

7. Lay F.T., Schirra H.J., Scanlon M.J., Anderson M.A., Craik D.J. The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alAFP. *J. Mol. Biol.*, 2003, vol. 325, pp. 175-188.

8. Dracatos P.M., van der Weerden N.L., Carroll K.T., Johnson E.D., Plummer K.M., Anderson M.A. Inhibition of cereal rust fungi by both class I and II defensins derived from the flowers of *Nicotiana glauca*. *Mol. Plant Pathol.*, 2014, vol. 15, no. 1, pp. 67-79.

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЦИНА

Шолина Е.А., Филатова Л.Ю., Киржанова Е.А., Балабушевич Н.Г.
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1-3, г. Москва, 119991, РФ
e-mail: nbalab2008@gmail.com

Аннотация. Мукозальное применение биологически активных веществ, в том числе высокомолекулярных веществ, интенсивно развивается последние десятилетия. Полиэлектrolитная система доставки лекарственных веществ получена путем послойной адсорбции муцина и протамина на микросферах ватеритной формы карбоната кальция. Условия процесса влияли как на включение муцина в процессе получения микросфер CaCO₃, так и на его адсорбцию на мезопористой поверхности частиц. Изучены стабильность, морфология, изменение поверхностного заряда частиц при попеременной адсорбции на микросферах CaCO₃ отрицательно заряженного муцина и положительно заряженного протамина. Проведен подбор условий растворения ядер CaCO₃ в готовых полиэлектролитных микрочастицах. Обсуждены три способа иммобилизации биологически активных веществ (преимущественно белков, ферментов, пептидов) в полиэлектролитную систему на основе муцина, а также перспективность ее использования для доставки биологически активных веществ через слизистые оболочки.

Ключевые слова: муцин, адсорбция, микросферы CaCO₃, протамин, послойная адсорбция полиэлектролитов, мукоадгезивная система доставки лекарственных веществ.

POLYELECTROLYTE SYSTEM DELIVERY USING MUCIN

Sholina E.A., Filatova L.Y., Kirzhanova E.A., Balabushevich N.G.
Lomonosov Moscow State University
Leninskie gory, 1-3, Moscow, 119991, Russia
e-mail: nbalab2008@gmail.com

Abstract. Mucosal applications for different biologically active ingredients including high molecular weight substances have been developed actively last decades. Polyelectrolyte drug delivery system was obtained by mucin and protamine layer-by-layer (LbL) adsorption on microspheres made of calcium carbonate vaterite form. Process conditions influenced both mucin entrapment during CaCO₃ microspheres formation and its further adsorption on mesoporous surface of the particles. Particle stability, morphology, surface charge during negatively charged mucin and positively charged protamine LbL adsorption on CaCO₃ microspheres have been studied. Conditions for CaCO₃-core dissolution inside formed LbL-particles have been selected. Three different ways for biologically active substances (mostly proteins, enzymes and peptides) immobilization in polyelectrolyte mucin-based system have been discussed together with their possible mucosal application.

Key words: mucin, adsorption, CaCO₃-microspheres, protamine, polyelectrolyte layer-by-layer adsorption, mucoadhesive drug delivery system.

В настоящее время активно растет интерес к муцинам – гликопротеинам, которые являются основным компонентом слизистых поверхностей, выстилающих желудочно-кишечный тракт, носовую и ротовую полости, глаза и т.д. [1, 2]. Муцины обладают высокой молекулярной массой и имеют в составе до 80 % углеводов, представленных галактозой, *N*-ацетилглюкозамином, *N*-ацетилгалактозамином, фукозой и сиаловыми кислотами. Белковый стержень состоит из центрального гликозилированного участка, содержащего преимущественно серин, треонин и пролин, а также участков, богатых цистеином, благодаря которым образуются дисульфидные связи как внутри, так и между молекулами мономеров. В составе слизи муцины выполняют функцию барьера для всасывания как патогенов, так и лекарственных веществ. Мукоадгезивные лекарственные формы способны взаимодействовать со слизистыми оболочками, удерживаясь на их поверхности продолжительное время, что способствует увеличению биодоступности включенных в них биологически активных веществ (БАВ). В связи с этим разработка мукозальных систем доставки БАВ является актуальной.

Метод последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на коллоидных частицах различной природы активно исследуется для иммобилизации БАВ, включая белки и пептиды, перспективных для системной и направленной доставки [3]. Использование в качестве коллоидных частиц мезопористых ватеритных микросфер CaCO₃ позволяет включать значительные количества БАВ, а после

нанесения полиэлектролитов растворить карбонатную матрицу и получить полые полимерные микрокапсулы. Муцин, имеющий отрицательный заряд в нейтральных и щелочных средах, был использован при формировании на гидрофильных и гидрофобных поверхностях полиэлектролитных слоев с использованием в качестве поликатиона лактопероксидазы, полиаллиламина и хитозана [4-7]. В литературе не описано взаимодействие ватеритных микросфер с муцином [8], однако известно, что в желчном пузыре избыточное образование слизи в присутствии CaCO_3 способствует образованию камней [9].

Цель исследования состояла в изучении взаимодействия муцина с микросферами ватеритной формы CaCO_3 , получении с использованием метода послойной адсорбции муцина и сильноосновного полипептида протамина микрочастиц и оценке перспектив использования полиэлектролитной системы для мукозальной доставки БАВ.

Материалы и методы. В работе использованы муцин из желудка свиньи (Sigma, США), содержащий 0.5-1.5 % сиаловых кислот, и протамин из молок лосося (Sigma, США). Перед использованием растворы муцина подвергали озвучиванию в течение 30 мин и при необходимости центрифугировали 30 мин 10000 g. Схема получения микрочастиц и их обозначения показаны на рисунке 1.

Микросферы ватеритной формы CaCO_3 получали [10] смешиванием эквимольных растворов Na_2CO_3 и CaCl_2 (Sigma-Aldrich, США), не содержащих (I) или при соосаждении (IIб) содержащих муцин в концентрации 0.5-1.0 мг/мл, а затем дважды промывали водой и при необходимости высушивали при 70 °С. Адсорбцию муцина (0.5-1.0 мг/мл) в воде, 0.05 М трис-буфере с pH 7.1-9.0 или растворах 0.25-1.0 М NaCl на высушенных микросферах (20 мг/мл) проводили в течение 1 ч при активном перемешивании (IIа), согласно [11], а затем дважды промывали. Последовательную адсорбцию протамина (0.5 мг/мл) и муцина (0.5 мг/мл) на микросферах с включенным гликопротеином проводили до достижения нужного числа полиэлектролитных бислоев (IIIа, IIIб) [12, 13]. Матрицы CaCO_3 в полиэлектролитных частицах растворяли при дробном добавлении 0.2 М натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) с последующим трехкратным промыванием микрочастиц водой (IVа, IVб).

Размер и форму микрочастиц характеризовали с помощью световой оптической (Carl Zeiss, Германия) и сканирующей электронной (Zeiss DSM 40, Германия) микроскопии, а заряд – с использованием динамического лазерного светорассеяния (Malvern Zetasizer Nano ZS, Великобритания). Концентрацию муцина определяли методом Шиффа [14] или спектрофотометрически, используя длину волны 260 нм, при которой протамин не поглощает. Содержание муцина в микрочастицах определяли по разнице его концентраций в растворах до и после включения гликопротеина и относили к массе или площади поверхности микросфер CaCO_3 . Оценку мукоадгезивных свойств микрочастиц проводили, как описано в [15].

Результаты и обсуждение. В работе получены микросферы CaCO_3 (см. рис. 1 I) диаметром 3-5 мкм с площадью поверхности 8.8 м²/г и средним размером пор 20-60 нм, имеющие в воде поверхностный заряд $+(9\pm 1)$ мВ. Включение муцина, дзета-потенциал которого в воде составил $-(20\pm 2)$ мВ, проводили в микросферы двумя способами соосаждением при получении частиц (см. рис. 1, IIб) или адсорбцией на поверхности частиц (см. рис. 1, IIа). Не зависимо от способа включения гликопротеина микросферы сохраняли форму и хранились в растворе без агрегации (см. рис. 2 а и б).

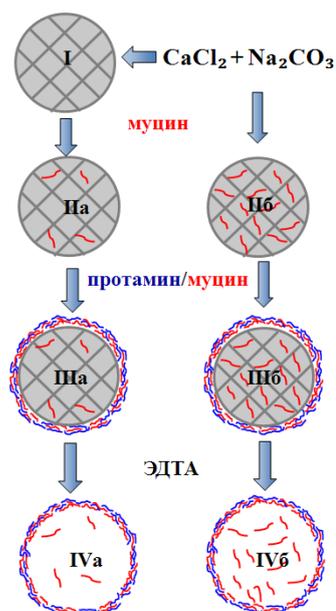


Рисунок 1 – Схема получения микрочастиц последовательной адсорбцией полиэлектролитов на микросферах CaCO_3 : I – микросферы CaCO_3 ; IIа и IIб – микрочастицы CaCO_3 соответственно с адсорбированным (а) и соосажденным (б) муцином; IIIа и IIIб – микрочастицы CaCO_3 , покрытые слоями противоположно заряженных протамина и муцина; IVа и IVб – полиэлектролитные микрокапсулы после растворения ЭДТА

Включение муцина в микросферы при соосаждении была выше, чем при адсорбции (см. табл. 1), что хорошо совпадало с результатами [12], полученными для других белков. Для сравнения при адсорбции на наночастицах полистирольного латекса диаметром 260 нм удалось включить муцин из подчелюстных желез максимально в количестве 2.3 мг/м^2 [8]. Потери муцина при промывках сорбента оказались небольшими, а дзета-потенциал микросфер с включенным гликопротеином был слабо отрицательным, но все же больше по абсолютной величине при включении адсорбцией на поверхности микросфер. Изучение влияния условий на включение муцина показано на рисунке 3. Содержание муцина в микросферах CaCO_3 возрастало с увеличением pH среды до значения 9.0 и уменьшалось при увеличении концентрации NaCl от 0.25 до 1.0 М.

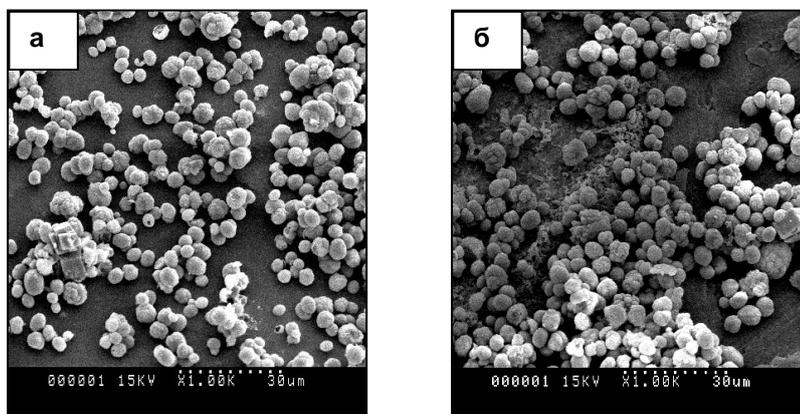


Рисунок 2 – Сканирующие электронные микрофотографии микросфер CaCO_3 до (а, I) и после (б, IIa) адсорбции муцина. Масштабная линейка 30 мкм

Таблица 1 – Характеристика включения муцина (0.5 мг/мл) в микросферы CaCO_3 (20 мг/мл)

Способ включения	Содержание муцина, мг/м^2 микросфер CaCO_3		Дзета-потенциал, мВ
	До промывки	После промывки	
Адсорбция (частицы IIa)	3.3 ± 0.3	2.8 ± 0.3	$-(15 \pm 3)$
Соосаждение (частицы IIб)	5.3 ± 0.4	5.0 ± 0.4	$-(11 \pm 2)$

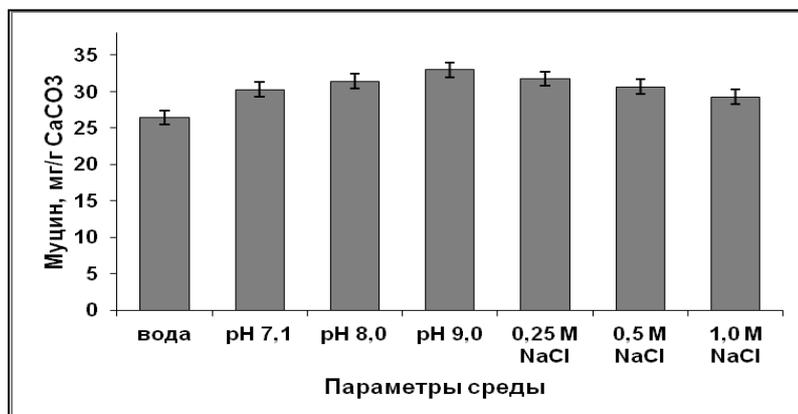


Рисунок 3 – Влияние среды на включение муцина адсорбцией на микросферах CaCO_3

При попеременной адсорбции на микросферах с включенным гликопротеином основного полипептида протамина (5 кДа, pI 10.5) и муцина получены микрочастицы (IIIa, IIIб), которые по данным оптической микроскопии (см. рис. 4а) были стабильны при хранении в растворе. При нанесении полиэлектролитов слоев наблюдалась перезарядка поверхности микрочастиц с отрицательной для муцина на положительную для протамина (см. рис. 5б), что подтверждало образование полиэлектролитного комплекса муцина с протамином.

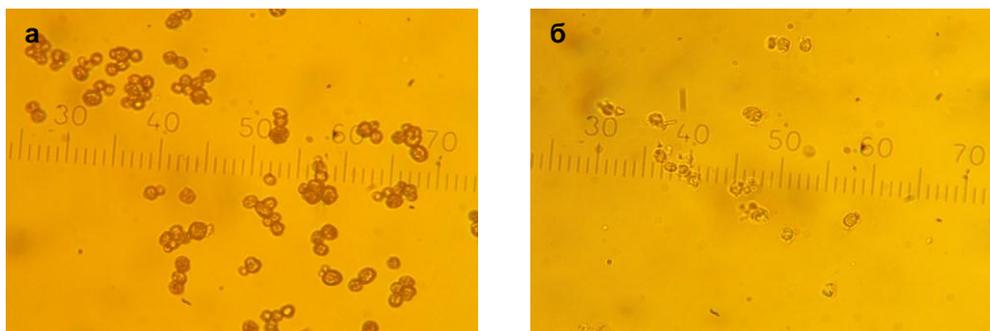


Рисунок 4 – Световая оптическая микроскопия микрочастиц покрытых тремя бислоями (муцин-протамин) до (а) и после (б) растворения ядра CaCO_3 с помощью ЭДТА. Одно деление масштабной линейки 3.2 мкм

Подобраны условия растворения ядер CaCO_3 в полиэлектролитных частицах с использованием 0.2 М раствора ЭДТА, что позволило получить (см. рис. 4б) мало агрегированные полиэлектролитные частицы (IVa) с тремя бислоями (муцин-протамин). Изучении взаимодействия частиц IVa с муцином, проведенное согласно [15], подтвердило наличие мукоадгезивных свойств, что может свидетельствовать о возможности их мукозального применения.

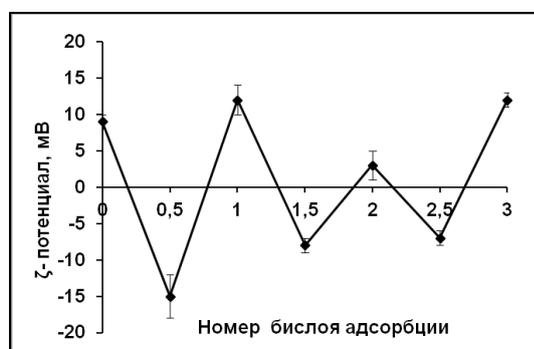


Рисунок 5 – Изменение дзета-потенциала частиц при попеременной адсорбции муцина (бислои 0.5, 1.5, 2.5) и протамина (бислои 1, 2, 3) на микросферах CaCO_3 . Условия: концентрация микросфер CaCO_3 - 20 мг/мл, концентрация муцина и протамина при адсорбции – 0.5 мг/мл, после каждой стадии адсорбции промывка от несвязавшегося полиэлектролита

Способ включения в муцинсодержащие полиэлектролитные микрочастицы БАВ (преимущественно гормонов, пептидов, ферментов) должен определяться зарядом частиц, а также зарядом и молекулярной массой БАВ. Возможны три пути иммобилизации БАВ: 1) введение в матрицу микросфер CaCO_3 соосаждением и адсорбцией при наличии положительного заряда преимущественно высокомолекулярного БАВ, 2) использование высокомолекулярного БАВ в качестве полианиона при послойной адсорбции полиэлектролитов, 3) включение БАВ адсорбцией в полиэлектролитные микрочастицы после удаления ядра CaCO_3 .

Таким образом, в работе показана возможность получения на основе ватеритной формы CaCO_3 стабильных микросфер и полиэлектролитных микрокапсул, содержащих муцин. Наличие в составе предложенных полиэлектролитных микрочастиц муцина делает их перспективными для мукозальной доставки биологически активных веществ через слизистые оболочки.

Список литературы / References:

1. Bansi R., Turner B.S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2006, vol. 11, pp. 164-170.
2. Sandberg T., Blom H., Caldwell K.D. Potential use of mucins as biomaterial coatings.I. Fractionation, characterization, and model adsorption of bovine, porcine, and human mucins. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2009, vol. 91, no. 3, pp. 762-72.
3. Балабушевич Н.Г., Изумрудов В.А., Ларионова Н.И. Белковые микрочастицы с контролируемой стабильностью, полученные послойной адсорбцией биополиэлектролитов. *Высокомолекулярные соединения*, 2012, т. 54, № 7, с. 1116-1129. [Balabushevich N.G., Izumrudov V.A., Larionova N.I. Protein microparticles with controlled stability prepared via layer-by-layer adsorption of biopolyelectrolytes. *Polymer Science – Series A*, 2012, vol. 54, no. 7, pp. 540-551. (In Russ.)]

4. Svensson O., Lindh L., Cardenas M., Arnebrant T. Layer-by-layer assembly of mucin and chitosan – influence of surface properties, concentration and type of mucin. *Journal Colloid Interface Science*, 2006, vol. 299, pp. 608–616.
5. Svensson O., Arnebrant T. Mucin layers and multilayers – physicochemical properties and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010, vol. 15, pp. 395–405.
6. Ahn J., Crouzier T., Ribbeck K., Rubher M.F., Cohen R.E. Turning the properties of mucin via layer-by-layer assembly. *Biomacromol.*, 2015, vol. 16, no. 1, pp. 228–235.
7. Lindh L., Svendsen I. E., Svensson O., Cárdenas M., Arnebrant T. The salivary mucin MUC5B and lactoperoxidase can be used for layer-by-layer film formation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, vol. 310, pp. 74–82.
8. Shi L., Caldwell K.D. Mucin Adsorption to Hydrophobic Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2000, vol. 224, pp. 372–381.
9. Yamasaki T., Chijiwa K., Endo M. Isolation of mucin from human hepatic bile and its induced effects on precipitation of cholesterol and calcium carbonate in vivo. *Digestive Diseases and Sciences*, 1993, vol. 38, no. 5, pp. 909–915.
10. Volodkin D.V., Larionova N.I., Sukhorukov G.B. Protein encapsulation via porous CaCO₃ microparticles templating. *Biomacromol.*, 2004, vol. 5, no. 5, pp. 1962–1972.
11. Balabushevich N.G., Lopez de Guereñu A.V., Feoktistova N.A., Volodkin D. Protein loading into porous CaCO₃ microspheres: adsorption equilibrium and bioactivity retention. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, vol. 17, pp. 2523–2530.
12. Balabushevich N.G., Lopez de Guereñu A.V., Feoktistova N.A., Volodkin D.V. Protein-containing multilayer capsules by templating on mesoporous CaCO₃ particles: post- and pre-loading approaches. *Macromol. Bioscience*, 2016, vol. 16, pp. 95–105.
13. Балабушевич Н.Г., Зими́на Е.П., Ларионова Н.И. Включение каталазы в полиэлектролитные микросферы из меламинформальдегида, декстрансульфата и протамина. *Биохимия*, 2004, т. 69, № 7, с. 937–944. [Balabushevich N.G., Zimina E.P., Larionova N.I. Encapsulation of catalase in polyelectrolyte microspheres composed of melamine formaldehyde, dextran sulfate, and protamine. *Biochemistry (Mosc.)*, 2004, vol. 69, no. 7, pp. 763–769. (In Russ.)]
14. Mantle M., Allen A. A colorimetric assay for glycoproteins based on the periodic acid/Schiff stain. *Biochem. Soc. Trans.*, 1978, vol. 6, pp. 607–609.
15. Балабушевич Н.Г., Печенкин М.А., Зоров И.Н., Шибанова Е.Д., Ларионова Н.И. Мукоадгезивные полиэлектролитные микрочастицы, содержащие рекомбинантный инсулин человека и его аналоги аспарт и лизпро. *Биохимия*, 2011, т. 76, № 3, с. 400–405. [Balabushevich N.G., Pechenkin M.A., Zorov I.N., Shibanova E.D., Larionova N.I. Mucoadhesive polyelectrolyte microparticles containing recombinant human insulin and its analogs aspart and lispro. *Biochemistry (Mosc.)*, 2011, vol. 76, no. 3, pp. 327–331. (In Russ.)]

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД БЫСТРОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ В ЛИОФИЛИЗОВАННОЙ БЦЖ ВАКЦИНЕ

Угарова Н.Н.^{1,2}, Ломакина Г.Ю.^{1,2}, Черников С.В.³, Винокурова Н.В.³,
Отрашевская Е.В.³, Перевышина Т.А.³, Горбачев В.Ю.³

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1, стр. 3, г. Москва, 119991, РФ

² ООО «Люмтек»

Воробьевы горы, 1, стр. 77, г. Москва, 119992, РФ

³ ФГУП "НПО "Микроген" Минздрава России

2-й Волконский пер., д. 10, г. Москва, 127473, РФ

e-mail: nugarova@gmail.com

Аннотация. Модифицирован и оптимизирован метод определения жизнеспособности клеток в лиофилизованной БЦЖ вакцине путем измерения содержания внутриклеточного АТФ. Содержание АТФ определяли биолюминесцентным методом с использованием АТФ-реагента (люциферин/люциферазы). По сравнению с АТФ-методом, опубликованным ранее, мы изменили условия реконструкции и предварительной инкубации лиофилизованной БЦЖ вакцины, а также условия экстракции внутриклеточного АТФ. Это позволило сократить длительность анализа с 36 до 2-х часов, упростить процедуру анализа и сделать ее более пригодной для практического применения. Наблюдалась высокая корреляция между содержанием АТФ и величиной КОЕ, определенной стандартным методом посевов.

Ключевые слова: биолюминесценция, АТФ-метод, жизнеспособность клеток, лиофилизованная БЦЖ вакцина.