

# МИКРОКАПСУЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МУЛЬТИКЛЕТОЧНЫХ РАКОВЫХ СФЕРОИДОВ

*Д.С. Зайцева-Зотова\**, *Г.В. Хмелев\**, *А.О. Чернышенко\*\**,  
*Т.А. Аكوва\*\*\**, *А.Н. Зеленецкий\*\*\**, *Т.Н. Ерохина\**, *Е.А. Марквичева\**

\*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, E-mail: DariaZ.z@gmail.com

\*\*Московский государственный текстильный университет  
им. А.Н. Косыгина, Москва

\*\*\*Институт синтетических полимерных материалов  
им. Н.С.Ениколопова РАН, Москва

# MICROCAPSULES BASED ON CHITOSAN AND ITS DERIVATIVES FOR PREPARATING OF MULTICELLULAR TUMOR SPHEROIDS

*D.S. Zaytseva-Zotova\**, *G.V. Khmelev\**, *A.O. Chernyshenko\*\**,  
*T.A. Akopova\*\*\**, *A.N. Zelenetskii\*\*\**, *T.N. Erokhina\**, *E.A. Markvicheva\**

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS,  
Moscow, E-mail: DariaZ.z@gmail.com

\*\*Moscow State Textile University, Moscow

\*\*\*Enikolopov Institute of Synthetic Polymer Materials, RAS, Moscow

## ABSTRACT

Microcapsules with semi-permeable membrane were prepared using polyelectrolyte complex between natural oppositely charged polysaccharides alginate and chitosan (and its derivatives). In order to gener-

ate multicellular tumor spheroids, tumor mouse cell cultures (melanoma M3 and myeloma Sp2/0) were immobilized into microcapsules and cultivated for 1–4 weeks. It has been shown that these tumor spheroids could accumulate a photosensitizer, such as protoporphyrin IX. The developed *in vitro* models can be used in photodynamic therapy and to study a therapeutic effect of new anticancer drugs.

Инкапсулирование клеток животных — сложная задача, так как сама процедура должна протекать быстро (не более 40 мин) в физиологических условиях (рН 6–7, температура 37°C), чтобы сохранить как можно больше жизнеспособных клеток. Поэтому спектр полимеров, которые можно использовать для решения этой задачи, невелик. Формирование микрокапсул обычно осуществляют с использованием противоположно заряженных полимеров. В качестве поликатиона могут выступать хитозан (или его производные) или поли-L-лизин, а в роли полианиона — альгинат, карбоксиметилцеллюлоза, хондроитинсульфат, гиалуроновая кислота, каррагинан и др. Хитозан, который уже широко используется в фармакологии и медицине, представляется одним из наиболее перспективных материалов для инкапсулирования клеточных культур. Однако хитозан растворяется в кислой среде (рН < 3,5), следовательно, невозможно получать микрокапсулы на основе комплекса альгинат — хитозан в физиологических условиях. Растворимость хитозана при нейтральных значениях рН может быть обеспечена снижением его молекулярной массы. В нашей работе были использованы низкомолекулярный хитозан ММ 29 кДа, либо олигохитозан ММ 3,5 кДа, полученный реакцией окисления из коммерческих образцов хитозанов. Другим подходом к решению проблемы является использование сополимеров хитозана с другими биосовместимыми материалами. В ИСПМ РАН методом реакционного смешения полимеров при совместном деформировании с низкомолекулярными агентами был получен новый графт-сополимер на основе хитозана и поливинилового спирта (хитозан — ПВС), растворимый при нейтральных рН. Воздействие давления со сдвигом на твердые полимерные смеси в присутствии низкомолекулярных агентов приводит к модификации полимеров за счет реакций полимераналогичных превращений, одновременно протекают перекрестные химические реакции образующихся *in situ* новых функциональных групп полимеров [2]. При совместном дезацетилировании хитина и поливинилацетата в экструдере были получены композиты хитозана и поливинилового спирта, что подтверждено результатами фракционирования продуктов реакции различными растворителями и данными исследования полученных фракций методами ИК-спектроскопии и широкоуголового рассеяния рентгеновских лучей.

В данной работе показано, что этот сополимер можно использовать для получения стабильных микрокапсул с полупроницаемыми полиэлектролитными мембранами с целью иммобилизации в них раковых клеток. В микрокапсулах на основе длительного *in vitro* культивирования раковых клеток можно получать мультиклеточные сфероиды, которые в дальнейшем использовать как *in vitro* модель малых солидных (твердых) опухолей. Такая модель может быть предложена для изучения эффектов различных видов противораковой терапии (в том числе фотодинамической), а также для исследования новых форм цитостатических лекарственных средств.

**Материалы и методы.** В работе были использованы альгинат натрия (AlgNa, medium viscosity, Sigma), олигохитозан, любезно предоставленный проф. А. Бартковиакон, Польша (ММ 3,5 кДа, СД 89%), низкомолекулярный хитозан (ММ 29 кДа, СД 98%), а также сополимер хитозан-ПВС (80% масс. хитозана). Последний был получен методом реакционного смешения в твердом агрегатном состоянии хитина краба (ММ 650 кДа, зольность 0.15 %) и поливинилацетата (ММ 50–100 кДа) при механическом воздействии в присутствии щелочи. В работе также использовали CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Sigma, USA), ЭДТА (чда, Ангарский завод химреактивов, Россия). Все растворы для иммобилизации клеток были приготовлены в 0,9 % растворе NaCl. В качестве модельных клеток были взяты раковые клеточные линии Sp2/0 (миелома мыши) и М3 (меланома мыши). Для культивирования клеток использовали среду DMEM (Flow Laboratories), либо DMEM/Ham's F-12 (Gibco, UK). Обе среды содержали 10 % фетальной телячьей сыворотки (FCS, BioClot).

**Иммобилизация клеток в микрокапсулы.** Микрокапсулы с иммобилизованными в них клетками получали по следующей методике. Смесь 2 мл 2 % AlgNa с осадком клеток ( $10^6$  кл) с помощью специального прибора добавляли по каплям в 50 мл 0,5% раствора  $\text{CaCl}_2$ . Полученные микрогранулы на основе альгината кальция (AlgCa) трехкратно промывали физиологическим раствором, переносили в 25 мл раствора поликатиона и инкубировали 4–7 минут. После последующей трехкратной промывки физ. раствором гранулы выдерживали 10 мин в 50 mM растворе ЭДТА для удаления ионов кальция и получения микрокапсул. Затем опять промывали 3 раза физ. раствором и выдерживали 10 мин в 0,2 %-ном растворе AlgNa, промывали физ. раствором, а затем средой для культивирования.

**Культивирование инкапсулированных клеток** осуществляли во флаконах 25 см<sup>2</sup> (Corning Inc.) в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе (HERAEUS B5060 EK/ $\text{CO}_2$ ) в газовой среде, содержащей 5%  $\text{CO}_2$ , при температуре 37°C в течение 1–4 недель до образования сфероидов внутри микрокапсул.

**Оценка методом флуоресценции накопления сфероидами Sp2/0 протопорфирина IX (ПП-IX).** Маточный раствор ПП-IX готовили в конц-и  $10^{-3}$  М в растворителе (ПЭГ-400 / этанол 60 % / 40 %). На основе спектров флуоресценции ПП-IX, приготовленного в различных концентрациях в среде DMEM/Ham's F-12, содержащей 10 % FCS, строили калибровочную кривую, которую использовали в последующих экспериментах для оценки накопления ПП-IX биологическими объектами. Для количественной оценки накопления ПП-IX в образцах: 1) инкапсулированных сфероидов, 2) суспензии клеток и 3) пустых микрокапсулах – брали суспензию клеток в концентрации  $1,0 \cdot 10^6$  кл/мл, аликвоту пустых микрокапсул (1 мл), аликвоту сфероидов в микрокапсулах (1 мл) и инкубировали в присутствии ПП-IX и растворителя (ПЭГ-400/этанол; 0,6%/0,4 %) в среде (DMEM/Ham's F-12, 10% FCS) в течение 17 ч при 37°C в 5 % атмосфере  $\text{CO}_2$ . Затем отбирали пробы супернатантов и регистрировали спектры флуоресценции при  $\lambda_{\text{возб}} = 640$  нм. В контрольных пробах инкубирование проводили в присутствии растворителя (ПЭГ-400/этанол; 0,6%/0,4 %). По калибровочной кривой определяли количество ПП-IX, накопленного свободными клетками, пустыми микрокапсулами и инкапсулированными сфероидов.

## Результаты и их обсуждение

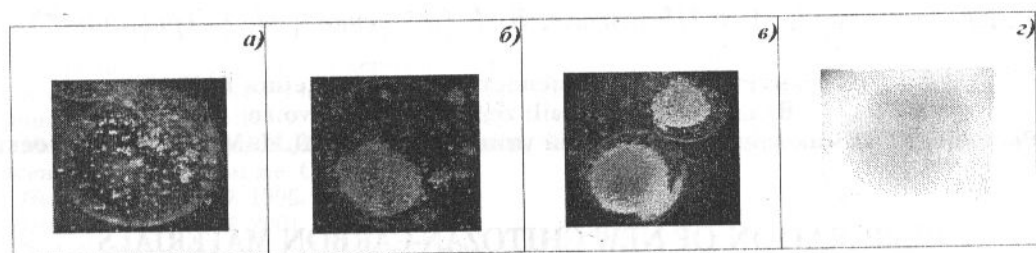
**Получение микрокапсул, устойчивых в среде для культивирования клеток.** Для получения микрокапсул использовали прибор с коаксиальной подачей воздуха и диаметром иглы 0,4 мм. Размер получаемых гранул ограничивался возможностями прибора, но удовлетворял требованиям, предъявляемым к микрокапсулам для культивирования клеток (< 1 мм). Исследовали как химическую стабильность микрокапсул в среде культивирования, так и толщину образующейся полиэлектролитной мембраны. Для этого в 2 мл 2 %-ного раствора AlgNa добавляли 100 мкл раствора латексных частиц ( $d = 600$  нм). Далее микрокапсулы центрифугировали при 1000–10 000 об./мин 5–10 мин. Такой метод позволили не только оценить относительную прочность микрокапсул, но и визуализировать мембрану микрокапсулы под световым микроскопом за счет концентрирования контрастных латексных частиц на ее внутренней поверхности. Полученные в физ. растворе микрокапсулы перемещали в культуральные среды с различным рН. При резкой смене рН до 8–8,5 наблюдали набухание и растворение микрокапсул. Микрокапсулы, дополнительно обработанные 0,2 %-ным раствором AlgNa, были более устойчивы к изменениям ионной силы среды. Оптимальные условия для получения стабильных микрокапсул на основе альгината и различных поликатионов (хитозана, олигохитозана и сополимера хитозан-ПВС) представлены в таблице.

Оптимальные условия для получения стабильных микрокапсул  
с использованием альгината и различных поликатионов

Характеристика	Хитозан	Олигохитозан	Сополимер хитозан-ПВС
Молекулярная масса, кДа	29	3.5	-
Степень деацетилирования, %	90	80	-
Концентрация раствора поликатиона, %	0,2	0,2	0,25
pH раствора	6	6.5	7
Время инкубации CaAlg микрогранул в р-ре поликатиона*, мин	4,5	7	4,25
Средний размер микрокапсул в физ. растворе, мкм	820	810	830
Оценка относительной механической стабильности микрокапсул (центрифугированием при 10 000 об/мин, 5 мин):			
а) в физиологическом растворе	+	+	+
б) в среде для культивирования	+	+	+

\*Время было подобрано таким образом, чтобы обеспечить формирование мембраны толщиной 80–90 мкм.

**Культивирование клеточных культур.** Ранее была продемонстрирована возможность культивирования в полиэлектролитных микрокапсулах клеток гибридомы SS-3 и клеток печени сибирского горного козерога ПСГК-60 [3]. В нашей работе для получения сфероидов были выбраны клетки суспензионной культуры мышинной миеломы Sp2/0 и поверхностно-зависимые клетки мышинной меланомы М3. Использование классических методов (без капсулирования) не позволяет получить сфероиды из миеломы Sp2/0. Сфероиды были получены путем длительного культивирования инкапсулированных клеток (14 дней). На рисунке показана динамика роста инкапсулированных клеток Sp2/0, которые формировали мультиклеточные опухолевые сфероиды, практически полностью заполняющие объем микрокапсулы на 14-й день культивирования.



Динамика роста инкапсулированных клеток мышинной миеломы Sp2/0:  
а – 1 день; б – 5 день; в – 10 день; г – 14 день

Клеточную культуру мышинной меланомы М3, которая является поверхностно-зависимой культурой, также иммобилизовали в микрокапсулы. Клетки меланомы уже на первые сутки культивирования образовывали на внутренней стенке мембраны небольшие конгломераты, которые значительно не увеличивались после 7 дней культивирования. Таким образом, нам не удалось получить мультиклеточных сфероидов, заполняющих весь объем микрокапсулы, что, вероятно, можно объяснить свойствами этой клеточной линии.

**Изучение накопления протопорфирина IX (ПП-IX) клетками миеломы SP2/0.** В полученных инкапсулированных сфероидах (клетки Sp2/0) анализировали накопление фотосенсибилизатора (ФС) ПП-IX, который используется в противораковой фотодинамической терапии (ФДТ). Известно, что ПП-IX хорошо флуоресцирует и является соединением, которое активируется светом, что позволяет по интенсивности флуоресценции оценить его накопление в раковых клетках. После

17 ч инкубирования образцов была определена степень накопления ПП-IX:

- 1) в суспензионных клетках ( $1 \cdot 10^6$  кл/мл) –  $7,8 \cdot 10^{15}$  молекул ПП-IX;
- 2) в микрокапсулах (1мл) –  $8,4 \cdot 10^{15}$  молекул ПП-IX;
- 3) в инкапсулированных сфероидах (1мл) –  $1,5 \cdot 10^{16}$  молекул ПП-IX.

Таким образом показано, что инкапсулированные сфероиды на основе поверхностно-независимых клеток Sp2/0 накапливали ПП-IX. Так как пустые микрокапсулы также накапливали ФС (за счет неспецифической сорбции на полиэлектролитной мембране), было предложено перед тестированием на накопление ФС удалять мембрану с инкапсулированных сфероидов. Поскольку хитозан и его производные являются рН-зависимыми смарт-полимерами, был предложен способ разрушения микрокапсул за счет резкой смены рН среды.

С использованием метода микроинкапсулирования раковых клеток открывается возможность создания в будущем новой *in vitro* модели для исследования эффектов ФДТ на малых солидных опухолях. Новая модель может позволить генерировать сфероиды на основе нескольких типов клеток (в том числе поверхностно-независимых). Кроме того, подобные модели могут быть использованы для исследования новых форм цитостатических лекарственных средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (номер проекта 04-03-32765).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Марквичева Е.А.* Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. Скрябина К.Г., Варламова В.П., Вихоревой Г.А., М.: Наука, 2002. С. 315–326.
2. *Акопова Т.А., Mognilevskaja E.L., Ozerin A.N., Zelenetskii A.N., Vladimirov L.V. and Zhorin V.A.* Proc. Int. Conf. "Mechanochemical Synthesis and Sintering", Novosibirsk, June 14–18, 2004., P. 199.
3. *Бальшиева В.И., Аронов Р.Б., Жестерева В.И., Марквичева Е.А., Чернылева И.С., Албулов А.И., Шинкарев С.М.* Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы Седьмой Международной конференции. М.: Изд-во ВНИРО, 2003. С. 224–226.