

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 CaCO<sub>3</sub>, так и на его адсорбцию на мезопористой поверхности частиц. Изучены стабильность, морфология, изменение поверхностного заряда частиц при попеременной адсорбции на микросферах CaCO<sub>3</sub> отрицательно заряженного муцина и положительно заряженного протамина. Проведен подбор условий растворения ядер CaCO<sub>3</sub> 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 CaCO<sub>3</sub>, 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 CaCO<sub>3</sub> 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 CaCO<sub>3</sub> microspheres have been studied. Conditions for CaCO<sub>3</sub>-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, CaCO<sub>3</sub>-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 CaCO<sub>3</sub> 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  $\text{CaCO}_3$  способствует образованию камней [9].

Цель исследования состояла в изучении взаимодействия муцина с микросферами ватеритной формы  $\text{CaCO}_3$ , 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  $\text{CaCO}_3$  получали [10] смешиванием эквимольных растворов  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и  $\text{CaCl}_2$  (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  $\text{CaCO}_3$  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  $\text{CaCO}_3$ . Оценку мукоадгезивных свойств микрочастиц проводили, как описано в [15].

**Результаты и обсуждение.** В работе получены микросферы  $\text{CaCO}_3$  (см. рис. 1 I) диаметром 3-5 мкм с площадью поверхности 8.8 м<sup>2</sup>/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).

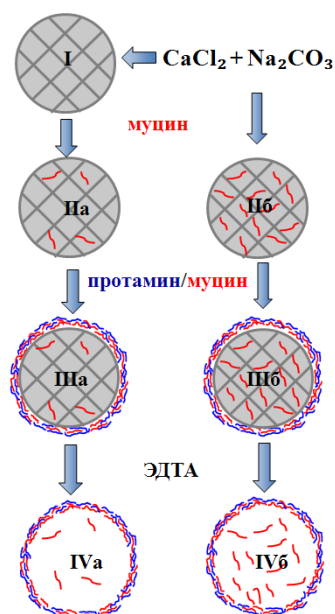


Рисунок 1 – Схема получения микрочастиц последовательной адсорбцией полиэлектролитов на микросферах  $\text{CaCO}_3$ : I – микросферы  $\text{CaCO}_3$ ; IIа и IIб – микрочастицы  $\text{CaCO}_3$  соответственно с адсорбированным (а) и соосажденным (б) муцином; IIIа и IIIб – микрочастицы  $\text{CaCO}_3$ , 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  $2.3 \text{ мг/м}^2$  [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  $\text{CaCO}_3$  возрастало с увеличением pH среды до значения 9.0 и уменьшалось при увеличении концентрации NaCl от 0.25 до 1.0 М.

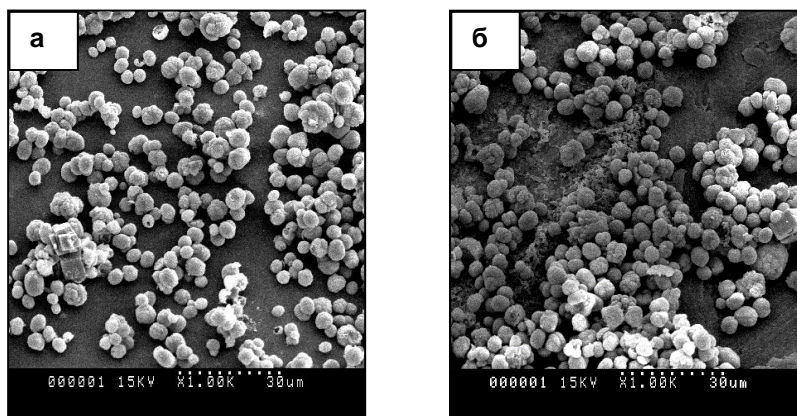


Рисунок 2 – Сканирующие электронные микрофотографии микросфер  $\text{CaCO}_3$  до (а, I) и после (б, IIa) адсорбции муцина. Масштабная линейка 30 мкм

Таблица 1 – Характеристика включения муцина (0.5 мг/мл) в микросферы  $\text{CaCO}_3$  (20 мг/мл)

Способ включения	Содержание муцина, $\text{мг/м}^2$ микросфер $\text{CaCO}_3$		Дзета-потенциал, мВ
	До промывки	После промывки	
Адсорбция (частицы IIa)	$3.3 \pm 0.3$	$2.8 \pm 0.3$	$-(15 \pm 3)$
Соосаждение (частицы IIб)	$5.3 \pm 0.4$	$5.0 \pm 0.4$	$-(11 \pm 2)$

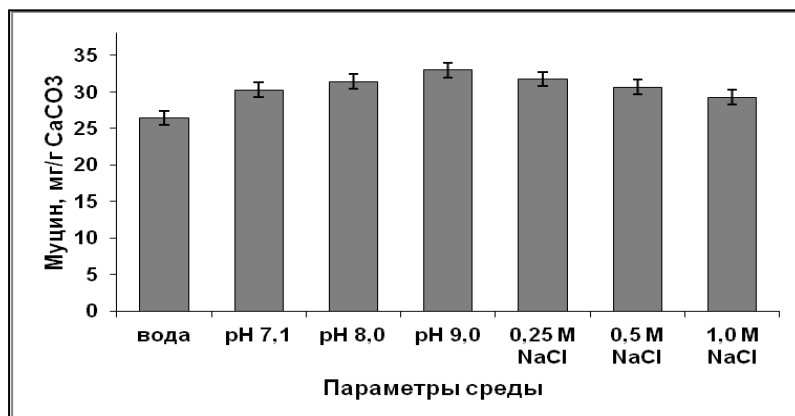


Рисунок 3 – Влияние среды на включение муцина адсорбцией на микросферах  $\text{CaCO}_3$

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.

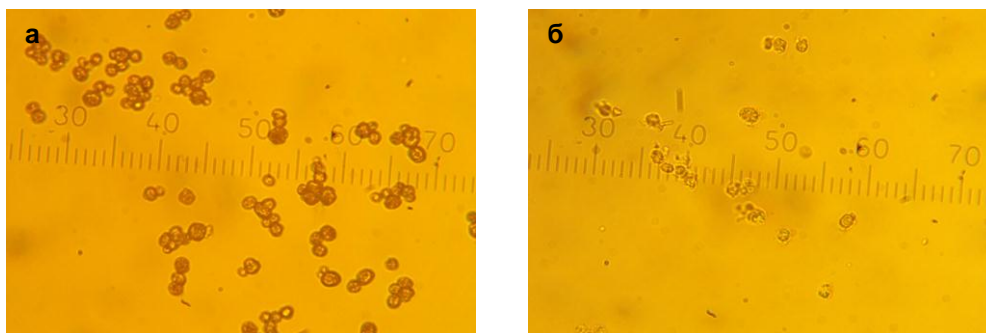


Рисунок 4 – Световая оптическая микроскопия микрочастиц покрытых тремя бислоями (муцин-протамин) до (а) и после (б) растворения ядра  $\text{CaCO}_3$  с помощью ЭДТА. Одно деление масштабной линейки 3.2 мкм

Подобраны условия растворения ядер  $\text{CaCO}_3$  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.

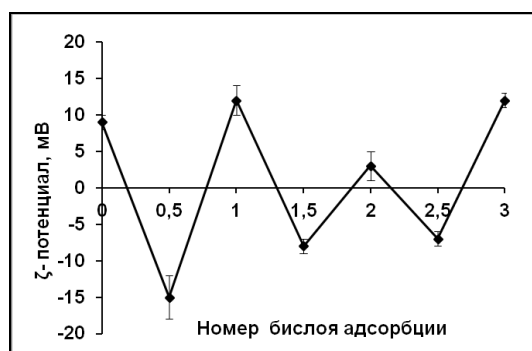


Рисунок 5 – Изменение дзета-потенциала частиц при попеременной адсорбции муцина (бислои 0.5, 1.5, 2.5) и протамина (бислои 1, 2, 3) на микросферах  $\text{CaCO}_3$ . Условия: концентрация микросфер  $\text{CaCO}_3$  - 20 мг/мл, концентрация муцина и протамина при адсорбции – 0.5 мг/мл, после каждой стадии 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  $\text{CaCO}_3$  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  $\text{CaCO}_3$ .

Таким образом, в работе показана возможность получения на основе ватеритной формы  $\text{CaCO}_3$  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 CaCO<sub>3</sub> 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 CaCO<sub>3</sub> 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 CaCO<sub>3</sub> 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.<sup>1,2</sup>, Ломакина Г.Ю.<sup>1,2</sup>, Черников С.В.<sup>3</sup>, Винокурова Н.В.<sup>3</sup>,  
Отрашевская Е.В.<sup>3</sup>, Перевышина Т.А.<sup>3</sup>, Горбачев В.Ю.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
*Ленинские горы, 1, стр. 3, г. Москва, 119991, РФ*

<sup>2</sup> ООО «Люмтек»

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

<sup>3</sup> 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.