

МЕДИЦИНСКИЕ
ПОЛИМЕРЫ

УДК 541(64+49):547.995.12

КОМПЛЕКСЫ АНИОННОГО ПАВ С ХИТОЗАНОМ
И ЕГО ГИДРОФОБНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ
КАК ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИЕ СРЕДСТВА ПРОТИВ SARS-CoV-2

© 2023 г. А. В. Шibaев^{a,*}, А. С. Оспенников^a, Г. В. Корнилаева^b, В. Ф. Ларичев^b,
И. Т. Федякина^b, Lifeng Fu^c, Zhuo Chen^d, Yangyang Yang^d, Э. В. Карамов^{b,e}, А. С. Тургиев^{b,e},
Liping Duan^f, Jun Liu^g, О. Е. Филиппова^a

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова. Физический факультет
119991 Москва, Ленинские горы, 1, корп. 2, Россия

^bНациональный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи
123098 Москва, ул. Гамалеи, 18, Россия

^cCAS Key Laboratory of Pathogen Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology,
Chinese Academy of Sciences (CAS) Beijing 100101, China

^dShanghai Key Laboratory of Chemical Biology, Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, School of Pharmacy,
East China University of Science and Technology Shanghai 200237, China

^eНациональный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных болезней
Минздрава России 127473 Москва, ул. Достоевского, 4, корп. 2, Россия

^fNHC Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, WHO Collaborating Centre for Tropical Diseases,
National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention Shanghai 200025, China

^gNHC Key Laboratory of Biosafety, National Institute for Viral Disease Control and Prevention,
Chinese Center for Disease Control and Prevention (China CDC) Beijing 102206, China

*e-mail: shibaev@polly.phys.msu.ru

Поступила в редакцию 30.01.2023 г.

После доработки 07.11.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

Настоящая работа направлена на получение комплексов хитозана и гидрофобно-модифицированного хитозана с анионным ПАВ додецилбензолсульфонатом натрия и изучение вирулицидной активности комплексов и их компонентов по отношению к SARS-CoV-2. Показано, что введение достаточного количества (4 мол. %) боковых гидрофобных *n*-додецильных групп обеспечивает активность гидрофобно-модифицированного хитозана против SARS-CoV-2 в умеренных концентрациях, при которых немодифицированный хитозан и хитозан, содержащий меньшее количество гидрофобных групп, не проявляют активности. Получены комплексы гидрофобно-модифицированного хитозана с додецилбензолсульфонатом натрия, что подтверждено данными флуоресцентной спектроскопии и изотермической титрационной калориметрии. Установлено, что комплекс гидрофобно-модифицированный хитозан–додецилбензолсульфонат натрия более активен, чем полимер без ПАВ, а увеличение количества гидрофобных групп усиливает активность.

DOI: 10.31857/S2308112023600114, EDN: DCRANG

ВВЕДЕНИЕ

За последние несколько десятилетий произошли вспышки эпидемий трех новых высококонтагиозных и летальных заболеваний, вызванных различными коронавирусами [1–3]: SARS-CoV в 2002 г., MERS-CoV в 2014 г. и SARS-CoV-2 в 2020 г. Для эффективной борьбы с вызванной последним вирусом пандемией приоритетной задачей является разработка новых безопасных противовирусных средств, включая вакцины, лекарства и дезинфицирующие средства. Разработаны различные дезинфицирующие средства как

наружного (для устранения вируса с поверхностей и рук и т.п.), так и внутреннего применения (например, в виде спреев для горла и т.п.). Наиболее широко используемые дезинфицирующие средства созданы на основе катионных четвертичных аммониевых соединений (так называемых “quats”) [4, 5], с ними связано большинство современных исследований вирулицидных свойств [6–8]. Однако и анионные ПАВ являются перспективными противовирусными средствами, поскольку они менее токсичны, и некоторые из них известны своей активностью в отношении вирусов [9–11].

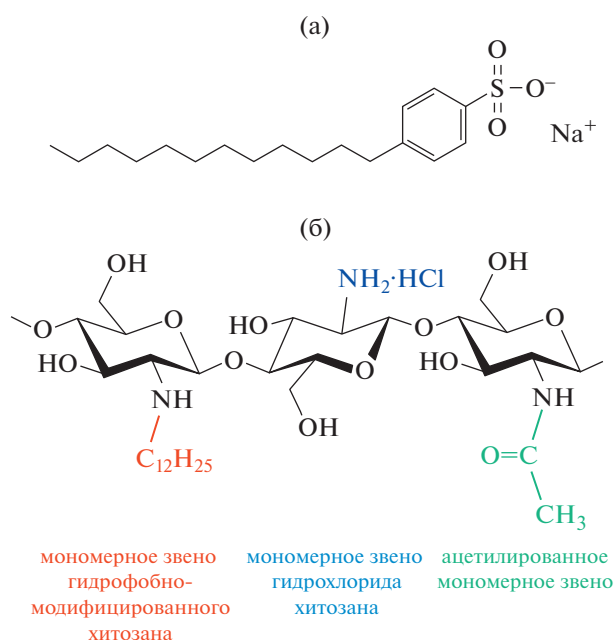


Рис. 1. Химическая структура анионного поверхностно-активного вещества ДБСН (а) и гидрохлорида гидрофобно-модифицированного хитозана (б). Цветные рисунки можно посмотреть в электронной версии.

Одним из путей улучшения противовирусного действия ПАВ служит получение комплексов полимер–ПАВ [12, 13]. Для этой цели очень перспективны носители на основе природных полимеров. Среди них одним из лучших кандидатов для получения комплексов с анионными ПАВ является хитозан [14, 15], поскольку он представляет собой один из немногих положительно заряженных природных полимеров, обеспечивающих комплексобразование с противоположно заряженными частицами за счет электростатических взаимодействий, и характеризуется хорошей биосовместимостью и биodeградируемостью [16, 17]. Хитозан представляет собой линейный аминополисахарид, состоящий из двух типов случайно распределенных β -(1 $\rightarrow$ 4)-связанных мономерных звеньев: 2-амино-2-дезоксид-Д-глюкопиранозы (Д-глюкозамина) и 2-ацетида-2-дезоксид-Д-глюкопиранозы (N-ацетил-Д-глюкозамина) [16]. Благодаря своему положительному заряду хитозан способствует проникновению различных веществ через липидные бислои [18]. Хитозан широко исследуется с целью дальнейшего биомедицинского использования в качестве носителя лекарств или для генной инженерии [19]. Для повышения эффективности хитозана часто проводят его химическую модификацию [20, 21]. Например, введение боковых гидрофобных заместителей усиливает его взаимодействие с клетками или слизистыми оболочками. Показано, что гидрофобная модификация хитозана способствует

трансфекции его комплекса с ДНК в клетки [19, 22]. Активно разрабатываются носители противовирусных средств на основе хитозана [23, 24]. Например, показано, что наноконпозиты хитозана с наночастицами серебра обладают вирулицидной активностью в отношении вируса гриппа [25], а наногели хитозана, содержащие куркумин, активны против вируса гепатита С [26]. Некоторые производные хитозана проявляют активность в отношении коронавирусов, подавляя их репликацию [27], в частности, это касается SARS-CoV-2 [28].

Однако влияние самого хитозана на SARS-CoV-2 не было исследовано, и роль гидрофобной модификации хитозана в противовирусной эффективности его препаратов не выявлена. Кроме того, не получены комплексы хитозан–ПАВ, обладающие вирулицидной активностью. В связи с этим целью настоящей работы является получение комплексов хитозана и гидрофобно-модифицированного хитозана с анионным ПАВ додецилбензолсульфонатом натрия (ДБСН) и исследование вирулицидного действия этих комплексов и их компонентов на SARS-CoV-2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

ДБСН (твердый тип, чистота >95%) (рис. 1а) приобретен в компании TCI. Хитозан с низкой молярной массой ($M = (5-19) \times 10^4$ г/моль), ледяная уксусная кислота (чистота > 99%), додецилальдегид (чистота > 92%) и цианоборгидрид натрия (чистота > 95%) были предоставлены “Sigma-Aldrich”. NaOH (чистота > 99%) был куплен у “Acros”. Образцы готовили с использованием физиологического раствора (0.9 мас. % NaCl в дистиллированной воде), предоставленного фирмой “Гротекс” (Россия). Для приготовления растворов использовали дистиллированную деионизированную воду, полученную с помощью системы MilliQ (“Millipore”). Этанол был предоставлен фирмой “Ферейн” (Россия) и очищен перегонкой. Растворы для ЯМР-измерений готовили в D_2O (изотопная чистота > 99.9%, “Астрахим”, Россия).

Модификация хитозана

Модификацию хитозана с введением *n*-додецильных групп проводили по методике, описанной в работе [29]. Хитозан (10 г) растворяли в 0.2 М водном растворе уксусной кислоты (500 мл) при перемешивании в течение ночи, затем добавляли этанол (350 мл), и доводили pH до 5.2 добавлением концентрированного водного раствора NaOH. После этого приливали необходимое количество раствора *n*-додецилальдегида в этаноле. Затем добавляли цианоборгидрид натрия (17 г), и раствор перемешивали в течение 24 ч при комнат-

ной температуре. После завершения реакции pH доводили до 7.2, в результате чего продукт выпал в осадок. Его трижды промывали смесью этанола и воды и сушили на воздухе.

Характеризация хитозана

Количество *n*-додецильных групп, привитых к хитозану, определяли методом спектроскопии ЯМР ^1H на спектрометре “Bruker AV-600”. Получили два образца хитозана с разной степенью модификации, содержащие 1.7 или 4 мол. % групп C12 в расчете на один моносахаридный остаток. Степень ацетилирования (количество остаточных ацетамидных групп), также определенная методом ЯМР ^1H , составляла для всех образцов 15 мол. %.

Подготовка образцов

Сначала все хитозаны получали в форме водорастворимых гидрохлоридов путем растворения 0.3 мас.% хитозана или гидрофобно-модифицированного хитозана в водном растворе HCl (pH 3) при осторожном перемешивании в течение ночи. Потом растворы пропускали через керамический фильтр Robu 3 (размер пор 16–40 мкм) для удаления не растворимых в воде остатков, а затем высушивали лиофильно. Полученные хитозаны хорошо растворялись в воде [30], их химическая структура представлена на рис. 16. Полимеры и ДБСН растворяли в физиологическом растворе, и растворы смешивали в разном соотношении для получения образцов с желаемыми концентрациями.

Противовирусная активность

Для исследования вирулицидной активности клетки Vero E6 из ATCC (Манассас, США) (CRL-1586) культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде Игла, модифицированной Дульбекко (ДМЕМ) (“Sigma-Aldrich”) с высоким содержанием глюкозы, в которую добавляли 5% фетальной телячьей сыворотки (ФТС), 2 ммоль/л *L*-глутамина и смесь антибиотиков (150 ед/мл пенициллина и 150 ед/мл стрептомицина). Используемый препарат вируса SARS-CoV-2 (штамм HCoV-19/Russia/Moscow-PMVL-12/2020 (EPI_ISL_572398), выделенный от пациента) представлял собой культуральную жидкость, полученную из культур инфицированных клеток Vero E6.

Растворы анионных дезинфицирующих средств или их комплексов с гидрофобно-модифицированным хитозаном инкубировали с равным объемом препарата вируса при комнатной температуре в течение 60 мин. Затем вирусные частицы (вирионы) отмывали от дезинфицирующих средств центрифугированием при 27 000 об/мин в течение 1 ч, чтобы избежать их токсического воз-

действия на клетки. Вирусные частицы ресуспендировали в 300 мкл поддерживающей среды (ДМЕМ, 1% ФТС) и готовили 10-кратные разведения в поддерживающей среде для определения титра. Монослойные культуры клеток Vero-E6 в 96-луночных планшетах инфицировали приготовленными таким образом разведениями и после инкубации в течение 2 ч инокулят удаляли. Планшеты дважды промывали ДМЕМ, не содержащей ФТС, заполняли поддерживающей средой другого типа (ДМЕМ, 2% ФТС) и далее инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 96 ч. Вызванные вирусом цитопатические эффекты оценивали путем микроскопического исследования клеток и считали признаком их инфицирования. Количество активного вируса, оцениваемое по доле инфицированных клеток, определяли методом конечных разведений (титрованием) и выражали в пятидесятипроцентных инфекционных дозах для культуры ткани (TCID₅₀). Титр рассчитывали по методу Спирмана–Кербера и выражали в виде lg TCID₅₀/0.1 мл [31].

Вирулицидную эффективность ПАВ оценивали по разнице титров вируса (*A*) между контрольным *A_к* (без дезинфицирующих средств) и экспериментальным *A_э* значениями:

$$A = A_k - A_e.$$

Индекс защиты, или коэффициент ингибирования (КИ), рассчитывали по формуле

$$\text{КИ} = [(A_k - A_e)/A_k] \times 100\%.$$

Флуоресцентная спектроскопия

Эксперименты по флуоресцентной спектроскопии проводили на спектрометре “Perkin-Elmer LS55” с ксеноновой газоразрядной лампой. Длина волны возбуждения составляла 338 нм. Спектры флуоресценции образцов регистрировали при скорости сканирования 10 нм/мин. Щели возбуждения и испускания были установлены на 2.5 нм. Для измерения критической концентрации мицеллообразования в качестве гидрофобного флуоресцентного зонда использовали пирен. Метод определения ККМ основан на том, что спектр флуоресценции пирена зависит от полярности микроокружения, в котором находится пирен [32]. При концентрации ПАВ ниже ККМ пирен находится в воде, и соотношение интенсивностей первого и третьего пиков (*I₁/I₃*) в его спектре флуоресценции составляет 1.7–2.1. Выше ККМ, когда образуются мицеллы, пирен сольбилизируется в их ядрах, и соотношение *I₁/I₃* понижается до 0.8–1.1. ККМ определяют как точку перегиба зависимости *I₁/I₃* от концентрации ПАВ.

В экспериментах концентрацию пирена фиксировали на значении 8×10^{-6} моль/л. При подготовке образцов к измерениям сначала готовили

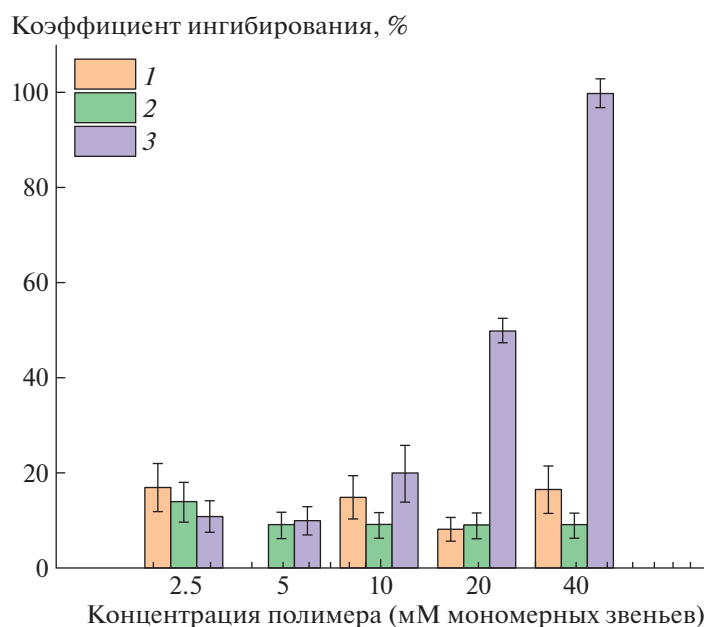


Рис. 2. Коэффициенты ингибирования SARS-CoV-2 для водных растворов хитозана (1) и образцов гидрофобно-модифицированного хитозана, содержащих 1.7 (2) и 4 мол. % (3) привитых *n*-додецильных групп (все полимеры были в форме гидрохлоридов).

раствор пирена в этаноле (10^{-3} моль/л). Небольшое количество этого раствора добавляли в пузырьки, этанол выпаривали, добавляли водный раствор ПАВ и полимера, и образец перемешивали встряхиванием в течение 2 ч.

Изотермическая титрационная калориметрия

Эксперименты по изотермической титрационной калориметрии проводили на изотермическом титрационном калориметре “Nano ITC TA Instruments” (США). Титрование осуществляли ступенчатым введением раствора ПАВ (0.144 ммоль/л) из инъекционного шприца емкостью 50 мкл в ячейку для образца, заполненную раствором гидрофобно-модифицированного хитозана (0.6 ммоль/л мономерных звеньев, 4 мол. % *n*-додецильных групп) в 0.9% NaCl в воде при постоянной температуре 20.0°C. Интервал времени между одновременными впрысками составлял 300 с. Выделение или поглощение тепла в результате каждой инъекции в ходе титрования измеряли непосредственно микрокалориметром.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы получили комплексы хитозана с гидрофобно-модифицированного хитозана с анионным поверхностно-активным веществом ДБСН и изучили их вирулицидную активность в отношении SARS-CoV-2. Концентрацию полимеров поддерживали в диапазоне $0-80 \times 10^{-3}$ ммоль/л (1 ммоль/л = 1 М мономерных звеньев), а концентрацию ДБСН варь-

ровали от 0 до 8 ммоль/л. Сначала мы оценили вирулицидную активность хитозана в отсутствие ДБСН.

Вирулицидная активность хитозана и гидрофобно-модифицированного хитозана

Исследовали активность хитозана по отношению к SARS-CoV-2 и сравнили ее с активностью гидрофобно-модифицированного хитозана с различной степенью замещения. На рис. 2 представлены зависимости коэффициента ингибирования от концентрации немодифицированного хитозана и двух образцов гидрофобно-модифицированного хитозана, содержащих 1.7 и 4 мол. % групп C12.

В диапазоне концентраций полимера от 0.0025 до 0.04 ммоль/л немодифицированный хитозан и гидрофобно-модифицированный хитозан с меньшей степенью модификации (1.7 мол. %) практически не обладают активностью, которая находится на уровне шума и не меняется закономерно с концентрацией. Однако гидрофобно-модифицированный хитозан с более высокой степенью модификации (4 мол. %) проявляет высокую эффективность ингибирования при концентрации 0.04 ммоль/л — он снижает титр вируса на 6 порядков. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) этого гидрофобно-модифицированного хитозана составляет 0.02 ммоль/л. Противовирусную активность гидрофобно-модифицированного хитозана можно объяснить тем, что он несет заряженные группы $-NH_3^+$ и гидро-

фобные *n*-додецильные группы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженной оболочкой вируса и разрушают ее, подобно низкомолекулярным катионным дезинфицирующим средствам [7]. Активность гидрофобно-модифицированного хитозана по сравнению с немодифицированным хитозаном объясняется тем, что введение в макромолекулы боковых C12-алкильных групп делает взаимодействие полимера с липидным бислоем энергетически более выгодным, поскольку *n*-додецильные группы встраиваются в липидный бислой, действуя как гидрофобные хвосты ПАВ.

Таким образом, введение достаточного количества боковых гидрофобных групп придает хитозану активность против SARS-CoV-2 при достаточно небольших концентрациях полимера. Насколько нам известно, это первое сообщение, демонстрирующее противовирусные свойства гидрофобно-модифицированного природного полимера, и первый описанный случай активности гидрофобно-модифицированного хитозана против SARS-CoV-2.

Вирулицидная активность ДБСН

ДБСН без добавления полимеров активен по отношению к SARS-CoV-2 (рис. 3): он способен ингибировать вирусную активность более чем на 6 порядков в концентрациях выше 2 ммоль/л. Этот эффект можно объяснить проникновением молекул ПАВ в липидный бислой вирусной оболочки и его разрушением [33], что происходит за счет наличия достаточно длинного C12-алкильного хвоста и гидрофобного бензольного фрагмента в структуре ПАВ. EC_{50} для этого ПАВ очень низкая и составляет около 0.5 ммоль/л. Однако она выше, чем EC_{50} для различных катионных ПАВ. Например, $EC_{50} = 0.081$ ммоль/л для катионного ПАВ аналогичного строения – хлорида бензилдиметилдодециламмония (C12ВАС), которое также имеет алкильный хвост C12 и бензольную группу, но при этом его головка положительно заряжена [8]. Это объясняется более высоким сродством катионных ПАВ к отрицательно заряженным липидным бислоям.

Заметим, что все концентрации ДБСН, при которых он проявляет высокую активность, превышают ККМ (0.4 ммоль/л, см. ниже); это означает, что ПАВ активен в мицеллярной форме. Это вполне объяснимо, поскольку одна мицелла, контактирующая с вирусной частицей, может передать ей сразу несколько десятков ионов ПАВ, что гораздо эффективнее деактивирует вирус, чем контакт с одиночной молекулой ПАВ, не включенной в мицеллу.

Ранее было продемонстрировано, что ДБСН активен против оболочечных вирусов: например, 3 мас. % ДБСН и 70 мас. % этанола проявляют ви-

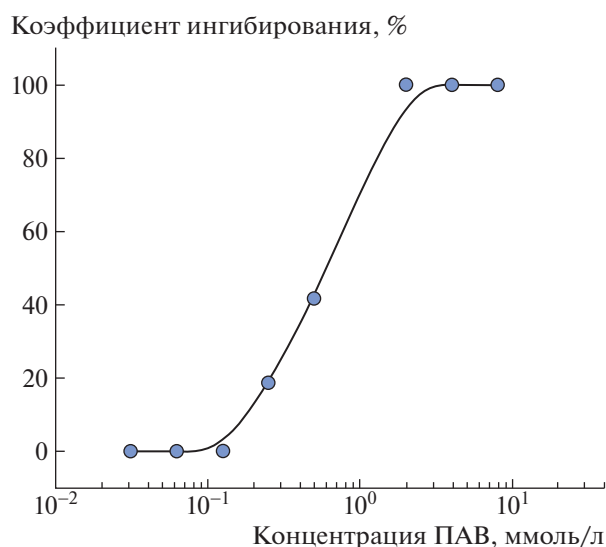


Рис. 3. Коэффициенты ингибирования SARS-CoV-2 для водных растворов анионного поверхностно-активного вещества ДБСН.

рулицидную активность против SARS-CoV-2 [11]. В настоящей работе мы показываем, что сам ДБСН (в отсутствие этанола) эффективен против SARS-CoV-2 даже в небольших концентрациях.

Получение комплексов хитозан–ДБСН и гидрофобно-модифицированный хитозан–ДБСН

Для получения комплексов полимер–ПАВ хитозан или гидрофобно-модифицированный хитозан с 4 мол. % *n*-додецильных групп смешивали с ДБСН при различном мольном отношении ПАВ к мономерным звеньям хитозана. Показано, что смеси немодифицированного хитозана и ДБСН стабильны только в узком диапазоне концентраций, в частности, при низких концентрациях ДБСН. Гидрофобная модификация хитозана расширяет область гомогенности: в этом случае стабильные однофазные растворы можно приготовить при концентрации гидрофобно-модифицированного хитозана до 1.5 мас. % (90 ммоль/л мономерных звеньев) и мольном отношении [ДБСН] : [мономерные звенья полимера] до 0.2. Таким образом, при низком мольном отношении [ДБСН] : [мономерные звенья хитозана] растворы являются однофазными и гомогенными, а при его увеличении происходит фазовое расслоение, сопровождающееся выпадением осадка. Такое поведение можно объяснить образованием электростатического комплекса между анионными полярными головками ДБСН и катионными аминогруппами хитозана. При низких мольных соотношениях [ДБСН] : [мономерные звенья хитозана] комплексы сильно заряжены положительно и не выпадают в осадок из-за большой потери энтропии противоионов. Увеличение соотношения [ДБСН] : [мономерные звенья хитозана] делает

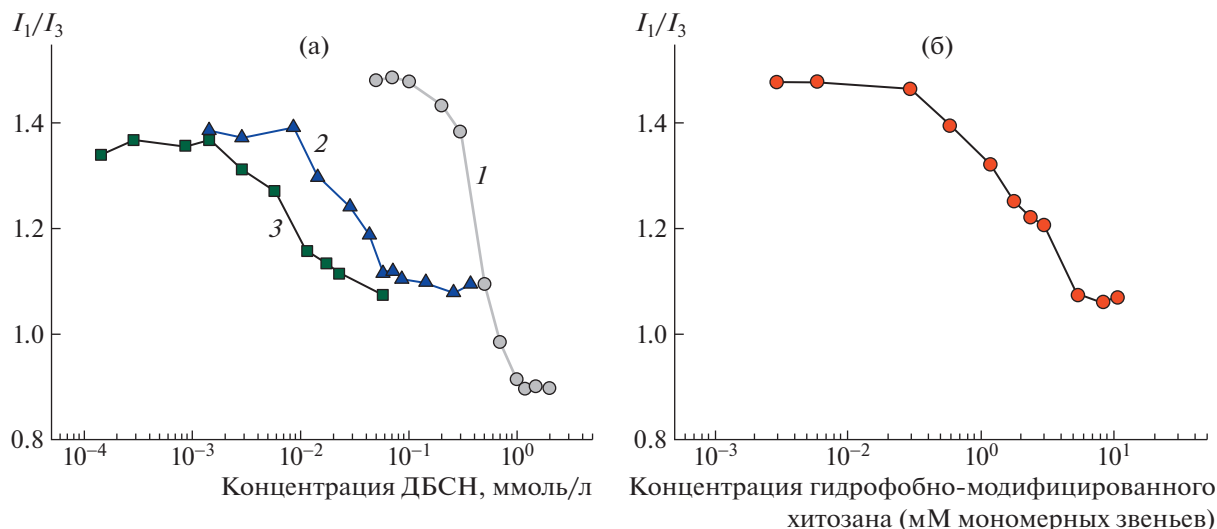


Рис. 4. Зависимость соотношения интенсивностей первого и третьего пиков в спектре флуоресценции пирена от концентрации ДБСН для растворов в отсутствие полимера (1), в присутствии хитозана (2) или гидрофобно-модифицированного хитозана (0.6 мМ мономерных звеньев, 4 мол. % *n*-додецильных групп) (3) (а), а также от концентрации гидрофобно-модифицированного хитозана (в отсутствие ДБСН) (б). Растворитель: 0.9 мас. % NaCl в воде.

комплекс менее заряженным, вызывая его выпадение в осадок. Такая ситуация типична для комплексов полиэлектролит–ПАВ и описана в литературе для многих систем [34–37].

Образование комплексов доказано измерением критической концентрации мицеллообразования ДБСН в отсутствие хитозана и критической концентрации ассоциации (ККА) в присутствии хитозана — гидрофобно-модифицированного хитозана методом флуоресцентной спектроскопии с использованием пирена в качестве зонда (рис. 4). В отсутствие хитозана критическая концентрация мицеллообразования ДБСН в физиологиче-

ском растворе (0.9 мас. % NaCl в воде) равна 0.4 ммоль/л, что близко к значениям, полученным ранее [38]. При добавлении немодифицированного хитозана концентрация мицеллообразования понижается на порядок, что свидетельствует об образовании электростатического комплекса. Действительно, противоположно заряженный полиэлектролит эффективно экранирует электростатическое отталкивание между заряженными головками ПАВ, способствуя связыванию молекул ПАВ с полимером и образованию агрегатов.

В случае гидрофобно-модифицированного хитозана ситуация более сложная, поскольку молекулы ДБСН получают возможность взаимодействовать как с противоположно заряженными аминогруппами, так и с боковыми гидрофобными *n*-додецильными цепями. В широком диапазоне концентраций гидрофобно-модифицированного хитозана (более 4 ммоль/л мономерных звеньев) *n*-додецильные группы полимера образуют гидрофобные агрегаты даже в отсутствие ПАВ. Это подтверждается данными флуоресцентной спектроскопии, которые показывают, что при очень низких концентрациях полимера отношение I_1/I_3 в спектрах флуоресценции пирена велико и падает при повышении содержания полимера (рис. 4б). Данный факт свидетельствует об образовании гидрофобных доменов *n*-додецильными группами, когда содержание указанных групп увеличивается.

Следовательно, можно ожидать, что наличие гидрофобных групп будет способствовать комплексообразованию между гидрофобно-модифицированным хитозаном и ДБСН. Это подтверждается тем, что даже при очень низких концентрациях гидрофобно-модифицированного хитозана

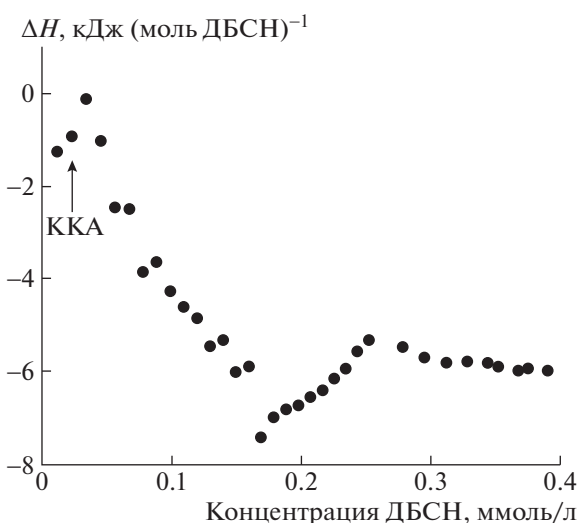


Рис. 5. Кривая изотермического титрования 5 мМ раствором ДБСН гидрофобно-модифицированного хитозана (6 мМ мономерных звеньев, 4 мол. % *n*-додецильных групп) при 20°C.

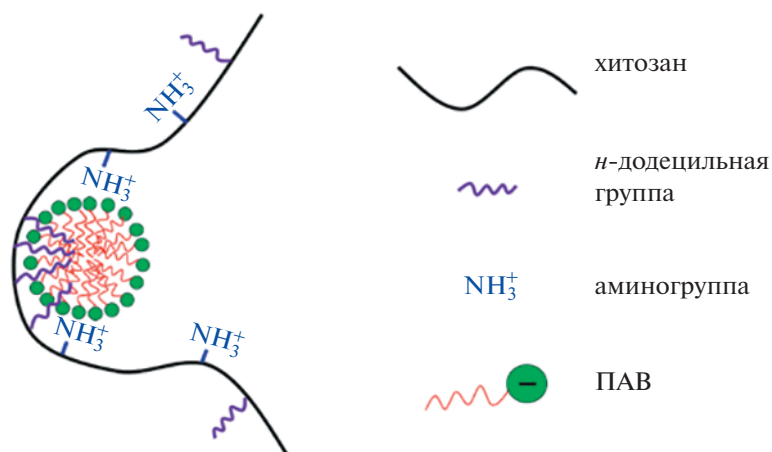


Рис. 6. Структура комплекса гидрофобно-модифицированный хитозан–ДБСН.

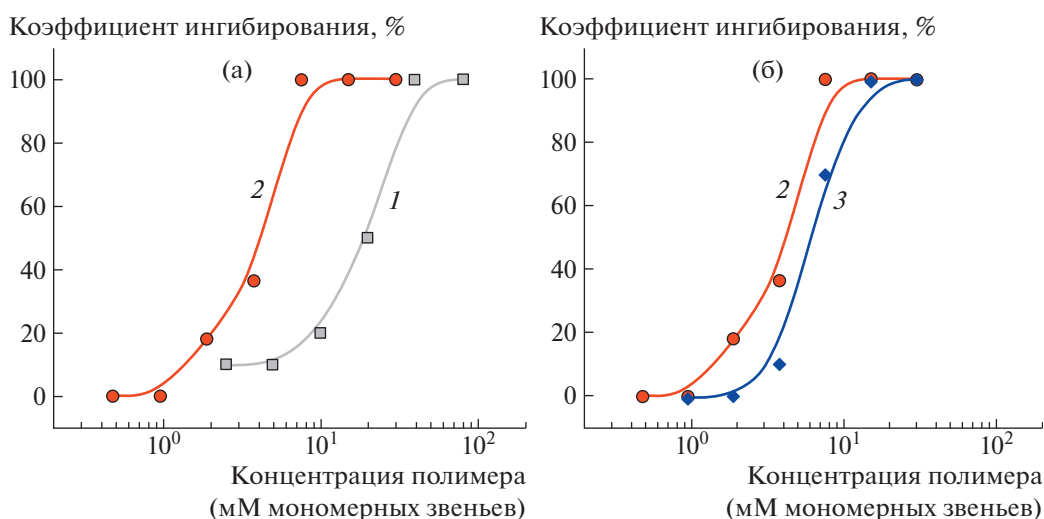


Рис. 7. Коэффициенты ингибирования SARS-CoV-2 для водных растворов, содержащих гидрофобно-модифицированный хитозан с 4 мол. % *n*-додецильных групп (1), гидрофобно-модифицированный хитозан с 4 мол. % *n*-додецильных групп и 8 мМ ДБСН (2), гидрофобно-модифицированный хитозан с 1.7 мол. % *n*-додецильных групп и 8 мМ ДБСН (3).

происходит более сильное падение ККМ, чем для немодифицированного хитозана (рис. 4а). Аналогичные низкие значения ККА для агрегации ДБСН в присутствии гидрофобно-модифицированного хитозана получены методом изотермической титрационной калориметрии (рис. 5). Таким образом, в смесях гидрофобно-модифицированный хитозан–ДБСН образуются смешанные агрегаты, состоящие из ПАВ и *n*-додецильных групп. Их возможная структура показана на рис. 6.

Вирулицидная активность комплексов гидрофобно-модифицированный хитозан–ДБСН

Активность комплексов гидрофобно-модифицированный хитозан–ДБСН по отношению к SARS-CoV-2 исследовали в широком диапазоне концентраций, используя стабильные гомоген-

ные комплексы. Показано, что комплексы значительно эффективнее самого гидрофобно-модифицированного хитозана (рис. 7а): при добавлении 8 ммоль/л ПАВ зависимость коэффициента ингибирования от концентрации полимера смещается в ~5 раз в сторону меньших концентраций, что обусловлено вирулицидным действием ПАВ.

Роль комплексообразования в получении синергетического эффекта обоих компонентов очевидна из того обстоятельства, что важным фактором, влияющим на активность комплекса, является количество привитых групп C12 в хитозане. Его увеличение с 1.7 до 4 мол. % приводит к повышению активности при тех же концентрациях компонентов (рис. 7б). Такой же эффект наблюдался выше для гидрофобно-модифицированного хитозана в отсутствие ПАВ (рис. 2). Та же закономерность для комплексов полимер–ПАВ означа-

ет, что для получения комплекса предпочтителен гидрофобно-модифицированный хитозан с большим содержанием привитых групп, что может быть обусловлено двумя причинами: он обеспечивает более сильное сродство комплекса к вирусу и усиливает взаимодействие между хитозаном и ДБСН.

Таким образом, комплексы гидрофобно-модифицированного хитозана с анионным поверхностно-активным веществом ДБСН проявляют повышенную активность против SARS-CoV-2, что является результатом кооперативного переноса на вирион одним комплексом многих молекул ПАВ, а также синергизма вирулицидной активности гидрофобно-модифицированного хитозана и ПАВ.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, NSFC и CNPq в рамках научного проекта РФФИ № 20-53-80005 (научный проект БРИКС 085-ChitoTarCoV) и Фондом развития теоретической физики и математики “БАЗИС” (А.С. Оспенников).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cui J., Li F., Shi Z.-L. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. V. 17. P. 181.
2. Liu W.J., Wu G.Z. // *Biosaf. Health.* 2020. V. 2. P. 185.
3. Gao G.F., Liu W.J. // *China CDC Wkly.* 2021. V. 3. P. 915.
4. Schrank C.L., Minbiole K.P.C., Wuest W.M. // *ACS Infect. Dis.* 2020. V. 6. P. 1553.
5. Vereshchagin A.N., Frolov N.A., Egorova K.S., Seitkalieva M.M., Ananikov V.P. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 6793.
6. Baker N., Williams A.J., Tropsha A., Ekins S. // *Pharm. Res.* 2020. V. 37. P. 104.
7. Ogilvie B.H., Solis-Leal A., Lopez J.B., Poole B.D., Robinson R.A., Berges B.K. // *J. Hosp. Infect.* 2021. V. 108. P. 142.
8. Karamov E.V., Larichev V.F., Kornilaeva G.V., Fedyakina I.T., Turgiev A.S., Shibaev A.V., Molchanov V.S., Philippova O.E., Khokhlov A.R. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 6645.
9. Korneyeva M., Hotta J., Lebing W., Rosenthal R.S., Franks L., Petteway Jr S.R. // *Biologicals.* 2002. V. 30. P. 153.
10. Fletcher N.F., Meredith L.W., Tidswell E.L., Bryden S.R., Gonçalves-Carneiro D., Chaudhry Y., Shannon-Lowe C., Folan M.A., Lefteri D.A., Pinggen M., Bailey D., McKimmie C.S., Baird A.W. // *J. Gen. Virol.* 2020. V. 101. P. 1090.
11. Jahromi R., Mogharab V., Jahromi H., Avazpour A. // *Food Chem. Toxicol.* 2020. V. 145. P. 111702.
12. Molchanov V.S., Shibaev A.V., Karamov E.V., Larichev V.F., Kornilaeva G.V., Fedyakina I.T., Turgiev A.S., Philippova O.E., Khokhlov A.R. // *Polymers.* 2022. V. 14. P. 2444.
13. Kozhunova E.Y., Komarova G.A., Vyshivannaya O.V., Nasimova I.R., Kuvarina A.E., Sadykova V.S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 4394.
14. Bezrodnykh E.A., Berezin B.B., Kulikov S.N., Zelenikhin P.V., Vyshivannaya O.V., Blagodatskikh I.V., Tikhonov V.E. // *Starch.* 2021. V. 73. P. 2000234.
15. Blagodatskikh I.V., Vyshivannaya O.V., Bezrodnykh E.A., Tikhonov V.E., Orlov V.N., Shabelnikova Y.L., Khokhlov A.R. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 214. P. 192.
16. Rinaudo M. // *Prog. Polym. Sci.* 2006. V. 31. P. 603.
17. Muzzarelli R.A.A. // *Mar. Drugs* 2010. V. 8. P. 292.
18. Janes K.A., Calvo P., Alonso M.J. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2001. V. 47. P. 83.
19. Kabanov A.V., Kabanov V.A. // *Bioconjugate Chem.* 1995. V. 6. P. 7.
20. Spinner J.L., Oberoi H.S., Yorgensen Y.M., Poirier D.S., Burkhart D.S., Plante M., Evans J.T. // *Vaccine.* 2015. V. 33. P. 5845.
21. De Matteis L., Alleva M., Serrano-Sevilla I., Garcia-Embid S., Stepien G., Moros M., de la Fuente J.M. // *Mar. Drugs* 2016. V. 14. P. 175.
22. Philippova O.E., Korchagina E.V. // *Polymer Science A.* 2012. V. 54. № 7. P. 552.
23. Safer A.-M., Leporatti S. // *Int. J. Nanomedicine* 2021. V. 16. P. 8141.
24. Jaber N., Al-Remawi M., Al-Akayleh F., Al-Muhtaseb N., Al-Adham I.S.I., Collier P.J. // *J. Appl. Microbiol.* 2022. V. 132. P. 41.
25. Mori Y., Ono T., Miyahira Y., Nguyen V.Q., Matsui T., Ishihara M. // *Nanoscale Res. Lett.* 2013. V. 8. P. 93.
26. Loufi S.A., Elberry M.H., Farroh K.Y., Mohamed H.T., Faraag A.H.I., Mousa S.A. // *Int. J. Nanomedicine* 2020. V. 15. P. 2699.
27. Pyrk K., Milewska A., Nowakowska M., Szczubialka K., Kaminski K. Pat. EP 2 849 763 B1. 2017.
28. Milewska A., Chi Y., Szczepanski A., Barreto-Duran E., Dabrowska A., Botwina P., Obloza M., Liu K., Liu D., Guo X., Ge Y., Li J., Cui L., Ochman M., Urlik M., Rodziejewicz-Motowidlo S., Zhu F., Szczubialka K., Nowakowska M., Pyrk K. // *J. Virology.* 2021. V. 95. E01622-20.
29. Desbrières J., Martinez C., Rinaudo M. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1996. V. 19. P. 21.
30. Signini R., Campana Filho S.P. // *Polym. Bull.* 1999. V. 42. P. 159.
31. Flint S.J., Racaniello V.R., Rall G.F., Skalka A.M., Enquist L.W. *Principles of Virology.* 4th ed. Washington: ASM Press, 2015.
32. Kalyanasundaram K., Thomas J.K. // *J. Am. Chem. Soc.* 1977. V. 99. P. 2039.
33. Simon M., Veit M., Osterrieder K., Gradzielski M. // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2021. V. 55. P. 101479.
34. Thalberg K., Lindman B., Karlström G. // *J. Phys. Chem.* 1991. V. 95. P. 6004.
35. Piculell L. // *Langmuir.* 2013. V. 29. V. 33. P. 10313.
36. Bezrodnykh E.A., Antonov Y.A., Berezin B.B., Kulikov S.N., Tikhonov V.E. // *Carbohydr. Polym.* 2021. V. 270. P. 118352.
37. Onésippe C., Lagerge S. // *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2008. V. 330. P. 201.
38. Chauhan S., Sharma K. // *J. Chem. Thermodyn.* 2014. V. 71. P. 205.