

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ С ВКЛЮЧЕНИЕМ ЦИТОСТАТИКА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ

Горшенев В.Н., Ольхов А.А., Яковлева М.А., Телешев А.Т., Акатов В.С.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

e-mail: gor@sky.chph.ras.ru

Аннотация. Проведено предварительное исследование по созданию биоматериалов на основе поли-3-оксибутирата, включающих цитостатик. Образцы поли-3-оксибутирата, содержащие лекарственную форму изготавливались двумя способами. Совмещением компонентов в хлороформе под действием ультразвука с последующей микроволновой сушкой образцов или сушкой с использованием метода электроформования. Показано, что образцы поли-3-оксибутирата, включающие цитостатик – эндоксан (циклофосфамид), независимо от способа их получения, проявляют токсичность по отношению к клеткам аденокарциномы толстой кишки человека. Установлено, что для пленки, полученной согласно первому способу, эндоксан переходит в буферный раствор незначительно и по большей части за первые трое суток. В противоположность этому, лекарственное вещество, введенное в волокно поли-3-оксибутирата, в раствор переходит эффективнее, достигая по времени максимума концентрации примерно на порядок быстрее.

Ключевые слова: биоматериал, цитостатик, электроформование, аденокарцинома.

THE BIODEGRADED MATERIAL WITH INCLUDING THE CYTOSTATICS FOR REPLACEMENT OF DEFECTS OF THE BONE TISSUE

Gorshenev V.N., Olkhov A.A., Yakovleva M.A., Teleshev A.T., Akatov V.S.

Institute of biochemical physics of N.M. Emanuel of RAS

Kosygin St., 4, Moscow, 119334, Russian Federation

e-mail: gor@sky.chph.ras.ru

Abstract. The preliminary research on creation of biomaterials on the basis of poly-3-oxybutyrate, the including cytostatics is conducted. Exemplars poly-3-oxybutyrate, containing a dosage form were made in two ways. Combination of components in chloroform under the influence of ultrasound with the subsequent microwave drying of exemplars or drying with use of a method of electroformation. It is shown that exemplars poly-3-oxybutyrate, the including cytostatics – endoksan (cyclophosphamidum), irrespective of a way of their receiving, show toxicity in relation to cages of an adenocarcinoma of a colon of the person. It is established what for the film received according to the first way эндоксан passes into a buffered solution slightly and mostly for the first three days. Contrary to it, the medicinal substance injected into fiber poly-3-oxybutyrate passes into solution more effectively, reaching on concentration maximum time approximately much quicker.

Key words: biomaterial, cytostatics, electroformation, adenocarcinoma.

Природные биodeградируемые полимеры создают конкурентную альтернативу синтетическим полимерам таким, как полиэтилен полипропилен [1]. Благодаря удачному сочетанию биосовместимости и способности к биоразложению они широко используются в различных медицинских материалах и изделиях, предназначенных для имплантирования. Эти полимеры, как правило, нетоксичны, сырьевые ресурсы их производства возобновляемы, и, главное, продукты их распада не оказывают отрицательного воздействия на организм [2-6]. Известно, что по сравнению с другими распространенными биodeградируемыми полиэфирами (полилактид, полигликолид или их сополимерами) представители полиоксиалканоев разлагаются в организме с более низкой скоростью и поэтому риск интоксикации продуктами биodeградации, накапливаемыми вблизи имплантата, для данного класса полимеров существенно ниже [7]. Среди полиоксиалканоев своей доступностью привлекает поли-3-оксибутират (ПОБ). Использование ПОБ, в виде сополимеров с 3-оксивалератом [8], 3-оксигексаноатом [7], 3-оксиоктаноатом [9] позволяет получать материалы с улучшенными механическими и термическими свойствами, расширяя тем самым спектр их использования и, соответственно изделий медицинского назначения [1]. Другой важной социально значимой задачей по направлению создания новых материалов медицинского назначения является создание материалов на основе биodeградируемых полимеров с включением лекарственных форм для адресного лечения заболеваний. При этом в процессе биоразложения полимерного тела лекарственное вещество выходит постепенно, снижая риск передозировки, обеспечивая длительное воздействие на пораженную ткань. Основная трудность состоит в подборе условий приготовления такого полимера с равномерно размещенным лекарственным препаратом и обеспечение постепенного выхода лекарства в окружающую среду.

Цель настоящей работы состояла в изготовлении пористых биоматериалов на основе ПОБ, включающих цитостатик и исследовании кинетики выхода лекарства из материала в процессе биodeградации.

Материалы и методы.

В работе использовали порошкообразный ПОБ немецкой фирмы «Biomer». В качестве лекарственного препарата был выбран эндоксан - производитель «Baxter Oncology GmbH». Активным началом эндоксана является циклофосфамид. Циклофосфамид метаболизируется под действием микросомальной оксидазной

системы, образуя активные алкилирующие метаболиты, часть которых транспортируется в клетки, где под влиянием фосфатаз превращаются в метаболиты, обладающие цитотоксическим действием [10].

Образцы ПОБ, содержащие лекарственную форму, препятствующую развитию новообразований, изготавливались двумя способами. В первом способе: 7%-ный раствор ПОБ в хлороформе смешивался с цитостатиком – эндоксаном. Смешение осуществлялось в условиях ультразвукового воздействия частотой 22 кГц, с генерируемой мощностью излучателя 100 Вт. Высушивание образца проводилось под действием микроволнового излучения (800 Вт, частотой 2,4 ГГц). Образец композиции наносился на диэлектрическую тефлоновую подложку в форме дорожки глубиной 1мм и шириной 10 мм и растворитель удалялся (образец 1). Во втором способе синтеза образца ПОБ, содержащего лекарственную форму, использовалось электроформование (ЭФВ) - метод получения химических волокон и нетканых волокнистых материалов. Процесс ЭФВ осуществляли на опытной лабораторной однокапиллярной установке ЭФВ-1 (Россия). Напряжение на электроде составляло 12 кВ. Расстояние между электродами 18 см. Формование осуществляли на подложку из нетканого полипропиленового материала. Формовочный раствор ПОБ готовили в хлороформе с содержанием полимера 7% и эндоксана до 5 масс.% (образец 2).

Выход эндоксана, а точнее циклофосфамида, из пленок двух типов оценивали по интенсивности поглощения на длине волны 216 нм. Для лекарства была сделана серия контрольных разведений, для построения калибровочной зависимости оптической плотности от концентрации циклофосфамида. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 в кювете на 3 мл с длиной оптического пути 1 см. В качестве раствора сравнения выступал фосфатный буфер pH=7,4 с добавлением азида натрия (0,2 г/100мл). Для проведения спектрального анализа точную навеску пленок образцов помещали в фосфатный буфер pH=7,4 с добавлением азида натрия (0,2 г/100мл) и выдерживали в термостате определенное время при 37 °С. Затем снимали спектр поглощения, а раствор снова помещали в термостат. Изучение экспериментальных образцов в условиях *in vitro* проводили с использованием клеток аденокарциномы толстой кишки человека, линия НСТ 116. Клетки культивировали в питательной среде DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 80 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США), при 37°С, в условия 5% содержания углекислого газа в воздухе. Для проведения экспериментов *in vitro* клетки высевали плотностью 1×10^4 клеток/см² на поверхность лунок в планшетах, половина площади которых была покрыта экспериментальным материалом. Через 24 ч и 72 ч от момента посева клеток проводили изучение цитотоксического действия материалов.

Цитотоксический тест проводили с помощью окрашивания клеток флуоресцентными красителями кальцеином АМ (окрашивает живые клетки) и йодидом пропидия (окрашивает погибшие клетки). Клетки окрашивали в среде DMEM/F12 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, содержащей 1 мкг/мл кальцеина АМ и 1 мкг/мл йодида пропидия, в течение 25 мин при 37°С. Анализ живых и погибших клеток осуществляли прямым подсчетом клеток в поле зрения, с использованием флуоресцентной моторизованной микроскопической станции NikonEclipseTiE (Nikon, Япония), для анализа подсчитывали не менее 500 клеток.

Результаты опытов представляли в виде среднего \pm стандартная ошибка ($M \pm SEM$). Опыты проводили не менее чем в трех повторах ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с использованием критерия Манна-Уитни.

Результаты.

Показано, что для достаточно плотной пленки, полученной согласно первому способу, циклофосфамид выходит в буферный раствор по большей части за 3 сут, а затем наблюдается лишь незначительное колебания его концентрации. В противоположность этому, лекарственное вещество, введенное в волокно ПОБ, в раствор переходит быстрее, достигая максимума концентрации приблизительно через 24 сут (см. табл. 1).

Таблица 1 – Зависимость концентрации циклофосфамида в буферном растворе от способа формирования материала ПОБ

Экспозиция, сут	Концентрация циклофосфамида в буферном растворе, моль/л	
	Пленка ПОБ (образец 1)	Волокно ПОБ (образец 2)
0	0	0
1	0.006	0.004
3	0.015	0.018
6	0.008	0.025
8	0.008	0.029
13	0.005	0.063
15	0.001	0.066
17	0.001	0.067
24	0.002	0.078
31	0.004	0.070

Культивирование клеток аденокарциномы в присутствии образца пленки ПОБ (образец 1), покрывающего половину площади культурального сосуда через 3 сут приводит к деградации клеток, отсутствию их распластанных форм, пикнотизации ядер (см. рис. 1б). Флуоресцентная микроскопия. позволяет наблюдать небольшие везикулы окрашенные кальцеином, которые с большой вероятностью (с учетом пикноза ядер клеток) указывают на апоптотическую клеточную гибель. Культивирование клеток в присутствии образца 2, покрывающего половину площади культурального сосуда через 3 сут приводит к деградации клеток, отсутствию их распластанных форм, пикнотизации ядер, (см. рис. 1в). Согласно наблюдениям, проведенным с помощью флуоресцентной микроскопии ситуация подобна той, что иллюстрирована рис. 1б. Однако в этом случае все-таки наблюдаются выживание малой части клеток и это позволяет предполагать, что токсичность образца 2 менее выражена, чем образца пленки 1. С другой стороны, эти изменения не столь существенны, их сложно оценить, а по сути обе пленки, включающие эндоксан, проявляют токсичность, которая отчетливо наблюдается уже за первые 3 сут культивирования. Для пленки образца 1 число живых клеток относительно контроля не превышало 1%, для пленки образца 2 - 2%. Это согласуется с примерно одинаковым выходом эндоксана из пленок образцов 1 и 2 в первые 3 сут (см. табл. 1).

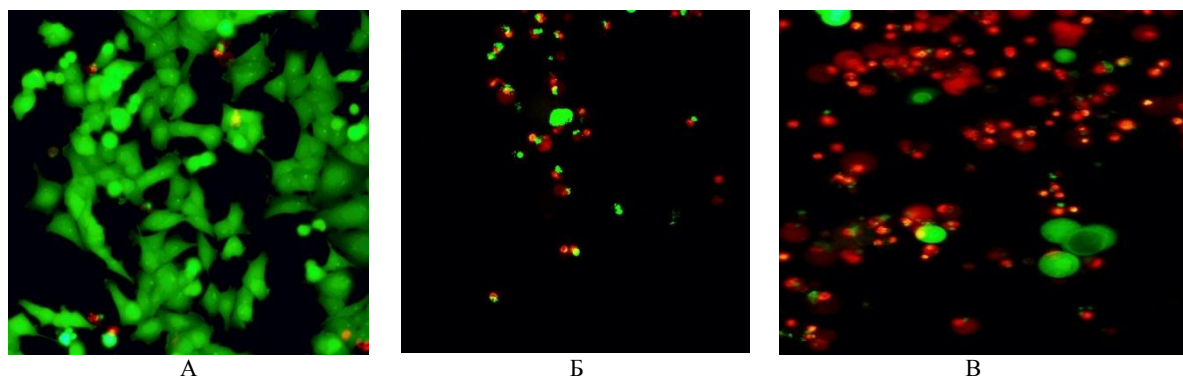


Рисунок 1 – Флуоресцентная микроскопия. А – контроль, распластанные на дне культурального флакона клетки, Зеленым цветом (кальцеином) окрашена цитоплазма живых клетки. Редкие фрагменты ДНК погибших клеток, окрашенные пропидиум иодидом, указывают на высокую жизнеспособность клеток аденокарциномы, Б – микрофотография клеток в присутствии фрагмента образца 1, В - микрофотография культуры клеток через 3 сут после посева в присутствии фрагмента образца 2

Заключение.

Таким образом, образцы ПОБ, включающие эндоксан (циклофосфамид) (независимо от способа их получения) проявляют токсичность по отношению к клеткам аденокарциномы толстой кишки человека, линия НСТ 116, что указывает на возможность их использования при имплантации, для постепенного введения в организм данного лекарственного препарата.

Список литературы / References:

1. Босхомджиёв А.П., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Багров Д.В., Филатова Е.В., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А. Сравнительное изучение кинетики биodeградации биополимерных систем на основе поли-3-оксибутирата. *Биомедицинская химия*, 2009, т. 55, № 6, с. 625-635. [Boskhomdzhiev A.P., Bonartsev A.P., Makhina T.K., Myshkin V.L., Ivanov E.A., Bagrov D.V., Filatova E.V., Jordanian A.L., Bonartsev G.A. Comparative studying of kinetics of biodegradation of biopolymer systems on the basis of poly-3-oxubutyrate. *Biomeditsinskaya khimiya*, 2009, vol. 55, no. 6, pp. 625-635. (In Russ.)]
2. Bonartsev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Zaikov G.E. Biodegradation and medical application of microbial poly(3-hydroxybutyrate). *Polym. Res. J.*, 2008, vol. 2, pp. 127-160.
3. Williams D. The proving of polyhydroxybutyrate and its potential in medical technology. *Medical Device Technology*, 2005, vol. 16, pp. 9-10.
4. Chen G.Q., Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, iss. 33, pp. 6565-6578.
5. Lenz R.W., Marchessault R.H. Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 2005, vol. 6, pp. 1-8.
6. Anderson A.J., Dawes E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, 1990, vol. 54, pp. 450-472.
7. Wu Q., Zhang K.Y., Chen G.Q. In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and tissue reactions. *Biomaterials*, vol. 27, pp. 3540-3548.
8. Miller N.D., Williams D.F. On the biodegradation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly- β -hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers. *Biomaterials*, 1987, vol. 8, pp. 129-137.
9. Foster L.J.R., Sanguanchaipaiwong V., Gabelisha C.L., Hookc J., Stenzel M. A natural-synthetic hybrid copolymer of polyhydroxyoctanoate-diethylene glycol: biosynthesis and properties. *Polymer*, 2005, vol. 46, pp. 6587-6594.

10. Thangabalan B., Harini A.L., Manohar Babu S. Spectrophotometric estimation of cyclophosphamide in capsule dosage form. *Thangabalan B et al.*, 2015, vol. 5, pp. 36-37.

РАЗНОНАПРАВЛЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ШУНГИТА НА РОСТ ПЛАНКТОННЫХ ОРГАНИЗМОВ В ПРИСУТСТВИИ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ И СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

Даллакян Г.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Ленинские горы, 1, корп. 12, г. Москва, 119991, РФ

e-mail: honaris@bk.ru

Аннотация. Исследована эффективность токсического действия синглетного кислорода на культуру водорослей *Sc. quadricauda*. При наличии в среде шунгита 100г/л защита от токсического действия синглетного кислорода на водоросли происходит в течении всего времени роста культуры. Концентрация шунгита 100г/л без эозина стимулирует рост культуры, при концентрации более 200г/л замедляет. В аквариумной воде при добавлении антибиотиков численность бактерии снизилась в 12 раз. При наличии шунгита и антибиотиков численность бактерии снизилась только в 1,7 раз по сравнению с исходными значениями. В присутствии только шунгита в среде рост культуры стимулируется. Шунгит в зависимости от концентрации может быть использован в качестве стимулятора роста микроорганизмов и как протектор от токсикантов. Совместное действие шунгита сульфата меди и сульфата кадмия на ракообразных показало, что шунгит в минимальной из пяти исследованных концентраций 0,01 г/л оказывал защитное действие на дафний. При высоких концентрациях шунгита дафнии погибали, и шунгит не защищал их от действия токсикантов. Таким образом, в зависимости от концентрации шунгит может стимулировать рост водных организмов, инактивировать токсическое действие различных соединений и вместе с тем в больших концентрациях тормозить развитие гидробионтов. Поэтому при выборе шунгита для очистки питьевой воды с большой осторожностью надо относиться к широко рекламируемым, но не прошедшим необходимых клинических испытаний в лабораторных условиях препаратов.

Ключевые слова: Шунгит, водоросли, бактериопланктона, фуллерен, Дафнии магна, эффективность фотосинтеза, тяжелые металлы, антибиотики.

THE DIFFERENT ACTION OF SHUNGIT ON THE GROWTH OF PLANKTON ORGANISMS IN THE PRESENCE OF HEAVY METALS AND SINGLE OXYGEN

Dallakyan G.A.

Moscow State University M.V. Lomonosov

Leninsky Hills, 1, build. 12, Moscow, 119991, Russia

E-mail: honaris@bk.ru

Abstract. The effectiveness of the toxic effect of singlet oxygen on the culture of algae *Sc. Quadricauda*. If there is 100 g / l of schungite in the environment, the protection against the toxic effect of singlet oxygen on algae occurs during the entire time of culture growth. The concentration of schungite 100 g / l without eosin stimulates the growth of the culture, at a concentration of more than 200 g / l slows down. In aquarium water, with the addition of antibiotics, the number of bacteria decreased 12-fold. In the presence of schungite and antibiotics, the number of bacteria decreased only 1.7 times in comparison with the initial values. In the presence of only schungite in the environment, the growth of culture is stimulated. Shungite, depending on the concentration, can be used as a growth stimulant for microorganisms and as a protector against toxicants. The combined action of schungite copper sulfate and cadmium sulfate on crustaceans showed that schungite in the minimum of five concentrations of 0.01 g / l tested had a protective effect on daphnia. At high concentrations of schungite, daphnia perished, and schungite did not protect them from the action of toxicants. Thus, depending on the concentration, schungite can stimulate the growth of aquatic organisms, inactivate the toxic effect of various compounds and at the same time in large concentrations inhibit the development of hydrobionts. Therefore, when choosing schungite for drinking water purification with great caution, one must treat widely advertised, but not undergone the necessary clinical tests in laboratory conditions of preparations.

Keywords: schungite, algae, bactero-plankton, fullerene, *Daphnia magna*, photosynthesis efficiency, heavy metals, antibiotics

Введение.

В настоящее время о целебных свойствах шунгита существует значительное количество литературы, однако о происхождении этого камня и механизме проявления уникальных лечебных свойств до сих пор идут дискуссии. В действительности отсутствуют научно обоснованные объяснения причины высокой биологической активности шунгита. Ряд исследователей ссылается на присутствие в шунгите фуллеренов. При этом следует учитывать весь комплекс достаточно сложных биологически активных соединений, а также металлов, входящих в состав органической массы и минеральной составляющей шунгита.

В 1992 г. в шунгите Карелии был обнаружен фуллерен [1]. Показано, что в проходящей через шунгит воде быстро окисляются органические молекулы и свободные радикалы [2]. При этом содержание в ней бактерий снижается в десятки раз [3]. Важную роль в очистке воды от загрязняющих веществ и стабилизации