

БИОКАПСУЛИРОВАНИЕ В ПЛЕНКИ И МИКРОКАПСУЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ ДЛЯ БИМЕДИЦИНЫ

Е.А. Марквичева, Т.А. Аكوпова, Д.С. Зайцева-Зотова, А.Н. Зеленецкий*, В.А. Жорин*, Н.И. Новикова, А.Н. Мурашов, Б.М. Фельдман**, Л.Д. Руми*

Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, E-mail: lemark@ibch.ru

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

**ФГУП “Государственный научный центр НИОПИК”

BIOENCAPSULATION IN FILMS AND MICROCAPSULAE BASED ON CHITOSAN AND ITS DERIVATIVES FOR BIOMEDICINE

*E.A. Markvicheva, T.A. Akopova *, D.S. Zaitseva-Zotova, A.N. Zelenetskii*, V.A. Zhorin*, N.I. Novikova, A.N. Murashov, B.M. Feldman**, L.D. Rumsh*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy
of Sciences, Moscow, E-mail: DariaZ.z@gmail.com

*Enikolopov Institute of Synthetic Polymer Materials, RAS, Moscow

**Federal State Unitary Enterprise “State Scientific Center NIOPIK”

ABSTRACT

Polymer films and microcapsules based on chitosan and its derivatives with entrapped biologically active plant extracts or tumor cells were developed. The films were tested *in vivo* (in a mouse model) for accelerating wound healing while the microcapsules can be used as novel *in vitro* models in photodynamic therapy.

1. ПОЛИМЕРНЫЕ ПЛЕНКИ С ВКЛЮЧЕННЫМИ В НИХ ЭКСТРАКТАМИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАН

Полимерные покрытия на основе хитозана и его производных успешно разрабатываются в течение последних лет для терапии ран как в России, так и за рубежом. Продолжаются исследования с целью улучшения их механических (эластичность, прочность) и физико-химических свойств, таких, как набухаемость, селективность, биоадгезивность и др. Для решения этой задачи используются различные подходы. Интересным подходом для решения этой задачи, на наш взгляд, является получение привитых сополимеров хитозана с другими сополимерами, например с метакриловыми мономерами: акрилонитрилом, акриламидом и диметиламиноэтил-метакрилатметилсульфатом. Прочность на разрыв таких пленок возрастает более чем в 3 раза по сравнению с пленками из чистого хитозана. Показано, что термообработка хитозановых пленок также позволяет регулировать их прочностные свойства, набухаемость и “транспортные характеристики” (проницаемость и селективность) [1].

Отметим, что часто полимерные покрытия содержат хитозан или его производные в качестве одного из компонентов полиэлектролитного комплекса. В качестве другого (противоположно заряженного) полимера предлагаются различные соединения, например альгинат [2,3], пектин, и некоторые другие. Предлагаются также двухслойные покрытия, например состоящие из карбоксиметилхитина (верхний слой) и нижнего слоя на основе хитозана [4].

Хотя благодаря особым свойствам хитозана и его производных как биологически активных соединений удастся ускорить процесс ранозаживления, наибольший эффект, безусловно, можно достигнуть, если инкапсулировать в такие пленки лекарственную “начинку”. В качестве последней обычно используются обезболивающие, антибактериальные и гемостатические препараты, антиоксиданты, факторы роста, протеолитические ферменты (террилитин, коллитин, трипсин, протеиназа С) [5,6].

Особый интерес представляет использование в качестве “начинки” комплексов натуральных биологически активных веществ (БАВ), содержащихся в лекарственном растительном сырье. Следует отметить, что многие природные БАВ растений, так же как ферменты, гормоны, факторы роста, пептиды, являются нестабильными. Следовательно, обычные методы получения полимерных пленок, в которых используются высокие температуры, токсичные органические растворители или “нефизиологические” рН, не могут быть предложены для приготовления покрытий с включенными в них биологически активными растительными экстрактами.

В этих случаях необходимы “мягкие” (протекающие в физиологических условиях) методы получения гидрогелевых пленок на основе биосовместимых природных полимеров, в которых иммобилизация (включение) БАВ в полимерную матрицу происходит одновременно с образованием гидрогеля, а сам процесс гелеобразования протекает быстро и при комнатной температуре. Особый интерес в этой связи представляют сополимеры хитозана с поливиниловым спиртом, которые, с одной стороны, в отличие от хитозана, растворимы в физиологическом интервале рН, а с другой — имеют функциональные аминогруппы хитозана, которые можно использовать для получения полиэлектролитных комплексов между двумя биосовместимыми противоположно заряженными полимерами, например при взаимодействии сополимера хитозан-ПВС с альгинатом.

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. Нами было показано, что этот сополимер можно использовать для получения стабильных пленочных покрытий с включенными в них биологически активными экстрактами лекарственных растений, в частности подорожника (*Plantago major*), календулы (*Calendula officinalis*) и др. Отметим, что состав экстрактов достаточно сложен. Так, недавно в календуле было найде-

но и идентифицировано порядка 19 активных биофлаваноидов. Состав композитной пленки был следующий: ПВС (60 % масс.), хитозан (40 % масс.), БАВ. Для улучшения эластичности пленок в состав всех пленок вводили глицерин (10 % масс.). Спектрометрически была исследована *in vitro* кинетика выхода БАВ как из альгинат-олигохитозановых пленок, так и их пленок на основе сополимера хитозан-ПВС. Показано, что в течение первых суток выходит от 21 до 35 % БАВ в зависимости от способа получения полимерной матрицы (хитозан-ПВС). Всего за двое суток высвобождается от 34 до 62,2% БАВ в зависимости от состава и способа приготовления пленки. При этом количество и, соответственно, скорость выхода БАВ из полимерной матрицы на вторые сутки уменьшается в 1,5–2 раза. Интересно, что в пленках на основе хитозан-ПВС удалось снизить скорость выхода БАВ почти в 2 раза по сравнению с выходом БАВ из альгинат-олигохитозановых пленок. Такой результат, вероятно, можно объяснить тем, что в процессе получения исходного композита для пленки, который заключается в смешении порошков низкомолекулярного хитина, поливинилацетата и соответствующего БАВ и последующей твердофазной реакции в экструдере, часть БАВ ковалентно связывается с образующимся сополимером и, таким образом, затрудняется (продолжается) выход БАВ из полимерной пленки. Таким образом, регулируя состав полимерных матриц и варьируя способы их получения, имеется возможность целенаправленного регулирования скорости выхода БАВ.

Полученные образцы пленок с включенными в них БАВ были исследованы в экспериментах *in vivo* (модель на мышах). Было показано ускорение заживления кожных резаных ран у опытных животных по сравнению с контрольными (открытая рана или рана, закрытая пустой пленкой (без БАВ)). Ранозаживляющим эффектом обладали полимерные пленки, содержащие водорастворимый экстракт подорожника или календулы или их смесь в соотношении 1:1. На 7-е сутки после снятия указанных выше полимерных покрытий размер ран опытных животных достоверно отличался от размера ран животных из контрольных групп (площадь ран опытных животных была в 2 раза меньше площади ран контрольных животных).

Таким образом, предложенные покрытия на основе хитозана и его производных с включенными в них экстрактами лекарственных растений могут быть использованы для разработки новых эффективных покрытий для ускоренной терапии ран.

2. ПОЛИМЕРНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ В НИХ РАКОВЫМИ КЛЕТКАМИ

В микрокапсулах на основе длительного *in vitro* культивирования раковых клеток можно получать мультиклеточные раковые сфероиды, которые в дальнейшем использовать как новую *in vitro* модель малых солидных (твердых) опухолей. Такая модель может быть предложена как для изучения эффектов различных видов противораковой терапии (в том числе фотодинамической, наиболее перспективной в настоящее время), а также для исследования механизмов действия новых форм цитостатических лекарственных средств, в частности также для лечения рака. Синтезированный графт-сополимер хитозан-ПВС, который легко растворяется в физиологическом интервале рН (6,5–7,2) при комнатной температуре, является идеальным компонентом полиэлектrolитной мембраны, в которой можно длительно культивировать раковые клетки с целью получения капсулированных раковых сфероидов. Нами были разработаны и оптимизированы методы получения микрокапсул на основе данного сополимера (поликатион) и альгинат f (полианион). Продемонстрировано, что в этих микрокапсулах можно культивировать раковые линии клеток, в частности клетки мышинной миеломы SP2/0 и мышинной меланомы М3.

Использование классических методов (без капсулирования) не позволяет получить сфероиды из миеломы Sp2/0. Нами были получены сфероиды путем длительного культивирования инкапсулированных клеток (14 дней). Далее было показано, что сфероиды способны накапливать фотосенсибилизатор протопорфи-

рин-IX, который широко используется в России при фотодинамической терапии (ФДТ).

Таким образом, с использованием метода микрокапсулирования раковых клеток в микрокапсулы на основе сополимера хитозан-ПВП и альгината открывается возможность создания в будущем новой *in vitro* модели для исследования эффектов ФДТ на малые солидные опухоли. Кроме того, в отличие от существующих классических методов, метод инкапсулирования может позволить генерировать сфероиды на основе нескольких типов клеток (в том числе поверхностно-независимых), что является более адекватной моделью малых солидных опухолей *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вихорева Г.А., Зоткин М.А., Агеев В.П., Матушкина Н.Н., Кечекьян А.С. 2001. Свойства хитозановых пленок, модифицированных термообработкой // Материалы 6-й Международной конференции "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана" (Москва-Щелково, 22-24 октября 2001). С. 14-18.
2. Yan X., Khor T., Lim LY, PEC films prepared from Chitosan-Alginate coacervates // Chem Pharm Bull (Tokyo) 2000. V. 48. N 7. P. 941-946.
3. Kim HJ, Lee HC, Oh JS, Shin BA, Oh CS, Park RD, Yang KS, Cho CS. Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application // J. Biomater Sci. Polym Ed, 1999. V. 10. N 5. P. 543-556.
4. Loke W.K., Lau S.K., Yong L.L., Khor E., Sum C.K. Wound dressing with sustained anti-microbial capacity // J. Biomed. Mater. Res, 2000. V. 53. P. 8-17.
5. Ameer GA., Harmon W., Sasisekharan R., Langer R. Investigation of a whole blood fluidized bed Taylor-Couette flow device for enzymatic heparin neutralization // Biotechnol. Bioeng., 1999. V. 62. P. 602-608.
6. Alvarez O.A., Zimmerman G. Pegaspargase-induced pancreatitis // Med. Pediatr. Oncol., 2000. V. 34. P. 200-205.