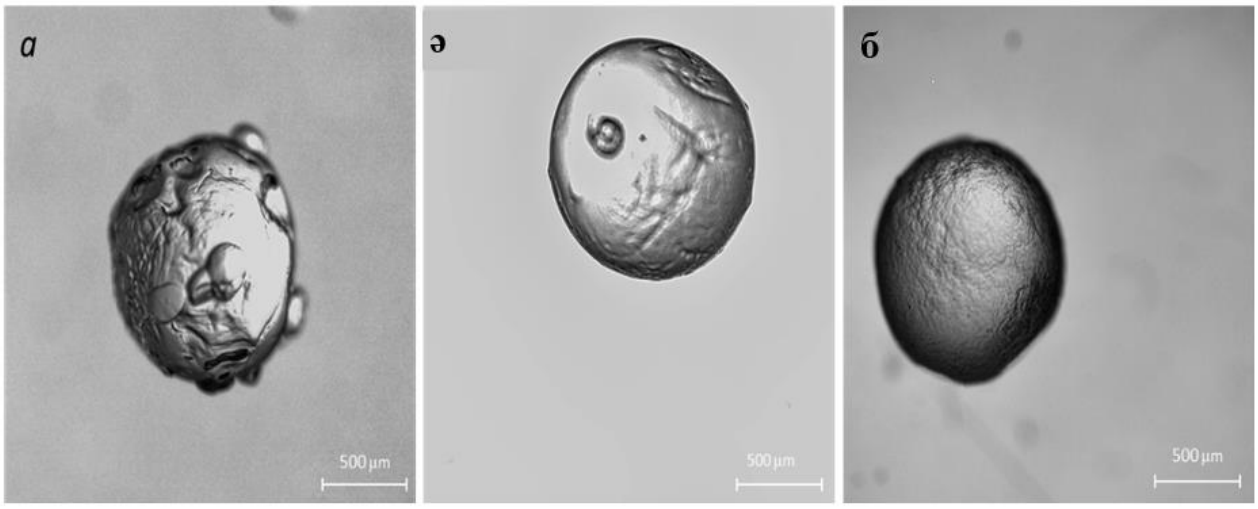
Ұсынылған механизмерге сүйене отырып, натрий альгинатын негізгі, желатинді екіншілік гель түзуші агент ретінде қолданып, жеке және аралас гидрогель композицияларынан тұратын бірнеше гибридті жүйелердің дизайны модельделді (17 – сурет).

Альгинаттағы карбоксильді және гидроксильді топтар жоғары реакциялық қабілеттілікке ие және тігуші ион Ca^{2+} альгинатты тізбектің G-блоктарымен әрекеттесуінің нәтижесінде үш өлшемді полимерлі торлар пайда болады (17 – сурет, ALG ($CaCl_2$)). Желатинді натрий альгинатына қосу бұл биополимерлердің тор ішілік электростатикалық әрекеттесуіне алып келуі керек (17 - сурет, ALG - Gel ($CaCl_2$)). Глутаральдегид желатин мен альгинаттың аминтопторы және гидроксиль топтарымен үш өлшемді полимерлі тор түзіп, тігуші агент ретінде ковалентті әрекеттесе алады (17 - сурет, ALG - Gel (GA)). ALG – Gel ($CaCl_2$ - GA) матрицасында Ca^{2+} және GA тігуші агенттерінің екеуі де болғандықтан, бұнда жоғарыда келтірілген әрекеттесулердің барлығы да жүреді деп күтіледі және олар полимерлі торды нығайтуға септігін тигізеді.



17 - сурет. Инсулинді иммобилизациялауға арналған гидрогель матрицаларының дизайны

Бөлшектер тігуші агент құйылған ыдысқа шприцтен тамшылардың тамуы кезіндегі сыртқы тігу әдісімен алынған [273]. Капиллярлы ине диаметрі, материал және беттік керілу бөлшектердің өлшемін анықтаушы негізгі факторлар болып табылады. Биополимер ерітіндісі инеден итеріліп шығарылғанда, итеруші күш тамшы мен иненің бөліну шекарасындағы беттік керілуден үлкен болған кезде тамшы капиллярдан бөлінеді. Тамшылардың бөлінуі тұрақсыздықтардың (бастапқыда Толлмин-Шлихтинг толқындары, одан кейін Рэлей - Плато тұрақсыздықтарының) артуына байланысты ағынды бұзудың күрделі процесі болып табылады. Ағын тұрақсыздыққа ұшыраған кезде бастапқы тамшыдан кішігірім бағыттас тамшылар бөлінеді [274] Осы кішігірім бағыттас тамшылар негізгі тамшының беткі қабатына жабысып, күрделі және қажетсіз беттік морфологияға алып келеді (18 (а) - сурет). Тамшылардың түзілуін тұрақтандыру мақсатында тамшыларды алуда ультрадыбыс қолданылды [275]. Тігу процесі жүргізуге арналған ыдыс Symphony ультрадыбыстық сандық ваннасына ((VWR, АҚШ) f=35 кГц жұмыс жиілігімен және ультрадыбыстық энергияның айналмалы мөлшерімен орналастырылды. 18 (ә) және (б) суреттерінде ALG ($CaCl_2$) бөлшектерінің модифицирленген әдістің эффективтілігін көрсететін, 50% және 100% ультрадыбыс энергиясы мөлшерінде жасалынған беттік морфологиясындағы өзгерістер келтірілген.



а – ультрадыбыссыз; ә – 50% энергиямен ультрадыбыс процесі;
б - 100% энергиямен ультрадыбыс процесі

18 – сурет. Бөлшектердің морфологиясына ультрадыбыстың әсері

3.7 Оңтайландырылған матрицаларға инсулинді иммобилизациялау, инкапсуляция эффективтілігі және стереомикроскопия, СЭМ талдаулары

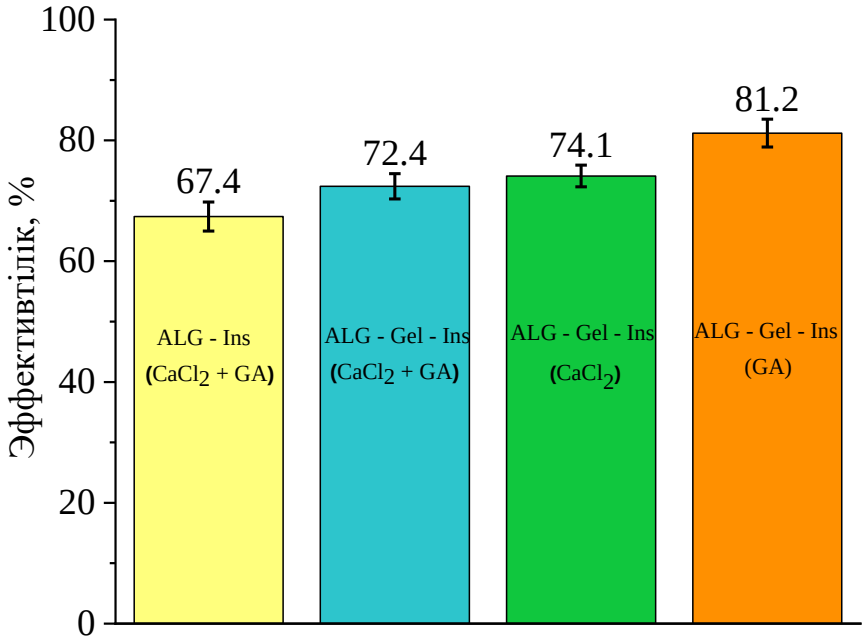
19-шы суретте активті фармацевтикалық заттарды иммобилизациялаудың классификациясы келтірілген. Инсулинді полимерлі гельдерге иммобилизациялау активті фармацевтикалық субстанцияларды иммобилизациялаудың физикалық (гельге енгізу) әдістеріне жатады [276].



19 – сурет. Активті фармацевтикалық заттарды иммобилизациялау әдістері [277, 278].

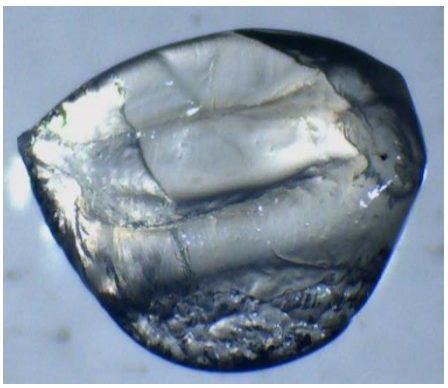
Инсулин - полпептидті тізбектерден тұратын ақуызды гормон, А – тізбегі (21 аминқышқылы) және В – тізбегі (30 аминқышқылы) бір бірімен дисульфидті көпірмен жалғанған. Гибридті матрицаға иммобилизацияланған инсулин гельдің кеуектерінде инкапсуляцияланады. Бұндай резервуарлы жүйелердің ядросы гидрогельді мембранадан тұрады және ядродағы дәрілік заттың жоғары концентрациясы пролонгациялық босап шығуды қамтамасыз етеді [279]. Көп жағдайда иммобилизацияланған активті фармацевтикалық заттар денатурациялық факторларға (pH, температура және т.б.) жоғары тұрақтылықпен сипатталады.

Инкапсуляция эффективтілігі гидрогельдің инсулинді иммобилизациялау/ұстау қабілеттілігін сипаттайды. 20-шы суретте инсулинді жеткізу жүйелерінің инкапсуляция эффективтілігі берілген. Гибридті матрицаны $CaCl_2$ және GA тігуші агенттермен тігу эффективті инкапсуляциялауды көрсетеді.

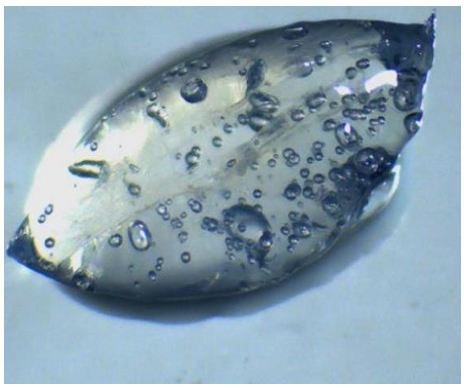


20 - сурет. Инсулинді жеткізу жүйелерінің инкапсуляция эффективтілігі

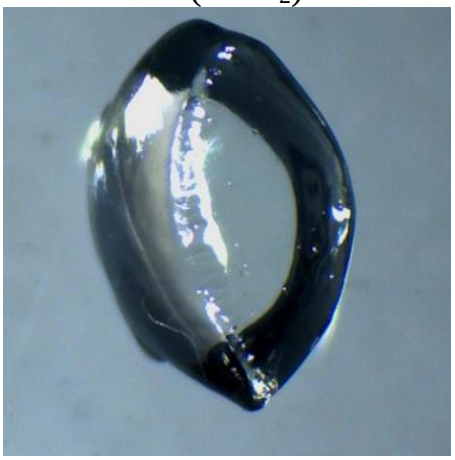
Инсулинмен жүктелген полимерлі матрицалардың құрылымы SMZ-171 TLED (ESD) стереомикроскопының көмегімен зерттелді. Төменде 21-ші суретте полимерлі бөлшектер қимасының стереомикроскопиялық нәтижесі көрсетілген. Инсулинмен жүктелген полимерлі бөлшектердің барлық үлгілерінде (альгинат, альгинат – желатин) тігуші агенттің түріне қарамастан бастапқы үлгілермен салыстырғанда гидрогель көлемінде кеуектер байқалды.



ALG ($CaCl_2$)



ALG - Insulin ($CaCl_2$)



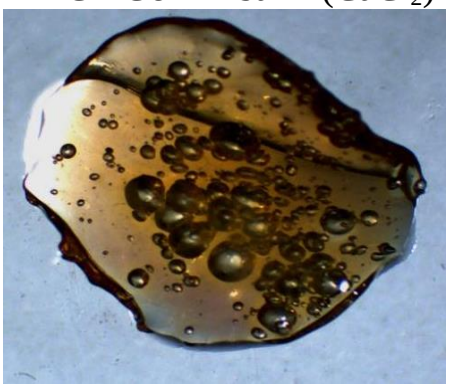
ALG - Gel ($CaCl_2$)



ALG - Gel - Insulin ($CaCl_2$)



ALG - Gel (GA)



ALG - Gel - Insulin (GA)



ALG - Gel ($CaCl_2$ - GA)



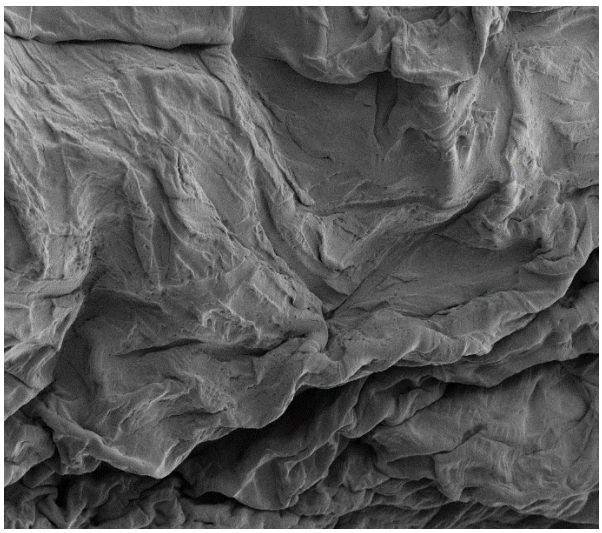
ALG - Gel - Insulin ($CaCl_2$ - GA)

21 - сурет. Альгинат, альгинат – желатин полимерлі матрицаларының қималарының стереокескіндері

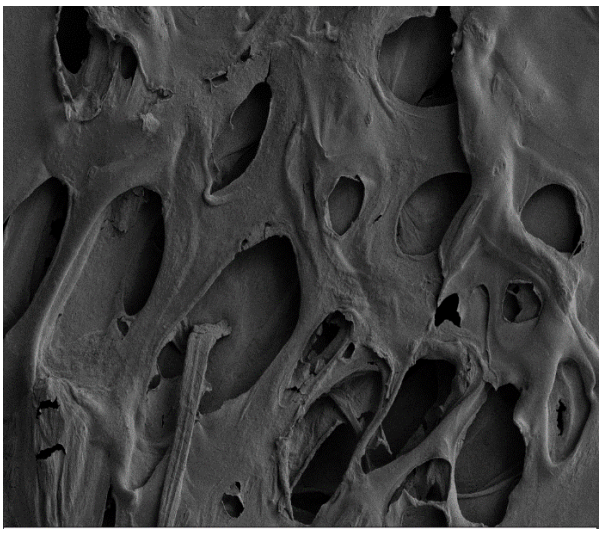
Инсулинмен жүктелген үлгілерде (21, 22 - суреттер) кеуектердің түзілуі инсулиннің иммобилизациясы немесе адсорбциясы жақсы жүретіндігінің дәлелі болуы мүмкін. Бұл жағдайда инсулин фермент ретінде әсер етеді деп қарастырсақ, онда альгинат пен альгинат – желатин субстрат болып табылады. Әдетте фермент пен субстрат арасында химиялық құрамы мен құрылысы бойынша ұқсастық болады.

Берілген жүйе компоненттері: альгинат, желатин және инсулин арасында құрамы мен құрылысы бойынша ұқсастық бар. Ұқсастық олардың құрамында карбоксил (-COOH) және амин ($-NH_2$) функционалды топтарының болуымен түсіндіріледі. Егер фермент өз субстратын табатын болса, оның активтілігі жоғарылайды. Сол себепті инсулин альгинат және желатин бетінде жоғары деңгейде иммобилизацияланған (немесе адсорбцияланған). Нәтижесінде альгинат, альгинат – желатин бөлшектерінің бетінде инсулиннің сәтті иммобилизациясын көрсете алатын кеуектер пайда болды.

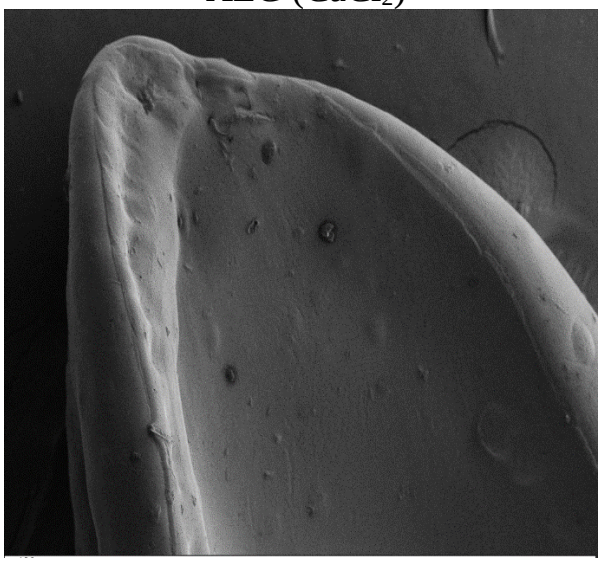
Бастапқы және инсулинмен жүктелген альгинат үлгілерінің морфологиясы СЭМ көмегімен зерттелді (22 - сурет). Инсулинмен жүктелген альгинат бөлшектері (22 - сурет, ALG - Insulin ($CaCl_2$)) бастапқы үлгімен салыстырғанда кеуекті құрылым көрсетті. Натрий альгинатына желатин қосқан кезде тегіс беттің түзілгендігін байқауға болады, себебі бастапқы альгинаттың беті (22 - сурет, ALG ($CaCl_2$)) біркелкі емес болып табылады. ALG/Gel композициясына инсулинді иммобилизациялау кезінде алынған СЭМ кескіндерінде екі жағы да ойыңқы формалы кеңістіктер (22 - сурет, ALG - Gel - Insulin ($CaCl_2$) және AlG – Gel - Insulin ($CaCl_2$ - GA)), сонымен қатар басыңқы бос кеңістіктер (22 - сурет, AlG - Gel - Insulin ($CaCl_2$ - GA)) байқалды. Зерттелінген үлгілердің морфологиясындағы бұндай өзгерістер инсулиннің ALG және ALG/Gel полимерлі композициясымен әрекеттесетіндігінің дәлелі бола алады.



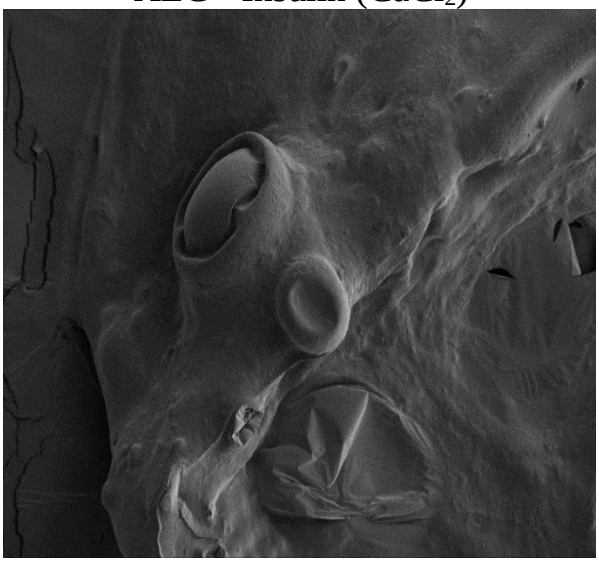
ALG ($CaCl_2$)



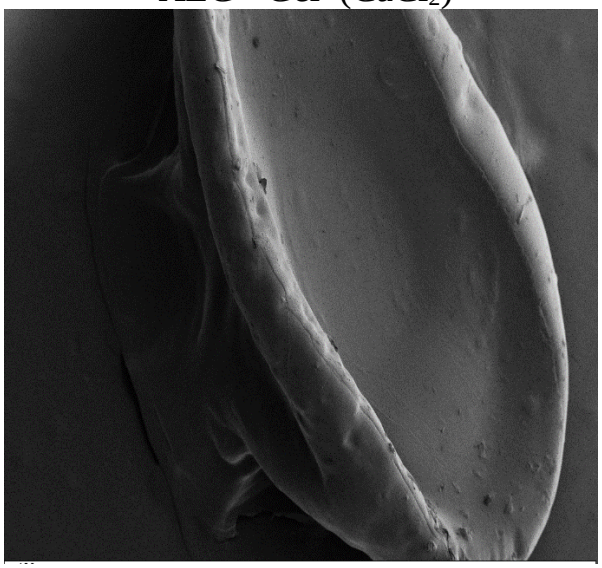
ALG - Insulin ($CaCl_2$)



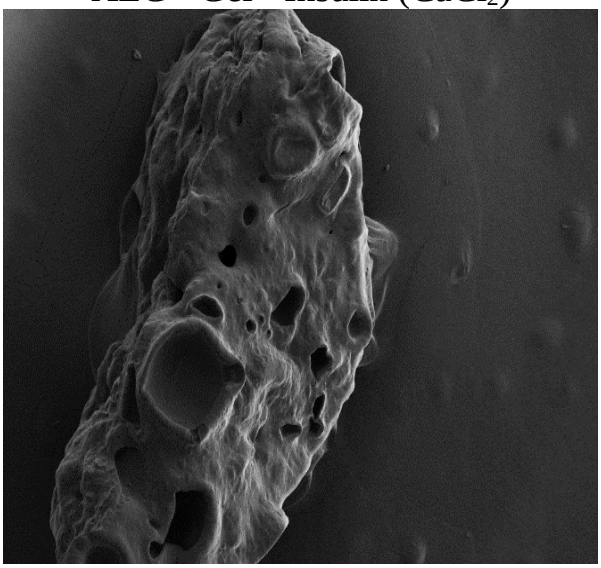
ALG - Gel ($CaCl_2$)



ALG - Gel - Insulin ($CaCl_2$)



ALG - Gel ($CaCl_2$ - GA)



AlG - Gel - Insulin ($CaCl_2$ - GA)

22 - сурет. Альгинат, альгинат – желатин полимерлі матрицаларының қималарының СЭМ кескіндері

3.8 Молекулалық динамикалық моделін құрастыру

Потенциалды энергия – бұл молекуладағы атомдардың салыстырмалы орналасуымен байланысты толық энергияның мөлшері. Молекулааралық әрекеттесу механизмдерін анықтау мақсатында алынған полимерлі матрицалардың потенциалды энергиясын модельдеуде *Molecular Mechanics 2 (MM2)* бағдарламасы қолданылды. *MM2*-де молекулалық жүйенің потенциалдық энергиясы байланыстың созылу энергиясы, бұрыштық иілу энергиясы, бұралу энергиясы, Ван-дер-Ваальс энергиясы және электростатикалық энергия сияқты белгілі бір атомдық өзара әрекеттесулермен байланысты энергия мөлшерлерінің қосындысы ретінде есептеледі (3 - кесте). Желатин көптеген аминқышқылдарының күрделі қоспасы болғандықтан, желатиннің әрекеттесу энергиясын есептеуде желатиннің негізгі компоненттері глицин мен пролин қолданылды [280]. Барлық молекулярлы құрылымдар *ChemDraw Professional Suite 22* бағдарламасында құралып, талданады. Модельдеу нәтижелері бойынша инсулинді инкапсуляциялау процесінде диполь – дипольді әрекеттесулер басым: ALG – Ins (81%), Gel – Ins (97%), Ins – Ins (88%). Олар жалпы өзара әрекеттесу энергиясының 80% - дан астамын құрайды, бұл электростатикалық тартылыс алынған матрицалардағы ең басым механизм екенін растайды. Альгинат - желатин өзара әрекеттесуі негізінен полярлық энергия компонентінің жеткіліксіз үлесі бар Ван-дер-Ваальс түріне ие. Желатин мен альгинат арасындағы салыстырмалы түрде әлсіз электростатикалық потенциал гельдің гибридті құрылымын көрсетеді, мұнда барлық компоненттер өзара енетін гель желілерін құрып, тәуелсіз тігілген [281].

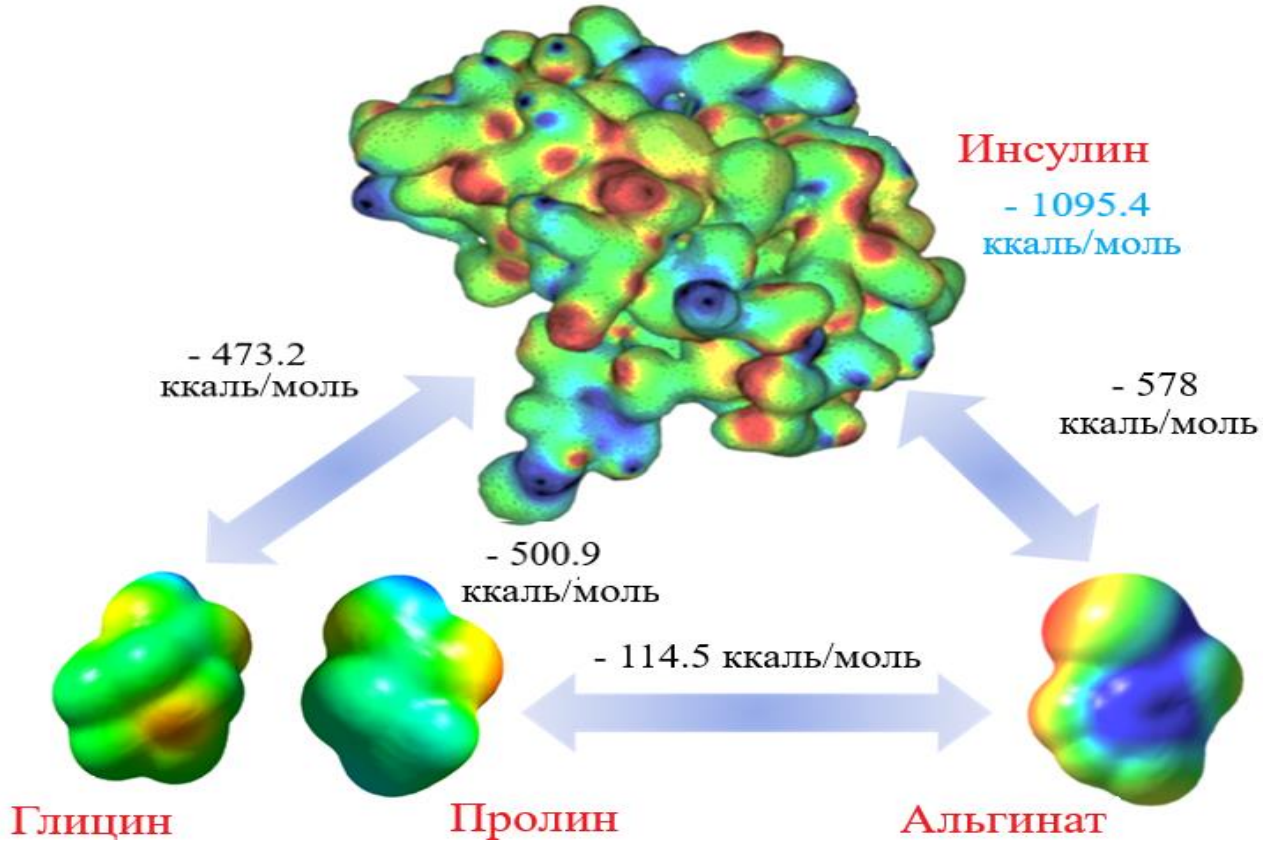
3 – кесте. ALG - Gel - Ins жүйесіндегі молекулааралық әрекеттесудің есептелген энергиялары

Энергия (ккал / моль)	Натрий альгинаты	Пролин	Глицин	Инсулин
Натрий альгинаты	-215.5	-81.9	-114.5	-578.1
Пролин	-81.91	11.19	0.757	-500.9
Глицин	-114.5	0.757	-17.31	-473.2
Инсулин	-578.1	-500.9	-473.2	-1095.4

Молекулалық модельдеу гидрогель компоненттері мен инсулин арасындағы өзара әрекеттесуді жақсы түсінуге мүмкіндік береді. Электростатикалық потенциал картасы молекулалардағы күшті және әлсіз электростатикалық потенциалы бар аймақтарды көрсетеді. Қызыл түске боялған аймақтар электротеріс топтардың болуына байланысты электрондардың тартылуының күшті потенциалын көрсетеді. Керісінше, көк түсті аймақтар электрон донорлық потенциалдың төмен деңгейін көрсетеді. 23-

ші суретте инсулин аминқышқылдарының, натрий альгинаты және желатиннің оңтайландырылған құрылымдары және сәйкес электростатикалық потенциал картасы көрсетілген.

Инсулин-инсулиннің өзара әрекеттесуі ең үлкен энергияға ие - 1095.4 ккал/моль, бұл оның өзіндік жиналуға және фибриллдердің түзілуіне бейімділігін жақсы түсіндіреді.

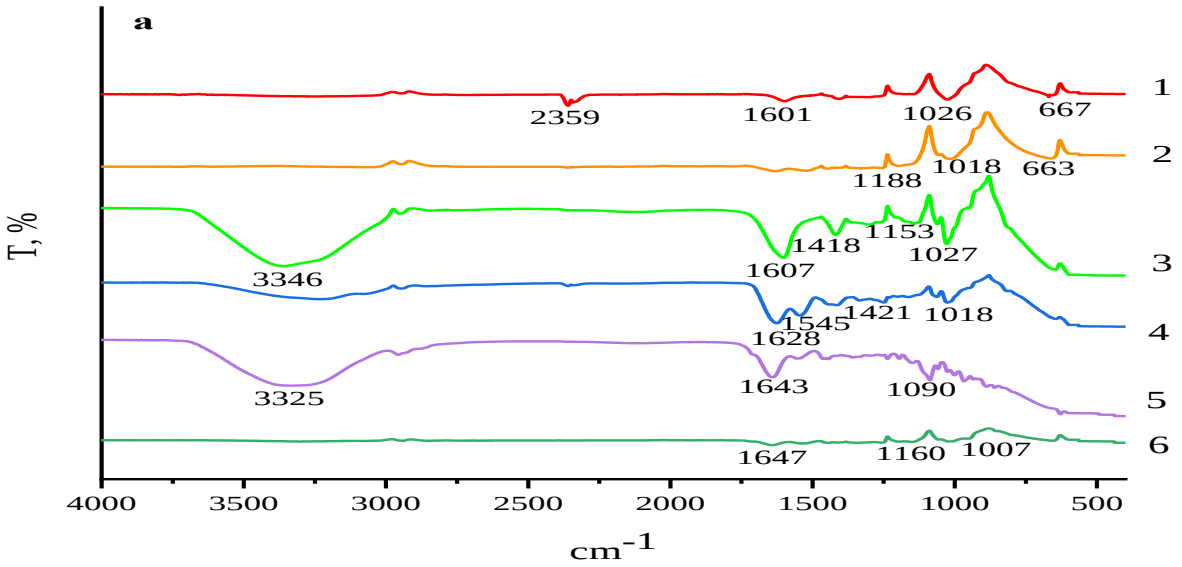


23 - сурет. Өзара әрекеттесуші молекулалардың электростатикалық потенциалының есептелген карталары және жұптық өзара әрекеттесудің толық энергиялары. Инсулиннің электростатикалық потенциал картасы [282] әдебиет көзіне бейімделген

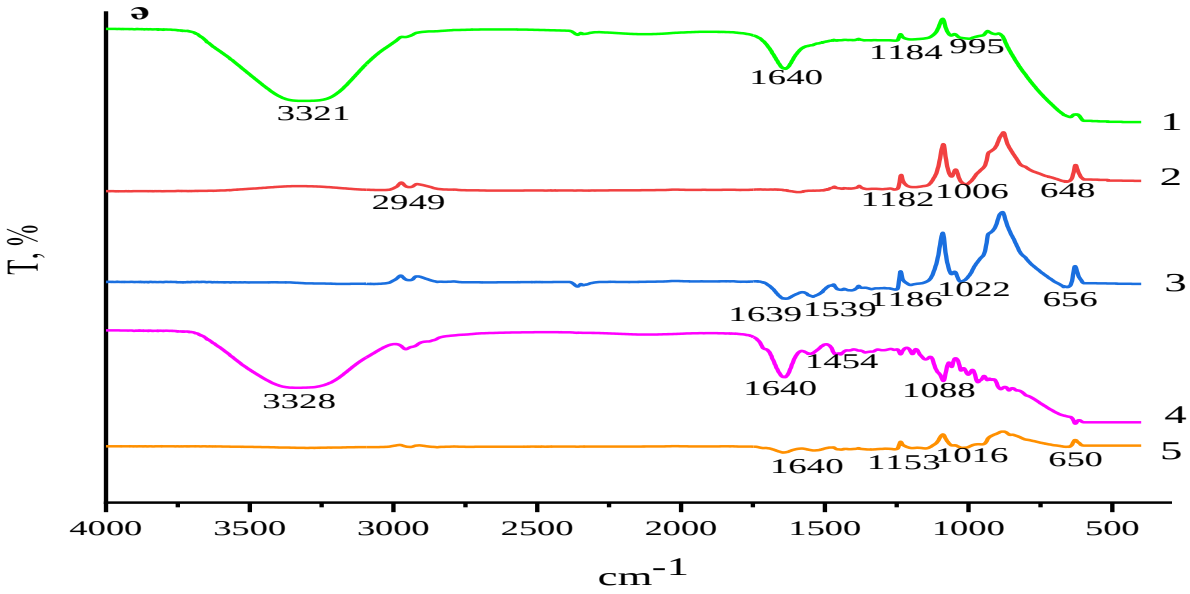
Бір таңқаларлығы, желатин (глицин, - 473.2 ккал/моль, пролин, - 500.9 ккал/моль) және натрий альгинаты (- 578.1 ккал/моль) инсулинге қатысты күшті электростатикалық потенциалдарды көрсетті, бұл инсулинді инкапсуляциялау механизмінінің дұрыс болжамдалғандығына сенім береді. Бұл сонымен қатар толтырғыш молекулаларымен әрекеттесу фибриллдердің түзілуіне әсер етеді деген қорытындымызды растайды. Өзара әрекеттесу потенциалының аз мөлшеріне қарамастан, капсуляция матрицаларының ішінде инсулин әлдеқайда аз концентрацияда болады. Сондықтан өзара әрекеттесу орындарының саны инсулин молекулаларындағы осындай орындардың санынан едәуір асып түседі. Нәтижесінде инсулин, альгинат және желатин арасындағы бәсекеге қабілетті электростатикалық адсорбция әсерінен фибриллдердің түзілуінің төмендеуін күтуге болады [283].

3.9 Инсулинмен жүктелген гибридті матрицаның ИҚ талдауы

Инсулинмен жүктелген матрицалардың құрамы жайлы мәлімет алу үшін ИҚ спектроскопия әдісі қолданылды. Әр түрлі тігуші агенттерді қолдану кезіндегі ALG және ALG - Gel жүйелерінің ИҚ спектрлері 24-ші суретте көрсетілген.



1 – ALG; 2 – Gel; 3 - ALG ($CaCl_2$); 4 – ALG - Gel ($CaCl_2$);
5 – ALG - Gel (GA); 6 – ALG - Gel ($CaCl_2$ - GA)



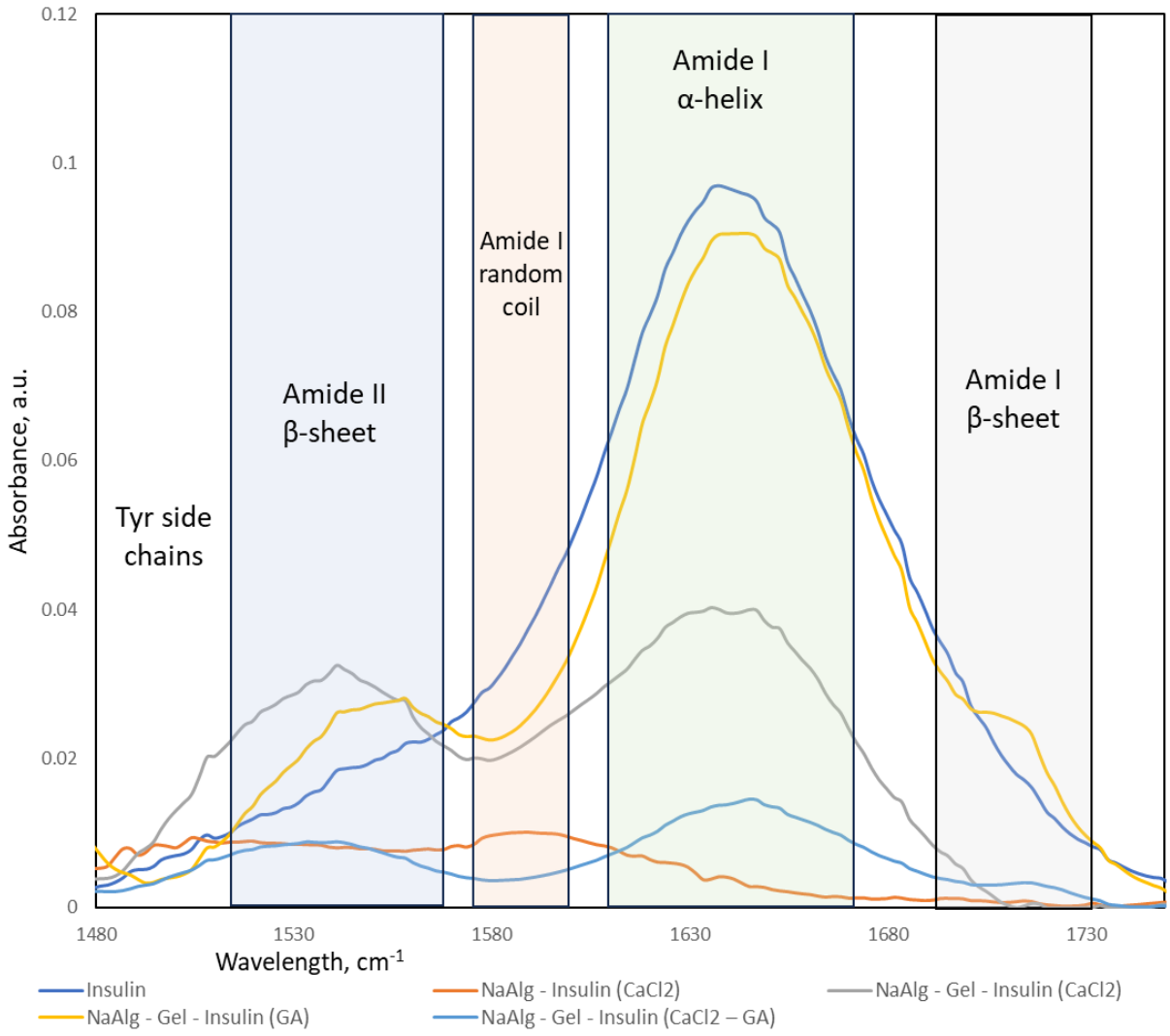
1 - Insulin; 2 - ALG - Insulin ($CaCl_2$); 3 - ALG - Gel - Insulin ($CaCl_2$);
4 - ALG - Gel - Insulin (GA); 5 - ALG - Gel - Insulin ($CaCl_2$ – GA)

24 - сурет. Инсулинсіз (а) және инсулинмен (ə) тігілген альгинат, альгинат – желатин полимерлі матрицаларының ИҚ спектрлері

3500-3000 $см^{-1}$ диапазонында байқалған пиктер полимерлі матрицалардың гидроксильді (-OH) топтарына сәйкес келеді [284]. 2949 $см^{-1}$ толқын ұзындығындағы жұтылу жолағы C-H валентті тербелістеріне тән пик болып табылады және инсулинмен жүктелген альгинат бөлшектерінде кездеседі [285]. ALG - Gel композицияларының үлгілеріндегі 1643-1599 $см^{-1}$ диапазонындағы интенсивті пиктер II-лік амидтің N-H деформациялық тербелістері мен N-C=O валентті тербелістеріне сәйкес келеді [286] және ALG – Gel композициясындағы пептидті байланыстардың бар екендігін дәлелдейді. Ароматты қосылыстардың C-C созылуына тән жолақтар 1418-1454 $см^{-1}$ аралығында байқалды. Барлық келтірілген спектрлердегі 1006-1300 $см^{-1}$ аймағындағы тербеліс жолақтары C-O және C-H деформацияларына жатқызылады [287]. Инсулинмен жүктелген үлгілерде 667-648 $см^{-1}$ диапазонында O=N-O байланыстарының деформациялық тербелістерінің жаңа пиктері байқалды. 1640 $см^{-1}$ аймағында инсулин спектрінде тіркелген пик инсулинмен жүктелген ALG – Gel композицияларының барлық спектрлерінде жұтылу жолақтарының интенсивтілігіндегі айырмашылықтарға қарамастан өзгеріссіз сақталды. Берілген пиктің өзгеріссіз жағдайы иммобилизацияланған инсулиннің тұрақтылығының дәлелі бола алады.

Натрий альгинатының, желатиннің және инсулинмен жүктелген ALG – Gel қоспасының 1700–1500 $см^{-1}$ диапазонындағы ИҚ-Фурье-спектрлері (25 – сурет) жүйедегі конформациялық өзгерістерді түсіну үшін өте маңызды. Инсулин спектрлері I амилоидтың α-спираль құрылымымен, I амилоидтың β-бетінің шағын бөлігімен және II амилоид аймағындағы жолақтармен байланысты күшті шыңдарды көрсетеді. Инсулинмен жүктелген гидрогель бөлшектерінің ИҚ-Фурье-спектрлері [288] әдебиеттегідей спектрлердің басыңқы көк ығысуын көрсетті. Қатты көк ығысу әдетте молекулалық ортадағы өзгерістермен немесе матрица ішіндегі өзара әрекеттесумен байланысты. ИҚ жолақтарының көгілдір ығысуының кең таралған себептерінің бірі сутектік байланыстардың түзілуі болып табылады. Сутектік байланыстар жұтылу жолақтарының ығысуына алып келетін молекулалардың тербеліс режимдерін өзгерте алады. Молекулалық модельдеу нәтижелері көрсеткендей, сутектік байланыстар инсулиннің альгинат пен желатинмен байланысуындағы негізгі механизм болып табылады.

Қандағы қант деңгейін реттейтін маңызды гормон инсулиннің белгілі бір жағдайларда амилоидты фибрилдерді түзетіні анықталған. Агрегацияға ықпал ететін жағдайларда инсулин молекулалары конформациялық өзгерістерге ұшырап, бета беттерінің пайда болуымен сипатталатын фибриллярлық құрылымдарға жиырылуы мүмкін. Бұл агрегация процесі, ерімейтін агрегаттар түзетін, инсулин молекулаларының конформациялық жиырылуымен байланысты. Фибрилдің түзілу процесін инсулиннің қоршаған ортамен (натрий альгинаты және желатин) әрекеттесуін өзгерту және ақуыздың конформациялық өзгерістеріне әсер ету арқылы басқаруға болады.



25 - сурет. Инсулинмен жүктелген полимерлі матрицалардың 1500 - 1700 $см^{-1}$ аймақтарындағы ИҚ-Фурье-спектрлері және инсулин жолақтарының сәйкес таралуы

Инсулиннің амилоидты фибрилдері бұрыс жиырылған ақуыздар немесе пептидтерден тұрады, олар өзіне тән құрылымы бар көлденең β-беттік ерімейтін фибрилдерге бірігеді. Фибрилдер β-беттік құрылымдарының болуымен сипатталады [289]. Инсулин фибрилдерінде β-беттердің түзілуі ақуыздың құрылымдық бірігуінің артқандығын көрсетеді. Инсулинмен жүктелген гидрогель бөлшектерінің ИҚ-Фурье-спектрлері өңделді (базалық жою және деконволюция). Есептелген фракциялық пик ауданы дайындалған бөлшектердегі инсулиннің екіншілік құрылымдарының салыстырмалы құрамын білдіреді (4 - кесте).

4 - кесте. Алынған гидрогельдердегі инсулин конформациясының фракциялық талдауы

Атауы	α-спиралды I амилоид	β-бетті I амилоид	кездейсоқ I амилоид	β-бетті II амилоид	Тирозиннің бүйір тізбектері
Insulin	89	-	-	11	-
ALG - Ins ($CaCl_2$)	-	-	54	-	46
ALG - Gel - Ins ($CaCl_2$)	55	-	-	45	-
ALG - Gel - Ins (GA)	75	7	-	18	-
ALG - Gel - Ins ($CaCl_2$ + GA)	59	4	-	37	-

Инсулиннің бастапқы түрінде негізінен инсулиннің ең биожетімді конфигурациясы I амилоидтың α-спиралінен тұрады. II амилоидтың β-бетінің шамалы фракциясы инсулиннің жоғары концентрациясына және ұзақ сақтау уақытына байланысты әлсіз агрегацияны көрсетеді. Ионотропты гельтүзілу әдісі арқылы тігілген натрий альгинаты бөлшектері негізінен I амилоидтың кездейсоқ орамдары мен кейбір тирозин тізбектерін қамтиды. ALG + Ins ($CaCl_2$) фибрилдердің түзілуі байқалмады.

Құрамында желатині бар барлық гидрогельдер құрамында I амилоидтың α-спиралінің болуын көрсетеді, соның ішінде глутаральдегидпен тігілген үлгілерде ең жоғары фракциялар байқалды. Бірақ $CaCl_2$ қатысында тігілген аралас гидрогельдер құрамында I амилоидтың α-спиралінің үлесі аз, ал II амилоидтың β-бетінің едәуір жоғары үлесі бар. Бұл фибрилдің түзілу процесінің жүруін көрсетеді, өз кезегінде мұндай құрамдардың дәрілік препараттарды тасымалдаудағы қолайлылығы төмендейді. I амилоидтың β-бетінің конформациясының едәуір фракциясы байқалды, ол инсулиннің глутаральдегидпен әрекеттесуінің нәтижесі болуы мүмкін.

Фибрилдің түзілуі ақуыз құрылымдарының кездейсоқ спиральді немесе α-спиральді конформациядан β-беті көп құрылымдарға ауысуын қамтиды. Матрицаға желатинді қосу фибрилдің түзілуін және гидрогельден инсулиннің ағып кетуінің алдын алатындығы байқалды. Аминқышқылдарымен әрекеттесу нәтижесінде фибрил түзілуінің алдын алу процесінің себебін желатинді тізбектер мен инсулин молекулалары арасындағы бәсекелес адсорбциямен түсіндіруге болады деп есептейміз.

Кедергі/стерикалық фактор арқылы нуклеацияның бұзылуы, β-беттерінің түзілуінің тежелуі және диффузиялық тасымалдауды шектеу - аминқышқылдарының немесе басқа агенттердің фибрилдердің түзілуіне кедергі бола алатын ең көп таралған механизмдері. Гидрофобты немесе ароматты бүйір

тізбектері бар желатин аминқышқылдары фибрилдердің түзілуіне әкелетін, молекулааралық өзара әрекеттесу үшін өте маңызды ақуыз бетіндегі байланыстыру орындарын бәсекеге қабілетті түрде иемденуі мүмкін. Гидрофобты бүйір тізбектері бар аминқышқылдары ақуыздардың агрегациясына әкелетін гидрофобты әрекеттесулерге кедергі келтіре алады. Ақуыз бетіндегі гидрофобты аймақтармен бәсекеге түсе отырып, олар фибриллогенезге ықпал ететін гидрофобты күштерді бұзады.

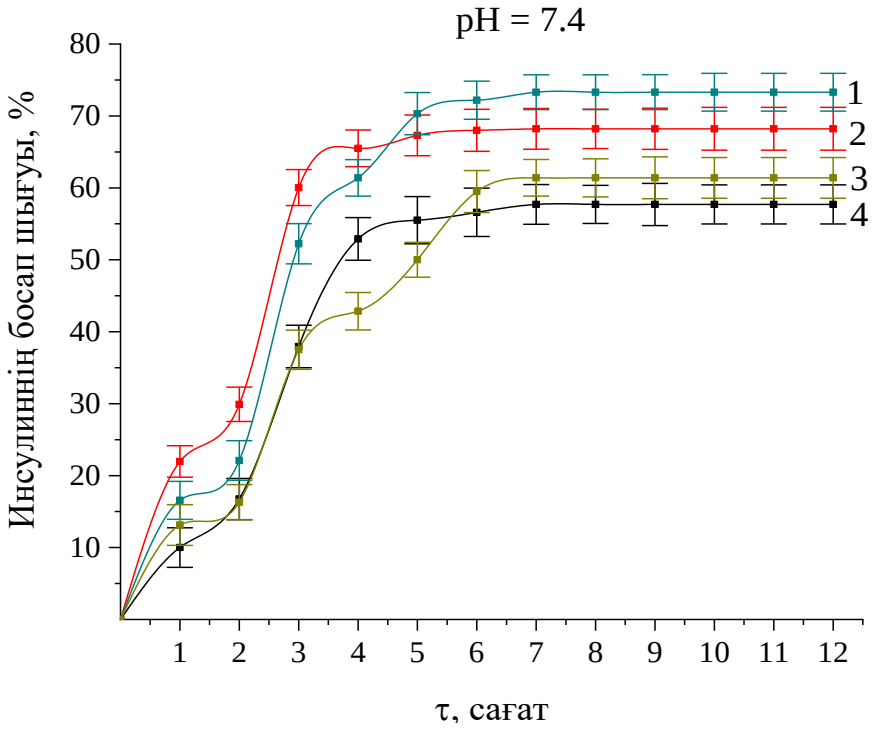
Сонымен қатар, аминқышқылдары инсулин молекулаларының өзара әрекеттесу орындарын физикалық түрде блоктау арқылы стерикалық кедергілер тудыруы мүмкін. Бұл тұрақты ядролардың пайда болуына қажетті жақындасуды болдырмайды [290]. Егер ядро пайда болса, фибрилдерге тән β-беттік құрылымдарының түзілуін бұзатын аминқышқылдары осы өзара әрекеттесулер орын алатын аймақтармен байланыса алады. Бұл β-беттердің қатпарлануын бұзады және фибриллдердің өсуіне жол бермейді. Зарядталған бүйір тізбектері бар аминқышқылдары ақуыздардың агрегациясына қатысатын электростатикалық өзара әрекеттесулерге әсер етуі мүмкін. Инсулин молекуласының зарядталған аймақтарымен байланыса отырып, фибрилдердің түзілуіне жол бермейді. Сонымен қатар, ірі биополимерлі молекулалар ақуыздың агрегация уақытын арттырып, фибрилдердің түзілуіне әсер ететін, "молекулалық жинақталу" деп аталатын диффузияға кедергіні қамтамасыз ете алады.

Осылайша матрицаның құрамы мен тігуші агенттерді түрлендіру арқылы альгинат пен желатин негізінде инсулинді иммобилизациялауға арналған полимерлі матрицалар алынды. Инсулинмен жүктелген матрицалардың құрылымы стереомикроскоп және СЭМ арқылы зерттелді. Полимерді матрицаларға иммобилизацияланған инсулинді идентификациялауда ИҚ спектроскопия қолданылды. Инсулинді тасымалдауда тұрақты матрица ALG – Gel ($CaCl_2$ - GA) негізіндегі матрица болып табылады, себебі оның құрамында екі бірдей Ca^{2+} және GA тігуші агенті бар және осы тігуші агенттер полимерлі тордың қасиеттерінің нығаюына оң әсер етеді.

3.10 Инсулиннің босап шығуы және диффузиясына фермент әсерін талдау

Полимерлі бөлшектердің ісіну және жиырылу қабілеттіліктерін ақуыздарды жүктеу, ұстау және босату үшін пайдалануға болады. Жиырылу кезінде полимерлі гельдің кеуектері кішірейіп, ақуыздың босап шығуына кедіргі келтіреді. Сәйкесінше ісіну кезінде полимерлі тор диффузия әсерінен жүктелген ақуызды босатып шығарады [291]. Полимерлі бөлшектердің ісінуі және биодегидратациялануы иондық күштің, температураның, ферменттің және pH мәнінің өзгеруі кезінде жүзеге асады [292]. Альгинатты гельдер тізбектегі теріс зарядтың жоғары тығыздығына байланысты бейтарап ортада ісінеді, ал қышқылды ортада карбоксилді топтардың зарядтарының бір бөлігінің жоғалуына байланысты жиырылады. Сондай-ақ, полимерлік тізбектер арасындағы күшті электростатикалық әрекеттесу кезінде полимер тізбектері арасында ісінуге деген қабілеттілік байқалады [293]. Бізге мәлім, тірі

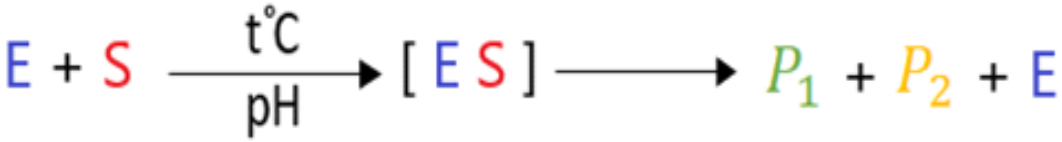
организмде үнемі сырттан келетін заттардың бірқатар химиялық өзгерістері жүреді. Бұл реакциялар белгілі бір катализаторлардың қатысуымен ғана болуы мүмкін. Ол ақуыздық заттар – ферменттер. Олар метаболизм процесін жылдамдатады және тепе-теңдікке қол жеткізеді. Келесі зерттеулерде алынған гибридті матрицаның тұрақтылығына фермент әсері қарастырылды. Төменде pH = 7.4 мәнінде ALG – Gel бөлшектерінен фермент қатысында және қатысынсыз инсулиннің босап шығу кинетикасы келтірілген (26 - сурет).



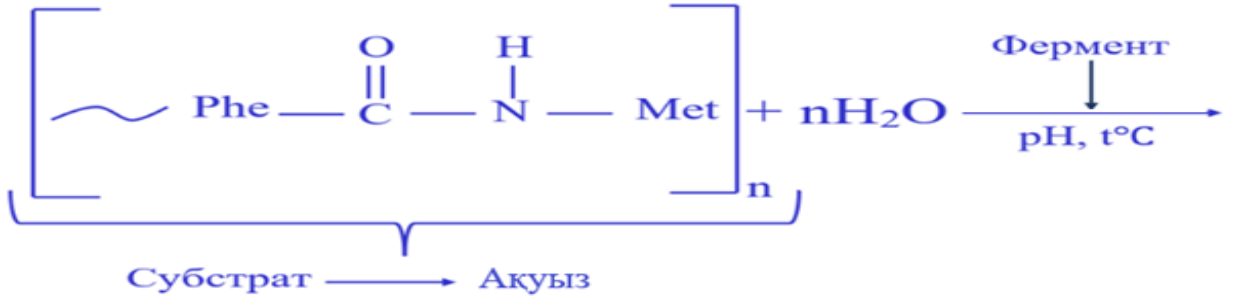
1 - ALG – Gel – Ins; 2 - ALG – Ins;
3 - ALG – Gel - Ins - пепсин; 4 – ALG – Ins – пепсин

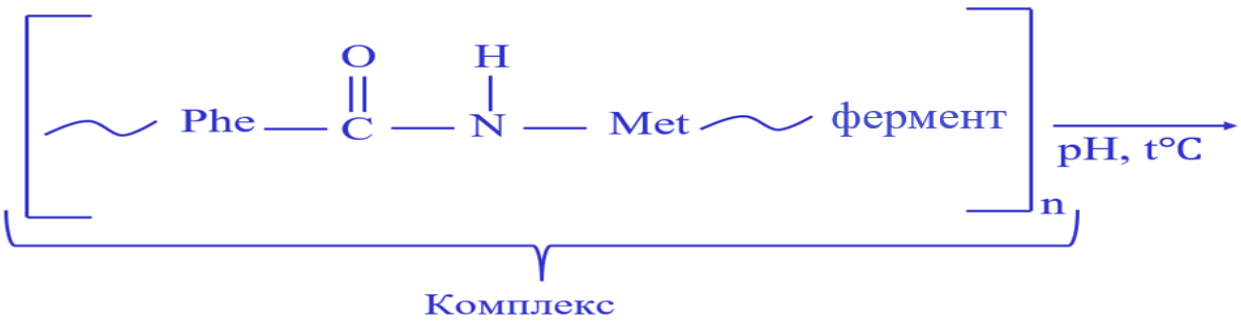
26 - сурет. ALG ($CaCl_2$ – GA); ALG – Gel ($CaCl_2$ – GA) бөлшектерінен инсулиннің фермент қатысында және қатысынсыз босап шығуының кинетикасы

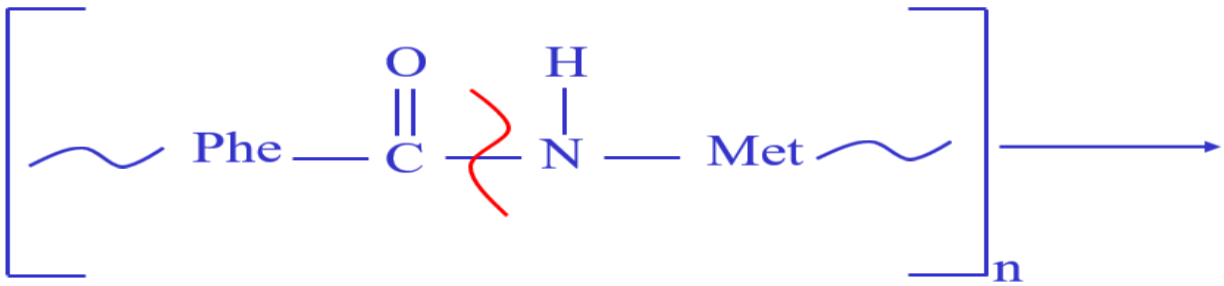
Асқазан ішек жолы ақуыздар үшін өте жағымсыз орта болып табылады. Асқазанға түскеннен кейін ақуыздар тұз қышқылы мен пепсиннің жоғары концентрациясында пептидтерге дейін гидролизденеді және денатурацияланады [294]. Пепсин – ақуыздарды пептидтерге дейін ыдыратын қышқыл протеазалық фермент [295]. Ақуыздардың асқазан ішек жолында ферменттер әсерінен жалпы ыдырау механизмі 1-ші сызбанұсқада келтірілген.

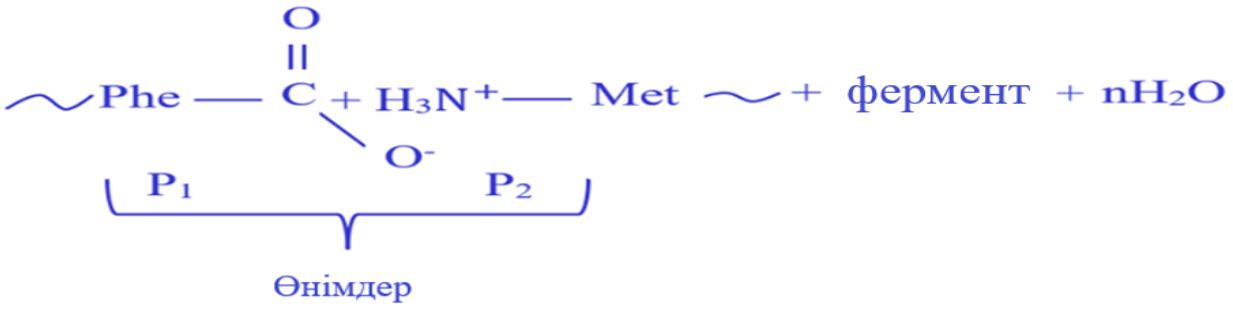


E - фермент; S - субстрат; [E S] - комплекс; P_1, P_2 - өнімдер









1 - сызбанұсқа. Ақуыздардың асқазан ішек жолында фермент әсерінен ыдырау механизмі

Фермент әсері оның төлсипаттылығымен сипатталады. Ферменттің төлсипаттылық механизмі, Эмиль Фишердің («қатаң матрица» моделі, «кілт-құлып») және Дэниел Кошландтың («индукцияланған сәйкестік» моделі, «қолғапты қол») теориялары арқылы жүзеге асады. Жалпы, бәрі фермент пен субстраттың комплементарлы әрекеттесуіне келіп тіреледі. Бұл жағдайда субстраттың функционалдық топтары ферменттің сәйкес функционалдық топтарымен әрекеттеседі.

Пепсин зимогендік пепсиноген түрінде асқазанның негізгі жасушаларымен синтезделінеді және өзінің активті формасы үшін қышқылды ортаны қажет етеді [296]. Адам асқазанындағы пепсиннің концентрациясы 0.5-1.0 мг/мл аралығында болады [294].

Инсулиннің бөлшектерден босап шығу кинетикасы адамның асқазан ішек жолын модельдейтін pH мәндерінің шартында анықталынды. Зерттеу барысында бөлшектер 30 минутқа pH = 1.0 болатын, асқазан ортасын имитациялайтын физикалық ерітіндісінде пепсин қатысында (0.1 мг/мл) және қатысынсыз инкубацияланды. 30 минуттан кейін бөлшектер pH = 7.4 болатын, ішек аймағын имитациялайтын ортаға пепсин қатысында (0.1 мг/мл) және қатысынсыз орналастырылды. Пепсин қатысында ALG; ALG – Gel бөлшектерінен инсулиннің босап шығуы сәйкесінше 57.7% және 61.4% құрады. Ал пепсинсіз ортада ALG; ALG – Gel бөлшектерінен инсулиннің босап шығуы сәйкесінше 68.2% және 73.3% құрады. ALG жүйесіне қарағанда ALG – Gel жүйесінен инсулиннің босап шығу дәрежесінің артуы желатинді альгинатқа қосу инсулиннің босап шығуына айтарлықтай әсер ететіндігін көрсетеді.

Инсулиннің ALG бөлшектеріне қарағанда ALG – Gel бөлшектерінен жоғарырақ бөлінуінің себебі желатиннің жоғары ерігіштігінде болуы мүмкін, өйткені желатин еріген кезінде матрицада кеуектер қалдырады, ал ол өз кезегінде инсулиннің гельдегі қозғалғыштығын арттырады.

Матрицалық типтегі жүйелер үшін дәрілік заттың босап шығуы концентрация градиентімен байланыстағы Фик диффузиясы арқылы жүреді [297]. Сонымен қатар дәрілік заттың диффузиясы полимерлі тордың физикалық қасиеттеріне, полимер және дәрілік зат арасындағы әрекеттесулерге байланысты. Фиктің екінші заңы [298] t уақытқа байланысты көлем бірлігіндегі концентрацияның өзгеруін концентрацияның екінші кеңістіктік туындысымен байланыстырады:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\nabla \cdot J \Rightarrow \frac{\partial C}{\partial t} = -\nabla \cdot (-D\nabla C) = \nabla \cdot (D\nabla C) \qquad (7)$$

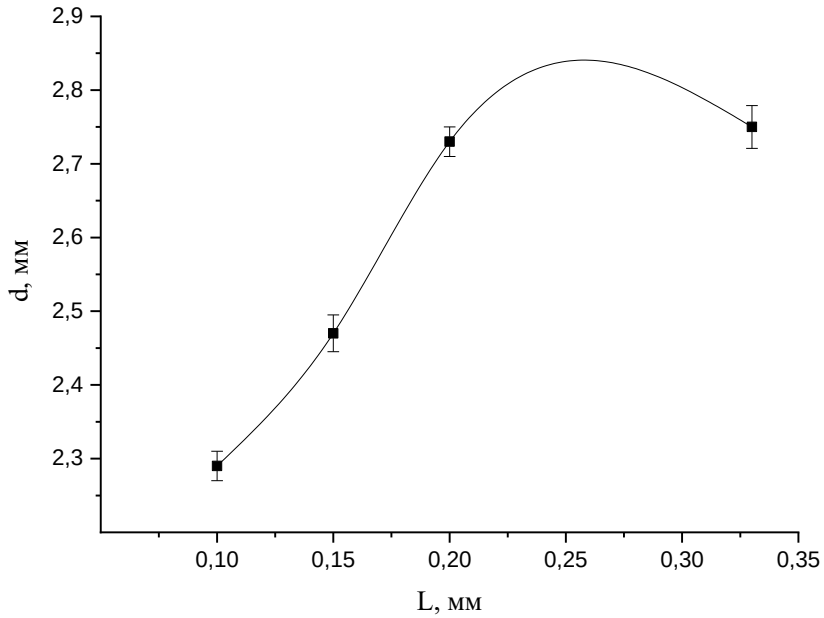
(7) теңдеу келесідей ықшамдалынады [299]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C \qquad (8)$$

Сфералық типтегі матрицалар үшін Фиктің екінші заңы (8 теңдеу) келесідей өрнектеледі [298]:

$$F = \frac{Q}{Q_\infty} = \frac{6}{r_0}\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \qquad (9)$$

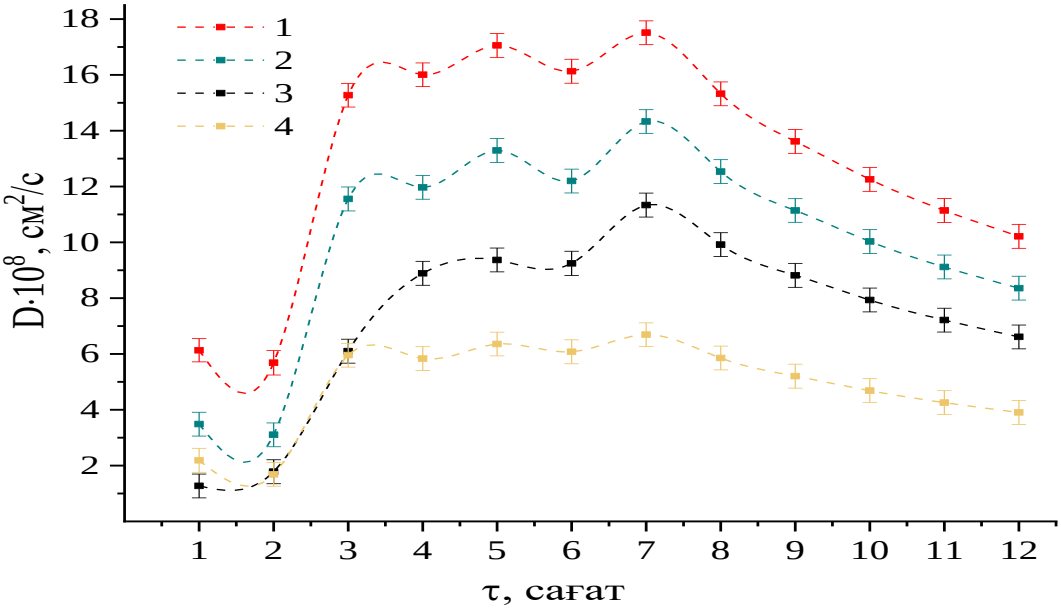
9-шы теңдеуде қолданылған бөлшектер радиусы 27-ші суреттегі мәліметтен алынған. 27-ші суретте ионотропты гель түзілу әдісімен алынған бөлшектердің диаметрлерінің шприцтік насостағы шприц ұшының диаметріне тәуелділігі келтірілген.



27 – сурет. Ионотропты гель түзу әдісімен алынған бөлшектердің өлшемі

9-шы теңдеу бойынша ALG; ALG – Gel бөлшектерінен пепсин қатысында және қатысынсыз инсулиннің диффузия коэффициенті есептелді (28 - сурет).

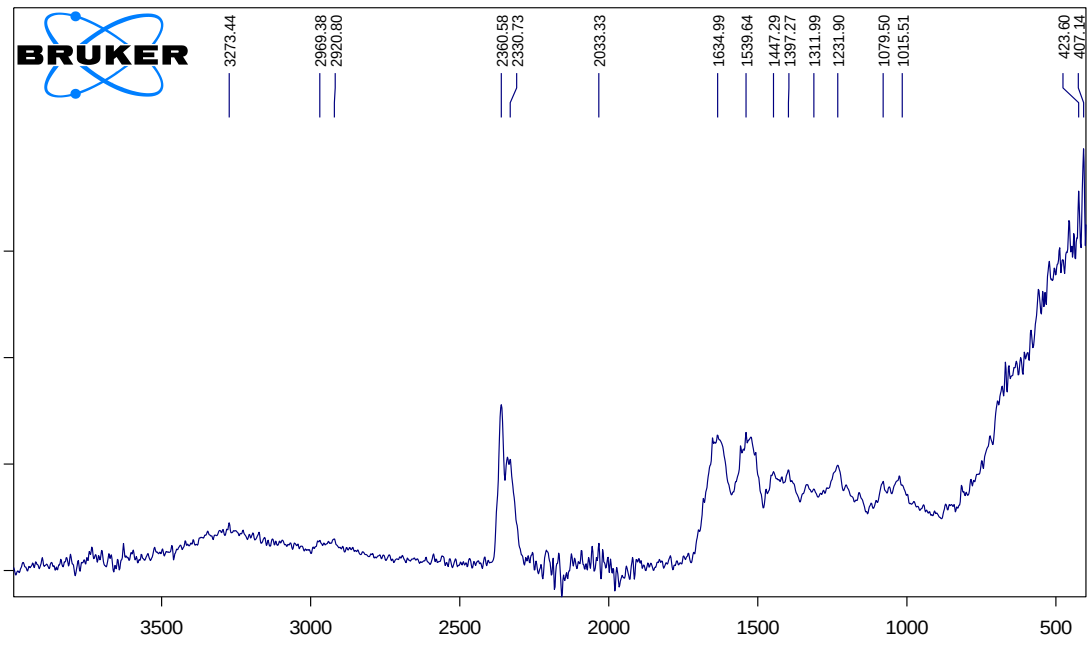
Инкубация уақытының артуымен әрбір үлгі үшін диффузия коэффициентінің мәні максимумге жетіп, төмендейді. Пепсин қатысында диффузия коэффициенті бастапқы үлгілермен салыстырғанда төмен екендігі байқалды. ALG бөлшектері үшін диффузия коэффициенті пепсин қатысынсыз 5 сағ. аралығында $13.3\cdot10^{-8}$ см^2/с максимумына жетіп, $8.4\cdot10^{-8}$ см^2/с мәніне дейін төмендейді; пепсин қатысында 7 сағат аралығында $6.7\cdot10^{-8}$ см^2/с максимумына жетіп, $3.9\cdot10^{-8}$ см^2/с мәніне дейін төмендейді. ALG – Gel бөлшектері үшін диффузия коэффициенті пепсин қатысынсыз 7 сағат аралығы үшін диффузия коэффициенті $17.5\cdot10^{-8}$ см^2/с мәнінде бақыланып, $10.2\cdot10^{-8}$ см^2/с мәніне дейін төмендейді; Пепсин қатысында максимум 7 сағат аралығында $11.3\cdot10^{-8}$ см^2/с мәніне дейін жетіп, $6.6\cdot10^{-11}$ см^2/с шамасына дейін төмендейді. Пепсин қатысында диффузия коэффициентінің төмендеуі ALG, ALG-Gel матрицаларындағы конформациялық өзгерістермен байланысты болуы мүмкін. Пепсин қатысында дәрілік заттың диффузия коэффициентін төмендуіне алып келетін ALG, ALG-Gel матрицаларының тығыздығының артуымен байланысты.



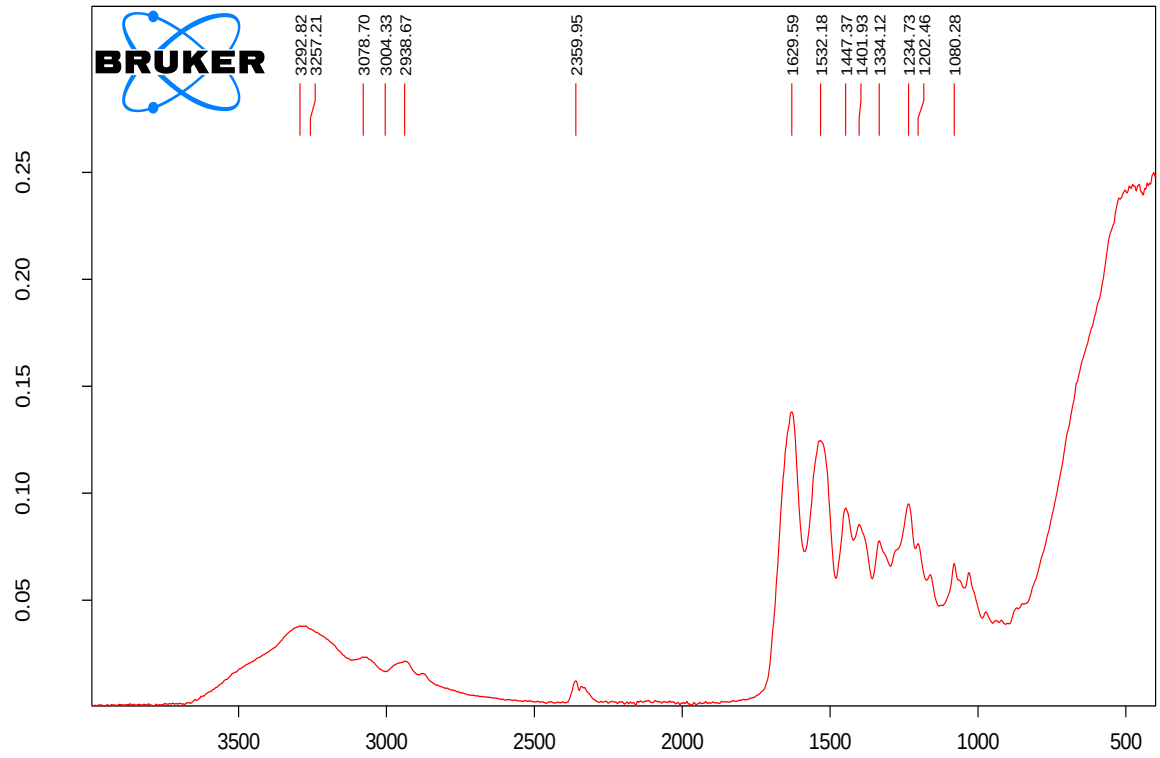
1 - ALG – Gel – Ins; 2 - ALG – Ins; 3 - ALG – Gel - Ins – пепсин; 4 – ALG – Ins – пепсин

28 - сурет. Пепсин қатысында және қатысынсыз ALG ($CaCl_2$ – GA); ALG – Gel ($CaCl_2$ – GA) бөлшектерінен босап шыққан инсулиннің диффузия коэффициентінің инкубация уақытына тәуелділігі

Пепсиннің ақуыз – полисахаридті матрицаға әсері ИҚ спектроскопия әдісімен де зерттелінді. Төмендегі 29, 30 суреттерде ALG-Gel матрицаларының пепсин қатысынсыз (29 - сурет) және пепсин қатысындағы (30 - сурет) ИҚ спектрлері келтірілген.



29 - сурет. ALG-Gel ($CaCl_2$ – GA) матрицасының пепсин қатысынсыз ИҚ спектрі



30 - сурет. ALG-Gel ($CaCl_2$ – GA) матрицасының пепсин қатысында ИҚ спектрі

ALG-Gel матрицаларының пепсин қатысында және қатысынсыз ИҚ спектрлерінде 1634 және 1539 $см^{-1}$ (29 - сурет), 1629 және 1533 $см^{-1}$ (30 - сурет) аралықтарында N-H деформациялық тербелістері мен амид - карбонил C-O және C-N валентті тербелістерімен байланысты жолақтар анықталды. 1234 – 1015 $см^{-1}$ аралығындағы екі спектрде де байқалған барлық жолақтар амино топтар мен алкил тізбектерінің сипаттамалық пиктеріне жатқызылды. 1447 $см^{-1}$ толқын санындағы байқалған жолақтар карбоксилат тұзы ионының асимметриялық және симметриялық валентті тербелістеріне сәйкес келеді. 1401, 1397, 1334 $см^{-1}$ толқын сандарындағы тербелістер C-O және C-H байланыстарының деформациялық тербелістері болып табылады. Пепсинсіз үлгінің спектрінде байқалған 2360, 2330 $см^{-1}$ аралығындағы жолақтар тобы (29 - сурет) $R_2C{=}NH^+$ түріндегі амин тұздарының валентті тербелістеріне жатады. Пепсин қатысындағы үлгінің спектрлерінде пепсинсіз үлгімен салыстырғанда бұл пиктің интенсивтілігінің төмендеуі байқалады. Сондай-ақ, пепсин қатысындағы үлгінің спектрлерінде 3292–3257 $см^{-1}$ диапазонында пепсинсіз үлгі спектрінде байқалмаған, А амидіне жолағына жатқызылатын, N-H байланысының созылуы кезінде пайда болатын пикті байқауға болады (30 - сурет). Бұл байқалған өзгерістер, нәтижесі ақуыздардың амидтік байланыспен байланысқан полипептидтерге ыдырауына әкелетін, пепсин ферментінің ALG-Gel матрицасына әсер етуінің салдарынан болуы мүмкін [267].

Қорытындылай келе, альгинат, альгинат - желатин негізіндегі гибридті гидрогельдерге инсулин иммобилизациясы тігуші агенттер ($CaCl_2$, GA; $CaCl_2$ - GA) қатысында ионотропты гель түзу әдісімен жүргізілді. Альгинатты

бөлшектердің АКМ кескіндерінде бөлшектің ішек фазасында еруіне әкелетін кеуекті құрылым байқалды. Ақуыз – полисахаридті гибридті матрица инсулиннің табиғи (α – спиральды) конформациясын сақтайтындығы анықталды. Инсулиннің желатинмен сутектік байланыстарының артуы оның фибриногенез процесін тежейді. Гибридті матрицаға инсулинді иммобилизациялау кезіндегі молекулааралық өзара әрекеттесудің басты механизмі диполь - дипольді өзара әрекеттесу екендігі молекулалық динамикалық модельдеу арқылы көрсетілді. SEM, стереомикроскопия суреттерінде байқалған кеуектер инсулиннің нәтижелі иммобилизацияландығының дәлелі бола алады. Полимерлі матрицаға желатинді қосу инсулиннің ағып кетуін төмендетеді. Ақуыз – полисахаридті гибридті матрицаға иммобилизацияланған инсулиннің босап шығу кинетикасы мен диффузия коэффициентіне фермент әсері қарастырылды. Зерттеу жұмыстарының нәтижелері инсулинді полимерлі гидрогельдерге иммобилизациялау арқылы оның пероралды формасына қол жеткізуге болатындығын көрсетеді.

ҚОРЫТЫНДЫ

1. Инсулиннің пероралды формасын дайындау мақсатында альгинат негізіндегі бөлшектер ионотропты гель түзу әдісі арқылы алынды. Тігуші агент ретінде $CaCl_2$ ерітіндісінің 1.5% оптималды концентрациясы таңдап алынды. Асқазан – ішек жолдарындағы қышқыл және сілтілік орталарға қарсы тұрақтылықты арттыру мақсатында бөлшектер желатинмен қапталынып, осы бөлшектерге иммобилизацияланған инсулиннің босап шығу кинетикасы pH = 6.86; 9.18 мәндерінде сәйкесінше 50% және 83% құрады. Атомдық күштік микроскопия әдісімен бөлшектердің кедір бұдырлығы мен морфологиясы анықталынды. АКМ кескініңде беттік қабаттың кедір бұдырлығы 100 - 130 нм шамасында, ал осы үлгінің pH = 6.86 мәніндегі АКМ кескініндегі кедір бұдырлық шамасы 150 нм шамасында, pH = 9.18 мәнінде 200 нм. Осы pH мәндерінде бөлшектің ішек фазасында еруіне әкелетін кеуекті құрылым байқалды. Алынған АКМ нәтижелері альгинатты бөлшектердің морфологиялық өзгерістерінің инсулинді босатып шығаруда қолайлы екендігін растайды.

2. Желатиннің құрылымдық – механикалық қасиеттерін жақсарту мақсатында оның композициялары жасалынды және олардың асқазан - ішек жолдарының pH мәндеріне тәуелділігі зерттелінді. Желатиннің хитозан, лимон және *L*-глутамин қышқылдары қатысында түзілген композицияларының деформациялық, серпімділік модулі және беріктік сипаттамалары анықталынды, алынған композициялар желатиннің реологиялық қасиеттерін нығайтады. Қарастырылған жүйелерден желатиннің *L*-глутамин қышқылымен композициясы pH = 4.01 мәнінде берік құрылымдануы (δ = 5.3 кПа) асқазанның қышқыл ортасындағы төзімділігін арттырады. Ал сілтілік ортада жүйенің реологиялық сипаттамаларының төмендеуі дәрілік заттың ағзаның ішек жолдарында тасымалдануына оңтайлы жағдай туғызады. Композиттерге әр түрлі pH орталарының әсерін ИҚ спектроскопия әдісімен бақылау кезінде C-H, C-OH, C=O, C-N, N-H, $CH(NH_2)$, CH_2OH топтарының артуы молекулааралық сутектік байланыстардың санының жоғарылауымен және ассоциативтік құрылымдардың түзілуімен байланысты.

3. Инсулиннің табиғи (α – спиральды) конформациясын сақтау үшін ақуыз – полисахаридті, яғни гибридті матрица алынды. Полимерлі матрицаның құрамын өзгерту және тігуші агенттерді ($CaCl_2$, GA; $CaCl_2$ -GA) қолдану арқылы инсулиннің тұрақтылығына қолайлы молекулярлы орта анықталынды. ALG – Gel қоспасының GA тігілуі барысында алынған бөлшектер модельді асқазан ортасына тұрақтылық пен жоғары инкапсуляция, эффективтілік көрсетті. Инсулиннің фибриногенез процесі инсулиннің желатинмен сутектік байланыстарының артуынан тоқтатайтындығы анықталды. *Molecular Mechanics 2 (MM2)* бағдарламасымен орындалған молекулалық динамикалық модельдеу матрица ішіндегі инсулиннің әрекетін анықтайтын басты механизм диполь - дипольді өзара әрекеттесулер екенін көрсетті. Гибридті матрицадағы молекулааралық әрекеттесулерді талдау үшін FT-IR спектроскопиясы қолданылды. 1643–1599 $см^{-1}$ диапазонындағы жұтылу максимумы ALG - Gel

құрамындағы пептидтік байланыстың бар екендігін көрсетеді. 1640 $см^{-1}$ аймағында инсулин спектрінде тіркелген пик инсулинмен жүктелген ALG – Gel композицияларының барлық спектрлерінде жұтылу жолақтарының интенсивтілігіндегі айырмашылықтарға қарамастан өзгеріссіз сақталуы, иммобилизацияланған инсулиннің тұрақтылығының дәлелі бола алады.

4. Гибридті ақуыз - полисахарид матрицасына $CaCl_2$ - GA тігуші агенттері қатысында инсулин иммобилизациясы жүргізілді және оның босап шығу кинетикасына пепсин әсері зерттелді. ALG; ALG – Gel бөлшектерінен пепсин қатысында инсулиннің босап шығуы сәйкесінше 57.7% және 61.4% құрады. ALG; ALG – Gel бөлшектеріндегі инсулиннің диффузия коэффициенттерінің өзгерісіне пепсин әсері бағаланды. Матрицалық типтегі жүйелер үшін дәрілік заттың босап шығуы концентрация градиентімен байланыстағы Фик диффузиясы арқылы жүреді. ALG бөлшектері үшін диффузия коэффициенті пепсин қатысында 7 сағат аралығында $6.7 \cdot 10^{-8}$ $см^2/с$ максимумына жетіп, $3.9 \cdot 10^{-8}$ $см^2/с$ мәніне дейін төмендейді. ALG – Gel бөлшектері үшін диффузия коэффициенті пепсин қатысында максимум 7 сағат аралығында $11.3 \cdot 10^{-8}$ $см^2/с$ мәніне дейін жетіп, $6.6 \cdot 10^{-11}$ $см^2/с$ шамасына дейін төмендейді. Пепсиннің қатысуымен диффузия коэффициентінің төмендеуі ALG және ALG-Gel матрицаларының конформациялық құрылымының өзгеруімен байланысты болуы мүмкін. Сондай-ақ, FTIR спектроскопиясының көмегімен пепсиннің ақуыз-полисахаридті матрицаға әсері зерттелді, матрицалардың алынған спектрлерінде пепсиннің әсері $R_2C{=}NH^+$ амин тұздарының созылу тербелістерінің қарқындылығының төмендеуі, N-H байланыстарының созылуынан жаңа амидті жолақтарының пайда болуы түрінде байқалды.

Алға қойылған мақсаттардың толық орындалғандығын негіздеу

Алға қойылған мақсаттар мен міндеттер толық орындалды. Ионотропты гель түзу әдісімен инсулиннің пероралды формасы алынды. Альгинатты бөлшектердің қышқыл, сілтілі ортаға қарсы тұрақтылығы желатинмен қаптау арқылы қол жеткізілді. Желатиннің құрылымдық – механикалық қасиеттері оның композициялары арқылы жақсартылды. Инсулинді иммобилизациялауда гибридті матрица алынды, инсулиннің тұрақтылығы тігуші агенттерді (CaCl2, GA; CaCl2 -GA) қолдану арқылы жүзеге асырылды. Гидрогель компоненттері мен инсулин арасындағы өзара әрекеттесулер *Molecular Mechanics 2 (MM2)* бағдарламасымен модельденді. Гибридті матрицадан инсулиннің босап шығу кинетикасы мен диффузия коэффициентіне фермент әсері бағаланды.

Жұмыстың ғылыми деңгейі мен экономикалық тиімділігін бағалау

Диссертация нәтижелері денсаулық сақтау саласының басты мәселелерінің бірі болып табылатын, дүние жүзіндегі адам шығынының негізгі себебі болып табылатын қант диабеті эпидемиясының алдын алуда қолданыла алады. Науқастар үшін қиыншылық тудыратын инъекциялық инсулин түріне қарағанда пероралды инсулин формасы инсулин секрециясын бақылауға мүмкіндік бере алатын табиғи және қолайлы әдіс. Пероралды форманы алуда биоүйлесімді, биоыдырағыш табиғи полимерлі материалдарды қолдану, ионотропты әдіспен гель түзілу процесінің қарапайымдылығы мен жұмсақ шарттарда жүруі жұмыстың экономикалық тиімділігін көрсетеді.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1 International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. - 2021. 10th edition. www.diabetesatlas.org.

2 Singh S., Hariharan K. Diabetic hindfoot problems // Orthop Trauma. - 2016. - Vol. 30. - P. 75-85.

3 Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030 // Diabetes Care. - 2004. - Vol. 27. - P. 1047-1053.

4 Ravaine V., Ancla C., Catargi B. Chemically controlled closed-loop insulin delivery // Journal of Controlled Release. - 2008. - Vol. 132. - P. 2-11.

5 American diabetes association, Nutrition Recommendations and Interventions for Diabetes-2006: A position statement of the American Diabetes Association // Diabetes Care. - 2006. -Vol. 29. - P. 2140-2157.

6 Herrero E.P., Alonso M.J., Csaba N. Polymer-based oral peptide nanomedicines // Ther Deliv. - 2012. - Vol. 3. - P. 657-668.

7 Sheeja V.S., Reddy M.H., Joseph J., Reddy D. Insulin therapy in diabetes management // Int. J Pharm Sci Rev Res. - 2012. - Vol. 2. - P. 98-105.

8 Van Belle T.L., Coppieters K.T., Von Herrath M.G. Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies // Physiol Rev. - 2011. - Vol. 91. - P. 79-118.

9 Babu V.R., Patel P., Mundargi R.C., Rangaswamy V., Aminabhavi T.M. Developments in polymeric devices for oral insulin delivery // Expert Opin Drug Deliv. - 2008. - Vol. 5. - P. 403-415.

10 Zambanini A., Newson R.B., Maisey M., Feher M.D. Injection related anxiety in insulin-treated diabetes // Diabetes Res Clin Pract. - 1999. - Vol. 46. - P. 239-246.

11 Peyrot M., Barnett A.H., Meneghini L.F., Schumm-Draeger P.M. Factors associated with injection omission/non-adherence in the Global Attitudes of Patients and Physicians in Insulin Therapy study // Diabetes Obes Metab. - 2012. - Vol. 14. - P. 1081-1087.

12 Arbit E. The Physiological Rationale for Oral Insulin Administration // Diabetes Technol Ther. - 2004. - Vol. 6. - P. 510-517.

13 Brange J., Langkjaer L. Insulin Formulation and Delivery // Plenum Press, New York. - 1997. - P. 343-410.

14 Sajeesh S., Sharma C.P. Cyclodextrin–insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery // Int J Pharm. - 2006. - Vol. 325. - P. 147-154.

15 Sun L., Liu Z., Tian H., Le Z., Liu L., Leong K.W., Mao H.Q., Chen Y. Scalable Manufacturing of Enteric Encapsulation Systems for Site-Specific Oral Insulin Delivery // Biomacromolecules. - 2019. - Vol. 20. - P. 528-538.

16 Sood A., Panchagnula R. Peroral Route: An Opportunity for Protein and Peptide Drug Delivery // Chem Rev. - 2001. - Vol. 101. - P. 3275-3304.

17 Cone R.A. Barrier properties of mucus // Adv Drug Deliv Rev. - 2009. - Vol. 61. - P. 75-85.

18 Niu M., Lu Y., Hovgaard L., Guan P., Tan Y., Lian R., Qi J., Wu W. Hypoglycemic activity and oral bioavailability of insulin-loaded liposomes containing bile salts in rats: The effect of cholate type, particle size and administered dose // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. - 2012. - Vol. 81. - P. 265-272.

19 Fonte P., Araujo F., Silva C., Pereira C., Reis S., Santos H.A., Sarmento B. Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches // Biotechnol Adv. - 2014. - Vol. 33. - P. 1342-1354.

20 Elsayed A., al Remawi M., Qinna N., Farouk A., Badwan A. Formulation and characterization of an oily-based system for oral delivery of insulin // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. - 2009. - Vol. 73. - P. 269-279.

21 Nakamura K., Murray R.J., Joseph J.I., Peppas N.A., Morishita M., Lowman A.M. Oral insulin delivery using P(MAA-g-EG) hydrogels: Effects of network morphology on insulin delivery characteristics // Journal of Controlled Release. - 2004. - Vol. 95. - P. 589-599.

22 Mohanraj V.J., Barnes T.J., Prestidge C.A. Silica nanoparticle coated liposomes: A new type of hybrid nanocapsule for proteins // Int J Pharm. - 2010. - Vol. 392. - P. 285-293.

23 Al-Remawi M., Elsayed A., Maghrabi I., Hamaidi M., Jaber N. Chitosan/lecithin liposomal nanovesicles as an oral insulin delivery system // Pharm Dev Technol. - 2007. - Vol. 22. - P. 390-398.

24 Sarmento B., Martins S., Ferreira D., Souto E.B. Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. - 2007. - Vol. 2, № 4. - P. 743-749.

25 Gu Z., Dang T.T., Ma M., Tang B.C., Cheng H., Jiang S., Dong Y., Zhang Y., Anderson D.G. Glucose-responsive microgels integrated with enzyme nanocapsules for closed-loop insulin delivery // ACS Nano. - 2013. - Vol. 7. - P. 6758-6766.

26 Chen M.C., Sonaje K., Chen K.J., Sung H.W. A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery // Biomaterials. - 2011. - Vol. 32. - P. 9826-9838.

27 Meneguin A.B., Beyssac E., Garrait G., Hsein H., Cury B.S.F. Retrograded starch/pectin coated gellan gum-microparticles for oral administration of insulin: A technological platform for protection against enzymatic degradation and improvement of intestinal permeability // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. - 2018. - Vol. 123. - P. 84-94.

28 Larionov N.I., Balabushevich N.G., Vikhoreva G.A., Mikhalchik E.V. Fabrication and properties of ph-sensitive nanostructured polyelectrolyte

microparticles loaded with insulin // Moscow University Chemistry Bulletin. - 2010. - Vol. 65. № 3. - P.148-153

29 Deat-Laine E., Hoffart V., Cardot J.M., Subirade M., Beyssac E. Development and in vitro characterization of insulin loaded whey protein and alginate microparticles // Int J Pharm. - 2012. - Vol. 439. - P.136-144.

30 Hebrard G., Hoffart V., Beyssac E., Cardot J.M., Alric M., Subirade M. Coated whey protein/alginate microparticles as oral controlled delivery systems for probiotic yeast // J Microencapsul. - 2010. - Vol. 27. - P. 292-302.

31 Hebrard G., Hoffart V., Cardot J.M., Subirade M., Beyssac E. Development and characterization of coated-microparticles based on whey protein/alginate using the Encapsulator device // Drug Dev Ind Pharm. - 2013. - Vol. 39. - P. 128-137.

32 Sajeesh S., Vauthier C., Gueutin C., Ponchel G., Sharma C.P. Thiol functionalized polymethacrylic acid-based hydrogel microparticles for oral insulin delivery // Acta Biomater. - 2010. - Vol. 6. - P. 3072-3080.

33 Frokjaer S., Otzen D.E. Protein drug stability: A formulation challenge // Nat Rev Drug Discov. - 2005. - Vol. 4. - P. 298-306.

34 Khodaverdi E., Heidari Z., Tabassi S.A.S., Tafaghodi M., Alibolandi M., Tekie F.S., Khameneh B., Hadizadeh F. Injectable Supramolecular Hydrogel from Insulin-Loaded Triblock PCL-PEG-PCL Copolymer and γ-Cyclodextrin with Sustained-Release Property // AAPS PharmSciTech. - 2015. - Vol. 16. - P. 140-149.

35 Damge C., Maincent P., Ubrich N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats // Journal of Controlled Release. - 2007. - Vol. 117. - P. 163-170.

36 Sheng J., Han L., Qin J., Ru G., Li R., Wu L., Cui D., Yang P., He Y., Wang J. N - Trimethyl Chitosan Chloride-Coated PLGA Nanoparticles Overcoming Multiple Barriers to Oral Insulin Absorption, ACS Appl Mater Interfaces. - 2015. - Vol. 7. - P. 15430-15441.

37 Maciel V., Yoshida C., Pereira S., Goycoolea F., Franco T. Electrostatic Self-Assembled Chitosan-Pectin Nano- and Microparticles for Insulin Delivery // Molecules. - 2017. - Vol. 22. - P. 1707-1728.

38 Guerreiro L.H., Da Silva D., Girard-Dias W., Mascarenhas C.M., Miranda K., Sola-Penna M., Ricci Junior E., Lima L.M. Macromolecular confinement of therapeutic protein in polymeric particles for controlled release: Insulin as a case study // Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. - 2017. - Vol. 53. - P. 1-8.

39 Suzuki I., Egawa Y., Mizukawa Y., Hoshi T., Anzai J.I. Construction of positively-charged layered assemblies assisted by cyclodextrin complexation // Chemical Communications. - 2002. - Vol. 2. - P. 164-165.

40 Wang Z., Feng Z., Gao C. Stepwise assembly of the same poly electrolytes using host-guest interaction to obtain microcapsules with multiresponsive properties // Chemistry of Materials. - 2008. - Vol. 20. - P. 4194-4199. Pallarola D., Von Bildering C., Pietrasanta L.I., Queralto N., Knoll W., Battaglini F., Azzaroni.

Recognition-driven layer-by-layer construction of multiprotein assemblies on surfaces: A biomolecular toolkit for building up chemoresponsive bioelectrochemical interfaces // Physical Chemistry Chemical Physics. - 2010. - Vol. 14. - P. 11027-11039.

41 Pavlukhina S., Sukhishvili S. Polymer assemblies for controlled delivery of bioactive molecules from surfaces // Adv Drug Deliv Rev. - 2011.- Vol. 63. - P. 822-836.

42 Tomita S., Sato K., ichi Anzai J. Layer-by-layer assembled thin films composed of carboxyl-terminated poly(amidoamine) dendrimer as a pH-sensitive nano-device // J Colloid Interface Sci. - 2008. - Vol. 326. - P. 35-40.

43 Sukhishvili S.A., Granick S. Erasable Polymer Multilayers Formed by Hydrogen-Bonded Sequential Self-Assembly // Macromolecules. - 2002. - Vol. 35. - P. 301-310.

44 Elia G. Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins // Proteomics. - 2008. - Vol. 8. - P. 4012-4024.

45 Yao H., Hu N. pH-Switchable Bioelectrocatalysis of Hydrogen Peroxide on Layer-by-Layer Films Assembled by Concanavalin A and Horseradish Peroxidase with Electroactive Mediator in Solution // J Phys Chem B. - 2010. - Vol. 114. - P. 3380-3386.

46 Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Leporatti S., Radtchenko I.L., Donath E., Mohwald H. Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control // Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. - 2002. -Vol. 198. - P. 535-541.

47 Dam H.H., Caruso F. Formation and degradation of layer-by-layer-assembled polyelectrolyte polyrotaxane capsules // Langmuir. - 2013. - Vol. 29. - P. 7203-7208.

48 Zuo Q., Lu J., Hong A., Zhong D., Xie S., Liu Q., Huang Y., Shi Y., He L., Xue W. Preparation and characterization of PEM-coated alginate microgels for controlled release of protein // Biomedical Materials. - 2012. - Vol.7. - P. 1-12.

49 Santos J.L., Nouri A., Fernandes T., Rodrigues J., Tomas H. Gene delivery using biodegradable polyelectrolyte microcapsules prepared through the layer-by-layer technique // Biotechnol Prog. - 2012. - Vol. 28. - P. 1088-1094.

50 Yoshida K., Sato K., Anzai J.I. Layer-by-layer polyelectrolyte films containing insulin for pH-triggered release // J Mater Chem. - 2010. - Vol. 20. - P. 1546-1552.

51 Balabushevich N.G., Pechenkin M.A., Shibanova E.D., Volodkin D.V., Mikhalchik E.V. Multifunctional polyelectrolyte microparticles for oral insulin delivery // Macromol Biosci. - 2013. - Vol. 13. - P. 1379-1388.

52 Kirzhanova E.A., Pechenkin M.A., Demina N.B., Balabushevich N.G. Alginate – chitosan micro - and nanoparticles for transmucosal delivery of proteins // Moscow University Chemistry Bulletin. - 2016. - Vol. 71. - P. 127-133.

53 Yoshida K., Ono T., Kashiwagi Y., Takahashi S., Sato K., Anzai J.I. pH-dependent release of insulin from layer-by-layer-deposited polyelectrolyte microcapsules // Polymers (Basel). - 2015. - Vol. 7. - P. 1269-1278.

54 Zhang N., Wardwell P., Bader R. Polysaccharide-Based Micelles for Drug Delivery // Pharmaceutics. - 2013. - Vol. 5. - P. 329-352.

55 Posocco B., Dreussi E., de Santa J., Toffoli G., Abrami M., Musiani F., Grassi M., Farra R., Tonon F., Grassi G., Dapas B. Polysaccharides for the Delivery of Antitumor Drugs // Materials. - 2015. - Vol. 8. - P. 2569-2615.

56 Hafren J., Zou W., Cordova A. Heterogeneous 'Organoclick' Derivatization of Polysaccharides // Macromol Rapid Commun. - 2006. - Vol. 27. - P. 1362-1366.

57 Ramadas M., Paul W., Dileep K.J., Anitha Y., Sharma C.P. Lipoinsulin encapsulated alginate-chitosan capsules: Intestinal delivery in diabetic rats // J Microencapsul . - 2000. - Vol. 17. - P. 405-411.

58 Xing L., Dawei C., Liping X., Rongqing Z. Oral colon-specific drug delivery for bee venom peptide: Development of a coated calcium alginate gel beads-entrapped liposome // Journal of Controlled Release. - 2003. - Vol. 93. - P. 293–300.

59 Dai C., Wang B., Zhao H., Li B., Wang J. Preparation and characterization of liposomes-in-alginate (LIA) for protein delivery system // Colloids Surf B Biointerfaces. - 2006. - Vol. 47. - P. 205-210.

60 Валуев И.Л., Старосельцева Л.К., Валуев Л.И., Ванчугова Л.В. Препарат инсулина для регулирования уровня глюкозы в крови // Химико-Фармацевтический Журнал. - 2019. - Т. 53. - С. 20-23.

61 Valuev I.L., Vanchugova L., Obydennova I., Valuev L.I. Polymer Insulin Derivatives: Application Peculiarities // Polymer Science. - 2018. - Vol. 60. Series A. - P. 491-494.

62 Платэ Н.А., Валуев Л.И., Старосельцева Л.К., Валуева Т.А., Ванчугова Л.В., Ульянова М.В. Макромолекулярные системы с инсулином в связи с проблемой диабета // Высокомолекулярные Соединения. - 1994. - Т. 36. - С. 1876-1879.

63 Lin P., Chen K., Miao Y., Chen H., Lin K., Chen C., Yeh C., Chang Y., Sung H. Phase-Changeable Nanoemulsions for Oral Delivery of a Therapeutic Peptide: Toward Targeting the Pancreas for Antidiabetic Treatments Using Lymphatic Transport // Adv Funct Mater. - 2019. - Vol. 29. - P. 1809015 (1 -11).

64 Alfatama M., Lim L.Y., Wong T.W. Alginate - C18 Conjugate Nanoparticles Loaded in Tripolyphosphate - Cross - Linked Chitosan - Oleic Acid Conjugate - Coated Calcium Alginate Beads as Oral Insulin Carrier // Mol Pharm. - 2018. - Vol. 15. - P. 3369-3382.

65 Muntoni E., Marini E., Ahmadi N., Milla P., Ghe C., Bargoni A., Capucchio M.T., Biasibetti E., Battaglia L. Lipid nanoparticles as vehicles for oral delivery of insulin and insulin analogs: preliminary ex vivo and in vivo studies // Acta Diabetol. - 2019. - Vol. 56. - P. 1283-1292.

66 Mudassir J., Darwis Y., Muhamad S., Ali Khan A. Self-assembled insulin and nanogels polyelectrolyte complex (Ins/NGs-PEC) for oral Insulin delivery: characterization, lyophilization and in-vivo evaluation // Int J Nanomedicine Volume. - 2019. - Vol. 14. - P. 4895-4909.

67 Валуев И.Л., Сытов Г.А., Валуев Л.И., Ванчугова Л.В., Пан А.В., Платэ Н.А. Стабильность препарата иммобилизованного инсулина при различных pH, // Вопросы Медицинской Химии. - 2002. - Т. 48. - С. 618-623.

68 Nurpeissova Z.A., Alimkhanova S.G., Mangazbayeva R.A., Shaikhutdinov Y.M., Mun G.A., Khutoryanskiy V.V. Redox- and glucose-responsive hydrogels from poly(vinyl alcohol) and 4-mercaptophenylboronic acid // Eur Polym J. - 2015. - Vol. 69. - P.132-139.

69 Cheng M.B., Wang J.C., Li Y.H., Liu X.Y., Zhang X., Chen D.W., Zhou S.F., Zhang Q. Characterization of water-in-oil microemulsion for oral delivery of earthworm fibrinolytic enzyme // Journal of Controlled Release. - 2008. - Vol. 129. - P. 41-48.

70 Liu D., Kobayashi T., Russo S., Li F., Plevy S.E., Gambling T.M., Carson J.L., Mumper R.J. In Vitro and In Vivo Evaluation of a Water-in-Oil Microemulsion System for Enhanced Peptide Intestinal Delivery // AAPS J. - 2013. - Vol. 15. - P. 288-298.

71 Senthil Kumar K., Dhachinamoorthi D., Saravanan R., Shanmugam V. Microemulsions as carrier for novel drug delivery: a review // Int. J Pharm Sci Rev Res. - 2011. - Vol. 10. - P. 37–45.

72 Madhav S., Gupta D. A review on microemulsion based system. - 2011. - Vol. 2. - P. 1888-1899.

73 Gupta S., Jain A., Chakraborty M., Sahni J.K., Ali J., Dang S. Oral delivery of therapeutic proteins and peptides: a review on recent developments // Drug Deliv. - 2013. - Vol. 20. - P. 237-246.

74 Catalan-Latorre A., Ravaghi M., Manca M.L., Caddeo C., Marongiu F., Ennas G., Escribano-Ferrer E., Peris J.E., Diez-Sales O., Fadda A.M., Manconi M. Freeze-dried eudragit-hyaluronan multicompartment liposomes to improve the intestinal bioavailability of curcumin // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. - 2016. - Vol. 107. - P. 49-55.

75 Park K., Kwon I.C., Park K. Oral protein delivery: Current status and future prospect // React Funct Polym. - 2011. - Vol. 71. - P. 280-287.

76 Schipper N.G., Varum K.M., Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells // Pharm Res. - 1996. - Vol. 13. - P. 1686-1692.

77 Alai M.S., Lin W.J., Pingale S.S. Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery // J Food Drug Anal. - 2015. - Vol. 23. - P. 351-358.

78 Jannin V., Dellera E., Chevrier S., Chavant Y., Voutsinas C., Bonferoni C., Demarne F. In vitro lipolysis tests on lipid nanoparticles: comparison between lipase/co-lipase and pancreatic extract // Drug Dev Ind Pharm. - 2015. - Vol. 41. - P. 1582-1588.

79 Boushra M., Tous S., Fetih G., Korzekwa K., Lebo D.B., Xue H.Y., Wong H.L. Development and evaluation of viscosity-enhanced nanocarrier (VEN) for oral insulin delivery // Int J Pharm. - 2016. - Vol. 511. - P. 462-472.

80 Yokoyama M. Polymeric micelles as drug carriers: their lights and shadows // J Drug Target. - 2014. - Vol. 22. - P. 576-583.

81 Mitragotri S., Burke P.A., Langer R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies // Nat Rev Drug Discov. - 2014. - Vol. 13. - P. 655-672.

82 Williams A.C., Barry B.W. Penetration enhancers // Adv Drug Deliv Rev. - 2004. - Vol. 56. - P. 603-618.

83 Brayden D.J., Mrsny R.J. Oral peptide delivery: prioritizing the leading technologies // Ther Deliv. - 2011. - Vol. 2. - P. 1567-1573.

84 Sarmento B., Ribeiro A., Veiga F., Sampaio P., Neufeld R., Ferreira D. Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery // Pharm Res. - 2007. - Vol. 24. - P. 2198-2206.

85 Sudhakar Y., Kuotsu K., Bandyopadhyay A.K. Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs // Journal of Controlled Release. - 2006. - Vol. 114. - P. 15-40.

86 Almeida H., Amaral M.H., Lobao P. Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and selfregulated drug delivery // J Appl Pharm Sci. - 2012. - Vol. 2. - P. 01-10.

87 Makhlof A., Werle M., Takeuchi H. Mucoadhesive drug carriers and polymers for effective drug delivery // J Drug Deliv Sci Technol. - 2008. - Vol. 18. - P. 375-386.

88 Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery // Adv Drug Deliv Rev. - 2005. - Vol. 57. - P. 1595-1639.

89 Ma Z., Lim T.M., Lim L.Y. Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats // Int J Pharm. - 2005. - Vol. 293. - P. 271-280.

90 Tabata Y., Ikada Y. Protein release from gelatin matrices, Adv Drug Deliv Rev. - 1998. - Vol. 31. - P. 287–301.

91 Tabata Y., Ikada Y. Protein release from gelatin matrices, Adv Drug Deliv Rev. - 1998. - Vol. 31. - P. 287–301.

92 Ahmed S., Alhareth K., Mignet N. Advancement in nanogel formulations provides controlled drug release // Int J Pharm. - 2020. - Vol. 584. - P. 119435 (1-31).

93 Fefelova N.A., Nurkeeva Z.S., Mun G.A., Khutoryanskiy V.V. Mucoadhesive interactions of amphiphilic cationic copolymers based on [2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride // Int J Pharm. - 2007. - Vol. 339. - P. 25-32.

94 Snyman D., Hamman J.H., Kotze A.F. Evaluation of the Mucoadhesive Properties of ***N*** -Trimethyl Chitosan Chloride // Drug Dev Ind Pharm. - 2003. - Vol. 29. - P.61-69.

95 Reis C.P., Ribeiro A.J., Neufeld R.J., Veiga F. Alginate microparticles as novel carrier for oral insulin delivery // Biotechnol Bioeng. - 2007. - Vol. 96. - P. 977-989.

96 Saravanakumar G., Jo D.G., Park J.H. Polysaccharide-Based Nanoparticles: A Versatile Platform for Drug Delivery and Biomedical Imaging // Curr Med Chem. - 2012. - Vol. 19. - P. 3212-3229.

97 Kim K.K., Pack D.W. Microspheres for Drug Delivery // BioMEMS and Biomedical Nanotechnology, Springer US, Boston. - 2006. - P. 19-50.

98 Abasalizadeh F., Moghaddam S.V., Alizadeh E., Akbari E., Kashani E., Fazljou S.M., Torbati M., Akbarzadeh A. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting // J Biol Eng. - 2020. - Vol. 14, № 8. - P. 1-22

99 Agnihotri S.A., Mallikarjun N.N., Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery // J. Control. Release. - 2004. - Vol. 100, №1, - P. 5-28.

100 Ayala G. D., Malinconico M., Laurienzo P. Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches // Molecules. - 2008. - Vol. 13. - P. 2069-2106.

101 Seoul N.U. Eun-Jin. The controlled release of blue dextran from alginate beads // Int J Pharm. - 1992. - Vol. 79. - P. 11-19.

102 Sarika P.R., Anil Kumar, Raj D.K., James N.R. Nanogels based on alginic aldehyde and gelatin by inverse miniemulsion technique: synthesis and characterization // Carbohydr Polym. - 2015. - Vol. 119. - P. 118-125.

103 Ching S.H., Bansal N., Bhandari B. Alginate gel particles - A review of production techniques and physical properties // Crit Rev Food Sci Nutr. - 2017. - Vol. 57. - P. 1133-1152.

104 Fang Y., Al-Assaf S., Phillips G.O., Nishinari K., Funami T., Williams P.A. Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate // Carbohydr Polym. - 2008. - Vol. 72. - P. 334-341.

105 Greimel A., Werle M., Bernkop-Schnurch A. Oral peptide delivery: in-vitro evaluation of thiolated alginate/poly(acrylic acid) microparticles // Journal of Pharmacy and Pharmacology. - 2010. - Vol. 59. - P. 1191-1198.

106 Abraham E., Weber D.E., Sharon S., Lapidot S., Shoseyov O. Multifunctional Cellulosic Scaffolds from Modified Cellulose Nanocrystals // ACS Appl Mater Interfaces. - 2017. - Vol. 9. - P. 2010-2015.

107 Danafar H., Davaran S., Rostamizadeh K., Valizadeh H., Hamidi M. Biodegradable m-PEG/PCL core-shell micelles: Preparation and characterization as a sustained release formulation for curcumin // Adv Pharm Bull. - 2014. - Vol. 4. - P. 501-510.

108 Kamata H., Li X., Chung U., Sakai T. Design of Hydrogels for Biomedical Applications // Adv Healthc Mater. - 2015. - Vol. 4. - P. 2360-2374.

109 Ch'Ng H.S., Park H., Kelly P., Robinson J.R. Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery II: Synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers // J Pharm Sci. - 1985. - Vol. 74. - P. 399-405.

110 Chen S.C., Wu Y.C., Mi F.L., Lin Y.H., Yu L.C., Sung H.W. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery // Journal of Controlled Release. - 2004. - Vol. 96. - P. 285-300.

111 Chandramouli V., Kailasapathy K., Peiris P., Jones M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect Lactobacillus spp. in simulated gastric conditions // J Microbiol Methods. - 2004. - Vol. 56. - P. 27-35.

112 Zhou S., Deng X., Li X. Investigation on a novel core-coated microspheres protein delivery system // Journal of Controlled Release. - 2001. - Vol. 75. - P. 27-36.

113 Grigor'ev D., Musabekov K.B., Musabekov N.K., Kusainova Zh.Zh. The immobilization of antineoplastic drug cyclophosphamide in calcium alginate // Polymer Science. - 2017. - Vol. 59, Series A. - P. 506-514.

114 Iskakov R.M., Batyrbekov E.O., Zhubanov B.A., Fomicheva Y.Y., Yu V.K., Praliev K.D., Berlin D.K. Immobilization of Analgetic AB-101 into Calcium Alginate Gels // Eurasian Chemico-Technological Journal. - 2017. - Vol. 4. - P. 293 – 295.

115 Bajpai M., Shukla P., Bajpai S.K. Ca (II) + Ba (II) ions crosslinked alginate gels prepared by a novel diffusion through dialysis tube (DTDT) approach and preliminary BSA release study // Polym Degrad Stab. - 2016. - Vol. 134. - P. 22-29.

116 Vandenberg G.W., De La Noue J. Evaluation of protein release from chitosan-aginate microcapsules produced using external or internal gelation // J Microencapsul. - 2001. - Vol. 18. - P. 433-441.

117 Coppi G., Iannuccelli V., Leo E., Bernabei M.T., Cameroni R. Chitosan-alginate microparticles as a protein carrier // Drug Dev Ind Pharm. - 2001. - Vol. 27. - P. 393-400.

118 Mi F.L., Sung H.W., Shyu S.S. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent // Carbohydr Polym. - 2002. - Vol. 48. - P. 61-72.

119 Wang L.Y., Ma G.H., Su Z.G. Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug // Journal of Controlled Release. - 2005. - Vol. 106. - P. 62-75.

120 Манаенков О.В., Сидоров А.И., Молчанов В.П. Получение полислойных капсул на основе хитозана и солей альгиновой кислоты для инкапсулирования фосфолипидных мицелл // Вестник МИТХТ. - 2010. - Т. 5. - С. 76-81.

121 Pokhilenko V.D., Dunaitsev I.A., Perelygin V.V., Lev I.O. Immobilization of antimicrobial bacterial substances onto polymeric matrices: their property evaluation // Modern Problems of Science and Education. - 2016. - P. 1-10.

122 Cook M.T., Tzortzis G., Charalampopoulos D., Khutoryanskiy V. Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria // Biomacromolecules. - 2011. - Vol. 12. - P. 2834-2840.

123 Rhazi M., Desbrieres J., Tolaimate A., Alagui A., Vottero P. Investigation of different natural sources of chitin: Influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan // Polym Int. - 2000. - Vol. 49. - P. 337–344.

124 Chen M.C., Mi F.L., Liao Z.X., Hsiao C.W., Sonaje K., Chung M.F., Hsu L.W., Sung H.W. Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules, Adv Drug Deliv Rev. - 2013. - Vol. 65. - P. 865-879.

125 Rabea E.I., Badawy M.E, Stevens C. V., Smagghe G., Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action // Biomacromolecules. - 2003. - Vol. - P. 1457-1465.

126 Tıglı Aydın R.S., Pulat M. 5-Fluorouracil Encapsulated Chitosan Nanoparticles for pH-Stimulated Drug Delivery: Evaluation of Controlled Release Kinetics // J Nanomater. - 2012. - P. 1-10.

127 Xu Y., Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles // Int J Pharm. - 2003. - Vol. 250. - P. 215-226.

128 Zhang J., Xia W., Liu P., Cheng Q., Tahi T., Gu W., Li B. Chitosan Modification and Pharmaceutical // Biomedical Applications, Mar Drugs. - 2010. - Vol. 8. - P. 1962-1987.

129 Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation // Prog Polym Sci. - 2009. - Vol. 34. - P. 641-678.

130 Jayakumar R., Prabaharan M., Reis R.L., Mano J.F. Graft copolymerized chitosan - present status and applications // Carbohydr Polym. - 2005. - Vol. 62. - P. 142-158.

131 Chen Z., Han S., Yang X., Xu L., Qi H., Hao G., Cao J., Liang Y., Ma Q., G. Zhang, Sun Y. Overcoming Multiple Absorption Barrier for Insulin Oral Delivery Using Multifunctional Nanoparticles Based on Chitosan Derivatives and Hyaluronic Acid // Int J Nanomedicine Volume. - 2020. - Vol. 15. - P. 4877-4898.

132 Li H., Zhang Z., Bao X., Xu G., Yao P. Fatty acid and quaternary ammonium modified chitosan nanoparticles for insulin delivery // Colloids Surf B Biointerfaces. - 2018. - Vol. 170. - P. 136-143.

133 Bhattacharyya A., Nasim F., Mishra R., Bharti R.P., Kundu P.P. Polyurethane-incorporated chitosan / alginate core-shell nano-particles for controlled oral insulin delivery // J Appl Polym Sci. - 2018. - Vol. 135. - P. 46365 (1-15)

134 Sudhakar S., Chandran S.V., Selvamurugan N., Nazeer R.A. Biodistribution and pharmacokinetics of thiolated chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin in vivo // Int J Biol Macromo. - 2020. - Vol. 150. - P. 281-288.

135 Abilova G.K., Kaldybekov D.B., Irmukhametova G.S., Kazybayeva D.S., Iskakbayeva Z.A., Kudaibergenov S.E., Khutoryanskiy V.V. Chitosan/Poly(2-ethyl-2-oxazoline) Films with Ciprofloxacin for Application in Vaginal Drug Delivery // Materials. - 2020. - Vol. 13. - P. 1-12.

136 Ghavimishamekh A., Ziamajidi N., Dehghan A., Goodarzi M.T., Abbasalipourkabir R. Study of Insulin-Loaded Chitosan Nanoparticle Effects on TGF-β1 and Fibronectin Expression in Kidney Tissue of Type 1 Diabetic Rats // Indian Journal of Clinical Biochemistry. - 2019. - Vol. 34. - P. 418-426.

137 Ghasemi H., Kheiripour N., Alipoor B., Ranjbar A., Pourfarjam Y., Kazemi Najafabadi F., Dehkhodaei N., Farhadiannezhad M. The effects of synthetic orally administrated insulin nanoparticles in comparison to injectable insulin on the renal function markers of type 1-diabetic rats // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. - 2020. - Vol. 23. - P. 1-9.

138 Cho Y.W., Jang J., Park C.R., Ko S.W. Preparation and Solubility in Acid and Water of Partially Deacetylated Chitins // Biomacromolecules. - 2000. - Vol. 1. - P. 609-614

139 Kim K.M., Son J.H., Kim S.K., Weller C.L., Hanna M.A. Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type // J Food Sci. - 2006. - Vol. 71. - P. E119-E124.

140 Rinaudc M., Pavlov G., Desbrieres J. Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium, International Journal of Polymer Analysis and Characterization. - 1999. - Vol. 5. - P. 267-276.

141 Onishi H. Chitosan microparticles // J Drug Deliv Sci Technol. - 2010. - Vol. 20. - P. 15-22.

142 Bellich B., D'Agostino I., Semeraro S., Gamini A., Cesaro A. The good, the bad and the ugly of chitosans // Mar Drugs. - 2016. - Vol. 14, № 99. - P. 1-31.

143 Dai C., Wang B., Zhao H., Li B., Wang J. Preparation and characterization of liposomes-in-alginate (LIA) for protein delivery system // Colloids Surf B Biointerfaces. - 2006. - Vol. 47. - P. 205-210.

144 George M., Abraham T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review // Journal of Controlled Release. - 2006. - Vol. 114. - P. 1-14.

145 Bernkop-Schnurch A., Kast C.E., Richter M.F. Improvement in the mucoadhesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine // Journal of Controlled Release. - 2001. - Vol. 71. - P. 277-285.

146 Sonia T.A., Sharma C.P. Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective, Advances in Polymer Science. - 2011. - Vol. 243. - P. 23-54.

147 Sakloetsakun D., Perera G., Hombach J., Millotti G., Bernkop-Schnurch A. The impact of vehicles on the mucoadhesive properties of orally administrated

nanoparticles: A case study with chitosan-4-thiobutylamidine conjugate // AAPS PharmSciTech. - 2010. - Vol. 11. - P. 1185-1192.

148 Chung Y.C., Yeh J.Y., Tsai C.F. Antibacterial Characteristics and Activity of Water-Soluble Chitosan Derivatives Prepared by the Maillard Reaction // Molecules. - 2011. - Vol. 16. - P. 8504-8514.

149 Zhu X., Su M., Tang S., Wang L., Liang X., Meng F., Hong Y., Xu Z. Synthesis of thiolated chitosan and preparation nanoparticles with sodium alginate for ocular drug delivery // Mol Vis. - 2012. - Vol. 18. - P. 1973-1982.

150 Esquivel R., Juarez J., Almada M., Ibarra J., Valdez M.A. Synthesis and Characterization of New Thiolated Chitosan Nanoparticles Obtained by Ionic Gelation Method // Int J Polym Sci. - 2015. - Vol. 2015. - P. 1-18.

151 Sogias I.A., Khutoryanskiy V.V., Williams A.C. Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water // Macromol Chem Phys. - 2010. - Vol. 211. - P. 426-433.

152 il Jeong Y., Kim D.G., Jang M.K., Nah J.W. Preparation and spectroscopic characterization of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted water-soluble chitosan // Carbohydr Res. - 2008. - Vol. 343. - P. 282-289.

153 Alonso M.J., Lorenzo - Lamosa M.L., Remunan - Lopez C., Vila - Jato J.L. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery // Journal of Controlled Release. - 1998. - Vol. 52. - P. 109-118.

154 Russo E., Villa C. Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications // Pharmaceutics. - 2019. - Vol. 11. - P. 671-688.

155 Lee S.C., Gillispie G., Prim P., Lee S.J. Physical and Chemical Factors Influencing the Printability of Hydrogel-based Extrusion Bioinks // Chem Rev. - 2020. - Vol. 120. - P. 10834-10886.

156 Azeredo H.M., Waldron K.W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact - A review // Trends Food Sci Technol. - 2016. - Vol. 52. - P. 109-122.

157 Ostrowska - Czubenko J., Gierszewska - Druzynska M. Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes // Carbohydr Polym. - 2009. - Vol. 77. - P. 590-598.

158 Hennink W.E., van Nostrum C.F. Novel crosslinking methods to design hydrogels // Adv Drug Deliv Rev. - 2002. - Vol. 54. - P. 13-36.

159 Martucci J.F., Ruseckaite R.A. Tensile properties, barrier properties, and biodegradation in soil of compression - Molded gelatin-dialdehyde starch films // J Appl Polym Sci. - 2009. - Vol. 112. - P. 2166-2178.

160 Ganesan K., Budtova T., Ratke L., Gurikov P., Baudron V., Preibisch I., Niemeyer P., Smirnova I., Milow B. Review on the Production of Polysaccharide Aerogel Particles // Materials. - 2018. - Vol. 11. - P. 2144 (1-37).

161 Laurienzo P. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview // Mar Drugs. - 2010. - Vol. 9. - P. 2435-2465.

162 G.A. Martau, Mihai M., Vodnar D.C. The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector - Biocompatibility // Bioadhesiveness, and Biodegradability, Polymers (Basel). - 2019. - Vol. 11. - P. 1837 (1-28).

163 Lu X., Gao H., Li C., Yang Y.W., Wang Y., Fan Y., Wu G., Ma J. Polyelectrolyte complex nanoparticles of amino poly(glycerol methacrylate)s and insulin // Int J Pharm. - 2012. - Vol. 423. - P. 195-201.

164 Kuo C.K., Ma P.X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties // Biomaterials. - 2001. - Vol. 22. - P. 511-521.

165 Li J., Mooney D.J. Designing hydrogels for controlled drug delivery // Nat Rev Mater. - 2016. - Vol. 1. - P. 1-17.

166 Siboro S.A., Anugrah D.S., Ramesh K., Park S.H., Kim H.R., Lim K.T. Tunable porosity of covalently crosslinked alginate-based hydrogels and its significance in drug release behavior // Carbohydr Polym. - 2021. - Vol. 260. - P. 117779 (1-10).

167 Balaguer M.P., Cerisuelo J.P., Gavara R., Hernandez-Munoz P. Mass transport properties of gliadin films: Effect of cross-linking degree, relative humidity, and temperature // J Memb Sci. - 2013. - Vol. 428. - P. 380-392.

168 Fang Y., Al-Assaf S., Phillips G.O., Nishinari K., Funami T., Williams P.A. Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate // Carbohydr Polym. - 2008. - Vol. 72. - P. 334-341.

169 Bonilla J., Talon E., Atares L., Vargas M., Chiralt A. Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch – chitosan films // J Food Eng. - 2013. - Vol. 118. - P. 271-278.

170 Hashem M., Sharaf S., Abd El - Hady M.M., Hebeish A. Synthesis and characterization of novel carboxymethylcellulose hydrogels and carboxymethylcellulolse - hydrogel - ZnO – nanocomposites // Carbohydr Polym. - 2013. - Vol. 95. - P. 421-427.

171 Abasalizadeh, F. Moghaddam S.V., Alizadeh E., Akbari E., Kashani E., Fazljou S.M., Torbati M., Akbarzadeh A. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting // J Biol Eng. - 2020. - Vol. 14, № 8. - P. 1-22.

172 DeRamos C.M., Irwin A.E., Nauss J.L., Stout B.E. 13C NMR and molecular modeling studies of alginic acid binding with alkaline earth and lanthanide metal ions // Inorganica Chim Acta. - 1997. - Vol. 256. - P. 69-75.

173 Bucke C. Fundamentals of cell immobilisation biotechnology // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. - 2006. - Vol. 81. - P. 730-730.

174 Ching S.H., Bansal N., Bhandari B. Alginate gel particles - A review of production techniques and physical properties // Crit Rev Food Sci Nutr. - 2017. - Vol. 57. - P. 1133-1152.

175 Beauchamp R.O., Clair M.B., Fennell T.R., Clarke D.O., Morgan K.T., Kari F.W. A critical review of the toxicology of glutaraldehyde // Gastroenterology Nursing. - 1993. - Vol. 16. - P. 41-43.

176 Pal K., Paulson A.T., Rousseau D. Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems // Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics, Elsevier. - 2013. - P. 329-363.

177 Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Torres R., Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization // RSC Adv. - 2014. - Vol. 4. - P. 1583-1600.

178 Oryan A., Kamali A., Moshiri A., Baharvand H., Daemi H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds // Int J Biol Macromol. - 2018. - Vol. 107. - P. 678-688

179 Klein M., Poverenov E. Natural biopolymer-based hydrogels for use in food and agriculture // J Sci Food Agric. - 2020. - Vol. 100. - P. 2337-234

180 Sharma V., Kaur M., Sandhu K.S., Godara S.K. Effect of cross-linking on physico-chemical, thermal, pasting, in vitro digestibility and film forming properties of Faba bean (Vicia faba L.) starch // Int J Biol Macromol. - 2020. - Vol. 159. - P. 243-249.

181 Bhanukeerthi I.S., Velswamy P., Perumal P.T. Design and development of a piscine collagen blended pullulan hydrogel for skin tissue engineering // RSC Adv. - 2016. - Vol. 6. - P. 57863-57871.

182 Lele V.V., Kumari S., Niju H. Syntheses, Characterization and Applications of Graft Copolymers of Sago Starch - A Review // Starch - Starke. - 2018. - Vol. 70. - P. 1-9.

183 Hunger M., Domalik - Pyzik P., Reczynska K., Chłopek J. Double crosslinking king of chitosan/vanillin hydrogels as a basis for mechanically strong gradient scaffolds for tissue engineering // Engineering of Biomaterials. - 2020. - Vol. 23. - P. 2-11.

184 Tashi Z., Zare M., Parvin N. Application of phytic-acid as an in-situ crosslinking agent in electrospun gelatin-based scaffolds for skin tissue engineering // Mater Lett. - 2020. - Vol. 264. - P. 1-4.

185 Bahmanzadeh S., Ruzgas T., Sotres J. Proteolytic degradation of gelatin-tannic acid multilayers // J Colloid Interface Sci. - 2018. - Vol. 526. - P. 244–252.

186 Eggermont L.J., Rogers Z.J., Colombani T., Memic A., Bencherif S.A. Injectable Cryogels for Biomedical Applications // Trends Biotechnol. - 2020. - Vol. 38. - P. 418-431.

187 Gopinathan J., Noh I. Click Chemistry-Based Injectable Hydrogels and Bioprinting Inks for Tissue Engineering Applications // Tissue Eng Regen Med. - 2018. - Vol. 15. - P. 531-546.

188 Li Y., Wang X., Han Y., Sun H.Y., Hilborn J., Shi L. Click chemistry-based biopolymeric hydrogels for regenerative medicine // Biomedical Materials. - 2021. - Vol. 16. - P. 022003 (1-27).

189 Piluso S., Vukicevic R., Nochel U., Braune S., Lendlein A., Neffe A.T. Sequential alkyne-azide cycloadditions for functionalized gelatin hydrogel formation // Eur Polym J. - 2018. - Vol. 100. - P. 77-85.

190 Wang G., Zhu J., Chen X., Dong H., Li Q., Zeng L., Cao X. Alginate based antimicrobial hydrogels formed by integrating Diels - Alder “click chemistry” and the thiol - ene reaction // RSC Adv. - 2018. - Vol. 8. - P. 11036-11042.

191 Myrgorodska I., Jenkinson - Finch M., Moreno - Tortolero R.O., Mann S., Gobbo P. A Novel Acid-Degradable PEG Crosslinker for the Fabrication of pH - Responsive Soft Materials // Macromol Rapid Commun. - 2021. - Vol. 42. - P. 1-7.

192 Gelperina S., Kisich K., Iseman M.D., Heifets L. The Potential Advantages of Nanoparticle Drug Delivery Systems in Chemotherapy of Tuberculosis // Am J Respir Crit Care Med. - 2005. - Vol. 172. - P. 1487-1490.

193 Gong J.P. Friction and lubrication of hydrogels - its richness and complexity // Soft Matter. - 2006. - Vol. 2. - P. 544-552.

194 Stokes J.R. Food Biopolymer Gels, Microgel and Nanogel Structures, Formation and Rheology // Food Materials Science and Engineering, Wiley. - 2012. - Vol. 6. - P. 151-176.

195 Kasapis S., Morris E.R., Norton I.T., Gidley M.J. Phase equilibria and gelation in gelatin/maltodextrin systems - Part II: polymer incompatibility in solution // Carbohydr Polym. - 1993. - Vol. 21. - P. 249-259.

196 Norton A.B., Hancocks R.D., Grover L.M. Poly (vinyl alcohol) modification of low acyl gellan hydrogels for applications in tissue regeneration // Food Hydrocoll. - 2014. - Vol. 42. - P. 373-377.

197 Kashyap N., Kumar N., Kumar M.N. Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications // Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. - 2005. - Vol. 22. - P.107-150.

198 Berger A.N., Hasan I., Klapper L.F. Further Evidence on the Link between Finance and Growth: An International Analysis of Community Banking and Economic Performance // Journal of Financial Services Research. - 2004. - Vol. 25. - P. 169-202.

199 Hess S.T., Girirajan T.P., Mason M.D. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy // Biophys J. - 2006. - Vol. 91. - P. 4258-4272.

200 Chen D., Leon A.S., Gibson N.L., Hosseini P. Dimension reduction of decision variables for multireservoir operation: A spectral optimization model // Water Resour Res. - 2016. - Vol. 52. - P. 36-51.

201 Bealer E.J., Onissema-Karimu S., Rivera-Galletti A., Francis M., Wilkowski J., Salas-de la Cruz D., Hu X. Protein - Polysaccharide Composite

Materials: Fabrication and Applications // Polymers (Basel). - 2020. - Vol. 12. - P. 464 (1-28).

202 Bin Park S., Lih E., Park K.S., Joung Y.K., Han D.K. Biopolymer - based functional composites for medical applications // Prog Polym Sci. - 2017. -Vol. 68. - P. 77-105.

203 Tu L., He Y., Yang H., Wu Z., Yi L. Preparation and characterization of alginate - gelatin microencapsulated Bacillus subtilis SL-13 by emulsification/internal gelation // J Biomater Sci Polym Ed. - 2015. - Vol. 26. - P. 735-749.

204 Loan Khanh L., Thanh Truc N., Tan Dat N., Thi Phuong Nghi N., Toi V., Thi Thu Hoai N., Ngoc Quyen T., Thi Thanh Loan T., Thi Hiep N. Gelatin-stabilized composites of silver nanoparticles and curcumin: characterization, antibacterial and antioxidant study // Sci Technol Adv Mater. - 2019. - Vol. 20. - P.276-290.

205 Samakradhamrongthai R.S., Thakeow Angeli P., Kopermsub P., Utama-ang N. Optimization of gelatin and gum arabic capsule infused with pandan flavor for multi-core flavor powder encapsulation // Carbohydr Polym. - 2019. - Vol. 226. - P. 115262 (1-12).

206 Nichol J.W., Koshy S.T., Bae H., Hwang C.M., Yamanlar S., Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels // Biomaterials. - 2010. - Vol. 31. - P. 5536-5544.

207 Phillips G.O., Williams P.A. Handbook of hydrocolloids // Woodhead Pub. - 2009. - P. 142-163.

208 Voron'ko N.G., Derkach S.R., Kuchina Y.A., Sokolan N.I. The chitosan–gelatin (bio)polyelectrolyte complexes formation in an acidic medium // Carbohydr Polym. - 2016. - Vol. 138. - P. 265-272.

209 Derkach S.R., Ilyin S.O., Maklakova A.A., Kulichikhin V.G., Malkin A.Y. The rheology of gelatin hydrogels modified by κ-carrageenan // LWT - Food Science and Technology. - 2015. - Vol. 63. - P. 612-619.

210 Lu T.Y., Yu K.F., Kuo S.H., Cheng N.C., Chuang E.Y., Yu J.S. Enzyme-crosslinked gelatin hydrogel with adipose-derived stem cell spheroid facilitating wound repair in the murine burn modelm // Polymers (Basel). - 2020. - Vol. 12. - P. 1-13.

211 Duconseille A., Astruc T., Quintana N., Meersman F., Sante-Lhoutellier V. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review // Food Hydrocoll. - 2015. - Vol. 43. - P. 360 - 376.

212 Truong V.X., Tsang K.M., Simon G.P., Boyd R.L., Evans R.A., Thissen H., Forsythe J.S. Photodegradable gelatin-based hydrogels prepared by bioorthogonal click chemistry for cell encapsulation and release // Biomacromolecules. - 2015. - Vol. 16. - P. 2246-2253.

213 Wang H., Boerman O.C., Sariibrahimoglu K., Li Y., Jansen J.A., Leeuwenburgh S.C Comparison of micro- vs. nanostructured colloidal gelatin gels

for sustained delivery of osteogenic proteins: Bone morphogenetic protein-2 and alkaline phosphatase // Biomaterials. - 2012. - Vol. 33. - P. 8695-8703.

214 Zhou Z., He S., Huang T., Peng C., Zhou H., Liu Q., Zeng W., Liu L., Huang H., Xiang L., Yan H. Preparation of gelatin/hyaluronic acid microspheres with different morphologies for drug delivery // Polymer Bulletin. - 2015. - Vol. 72. - P. 713-723.

215 Thu H.E., Ng S.F. Gelatine enhances drug dispersion in alginate bilayer film via the formation of crystalline microaggregates // Int J Pharm. - 2013. - Vol. 454. - P. 99-106.

216 Young S., Wong M., Tabata Y., Mikos A.G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules // Journal of Controlled Release. - 2005. - Vol. 109. - P. 256-274.

217 Bajpai A.K., Choubey J. Design of gelatin nanoparticles as swelling controlled delivery system for chloroquine phosphate // J Mater Sci Mater Med. - 2006. - Vol. 17. - P. 345-35

218 Cascone M.G., Lazzeri L., Carmignani C., Zhu Z. Gelatin nanoparticles produced by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate // J Mater Sci Mater Med. - 2002. - Vol. 13. - P. 523-526.

219 Tokunaga N., Nagaya N., Shirai M., Tanaka E., Ishibashi-Ueda H., Harada-Shiba M., Kanda M., Ito T., Shimizu W., Tabata Y., Uematsu M., Nishigami K., Sano S., Kangawa K., Mori H. Adrenomedullin Gene Transfer Induces Therapeutic Angiogenesis in a Rabbit Model of Chronic Hind Limb Ischemia // Circulation. - 2004. - Vol. 109. - P. 526-531.

220 Higuchi A., Ling Q.D., Kumar S.S., Chang Y., Kao T.C., Munusamy M.A., Alarfaj A.A., Hsu S.T., Umezawa A. External stimulus-responsive biomaterials designed for the culture and differentiation of ES, iPS, and adult stem cells // Prog Polym Sci. - 2014. - Vol. 39. - P. 1585-1613

221 Kabiri M., Emami S.H., Rafinia M., Tahriri M. Preparation and characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical applications // Current Applied Physics. - 2011. - Vol. 11. - P.457-461

222 Zhou Z., He S., Huang T., Peng C., Zhou H., Liu Q., Zeng W., Liu L., Huang H., Xiang L., Yan H. Preparation of gelatin/hyaluronic acid microspheres with different morphologies for drug delivery // Polymer Bulletin. - 2015. - Vol. 72. - P. 713-723.

223 Schiffman J.D., Schauer C.L. Cross-Linking Chitosan Nanofibers, Biomacromolecules. - 2007. - Vol 8. - P. 594-601.

224 Kuznetsova N.P., Mishaeva R.N., Gudkin L.R., Panarin E.F. Reactions of glutaraldehyde with dipolar ions of amino acids and proteins // Russian Chemical Bulletin. - 2013. - Vol. 62. - P. 918-927.

225 Кильдеева Н.Р., Перминов П.А, Владимиров Л.В., Новиков В.В., Михайлов С.Н. О механизме реакции глутарового альдегида с хитозаном // Биоорганическая Химия. - 2009. - Т. 35. - С. 397-407.

226 Zhou Z., Yang Z., Huang T., Liu L., Liu Q., Zhao Y., Zeng W., Yi Q., Cao D. Effect of Chemical Crosslinking on Properties of Gelatin/Hyaluronic Acid Composite Hydrogels // Polym Plast Technol Eng. - 2013. - Vol. 52. - P. 45-50.

227 Lin J., Pan D., Sun Y., Ou C., Wang Y., Cao J. The modification of gelatin films: Based on various cross-linking mechanism of glutaraldehyde at acidic and alkaline conditions // Food Sci Nutr. - 2019. - Vol. 7. - P. 4140-4146.

228 Mohammadzadehmoghadam S., Dong Y. Fabrication and Characterization of Electrospun Silk Fibroin/Gelatin Scaffolds Crosslinked With Glutaraldehyde Vapor // Front Mater. - 2019. - Vol. 6. - P. 1-12.

229 Yerlan G., Tyussyupova B., Tazhibayeva S., Musabekov K. Polymer systems for oral delivery of insulin // Chemical Bulletin of Kazakh National University. - 2023. - Vol. 1. - P. 12-29.

230 Smart J. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion // Adv Drug Deliv Rev. - 2005. - Vol. 57. - P. 1556-1568.

231 Marques M.R., Loebenberg R., Almukainzi M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing // Dissolut Technol. - 2011. - Vol. 18. - P. 15-28.

232 Rees D.A., Welsh E.J. Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels // Angewandte Chemie International Edition in English. - 1977. - Vol. 16. - P. 214-224.

233 Daly M.M., Knorr D. Chitosan-Alginate Complex Coacervate Capsules: Effects of Calcium Chloride, Plasticizers, and Polyelectrolytes on Mechanical Stability // Biotechnol Prog. - 1988. - Vol. 4. - P. 76-81.

234 Takka S., Ocak O.H., Acarturk F. Formulation and investigation of nicardipine HCl-alginate gel beads with factorial design-based studies // European Journal of Pharmaceutical Sciences. - 1998. - Vol. 6. - P. 241-246.

235 Shenouda L.S., Adams K.A., Zoglio M.A. A controlled release delivery system using two hydrophilic polymers // Int J Pharm. - 1990. - Vol. 61. - P. 127-134.

236 Akhmetzhan A., Abeu N., Nik S.. A. Longinos, Tashenov, N. Myrzakhmetova, N. Amangeldi, Z. Kuanyshova, Z. Ospanova, Z. Toktarbay, Synthesis and Heavy-Metal Sorption Studies of N,N-Dimethylacrylamide-Based Hydrogels // Polymers (Basel). - 2012. - Vol. 13. - P. 1-12.

237 Landsgesell J., Holm C. Cell Model Approaches for Predicting the Swelling and Mechanical Properties of Polyelectrolyte Gels // Macromolecules. - 2019. - Vol. 52. - P. 9341-9353.

238 Yin D.W., Horkay F., Douglas J.F., De Pablo J.J. Molecular simulation of the swelling of polyelectrolyte gels by monovalent and divalent counterions // Journal of Chemical Physics. - 2008. - Vol. 129. - P. 154902 (1-12).

239 Bourbon A.I., Pinheiro A.C., Cerqueira M.A., Vicente A.A. Influence of chitosan coating on protein-based nanohydrogels properties and in vitro gastric digestibility // Food Hydrocoll. - 2016. - Vol. 60. - P. 109-118.

240 Elsayed A., Al-remawi M., Farouk A., Badwan A. Insulin-Chitosan Polyelectrolyte nanocomplexes: Preparation, Characterization and Stabilization of Insulin // Sudan Journal of Medical Sciences. - 2015. - Vol.5. - P. 99-109.

241 Al-Kurdi Z.I., Chowdhry B.Z., Leharne S.A., Al Omari M.M., Badwan A.A. Low molecular weight chitosan-insulin polyelectrolyte complex: Characterization and stability studies // Mar Drugs. - 2015. - Vol. 13. - P. 1765-1784.

242 Ravi Kumar M.N. A review of chitin and chitosan applications // React Funct Polym. - 2000. - Vol. 46. - P. 1-27.

243 Wedmore I., McManus J.G., Pusateri A.E., Holcomb J.B. A Special Report on the Chitosan-based Hemostatic Dressing: Experience in Current Combat Operations // The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. - 2006. - Vol. 60. - P. 655-658.

244 S. Richardson, Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA // Int J Pharm. - 1999. - Vol. 178. - P. 231-243.

245 Draget K.I., Skjak Bræk G., Smidsrod O. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight // Carbohydr Polym. - 1994. - Vol. 25. - P. 31-38.

246 Cook M.T., Tzortzis G., Charalampopoulos D., Khutoryanskiy V.V. Production and Evaluation of Dry Alginate-Chitosan Microcapsules as an Enteric Delivery Vehicle for Probiotic Bacteria // Biomacromolecules. - 2011. - Vol. 12. - P. 2834-2840.

247 Fu Y., Kao W.J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems // Expert Opin Drug Deliv. - 2010. - Vol. 7. - P. 429-444.

248 Vehlow D., Schmidt R., Gebert A., Siebert M., Lips K.S., Muller M. Polyelectrolyte complex based interfacial drug delivery system with controlled loading and improved release performance for bone therapeutics // Nanomaterials. - 2016. - Vol. 6. - P. 1-21.

249 Feng W., Nie W., He C., Zhou X., Chen L., Qiu K., Wang W., Yin Z. Effect of pH-responsive alginate/chitosan multilayers coating on delivery efficiency, cellular uptake and biodistribution of mesoporous silica nanoparticles based nanocarriers // ACS Appl Mater Interfaces. - 2014. - Vol. 6. - P. 8447-8460.

250 Black K.A., Priftis D., Perry S.L., Yip J., Byun W.Y., Tirrell M. Protein encapsulation via polypeptide complex coacervation // ACS Macro Lett. - 2014. - Vol. 3. - P. 1088-1091.

251 Itaka K., Yamauchi K., Harada A., Nakamura K., Kawaguchi H., Kataoka K. Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: Physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency // Biomaterials. - 2003. - Vol. 24. - P. 4495-4506.

252 Dragan E.S., Dinu M.V. Polysaccharides constructed hydrogels as vehicles for proteins and peptides. A review // Carbohydr Polym. - 2019. - Vol. 225. - P. 115210 (1-18).

253 Bajas D., Vlase G., Mateescu M., Grad O.A., Bunoiu M., Vlase T., Avram C. Formulation and characterization of alginate-based membranes for the potential transdermal delivery of methotrexate // Polymers (Basel). - 2012. - Vol. 13. - P. 1-18.

254 Daemi H., Barikani M. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles // Scientia Iranica. - 2012. - Vol. 19. - P. 2023-2028.

255 Sundarrajan P., Eswaran P., Marimuthu A., Subhadra L.B., Kannaiyan P. One pot synthesis and characterization of alginate stabilized semiconductor nanoparticles // Bull Korean Chem Soc. - 2012. - Vol. 33. - P. 3218-3224.

256 Hashim D.M., Man Y.B., Norakasha R., Shuhaimi M., Salmah Y., Syahariza Z.A. Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins // Food Chem. - 2010. - Vol. 118. - P. 856–860.

257 Bandekar J. Amide modes and protein conformation // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular. - 1992. - Vol. 1120. - P. 123–143.

258 Yerlan G.Ye., Tyussyupova B.B., Tazhibayeva S.M., Musabekov K.B., Balabushevich N.G., Kokanbayev A.K. Encapsulation of Insulin in Biodegradable Polymers // Eurasian Chemico-Technological Journal. - 2022. - Vol. 24. - P. 351-361.

259 Ciriminna R., Meneguzzo F., Delisi R., Pagliaro M. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product // Chem Cent J. - 2017. - Vol. 11. - P. 1-9.

260 Korithoski B., Krastel K., Cvitkovitch D.G. Transport and metabolism of citrate by Streptococcus mutans // J Bacteriol. - 2005. - Vol. 187. - P. 4451-4456.

261 Long B., Li J., Song Y., Du J. Temperature Dependent Solubility of r-Form L-Glutamic Acid in Selected Organic Solvents: Measurements and Thermodynamic Modeling // Ind Eng Chem Res. - 2011. - Vol. 50. - P. 8354-8360.

262 Salyha N.O. Activity of the glutathione system of antioxidant defense in rats under the action of L-glutamic acid // The Ukrainian Biochemical Journal. - 2013. - Vol. 85. - P. 40-47.

263 Nisar S., Pandit A.H., Nadeem M., Pandit A.H., Rizvi M.M., Rattan S. γ-Radiation induced L-glutamic acid grafted highly porous, pH-responsive chitosan hydrogel beads: A smart and biocompatible vehicle for controlled anti-cancer drug delivery // Int J Biol Macromol. - 2021. - Vol. 182. - P. 37-50.

264 Dyakina T.A., Derkatch S.R., Levachev S.M. Concentrated gelatin/lecithin emulsions: rheological properties // Bulletin of Moscow University. - 2004. - Vol. 45, № 1. - P. 452-456.

265 Matveyenko V.N., Kirsanov Ye.A., Remizov S.V. Rheology of structurizated dispersion systems // Bulletin of Moscow University. - 2006. - Vol. 47, № 6. - P. 393-397.

266 Yerlan G., Tyussyupova B., Tazhibayeva S., Musabekov K., Balabushevich N. Structural and mechanical properties of gelatin composite films // Chemical Bulletin of Kazakh National University. - 2022. – Vol. 4. - P. 30–39.

267 Maji K., Dasgupta S. Characterization and in vitro evaluation of gelatin–chitosan scaffold reinforced with bioceramic nanoparticles for bone tissue engineering // J Mater Res. - 2019. - Vol. 34. - P. 2807-2818.

268 Tolstoy VP., Chernyshova IV., Skryshevsky VA. Handbook of Infrared Spectroscopy of Ultrathin Films // John Wiley & Sons, Inc. Publication, Hoboken, New Jersey. - 2003. - P. 24-31.

269 Rousi Z., Malhiac C., Fatouros D.G., Paraskevopoulou A. Complex coacervates formation between gelatin and gum Arabic with different arabinogalactan protein fraction content and their characterization // Food Hydrocoll. - 2019. - Vol. 96. - P. 577-588.

270 Stuart B.H. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications // John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. - 2004. - P. 45-70.

271 Rohman A., Man Y.B., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil // Food Research International. - 2010. - Vol. 43. - P. 886-892.

272 Martucci J.F., Ruseckaite R.A. Tensile properties, barrier properties, and biodegradation in soil of compression-Molded gelatin-dialdehyde starch films // J Appl Polym Sci. - 2009. - Vol. 112. - P. 2166-2178.

273 Lee B.B., Ravindra P., Chan E.S. Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping // Chem Eng Technol. - 2013. - Vol. 36. - P. 1627-1642.

274 Bennacef C., Desobry - Banon S., Probst L., Desobry S. Alginate Core-Shell Capsules Production through Coextrusion Methods: Principles and Technologies // Mar Drugs. - 2023. - Vol. 21. - P. 235 (1-16).

275 Simonescu C.M., Mason T.J., Calinescu I., Lavric, Vinatoru V.M., Melinescu A., Culiţa D.C. Ultrasound assisted preparation of calcium alginate beads to improve absorption of Pb^{+2} from water // Ultrason Sonochem. - 2020. - Vol. 68. - P. 105191 (1-8).

276 Apetrei I.M., Rodriguez - Mendez M.L., Apetrei C., de Saja J.A. Enzyme sensor based on carbon nanotubes/cobalt(II) phthalocyanine and tyrosinase used in pharmaceutical analysis // Sens Actuators B Chem. - 2013. - Vol. 177. - P. 138-144.

277 Jaros D., Rohm H. Enzymes Exogenous to Milk in Dairy Technology | Transglutaminase // Encyclopedia of Dairy Sciences, Elsevier. - 2011. - P. 297-300.

278 Bai Y., Huang H., Meng K., Shi P., Yang P., Luo H., Luo C., Feng Y., Zhang W., Yao B. Identification of an acidic α-amylase from Alicyclobacillus sp. A4

and assessment of its application in the starch industry // Food Chem. - 2012. - Vol. 131. - P. 1473-1478.

279 Kamata H., Li X., Chung U., Sakai T. Design of Hydrogels for Biomedical Applications // Adv Healthc Mater. - 2015. - Vol. 4. - P. 2360-2374.

280 Te Nijenhuis K. Gelatin // Thermoreversible Networks, Springer, Berlin. - 1997. - P. 160-193.

281 Ni F., Luo X., Zhao Z., Yuan J., Song Y., Liu C., Huang M., Dong L., Xie H., Cai L., Ren G., Gu Q. Enhancing viability of Lactobacillus plantarum encapsulated by alginate-gelatin hydrogel beads during gastrointestinal digestion, storage and in the mimic beverage systems // Int J Biol Macromol. - 2023. - Vol. 224. - P. 94-104.

282 Kraus J., Nakov S., Repin S. Reliable Computer Simulation Methods for Electrostatic Biomolecular Models Based on the Poisson - Boltzmann Equation // Computational Methods in Applied Mathematics. - 2020. - Vol. 20. - P. 643-676.

283 Yerlan G., Shen M., Tyussyupova B.B., Tazhibayeva S.M., Musabekov K., Takhistov P. Insulin Conformation Changes in Hybrid Alginate - Gelatin Hydrogel Particles // Molecules. - 2024. - Vol. 29. - P. 1-17.

284 Hashemi Gahruie H., Ziaee E., Eskandari M.H., Hosseini S.M. Characterization of basil seed gum-based edible films incorporated with Zataria multiflora essential oil nanoemulsion // Carbohydr Polym. - 2017. - Vol.166. - P. 93-103.

285 Chen X., Fan M., Tan H., Ren B., Yuan G., Jia Y., Li J., Xiong D., Xing X., Niu X., Hu X. Magnetic and self-healing chitosan-alginate hydrogel encapsulated gelatin microspheres via covalent cross-linking for drug delivery // Materials Science and Engineering: C. - 2019. - Vol. 101. - P. 619-629.

286 Jahed E., Khaledabad M.A., Almasi H., Hasanzadeh R. Physicochemical properties of Carum copticum essential oil loaded chitosan films containing organic nanoreinforcements // Carbohydr Polym. - 2017. - Vol. 164. - P. 325-338.

287 Muhoza B., Xia S., Zhang X. Gelatin and high methyl pectin coacervates crosslinked with tannic acid: The characterization, rheological properties, and application for peppermint oil microencapsulation // Food Hydrocoll. - 2019. - Vol. 97. - P. 105174 (1-8).

288 Glazova I., Smirnova L., Zamyshlyayeva O., Zaitsev S., Avdoshin A., Naumov V., Ignatov S. Interpolymer interaction in insulin-chitosan complexes // Supramol Chem. - 2019. - Vol. 31. - P. 412-423.

289 Nielsen L., Frokjaer S., Carpenter J.F., Brange J. Studies of the Structure of Insulin Fibrils by Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy and Electron Microscopy // J Pharm Sci. - 2001. - Vol. 90. - P. 29-37.

290 Kalikmanov V.I. Nucleation Theory // Springer Netherlands, Dordrecht, - 2013. - P. 71-78.

291 McClements D.J. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review // Adv Colloid Interface Sci. - 2018. - Vol. 253. - P. 1-22.

292 Ganji F., Vasheghani - Farahani S., Vasheghani - Farahani E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review, 2010. www.SID.ir.

293 Bannikova A., Rasumova L., Evteev A., Evdokimov I., Kasapis S. Protein-loaded sodium alginate and carboxymethyl cellulose beads for controlled release under simulated gastrointestinal conditions // Int J Food Sci Technol. - 2017. - Vol. 52. - P. 2171-2179.

294 Brodkorb A., Egger L., Alminger M., Alvito P. Infogest static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion // Nat Protoc. - 2019. - Vol. 14. - P. 991-1014.

295 Polzonetti V., Natalini P., Vincenzetti S., Vita A., Pucciarelli S. Modulatory Effect of Oleuropein on Digestive Enzymes // Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention, Elsevier. - 2010. - P. 1327-1333.

296 Kahrilas P.J., Kia L. Pepsin // Chest. - 2015. - Vol. 148. - P. 300-301.

297 Siepmann J., Siepmann F. Mathematical modeling of drug delivery // Int J Pharm. - 2008. - Vol. 364. - P. 328-343.

298 Yao Fu, Weiyuan John Kao. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems // Expert Opinion Drug Delivery. - 2010. - Vol. 7 (4). - P. 1-28.

299 Boyd G.E., Adamson A.W., Myers L.S. The Exchange Adsorption of Ions from Aqueous Solutions by Organic Zeolites. II. Kinetics // J Am Chem Soc. - 1947. - Vol. 69. - P. 2836-2848.