

УДК 577.12; 537.533.35; 615.919

ИНКАПСУЛЯЦИЯ НЕЙРОТОКСИНОВ — БЛОКАТОРОВ НИКОТИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ В НАНОМАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Ч. Д. Нгуен^{1,2}, Т. Н. Нгуен^{2,3}, Х. К. Нгуен^{1,2}, К. Н. Чан^{1,2}, А. Н. Хоанг^{1,2},
Н. С. Егорова⁴, В. Г. Старков⁴, член-корреспондент РАН В. И. Цетлин⁴, Ю. Н. Уткин^{4,*}

Поступило 06.03.2019 г.

Трёхпетельные белковые нейротоксины змей являются селективными антагонистами некоторых подтипов никотиновых холинорецепторов и используются для изучения этих рецепторов. Выделенный нами недавно из яда гадюки *Azemipos feae* пептидный нейротоксин аземиопсин является избирательным блокатором холинорецепторов мышечного типа. С целью уменьшения их токсичности и повышения устойчивости в физиологических условиях нами проведено инкапсулирование этих токсинов в наноматериалы. Исследование наноматериалов после взаимодействия с нейротоксинами методами просвечивающей электронной микроскопии и динамического рассеяния света выявило увеличение размеров наночастиц, что свидетельствует о включении нейротоксинов в наноматериалы.

Ключевые слова: нейротоксины, аземиопсин, α -кобратоксин, наноматериал, дендример, фукоидан, гепарин, плуроник 123.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524871102-106>

Никотиновые холинорецепторы (нХР) участвуют в передаче нервного импульса через синапсы и активируются ацетилхолином. нХР обнаружены в химических синапсах в центральной и периферической нервной системе, в нервно-мышечных синапсах, а также в эпителиальных клетках многих видов животных. Существует ряд пептидно-белковых соединений, избирательно взаимодействующих с нХР. Давно известны α -нейротоксины змей и α -кобратоксины, являющиеся антагонистами нХР [1]. Выделенный нами недавно из яда гадюки *Azemipos feae* пептидный нейротоксин аземиопсин является избирательным блокатором холинорецепторов мышечного типа [2]. нХР участвуют во многих физиологических процессах, и в ряде случаев требуется регуляция их деятельности с помощью экзогенных лигандов, в том числе и токсинов. Так, нами было показано, что аземиопсин имеет хорошие перспек-

тивы для применения в качестве местного миорелаксанта [3]. Однако у нейротоксинов имеются недостатки, которые препятствуют их практическому использованию, и основной — высокая токсичность. Кроме того, линейный пептид аземиопсин может быть недостаточно устойчивым в физиологических условиях. Одним из возможных путей преодоления этих недостатков может быть включение нейротоксинов в наноматериалы. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что включение белков и/или пептидов в наноматериалы существенно повышает их устойчивость к деградации в физиологических условиях [4]. На основе наноматериалов разрабатываются системы для доставки в организм пептидо-белковых лекарственных препаратов, в частности инсулина, через кишечно-желудочный тракт [5]. Инкапсуляция пчелиного яда в биоразлагаемые наночастицы на основе поли(D,L-лактид-ко-гликолида) обеспечивала более продолжительный эффект от применения яда при сохранении сопоставимого терапевтического эффекта [6]. Принимая во внимание эти данные, мы приготовили нейротоксины, инкапсулированные в наноматериалы.

В качестве наноматериалов для инкапсулирования использовали термочувствительный наногель, состоящий из гепарина и плуроника 123 (Нер-Р123), а также комплекс дендримера полиамидамина (ПАМAM) генерации G3.0 с сульфатированным полисахаридом фукоиданом (G3.0-Fu). Нер-Р123

¹ Institute of Applied Materials Science,
Vietnam Academy of Science and Technology,
Ho Chi Minh City, Vietnam

² Graduate University of Science and Technology,
Vietnam Academy of Science and Technology,
Ho Chi Minh City, Vietnam

³ Department of Pharmacy and Medicine,
Tra Vinh University, Tra Vinh City, Vietnam.

⁴ Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской Академии наук, Москва

*E-mail: yutkin@yandex.ru; utkin@ibch.ru

синтезировали, как описано в работе [7]. Для инкапсулирования токсинов 25 мг Нер-Р123 растворяли в 5 мл воды и к полученному раствору добавляли 2,5 мг α -кобратоксина (СТХ) или аземиопсина (Az) в 0,1 мл воды. Через 20 мин 2,5 мл смеси замораживали и лиофилизовали. Оставшиеся 2,6 мл смеси инкубировали 24 часа, после чего замораживали и лиофилизовали. Для приготовления наноматериала на основе дендримера и фукоидана 25 мг фукоидана растворяли в 2,5 мл воды, к полученному раствору добавляли 2,5 мг СТХ или Az в 0,1 мл воды. Смесь перемешивали 15 мин и добавляли 25 мг дендримера в 2,5 мл воды. Через 10 мин смесь замораживали и лиофилизовали.

Полученные материалы анализировали методами просвечивающей электронной микроскопии и динамического рассеяния света, а также измеряли их дзета-потенциал.

Следует отметить, что молекула ПАМAM дендримера G3.0 имеет внутренние полости, в которые могут захватываться другие соединения, лекарственные препараты в том числе [8]. Однако дендример имеет высокую токсичность, поэтому его применение в биомедицинских целях проблематично. Дзета-потенциал ПАМAM G3.0 составляет 39,3 мВ. Высокий положительный дзета-потенциал и сильно основные свойства дендримеров приводят к тому, что они могут проявлять цитотоксичность, выраженность которой зависит от природы и генерации дендримера. Что касается ПАМAM G3.0, то он не обладает высокой цитотоксичностью. Так, этот дендример не проявлял токсических свойств по отношению к клеткам MCF-7 и A549 до концентрации 72 мкМ [9]. Тем не менее в данной работе для изменения поверхностного заряда ПАМAM G3.0 был модифицирован с использованием фукоидана, имеющего дзета-потенциал $-90,6$ мВ. Фукоидан встречается в некоторых видах бурых и коричневых водорослей, проявляет антикоагулянтное, иммуномодулирующее, противоопухолевое и противовирусное действие и используется в качестве пищевой добавки. Молекулярная масса фукоиданов изменяется в широких пределах; масса использованного в данном исследовании препарата согласно спецификации производителя (F5631, Merck) составляет 20–200 кДа. Вытянутая молекула фукоидана по размерам существенно превышает молекулу дендримера. Можно предположить, что после образования комплекса с дендримером часть углеводных цепей фукоидана, содержащих сульфатные группы, будет экспонирована в раствор, образуя полости, которые так же, как и полости в дендримере, могут захваты-

вать другие соединения. Именно эти полости являются идеальным местом для инкапсулирования сильно основных токсинов.

Что касается Нер-Р123, то входящий в его состав плуроник P123 является амфифильным веществом с низкой величиной гидрофильно-липофильного баланса ($HLB = 8$) и с очень высоким соотношением полипропиленоксид (PPO)/полиэтиленоксид (PEO). Вследствие этого он способен включать гидрофобные препараты в полости, образуемые полимерной цепью. Чтобы дополнить эту способность возможностью захватывать основные соединения, P123 присоединяли к кислому протеогликану гепарину и получали сильно кислый Нер-Р123. Такая конъюгация существенно расширяет возможности применения полученного наногеля для инкапсулирования.

Результаты измерения дзета-потенциала исследуемых наноматериалов с использованием анализатора HORIBA SZ-100 представлены в табл. 1. Приведённые данные показывают, что G3.0-Fu имеет потенциал $-34,5$ мВ, т.е. фукоидан (потенциал $-90,6$ мВ) нейтрализует сильный положительный потенциал дендримера (39,3 мВ) и таким образом, по-видимому, уменьшает его цитотоксичность. Молекулы СТХ и Az являются сильно основными, и их включение в G3.0-Fu приводит к сильному уменьшению отрицательного потенциала. При инкапсулировании токсинов происходит сдвиг потенциала в положительном направлении от $-34,5$ мВ для G3.0-Fu до $-6,67$ и $-3,33$ мВ для G3.0-Fu-CTX и G3.0-Fu-Az соответственно (табл. 1).

Термочувствительный наногель Нер-Р123 за счёт сульфатированного протеогликана гепарина имеет отрицательный дзета-потенциал $-60,52$ мВ. Так же, как и в случае G3.0-Fu, при инкапсулировании токсинов происходит сдвиг потенциала в положитель-

Таблица 1. Характеристики наноматериалов G3.0-Fu и Нер-Р123, содержащих нейротоксины

Образец	Дзета-потенциал, мВ	Размер частиц, нм, по данным	
		динамического рассеяния света	просвечивающей электронной микроскопии
G3.0-Fu	$-34,5 \pm 0,56$	$70,23 \pm 2,61$	$32,99 \pm 4,78$
G3.0-Fu-CTX	$-6,67 \pm 0,51$	$205,17 \pm 2,81$	$82,66 \pm 18,3$
G3.0-Fu-Az	$-3,33 \pm 0,35$	$204,93 \pm 2,94$	$52,97 \pm 5,47$
Нер-Р123	$-60,52 \pm 1,73$	$145,23 \pm 6,42$	$69,4 \pm 29,7$
Нер-Р123-CTX	$-45,03 \pm 1,46$	$168,03 \pm 1,27$	$111,74 \pm 53,46$
Нер-Р123-Az	$-36,03 \pm 1,70$	$162,80 \pm 2,07$	$71,32 \pm 23,66$

ном направлении от $-60,52$ мВ для Нер-Р123 до $-45,03$ и $-36,03$ мВ для Нер-Р123-СТХ и Нер-Р123-Аз соответственно (табл. 1). Наблюдаемые изменения зависят от потенциала токсина и от того, сколько токсина загружено в наноматериал. Изменение потенциала означает также, что токсин включается в наноматериал не только пассивным захватом в полости, но и при посредстве электростатического взаимодействия между отрицательно заряженной оболочкой наноматериала и положительно заряженным токсином. Именно это электростатическое взаимодействие помогает токсину оставаться внутри оболочки, что может уменьшать влияние физиологической среды на токсины и пролонгировать их действие.

Морфологию и размер наночастиц исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с помощью электронного микроскопа JEM-1400 JEOL и методом динамического рассеяния света (ДРС) на анализаторе размеров наночастиц HORIBA SZ-100. При этом обнаружили, что природа токсина (молекулярная масса и заряд) влияет на структуру наноматериала.

По данным ПЭМ исходный материал G3.0-Fu перед инкапсулированием токсинов имеет размер наночастиц около 33 нм (табл. 1). Следует отметить, что материал довольно гомогенный, разница в размерах частиц невелика, а наночастицы весьма однородны. Вместе с тем наночастицы G3.0-Fu не являются идеально сферическими. Отсутствие сферической формы можно объяснить тем, что образование этого наноматериала происходит в основном за счёт электростатического взаимодействия между противоположно заряженными полиэлектролитами.

При инкапсулировании токсинов в наноматериалы происходит увеличение размеров как по данным ПЭМ, так и ДРС (табл. 1). Как видно из таблицы,

размер наночастиц, установленный ДРС, существенно превышает величину, установленную ПЭМ. Эта разницу можно объяснить гидрофильной природой полисахаридов, входящих в состав наноматериалов и сильно гидратированных в воде. Гидратация приводит к набуханию и увеличению кажущегося размера наночастиц при использовании метода ДРС. При инкапсулировании размер наночастиц G3.0-Fu, измеренный с помощью ПЭМ, увеличивается с 32,99 до 82,66 нм (на 150%) и 52,97 нм (на 60%) для СТХ и Аз соответственно (табл. 1, рис. 1). Измерения методом ДРС показывают увеличение размера наночастиц с 70,23 до 205,17 и 204,93 нм для СТХ и Аз соответственно (табл. 1). Размеры наночастиц при инкапсулировании токсинов увеличиваются с увеличением молекулярной массы токсинов, которая составляет 2540 и 7821 Да для Аз и СТХ соответственно. Как показывают представленные данные ПЭМ (табл. 1, рис. 1), размер наночастиц с СТХ на 29,7 нм (56%) больше размеров наночастиц с Аз. Интересно, что по данным ДРС размеры обоих наноматериалов весьма близки (табл. 1), что, по-видимому, объясняется влиянием окружающей среды, включая гидратацию. При этом наночастицы G3.0-Fu-СТХ и G3.0-Fu-Аз более однородны по размерам и имеют более правильную сферическую форму (рис. 1), чем G3.0-Fu.

Анализ размера и морфологической структуры наночастиц Нер-Р123 показал, что до инкапсулирования токсинов размер наночастиц составляет 69,4 нм по данным ПЭМ и 145,2 нм по данным ДРС (табл. 1). Результаты ПЭМ показали, что при инкапсулировании Аз размер частиц Нер-Р123 оказался почти неизменным — 71,32 нм (увеличение на 3%), но, когда инкапсулируется более крупная молекула СТХ, размер частиц значительно увеличивается до 111,74 нм (на 61%) (табл. 1, рис. 2). Как показывают представленные данные (табл. 1), размер наночастиц с СТХ на 40,3 нм (57%) больше размеров наночастиц с Аз. Измерения методом ДРС показывают небольшое увеличение размера наночастиц с 145,23 до 168,03 и 162,80 нм для СТХ и Аз соответственно (табл. 1), т.е. по данным ДРС размеры наночастиц при инкапсулировании токсинов также увеличиваются с увеличением молекулярной массы токсинов. Различия в размерах, установленных методом ДРС, не столь существенны (табл. 1), что также можно объяснить влиянием внешней среды. Результаты исследования наноматериалов на основе Нер-Р123 показали, что в этом случае наночастицы имеют правильную сферическую форму (рис. 2). По данным ПЭМ размер наночастиц меняется в диапазоне от 22 до 100 нм, т.е.

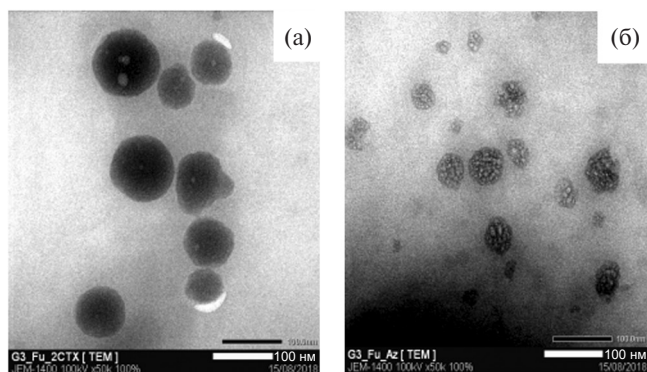


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение наночастиц G3-Fu с инкапсулированным СТХ (а) или Аз (б).

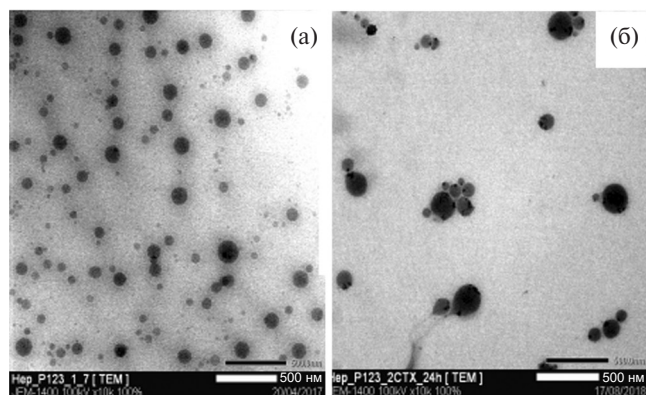


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение наночастиц Нер-Р123 (а) и Нер-Р123 с инкапсулированным СТХ (б).

они более гетерогенны по размеру, чем в случае G3.0-Fu. Подобная гетерогенность является характерным свойством Нер-Р123 (рис. 2а) [7], что объясняется различной степенью гидрофобности поверхности наночастиц или различным количеством групп Р123, присоединённых к гепарину. Кроме того, наночастицы Нер-Р123 имеют тенденцию в водном растворе собираться в облако (в группу). Это можно объяснить низкой величиной НЛВ молекулы Р123, а также высоким соотношением РРО/РЕО, что приводит к большой гидрофобной части в частицах Нер-Р123. Для уменьшения поверхностного натяжения гидрофобные части могут слипаться, вытесняя водный слой.

Следует отметить, что ранее нейротоксин яда кобры *Naja naja atra* инкапсулировали в липосомы на основе лецитина и холестерина [10]. В нашем исследовании два нейротоксина СТХ и Az были загружены в два различных наноматериала G3.0-Fu и Нер-Р123, содержащих сульфатированные полисахариды и имеющих различные характеристики. Наличие отрицательно заряженных полисахаридов в составе использованных нами наноматериалов способствует более прочному удержанию нейротоксинов. G3.0-Fu содержит Fu, который обладает высокой биосовместимостью и высоким отрицательным зарядом, в то время как дендример G3.0 имеет полости внутри молекулы и может быть использован для доставки лекарственных препаратов в клетки. Нер-Р123 представляет собой термочувствительный наногель, который может быть использован для доставки соединений, обладающих гидрофобными свойствами, каковым часто являются противораковые препараты. Оба этих наноматериала обладают различными физико-химическими характеристиками, что нашло своё отражение в результатах их структурного морфологического

анализа с помощью ПЭМ и ДРС, выполненного в данной работе.

Таким образом, представленные материалы позволяют сделать вывод о том, что в результате проведения данной работы мы впервые инкапсулировали нейротоксины змей в наноматериалы, содержащие сульфатированные полисахариды.

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–54–54006 и Вьетнамской академии наук и технологий в рамках научного проекта QTRU01.03/18–19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dutertre S., Nicke A., Tsetlin V.I. Nicotinic Acetylcholine Receptor Inhibitors Derived from Snake and Snail Venoms // *Neuropharmacology*. 2017. V. 127. P. 196–223. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.06.011.
2. Utkin Y.N., Weise C., Kasheverov I.E., Andreeva T.V., Kryukova E.V., Zhmak M.N., Starkov V.G., Hong N.A., Bertrand D., Ramerstorfer J., Sieghart W., Thompson A.J., Lummis S.C., Tsetlin V.I. Azemiopsin from Azemiops Feae Viper Venom, a Novel Polypeptide Ligand of Nicotinic Acetylcholine Receptor // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 32. P. 27079–27086. DOI: 10.1074/jbc.M112.363051.
3. Shelukhina I.V., Zhmak M.N., Lobanov A.V., Ivanov I.A., Garifulina A.I., Kravchenko I.N., Rasskazova E.A., Salmova M.A., Tukhovskaya E.A., Rykov V.A., Slashcheva G.A., Egorova N.S., Muzyka I.S., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Azemiopsin, a Selective Peptide Antagonist of Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor: Preclinical Evaluation as a Local Muscle Relaxant // *Toxins (Basel)*. 2018. V. 10. № 1. pii: E34. DOI: 10.3390/toxins10010034.
4. McClements D.J. Encapsulation, Protection, and Delivery of Bioactive Proteins and Peptides Using Nanoparticle and Microparticle Systems: A Review // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2018. V. 253. P. 1–22. DOI: 10.1016/j.cis.2018.02.002.
5. Sharma G., Sharma A.R., Nam J.S., Doss G.P., Lee S.S., Chakraborty C. Nanoparticle Based Insulin Delivery System: The Next Generation Efficient Therapy for Type 1 Diabetes // *J. Nanobiotechnology*. 2015. V. 13. P. 74. DOI: 10.1186/s12951-015-0136-y.
6. Jeong I., Kim B.S., Lee H., Lee K.M., Shim I., Kang S.K., Yin C.S., Hahn D.H. Prolonged Analgesic Effect of PLGA-Encapsulated Bee Venom on Formalin-Induced Pain in Rats // *Int. J. Pharm.* 2009. V. 380. № 1/2. P. 62–66. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.06.034.
7. Ngoc The Nguyen, Thi Hiep Nguyen, Minh Thanh Vu, Van Thu Le, Xuan Anh Nguyen, Tram Chau Nguyen, Thi Bich Tram Nguyen. Novel Amphiphilic Heparin-Pluronic P123 Copolymers Exhibiting a Great Poten-

- tial for Cisplatin Delivery // *J. Mater. Sci.* 2018. V. 53. P. 12692. DOI: 10.1007/s10853-018-2569-9.
8. *Cuu Khoa Nguyen, Ngoc Quyen Tran, Thi Phuong Nguyen, Dai Hai Nguyen.* Biocompatible Nanomaterials Based on Dendrimers, Hydrogels and Hydrogel Nanocomposites for Use in Biomedicine // *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 2017. V. 8. 015001. 10 p. DOI: 10.1088/2043-6254/8/1/015001.
 9. *Shao N., Su Y., Hu J., Zhang J., Zhang H., Cheng Y.* Comparison of Generation 3 Polyamidoamine Dendrimer and Generation 4 Polypropylenimine Dendrimer on Drug Loading, Complex Structure, Release Behavior, and Cytotoxicity // *Int. J. Nanomedicine.* 2011. V. 6. P. 3361–3372. DOI: 10.2147/IJN.S27028.
 10. *Yang Q., Zhao C., Zhao J., Ye Y.* Photoresponsive Nanocapsulation of Cobra Neurotoxin and Enhancement of Its Central Analgesic Effects under Red Light // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 3463–3470. DOI: 10.2147/IJN.S132510.

ENCAPSULATION OF NEUROTOXINS — BLOCKERS OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS — IN NANOMATERIALS BASED ON SULFATED POLYSACCHARIDES

**Trung D. Nguyen^{1,2}, The N. Nguyen^{2,3}, Khoa C. Nguyen^{1,2},
Quyen N. Tran^{1,2}, Anh N. Hoang^{1,2}, N. S. Egorova⁴, V. G. Starkov⁴,
Corresponding Member of the RAS V. I. Tsetlin⁴, Yu. N. Utkin⁴**

¹*Institute of Applied Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology,
Ho Chi Minh City, Vietnam*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,
Ho Chi Minh City, Vietnam*

³*Department of Pharmacy and Medicine, Tra Vinh University, Tra Vinh City, Vietnam*

⁴*Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

Received March 6, 2019

The three-finger snake neurotoxins are selective antagonists of some nicotinic cholinergic receptor subtypes and are used to study these receptors. The peptide neurotoxin azemiopsin, recently isolated from the venom of *Azemipos feae*, is a selective muscle-type cholinergic receptor blocker. In order to reduce their toxicity and increase resistance under physiological conditions, we have encapsulated these toxins into nanomaterials. The study of nanomaterials after interaction with neurotoxins by the methods of transmission electron microscopy and dynamic light scattering revealed an increase in the size of nanoparticles, which indicates the inclusion of neurotoxins in nanomaterials.

Keywords: neurotoxins, azemiopsin, alpha-cobratoxin, nanomaterial, dendrimer, fucoidan, heparin, pluronic 123.