

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОСПИННИНГА
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ 3D-СКАФФОЛДОВ
С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ КУРКУМЫ
Капустин М.А.¹, Чубарова А.С.¹, Курченко В.П.¹, Лодыгин А.Д.²,
Ржепаковский И.В.²

¹ Белорусский государственный университет, г. Минск
maximkapustin84@gmail.com

² Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь

*Разработана технология создания композитных нановолокнистых материалов с включением комплексов гидрофобных органических соединений с циклодекстринами в структуру нановолокон. С использованием метода электроспиннинга получены композитные 3D-скаффолды на основе пуллулана с включением в структуру нанонитей биологически активных веществ *Curcuma longa* L – куркумина, деметоксикуркумина и бисдеметоксикуркумина. Показано, что равномерное распределение куркуминоидов в структуре формирующихся скаффолдов наблюдается в случае внесения в рабочий раствор пуллулана комплексов включения диарилгептаноидов с циклическими олигосахаридами – бета-циклодекстрином и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрином.*

Введение

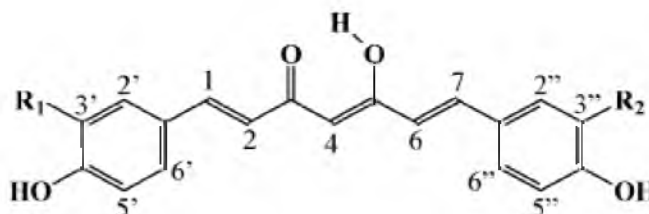
Электроспиннинг, или электроформование, представляет собой процесс получения нановолокон из раствора различных полимеров под действием электростатических сил. При наличии высоковольтного потенциала, из раствора, подаваемого в иглу-капилляр, происходит вытягивание тонкого волокна. При этом происходит испарение растворителя и формируется тонкая полимерная нить, которая, укладываясь на подложку, формирует покрытие из нанонитей – скаффолды. Толщину нитей можно варьировать, используя различные режимы нанесения покрытия и различные концентрации полимеров [1, 2].

С использованием технологии электроспиннинга можно получать различные биосовместимые материалы для использования в медицине в процессе лечения различных травматических повреждений, ожогов, обморожений и пр.; в качестве основы для выращивания стволовых клеток, при производстве имплантантов, при послеоперационном лечении онкологических заболеваний. В качестве основы для таких покрытий можно использовать различные биополимеры белковой (коллаген, желатин) и углеводной природы (хитозан, пуллулан). При добавлении к раствору полимера различных биологически активных веществ (БАВ), происходит включение частиц БАВ в структуру полимерных нанонитей, и, в процессе электроспиннинга, можно получить композитный нетканый материал. При этом возможно получать наноструктуры с несколькими модификаторами [2,

7]. При нанесении таких покрытий на поверхность раны будет происходить контролируемое пролонгированное высвобождение молекул БАВ или факторов роста, антибиотиков и прочих соединений, что положительно скажется на динамике заживления и значительно сократит сроки выздоровления [7].

При исследовании биологических активностей препарата куркумина, был выявлен ряд фармакологических эффектов, проявляющихся при применении этой субстанции для лечения пациентов, страдающих раковыми заболеваниями, заболеваниями сердечно-сосудистой системы. Фармакологические эффекты применения препаратов куркуминоидов проявлялись при лечении артритов, язвенных колитов, гастрита, витилиго, псориаза, атеросклероза, диабета, холециститов, болезни Паркинсона, хронических бактериальных простатитов и пр. Для препарата куркумина обнаружено более 195 возможных разнообразных мишеней участвующих в регулировании клеточных процессов [6].

Препарат куркумина представляет собой смесь трех основных диарилгептаноидов: 75–77 % составляет куркумин (диферулоилметан), 15–18 % – деметоксикуркумин, 5–7 % – бис-деметоксикуркумин. По химической структуре куркумин, представляет собой бис- α , β -ненасыщенный β -дикетон, образующийся в результате конъюгации двух молекул феруловой кислоты, соединенных посредством метиленового мостика. В растворе молекулы куркуминоидов находятся в кето-енольной форме, стабилизированной водородными связями. На рисунке 1 приведены структурные формулы основных диарилгептаноидов [4, 6].



C: R1=OCH3, R2=OCH3

DMC: R1=OCH3, R2=H

BDMC: R1=H, R2=H

Рисунок 1 – Структурные формулы куркумина (C), деметоксикуркумина (DMC), бисдеметоксикуркумина (BDMC)

Куркуминоиды практически не растворимы в водных системах, а также нестабильны под действием света и легко окисляются. В результате образования наноструктур с бета-циклодекстрином и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрином, для препарата куркумина наблюдается увеличение водорастворимости, а также термо- и фотостабильности, что обуславливает увеличение их биодоступности и пролонгирование биологических эффектов [3, 5].

Целью исследования являлось получить нетканые композитные нанопокрывтия (скаффолды) на основе пуллулана с комплексами включения куркумина и циклических олигосахаридов.

Материалы и методы

Для получения скаффолдов нами использовалась установка для электроформования Yflow® StartUp Electrospinning Machine (Испания). Процесс электроформования проходил при следующих рабочих параметрах: напряжение на инжекторе – 20.8 kV, напряжение на коллекторе – 0 kV. Расстояние между инжектором и коллектором – 0.2 м, внутренний диаметр иглы – 0.5 мм. Скорость подачи рабочего раствора – 2.8 мл*ч⁻¹. В качестве рабочих растворов использовали 30% раствор пуллулана в деионизированной воде, 20% раствор пуллулана в деионизированной воде, а также 20% раствор пуллулана с добавлением бета-циклодекстрина в соотношении 3:1, 20% раствор пуллулана с добавлением 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина в соотношении 3:1 и 20% растворы пуллулана с добавлением суммарного препарата куркумина и комплексов включения куркумина с бета-циклодекстрином и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрином при соотношении 3:1. Нанесение нановолокон проводилось на алюминиевую фольгу толщиной 9 мкм (ТУ У 74.8-21509860-001-2002), закрепленную на коллекторе.

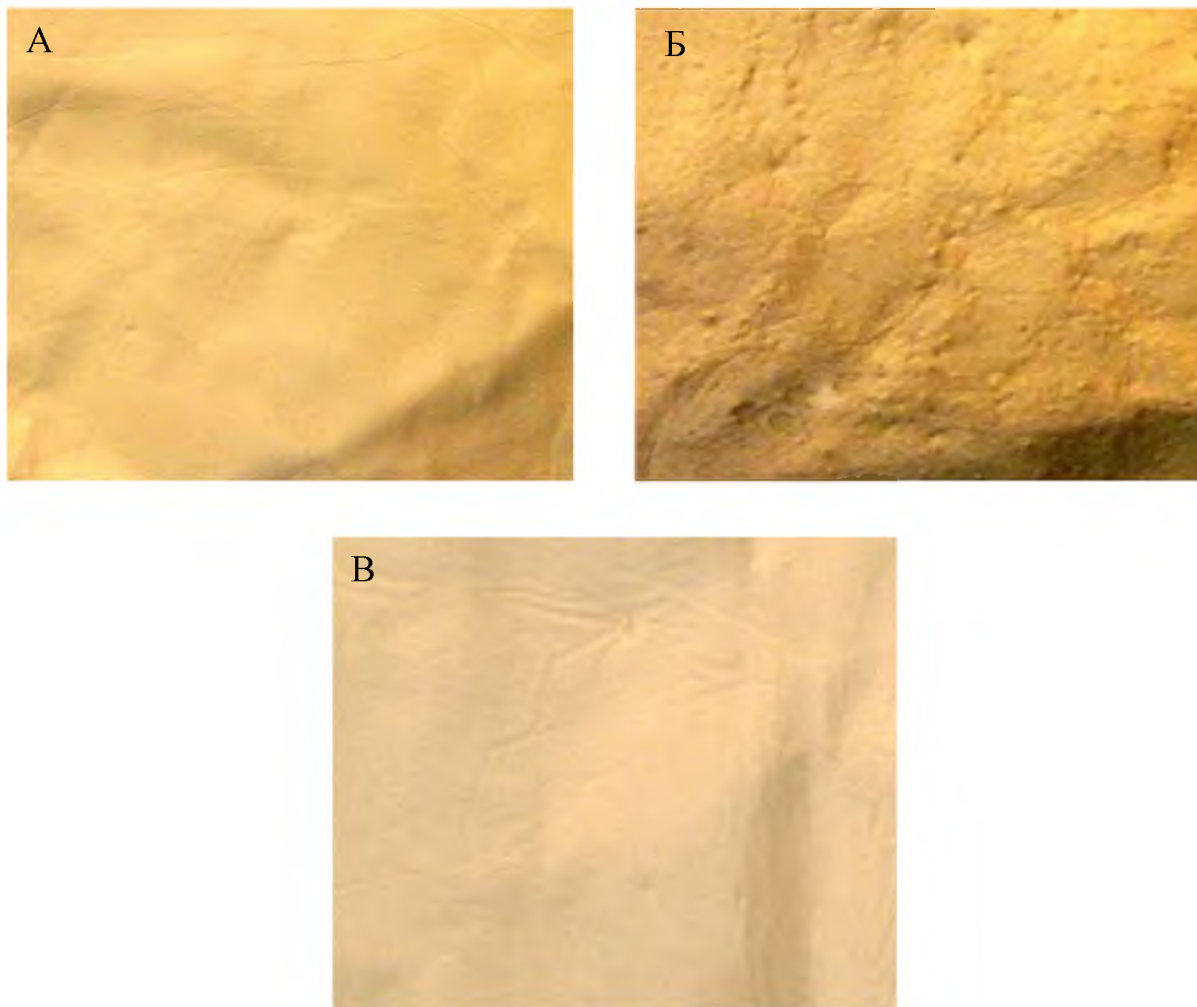
Наноструктурные комплексы были получены с использованием комбинированного метода комплексообразования – сорастворение с последующим замораживанием и лиофилизацией [4, 5].

Комплексы включения препарата куркумина были получены при молярном соотношении бета-циклодекстрин:куркумин и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин:куркумин – 2:1. При такой стехиометрии наблюдается эффективное включения молекул вещества гостя в неполярную полость тора молекул циклодекстрина.

Для получения наноструктур куркумина, нами были взяты навески препарата куркуминоидов и необходимые количества бета-циклодекстрина и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина. Куркумин растворяли в смеси ацетон:96% этиловый спирт в соотношении 20:80 при температуре 20 °С. Бета-циклодекстрин и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин растворяли в деионизированной воде и инкубировали на термостатируемой магнитной мешалке до полного растворения при температуре 85–90 °С. После завершения растворения, растворы фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм. Затем к растворам бета-циклодекстрина и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина, охлажденным до 50 °С при интенсивном перемешивании по каплям прибавляли раствор куркуминоидов. После интенсивного перемешивания в течении 6 часов и охлаждения до 20 °С, полученные смеси замораживали и лиофилизировали в течение 24 часов. Полученный порошок растирали до мелкодисперсного гомогенного препарата и просеивали через сетчатое сито с размером ячеек 0,02 мм.

Результаты и обсуждение

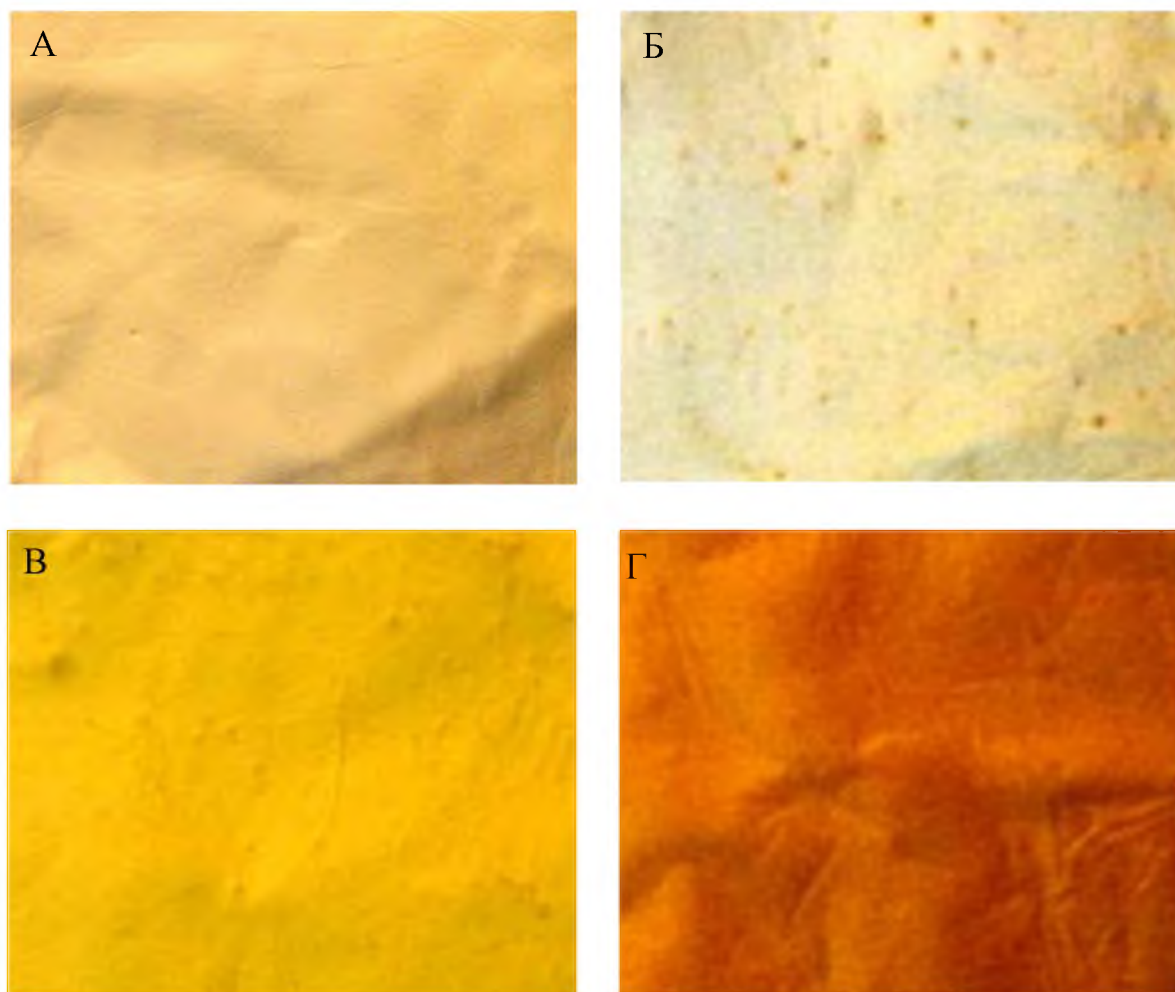
Полученные результаты показали, что наиболее качественные покрытия образуются при указанных условия электроформования с использованием в качестве рабочего раствора 20 % пуллулана, поскольку 30 % раствор этого полимера обладает большим влагоудержанием, что затрудняет формирование нанонитей.



А. 3D-скаффолды из пуллулана; Б. Композитные 3D-скаффолды пуллулан:
 β -циклодекстрин в соотношении 3:1; В. Композитные 3D-скаффолды
пуллулан:2-гидроксипропил- β -циклодекстрин в соотношении 3:1;
Рисунок 2 – Фотографии 3D-скаффолдов на основе пуллулана, полученных
методом электроспиннинга

Анализ высококонтрастных фотографий поверхности полученных 3-D скаффолдов (рисунок 2) показал, что добавление к раствору пуллулана бета-циклодекстрина приводит к формированию гетерогенных структур с ярко выраженными включениями крупных кристаллов циклических олигосахаридов (рисунок 2 Б), в то время как при электроформовании нативного раствора пуллулана образуется однородная структура без видимых гетерогенных образований (рисунок 2 А). Добавление к раствору пуллулана

2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина также приводит к формированию однородной структуры композитного скаффолда (рисунок 2 В).



А. 3D-скаффолды из пуллулана; Б. Композитные 3D-скаффолды пуллулан:куркумин 3:1; В. Композитные 3D-скаффолды пуллулан:комплекс β -циклодекстрин/куркумин в соотношении 3:1 ; Г. Композитные 3D-скаффолды пуллулан:комплекс 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин/куркумин в соотношении 3:1;

Рисунок 3 – Фотографии композитных 3D-скаффолдов на основе пуллулана и комплексов куркумина, полученных методом электроспиннинга

При получении нановолокон из смеси 20% пуллулан:препарат куркуминоидов 3:1 происходит образование покрытий с неравномерными вкраплениями крупных частиц куркумина. Такой эффект обусловлен высокой гидрофобностью куркумина и образованием суспензии препарата в растворе пуллулана. При электроформовании такого гетерогенного раствора образуется неоднородная структура скаффолдов (рисунок 3 Б). При электроформовании раствора пуллулана с добавлением комплексов включения бета-циклодекстрин:куркумин, наблюдается более однородная поверхность формирующихся 3-D скаффолдов, что объясняется включением в структуру нановолокон пуллулана кристаллов комплексов включения,

обладающих иной пространственной геометрией и более мелкими размерами, по сравнению с диспергированным куркумином (рисунок 3В).

При электроформовании раствора пуллулана с добавлением комплексов включения 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин:куркумин, наблюдается гомогенное распределение комплекса в растворе пуллулана и формируется однородная поверхность 3-D скаффолдов (рисунок 3Г). При использовании такой формы куркумина образуется упорядоченная структура нанонитей с включениями мелкодисперсных кристаллов комплексов включения.

Таким образом, была разработана технология создания композитных нановолокнистых материалов с включением комплексов гидрофобных органических соединений с циклодекстринами в структуру нановолокон. Присутствие в системе циклодекстринов приводит к образованию гомогенных рабочих растворов и, в процессе электроспиннинга, формируется однородная структура нанонитей. Полученные таким образом скаффолды обладают свойствами равномерного контролируемого высвобождения включенного биологически активного вещества. Основой нановолокна и формирующегося на его основе скаффолда является биodeградируемый материал, обладающий свойствами биосовместимости. Включение в структуру таких композитных нановолокнистых скаффолдов наноструктур куркуминоидов делает возможным их применение в биомедицинских целях в качестве ранозаживляющего покрытия при терапии травматических повреждений, ожогов, обморожений и пр.

Список литературы:

1. Huang, Z.-M. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites /Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M.Kotaki, S. Ramakrishna// Composites Science and Technology. – 2003. –Vol. 63. – P. 2223–2253.
2. Zhang, C.-L. Nanoparticles meet electrospinning: recent advances and future prospects /C.-L. Zhang , S.-H. Yu// The Royal Society of Chemistry. – 2014. – Vol. 43, №13. – P. 4423–4448.
3. Капустин, М.А. Взаимодействие куркуминоидов с нативным и модифицированным бета-циклодекстрином в водном растворе/М.А. Капустин, А.С. Чубарова//Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сб. статей Междунар. науч. конф., г. Минск, 28–30 июня 2016 г. – Минск: Изд. центр БГУ, 2016.– Ч. 1. – С. 95–98.
4. Капустин, М.А. Методы получения нанокомплексов биологически активных веществ с циклическими олигосахаридами, анализ их физико-химических свойств и использование в пищевом производстве/М.А. Капустин, А.С. Чубарова, Т.Н. Головач, В.Г. Цыганков, В.П. Курченко// Труды Белорусского государственного университета. – 2016. – Т. 11, ч. 1. – С. 73–100.

5. Капустин, М.А. Получение и свойства наноструктур куркуминоидов с нативными и модифицированными циклическими олигосахаридами/ М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.П. Курченко, В.Г. Цыганков // Инновации в пищевой технологии, биотехнологии, и химии: сб. статей Междунар. науч.практ. конф., г. Саратов, 13–15 июня 2017 г. – Саратов: Изд. Центр «Наука», 2017. – С. 240–246.
6. Капустин, М.А. Выделение куркуминоидов из коневещица *Curcuma longa* L и исследование состава полученного препарата с использованием хроматографических методов анализа / М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.Г. Цыганков, В.П. Курченко// Труды Белорусского государственного университета. – 2016. – Т. 11, ч. 2. – С. 248–262.
7. Северюхина, А.Н. Композитные нетканые материалы с включением микрочастиц для нужд регенеративной медицины/ А. Н. Северюхина, Ю. И. Свенская, Д. А. Горин // Известия Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. –2013. –Т. 13, № 2. – С. 69–79.

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ

Кравченко Л.М., Кудин К.В., Прокулевич В.А.

Белорусский государственный университет, г. Минск,

lidia_kravchenko@tut.by

Данное исследование посвящено разработке генетических конструкций, которые могут стать основой для создания ДНК-вакцины против цирковируса свиней типа 2. В результате проведенной работы на основе коммерческого плазмидного вектора pVAX1 (Invitrogen) получены две генетические конструкции, одна из которых содержит полноразмерную природную открытую рамку трансляции капсидного белка цирковируса свиней типа 2 (ЦВС-2), а вторая – укороченную без 112 первых нуклеотидов.

Одной из важнейших отраслей животноводства Беларуси является свиноводство. На сегодняшний день наблюдается рост поголовья и количества свиноводческих комплексов. Для максимально эффективного и прибыльного свиноводства необходим строгий контроль состояния здоровья животных. Наиболее распространенным агентом, вызывающим заболевания вирусной этиологии среди свиней, является цирковирус свиней типа 2 (ЦВС-2). Данный патоген – это икосаэдрический безоболочечный вирус диаметром 17-22 нм из семейства *Circoviridae* рода *Circovirus*. Геном ЦВС-2 представлен кольцевой ДНК размером 1800 пар нуклеотидов, что соответствует минимальному размеру полноценного вирусного генома. В нем выявлены три открытые рамки трансляции (ОРТ): ОРТ1, ОРТ2, ОРТ3, которые кодируют белок капсида, Рер-белок и белок, вызывающий апоптоз клеток, соответственно. Белок капсида цирковируса состоит из 233 аминокислот,