

Биологически активная композиция пролонгированного действия на основе хитозана и дигидрокверцетина

**И. А. Баранов, Д. Ю. Джонс, А. В. Будруев, А. Е. Мочалова,
Л. А. Смирнова, А. С. Корягин**

Разработан гидрогель на основе хитозана содержащий антиоксидант дигидрокверцетин. Выявлена оптимальная концентрация сшивающего агента, позволяющая получать вязкие текучие гидрогели хитозана, способные пролонгировано выделять дигидрокверцетин. Показано, что в процессе формирования и хранения гидрогеля 86 % дигидрокверцетина сохраняется в нативной форме, наблюдается образование не более 14 % продуктов термоокисления. При этом исходное содержание флавоноида в гидрогеле в 5 раз превышает его растворимость в воде, а выделение дигидрокверцетина из гидрогеля происходит в 4 раза медленнее, чем из раствора хитозана. На экспериментальных животных при пероральном применении показана адаптогенная активность гидрогеля в условиях гипобарической гипоксии.

Ключевые слова: хитозан, дигидрокверцетин, гидрогели, нейрон-специфическая енолаза, свободнорадикальное окисление.

Введение

В настоящее время актуальным является поиск новых эффективных антигипоксических и адаптогенных средств, снижающих интенсивность свободнорадикальных процессов в организме, сопровождающихся образованием активных форм кислорода. Последние в больших количествах образуются при нарушениях работы сердечно-сосудистой системы, легких, системы крови и отравлениях [1 – 3]. Классические синтетические антигипоксанты зачастую обладают симптоматическим действием и имеют побочные эффекты [4]. Перспективными для разработки новых высокоэффективных адаптогенов являются биосовместимые природные полимеры и биологически активные вещества, среди которых следует выделить хитозан и соединения класса флавоноидов [5].

Хитозан — это полностью или частично (более чем на 50 %) деацетилированное производное природного полисахарида хитина (поли[(1→4)-N-ацетил-2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы]), обладающее рядом свойств, привлекательных для

применения во многих областях — от создания биоразлагаемых материалов до фармации и медицины. Существенно, что сырьевые источники данного биополимера являются разнообразными и возобновляемыми [6].

Сочетание биосовместимости хитозана, его способности к биодеградации, биологической активности и высокой эффективности сорбции этого полисахарида на эпителии слизистых оболочек организма определило повышенный интерес к разработке средств доставки лекарств и биологически активных препаратов на его основе [7]. Отдельный интерес вызывает получение материалов на основе хитозана, обладающих ранозаживляющими свойствами [8]. В указанных направлениях могут найти применение гидрогели на основе хитозана, содержащие флавоноиды [9], например дигидрокверцетин (ДГК), который является одним из наиболее сильных антиоксидантов [10], при этом его токсичность и мутагенная активность не выявлены [11, 12]. Кроме того, кверцетины — это витамин P, суточная потребность которого составляет 35 мг. Существуют различные препараты на основе ДГК, которые содержат

другие биологически активные компоненты, но все композиции основаны на использовании этого вещества либо в форме порошка, либо в виде коллоидных дисперсий (эмульсий, суспензий, липосом и мицелл) ввиду его малой растворимости в воде (до 0,1 %) [13, 14]. Следует отметить, что растворимость ДГК снижается в кислой среде, поэтому в указанных препаратах его биодоступность в среде желудка будет пониженной [15].

Цель данной работы — создание композиций хитозана с ДГК в виде растворов и гелей, обладающих повышенной устойчивостью и способных к замедленному высвобождению ДГК, исследование их адаптогенной активности *in vivo* при пероральном применении.

Экспериментальная часть

В работе использовали хитозан (ОАО “Биопрогесс”, п. Биокомбинат, Московская область) с молекулярной массой $1,2 \cdot 10^5$ и степенью деацетилирования 0,82. Молекулярную массу хитозана определяли вискозиметрическим методом на вискозиметре Уббелодде при температуре 21 °С. Расчет проводили по уравнению Марка – Куна – Хаувинка $[\eta] = K \cdot M^\alpha$, $K = 3,41 \cdot 10^{-3}$, $\alpha = 1,02$, растворителем служила смесь 0,33 М уксусной кислоты и 0,3 М NaCl [6].

Дигидрокверцетин (ООО “Локус”, г. Саров) использовали без дополнительной очистки. Содержание основного компонента не менее 95%. В качестве растворителя ДГК использовали 96% этиловый спирт.

Для приготовления растворов хитозана (ХТЗ), содержащих от 0,1 до 0,5 % ДГК, к 3 % раствору ХТЗ в 2 % водной янтарной кислоте (ЯК) добавляли расчетное количество ДГК в этаноле (содержание ДГК в этаноле варьировалось от 1,1 до 5,5 масс. %). В качестве сшивающего агента использовали глутаровый альдегид (ГА). При получении гидрогелей к 3 % раствору ХТЗ в 2 % водной ЯК добавляли при перемешивании расчетное количество 5,5 % раствора ДГК в этаноле. Затем к полученной смеси добавляли 3 % водный раствор ГА из расчета 0,400, 0,500, 0,550, 0,600 и 0,625 % альдегида по отношению к массе хитозана и выдерживали смесь при 70 °С.

Кинетическую вязкость полученных смесей определяли на вискозиметре Гепплера при 21 °С. Расчет проводили по формуле:

$$\eta = t(\rho_1 - \rho_0)k, \quad (1)$$

где t — время прохождения шарика между метками, с; ρ_1 — плотность шарика ($8,14 \text{ г/см}^3$); ρ_0 — плотность смеси ($\approx 1,0 \text{ г/см}^3$), k — коэффициент для данного шарика ($0,120 \text{ (сПз}\cdot\text{см}^3)/(\text{г}\cdot\text{с})$).

Образцы ДГК, растворов ХТЗ, композиций и гидрогелей ХТЗ с ДГК для проведения ИК-спектроскопии сушили до постоянной массы, растирали в порошок и таблетировали с KBr. ИК-спектры регистрировали на спектрофотометре Infracum-FT-801.

С целью проведения хроматографического анализа образцов растворы смесей ХТЗ с ДГК и гидрогелей обрабатывали этиловым спиртом, ХТЗ при этом выделялся в осадок, а ДГК оставался в водно-спиртовом растворе. Осадок ХТЗ отделяли центрифугированием, затем раствор, содержащий ДГК, доводили до известного объема этиловым спиртом. Анализ содержания ДГК выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Shimadzu LC-20, с детектором — диодная матрица и колонкой Supelco Discovery C-18 с градиентным элюированием смесью — этанол : водный раствор фосфорной кислоты (0,01 %), с ее линейным уменьшением от 65,5 % до 0 % за 20 минут и дальнейшим элюированием 25 мин только этанолом. Разделение проводили при температуре 35 °С. Содержание ДГК в анализируемой смеси определяли по заранее построенному калибровочному графику зависимости площади пика анализируемого ДГК от его содержания в пробе на длине волны — 290 нм.

Исследование процесса высвобождения ДГК из его растворов с ХТЗ и гидрогелей в дистиллированную воду через ацетатцеллюлозную мембрану проводили при температуре $37,0 \pm 0,5$ °С. Через определенные отрезки времени отбирали пробы и анализировали содержание в них ДГК. Анализ проводили спектрофотометрическим методом, регистрируя УФ-спектры относительно дистиллированной воды на приборе Shimadzu UV-1650 PC. По калибровочному графику зависимости оптической плотности водного раствора ДГК на длине волны 290 нм от его концентрации определяли количество выделившегося к данному моменту времени ДГК. По полученным данным строили график зависимости концентрации и доли ДГК, выделившегося из геля (раствора) через мембрану в воду, от времени.

Адаптогенную активность полученных гидрогелей исследовали на белых беспородных крысах-самцах массой 200 – 250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Работу с животными проводили согласно приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ “Об утверждении Правил лабораторной практики” (GLP) (23.08.2010 г., № 708-н).

Изучено возникновение резистентности крыс к условиям барометрической гипоксии при предварительном курсовом введении препаратов на 3 опытные и 2 контрольные группы по 5 животных в каждой.

Препараты вводили перорально в течение 5 дней объемом 0,5 мл на животное 1 раз в сутки. Затем животных подвергали тяжелой гипобарической гипоксии при разрежении атмосферного давления 143 мм рт. ст. (условная высота 12000 м) с экспозицией 30 минут. Кроме опытной группы (животным вводили гидрогель хитозан-ДГК: 60 мг/кг хитозана, 10 мг/кг дигидрокверцетина) гипоксии подвергали контрольные группы (животным вводили ДГК — 10 мг/кг, Хитозан — 60 мг/кг) и группу “Тип.12т.м.”, животным которой препараты не вводили. Интактных животных не подвергали никаким воздействиям. Сразу после моделирования состояния гипоксии определяли биохимические показатели в плазме крови исследуемых животных.

Содержание нейрон-специфической енолазы (НСЕ) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа.

Оценку состояния процессов свободнорадикального окисления (СРО) в крови крыс проводили методом железо-индуцированной биохемиллюминесценции. Изучены следующие показатели хемилюминесценции: S — светосумма свечения (отражает содержание радикалов RO_2^* , соответствующих обрыву цепи СРО; на интенсивность этого процесса оказывают влияние вещества, обладающие как антиоксидантным, так и прооксидантным действием); I_{max} — интенсивность максимальной вспышки (отражает потенциальную способность биологического объекта к СРО); $tg2$ — характеризует антиоксидантный потенциал [16].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ EXCEL и Statistica 6.0, согласно рекомендациям по проведению медико-биологической статистики [16].

Результаты представляли в виде $M \pm G$, где M — среднее арифметическое, G — среднеквадратичное отклонение. Достоверность различий определяли по критерию Крускала – Уоллиса. Показатели значений для двух выборок считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Эффективность доставки лекарственных препаратов к месту терапевтического действия при пероральном применении зачастую очень низка из-за их невысокой стабильности в условиях желудочно-кишечного тракта и малой растворимости в водных средах [14]. Решение задачи создания пролонгированных форм таких биологически активных и нестабильных препаратов, и, в частности ДГК, возможно путем их совмещения с экологически

безопасным полимером-носителем класса полисахаридов ХТЗ в растворе и гидрогеле. Однако, необходимо учитывать, что флавоноид плохо растворим в воде и для повышения его растворимости целесообразно использовать смесь этанола-вода, которая в определенном соотношении может вызвать осаждение ХТЗ. Поэтому на первом этапе работы было выявлено оптимальное содержание спирта, обеспечивающее максимальное растворение ДГК в водно-кислых растворах полисахарида без осаждения последнего. Методом УФ-спектроскопии по изменению оптической плотности установлено, что максимальное содержание этанола в растворе ХТЗ, не приводящее к помутнению, составляет 20 % от общей массы раствора. В соответствии с полученными результатами для приготовления смесей и гидрогелей раствор ДГК в спирте вводили в количестве 10 % от массы водно-кислого раствора полисахарида. Полученные композиции, содержащие до $1,6 \cdot 10^{-2}$ моль/л ДГК, обладали устойчивостью при хранении: через две недели наблюдалось появление осадка ДГК, количество которого через полтора месяца не превышало 15% от исходной концентрации ДГК. При этом существенно, что исходное содержание флавоноида в растворе полисахарида в ~ 5 раз превышало его растворимость в воде ($0,33 \cdot 10^{-2}$ моль/л).

С целью создания препаратов, способных эффективно удерживать и пролонгировано выделять гидрофобные молекулы ДГК, были получены гидрогели ХТЗ. В качестве сшивающего агента был использован ГА, что обусловлено его относительной доступностью, а также высокой устойчивостью образующихся ковалентно-сшитых гидрогелей ХТЗ [9, 17]. Оптимальная концентрация сшивающего агента, обеспечивающего значительное увеличение вязкости при сохранении текучести геля, была установлена на основании анализа зависимости вязкости гидрогелей от количества добавленного

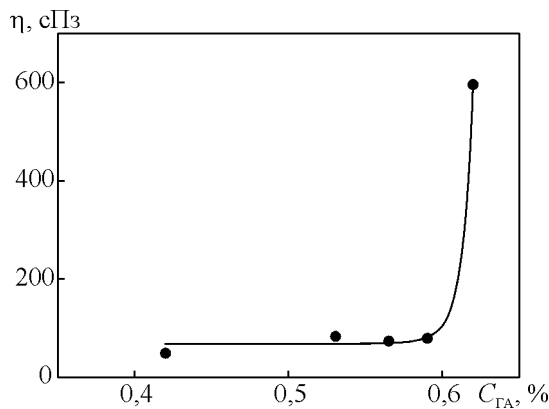


Рис. 1. Зависимость динамической вязкости (η , сПз) гидрогеля ХТЗ от концентрации сшивающего агента (% по отношению к массе ХТЗ).

сшивающего агента (рис. 1). Характерно, что до определенной (критической) концентрации сшивающего агента вязкость гидрогелей не изменялась. При концентрациях ГА свыше $1,8 \cdot 10^{-2} \%$ наблюдалось резкое увеличение вязкости образующихся гидрогелей, при содержании ГА свыше $2,1 \cdot 10^{-2} \%$ происходило формирование нетекучих формоустойчивых гелей. В соответствии с полученными данными было выбрано оптимальное содержание сшивающего агента, которое составило $1,80 \cdot 10^{-2} - 1,95 \cdot 10^{-2} \%$ от массы раствора полисахарида.

Удержание ДГК в гидрогеле ХТЗ может осуществляться под влиянием нескольких факторов. Во-первых, как и в растворе ХТЗ, это взаимодействия между гидрофобными непротонированными участками цепей ХТЗ и ДГК, во-вторых, образование водородных связей ДГК и ХТЗ с участием гидроксильных, карбонильных и аминогрупп, и, кроме того, формирование в геле полимерной сетки, затрудняющей диффузию ДГК в ее пределах. Полученные гидрогели ХТЗ, содержащие ДГК, в силу указанных факторов должны обладать способностью к замедленному высвобождению флавоноида.

Результаты по кинетике диффузии ДГК из гидрогеля и раствора для различных количеств исследуемых образцов с одинаковой исходной концентрацией ДГК через ацетатцеллюлозную мембрану в дистиллированную воду представлены на рис. 2 и 3. Из рисунков видно, что выделение ДГК из гидрогеля происходило в 4 раза медленнее, чем из раствора ХТЗ. Транспорт низкомолекулярного вещества через мембрану может быть в первом приближении описан уравнением:

$$J_s = \frac{D_s K_s}{l} \Delta C_s, \quad (2)$$

где J_s — количество вещества, переносимого в единицу времени через единицу площади поверхности, перпендикулярной направлению переноса, D_s — коэффициент диффузии растворенного вещества, K_s — коэффициент растворимости, l — толщина мембраны, ΔC_s — разность концентраций по обе стороны мембраны.

Поскольку скорость потока определяется разностью концентраций по обе стороны мембраны, то начальные скорости высвобождения ДГК для разных количеств исследуемой смеси с одинаковой исходной концентрацией ДГК совпадают. Расхождение кривых при дальнейшем протекании процесса обусловлено более резким убыванием концентраций в меньшем количестве смеси при одинаковых значениях потока.

Из тангенса угла наклона зависимостей концентраций высвобожденного ДГК от времени для 5 г

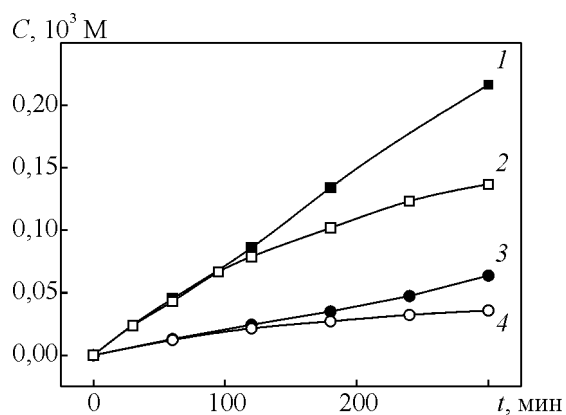


Рис. 2. Зависимости концентраций ДГК в воде (C , моль/л), высвобожденного из исследуемого образца через мембрану от времени (t , мин): 1 и 2 — 5 г и 1 г смеси ХТЗ с ДГК, 3 и 4 — 5 г и 1 г гидрогеля, соответственно. $[ДГК]_0 = 1,6 \cdot 10^{-2}$ моль/л, температура $T = 37,0$ °С. Приведены усредненные данные по пяти экспериментальным сериям со стандартным отклонением не более 4 %.

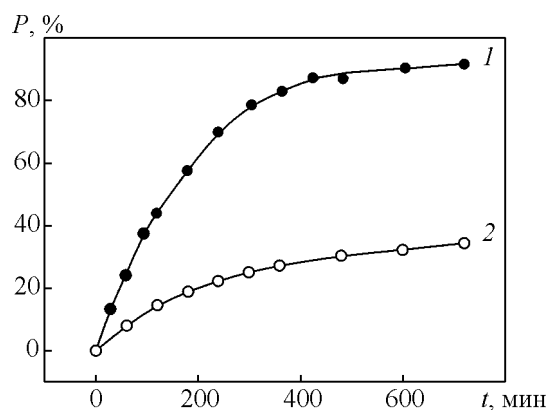


Рис. 3. Зависимости доли выделившегося через мембрану ДГК (P , %) от времени (t , мин): 1 — 1 г раствора ХТЗ с ДГК, 2 — 1 г гидрогеля. $[ДГК]_0 = 1,6 \cdot 10^{-2}$ моль/л, $T = 37,0$ °С. Приведены усредненные данные по пяти экспериментальным сериям со стандартным отклонением не более 4 %.

смеси и 5 г гидрогеля рассчитаны коэффициенты переноса массы (произведение $D_s K_s$), которые составляют $10,8 \cdot 10^{-12}$ и $3,0 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$, соответственно.

Установлено, что при одной и той же начальной концентрации ДГК практически полное высвобождение его из раствора (рис. 3) достигается за 12 ч, в то время как из гидрогеля выделяется всего около 35 % ДГК. Таким образом, в гидрогеле ХТЗ с ДГК по сравнению с растворами время удержания ДГК существенно увеличивается.

Как отмечалось выше, ДГК легко окисляется под воздействием различных окислителей. В связи с этим представлялось целесообразным изучение влияния

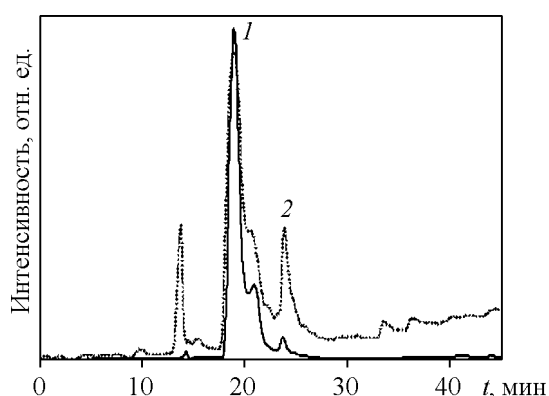


Рис. 4. Хроматограмма фильтратов, полученных при осаждении раствора (1) и гидрогеля (2) ХТЗ с ДГК этанолом.

условий получения гидрогеля (температура 70 °С, водно-спиртовая смесь, рН 4,3, сшивающий агент) на процесс окисления ДГК. Об изменениях ДГК судили по результатам хроматографического и ИК-анализов.

С целью количественного определения изменения содержания ДГК после термообработки из образцов раствора ХТЗ с ДГК и гидрогеля этанолом высаживали полимерную составляющую, после чего фильтраты анализировали методом ВЭЖХ (рис. 4). Установлено, что термообработка приводит к 13–15% уменьшению концентрации ДГК в системе и образованию продуктов термоокисления с временами удержания 13–14 и 24–25 мин. Эти же продукты в меньших количествах содержатся и в исходном ДГК, что свидетельствует об отсутствии побочных реакций ДГК с компонентами гидрогеля.

На ИК-спектрах высушенных образцов раствора ХТЗ с ДГК и ХТЗ в янтарной кислоте наблюдали несущественные смещения максимумов поглощения, соответствующие колебаниям глюкопиранозного цикла (1065–1080 см⁻¹), карбоксильных (1740–1750 см⁻¹) и гидроксильных групп (3100–3300, 3400–3700 см⁻¹), по-видимому, обусловленные образованием водородных связей молекул ДГК и мономерных звеньев ХТЗ. Спектры порошков, полученных из образцов гидрогеля и раствора смеси ХТЗ с ДГК идентичны. Таким образом, можно заключить, что в процессе формирования гидрогеля и его хранения в течение полутора месяцев 86% ДГК остается в нативном виде.

Из полученных данных видно, что формирование трехмерной сетки в гидрогеле ХТЗ позволяет создавать препараты с содержанием ДГК в 5 раз превышающем его растворимость в воде и обеспечивает замедленное высвобождение флавоноида. Это может послужить основой для создания препаратов с

продолжительным действием, что актуально как при применении композиций, обладающих биологической активностью, так и для ранозаживляющих материалов, так как постоянное поступление активного компонента способствует повышению эффективности процесса регенерации тканей [18].

Далее было исследовано корректирующее действие гидрогеля ХТЗ с ДГК на энергетический обмен и антиоксидантные свойства в условиях моделирования тяжелой формы гипоксии у экспериментальных животных при пероральном применении. Гипоксические и ишемические повреждения являются основой или сопутствующими факторами патогенеза многих заболеваний [1]. Снижение уровня поступления кислорода в ткани сопровождается угнетением метаболических процессов, в первую очередь энергетического обмена [2].

Нарушение энергетического метаболизма при гипоксии связано с интенсивностью свободнорадикального окисления (СРО). У животных в условиях гипоксии было установлено увеличение *S* — показателя суммарной активности СРО в крови на 18% (табл. 1). Препараты гидрогель ХТЗ-ДГК и раствор ДГК приводили к изменению интенсивности свободнорадикальных процессов в крови крыс в сторону их снижения относительно контрольной группы животных, подвергавшихся только гипоксическому воздействию. Следует отметить, что оба препарата в отличие от хитозана оказывают выраженное антиоксидантное действие при гипоксии.

Таблица 1

Светосумма свечения хемилюминесценции в плазме крови крыс после гипобарической гипоксии при предварительном пероральном введении препарата

Группа животных	Светосумма свечения <i>S</i>
Интактные	3885,6 ± 262,26
Гипоксия 12 т.м.	4571,8 ± 278,9*
ХТЗ	4412,3 ± 74,2*
ДГК	4095 ± 135,07#
ХТЗ-ДГК	4167,5 ± 153,3#

* — статистически значимо по отношению к интактным ($p \leq 0,05$); # — статистически значимо по отношению к контролю на гипоксию ($p \leq 0,05$).

Головной мозг является наиболее чувствительным к повреждающему действию дефицита кислорода. Увеличение активности СРО в нервной ткани сопровождается дестабилизацией структуры мембран клеток, при этом отмечается выход нейронспецифических энзимов и их изоферментов из поврежденных клеток мозга в кровь. В группе животных, подвергшихся воздействию острой гипоксии, наблюдалось увеличение содержания нейронспецифи-

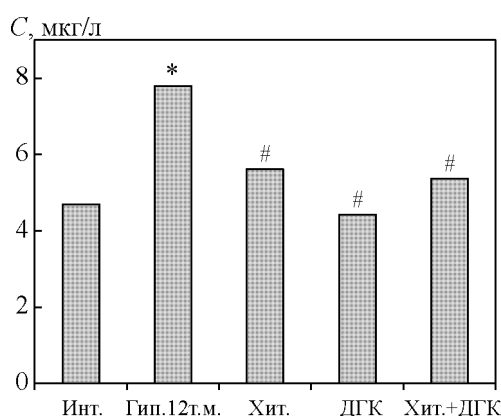


Рис. 5. Концентрация НСЕ (нг/мл) в сыворотке крови крыс после гипобарической гипоксии при предварительном пероральном введении препаратов. * – $p \leq 0,05$ по отношению к интактным; # – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю на гипоксию;

ческой енолазы (НСЕ) на 65 % по отношению к животным в условиях нормы (рис. 5), что показывает глубину и интенсивность структурно-функциональных нарушений биомембран в центральной нервной системе. У опытных животных, получавших препараты гидрогель и ДГК, содержание этого индикаторного фермента в сыворотке крови было ниже группы контроля на гипоксию и не отличалась от его значения у интактных животных. Это может указывать на то, что ДГК проникает через гематоэнцефалический барьер, нейтрализуя радикалы активных форм кислорода, в результате снижая негативное действие на мембраны нервных клеток.

Выводы

ХТЗ оказывает стабилизирующее действие на ДГК. В процессе формирования и хранения гидрогеля до 86 % ДГК остается в нативной форме. Исходное содержание флавоноида в гидрогеле в 5 раз превышает его растворимость в воде ($1,6 \cdot 10^{-2}$ моль/л против $0,33 \cdot 10^{-2}$ моль/л). Кроме того, выделение дигидрокверцетина из гидрогеля происходит в 4 раза медленнее, чем из раствора хитозана, что в сочетании с высокими мукоадгезивными свойствами хитозана обеспечит пролонгированное действие препарата на органы мишени.

На экспериментальных животных при пероральном применении гидрогеля ХТЗ-ДГК показано, что он проявляет специфическую активность — выраженное антигипоксическое действие, вызывающее резистентность организма в условиях дефицита кислорода.

Совокупность полученных результатов может послужить основой для создания новых препаратов

на основе гидрогеля ХТЗ, с повышенным содержанием ДГК и его пролонгированным выделением.

Работа выполнена при поддержке гранта (соглашение от 27 августа 2013г. № 02.В.49.21.0003 между МОН РФ и ННГУ) и частичной поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (код проекта 1537).

Литературы

1. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы гипоксии. Вестник РАМН, 2000, № 9, с. 3 – 12.
2. Рябов Г.А., Палечник И.Н., Азимов Ю.М. Активированные формы кислорода и их роль в некоторых патологических состояниях. Анестезиология и реанимация, 1991, № 1, с. 63 – 69.
3. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1997, № 9, с. 244 – 254.
4. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н., Афанасьева Г.А. Возможности эффективного использования антиоксидантов и антигипоксантов в экспериментальной и клинической медицине. Успехи химии современного естествознания, 2006, № 8, с. 18 – 25.
5. Burda S., Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J Agric Food Chem., 2001, v. 49, no. 6, p. 2774 – 2779.
6. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Prog. Polym. Sci., 2006, v. 31, pp. 603 – 632.
7. Dash M., Chiellini F., Ottenbriteb R.M., Chiellini E. Chitosan — a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Progress in Polymer Science, 2011, v. 36, p. 981 – 1014.
8. Jayakumar R., Prabakaran M., Kumar P.T.S., Nair S.V., Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnology Advances, 2011, v. 29, p. 322 – 337.
9. Hoare T.R., Kohane D.S. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. Polymer, 2008, v. 49, p. 1993 – 2007.
10. Теселкин Ю.О., Жамбалова Б.А., Бабенкова И.В., Клебанов Г.И., Тюкавкина Н.А. Антиоксидантные свойства ДГК. Биофизика, 1996, т. 41, № 3, с. 620 – 624.
11. Jurado J., Alejandro-Duran E., Alonso-Moraga A., Pueyo C. Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the Salmonella Ara test. Mutagenesis, 1991, v. 6, no. 4, p. 289 – 295.
12. Nagao M., Morita N., Yahagi T., Shimizu M., Kuroyanagi M., Fukuoka M., Yoshihira K., Natori S., Fujino T., Sugimura T. Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. Environ. Mutagen, 1981, v. 3, no. 4, p. 401 – 419.
13. Kurth E.F., Chan F.L. Dihydroquercetin as an antioxidant. Journ. Amer. Oil Chem. Soc., 1951, v. 28, no. 10, p. 433 – 436.
14. Григорьев А.М., Евтеев А.В., Смыслов А.П., Смыслов П.А., Цветков М.В. Фосфолипидная эмульсия, включающая дигидрокверцетин, и способ ее получения. Патент РФ № 2369383 от 10.10.2009.

15. Jayakumar R., Prabakaran M., Kumar P.T.S., Nair S.V., Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 2011, v. 29, p. 322 – 337.
16. Murach E.I., Baranov I.A., Erlykina E.I., Koryagin A.S., Mochalova A.E., Smirnova L.A. Adaptogenic effects of dihydroquercetin-chitosan composition during modeling of acute hypoxia. *Bull Exp Biol Med.*, 2014, v. 156, no. 3, p. 306 – 309.
17. Bhattarai N., Gunn J., Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, v. 62, p. 83 – 99.
18. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, 1998, v. 15, no. 9, p. 1326–1331.
8. Jayakumar R., Prabakaran M., Kumar P.T.S., Nair S.V., Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 2011, vol. 29, pp. 322 – 337.
9. Hoare T.R., Kohane D.S. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. *Polymer*, 2008, vol. 49, pp. 1993 – 2007.
10. Teselkin J.O., Zhambalova B.A., Babenkova I.V., Klebanov G.I. Tyukavkin N.A. Antioxydantes svoystva degidrokverticina. [Degidrokvertsetina antioxidant properties.] *Biophysique — Biophysics*, 1996, vol. 41, no. 3, pp. 620 – 624.
11. Jurado J., Alejandro-Duran E., Alonso-Moraga A., Pueyo C. Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the Salmonella Ara test. *Mutagenesis*, 1991, vol. 6, iss. 4, pp. 289 – 295.
12. Nagao M., Morita N., Yahagi T., Shimizu M., Kuroyanagi M., Fukuoka M., Yoshihira K., Natori S., Fujino T., Sugimura T. Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ. Mutagen*, 1981, vol. 3, iss. 4, pp. 401 – 419.
13. Kurth E. F., Chan F.L. Dihydroquercetin as an antioxidant. *Journ. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1951, vol. 28, no. 10, pp. 433 – 436.
14. Grigoriev A.M., Evteev A.V., Smyslov A.P., Smyslov P.A., Tsvetkov M.V. *Phospholipidique emulsia, vkluchashya dihydroquercetin I sposob ee polucheniya* [Phospholipid emulsion comprising dihydroquercetin, and its method of preparation.] Patent RF 2369383 from 10.10.2009.
15. Jayakumar R., Prabakaran M., Kumar P.T.S., Nair S.V., Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 2011, vol. 29, pp. 322 – 337.
16. Murach E.I., Baranov I.A., Erlykina E.I., Koryagin A.S., Mochalova A.E., Smirnova L.A. Adaptogenic effects of dihydroquercetin-chitosan composition during modeling of acute hypoxia. *Bull Exp Biol Med.*, 2014, vol. 156, no. 3, pp. 306 – 309.
17. Bhattarai N., Gunn J., Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, vol. 62, pp. 83 – 99.
18. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical research*, 1998, vol. 15, no. 9, pp. 1326 – 1331.

References

1. Lukyanov L.D. Sovremennye problemy hypoxy [Modern problems of hypoxia]. *Vestnyk RAMN — Bulletin of medical sciences*, 2000, no. 9, pp. 3 – 12.
2. Ryabov G.A., Palechnik I.N., Asimov Y.M. Aktivirovanny formy kisloroda i ich rol v nekotoryx patologicheskix sostoianiyax [Activated oxygen species and their role in certain pathological conditions]. *Anesthesiology i medicina — Medicine anesthesiology and emergency medicine*, 1991, no. 1, pp. 63 – 69.
3. Lukyanov L.D. Bioenergie hypoxie: ponyatie, mehanizmy I sposoby korrektsii [Bioenergy hypoxia: the concept, mechanisms and methods of correction]. *Bulletin experimentale biologii i medicine — Bulletin of experimental biology and medicine*, 1997, no. 9, pp. 244 – 254.
4. Chesnokov N.P., Ponukalina E.V. Bizenkova M.N., Afanasyev G.A. Vozmognosti effektivnogo ispolzovaniya antioxydants et antihypoxants v experimentale i klinique medecine. [Opportunities for effective use of antioxidants and antihypoxants in experimental and clinical medicine]. *Uspexi khimii sovremennogo estestvoznaniya — Russian chemical reviews of modern natural science*, 2006, no. 8, pp. 18 – 25.
5. Burda S., Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem.*, 2001, 49, no. 6, pp. 2774 – 2779.
6. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 2006, vol. 31, pp. 603 – 632.
7. Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E. Chitosan — A versatile semi-synthetic polymer in

Статья поступила в редакцию 15.09.2014 г.

Баранов Иван Андреевич — ФГАОУВО “Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского” (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23), аспирант, специализируется в области химии высокомолекулярных соединений. E-mail: baranoff_ivan@mail.ru.

Джонс Дарья Юрьевна — ФГАОУВО “Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского” (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23), аспирант, специализируется в области фотохимии орто-замещенных ароматических азидов. E-mail: darja.sinjagina@rambler.ru.

Будруев Андрей Владимирович — ФГАОУВО “Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского” (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23), кандидат химических наук, доцент, специалист в области орто-замещенных ароматических азидов. E-mail: budruev@gmail.com.

Мочалова Алла Евгеньевна — ФГАОУВО “Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского” (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23), кандидат химических наук, доцент, специалист в области химии высокомолекулярных соединений. E-mail: mochalova_ae@mail.ru.

Смирнова Лариса Александровна — ФГАОУВО “Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского” (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23), доктор химических наук, профессор, специалист в области химии высокомолекулярных соединений. E-mail: smirnova_la@mail.ru.

Корягин Александр Сергеевич — ФГАОУВО “Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского” (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23), доктор биологических наук, профессор, специалист в области физиологии и биохимии животных и растений. E-mail: smirnova_la@mail.ru.

Long-acting bioactive composition based on chitosan and taxifolin

**I. A. Baranov, D. Yu. Dzhones, A. V. Budruev, A. E. Mochalova,
L. A. Smirnova, A. S. Koryagin**

Developed a hydrogel based on chitosan containing antioxidant dihydroquercetin. The optimal concentration of cross-linking agent, which allows to obtain a viscous liquid chitosan hydrogels capable of prolonged select dihydroquercetin. It is shown that in the process of forming the hydrogel most dihydroquercetin remains unchanged, there is education not more than 14% of the products of thermal oxidation. The original content of the flavonoid in the hydrogel 5 times greater than its solubility in water. The selection of dihydroquercetin of the hydrogel occurs 4 times slower than from a solution of chitosan. In experimental animals oral administration is shown adaptogenic activity of hydrogel in hypobaric hypoxia.

Keywords: chitosan, taxifolin, hydrogels, neuron-specific enolase, free radical oxidation.

Baranov Ivan A. — Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod (23 Prospekt Gagarina (Gagarin Avenue), Nizhny Novgorod, 603950, Russia), postgraduate, specialist in the field of macromolecular chemistry. E-mail: baranoff_ivan@mail.ru.

Dzhons Daria Yu. — Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod (23 Prospekt Gagarina (Gagarin Avenue), Nizhny Novgorod, 603950, Russia), postgraduate, specialist in the field of photochemistry orto-substituted aryl azides. E-mail: darja.sinjagina@rambler.ru.

Budruev Andrei V. — Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod (23 Prospekt Gagarina (Gagarin Avenue), Nizhny Novgorod, 603950, Russia), PhD, specialist in the field of photochemistry orto-substituted aryl azides. E-mail: budruev@gmail.com.

Mochalova Alla E. — Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod (23 Prospekt Gagarina (Gagarin Avenue), Nizhny Novgorod, 603950, Russia), PhD, specialist in the field of macromolecular chemistry. E-mail: mochalova_ae@mail.ru.

Smirnova Larisa A. — Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod (23 Prospekt Gagarina (Gagarin Avenue), Nizhny Novgorod, 603950, Russia), DrSci (che.), specialist in the field of macromolecular chemistry. E-mail: smirnova_la@mail.ru.

Koryagin Alexandr S. — Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod (23 Prospekt Gagarina (Gagarin Avenue), Nizhny Novgorod, 603950, Russia), DrSci (bio.), specialist in the field physiology and biochemistry of plants and animals. E-mail: smirnova_la@mail.ru.