

УДК 577.114

**Гелевые гранулы из пектина каллуса *Lupinus angustifolius* предотвращают преждевременное высвобождение месалазина**© 2020 М. В. ВОЛКОВА<sup>1,\*</sup>, З. Р. ХАСАНШИНА<sup>1</sup>, С. В. ПОПОВ<sup>2</sup>, П. А. МАРКОВ<sup>2</sup><sup>1</sup>ФГБОУ ВО Вятский государственный университет, Киров, 610000<sup>2</sup>Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167982

\*e-mail: biotech.volkova@list.ru

Поступила в редакцию 27.09.2019 г.

После доработки 11.11.2019 г.

Принята к публикации 09.02.2020 г.

Формирование кросс-связанных пектиновых матриц на основе физиологически активных полисахаридов открывает новые перспективы их применения в медицине. Цель исследования – выявить пектиновые гранулы, которые не оказывают цитотоксического действия и удерживают лекарственное средство в искусственной гастральной среде. В исследовании использовали яблочный пектин AU701, пектины борщевика, бодяка, рябины и люпина и их гели. Пектин-гелевые гранулы изготавливали из 4%-ных растворов пектинов методом иотропного желирования. Для оценки метаболической активности культур клеток человека использовали МТТ-тест. Установлено, что все исследованные пектины в концентрации менее 2 мг/мл не оказывают цитотоксического действия. Выявлено, что пектиновые гели незначительно снижают метаболическую активность клеток. Содержание месалазина в гелях и количество высвободившегося лекарства определяли с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Установлено, что гелевые гранулы из пектина люпина наиболее эффективно удерживают месалазин. На основании полученных результатов можно рассматривать пектиновые полисахариды люпина в качестве потенциальных гелевых матриц для систем пероральной доставки лекарственных средств.

*Ключевые слова:* гель, пектины, НЕК293, Сасо-2, 5-аминосалициловая кислота, гастральная среда, хромато-масс-спектрометрия

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-1-53-60

В настоящее время назрела потребность в разработке биоматериалов с новыми свойствами для медицинского применения, в том числе для систем пероральной доставки лекарств [1]. Одними из таких материалов могут быть пектиновые полисахариды, которые являются биосовместимыми и биоразлагаемыми полимерами [2, 3].

Пектины представляют собой сложные гетерополисахариды, относящиеся к классу гликаногалактуронанов – кислых растительных полисахаридов. Пектины различаются макромолекулярным строением, моносахаридным составом и степенью метилэтерификации карбоксильных групп остатков галактуронозойной кис-

лоты. Показано, что пектиновые полисахариды способны защищать эпителий кишечника от повреждений и ингибировать воспаление [4]. Благодаря этому свойству пектины можно рассматривать в качестве потенциальных усилителей эффективности действия противовоспалительных препаратов.

Так, пектины легко образуют гелевые гранулы с широким спектром физических и механических свойств. Выявлено, что ключевыми факторами, влияющими на формирование гранул, являются степень метилэтерификации карбоксильных групп, температура, наличие сахара и поливалентных ионов [2, 5].

*Список сокращений:* DMEM – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла; HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид; MRM – режим регистрации множественных переходов; PBS – фосфатно-солевой буфер; SGF – среда, имитирующая среду желудка.

Известно, что пектины устойчивы к действию протеаз и амилаз, которые активны в верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Ферментативная деструкция пектиновых полисахаридов осуществляется только комменсальными микроорганизмами толстой кишки [6]. Показано, что пектиновые гранулы могут выступать в качестве носителей для лекарственных препаратов [7].

Перечисленные свойства пектиновых полисахаридов делают их перспективным материалом для создания средств пероральной доставки лекарств, в том числе в толстую кишку. Ограничением в применении пектинов в качестве матриц для средств пероральной доставки лекарств может быть подверженность деструкции пектин-гелевых гранул в верхних отделах пищеварительного тракта. В кислых средах происходит протонирование карбоксильных групп, а также частичное замещение ионов кальция [8]. Это способствует проникновению жидкости в систему и набуханию пектиновых гранул при последующем повышении pH в кишечнике. В результате происходит преждевременное высвобождение лекарственного средства.

Свойства пектиновых гранул во многом зависят от химического состава и макромолекулярной структуры пектиновых полисахаридов [2, 9]. Вариативность и нестабильность химического состава полисахаридов, выделенных из природных источников, усложняет изготовление гранул с заданными свойствами [10]. Для решения проблемы стандартизации и стабильности растительного сырья широко используются каллусные культуры [8]. В настоящее время физиологическая активность пектинов, полученных биотехнологическим путем, и их надмолекулярных комплексов пока исследована недостаточно полно.

Таким образом, цель исследования – оценить перспективность использования гелевых гранул

из пектинов, полученных биотехнологическим путем, в качестве матриц для систем пероральной доставки лекарств.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Получение пектиновых полисахаридов

В исследовании использовали коммерческий яблочный пектин AU701 (Herbstreith & Fox, Германия) и пектины, выделенные из каллусных культур коллекции ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»: гераклиуман (пектин борщевика *Heracleum Sosnowskyi*, HSc), цирсиуман (пектин бодяка *Cirsium arvense*, CAc), сорбан (пектин рябины *Sorbus aucuparia*, SAc) и люпинан (пектин люпина *Lupinus angustifolius*, LAc). Культивировали каллусную ткань на твердой питательной среде с минеральной основой Мурасиге-Скуга с добавлением витаминов по прописи Стаба [11] и фитогормонов: 2,4-дихлофеноксисукусной кислоты (2,0 мг/мл) и 6-бензиламинопурина (1,0 мг/мл). Культивирование проводили при температуре  $26 \pm 1$  °C в темноте в течение 21 сут. Для выделения фракции пектиновых полисахаридов использовали экстракцию оксалатом аммония при 68 °C [11].

### Определение состава полисахаридов

Количественное содержание остатков уроновых кислот в полисахаридах определяли реакцией с 3,5-диметилфенолом [12], содержание белка – по методу Лоури [13]. Идентификацию и количественное определение моносахаридных остатков проводили с помощью хромато-масс-спектрометрии после гидролиза полисахаридов раствором 2 М трифторуксусной кислоты, содержащей в качестве внутреннего стандарта миоинозит (0,1 мг/мл), при 100 °C в течение 4–5 ч с последующим переводом их в триметилсилильные эфиры [14] или ацетаты полиолов [15]. Характеристика используемых пектиновых полисахаридов приведена в табл. 1.

Таблица 1

### Характеристика пектиновых полисахаридов

#### Characterization of the pectin polysaccharides

Пектин	Содержание, %							
	UA	Ara	Gal	Man	Glc	Rha	Xyl	Белок
HSc	57,80	7,94	5,18	0,35	0,97	2,11	nd	13,25
CAc	44,33	1,45	1,16	±	0,38	0,41	nd	10,61
SAc	61,10	4,89	6,64	0,33	2,11	0,47	0,46	4,80
LAc	53,60	1,80	1,30	0,10	0,54	0,73	0,14	5,80

Примечание: UA – уроновые кислоты, Ara – арабиноза, Gal – галактоза, Rha – рамноза, Xyl – ксилоза, Man – манноза, Glc – глюкоза, ± – следовые количества, nd – не определяли.

Note: UA – uronic acids, Ara – arabinose, Gal – galactose, Rha – rhamnose, Xyl – xylose, Man – mannose, Glc – glucose, ± – trace amount, nd – not determined.

## Получение гранул

Гранулы изготавливали из 4%-ных водных растворов пектиновых полисахаридов методом ионотропного желирования с использованием раствора 1 М хлорида кальция. Для этого пектины растворяли в дистиллированной воде и расплачивали в раствор хлорида кальция. Образующиеся гелевые гранулы оставляли в растворе на 30 мин, затем извлекали и высушивали под вакуумом при 60 °С в течение 1 ч для получения твердых частиц.

## Исследование цитотоксичности пектинов и гранул

В экспериментах использовали клеточные линии почек эмбриона человека (HEK293) и аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2). Клетки культивировали в полной питательной среде на основе DMEM (Gibco Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10 или 20% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) (для HEK293 и Caco-2 соответственно), 50 мг/мл гентамицина («Биолот», Россия), 1% незаменимых аминокислот, 1% пирувата и 1% HEPES (Gibco Thermo Fisher Scientific).

Для оценки цитотоксичности пектинов клетки инкубировали в питательной среде, содержащей пектиновые полисахариды в диапазоне концентраций от 0,5 до 10 мг/мл.

Для исследования цитотоксичности высушенные гелевые гранулы инкубировали в полной питательной среде в течение 24 ч в стандартных условиях культивирования (37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности). Затем гранулы извлекали, а полученный гель-экстракт использовали для проведения МТТ-теста.

Для оценки метаболической активности клеток использовали МТТ-тест [16]. Клетки с плотностью  $8 \cdot 10^3$  кл./мл высевали в 96-луночный планшет и инкубировали 24 ч при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Galaxy 170S (Eppendorf, Германия). Через сутки среду заменяли на исследуемые растворы, инкубировали в течение 2 или 6 сут в стандартных условиях. Питательную среду с пектинами или гель-экстракты меняли каждые двое суток. За 2 ч до окончания инкубации в лунки вносили по 10 мкл МТТ (5 мг/мл в PBS). После окончания инкубации раствор удаляли и в каждую лунку вносили 100 мкл раствора 4 мМ соляной кислоты в изопропанол для растворения образовавшихся кристаллов формазана. С помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия) определяли оп-

тическую плотность раствора в каждой лунке при длине волны 530 нм и вычитали фоновое поглощение, измеренное при 620 нм.

## Исследование интенсивности высвобождения месалазина

Для оценки интенсивности высвобождения лекарственного средства пектин-гелевые гранулы изготавливали по методике, описанной выше. В качестве модельного лекарственного средства использовали 5-аминосалициловую кислоту (Mesalazine, Acros Organics, Бельгия). Загрузку лекарства в гранулы проводили путем внесения в раствор пектина до ионотропного желирования. Образующиеся гелевые гранулы оставляли в растворе хлорида кальция на 30 мин и после извлечения высушивали.

Для исследования набухания и высвобождения лекарственного средства брали 5 мг гранул, инкубировали их в 5 мл раствора, имитирующего среду желудка (SGF) [17], в течение 2 ч при 37 °С, после чего гранулы извлекали, а аликвоту среды отбирали для исследования методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС).

Интенсивность набухания оценивали по изменению массы и размеров гранул после инкубации в растворе SGF. Извлеченные гранулы взвешивали, и для каждой из 20 отдельных гелевых гранул измеряли общую площадь ( $S_{\text{сеч}}$ ) и отношение сторон ( $L/D$ ) до и после инкубации в растворе SGF. Морфометрический анализ гранул проводили с использованием программы ImageJ 1.49.

Для определения количества месалазина несколько гранул растирали в ступке и отбирали навеску массой  $1,00 \pm 0,05$  мг. К навеске добавляли 5 мл 0,02 М раствора серной кислоты (рН 2,0), помещали в ультразвуковую баню на 15 мин, после чего выдерживали при комнатной температуре, периодически перемешивая, в течение 2–3 ч до полного разрушения гранул и 50-мкл аликвоту отбирали для анализа.

К 50 мкл среды (SGF или экстракт) добавляли 50 мкл раствора 4-аминосалициловой кислоты (Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 5 мкг/мл (в качестве внутреннего стандарта), 500 мкл насыщенного раствора сульфата натрия и 20 мкл пропионового ангидрида (Acros Organics, Бельгия). Пробы выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин при перемешивании, добавляли 1,8 мл ацетонитрила и инкубировали 10 мин при перемешивании. Затем центрифугировали 5 мин при 3 500 об/мин на центрифуге CM-6MT (ELMI, Латвия) и фильтровали через 0,2-мкм фильтр в пробирку для автодозатора.

Количество месалазина определяли с использованием системы ВЭЖХ-МС LCMS-8040 (Shimadzu, Япония). Для хроматографического разделения компонентов пробы использовали колонку Dr. Maish Reprosil-Pur Basic C18 100×2 мм с размером зерен неподвижной фазы 3 мкм. Хроматографию проводили при 40 °С в режиме градиентного элюирования при скорости подвижной фазы 0,25 мл/мин в течение 10 мин в следующем режиме: 1 мин – 100%-ная фаза А (0,1%-ная муравьиная кислота), 2–4 мин – линейный градиент до содержания 25% фазы Б (ацетонитрил), 5 мин – изократический режим. Объем вводимой пробы составлял 3 мкл. Детектирование проводили в режиме регистрации множественных переходов MRM(-) с использованием переходов: 208,20/164,20, 208,20/108,05 и 208,20/107,05. Время регистрации для каждого перехода составляло 100 с<sup>-3</sup>.

При обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение и среднее квадратичное отклонение. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

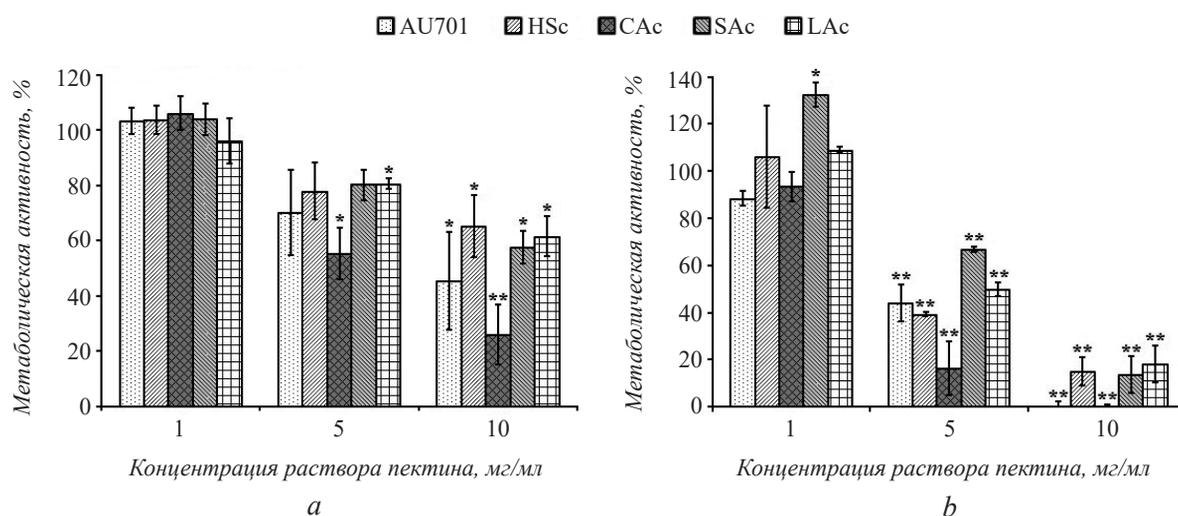
На первом этапе исследований оценивали действие пектинов и их гелевых гранул на метаболическую активность клеток человека *in vitro*. Для оценки цитотоксичности были выбраны две клеточные линии. Первая – это линия клеток аденокарциномы толстого кишечника человека Сасо-2. Эта линия идентична по морфоло-

гическим, биохимическим и функциональным свойствам клеткам эпителия кишечника человека и используется для тестирования лекарственных средств и материалов [18]. Вторая, используемая в работе линия клеток, – это культура эмбриональных клеток эпителия почки человека НЕК293. Отличительной чертой клеток НЕК293 является высокая чувствительность к факторам окружающей среды [19].

Вещество считается нетоксичным, если в его присутствии жизнеспособность клеток снижается менее чем на 10%. Снижение метаболической активности на 10–30% оценивается как низкая токсичность, а на 40–60% – как умеренная. Соединение, снижающее жизнеспособность клеток более чем на 70%, считается высокотоксичным [20].

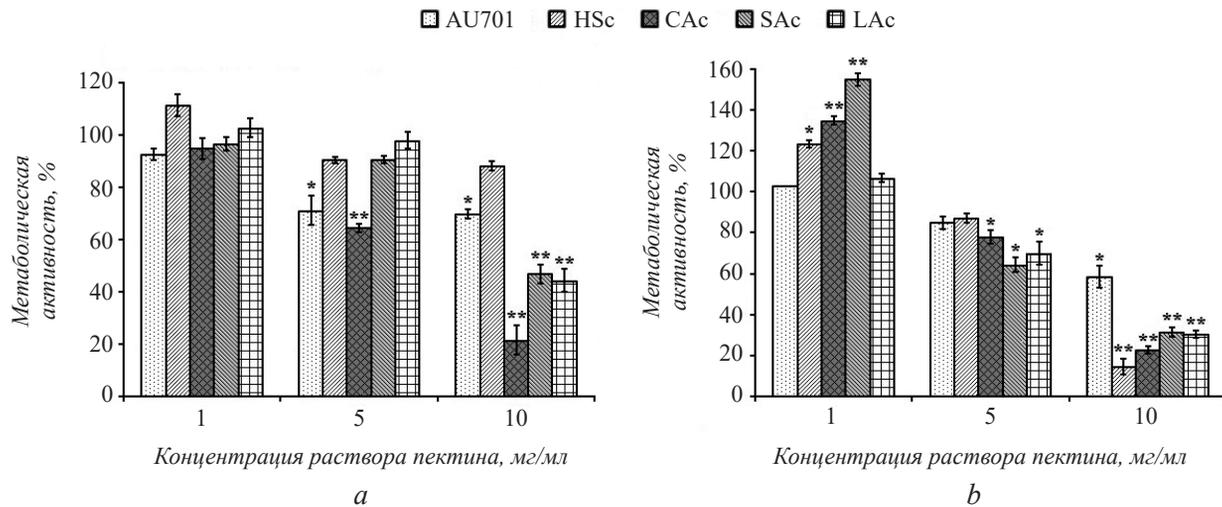
Было установлено, что пектины в концентрации 1 мг/мл не оказывают острого и хронического цитотоксического действия на клетки линии НЕК293 (рис. 1). При инкубации в течение 6 сут пектин рябины SAc в концентрации 1 мг/мл повышал жизнеспособность клеток на 30% (рис. 1b). Жизнеспособность клеток снижалась с увеличением концентрации пектинов (рис. 1a, b) и времени их воздействия (рис. 1b).

Выявлено, что пектины в концентрации 1 мг/мл не оказывают цитотоксического действия на клетки линии Сасо-2 (рис. 2). Пектины в концентрации 5 мг/мл оказывали слабый цитотоксический эффект на эту клеточную линию. Через 6 сут инкубации пектины рябины SAc, бодяка СAc и борщевика HSc в концентрации 1 мг/мл повышали жизнеспособность клеток Сасо-2 на 50,



**Рис. 1.** Метаболическая активность клеток НЕК293 после инкубации с растворами пектинов в течение двух (a) и шести (b) суток. Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение (SD),  $n = 3$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

**Fig. 1.** Metabolic activity of HEK293 cells after incubation with pectin solutions for two (a) and six (b) days. The data are presented as the mean ± SD,  $n = 3$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$



**Рис. 2.** Метаболическая активность клеток Caco-2 после инкубации с растворами пектинов в течение двух (a) и шести (b) суток. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

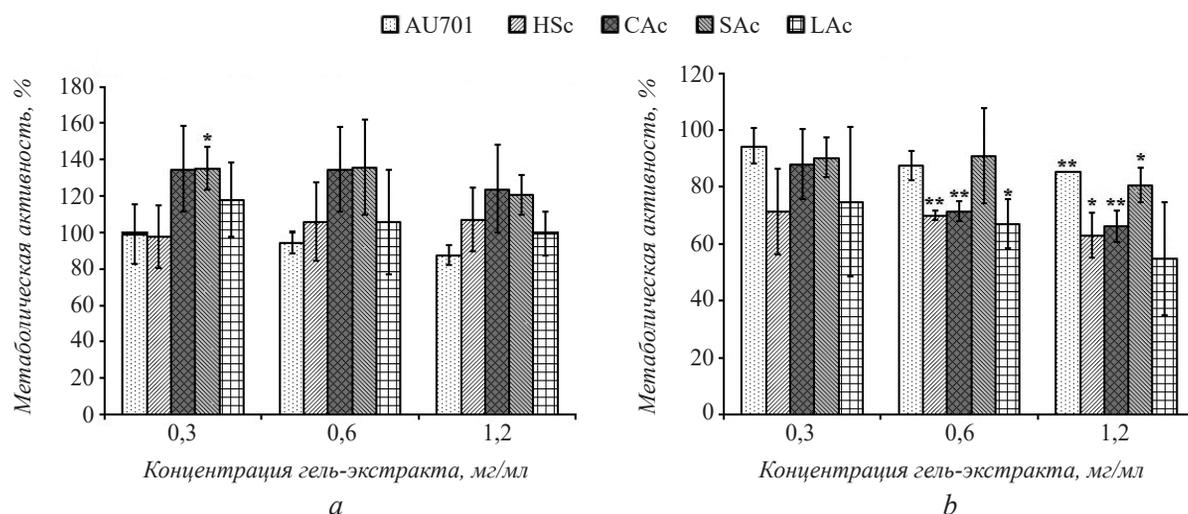
**Fig. 2.** Metabolic activity of Caco-2 cells after incubation with pectin solutions for two (a) and six (b) days. The data are presented as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

40 и 20% соответственно (рис. 2b). Жизнеспособность клеток Caco-2 падала при увеличении концентрации пектинов в культуральной среде (рис. 2a) и времени их воздействия (рис. 2b).

Установлено, что при двухдневной инкубации гель-экстракта SAc в концентрации 0,3 мг/мл с клетками HEK293 их метаболическая активность увеличивалась на 50%, в то время как остальные пектины в тех же условиях не оказывали влияния на жизнеспособность клеток (рис. 3a). При 6-суточной инкубации клеток с гелевыми экстрактами, взятыми в концентрации выше 1 мг/мл, выявлено их умеренное токсическое действие на клетки HEK293 (рис. 3b).

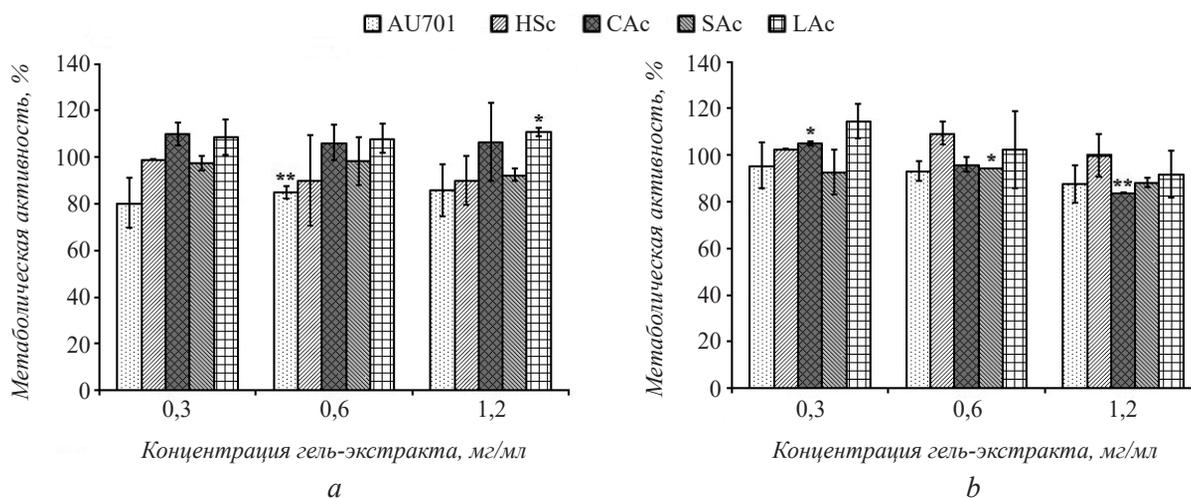
При двухдневной инкубации экстрактов гранул с клетками Caco-2 существенного цитотоксического действия во всем диапазоне исследованных концентраций не наблюдали (рис. 4a); при инкубации в течение 6 сут выявлено незначительное снижение метаболической активности клеток (рис. 4b).

Считается, что на биосовместимость полимеров влияют такие их свойства, как молекулярная масса, плотность заряда и тип катионных функциональных групп, а также структура и последовательность мономерных звеньев (линейные и разветвленные области) [21]. Различия в цитотоксичности пектинов могут быть следствием как изменения



**Рис. 3.** Метаболическая активность клеток HEK293 после инкубации с гель-экстрактами в течение двух (a) и шести (b) суток. Данные представлены в виде среднего арифметического значения  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

**Fig. 3.** Metabolic activity of HEK293 cells after incubation with pectin gels for two (a) and six (b) days. The data are presented as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$



**Рис. 4.** Метаболическая активность клеток Caco-2 после инкубации с гель-экстрактами в течение двух (a) и шести (b) суток. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

**Fig. 4.** Metabolic activity of Caco-2 cells after incubation with pectin gels for two (a) and six (b) days. The data are presented as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

физико-химических характеристик культуральной среды (вязкость, кислотно-щелочное равновесие и др.), так и действия на мембранные структуры (ионные каналы, рецепторы, транспортеры).

Установлено, что яблочный пектин AU701 и пектин бодяка CAc снижают pH питательной среды до 4–5, в отличие от других исследуемых образцов. Внеклеточный pH может косвенно изменять транспортные характеристики различных ионнозависимых каналов [22]. Нельзя исключить, что именно кислые условия подавляют метаболизм клеток НЕК293 при 6-суточной инкубации.

Для оценки цитотоксического действия пектин-гелевых гранул был выбран метод, описанный в литературе [23], а именно предварительная инкубация гелей в питательной среде для получения экстрактов, которые затем добавляют к адгезированным клеткам. Установлено, что гранулы при предварительной инкубации набухают, но не разрушаются. Основные компоненты, экстрагирующиеся из гелей, представлены ионами кальция и фрагментами полисахаридных молекул (отдельные моносахариды), характерными для каждого типа пектинов. Фактически все образцы, незначительно или умеренно, снижают метаболическую активность клеток. Вероятно, умеренная цитотоксичность вызвана действием ионов кальция.

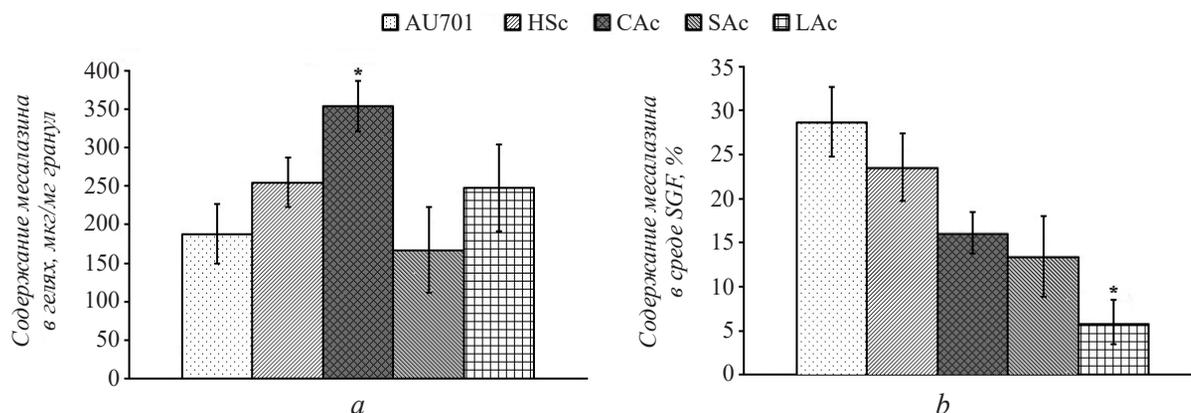
Пока неизвестно, с чем связано стимулирующее действие пектинов на метаболическую активность клеток. Возможно, пектиновый полисахарид рябины SAc стимулирует жизнеспособность клеток благодаря повышенному содержанию остатков глюкозы в его составе (табл. 1). Хорошо известно, что глюкоза является энергетическим субстратом

клеток млекопитающих [24]. Возможно, глюкоза, содержащаяся в пектине SAc, выступает как дополнительный источник энергии, способствующий росту пролиферативной активности клеток. Стимулирующее действие пектиновых полисахаридов борщевика HSc и бодяка CAc на метаболическую активность клеток может быть связано с высоким содержанием белка, который выступает источником аминокислот, в том числе незаменимых (табл. 1).

На втором этапе исследований оценивали кинетику высвобождения месалазина из пектин-гелевых гранул при инкубации в среде SGF, имитирующей среду желудка. Выявлено, что гелевые гранулы различаются по эффективности загрузки месалазином. При одинаковых условиях загрузки содержание месалазина в гранулах составляет от 167 до 364 мкг/мг гранул. Наибольшей эффективности загрузки удалось достичь для гелевых гранул, полученных из пектина бодяка CAc (рис. 5a).

Выявлено, что исследованные гранулы обладают различной устойчивостью к набуханию в искусственной среде желудка (табл. S1 дополнительный материал). Гелевые гранулы из пектинов люпина LAc и рябины SAc сохраняли форму при инкубации в среде SGF, а из пектинов бодяка CAc и борщевика HSc увеличились в размерах в 2 и 3 раза соответственно.

Установлено, что устойчивость гранул к набуханию в кислой среде коррелирует с их способностью удерживать месалазин. Минимальное высвобождение лекарственного средства (около 10%) выявлено для гранул из пектина люпина LAc. Найдено, что гелевые гранулы из пектинов бодяка CAc и рябины SAc высвобождают менее



**Рис. 5.** Содержание месалазина в гелевых гранулах (а) и его экстракция из гелевых гранул (б) яблочного пектина AU701, пектина борщевика HSc, пектина бодяка CAc, пектина рябины SAc, пектина люпина LAc. Данные представлены в виде среднего  $\pm$ SD,  $n = 3$ . \* $p < 0,05$  по сравнению с гранулами из яблочного пектина AU701

**Fig. 5.** The content of mesalazine in gel granules (a) and its extraction from gel granules (b) of AU701 apple pectin, HSc pectin, CAc pectin, SAc pectin, LAc pectin. The data are presented as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $p < 0,05$  vs AU701 apple pectin granules

20% месалазина, а гранулы из яблочного пектина AU701 и пектина борщевика HSc – около 30% лекарственного средства (рис. 5b).

Таким образом, установлено, что от устойчивости пектин-гелевых гранул в кислой среде зависит их способность удерживать лекарственное средство. Гранулы из пектина люпина LAc можно рассматривать как наиболее перспективный материал для создания средств пероральной доставки лекарств, так как наряду с низкой цитотоксичностью обладают устойчивостью к кислой среде желудка и предотвращают преждевременное высвобождение месалазина.

#### Дополнительный материал

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru>

#### ЛИТЕРАТУРА

- Chen Q., Liang S., Thouas G.A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.*, 2013, 38(3–4), 584–671. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2012.05.003
- Chan S.Y., Choo W.S., Young D.J., Loh X.J. Pectin as a rheology modifier: origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydr. Polym.*, 2017, 161, 118–139. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.12.033
- Kyomugasho C., Gwala S., Christiaens S., et al. Pectin nanostructure influences pectin-cation interactions and in vitro-bioaccessibility of  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ -ions in model systems. *Food Hydrocolloids*, 2016, 62, 299–310. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.07.030
- Оводова Р.Г., Головченко В.В., Попов С.В., Оводов Ю.С. Новейшие сведения о пектиновых полисахаридах. *Известия Коми научного центра УРО РАН*, 2010, 3(3), 37–45.
- Pectins and their manipulation, vol. 15. Eds Seymour G.B., Knox J.P., USA&Canada: Blackwell Publ., CRC Press LLC, 2002, 250 p.
- Mishra S. K., Banthia A.K., Majeed A.B.A. Pectin based formulations for biomedical applications: a review. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 2012, 5(4), 1–7.
- Günter E.A., Popeyko O.V., Markov P.A., et al. Swelling and morphology of calcium pectinate gel beads obtained from *Silene vulgaris* callus modified pectins. *Carbohydr. Polym.*, 2014, 103, 550–557. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.12.071
- Espinosa-Leal C.A., Puente-Garza C.A., García-Lara S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 2018, 248, 1–18. doi: 10.1007/s00425-018-2910-1
- Ngouemazong D.E., Tengweh F.F., Fraeye I., et al. Effect of de-methylesterification on network development and nature of  $Ca^{2+}$ -pectin gels: towards understanding structure-function relations of pectin. *Food Hydrocolloids*, 2012, 26(1), 89–98. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.04.002
- do Prado S.B.R., Ferreira G.F., Harazono Y., et al. Ripening-induced chemical modifications of papaya pectin inhibit cancer cell proliferation. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1), 16564. doi:10.1038/s41598-017-16709-3
- Оводова Р.Г., Бушнева О.А., Головченко В.В., и др. Способ получения из растительного сырья полисахаридов, обладающих иммуностимулирующим действием. Патент РФ №2149642 от 27.05. 00. (приоритет от 9.08.99.), БИ № 15. 2000.
- Usov A.T., Bilan M.I., Klochkova N.G. Polysaccharides of Algae. Polysaccharide composition of several calcareous red algae: isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (*Rhodophyta*, *Corallinaceae*). *Bot. Marina*, 1995, 38(1–6), 43–51. doi: 10.1515/botm.1995.38.1-6.43
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Pholin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265–275.

14. Костенко В.Г. Хроматографический анализ сахаров, получаемых в процессе переработки растительного сырья. ОНТИТЭИмикробиопром, 1984, 44 с.
15. York W.S., Darvil A.G., McNeil M., Stevenson T.T. Isolation and characterization of plant cell walls and cell-wall components. *Methods Enzymol.*, 1986, 118, 3–40. doi: 10.1016/0076-6879(86)18062-1
16. Bahuguna A., Khan I., Bajpai V.K., Kang S.C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh J. Pharmacol.*, 2017, 12(2), 115–118. doi: 10.3329/bjp.v12i2.30892
17. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use (EMA/CHMP/EWP/192217/2009), 2011.
18. Ferraretto A., Bottani M., De Luca P., et al. Morphofunctional properties of a differentiated Caco2/HT-29 co-culture as an *in vitro* model of human intestinal epithelium. *Biosci. Rep.*, 2018, BSR20171497. doi: 10.1042/BSR20171497
19. Hu J., Han J., Li H., et al. Human embryonic kidney 293 cells: a vehicle for biopharmaceutical manufacturing, structural biology, and electrophysiology. *Cells Tissues Organs*, 2018, 205(1), 1–8. doi: 10.1159/000485501
20. Barrioni B.R., de Carvalho S.M., Oréface R.L., et al. Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2015, 52, 22–30. doi: 10.1016/j.msec.2015.03.027
21. Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B., et al. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 2003, 24(7), 1121–1131. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00445-3
22. Matsuyama S., Reed J.C. Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ.*, 2000, 7(12), 1155. doi: 10.1038/sj.cdd.4400779
23. Yamdej R., Pangza K., Srichana T., Aramwit P. Superior physicochemical and biological properties of poly(vinyl alcohol)/sericin hydrogels fabricated by a non-toxic gamma-irradiation technique. *J. Bioact. Compat. Polym.*, 2016, 32(1), 32–44. doi: 10.1177/0883911516653145
24. Hosios A.M., Hecht V.C., Danai L.V., et al. Amino acids rather than glucose account for the majority of cell mass in proliferating mammalian cells. *Dev. Cell*, 2016, 36(5) 540–549. doi: 10.1016/j.devcel.2016.02.012

## Gel granules from pectin callus *Lupinus angustifolius* prevent the premature release of mesalazine

M. V. VOLKOVA<sup>1,\*</sup>, Z. R. KHASANSHINA<sup>1</sup>, S. V. POPOV<sup>2</sup>, P. A. MARKOV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Physiology, Komi Science Centre, The Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia*

\**e-mail*: biotech.volkova@list.ru

Received September 27, 2019

Revised November 11, 2019

Accepted February 9, 2020

The formation of cross-related pectin matrices on the base of physiologically active polysaccharides opens up new prospects for their application in medicine. The purpose of the study was to identify pectin gels that could retain the drug in an artificial gastric environment and did not have a cytotoxic effect. Here, pectins of apple, hogweed, thistle, rowan and lupine as well their gels were investigated. Pectin-gel granules were produced from 4% solutions of the pectins by ionotropic gelling. A metabolic activity of human cell cultures was evaluated in MTT test. The pectins at concentrations of less than 2 mg/mL were shown to be no cytotoxic. Pectin gels slightly reduced the metabolic activity of cells. The content of mesalazine in the gels and its releasing were evaluated by liquid chromatography-mass spectrometry method. Among pectines investigated, gel granules of lupine pectin retained the mesalazine most effectively. On the base of the results, one can consider the pectin polysaccharides of lupine as potential gel matrices for oral drug delivery systems.

**Keywords:** gel, pectins, HEK293, Caco-2, 5-aminosalicylic acid, gastric solution, chromatography-mass spectrometry

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-1-53-60