

УДК 615.918

Цитотоксические и иммунохимические свойства вискумина, инкапсулированного в полилактидные микрочастицы

Е. С. Колотова^{1*}, С. Г. Егорова¹, А. А. Рамонова¹, С. Э. Богородский², В. К. Попов², И. И. Агапов³, М. П. Кирпичников¹

¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

²Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, 142190, Троицк Моск. обл., ул. Пионерская, 2

³ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздравсоцразвития РФ, 123182, Москва, ул. Щукинская, 1

*E-mail: ekaterinakolotova@mail.ru

Поступила в редакцию 28.09.2011 г.

РЕФЕРАТ Методом сверхкритической флюидной инкапсуляции с использованием ультразвука получены биорезорбируемые полилактидные микрочастицы с инкапсулированным белковым цитотоксином вискумином. По данным электронной микроскопии, размер частиц составил от 10 до 50 мкм. Кинетика высвобождения вискумина из микрочастиц была изучена в иммуноферментной тест-системе с использованием антивискуминовых моноклональных антител. Показано, что в полимерные микрочастицы включается 99.91% добавленного в реакционную смесь цитотоксина. В течение 120 ч инкубации микрочастиц в фосфатно-солевом буфере с нейтральным значением pH высвободилось 0.08% от первоначально инкапсулированного белка. Анализ цитотоксической активности и иммунохимических свойств инкапсулированного вискумина показал, что метод «сухой» сверхкритической флюидной инкапсуляции с использованием ультразвука не влияет на биологические свойства вискумина и может использоваться для получения биodeградируемых полилактидных микрочастиц-носителей с включенными в них биологически активными веществами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биodeградируемые микрочастицы, вискумин, полилактид.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СКФ – сверхкритический флюидный; ск-СО₂ – сверхкритическая двуокись углерода; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ТМБ – тетраметилбензидин; МСГ – магнитно-стрикционный генератор; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; БСА – бычий сывороточный альбумин; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид; ЛД₅₀ – доза токсина, вызывающая гибель 50% клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Вискумин – рибосом-инактивирующий лектин, содержится в экстрактах листьев растения омела белая. Вискумин состоит из двух субъединиц А и В, связанных дисульфидной связью и имеет молекулярную массу 60 кДа [1, 2]. Вискумин активно используется в противоопухолевой терапии и находит в этой области все более широкое применение [3–6]. Эффективность действия вискумина можно увеличить, если заключить его в биорезорбируемые полимерные микрочастицы, что обеспечит его химическую и пространственную стабилизацию, а также пролонгированный выход в окружающие ткани организма и, как следствие, более длительное воздействие токсина на опухолевые клетки.

Полилактиды представляют собой класс биорезорбируемых полимеров, относящихся к гомологическому ряду алифатических полиэфиров, которые находят все более широкое применение в биомедицине и фармацевтике [7]. Полилактид – это полимер молочной кислоты, которая, имея асимметрично расположенные атомы углерода (рис. 1), легко образует оптически активные циклические димеры (лактиды), полимеризующиеся, как и гликолиды, в результате каталитического раскрытия 1,4-диоксановых колец.

Полилактид является более гидрофобным соединением по сравнению с полигликолидом, поскольку содержит метильные группы. Он легче растворяется и в органических растворителях. Поскольку мономер молочной кислоты существует

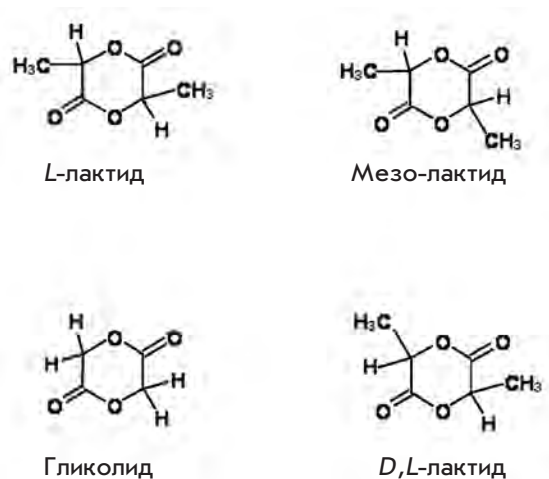


Рис. 1. Циклические димеры для синтеза алифатических полиэфиров.

в двух стереохимических формах, возможен синтез четырех морфологически различных полилактидов: двух стереорегулярных полимеров – поли(*D*-лактида) и поли(*L*-лактида); полимеризованной смеси *D*- и *L*-молочных кислот – поли(*D,L*-лактида); поли(мезо-лактида) – смеси *D*- и *L*-лактидов. Полимеры, синтезированные только из оптически активной *D*- или *L*-молочной кислоты, являются поликристаллическими, в то время как оптически неактивные поли(*D,L*-лактиды) – аморфные. Это обстоятельство весьма важно для практического использования, поскольку скорость гидролиза данных соединений (определяющая кинетику их биорезорбции в живом организме) обратно пропорциональна степени их кристалличности. Гликолид – более простое соединение, которое существует только в одной форме. Идентичность каталитической реакции раскрытия колец гликолидов и лактидов позволяет проводить их сополимеризацию с образованием высокомолекулярных сополимеров – полилактогликолидов, существенно расширяя круг биорезорбируемых синтетических материалов с различными биохимическими и механическими свойствами.

Способность алифатических полиэфиров к постепенному биологическому разложению в организме используется как для временной защиты активных молекул или лекарственных средств от быстрого расщепления различными ферментами и пептидами, так и для их адресной доставки в определенные клетки, ткани и органы, а также для контроля скорости высвобождения этих молекул из полимерной матрицы, обеспечивая более длительное терапевтическое воздействие [7]. С этой целью лекарственное

средство инкапсулируют в полимерный носитель и вводят в организм с помощью инъекций или перорально [8, 9]. Метод «сухой» сверхкритической флюидной (СКФ) инкапсуляции может успешно использоваться для включения различных биологически активных веществ (ферментов, пептидов, белков и лекарственных средств) в полимерные микрочастицы практически без потери их физико-химических и биологических свойств [10–12]. Это отличает СКФ-инкапсуляцию от других методов, применение которых подразумевает использование высоких температур (до 100°C и выше) и токсичных органических растворителей, которые достаточно трудно удалить из готового продукта [10]. Сверхкритическая двуокись углерода (ск-СО₂) позволяет проводить инкапсуляцию биоактивных компонентов в различные типы аморфных полимеров без использования жидких растворителей при температуре, близкой к комнатной, и умеренном давлении (критические параметры для СО₂ – $T_{кр} = 31^\circ\text{C}$, $P_{кр} = 7.4$ МПа). Ск-СО₂ легко и практически без остатка удаляется из полимера простым сбросом давления ниже критического значения [13].

Ранее [11] нами были проведены первые модельные эксперименты по СКФ-инкапсуляции вискумина в полилактидные микроматрицы. Как оказалось, время выхода вискумина можно регулировать при помощи изменений условий СКФ-инкапсуляции, что, в принципе, позволяет создавать препараты пролонгированного действия с определенной кинетикой высвобождения активного вещества из полимерного носителя.

В представленной работе изучены иммунохимические и цитотоксические свойства вискумина после его высвобождения из микрочастиц, полученных тем же методом, но с использованием ультразвука. Ультразвук позволил получить более плотные частицы мелкого размера (10–50 мкм).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вискумин был любезно предоставлен проф. У. Пфюллером (Институт фитохимии, Университет Виттен-Хердеке, Германия). В качестве исходного биорезорбируемого полимера использовали *D,L*-полилактид PURASORB PDL 02 (производство «PURAC Biochem bv», Нидерланды) с молекулярной массой $M_w \sim 20000$. Диоксид углерода марки «ос. ч.» (99.99%) производства Балашихинского кислородного завода (Московская обл., Россия) использовали без дополнительной очистки. Использовали также сухой фосфатно-солевой буфер (ФСБ, «Flow Laboratories», Великобритания), двухкомпонентный комплект реагентов для субстратной смеси на основе тетраметилбензидина для иммуноферментного анализа (ТМБ)

и конъюгат стрептавидин-пероксидаза («Имтек», Россия); полистироловые плашки («Costar», США). Моноклональные антитела MNA4 и MNA9-биотин против разных эпитопов А-субъединицы вискумина были получены нами ранее [14, 15]. Все остальные реактивы производства «Sigma-Aldrich Corp.» (США).

Инкапсуляция вискумина в полилактидные микрочастицы

Инкапсуляцию вискумина в полилактидный носитель проводили на экспериментальной установке, подробно описанной в [16]. Ее основное отличие от оборудования, примененного ранее [11], состояло в использовании мощного (до 1 кВт) ультразвукового (18 ± 0.2 кГц) воздействия на систему полимер/вискумин, находящуюся непосредственно в атмосфере CO_2 . Конструктивно этот подход реализовали с помощью магнитно-стрикционного генератора (МСГ) с акустическим концентратором и титановым индуктором, введенным в реакционную камеру высокого давления.

Процесс формирования биоактивных микрочастиц проходил в следующей последовательности. В реакционную камеру высокого давления загружалось 0.1 г порошкообразного полилактида (характерный размер частиц 100–200 мкм), полученного из предварительно механически измельченных исходных полимерных гранул (диаметром $\sim 3 \div 4$ мм), и 1 мг порошка лиофилизированного вискумина. Камеру уплотняли и в нее подавали CO_2 комнатной температуры до достижения давления 5 МПа. После этого включались нагреватели камеры и сопла. Температура камеры, как правило, составляла 40°C, а температура сопла изменялась от 40 до 80°C. По мере разогрева камеры давление в ней увеличивалось. При достижении требуемой температуры давление в камере доводили до заранее выбранной величины – $10 \div 20$ МПа. Затем включался блок питания и управления МСГ, мощность которого изменялась в пределах от 0.1 до 1.0 кВт. Для формирования установившегося режима СКФ-пластификации полимерной смеси с вискумином в реакторе систему выдерживали при этих условиях примерно 30 мин. После этого с помощью импульсного клапана через сопло диаметром 0.5 мм производился импульсный сброс пластифицированной смеси и диоксида углерода в приемную камеру.

После выдерживания полученного продукта в приемной камере в атмосферных условиях в течение 3 ч (необходимого для полного удаления CO_2 из частиц полимера и их окончательного затвердевания), собранные микрочастицы помещали в стеклянные пробирки объемом 1.5 мл и хранили при температуре +4°C до их дальнейшего анализа.

Сканирующая электронная микроскопия

Морфологию поверхности полимерных микрочастиц с вискумином, инкапсулированным с помощью CO_2 , изучали с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе LEO 1450 («Carl Zeiss», Германия). Для этого небольшое количество исследуемого порошка наносили на проводящую (углеродную) клейкую ленту, на которую затем методом плазменного напыления наносили тонкую (~ 0.05 – 0.1 мкм) пленку золота, обеспечивающую требуемую электропроводность.

Исследование кинетики выхода вискумина из полилактидных микрочастиц

Сухой порошок полилактидных микрочастиц (16.5 мг), содержащих вискумин, суспендировали в 2 мл ФСБ, суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 12100 g и отбирали супернатант. Оставшиеся частицы полилактида снова суспендировали в 2 мл ФСБ и перемешивали на качалке при 22°C. Супернатант отбирали и вносили очередную порцию ФСБ через 10, 30, 60, 120, 360, 1440, 2880 и 7200 мин соответственно. Полученные образцы хранили при +4°C.

Анализ количества вискумина, высвободившегося при деградации полилактидных микрочастиц

Количество вискумина в образцах (т.е. в супернатанте, отобранном в разные временные точки) определяли с использованием модифицированной тест-системы, описанной ранее [14, 15]. На 96-луночный планшет сорбировали моноклональные антитела MNA4 против вискумина в концентрации 10 мкг/мл в ФСБ по 100 мкл на лунку. Инкубировали в течение 24 ч при +4°C. Три раза отмывали раствором, содержащим 20 ммоль/л лактозы и 0.05% Твин-20 в ФСБ. Чтобы блокировать свободные сайты связывания полистироловой поверхности, в каждую лунку вносили по 100 мкл буфера, содержащего 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 20 ммоль/л лактозы и 0.05% Твин-20 в ФСБ. Инкубировали в течение 1 ч при 37°C, вновь отмывали 3 раза и вносили по 100 мкл исследуемых образцов, содержащих вискумин в разных разведениях. В качестве контроля использовали вискумин в различных концентрациях. Инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Наносили меченные биотином моноклональные антитела MNA9 против вискумина в концентрации 2 мкг/мл. Инкубировали в течение 1 ч при 37°C, отмывали 3 раза, после чего инкубировали (1 ч, 37°C) с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза и отмывали 5 раз. Проявляли с помощью субстратного буфера ТМБ в течение 20 мин при 37°C. Реакцию останавливали 10% серной кислотой по 50 мкл на лунку. Колориметрические изме-

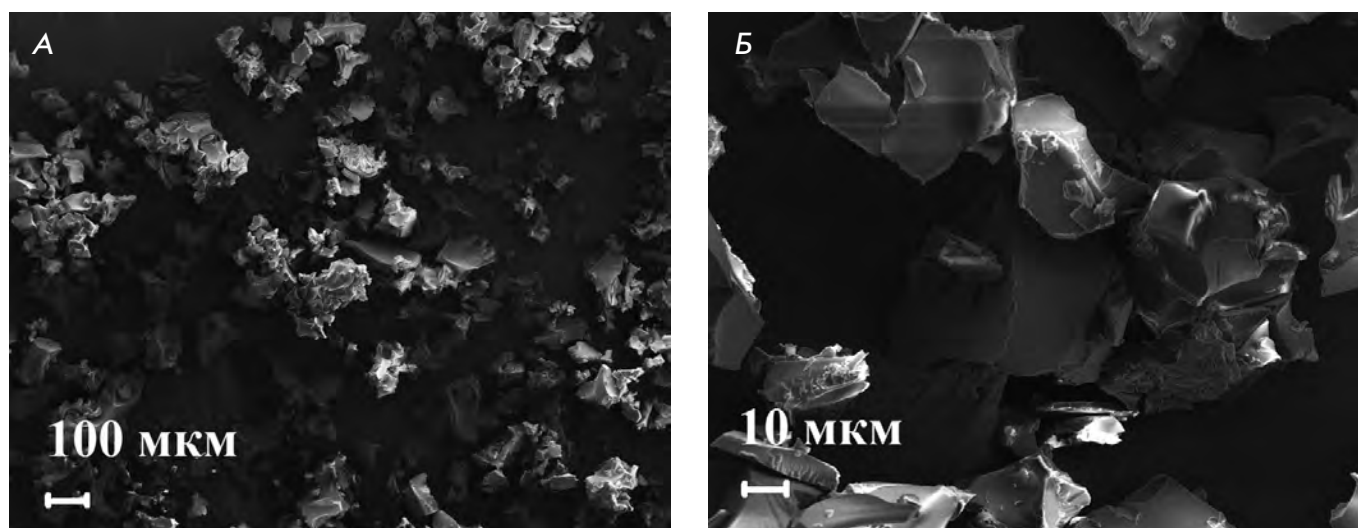


Рис. 2. Электронные микрофотографии полилактидных микрочастиц, содержащих вискумин. А – общий вид, Б – детальная структура.

рения проводили при 450 нм на спектрофотометре Multiskan® PLUS-314.

Количество вискумина, включившегося в микро-частицы, определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа по схеме, описанной выше. Для этого был проведен полный гидролиз образца полилактидных микрочастиц при 42°C в течение 48 ч (5 мг образца в 10 мл ФСБ).

Оценка цитотоксических свойств вискумина после его выхода из полилактидных микрочастиц

Цитотоксическую активность вискумина, высвободившегося из биополимерных микрочастиц, определяли с помощью МТТ-теста по методике, описанной ранее [17, 18]. Для оценки выживаемости клеток определяли дозу токсина (вискумина), вызывающую гибель 50% клеток (LD_{50}). В качестве контроля использовали вискумин, не подвергавшийся инкапсуляции. При расчете LD_{50} за 100% принимали интенсивность окрашивания клеток, культивируемых в отсутствие цитотоксического агента. Приведены данные одного из трех типичных опытов в виде $LD_{50} \pm$ стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлены характерные СЭМ-микрофотографии экспериментальных образцов после их выемки из приемной камеры СКФ-установки. Видно, что образцы состоят как из индивидуальных микрочастиц размером от 10 до 50 мкм, так и из их агломератов (до 200 мкм). При этом сами полилактидные микрочастицы представляют собой плотные

объемные частицы неправильной формы с довольно гладкой поверхностью.

Использование мощного ультразвукового воздействия дало возможность не только добиться более однородного перемешивания исходных компонентов (вискумина и полилактида), но также существенно снизить вязкость пластифицированного в ск-СО₂ полимера за счет введения дополнительной акустической энергии в систему. Совокупность этих факторов привела к кардинальному изменению режима последующего диспергирования полученной смеси в приемную камеру атмосферного давления, что, в свою очередь, резко изменило морфологию образующихся биоактивных полимерных структур.

Так в [11], при использовании в аналогичных условиях только магнитного смесителя происходило формирование полилактидных волокнистых матриц, состоящих из пористых микрочастиц неправильной формы размером от 50 до 200 мкм. В то же время применение интенсивного акустического воздействия привело к образованию плотных индивидуальных микрочастиц с характерным размером от 10 до 50 мкм.

Для определения количества вискумина в образцах использовали тест-систему на основе моноклональных антител MNA4 и MNA9-биотин против вискумина, описанную ранее [14, 15]. Эта система позволяет специфически определять вискумин и имеет предел чувствительности около 0.8 нг/мл. С помощью данной тест-системы мы оценили общее количество вискумина в образце полилактидных частиц весом 5 мг. Эта величина оказалась равной 50 мкг, что со-

ставляет 1 вес.% и равно количеству вискумина, подвергнутому инкапсуляции. Это может указывать на сохранность антигенной структуры белка после инкапсуляции.

Логично предположить, что на поверхности микро-частиц мог остаться и неинкапсулированный вискумин. Для удаления несвязавшегося вискумина дважды производили отмывку 16.5 мг микро-частиц в ФСБ (временные точки 0 и 10 мин). Количество вискумина в данных пробах составило 0.145 мкг, т.е. 0.09% от количества токсина, подвергнутого инкапсуляции. Таким образом, количество инкапсулированного вискумина составило 99.91%. Количество вискумина, вышедшего из полилактидных микро-частиц, в интервале от 0 до 120 ч отражено на рис. 3А и 3Б.

Из рис. 3Б видно, что с увеличением времени инкубации количество токсина в супернатантах уменьшается. Это говорит о медленной деградации полимерных микро-частиц с постепенным высвобождением вискумина. Увеличение количества вискумина в супернатантах в точках 360 и 1440 мин можно объяснить более длительной инкубацией, в течение которой большее количество токсина выходит из распавшегося полимера. Кроме того, начиная с 2880 мин выход вискумина происходит более медленно. Вероятно, такая кинетика выхода токсина связана со структурой полилактидных микро-частиц, т.е. внутри микро-частицы, возможно, плотнее, чем снаружи. Суммарно (за вычетом количества вискумина, обнаруженного в пробах после первых двух отмывок) за 120 ч из полилактидной матрицы высвободилось 0.134 мкг вискумина, что составило 0.08% от первоначально инкапсулированного.

Вискумин – представитель группы инактивирующих рибосомы белков 2-го типа, он может использоваться для удаления эукариотических клеток-мишеней [19–21]. При помощи МТТ-теста показано, что вискумин сохраняет цитотоксическую активность после выхода из полилактидных микро-частиц. Цитотоксическая активность вискумина в супернатантах остается практически такой же, как у токсина, который не подвергался обработке: концентрация нативного вискумина, приводящая к гибели 50% клеток линии 3Т3 (LD_{50}), через 48 ч составляет $7 \times 10^{-12} \pm 3 \times 10^{-12}$ М, при этом LD_{50} вискумина в анализируемых образцах составила $7 \times 10^{-12} \pm 2 \times 10^{-12}$ М.

Важно отметить, что, изменяя режимы СКФ-инкапсуляции и распыления пластифицированной полимерной смеси, можно в достаточно широких пределах варьировать морфологию поверхности и внутренней структуры формируемых полимерных микро-частиц (от высокопористых до практически монолитных), что определяющим образом будет сказываться на кинетике высвобождения из них био-

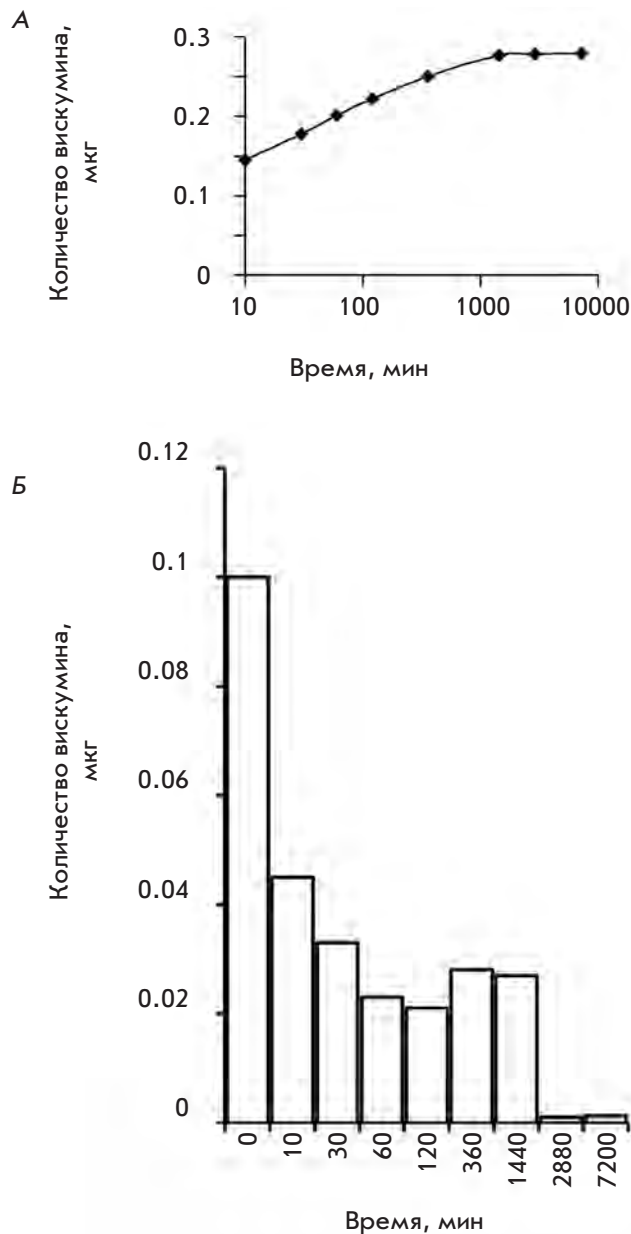


Рис. 3. Кинетика выхода вискумина из полилактидных микро-частиц. А – суммарное количество вискумина в супернатантах. Б – количество вискумина, выделенное из микро-частиц, в зависимости от времени инкубации.

активных компонентов. Полученные нами результаты наглядно демонстрируют этот факт. Так, в работе [11], полилактидные структуры, содержащие вискумин, представляли собой агломераты пористых частиц (характерный коэффициент пористости 20–25%) неправильной формы, в отличие от плотных микро-частиц с гладкой поверхностью, полученных

в настоящей работе (рис. 2А и 2Б). Соответственно и кинетика его выхода из этих структур в аналогичных условиях (сuspендирование в ФСБ, медленное перемешивание на качалке при 22°C, отбор проб после двух отмывок, а также через 30, 60, 120, 360, 1440, 2880 и 7220 мин) кардинально отличалась от приведенной на рис. 3А.

Вискумин может быть использован в противоопухолевой терапии [22]. Использование биосовместимых, биодegradуемых систем с медленным высвобождением вискумина достаточно перспективно. Снижение размера биодegradуемых микрочастиц с вискумином и/или с другим специфическим противоопухолевым цитотоксином позволяет использовать менее травматичное введение препарата посредством инъекций в область роста опухоли.

Метод «сухой» сверхкритической флюидной инкапсуляции с использованием ультразвука не влия-

ет на цитотоксические и иммунохимические свойства вискумина, заключенного в полилактидные микрочастицы. Разработанный метод инкапсуляции обеспечивает постепенный выход инкапсулированного токсина из микрочастиц, что может обеспечивать более длительное терапевтическое воздействие. ●

Работа осуществлялась при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» по Государственному контракту № П 407 от 12.05.2010 и № 14.740.11.0461 01.10.2010, а также на средства Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 09-02-00173 и 11-02-12185).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barbieri L., Battelli M.G., Stirpe F. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1154. P. 237–282.
2. Niwa H., Tonevitsky A.G., Agapov I.I., Saward S., Pfuller U., Palmer R.A. // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 2739–2749.
3. Park R., Kim M.S., So H.S., Jung B.H., Moon S.R., Chung S.Y., Ko C.B., Kim B.R., Chung H.T. // *Biochem. Pharmacol.* 2000. V. 60. P. 1685–1691.
4. Grossarth-Maticek R., Ziegler R. // *Arzneimittelforschung.* 2007. V. 57. P. 665–678.
5. Moisenovich M., Tonevitsky A., Maljuchenko N., Kozlovskaya N., Agapov I., Volkmandt W., Bereiter-Hahn J. // *Histochem. Cell Biol.* 2004. V. 121. № 6. P. 429–439.
6. Moisenovich M., Tonevitsky A., Agapov I., Niwa H., Seme H., Bereiter-Hahn J. // *Eur. J. Cell Biol.* 2002. V. 81. P. 529–538.
7. Биосовместимые материалы / Ред. Севастьянов В.И., Кирпичников М.П. М.: МИА, 2011. 537 с.
8. Kumar P.S., Saini T.R., Chandrasekar D., Yellepeddi V.K., Ramakrishna S., Diwan P.V. // *Drug Deliv.* 2007. V. 14. P. 517–523.
9. Graves R.A., Poole D., Moiseyev R., Bostanian L.A., Mandal T.K. // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2008. V. 34. P. 419–426.
10. Howdle S.M., Watson M.S., Whitaker M.J., Popov V.K., Davies M.C., Mandel F.S., Wang J.D., Shakesheff K.M. // *Chem. Commun.* 2001. P. 109–110.
11. Хапчаев Ш.Ю., Агапов И.И., Мойсенович М.М., Рамонова А.А., Богородский С.Э., Мусаэлян И.С., Попов В.К. // *Биотехнология.* 2008. Т. 5. С. 43–49.
12. Антонов Е.Н., Богородский С.Э., Фельдман Б.М., Марквичева Е.А., Румш Л.Д., Попов В.К. // *Сверхкритические флюиды: теория и практика.* 2008. Т. 3. С. 34–42.
13. Гумеров Ф.М., Сабирзянов А.Н., Гумерова Г.И. *Суб- и сверхкритические флюиды в процессах переработки полимеров.* Казань: ФЭН, 2000. 320 с.
14. Tonevitsky A.G., Agapov I., Temiakov D., Moisenovich M., Maluchenko N., Solopova O., Würzner G., Pfueller U. // *Arzneimittelforschung.* 1999. V. 49. P. 970–975.
15. Темяков Д.Е., Агапов И.И., Мойсенович М.М. // *Молекуляр. биология.* 1997. Т. 31. С. 536–541.
16. Баграташвили В.Н., Богородский С.Э., Коновалов А.Н., Кубышкин А.П., Новицкий А.А., Попов В.К., Уптон К., Хоудл С.М. // *Сверхкритические флюиды: теория и практика.* 2007. Т. 2. № 1. С. 53–60.
17. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. P. 55–63.
18. Agapov I.I., Tonevitsky A.G., Maluchenko N.V., Moisenovich M.M., Bulah Y.S., Kirpichnikov M.P. // *FEBS Lett.* 1999. V. 464. P. 63–66.
19. Knopf-Sidler F., Viviani A., Rist L., Hensel A. // *Pharmazie.* 2005. V. 60. P. 448–454.
20. Urech K., Buessing A., Thalman G., Schaefermeyer H., Heusser P. // *Anticancer Res.* 2006. V. 26. P. 3049–3055.
21. Zuzak T.J., Rist L., Eggenschwiler J., Grotzer M.A., Viviani A. // *Anticancer Res.* 2006. V. 26. P. 3485–3492.
22. Schoffski P., Breidenbach I., Krauter J., Bolte O., Stadler M., Ganser A., Wilhelm-Ogunbiyi K., Lentzen H. // *Eur. J. Cancer.* 2005. V. 41. P. 1431–1438.