

УДК 57.083.3

©Коллектив авторов

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПРОНИКНОВЕНИЯ ИВЕРМЕКТИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО КОРПУСКУЛЯРНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ

*Д.В. Пристенский¹, С.А. Староверов¹, Д.Н. Ермилов²,
С.Ю. Щеголев¹, Л.А. Дыкман^{1*}*

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049,
Саратов, просп. Энтузиастов, 13; тел./факс: (8452) 970383;
эл. почта: dykman@ibppm.sgu.ru

²ЗАО “Нита-Фарм”

Исследовано проникновение ивермектина, адсорбированного на поверхности частиц коллоидного золота или заключенного в мицеллы, в фагоцитарные клетки иммунной системы. Выявление препарата в клетках проводили иммунохимически с использованием мини-антител к ивермектину, полученных из комбинаторной фаговой библиотеки, и хроматографически на HPLC-системе “Стайер”. Установлено, что более интенсивно накапливается в клетках ивермектин, адсорбированный на частицах коллоидного золота.

Ключевые слова: ивермектин, коллоидное золото, мицеллы, адресная доставка лекарств, фаговые миниантитела, флуоресцентная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ. Проблема доставки низкомолекулярных веществ внутрь клеток животного организма является актуальной с общепромышленной и медицинской точки зрения. Для того, чтобы взаимодействовать со своим рецептором, молекула вещества должна иметь соответствующий размер, заряд, форму и структуру. Более того, препарат часто вводят в место, удаленное от области осуществления его действия. Поэтому активное вещество должно удовлетворять условиям транспорта от места введения к месту действия. Наконец, лекарство должно выводиться из организма со скоростью, обеспечивающей продолжительность и эффективность его действия [1].

Рациональным решением этой проблемы может стать разработка новых лекарственных форм, обладающих более высокой биодоступностью и (при необходимости) пролонгированным действием. Кроме того, должна быть обеспечена возможность направленного транспорта лекарственного вещества. То есть способность лекарства накапливаться в клетке быстро и селективно, независимо от места и способа его введения. Локальная концентрация вещества в области его действия должна быть достаточно большой, а содержание в иных органах и тканях – относительно малым, чтобы не вызывать побочных реакций [2].

Одним из вариантов решения этой проблемы может стать использование корпускулярных носителей в качестве формообразующего агента для низкомолекулярного вещества. Среди них особое внимание исследователей привлекают

*Адресат для переписки

в настоящее время мицеллообразующие системы и взвеси частиц благородных металлов (в том числе, коллоидного золота, КЗ) нанометрового диапазона.

Согласно современным представлениям, мицеллами называют ассоциаты из длинноцепочечных дифильных молекул или ионов поверхностно-активных веществ (ПАВ), образующиеся самопроизвольно в их растворах при определенной концентрации. Последняя зависит от природы полярной группы, особенно от длины цепи молекулы. Образование мицелл происходит при кооперативном не ковалентном связывании между собой молекул ПАВ при концентрациях, превышающих довольно узкую область вблизи так называемой критической концентрации мицеллообразования. При этом в растворе возникает достаточно большое число мицелл, находящихся в термодинамическом равновесии с растворенными молекулами (ионами), и резко изменяется ряд свойств полученной взвеси по сравнению с исходным раствором [3].

Мицеллы не имеют макроскопического аналога, а размер частиц в дисперсных системах этого типа ограничен довольно сложным механизмом процесса мицеллообразования. Переход к относительно большим размерам может быть обусловлен процессом агрегации образовавшихся мицелл с появлением еще одного минимума на кривой распределения частиц по размерам, связанным с формированием зародышей жидкокристаллической фазы.

Полимеры и ПАВ нашли применение в технологии производства лекарственных средств в качестве вспомогательных веществ – пролонгаторов, эмульгаторов и т.д. Кроме того, исследования последних лет показали перспективность их использования в качестве систем эффективного направленного транспорта высоко- и низкомолекулярных веществ [4, 5].

Начиная с 1971 г. конъюгаты КЗ с иммуноглобулинами традиционно используются в иммуноцито- и гистохимических исследованиях как маркеры для электронной микроскопии. Кроме традиционной области применения – просвечивающей электронной микроскопии, КЗ стало широко использоваться в методах сканирующей электронной микроскопии, световой микроскопии, различных вариантах зондовой микроскопии, твердофазном анализе, анализе на частицах золя, проточной цитометрии, иммунодиффузии, иммунопреципитации и др. [6].

Золотые наночастицы применяют также в качестве носителя для гаптенов при иммунизации животных [7, 8] и нуклеиновых кислот при использовании в составе ДНК-вакцин [9]. Кроме того, наночастицы золота применяются для изучения транспорта веществ в клетку путем эндоцитоза [10] (в том числе в лимфоидные клетки [11, 12]), для доставки генетического материала в клеточное ядро методом баллистической трансфекции [13], для адресной доставки лекарственных веществ [14, 15] и т.п.

Целью нашей работы было сравнительное исследование накопления лекарственного препарата, иммобилизованного отмеченными выше коллоидными носителями двух типов, в лейкоцитах животных. В качестве такого препарата был использован ивермектин – макроциклический лактон, связанный с двумя остатками моносахаридов, противопаразитарного действия, который представляет собой смесь дигидропроизводных авермектинов B_{1a} и B_{1b} , вырабатываемых грибами *Streptomyces avermitilis*. Препараты, содержащие в качестве активного вещества ивермектин, широко распространены как в растениеводстве, так и в ветеринарии благодаря их широкому спектру действия на вредителей растений и паразитов животных [16-19].

МЕТОДИКА. Получение конъюгата ивермектин/коллоидное золото. Ивермектин является слабо растворимой субстанцией (растворимость в воде ≈ 1 мкг/л). Поэтому для получения истинных растворов ивермектина необходимо применение органических растворителей в качестве стабилизирующих добавок. С этой целью нами был использован диметилацетамид (ДМА). Минимальная стабилизирующая концентрация ДМА в растворе ивермектина с концентрацией 1 мг/мл составила 55%.

КЗ со средним диаметром частиц 15 нм (КЗ 15) получали по методу Frens [20]. Далее было определено “золотое” число для ивермектина. Для этого в 96-луночной планшете для микротитрования двукратно по 20 мкл раститровывали раствор ивермектина в 55% ДМА с начальной концентрацией 1 мг/мл. В качестве растворителя при титровании использовали дистиллированную воду. В каждую лунку добавляли по 200 мкл КЗ 15 и по 2 мкл 1 М раствора хлорида натрия. Минимальная стабилизирующая концентрация ивермектина составляла 1 мг/мл (1-я лунка). Исходя из полученных результатов, приготовили конъюгат ивермектина с КЗ. Для этого к 2 мл КЗ 15 добавляли 200 мкл раствора ивермектина с концентрацией 1 мг/мл в 55% ДМА и тщательно перемешивали. Конечная концентрация ивермектина в конъюгате была 91 мкг/мл.

Кроме того, в экспериментах использовали инъекционный препарат ивермектина, полученный при введении активного вещества, растворенного в органическом растворителе, в мицеллярную основу, состоящую из неионогенного поверхностно активного вещества в воде.

Получение конъюгата ивермектина с белком. Конъюгаты ивермектин/белок получали по методу, предложенному в работе [21]. В 3-х мл пиридина растворяли 110 мг ивермектина, добавляли 50 мг янтарного ангидрида и кипятили 24 ч. После охлаждения пиридин отгоняли под вакуумом на роторном испарителе. Остаток растворяли в 20 мл этилацетата и промывали 0,025 М соляной кислотой. Промытую органическую фазу сушили сульфитом натрия и упаривали на роторном испарителе. Полученное масло перекристаллизовывали из водно-метанольной фазы. Выпавший в виде кристаллического осадка 5-*о*-сукциноил-ивермектин высушивали.

Далее полученное производное ивермектина – 5-*о*-сукциноил-ивермектин – сшивали с белком (овальбумином). Для чего 15 мг 5-*о*-сукциноил-ивермектина растворяли в 1 мл пиридина, добавляли 5 мг N-гидроксисукцинимид и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. Затем к полученному раствору добавляли 15 мг карбодиимида и выдерживали еще 5 мин при комнатной температуре. К полученной смеси добавляли 20 мг белка, предварительно растворенного в 3 мл 1 мМ ацетата натрия, и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Смесь диализовали в течение ночи при комнатной температуре против 0,15 М хлорида натрия. Полученный конъюгат разливали в пробирки по 200 мкл и замораживали.

Получение специфичных миниантител. Селекция клонов мини-антител, специфически реагирующих с ивермектином, проводилась с использованием овечьей комбинаторной фаговой библиотеки, любезно предоставленной профессором W.J. Harris (Aberdeen, UK) [22]. В качестве твердой фазы для закрепления антигенов (конъюгатов ивермектина с овальбумином) использовали нитроцеллюлозную мембрану (НЦ). Сорбцию проводили в течение ночи при +4°C. Затем на мембране инактивировали свободные сайты связывания 5% раствором овальбумина в трис-HCl буфере с добавлением NaCl (TBS) и твина (TBS-T). После инкубации НЦ тщательно отмывали TBS-T и TBS и элюировали связавшиеся с ивермектином фаги раствором триэтиламина.

Полученный элюат инокулировали в 50 мл среды 2YT с 0,5% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, содержащей суспензии клеток *E. coli* XL1 с образовавшимися F-пилиями в экспоненциальной фазе роста. Культуру растили в течение ночи при 37°C с интенсивной аэрацией. После этого 1/10 часть ночной культуры пересевали в свежую среду 2YT с 0,5% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина и растили до экспоненциальной фазы роста при 37°C с интенсивной аэрацией и выдерживали в термостате при 37°C 30 минут для восстановления F-пилий. Затем к культуре добавляли 20-ти кратное количество хелперного фага M13K07, несущего ген устойчивости к канамицину, и повторно культивировали в среде 2YT с 25 мкг/мл канамицина, 100 мкг/мл ампициллина и 100 мкл спиртового раствора изопропилтиогалактозида (IPTG). Культуру растили при 30°C с интенсивной аэрацией (200 об/мин) в течение ночи.

ИВЕРМЕКТИН, ИММОБИЛИЗОВАННЫЙ КОРПУСКУЛЯРНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ

Для определения степени обогащения в процессе селекции высевали после каждого раунда 1/10000 часть (20 мкл) инфицированных клеток на твердую агаризованную среду 2YT с 100 мкг/мл тетрациклина и 100 мкг/мл ампициллина. Бактерии растили в перевернутых вверх дном чашках Петри в термостате при 37°C в течении ночи. Наутро подсчитывали колонии и определяли степень обогащения. Количество фагов после третьего раунда составило $3,75 \times 10^7$ в мл, после четвертого – $3,38 \times 10^7$ в мл. Культуру клеток *E. coli*, содержащую рекомбинантную плазмиду pHEN1 и фаг M13K07, выращенную в течение ночи, центрифугировали при 6000 g в течение часа. К супернатанту добавляли 1/5 объема полиэтиленгликоля (ПЭГ)/NaCl (20% ПЭГ, 2,5 M NaCl) и инкубировали 1 час при 4°C. После центрифугирования образовавшийся осадок фаговых частиц суспендировали в 2 мл трис-буфера pH 7,4. Нерастворимые агрегаты отделяли центрифугированием и определяли титр фаговых частиц после трансдукции и посева на агаризованную среду с ампициллином, тетрациклином и канамицином. Специфичность фагов определяли с помощью иммуно-дот метода на НЦ мембране.

Получение перитонеальных макрофагов. Перитонеальные макрофаги выделяли из брюшной полости крыс. Усыпленным хлороформом крысам внутрибрюшинно вводили 10 мл среды для выделения клеток (среда 199 + 2% лошадиной сыворотки + 100 ед. гепарина + 100 ед. пенициллина) и выдерживали 1 мин, массируя брюшко. Затем вскрывали брюшную полость крысы и собирали введенную среду со смытыми макрофагами. Клетки осаждали при 490 g в течение 30 мин и отмывали 3 раза средой для отмывания клеток (среда 199 + 2% лошадиной сыворотки + 100 ед. пенициллина). Далее клетки ресуспендировали в среде для культивирования (среда 199 + 10% лошадиной сыворотки + 100 ед., пенициллина). Лейкограмму выделенных клеток определяли на геманализаторе “Arkus” (Австрия).

Получение лимфоцитов. Лимфоидные клетки получали из периферической крови телят. Периферическую кровь центрифугировали при 180 g в течение 30 мин, после чего отбирали плазму. Полученную плазму разводили раствором Хенкса 3:1. Разбавленную плазму наслаивали на фикол-верографин, не нарушая границу раздела плазма/фикол, и центрифугировали при 180 g в течение 30 мин.

После центрифугирования собирали образовавшееся кольцо мононуклеарных клеток в отдельную пробирку, разбавляли раствором Хенкса 1:1 и осаждали клеточную фракцию при 700 g в течение 10 мин. Осадок отмывали раствором Хенкса 1:7 от фикол-верографина, осаждая клеточную фракцию в том же режиме. Осадок с остатком супернатанта в суммарном объеме 1 мл разводили средой для получения лимфоцитов (среда 199 + 5% лошадиной сыворотки + 0,1% желатина) 1:1, осаждали при 320 g в течение 10 мин и полученный осадок ресуспендировали в той же среде. Лейкограмму выделенных клеток определяли на геманализаторе “Arkus” (Австрия).

Инкубация антигенов с лейкоцитами. Исследуемый АГ инкубировали с лейкоцитами в течение 3 ч в термостате при 36°C. После окончания инкубации, клетки трижды отмывали холодным физиологическим раствором для удаления не поглощенного АГ. После отмывки клетки суспендировали в 200 мкл физиологического раствора. В полученной клеточной суспензии измеряли количество накопившегося ивермектина методом ВЭЖХ, а также готовили мазки.

Хроматографическое определение количества поглощенного ивермектина. Для определения количества поглощенного клетками ивермектина путем ВЭЖХ, отмытую клеточную суспензию обрабатывали ультразвуком 2 раза по 2 мин. К полученной смеси добавляли 500 мкл метанола и центрифугировали в течение 30 мин при 3000 g. Супернатант использовали для хроматографического анализа.

Хроматографический анализ проводили при следующих параметрах:

колонка – Luna C18(2) 5 мкм 150×2,00 мм, элюент – ацетонитрил/вода – 75/25, скорость потока – 500 мкл/мин, детектор – UV детектор, $\lambda = 245$ нм, объем инжестируемой пробы – 20 мкл.

При подсчете учитывали площадь хроматографического пика ивермектина В_{1а}. Расчет концентрации ивермектина в лизате клеток проводили по уравнению калибровочной зависимости, построенной с помощью стандартных растворов ивермектина с концентрациями 1 мкг/мл, 10 мкг/мл и 50 мкг/мл.

Микроскопическое исследование. Из 50 мкл клеточной суспензии готовили мазки. Готовые мазки промывали холодным ацетоном. После высыхания мазки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) pH 7,2. Полученные мазки инкубировали с суспензией специфичных фагов, предварительно разведенной в PBS pH 7,2, в течение 1 ч и промывали PBS pH 7,2. Затем инкубировали с раствором антифаговых кроличьих антител, предварительно разведенных в PBS pH 7,2, в течение 1 ч и промывали PBS pH 7,2. Инкубировали с раствором 1:100 в PBS pH 7,2 антикроличьих антител, меченных ФИТЦ, в течение 1 ч. Промывали PBS pH 7,2. Высушенные мазки микроскопировали на люминесцентном микроскопе Leica DMLB (ФРГ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В результате проведенных экспериментов было установлено следующее. При использовании ивермектина, конъюгированного с КЗ как носителем, наибольшая концентрация препарата определялась в перитонеальных макрофагах крыс. Для лимфоцитов цельной крови телят наблюдалось существенное снижение количества препарата в клеточной популяции (таблица).

Таблица. Концентрация ивермектина внутри лимфоидных клеток.

вид конъюгата / вид клеток	внесено ивермектина, мкг	найденно ивермектина, мкг × 10 ⁸ /л
конъюгат ивермектин+КЗ / перитонеальные макрофаги	45,5	37,13
конъюгат ивермектин+КЗ / лимфоциты цельной крови	45,5	0,63
мицеллярный препарат ивермектина / перитонеальные макрофаги	45,5	2,25
мицеллярный препарат ивермектина / лимфоциты цельной крови	45,5	0,2

При использовании перитонеальных клеток крыс нами отмечена следующая лейкограмма: лимфоцитов 30%, гранулоцитов 60%, моноцитов 10%. В цельной крови телят мы наблюдали следующую картину: лимфоцитов 75%, гранулоцитов 20%, моноцитов 5%.

Наибольшая концентрация ивермектина была обнаружена при использовании КЗ как носителя низкомолекулярного вещества, что говорит о более эффективном проникновении данной структуры во внутриклеточное пространство.

Определив концентрацию низкомолекулярного вещества в клеточной популяции, мы поставили перед собой вопросы: как данное вещество распределено в клеточном пространстве? Остается ли данная структура на поверхности клеточной мембраны или проникает во внутриклеточное пространство?

Для ответа на эти вопросы были проведены цитохимические исследования препаратов, приготовленных из перитонеальных макрофагов, культивируемых в присутствии КЗ или мицеллярных систем.

ИВЕРМЕКТИН, ИММОБИЛИЗОВАННЫЙ КОРПУСКУЛЯРНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ

На рисунке 1 показана перитонеальная клетка после культивирования в присутствии ивермектина, адсорбированного на частицах КЗ.

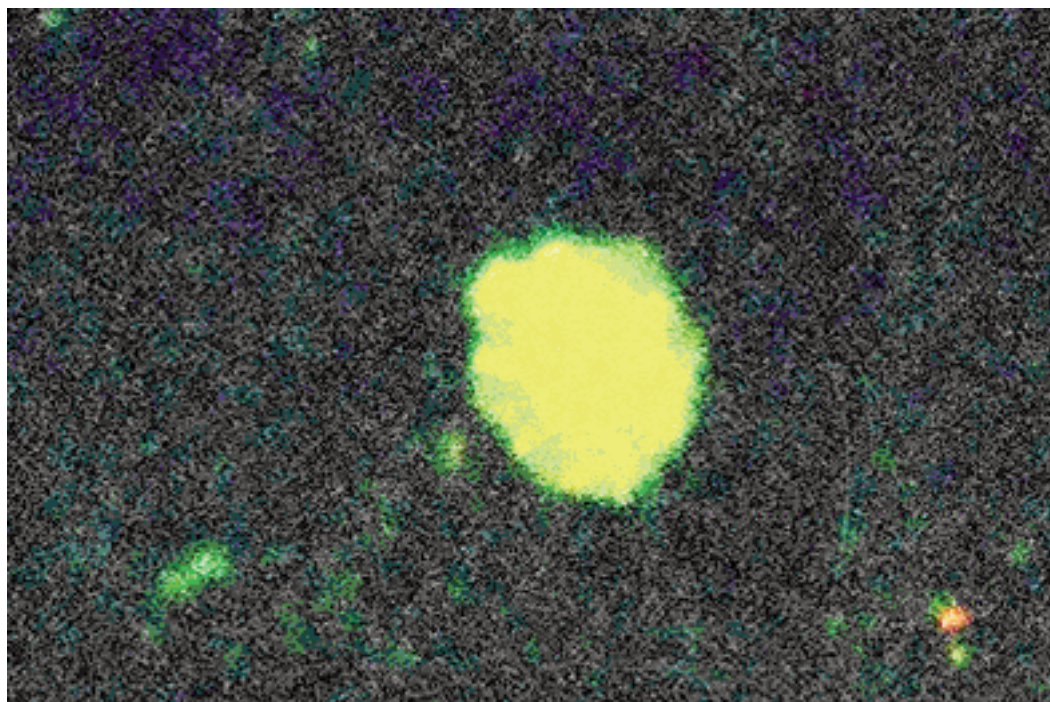


Рисунок 1.

Перитонеальная клетка, культивированная в присутствии ивермектина, адсорбированного на частицах КЗ.

После культивирования клеток с КЗ в них выявляли накопившийся ивермектин при помощи миниантител. На наличие ивермектина в клетках указывало желтое свечение.

При культивировании клеток с ивермектином, заключённым в воднодисперсную систему, нами также микроскопически фиксировалось проникновение препарата внутрь клетки (рис. 2).

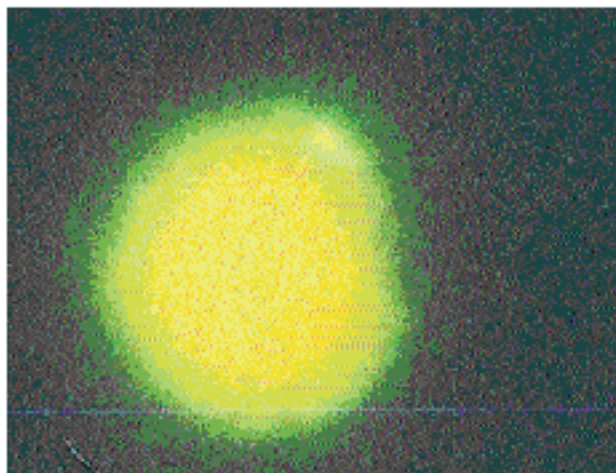


Рисунок 2.

Перитонеальная клетка, культивированная в присутствии мицеллярной формы ивермектина.

Чтобы определить локализацию исследуемых веществ в клетках, мазки перед окраской обрабатывали холодным ацетоном 2-3 минуты для разрушения липидного слоя клеточных мембран. Обработывая клетки ацетоном, мы проводили снятие мембранного слоя со связавшимся с ним ивермектином, тем самым убирая препарат с клеточной поверхности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. При культивировании перитонеальных клеток с ивермектином происходит его накопление во внутриклеточном пространстве при применении в качестве носителя как КЗ, так и мицелл.

2. При использовании КЗ как носителя накапливается большее количество лекарственного вещества в клетках.

3. Снижение количества препарата внутри клеточной популяции при использовании лимфоцитов, выделенных из цельной крови телят, по-видимому, указывает на фагоцитарный способ проникновения носителей с адсорбированным на нем низкомолекулярным веществом.

Данная работа частично поддержана грантами МНТЦ (№ 2426) и РФФИ (№ 04-04-48224).

ЛИТЕРАТУРА

1. Lin J.H., Lu A.H.Y. (1997) Pharm. Rev., **49**, 403-449.
2. Торчилин В.П., Клибанов А.Л. (1987) Росс. хим. журн., **32**, 502-514.
3. Osborne D.W., Ward A.J.I., O'Neill K.J. (1988) Drug Dev. Ind. Pharm., **14**, 1203-1219.
4. Constantinides P.P., Yiv S.H. (1995) Int. J. Pharm., **115**, 225-234.
5. Garti N., Aserin A. (1996) in: Microencapsulation: Methods and Industrial Applications (S. Benita ed.) Marcel Dekker Inc., New York, pp. 501-519.
6. Hayat M.A. (1989) Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications, Academic Press, San Diego.
7. Shiosaka S., Kiyama H., Wanaka A., Tohyama M. (1986) Brain Res., **382**, 399-403.
8. Дыкман Л.А., Сумарока М.В., Староверов С.А., Зайцева И.С., Богатырев В.А. (2004) Известия АН, Сер. биол., **31**, 86-91.
9. Thomas M., Klibanov A.M. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 9138-9143.
10. Andreu E.J., de Llano J.J.M., Moreno I., Knecht E. (1998) J. Histochem. Cytochem., **46**, 1199-1202.
11. Kruth H.S., Chang J., Ifrim I., Zhang W.Y. (1999) Eur. J. Cell Biol., **78**, 91-99.
12. Dyakonova V.A., Dambaeva S.V., Pinegin B.V., Khaitov R.M. (2004) Int. Immunopharmacol., **4**, 1615-1623.
13. Зеленин А.В. (2001) Вестник РАН, **71**, 387-395.
14. Uyas S.P., Sihorkar V. (2000) Adv. Drug Delivery Rev., **43**, 101-164.
15. Paciotti G.F., Myer L., Weinreich D., Goia D., Pavel N., McLaughlin R.E., Tamarkin L. (2004) Drug Deliv., **11**, 169-183.
16. Brownlee D.J.A., Holden D.Y.E., Walker R.J. (1997) Parasitology, **115**, 553-561.
17. Roy S., Ghosh R.C., Misra O.P. (1991) Indian J. Anim. Health, **30**, 131-135.
18. Panadero R., Lopez C., Mezo M., Morrondo P., Diez-Banos P. (1997) Vet. Parasitol., **73**, 325-334.
19. Викторов А.В., Тер-Симонян В.Г., Апенянская Л.М., Дриняев В.А., Кругляк Е.Б., Довгалеvская Е.П., Мосин В.А., Стерлина Т.С., Юркив В.А. (1996) Биотехнология, № 6, 55-62.
20. Frens G. (1973) Nature Phys. Sci., **241**, 20-22.

21. Crooks S.R.H., Baxter A.G., McCaughey W.J. (1998) *Analyst*, **123**, 355-358.
22. Molloy P.E., Harris W.J., Strachan G., Watts C., Cunniugham C. (1998) *J. Mol. Immunol.*, **35**, 73-81.

Поступила: 02. 11. 2005.

ANALYSIS OF EFFECTIVENESS OF INTRACELLULAR PENETRATION OF
IVERMECTIN IMMOBILIZED BY CORPUSCULAR CARRIERS

D.V. Pristensky¹, S.A. Staroverov¹, D.N. Ermilov², S.Yu. Shchyogolev¹, L.A. Dykman¹

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms,
Russian Academy of Sciences, prosp. Entuziastov, 13, Saratov, 410049 Russia;
tel./fax: (8452)97-03-83, e-mail: dykman@ibppm.sgu.ru

²Research Center "Nita-Farm Co."

Penetration of ivermectin adsorbed on the surface of colloidal gold particles or included in micelles to phagocytic immune system cells was studied. Detection of the preparation in the cells was carried out by an immunochemical method, employing miniantibodies to ivermectin obtained from a combinatory phage library and by a chromatographic method on the HPLC system "Stayer". It was found that ivermectin adsorbed on colloidal gold particles was accumulated in the cells most intensively.

Key words: ivermectin, colloidal gold, micelles, addressed drug delivery, phage miniantibodies, fluorescent microscopy.