

ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

doi: 10.51639/2713-0568_2024_4_2_33

УДК 543.424

ГРНТИ 29.31.27

ВАК 01.04.05

Оценка состава биоматериалов на основе бактериальной целлюлозы с добавлением клотримазола с помощью оптических методов

^{1,2*} Тимченко Е. В., ^{1,2} Тимченко П. Е., ¹ Алехин М. С., ¹ Кленова Н. А., ¹ Писарева Е. В.,
¹ Фролов О. О., ^{1,2} Власов М. Ю.

¹ Самарский университет, г. Самара

² Самарский государственный медицинский университет, г. Самара

e-mail: * laser-optics.timchenko@mail.ru, timpavel@mail.ru, alekhin.misha@inbox.ru,
klenova.na@ssau.ru, pella1@rambler.ru, frolov679@mail.ru, mvasov1@rambler.ru

В данной работе представлены результаты исследования по оценке состава двух форм комбинированного материала на основе бактериальной целлюлозы с помощью Рамановской спектроскопии. В результате проведенных исследований было установлено, что спектральные отличия образцов биоцеллюлозы с клотримазолом и без наблюдаются во всем исследуемом спектральном диапазоне от 800-1800 см⁻¹. При смешивании клотримазола и пектина спектры КР бактериальной целлюлозы становятся более сглаженными (1000 см⁻¹ – 1262 см⁻¹, а также 1420-1747 см⁻¹), что может свидетельствовать о том, что связь пектина и клотримазола могло повлиять на осаждение лекарственного средства в слое пленки бактериальной целлюлозы. С помощью микроскопического анализа были выявлены изменения структуры бактериальной целлюлозы при добавлении клотримазола, которые проявляются в хаотичном распределении гранул БЦ посредством накопления частиц клотримазола. Установлено, что полученные результаты позволят в дальнейшем проводить контроль состава образцов на основе биоцеллюлозы с добавлением клотримазола в разных концентрациях для последующего применения в тканевой инженерии при высвобождении лекарственных средств.

Ключевые слова: клотримазол, микроскопический анализ, Рамановская спектроскопия, спектры комбинационного рассеяния, бактериальная целлюлоза.

Введение

В последнее время значительно возрос интерес к биodeградируемым материалам. Дальнейшее развитие получило использование биоразлагаемых полимерных материалов для фармакологических применений, таких как средства доставки для контролируемого/продолжительного высвобождения лекарств [1]. Одним из таких материалов является бактериальная целлюлоза. Бактериальная целлюлоза (БЦ) представляет собой биополимер, который производится разными типами бактерий. Она способствует стимуляции клеточной адгезии, что приводит к более быстрому заживлению ран в регенеративной медицине. Комбинированные материалы на основе бактериальной

биоцеллюлозы могут быть использованы в различных медицинских направлениях, таких как: заживление ран; тканевая инженерия; доставка лекарств; сращивание хрящевой ткани и т. д. Контроль состава биоматериалов является актуальной задачей, т. к. влияет на их приживляемость.

В качестве основных методов оценки биоматериалов могут быть использованы оптические методы, так как являются быстродейственными и не деструктивными методами анализа [2–4]. Так, в работе авторов [5] клотримазол и пектин рассматривались как компоненты для полиэлектролитных комплексов, которые представляют собой трехмерные структуры, созданные противоположно заряженными полиионами, объединёнными обратимыми электростатическими взаимодействиями и поддерживаемыми водородными и/или гидрофобными силами.

В работе [6] авторы синтезировали гели на основе противогрибковой системы ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом. С помощью Рамановской спектроскопии для подтверждения наличия тиольных групп были получены линии: 1729 см^{-1} для $\nu\text{C=O}$; 1417 см^{-1} и 1282 см^{-1} для νCH_2 ; 938 см^{-1} за счёт $\nu\text{C-O-C}$. А также с помощью ИК спектроскопии был изучен химический состав полученных гелей. Образцы показали сильную полосу поглощения при $1721\text{--}1726\text{ см}^{-1}$, обусловленную валентными колебаниями C=O ($\nu\text{C=O}$).

Целью данной работы является оценка состава биоматериалов на основе бактериальной целлюлозы с добавлением клотримазола с помощью оптических методов.

Материалы и методы

В данной работе были исследованы материалы на основе бактериальной целлюлозы (БЦ) с добавлением пектина и клотримазола. Образцы были поделены на две группы:

1. Гель бактериальной целлюлозы с добавлением клотримазола и пектина.
2. Гель бактериальной целлюлозы с добавлением клотримазола.

Для получения БЦ культивировали ацетобактерии, которые были получены из культуры *Medusomycesgisevii* путём клонирования с посевом из разведения 1:100000 на агаризованную среду HS (HestrinSchramm, 1954). Далее гели бактериальной целлюлозы промывались проточной водой и помещались в раствор 0,1N NaOH на сутки при комнатной температуре для удаления оставшихся клеток бактерий. Промывку водой повторяли и помещали в 0,5 %-ный раствор HCl на сутки при комнатной температуре, затем снова промывали проточной, а затем дистиллированной водой до нейтрального значения pH и хранили в 70 %-ном этиловом спирте в пластиковой посуде при температуре от 25 до 27 °C.

После получения геля бактериальной целлюлозы, она была замочена в растворе клотримазола концентрацией 250 мкг/мл.

Исследуемые образцы изучались с помощью двух оптических методов: метода спектроскопии комбинационного рассеяния и метода конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния подробно описан в работе [7] и реализован с помощью экспериментального стенда, включающего в себя высокоразрешающий цифровой спектрометр AndorShamrock sr-303i со встроенной охлаждаемой камерой DV420A-OE, волоконно-оптический зонд для спектроскопии комбинационного рассеяния RPB785, совмещённый с лазерным модулем LuxxMaster LML-785.0RB-04 (с регулируемой мощностью до 500 мВт, длина волны 785 нм). Дальнейшая математическая обработка спектров КР проводилась с помощью программы RS-Tool [8].

Метод конфокальной микроскопии был реализован с помощью стенда на базе конфокального оптического микроскопа Olympus IX 71 («Olympus», Япония) и лазерного комбайна (фирма ANDOR). Стенд обеспечивал два режима работы: режим конфокальной микроскопии в видимом свете и режим лазерной флуоресценции. В качестве источника излучения использовалась галогеновая лампа[9].

Результаты

На рис.1. представлены усреднённые спектры КР по исследуемым группам. В таблице приведена расшифровка линий КР бактериальной целлюлозы.



Рис. 1. Усреднённые спектры комбинационного рассеяния двух исследуемых групп: 1 – Гель бактериальной целлюлозы с добавлением клотримазола и пектина (оранжевым цветом); 2 – Гель бактериальной целлюлозы с добавлением клотримазола (фиолетовый цвет).

Расшифровка линий КР бактериальной целлюлозы [10–11].

Волновое число, см ⁻¹	Тип колебания
830	$\nu(\text{COH})$ ring пектин
1088	$\nu(\text{COC})$ glycosidic, assymetric целлюлоза
1120	$\nu(\text{COC})$ glycosidic, symmetric целлюлоза
1032	$\delta(\text{CCC})$ ring 1, ring 2 + $\delta(\text{CH})$ ring 1, ring 2 клотримазол
1262	νCH_2 клотримазол
1420	$\nu(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2$ целлюлоза
1555	HCH scissoring bending целлюлоза
1747	$\nu(\text{C}=\text{O})$ ester целлюлоза

Проведённый анализ бактериальной целлюлозы с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния показывает, что спектральные изменения между двумя исследуемыми группами наблюдаются во всем исследуемом спектральном диапазоне от 800 до 1800 см⁻¹.

Наиболее значимые различия проявляются на линии КР ~800 см⁻¹ (вклад воды). Данная линия КР наблюдается в группе образцов биоцеллюлозы с добавлением клотримазола без пектина (группа 2). Это видимо связано с тем, что при добавлении пектина вода сгущается, поэтому в спектрах группы 1 данная линия отсутствует.

При смешивании клотримазола и пектина спектры КР бактериальной целлюлозы становятся более сглаженные (1000 см^{-1} – 1262 см^{-1} , а также $1420\text{--}1747\text{ см}^{-1}$), что может свидетельствовать о том, что связь пектина и клотримазола могло повлиять на осаждение лекарственного средства в слое плёнки бактериальной целлюлозы.

Далее на рисунке 2 представлены результаты микроскопического анализа исследуемых объектов.

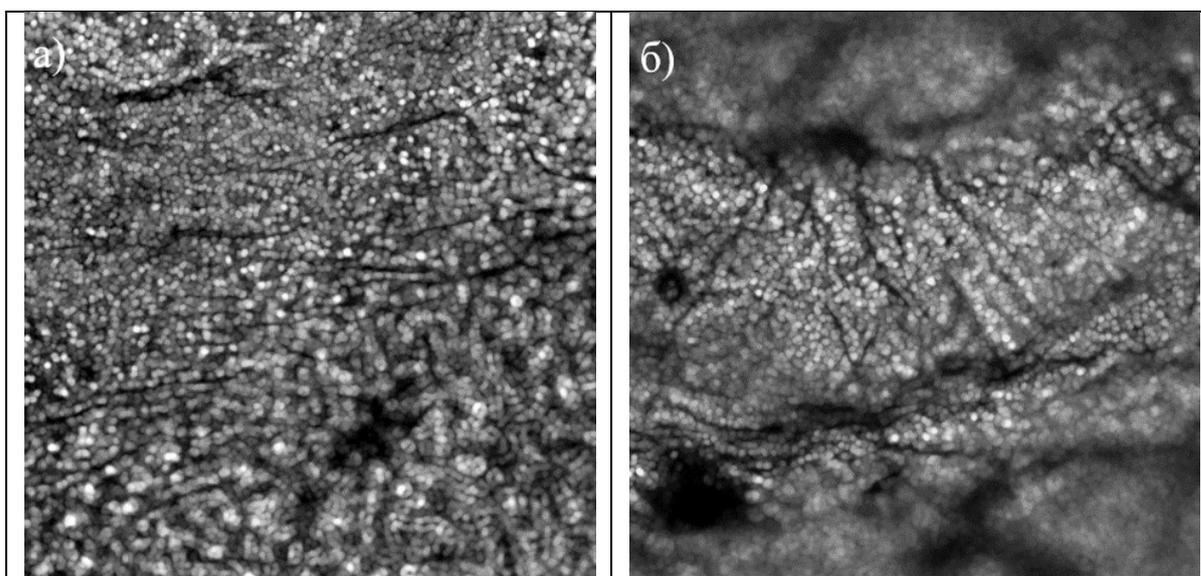


Рис. 2. Микроснимки бактериальной целлюлозы с добавлением клотримазола, полученные с помощью конфокальной микроскопии: а) Группа 1 – Гель бактериальной целлюлозы с клотримазолом и добавлением пектина; б) Группа 2 – Гель бактериальной целлюлозы с клотримазолом без пектина. Увеличение 400×400 мкм.

На рис. 2 представлены микрофотографии образцов высушенных гелей бактериальной целлюлозы с добавлением клотримазола и пектина (рис. 2,а) и без добавления пектина(рис. 2,б). Добавление пектина привело к формированию крупных гранул БЦ (рис. 2,а). Сами образцы имеют частично зернистую структуру, при этом добавление клотримазола привело к хаотичному распределению гранул бактериальной целлюлозы, что может свидетельствовать о накоплении частиц клотримазола.

Заключение

С помощью спектрального анализа были получены спектральные отличия образцов биоцеллюлозы с клотримазолом и без, которые наблюдались во всем исследуемом спектральном диапазоне от $800\text{--}1800\text{ см}^{-1}$. При смешивании клотримазола и пектина спектры КР бактериальной целлюлозы становятся более сглаженные ($1000\text{--}1262\text{ см}^{-1}$, а также $1420\text{--}1747\text{ см}^{-1}$), что может свидетельствовать о том, что связь пектина и клотримазола могло повлиять на осаждение лекарственного средства в слое пленки бактериальной целлюлозы.

С помощью микроскопического анализа выявлены изменения структуры бактериальной целлюлозы при добавлении клотримазола, которые проявляются в хаотичном распределении гранул БЦ посредством накопления частиц клотримазола.

Полученные результаты позволят в дальнейшем проводить контроль состава образцов на основе биоцеллюлозы с добавлением клотримазола в разных концентрациях для последующего применения в тканевой инженерии при высвобождения лекарственных средств.

Конфликт интересов

Авторы статьи заявляют, что у них нет конфликта интересов по материалам данной статьи с третьими лицами, на момент подачи статьи в редакцию журнала, и им ничего не известно о возможных конфликтах интересов в настоящем со стороны третьих лиц.

Список литературы

1. Isabela Reiniati, Dr. Andrew N. Hrymak. Bacterial Cellulose Nanocrystals : Production and Application // Electronic Thesis and Dissertation Repository. [Электронный ресурс]. URL: https://ir.lib.uwo.ca/etd/4826?utm_source=ir.lib.uwo.ca%2Fetd%2F4826&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages (21.08.2017).
2. Мкртычев О.В., Привалов В.Е., Фотиади А.Э., Шеманин В.Г. Лазерная абляция нанокompозитов // Научно-Технические Ведомости СПбПУ. Физико-математические науки. 2015. № 1 (213). С. 128-135.
3. Долгих Г.И., Привалов В.Е. Лазерная физика. Фундаментальные и прикладные исследования // Издательство "Рея". Владивосток. 2016. 351 с.
4. Лактюшкин Г.В., Привалов В.Е., Шеманин В.Г. Параметры зондирования молекул водорода // ЖТФ.1998.Т. 58, № 1, С. 20-22.
5. Joanna Potaś, Emilia Szymańska- Multilayer Films Based on Chitosan /Pectin Polyelectrolyte Complexes as Novel Platforms for Buccal Administration of Clotrimazole // Pharmaceutic.Vol. 13. Issue 10. [Электронный ресурс]. URL: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101588> (30.09.2021).
6. Казыбаева Д.С. Создание новых биodeградируемых материалов для доставки лекарственных веществ // Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, 2022.
7. P. E. Timchenko, E. V. Timchenko, L. T. Volova, M. A. Zybin, O. O. Frolov, and G. G. Dolgushov. Optical Assessment of Dentin Materials // Optical Memory and Neural Networks, 2020, Vol. 29, No. 4, P. 354–357.
8. Timchenko P.E., Timchenko E.V., Volova L.T., Frolov O.O. Use of Raman spectroscopy for the assessment of dentin materials during their fabrication // Journal of Optical Technology. 2021. Vol. 88. Issue 9. P. 485-488.
9. Zaharov V.P., Timchenko E.V., Timchenko P.E., Zolotuhina A.D., Alembekov S.V. Alteration of hydrosphere optical properties by synthetic active compounds // Computer Optics. 2011 - 35 (2).P. 238-242.
10. Monika Chylińska, Monika Szymańska-Chargot & Artur Zdunek. Imaging of polysaccharides in the tomato cell wall with Raman microspectroscopy // PlantMethods. Vol. 10. № 14. [Электронный ресурс]. URL: <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-10-14> (29.05.2014).
11. M. Todica, C. V. Pop, Luciana Udrescu, Traian Stefan. Spectroscopy of a Gamma Irradiated Poly (Acrylic Acid)-Clotrimazole System // Chinese Physics Letters. Vol. 28. № 12. [Электронный ресурс].URL: <https://cpl.iphy.ac.cn/10.1088/0256-307X/28/12/128201> (18.03.2011).

Evaluation of the composition of biomaterials based on bacterial cellulose with the addition of clotrimazole using optical methods

^{1,2*} Timchemko E. V., ^{1,2} Timchenko P. E., ¹ Alekhin M. S., ¹ Klenova N. A., ¹ Pisareva E. V.,
¹ Frolov O. O., ^{1,2} Vlasov M. Y.

¹ Samara university, Samara

² Samara state medical university, Samara

e-mail: * laser-optics.timchenko@mail.ru, timpavel@mail.ru, alekhin.misha@inbox.ru,
klenova.na@ssau.ru, pella1@rambler.ru, frolov679@mail.ru, mvasov1@rambler.ru

This paper presents the results of a study to evaluate the composition of two forms of a combined material based on bacterial cellulose using Raman spectroscopy. As a result of the conducted studies, it was found that spectral differences between samples of biocellulose with and without clotrimazole are observed throughout the studied spectral range from 800-1800 cm^{-1} . When clotrimazole and pectin are mixed, the RAMAN spectra of bacterial cellulose become more smoothed (1000 cm^{-1} – 1262 cm^{-1} , as well as 1420-1747 cm^{-1}), which may indicate that the bond of pectin and clotrimazole could affect the deposition of the drug in the bacterial cellulose film layer. Microscopic analysis revealed changes in the structure of bacterial cellulose with the addition of clotrimazole, which manifest themselves in the chaotic distribution of BC granules through the accumulation of clotrimazole particles. It was found that the results obtained will allow further control of the composition of samples based on biocellulose with the addition of clotrimazole in different concentrations for subsequent use in tissue engineering during the release of drugs.

Keywords: clotrimazole, microscopic analysis, Raman spectroscopy, Raman spectra of clotrimazole, bacterial cellulose.

References

1. Isabela Reiniati, Dr. Andrew N. Hrymak. Bacterial Cellulose Nanocrystals: Production and Application // Electronic Thesis and Dissertation Repository. [Электронный ресурс]. URL: https://ir.lib.uwo.ca/etd/4826?utm_source=ir.lib.uwo.ca%2Fetd%2F4826&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages (21.08.2017).
2. Mkrtychev O.V., Privalov V.E., Fotiadi A.E., Shemanin V.G. Nanocomposites laser ablation studies // Scientific and Technical Bulletin of St. Petersburg Polytechnic University. Physical and mathematical sciences. 2015. № 1 (213). P. 128-135.
3. Dolgikh G.I., Privalov V.E. Lazernaya fizika. Fundamental'nye i prikladnye issledovaniya // Izdatel'stvo "Reya". Vladivostok. 2016. 351 s.
4. Laktyushkin G.V., Privalov V.E., Shemanin V.G. Parametry zondirovaniya molekul vodoroda // ZHTF.1998. T. 58, № 1, S. 20-22.
5. Joanna Potaś, Emilia Szymańska- Multilayer Films Based on Chitosan /Pectin Polyelectrolyte Complexes as Novel Platforms for Buccal Administration of Clotrimazole // Pharmaceutic. Vol.

13. Issue 10. [Электронный ресурс]. URL: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101588> (30.09.2021).
6. Kazybaeva D.S. Sozdanie novykh biodegradiruemykh materialov dlya dostavki lekarstvennykh veshchestv // Kazakhskii natsional'nyi universitet imeni al'-Farabi, Almaty, 2022.
7. P. E. Timchenko, E. V. Timchenko, L. T. Volova, M. A. Zybin, O. O. Frolov, and G. G. Dolgushov. Optical Assessment of Dentin Materials // Optical Memory and Neural Networks, 2020, Vol. 29, No. 4, P. 354–357.
8. Timchenko P.E., Timchenko E.V., Volova L.T., Frolov O.O. Use of Raman spectroscopy for the assessment of dentin materials during their fabrication // Journal of Optical Technology. 2021. Vol. 88. Issue 9. P. 485-488.
9. Zaharov V.P., Timchenko E.V., Timchenko P.E., Zolotuhina A.D., Alembekov S.V. Alteration of hydrosphere optical properties by synthetic active compounds // Computer Optics. 2011 - 35 (2).P. 238-242.
10. Monika Chylińska, Monika Szymańska-Chargot & Artur Zdunek. Imaging of polysaccharides in the tomato cell wall with Raman microspectroscopy // PlantMethods. Vol. 10. № 14. [Электронный ресурс]. URL: <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-10-14> (29.05.2014).
11. M. Todica, C. V. Pop, Luciana Udrescu, Traian Stefan. Spectroscopy of a Gamma Irradiated Poly(Acrylic Acid)-Clotrimazole System//Chinese Physics Letters. Vol. 28. № 12. [Электронный ресурс].URL: <https://cpl.iphy.ac.cn/10.1088/0256-307X/28/12/128201> (18.03.2011).