

УДК 615.012.1

**МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫЕ ПРЕПАРАТЫ ГЕМИНА
НА ОСНОВЕ МИКРОЧАСТИЦ ФЕРРОКОМПОЗИТОВ
И ОЦЕНКА ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ**

**¹Комиссарова Л.Х., ¹Марнаутов Н.А., ¹Голощапов А.Н., ¹Кузнецов А.А.,
¹Ерохин В.Н., ¹Семенов В.А., ¹Никольская Т.А., ²Грин М.А., ²Митиани Л.Ш.**

¹*ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
Москва, e-mail: komissarova-lkh@mail.ru;*

²*«МИРЭА – Российский технологический университет» (РТУ МИРЭА),
Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Москва*

В работе представлены результаты по разработке методов получения магнитоуправляемых препаратов гемина и оценке их противоопухолевой активности. Магнитоуправляемые препараты гемина были получены путем иммобилизации на микрочастицах феррокомпози́тов разного химического состава: металлическое железо, железо-углерод (FeC), синтезированных плазмохимическим методом. Иммобилизация гемина проводилась на композитах с немодифицированной и модифицированной белками (альбумин, желатин) и полисахаридами (декстран) поверхностью. Изучена динамика десорбции гемина из препаратов в модельной биологической жидкости. Показано, что выход гемина происходит в виде конъюгатов с альбумином. Максимальные значения сорбционной емкости и суммарной десорбции были обнаружены для композита FeC с немодифицированной поверхностью. В опытах на мышах с карциномой Льюис обнаружено, что после интратуморального введения препарата гемина на основе композита FeC с немодифицированной поверхностью концентрацией 50 мкМ и 100 мкМ (с учетом значений суммарной десорбции) у мышей опытных групп по сравнению с контрольными объемами опухоли уменьшились на 5,0% и 10,0%, соответственно. Выживаемость мышей опытной группы (при концентрации гемина 100 мкМ) по сравнению с контрольной увеличилась на 2 суток.

Ключевые слова: магнитоуправляемые препараты гемина, микрочастицы феррокомпози́тов, модификация поверхности, иммобилизация, конъюгаты гемина, десорбция, противоопухолевая активность, карцинома Льюис у мышей

**MAGNETIC-OPERATED HEMIN PREPARATIONS
ON THE BASIS OF FERROCOMPOSITE MICROPARTICLES
AND EVALUATING THEIR ANTITUMOR ACTIVITY**

**¹Komissarova L.Kh., ¹Marnautov A.N., ¹Goloshchapov A.N., ¹Kuznetsov A.A.,
¹Erokhin V.N., ¹Semenov V.A., ¹Nikolskaya T.A., ²Grin M.A., ²Mitiani L.Sh.**

¹*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, e-mail: komissarova-lkh@mail.ru;*

²*Academy of Fine Chemical Technology of M.V. Lomonosov, Moscow*

The paper presents the results of working out methods to obtain magnetic-operated hemin preparations and evaluating their antitumor activity. The magnetic-operated hemin preparations were obtained by its immobilization on ferrocomposites microparticles of different chemical content: metallic ferrum, ferrum-carbon, synthesized by plasm-chemical method. The immobilization of hemin was carried out on composites with non-modified and modified by proteins (albumin, gelatin) surfaces. It was studied of hemin desorption dynamic from the preparations in a model biological liquid. It was shown that exit of hemin takes play in the form of the conjugates with albumin. The maximal figures of sorption capacity and summary desorption were detected for composite FeC with non-modified surface. In experiments on mice with carcinoma Luis it was discovered that after intratumoral injection of hemin preparations on base of FeC-microparticles with non-modified surface by concentration 50 mkM and 100 mkM (taking into account the summary desorption figures) the volumes of tumors in experimental groups in comparison with the control groups were reduced on 5,0% и 10,0%, accordingly. The survival of mice in experimental group (at concentration of hemin 100 mkM) was increased on two days.

Keywords: magnetic-operated hemin preparations, microparticles of ferrocomposites, modification of surface, immobilization, the conjugates hemin, desorption, antitumor activity, carcinoma Luis in mice

В литературе имеются данные по действию гемина на опухолевые клетки. Так, в работе румынских авторов [1] обнаружено, что гемин в концентрациях 10–100 мкМ тормозил пролиферацию клеток гепатом. В исследованиях российских авторов [2] обнаружена антимикробная, вирулицидная и антибактериальная активность производных гемина на клеточных культурах. По-

лученный эффект авторы связывают с окислительными свойствами гемина. Нами [3] на модельной системе было установлено, что гемин в концентрациях 50–100 мкМ в 2 и 4 раза соответственно (дозозависимый эффект) ускоряет окисление лимонена, т.е. обладает окислительной активностью. По-видимому, цитотоксическое действие гемина на опухолевые клетки *in vitro* обу-

словлено его окислительными свойствами. Представляло интерес изучить действие гемина на опухоль *in vivo* (на животных).

Цель исследования: разработка методов получения магнитоуправляемых препаратов гемина на основе микрочастиц феррокомпозигов разного химического состава, изучение десорбции гемина из препаратов в модельной биологической жидкости и оценка противоопухолевой активности препаратов на карциному Льюис у мышей.

Материалы и методы исследования

Необходимость использования носителей для создания лекарственной формы гемина связана с нерастворимостью гемина в водных растворах при физиологических значениях pH 7,0–7,4. Магнитоуправляемые препараты гемина были получены на основе микрочастиц феррокомпозигов с немодифицированной и модифицированной белками (альбумин, желатин) и полисахаридами (декстран) поверхностью. Модификация поверхности частиц проводилась по ранее отработанной нами методике [4]. Были использованы микрочастицы феррокомпозигов: железо-углерод (FeC) с различным содержанием железа и углерода с размером частиц 0,2–2 мкм, полученные методом низкотемпературного пиролиза [5], а также порошок металлического железа с размером частиц 0,6 мкм.

Подготовка феррокомпозигов для иммобилизации гемина

Поскольку частицы композигов в растворе агрегируют, для получения однородной по размерам суспензии проводили ультразвуковое диспергирование суспензии на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-Т при частоте излучения 22 кГц, силе тока 50 мА в течение 5–10 минут при температуре 3–5 °С. Для хранения использовали композизиты в виде суспензии концентрацией 50–10 мг/мл в 0,85 % NaCl (pH 7,4).

Модификация поверхности композигов альбумином, желатином и декстраном

Для покрытия композигов альбумином и желатином использовали 0,1 % растворы человеческого альбумина и желатина (фирмы Fluca) в 0,85 % NaCl (pH 7,4). Суспензии композигов 10 мг/мл и белков озвучивали на УЗДН-Т при 22 кГц в течение 2 мин и инкубировали при температуре 20 °С 90 мин при перемешивании, осаждали на Sm-Co магните индукцией 0,15 Тл. Осадок ресуспендировали в 0,85 % NaCl. К суспензии покрытых белками композигов добавля-

ли раствор формальдегида, инкубировали в течение 15 мин и отмывали дистиллированной водой от избытка формальдегида. Полученный осадок ресуспендировали в 0,85 % NaCl. Для покрытия частиц декстраном использовали 0,1 % декстран (Mm 40 тыс. Da, фирма SIGMA) в 0,85 % NaCl. Инкубацию проводили в течение 1 ч, осаждали на Sm-Co магните и отмывали от избытка декстрана.

Получение магнитоуправляемых препаратов гемина

Иммобилизация гемина (фирма Fluca) проводилась из щелочных растворов при весовых соотношениях композит/гемин: 10/1, 5/1 и 2/1 путем инкубации гемина в концентрации и 1 мг/мл в 0,05 N NaOH (pH 11,5) и суспензии композигов 10 мг/мл в NaCl в течение 60–90 минут при комнатной температуре (20–22 °С). Затем частицы с гемином осаждали на Sm-Co магните и в супернатанте определяли количество гемина. Расчет концентрации гемина проводился по калибровочной прямой путем определения оптической плотности супернатанта при 390 нм. Опыты повторяли не менее 5-и раз, для каждого опыта рассчитывали среднее значение и средне-квадратичное отклонение. Осадки использовали для десорбции в модельной биологической жидкости: раствор 0,6 % альбумина в 0,85 % NaCl (pH 7,4).

Динамика десорбции гемина из магнитоуправляемых препаратов

К осадкам композигов с иммобилизованным гемином приливали по 2 мл 0,6 % альбумина в 0,85 % NaCl (pH 7,4) и проводили десорбцию при 37 °С в течение 7 ч с периодическим осаждением суспензии частиц, сливом супернатанта для взятия проб на определение концентрации десорбированного гемина и добавлением новой порции 0,6 % альбумина к осадкам. Расчет концентрации десорбированного гемина проводился по калибровочной прямой путем определения оптической плотности супернатанта при 390 нм. Опыты повторяли не менее пяти раз, для каждого опыта рассчитывали среднее значение и средне-квадратичное отклонение.

Оценка действия препаратов гемина на карциному Льюис у мышей

Опыты проводились на мышах (самцах) линии F1(C57xDBA) весом 20–22 г. Суспензию опухолевых клеток карциномы Льюис в концентрации $14,5 \times 10^6$ клеток в 1 мл вводили мышам внутримышечно (в бедро правой лапы) по 0,2 мл в физиологическом

растворе. Животные делились на группы (по 7 мышей в каждой группе): 1 – контроль (развитие опухоли без воздействия). Группы 2, 3 и 4 – опытные. Мышам 1 и 2 групп интратуморально вводили по 0,2 мл физиологического раствора и 0,2 мл суспензии микрочастиц FeC концентрацией 10 мг/мл в физиологическом растворе соответственно. Мышам 3, 4 групп – суспензию препарата гемина, иммобилизованного на микрочастицах FeC концентрацией 50 мкМ и 100 мкМ (с учетом значений суммарной концентрации гемина после 6-часовой десорбции) соответственно. После введения суспензии магнитных частиц к мышам 2, 3 и 4 групп к опухоли на 5 мин прикладывали Sm-Co магниты индукцией 0,15Тл. В предварительных опытах нами было показано, что однократное приложение магнита к опухоли после интратуморального введения суспензии магнитных частиц на 3–5 мин позволяет создать депо частиц в области опухоли не менее, чем на 1 сутки. Через 12 суток после трансплатации в опытных и контрольной группах определяли объем внутримышечной опухоли на основе трёх взаимно перпендикулярных измерений размеров опухоли и на протяжении последующих двух недель число погибших животных.

Результаты исследования и их обсуждение

Было определено оптимальное время инкубации гемина с композитами для достижения максимальной сорбционной емкости по гемину, которое составило ≥ 90 мин. Результаты сорбционной эффективности (% адсорбции и сорбционная емкость) же-

лезо-углеродного композита и микрочастиц Fe по гемину представлены в табл. 1 и 2.

Из данных табл. 1 видно, что модификация поверхности FeC-композитов желатином и желатином с формальдегидом, а также с декстраном приводит к снижению сорбционной эффективности по гемину, т.е. физическая адсорбция гемина (в поры сорбента) является более эффективной, чем иммобилизация путем конъюгации желатина и декстрана с геминем. Сорбционная эффективность микрочастиц Fe к гемину возрастает после модификации их поверхности альбумином (табл. 2), так как преобладающую роль в данном случае, по-видимому, играет образование конъюгатов между ионогенными группами альбумина и гемина, что подтверждается характером спектров взаимодействия гемина с альбумином (рис. 1).

При взаимодействии гемина с альбумином (рис. 1) наблюдается сдвиг максимума поглощения продукта реакции в длинноволновую область (пик в области 400 нм), что подтверждает наше предположение об образовании конъюгатов гемина с альбумином (желатином) при иммобилизации гемина на микрочастицах железа, покрытых белками и соответствует данным работы [6], в которой обнаружено образование конъюгатов гемина с альбумином и показано, что реакция носит обратимый характер. Аналогичный характер спектральных характеристик гемина обнаружен и при взаимодействии гемина с желатином. Очевидно, образование конъюгатов гемина происходит за счет взаимодействия между пропионовокислыми группами гемина и аминокгруппами белков.

Таблица 1

Сорбционная эффективность к гемину FeC-композита марки 290/4-F (Fe-56%, C-44%)

Сорбционная эффективность	Весовое отношение композит/гемин	Модификация поверхности композита			
		не модиф.	модиф. жел.	модиф.ж. + формальд.	модиф. декстраном
Сорбция, % (M ± m)	10/1	78,4 ± 8,4	75 ± 7,7	69,4 ± 6,8	59 ± 5,7
	2/1	25,4 ± 1,8	23,4 ± 1,4	16,8 ± 1,2	19,4 ± 1,9
Сорбционная емкость, мг/г (M ± m)	10/1	78,4 ± 8,4	75 ± 7,7	69,4 ± 6,8	59 ± 5,7
	2/1	127,0 ± 9,0	117,0 ± 7,0	84,0 ± 6,0	97,0 ± 9,5

Таблица 2

Сорбционная эффективность к гемину микрочастиц железа

Сорбционная эффективность	Весовое отношение Fe / гемин	Модификация поверхности микрочастиц			
		Fe, не модиф.	Fe, модиф. альб.	Fe, модиф. альб. + формальд.	Fe, модиф. декстр.
Сорбция, % (M ± m)	10/1	27,8 ± 2,2	34,1 ± 2,3	58,6 ± 6,9	44,7 ± 5,0
	2/1	21,9 ± 1,7	27,5 ± 1,9	33,6 ± 2,1	12,3 ± 1,1
Сорбционная емкость, мг/г (M ± m)	10/1	27,8 ± 2,2	34,1 ± 2,3	58,6 ± 6,9	44,7 ± 5,0
	2/1	109,4 ± 8,5	137,5 ± 9,5	168,0 ± 11,5	61,5 ± 5,5

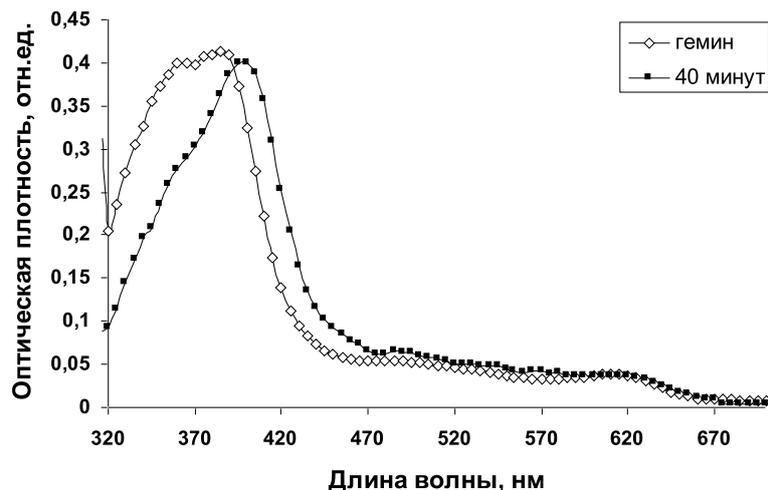


Рис. 1. Спектры поглощения гемина после инкубации с альбумином (среда: 0,85% NaCl + 0,05 N NaOH, pH 8,5 T 37°C). Концентрации в кювете: гемин – 0,01 мг/мл, альбумин – 2мг/мл

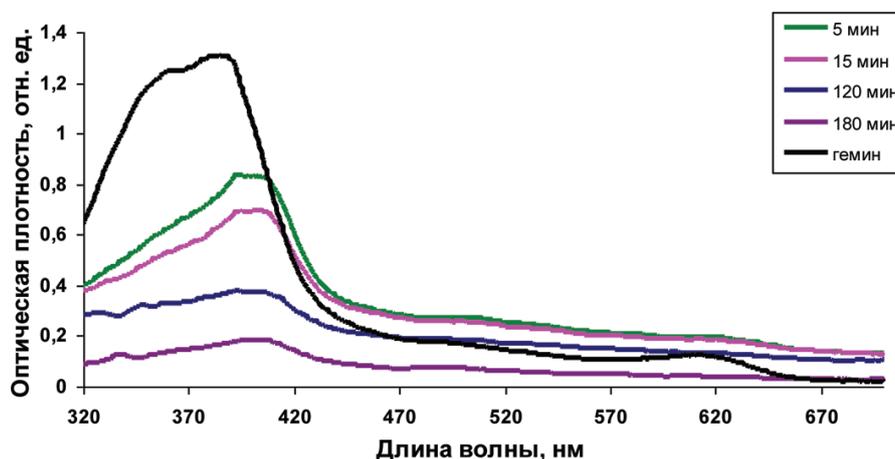


Рис. 2. Спектры поглощения гемина после десорбции из микрочастиц железа, покрытых желатином. Концентрация гемина в кювете 0,018 мг/мл (среда: 0,6% альбумин в 0,85% NaCl, pH 7,4)

На рис. 2 представлены спектры поглощения гемина после десорбции из микрочастиц железа, покрытых желатином.

При десорбции гемина, иммобилизованного на микрочастицах железа, покрытых желатином (рис. 2), отмечается сдвиг максимума поглощения продукта реакции в длинноволновую область (пик в области 400 нм), что свидетельствует об образовании конъюгатов гемина с альбумином. Очевидно, имеет место переход гемина из конъюгатов с желатином, покрывающих поверхность микрочастиц, в раствор с образованием конъюгатов с альбумином. Характер динамики десорбции гемина из композитов с немодифицированной и модифицированной поверхностью одинаков:

через 5–15 мин инкубации скорости десорбции замедляются. Так, скорость десорбции гемина из препаратов FeС с немодифицированной поверхностью идет наиболее эффективно в первые 5 мин инкубации, из препаратов Fe и FeС с модифицированной белками поверхностью в первые 10–15 мин инкубации (рис. 2). Кривая суммарной десорбции выходит на плато через 5–6 ч для всех типов сорбентов.

В табл. 3 представлены результаты по показателям адсорбции и суммарной десорбции гемина, иммобилизованного на микрочастицах феррокомпозитов, при различных способах модификации поверхности через 6 ч инкубации (суммарная десорбция) в модельном биологическом растворе.

Таблица 3

Показатели адсорбции и суммарной десорбции гемина из магнитоуправляемых препаратов через 6 ч инкубации в модельном биологическом растворе (0,6% альбумин в 0,85% NaCl, pH 7,4)

Сорбционная эффективность	Типы сорбентов					
	FeC	FeC + альб.	FeC + жел.	Fe + жел.	Fe + жел. + формальд.	Fe + декст.
Сорбц. емкость мг/г	127,0 ± 9,1	119,7 ± 8,1	117,1 ± 8,7	137,5 ± 9,5	168,0 ± 11,3	66,5 ± 5,5
Десорб. %	79,4 ± 7,1	41,6 ± 3,9	58,3 ± 4,7	74,8 ± 6,7	4,2 ± 0,8	3,0 ± 0,6

Как видно из таблицы, величина суммарной десорбции зависит от типа сорбента и модификации поверхности. Так, в случае десорбции гемина, иммобилизованного на железо-углеродном композите, значение десорбции составляет 79,4%, для композита, покрытого альбумином, соответствующее значение составляет 41,6%. Десорбция из препаратов на основе микрочастиц железа, модифицированных желатином с формальдегидом и декстраном, практически не идет, что может быть обусловлено образованием устойчивых конъюгатов гемина, разрыв которых энергетически затруднен. Исходя из данных табл. 3, для интратуморального введения мышам был выбран препарат гемина, полученный иммобилизацией на железо-углеродном композите с немодифицированной поверхностью, имеющий высокие значения сорбционной емкости 127,0 мг/г и десорбции 79,4%.

Результаты оценки противоопухолевой активности магнитоуправляемого препарата гемина на карциноме Льюис у мышей

Обнаружено, что через 12 суток после трансплантации у мышей опытных групп (3 и 4) после интратуморального введения препарата гемина на основе композита FeC концентрацией 50 мкМ и 100 мкМ (с учетом значений суммарной десорбции) объемы опухоли уменьшились на 5,0% и 10,0% соответственно, по сравнению с контрольными группами (1 и 2). Выживаемость мышей в группе 4 (при концентрации гемина 100 мкМ) по сравнению с группами 1, 2 и 3 увеличилась на 2 суток.

Заключение

Результаты оценки противоопухолевой активности препаратов гемина, полученных на основе микрочастиц феррокомпозитов, на карциноме Льюис у мышей свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших исследований противоопухо-

левого действия препаратов гемина, иммобилизованного на магнитных носителях. Использование синтезированных нами наночастиц магнетита [7] в качестве основы для создания магнитоуправляемых препаратов гемина позволит осуществить внутривенное введение препарата и создать его депо в клетках опухоли, вследствие чего можно ожидать значительную противоопухолевую активность препаратов гемина по сравнению с препаратами на основе микрочастиц магнетита.

Список литературы / References

1. Diaconu C.C., Szathmari M., Venetianer A. Atiproliferative and apoptosis-inducing effects of hemin in hepatoma cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003. V.10. P. 311–315.
2. Небельсин А.Е., Желтухина Г.А., Окороченков С.А. Производные гемина, обладающие антимикробной активностью, или их фармацевтически приемлимые соли, способ получения, фармацевтическая композиция, применение. Патент РФ № 2415868. 2010. Опубликовано 10.08.2011.
3. Комиссарова Л.Х., Грин М.А., Комарова М.А., Касакина О.Т. Влияние гемина на жидкофазное окисление лимонена // Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты: тезисы всероссийской конференции. М., 2008. С. 27–28.
4. Komissarova L.H., Green M.A., Komarova M.A., Kasaikina O.T. Influence of hemin on liquid-phase oxidation of citrene // Oxidation, Oxidizing Stress, Antioxidants: theses of the All-Russian conference. M., 2008. P. 27–28 (in Russian).
5. Самойлов И.Б., Комиссарова Л.Х., Кузнецов и др. Способ получения ферромагнитного углеродного сорбента. Патент РФ № 2547740. 2014. Опубликовано 12.02.2015.
6. Komissarova L.Kh., Feofanov V.S. Use of micro-sized ferrocomposites particles for immobilization of biologically active compounds // Chemical Technology. Apple Academic Press. 2015. March. P. 54–66.
7. Grinberg L.N., Brien P.J., Hrkal Z. The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalytic activities of hemin // Free Radical in Biology and Medicine. 1999. № 6. P. 214–219.
8. Комиссарова Л.Х., Татиколов А.С., Марнаутов Н.А., Ерохин В.Г., Семенов В.А., Ларкина Е.А., Скорая Ю.А., Барина О.П., Васильков О.О., Елфимов А.В. Оптимизация метода массарта для получения биосовместимых наночастиц магнетита с заданными размерами // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2016. № 1–2. С. 44–47.
9. Komissarova L.Kh., Tatikolov A.S., Marnautov N.A., Erohin V.N., Semenov V.A., Larkina E.A., Skoraya Yu.A., Barinova O.P., Vasilkov O.O., Elfimov A.B. Optimizing Massart Method for Obtaining Biocompatible Magnetite Nanoparticles of Given Sizes // Aktual'ny'e voprosy biologicheskoy fiziki i khimii. 2016. № 1–2. P. 44–47 (in Russian).