

КОМПОЗИТ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ХИТОЗАНА ДЛЯ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ L-АСПАРАГИНАЗЫ НА КЛЕТКИ МЕЛАНОМЫ

© 2024 А.Н. Шишпарёнок¹, Е.Р. Петряев², С.А. Королёва³, Н.В. Добрякова¹,
И.Д. Злотников⁴, Е.Н. Комедчикова⁵, О.А. Колесникова⁵,
Е.В. Кудряшова⁴, Д.Д. Жданов^{1*}

¹ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия; электронная почта: zhdanovdd@mail.ru

² Московский политехнический университет, 107023 Москва, Россия

³ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы (Университет РУДН),
117198 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119192 Москва, Россия

⁵ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 30.05.2024

После доработки 12.07.2024

Принята к публикации 22.07.2024

Актуальной проблемой, связанной с терапевтическим использованием L-аспарагиназ (L-АСП) для лечения опухолевых заболеваний, является ограниченный период их действия вследствие быстрой инактивации. Одним из подходов к улучшению терапевтических свойств ферментов, в том числе L-АСП, является их иммобилизация на различных типах биосовместимых полимеров. Бактериальная целлюлоза (БЦ) является перспективным носителем для различных лекарств благодаря своей биосовместимости, нетоксичности и высокой способности сорбции биоактивных соединений. Поскольку нативная БЦ имеет ряд недостатков, связанных со структурой и стабильностью, модифицированная БЦ часто рассматривается в качестве потенциального носителя для белков. В нашем исследовании для иммобилизации L-АСП был предложен композит БЦ-хитозан, в котором хитозан шит глутаровым альдегидом. Такая модификация увеличивала сорбционную ёмкость плёнки. Было показано, что плёнки из БЦ-хитозана обладают улучшенными физико-химическими характеристиками по сравнению с нативными плёнками БЦ, что позволило увеличить время высвобождения L-АСП с 8 до 24 ч в бесклеточной системе. Такие плёнки обладали пролонгированной токсичностью в отношении клеток меланомы до 10 ч. Предложенная стратегия иммобилизации L-АСП на плёнках БЦ-хитозан является перспективным подходом, потенциально применимым для терапии поверхностных типов рака, в частности меланомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: L-аспарагиназа, бактериальная целлюлоза, хитозан, кинетические модели, цитотоксичность, меланома.

DOI: 10.31857/S0320972524100031 EDN: IPWBDC

ВВЕДЕНИЕ

L-Аспарагиназа (L-АСП, ЕС 3.5.1.1) – фермент, который гидролизует аспарагин с образованием аммиака и L-аспарагиновой кислоты. Различные

типы фермента широко используются в фармацевтической и пищевой промышленности [1–6]. Нативная L-АСП *Escherichia coli* (ЕСАП), аспарагиназа *E. coli*, конъюгированная с полиэтиленгликолем (ПЭГ-аспарагиназа) и L-АСП *Erwinia*

Принятые сокращения: L-АСП – L-аспарагиназа (L-asparaginase); БЦ – бактериальная целлюлоза; ПЭГ – полиэтиленгликоль; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; ЕСА, ЕгА и ЕwА – терапевтические формы L-АСП.

* Адресат для корреспонденции.

chrysanthemi (ErA) успешно применяются для лечения острого лимфобластного лейкоза [7–9]. Недавние исследования показали, что L-АСП, которые используются в терапии острых лейкозов, имеют клинический потенциал для лечения нескольких агрессивных подтипов солидных опухолей, включая рак молочной железы [10], глиобластому, рак поджелудочной железы и гепатоцеллюлярную карциному [11]. Использование L-АСП связано со множественными побочными эффектами, коротким временем полувыведения и токсичностью [12]. Период инактивации циркулирующей L-АСП резко сокращается с 18–24 ч до 2,5 ч из-за системного появления нейтрализующих антител и протеолитической деградации [13]. Терапевтическая эффективность наиболее часто используемой формы L-АСП – ЕсАП [9] снижена из-за относительно высокой глутаминазной активности [14]. Глутаминазная активность является причиной развития таких побочных эффектов, как тромбоз, панкреатит, гипергликемия и токсичность [9, 15]. По сравнению с нативной ЕсАП, ПЭГ-форма данного фермента имеет более длительный период полувыведения и сниженную частоту возникновения побочных токсических эффектов [9], тем не менее у 30% пациентов возникает реакция гиперчувствительности [16, 17]. Фермент ErA и её гомолог из *Erwinia carotovora* (ЕwА) создавались как препараты второго ряда терапии при возникновении гиперчувствительности к ЕсА [17]. ErA и ЕwА обладают меньшей токсичностью за счёт меньшей специфичности к глутамину, и, как следствие, меньшим числом побочных эффектов [18, 19]. Однако ЕwА менее активна и менее стабильна по сравнению с ЕсА [19, 20]. Таким образом, разработка способов пролонгировать действие L-АСП [21, 22], в частности ЕwА, и уменьшить побочные эффекты является актуальной задачей. Одним из основных подходов для решения этой задачи является поиск новых источников L-АСП, а также создание менее иммуногенных и более стабильных вариантов L-АСП с помощью генетической инженерии [6, 23].

Иммобилизация L-АСП на различных носителях является другим подходом для увеличения стабильности, времени полувыведения и снижения токсичности [24, 25]. Иммобилизация позволяет оптимизировать каталитическую активность и минимизировать побочные эффекты [26, 27]. Для иммобилизации различных L-АСП применялись синтетические носители (ПЭГ, полиимид, полиакриламид), гибридные носители (ПЭГ–альбумин, ПЭГ–хитозан, полиметилметакрилат–крахмал, ПЭГ–полиэтиленмин), природные носители: углеводы (целлюлоза, декстран, крахмал, хитозан, хитин) и белки (альбумин, желатин, коллаген, волокна шёлка и фиброин шёлка) [12, 28, 29].

Одна из стратегий иммобилизации заключается в модификации ферментативной структуры L-АСП, например, ковалентное связывание (конъюгация) с ПЭГ [24, 25] или хитозаном [30, 31]. Другой подход направлен на захват фермента внутрь защитной структуры, или инкапсуляцию [32] – это позволяет снизить токсичность, продлить период его полужизни *in vivo*, повысить стабильность, обеспечить целевую доставку и контролируемое высвобождение фермента [12]. Для инкапсуляции L-АСП использовали эритроциты, твердые липидные наночастицы, липосомы, полимеры (поли(молочно-ко-гликолевая) кислота), полиакриламид, полианилин и др.) [12]. Преимущества обеих стратегий заключаются в том, что иммобилизация защищает ферменты от дезактивации и деградации [32]. На данный момент наиболее популярным подходом иммобилизации стала химическая модификация L-АСП путём ковалентного связывания с ПЭГ [33]. Модификация позволила увеличить период полувыведения, но, к сожалению, не снизила побочные эффекты [21, 34].

Системы доставки лекарств на основе бактериальной целлюлозы (БЦ) привлекают внимание [35] благодаря её уникальным характеристикам. БЦ обладает высокой чистотой (отсутствуют лигнины, характерные для растительной целлюлозы), механической прочностью [36], высокой пористостью, биосовместимостью, большой удельной поверхностью и высокой плотностью сетки фибрилл, т.е. характеристиками, которые влияют на адсорбцию и высвобождение лекарственного средства из матрицы [37]. БЦ не токсична [38].

Недостатком немодифицированной БЦ является низкая водоудерживающая способность, и адсорбированные на таком типе БЦ соединения со временем склонны к выщелачиванию. Поэтому для достижения пролонгированного высвобождения лекарственного средства БЦ подвергают различным химическим модификациям [39–42]. Одним из перспективных соединений для модификации БЦ является хитозан [43]. Высокая реакционная способность аминогрупп хитозана способствует сшиванию с линкерами, такими как глутаровый альдегид. Ранее было показано [44–48], что сшивка целлюлозы и хитозана повышает их сорбционную способность за счёт поверхностной доступности реакционных гидроксильных групп целлюлозы и аминогрупп хитозана [49]. Введение поперечных связей в сетку биополимера изменяет текстурные, гидратационные и механические свойства, а также химическую устойчивость к биоразложению [50]. Применимость данного подхода подтверждена работами по получению композитов хитозана и БЦ для иммобилизации липазы [51, 52], альбумина и фибронектина [53], контролируемого высвобождения

кверцетина [54], кветиапин fumarata [55] и ибупрофена [43].

Основным преимуществом использования БЦ является её способность к локальной доставке лекарств к опухолям с контролируемым высвобождением, в результате чего минимизируются системные побочные эффекты [40, 56]. В этом исследовании мы разработали композит БЦ и хитозана для иммобилизации L-АСП *Erw. carotovora* для увеличения времени её действия на опухолевые клетки меланомы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение бактериальной целлюлозы.

Для получения биоплёнок использовали штамм *Komagataeibacter hansenii* (ВКПМ № В-11239). Штамм-продуцент культивировали в среде Хестрина–Шрамма следующего состава (в расчёте на литр): 10 г глюкозы («Sigma», США); 5 г пептона («Диаэм», Россия); 5 г дрожжевого экстракта («PanReas Applichem», Испания); 1,15 г моногидрата лимонной кислоты («Merck Millipore», Германия); 2,7 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ («PanReas Applichem»). Среду готовили на деионизированной воде, доводили до pH 4,5 и автоклавировали в колбах. Затем на 200 мл среды добавляли 1 мл 90%-ного этанола и 15 мл среды, содержащей *K. hansenii* В-11239, разливали по 2 мл в стерильные 24-луночные планшеты («Wuxi NEST Biotechnology», Китай) и культивировали в статичных условиях при 27 °C. Мембраны БЦ выращивали в течение 48, 72 и 96 ч для получения мембран различной толщины. Для лизиса и удаления бактерий полученные мембраны БЦ обрабатывали смесью 0,1 М NaCl («Диаэм») и 1%-ного додецилсульфата натрия («Merck Millipore») в течение 72 ч, а затем промывали деионизированной водой для удаления остатков клеток и нейтрализации pH.

Подготовка композитов БЦ–хитозан. Композит БЦ–хитозан получали с помощью стратегии *ex situ* [37, 57, 58]. Раствор хитозан·HCl со средней молекулярной массой 7 кДа (степень деацелирования – 80%; предоставлен Федеральным исследовательским центром «Основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия) готовили в концентрациях 0,05; 0,1; 0,5 или 1%. Для этого хитозан растворяли в 1%-ном растворе CH_3COOH и выдерживали 1 ч на водяной бане при 50 °C до полного растворения. Влажные мембраны БЦ подсушивали 20 мин при 60 °C для удаления избытка влаги и погружали в 1 мл раствора хитозана на 1, 2, 3 или 6 ч при постоянном перемешивании со скоростью 100 об./мин при 37 °C. Далее, к мембранам БЦ добавляли 0,5 мл водного раствора 1%-ного глутарового альдегида (pH 7,0) («neoFroxx», Гер-

мания) и инкубировали при 23 °C в течение 1, 2, 3 или 4 ч. Лиофильное высушивание плёнок БЦ проводили для определения их физических характеристик. Плёнки замораживали в жидком азоте и лиофилизировали в течение 24 ч при температуре –50 °C и давлении 0,07 мбар в сублимационной сушилке Alpha 2-4 LD типа 101042 Lab («Christ», Германия).

Определение содержания воды в плёнках, их пористости и адсорбционной способности. Содержание воды в плёнках оценивали по изменению их веса до и после лиофильного высушивания. Процент воды рассчитывали по уравнению:

$$\text{Содержание воды (\%)} = \frac{A - B}{A} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где A – вес влажного образца; B – вес сухого образца.

Пористость рассчитывали по уравнению Kitaoka et al. [59]. Сначала БЦ взвешивали, предварительно удалив избыток влаги с помощью фильтровальной бумаги. Затем образцы лиофилизировали, и плёнку инкубировали в деионизированной воде 12 ч при комнатной температуре, после чего снова измеряли вес. Пористость определяли по уравнению:

$$P (\%) = \frac{Q_0 - Q_1}{Q_0 - Q_2} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где P – пористость мембраны; Q_0 – вес влажного образца (г); Q_1 – вес сухого образца (г); Q_2 – вес образца (г) после инкубации (12 ч) высушенного образца в воде.

Адсорбционную ёмкость плёнок измеряли по методике, предложенной Wu et al. [60], путём инкубации лиофильно высушенного образца плёнок в буфере HEPES (50 мМ (pH 8,0); «Serva», Германия) в течение 24 ч при 37 °C. Для расчёта использовали следующее уравнение:

$$\text{Адсорбционная ёмкость (\%)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100\%, \quad (3)$$

где W_0 и W_t – вес образцов до и после инкубации в буфере соответственно.

Определение химического состава методом инфракрасной (ИК) спектроскопии. ИК-Спектры лиофильно высушенных образцов регистрировали на ИК-Фурье-микроскопе МИКРАН-3 («Симекс», Россия). Спектры записывались в режиме поглощения. Проводили 36 сканов с разрешением 4 см^{-1} при 22 °C. Спектральный диапазон составлял $4000\text{--}900 \text{ см}^{-1}$.

Морфология. Морфологию лиофильно высушенных БЦ и композитов БЦ–хитозан изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Образцы плёнок покрывали золотом и исследовали с помощью сканирующего электрон-

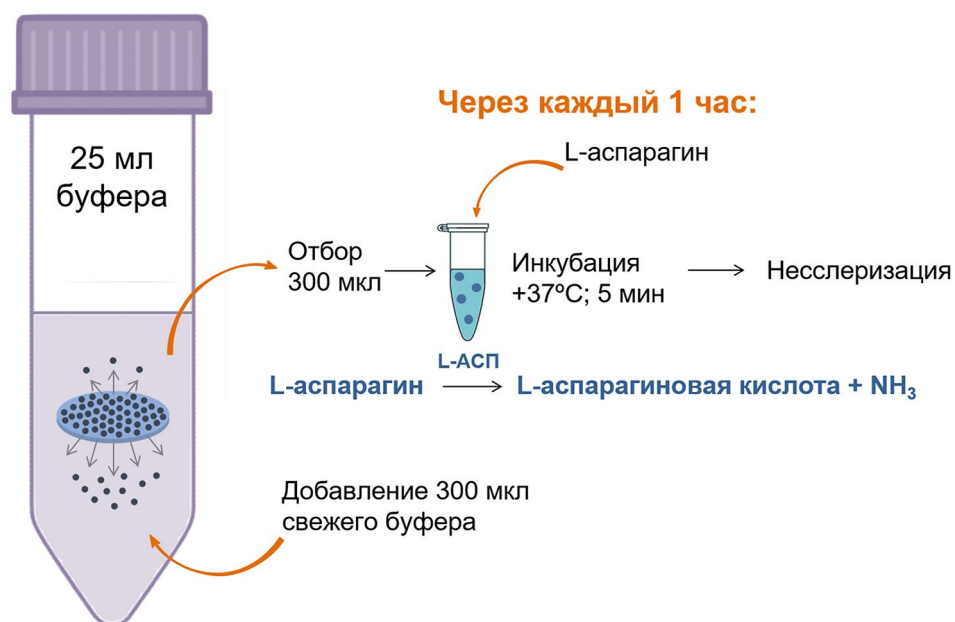


Рис. 1. Схема эксперимента для определения высвобождения L-АСП из плёнок БЦ и БЦ-хитозан. Плёнки БЦ и БЦ-хитозан с иммобилизованным ферментом инкубировали в 25 мл 50 мМ HEPES. Происходило высвобождение L-АСП из плёнок и её накопление в буфере. Каждый час отбирали 300 мкл пробы (одновременно добавляли 300 мкл свежего буфера для поддержания объёма) и определяли активность фермента по детекции количества ионов аммония методом прямой несслеризации после инкубации с субстратом

ного микроскопа MAJAZ («Tescan», Чехия) [61]. Изображения образцов были получены при ускоряющем напряжении 7 кВ и увеличении 20 000.

Иммобилизация L-АСП на БЦ. L-АСП EwA из продуцента *Erw. carotovora* (595 МЕ/мг; молекулярная масса – 37 кДа; 349 аминокислотных остатков; чистота – 98,1%; изоэлектрическая точка – 8,1; GenBank ID: AAR92666.3) была получена в лаборатории медицинской биотехнологии ИБМХ [62]. L-АСП была иммобилизована на БЦ методом физической адсорбции в 50 мМ HEPES (рН 8,0). Для этого мембраны БЦ погружали в 0,5 мл раствора фермента в концентрации 0,05 мг/мл (28 МЕ/мл) и инкубировали при 4 °C в течение 12 ч. Количество иммобилизованной L-АСП определяли с помощью UV-VIS-спектрофотометрии (Aquarius CE 7400 Spectrophotometer; «Cecil Instruments Ltd.», Великобритания) по методике Dawson et al. [63]. Процент адсорбированной L-АСП определяли как разницу между начальным количеством белка и количеством в супернатанте после инкубации.

Оценка высвобождения L-АСП. Высвобождение L-АСП из мембран БЦ-хитозан и БЦ определяли путём инкубации плёнки в 25 мл 50 мМ HEPES (рН 8,0) без субстрата в течение 24 ч. Через каждый час отбирали 300 мкл пробы, в которой проводили определение активности фермента. Для этого к пробе добавляли 100 мкл L-аспарагина (40 мМ; «Диаэм») и инкубировали 5 мин при 37 °C, после чего определяли концентрацию ионов аммония методом прямой нессле-

ризации, используя реактив Несслера («PanReac Applichem», Испания) [64, 65]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует высвобождение 1 мкмоль аммония за 1 мин при 37 °C. После отбора проб каждый раз добавляли 300 мкл свежего буфера для поддержания объёма реакции. Схема эксперимента по определению высвобождения фермента представлена на рис. 1.

Данные скорости высвобождения фермента использовали для построения кинетических моделей высвобождения: модель нулевого порядка, модель первого порядка, модель Хигучи, модель Корсмейера–Пеппаса и модель Хиксона–Кроуэлла [66]. Для описания механизма высвобождения применяли модель Корсмейера–Пеппаса и определяли коэффициент диффузии (n), характеризующий различия в высвобождении L-АСП из матриц БЦ.

Оценка цитотоксичности. Клетки линий меланомы человека A375, A875 и MelJuso, а также меланомы мыши B16F10 (получены из коллекции клеток Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина) культивировали на среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия). В качестве условно-нормальных использовали клетки фибробластов линии WI-38 («АТСС», США), культивированные в среде DMEM («ПанЭко»). Среда для культивирования содержала 5% эмбриональной телячьей сыворотки («Capricorn Scientific», Германия) и 1% пирувата натрия («ПанЭко»).

Клетки выращивали в атмосфере 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C. Перед экспериментом клеточные линии тестировали на загрязнение микоплазмой с помощью набора для обнаружения микоплазмы Plasmotest™ («InvivoGen», Калифорния).

Для определения значения IC₅₀ (концентрация фермента, при которой жизнеспособность клеток снижается на 50%) клетки культивировали в течение 72 ч в 96-луночной планшете («Wuxi NEST Biotechnology») в присутствии свободной EwA в диапазоне концентраций 0,01–10 Ед./мл. Цитотоксичность определяли путём измерения превращения тетразолиевой соли, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид («Serva»), в формазан (МТТ-тест) [67]. Определяли поглощение формазана при длине волны 540 нм при помощи планшетного ридера SuPerMax3000 («Flash Spectrum», Китай). Значения IC₅₀ были рассчитаны по уравнениям зависимости жизнеспособности клеток от концентрации фермента [68].

Для определения наиболее чувствительной к EwA линии клеток, иммобилизованной на композите БЦ-хитозан, клетки инкубировали в присутствии композита в 24-луночной планшете («Wuxi NEST Biotechnology») в течение 24 ч. Цитотоксичность определяли МТТ-тестом через 48 ч после начала инкубации с плёнками.

Для определения продолжительности действия иммобилизованного фермента клетки условной меланомы линии А875 или условно-нормальные фибробласты линии WI-38 высевали в 24-луночный планшет с плотностью посева 5×10^4 клеток на лунку и выращивали в течение 24 ч. Затем плёнки БЦ или БЦ-хитозан с иммобилизованной L-АСП помещали в лунки с клетками и инкубировали с течением 3 ч с последующим переносом в новые лунки планшета с клетками. Цитотоксичность оценивали через 48 ч после окончания инкубации с плёнками МТТ-тестом. Оптические изображения морфологии клеток через 72 ч инкубации получали с помощью инвертированного микроскопа «Биомед 3И» («Биомед», Россия) в режиме светлого поля.

Статистический анализ. Количественные данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение и получены в трёх независимых экспериментах. Все данные были проанализированы с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2016 («Microsoft Inc.», США). Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подбор оптимальных условий создания композита БЦ-хитозан. Для подбора оптималь-

ных условий по созданию композита БЦ-хитозан были проведены эксперименты по подбору времени культивирования плёнок, времени сшивки хитозана глутаровым альдегидом, концентрации хитозана и времени инкубации хитозана с БЦ. Оптимальным условием считали таковое, при котором активность фермента на плёнке БЦ-хитозан не отличается от активности фермента на БЦ через 24 ч, т.е. нет значительной потери активности.

На рис. 2 представлена кинетика высвобождения L-АСП из плёнок БЦ и БЦ-хитозан. Скорость высвобождения L-АСП, иммобилизованной на плёнке БЦ-хитозан (концентрация хитозана 0,05%), зависела от времени культивирования продуцента БЦ, т.е. толщины и пористости плёнок (рис. 2, а). Максимальной скоростью высвобождения фермента обладали плёнки, выращенные в течение 72 ч. Плёнки, выращенные в течение 48 и 96 ч, продемонстрировали скорость высвобождения в 2 раза ниже. Такое различие можно объяснить различием внутренней структуры плёнок. При добавлении хитозана в БЦ образуется новая сетчатая трёхмерная структура, в результате чего изменяется размер пор и адсорбционная ёмкость плёнок. Известно, что включение экзогенной молекулы, как правило, макромолекулы, изменяет структуру фибрилл БЦ, влияющих на размер и объём пор [69]. Таким образом, плёнки, выращенные в течение 72 ч, обладали оптимальными характеристиками пористости для иммобилизации и высвобождения L-АСП.

Концентрация хитозана в композите не влияла прямо пропорционально на скорость высвобождения фермента (рис. 2, б). Композиты с концентрацией хитозана 0,1, 0,5 и 1% показали более низкую скорость высвобождения фермента, чем композит с концентрацией 0,05%. Оптимальное время инкубации БЦ и хитозана (в концентрации 0,05%) составило 2 ч (рис. 2, в), так как наблюдали максимальную активность иммобилизованной L-АСП. Эти различия можно объяснить небольшим временем инкубации БЦ в хитозане (2 ч). В других работах [70–72] использовали более продолжительное время инкубации хитозана или другой компонент с БЦ, и было показано, что проникновение хитозана в БЦ значительно увеличивается в промежутке с 5 до 20 ч, а затем практически не изменяется [73]. Таким образом, концентрация хитозана при времени инкубации БЦ с хитозаном 1–2 ч не влияет на скорость высвобождения L-АСП.

В ходе подбора оптимального времени инкубации композита БЦ-хитозан и глутарового альдегида наилучшие показатели активности L-АСП через 24 ч были получены для плёнок с хитозаном, инкубированных с глутаровым альдегидом

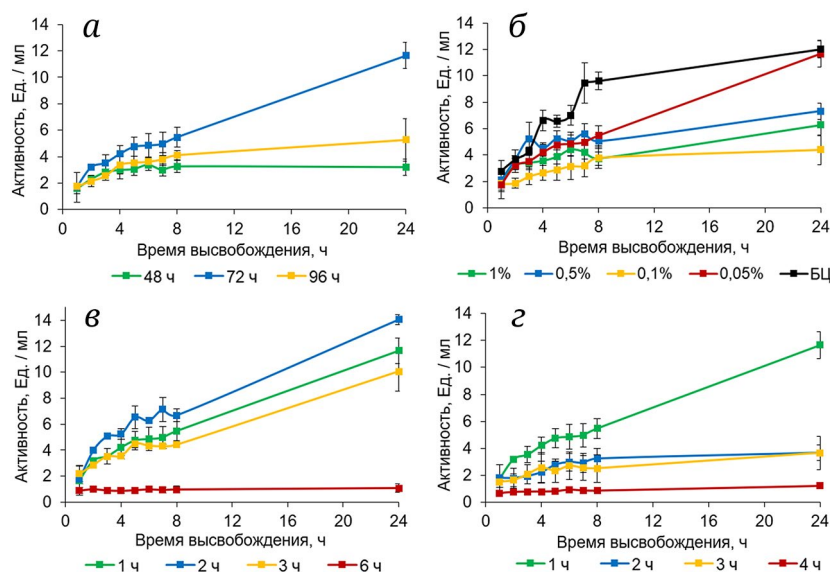


Рис. 2. Влияние условий создания композита БЦ–хитозан на высвобождение фермента в течение 24 ч. а – Влияние времени выращивания плёнок; б – влияние концентрации хитозана. Активность фермента, иммобилизованного на плёнки БЦ, показана для сравнения на панели. в – Влияние времени инкубации с хитозаном; г – влияние времени инкубации с глутаровым альдегидом

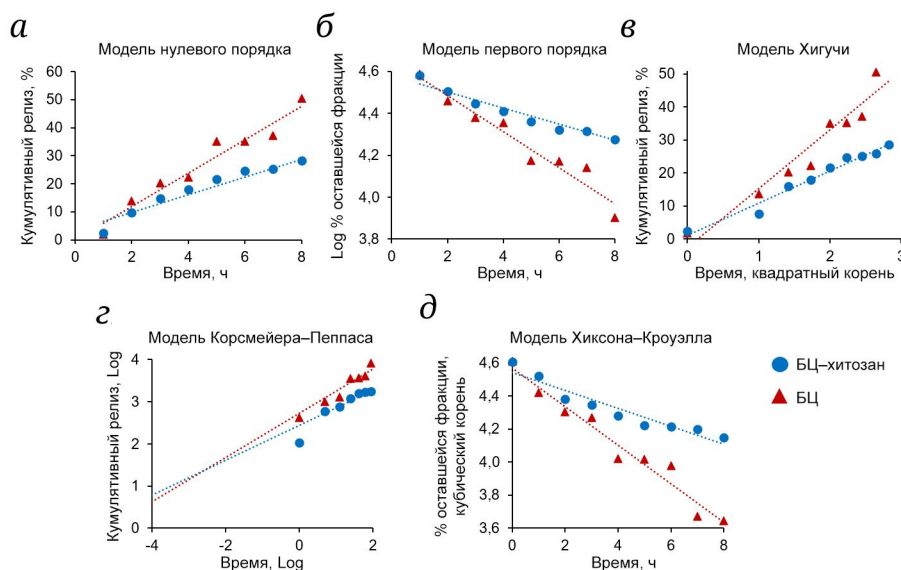


Рис. 3. Графическое изображение кинетических моделей высвобождения для L-АСП, иммобилизованной на БЦ–хитозан или БЦ. а – Модель нулевого порядка. б – Модель первого порядка. в – Модель Хигучи. г – Модель Корсмейера–Пеппаса. д – Модель Хиксона–Кроуэлла

в течение 1 ч (рис. 2, г). Увеличение времени инкубации до 4 ч вызывало значительное снижение активности фермента, а через 24 ч активность фермента снижалась практически до нуля.

После подбора условий получения композитов БЦ–хитозан было установлено, что оптимальное время выращивания плёнки составляет 72 ч, концентрация хитозана – 0,05%, время инкубации с хитозаном – 2 ч, время инкубации БЦ–хитозан с глутаровым альдегидом – 1 ч. С данными плёнками БЦ–хитозан проводили дальнейшие эксперименты.

Кинетические модели высвобождения.

Данные динамики высвобождения L-АСП, измеренные по активности фермента, использовали для моделирования кинетических параметров высвобождения из БЦ или композитов БЦ–хитозан. Высвобождение из композита БЦ–хитозан более всего соответствует модели Хигучи (рис. 3, в; табл. 1), при которой высвобождение лекарственного средства контролируется диффузией и имеет зависимость первого порядка от градиента концентрации [74]. Высвобождение из немодифицированной БЦ соответствует кинетической модели

Таблица 1. Коэффициенты регрессии (R^2) для кинетических моделей высвобождения L-АСП в течение 8 ч из БЦ и БЦ-хитозан

Кинетическая модель	БЦ	БЦ-хитозан
Нулевого порядка	0,960	0,928
Первого порядка	0,959	0,948
Хигучи	0,937	0,971
Хиксона-Кроуэлла	0,962	0,915
Корсмейера-Пеппаса	0,985	0,961

Корсмейера-Пеппаса (рис. 3, г; табл. 1), для которой высвобождение лекарственного средства регулируется процессами релаксации и перестройки матрицы [75].

За первые 8 ч из плёнок БЦ высвободилось 52% L-АСП, а из плёнок БЦ-хитозан – лишь 29% (рис. 2, б; рис. 3, а). Через 24 ч из плёнок БЦ высвободилось 65% фермента, а из плёнок БЦ-хитозан – 63% фермента. Эти данные указывают на то, что для немодифицированной плёнки характерно относительно быстрое высвобождение в течение 8 ч, которое потом замедляется. Плёнки, модифицированные хитозаном, имеют более медленное, пролонгированное высвобождение фермента без резкого скачка в первые 8 ч.

Кроме того, плёнки БЦ и БЦ-хитозан отличались характером диффузии. В течение первых 8 ч для композита БЦ-хитозан рассчитанный коэффициент диффузии (n) составил $0,246 \pm 0,029$, а для БЦ – $0,743 \pm 0,142$ ($p < 0,05$). В первом случае характер диффузии L-АСП из матрицы подчиняется закону Фика ($n < 0,45$), при котором скорость процессов диффузии гораздо меньше, чем скорость релаксации матрицы полимера [76]. Во втором случае высвобождение фермента характеризуется нефиковской диффузией ($0,45 < n < 0,89$). Фиковская диффузия относится к процессу переноса растворённого вещества, в котором время релаксации полимера намного превышает время диффузии растворителя. Когда время релаксации полимера соответствует времени диффузии растворителя, макроскопическое высвобождение лекарства становится аномальным или нефиковским [77], что было характерно для L-АСП, иммобилизованной на БЦ.

Влияние модификации БЦ на характеристики плёнок. Анализ водоудерживающей способности плёнок БЦ до и после модификации показал, что модификация хитозаном практически не влияет на водоудерживающую способность (табл. 2). Однако адсорбционная ёмкость воды плёнок БЦ-хитозан после лиофильного высушивания была в 1,6 раза выше, чем у БЦ.

Таблица 2. Характеристики плёнок БЦ-хитозан и БЦ

Параметр	БЦ-хитозан	БЦ
Масса влажной плёнки, мг	$401,8 \pm 0,7$	$402,0 \pm 0,9$
Масса лиофилизированной плёнки, мг	$5,3 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,6$
Масса плёнки после инкубации в воде, мг	$154,3 \pm 18,2$	$63,7 \pm 23,1$
Содержание воды, %	$98,67 \pm 0,14$	$99,09 \pm 0,14$
Пористость, %	$160,77 \pm 11,47$	$119,52 \pm 7,95$
Адсорбционная ёмкость, %	2794 ± 341	1745 ± 630

Также было выявлено увеличение пористости внутренней структуры композита БЦ-хитозан в 1,34 раза по сравнению с БЦ.

Улучшение адсорбционной ёмкости и пористости модифицированной БЦ после лиофильной сушки может быть связано с более высокой температурой плавления связанной воды вследствие меньшей доступности и лучшей способностью удерживать воду по сравнению с контролем. Образование пор зависит от количества кристаллов льда, образующихся из воды, связанной с материалом. Кристаллы льда полностью сублимируются в процессе сушки, а объём, занимаемый льдом, остаётся для образования пор [78]. Более высокие соотношения площади поверхности к объёму у более тонких немодифицированных плёнок БЦ приводят к более высоким скоростям образования несвязанной воды и её испарения [79] и вследствие этого пониженной адсорбционной ёмкостью для воды.

ИК-Спектры состава плёнок. Для идентификации химического состава плёнок БЦ-хитозан или БЦ с иммобилизованной L-АСП были получены их ИК-спектры (рис. 4).

В спектрах, соответствующих БЦ, присутствуют общие пики, соответствующие целлюлозе: широкий пик при 3335 см^{-1} (рис. 4, а), характерный для валентного колебания –ОН; пик при 2876 см^{-1} , характерный для алифатических валентных колебаний CH_2 -групп, и пик при 1435 см^{-1} , относящийся к деформационным колебаниям –СН [80]. Пики, наблюдаемые при волновых числах 1618, 1435, 1323, 1155 и 1066 см^{-1} , соответствовали разным группам целлюлозы: деформационным колебаниям –СН₂, деформационным колебаниям –СН, асимметричному растяжению гликозидной связи С–О–С и растяжению С–О соответственно (рис. 4, б).

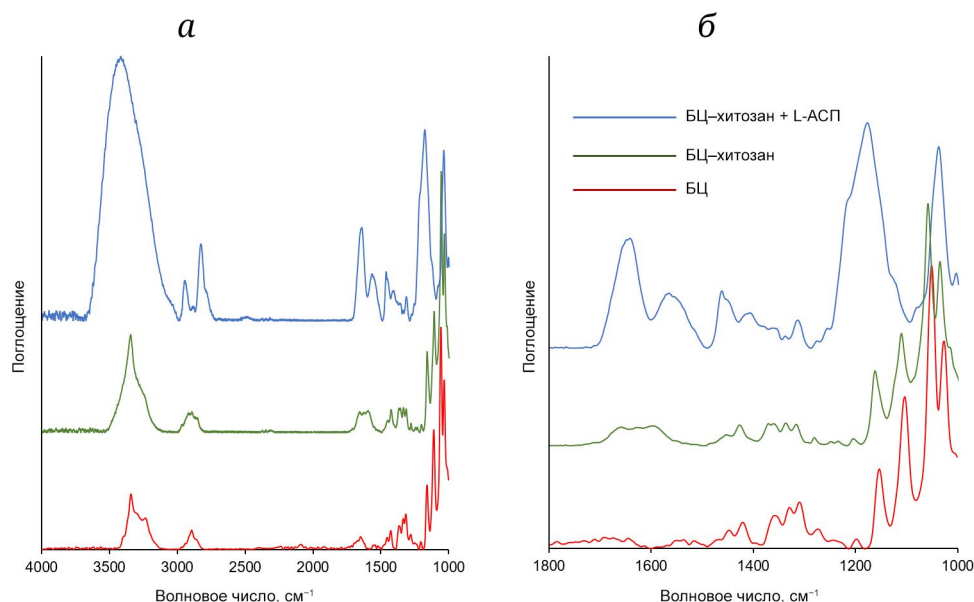


Рис. 4. ИК-спектры плёнок БЦ-хитозан и БЦ. а – Диапазон 1000–4000 см^{-1} ; б – диапазон 1000–2000 см^{-1}

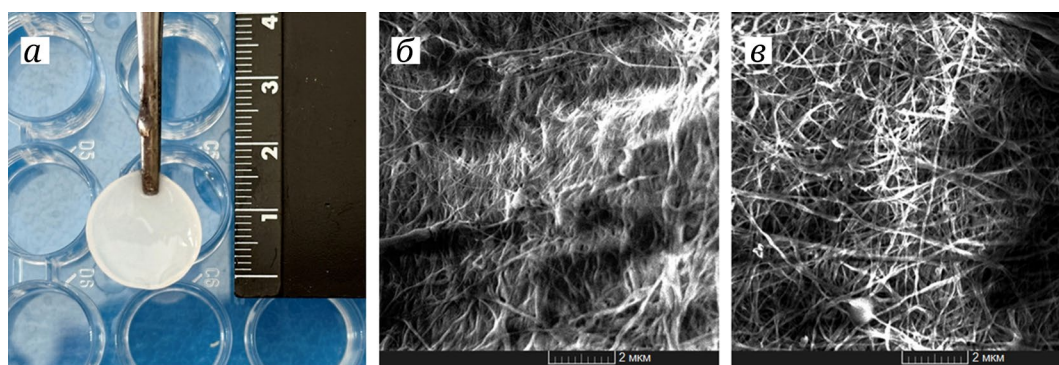


Рис. 5. Морфология плёнок. а – Внешний вид плёнки БЦ, выращенной в лунке 24-луночного планшета. б – СЭМ-изображения продольного среза плёнок БЦ-хитозан; в – СЭМ-изображения продольного среза плёнок БЦ

Спектр БЦ-хитозан был подобен спектру БЦ, поскольку большинство функциональных групп являются общими как для целлюлозы, так и для хитозана [81, 82]. Наблюдали пики валентных колебаний —OH при 3359 см^{-1} , —CH при 2837 см^{-1} и пик деформационных колебаний при 1435 см^{-1} , характерный для $\alpha\text{—CH}_2$ (рис. 4, а) [83]. В отличие от спектра БЦ, в спектре БЦ-хитозан присутствует пик группы N—H хитозана (деацилированные аминокислоты) при 1589 см^{-1} – первичный амин (рис. 4, б). Также на спектре для композита БЦ-хитозан присутствовал характерный пик группы —CH=N— , полученный при $\sim 1682 \text{ см}^{-1}$, который указывает на образование основания Шиффа [84]. На спектре БЦ-хитозан L-АСП видны (рис. 4, б) характерные пики амида I ($1500\text{--}1600 \text{ см}^{-1}$), амида II ($1600\text{--}1700 \text{ см}^{-1}$), амида III ($1200\text{--}1350 \text{ см}^{-1}$). Таким образом, в композите БЦ-хитозан при добавлении глутарового альдегида наблюдали его

реакцию с первичными аминогруппами хитозана с образованием ковалентных сшивок [85].

Морфология плёнок. Культивирование штамма продуцента *K. hansenii* в 24-луночном планшете позволяет получать биоплёнки 16 мм в диаметре (рис. 5, а). Анализ СЭМ проводили для определения морфологических изменений каркаса БЦ до и после модификации. В процессе лиофилизации в БЦ образуются пустоты, которые определяют финальную пористую структуру [71]. Микроструктуры БЦ и БЦ-хитозан показаны на рис. 5. У плёнок БЦ-хитозан (рис. 5, б) формируется более упорядоченная пористая послойная структура и большее количество пор меньшего диаметра по сравнению с БЦ (рис. 5, в). Нановолокна БЦ более плотно переплетены и свернуты по сравнению с более рыхло расположенными волокнами БЦ. Таким образом, различная степень плотности трёхмерной сети БЦ

Таблица 3. Значение IC_{50} свободной EwA и выживаемость клеток после инкубации с EwA, иммобилизованной на плёнке БЦ-хитозан

Клеточная линия	Значение IC_{50} , Ед./мл	Выживаемость, % от контроля
A875	0,04	$11,49 \pm 6,93$
MelJuso	0,12	$22,89 \pm 2,66$
B16F10	0,24	$34,26 \pm 6,92$
A375	0,38	$50,81 \pm 10,51$
WI-38	8,22	$93,61 \pm 17,24$

и БЦ-хитозан будет влиять на набухание, адсорбционную ёмкость плёнок и скорость высвобождения L-АСП.

Пролонгированное цитотоксическое действие L-АСП, иммобилизованной на плёнке БЦ-хитозан. Для выбора наиболее чувствительных к

действию L-АСП клеток определены значения IC_{50} для нативного фермента EwA. Среди линий меланомы наиболее чувствительными оказались клетки A875, а наименее чувствительными – клетки A375 (табл. 3). Контрольные фибробласты WI-38, ожидаемо, были наиболее устойчивыми к действию фермента.

Токсичность L-АСП, высвобождаемой из мембран, определяется скоростью высвобождения и скоростью деградации фермента, т.е. количеством активного фермента в среде. Для определения линии клеток, наиболее чувствительной к EwA, иммобилизованной на композите БЦ-хитозан, определяли выживаемость клеток после 24-часовой инкубации с плёнками. Данные выживаемости хорошо согласовались со значением IC_{50} . Наиболее чувствительными клетками меланомы были A875, а наименее чувствительными – A375 (табл. 3). Условно-нормальные фибробласты WI-38 были наиболее устойчивыми и показали наивысшую жизнеспособность.

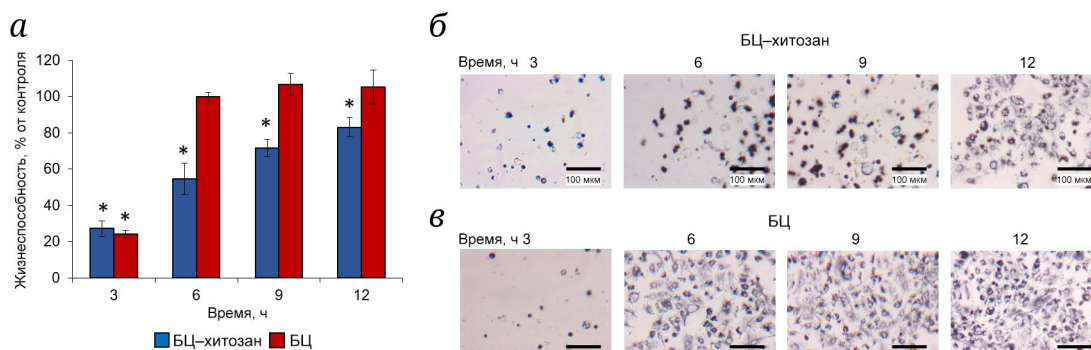


Рис. 6. Продолжительность цитотоксического действия L-АСП, иммобилизованной на плёнке БЦ и БЦ-хитозан на клетки меланомы A875. *a* – Жизнеспособность клеток, измеренная методом МТТ-теста, после инкубации с плёнками и последовательных переносов каждые 3 ч. Микрофотографии в режиме светлого поля клеток, синтезирующих кристаллы формазана, после инкубации с плёнками БЦ-хитозан (*б*) или БЦ (*в*) с иммобилизованной L-АСП. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам, инкубированным с пустыми плёнками БЦ или БЦ-хитозан

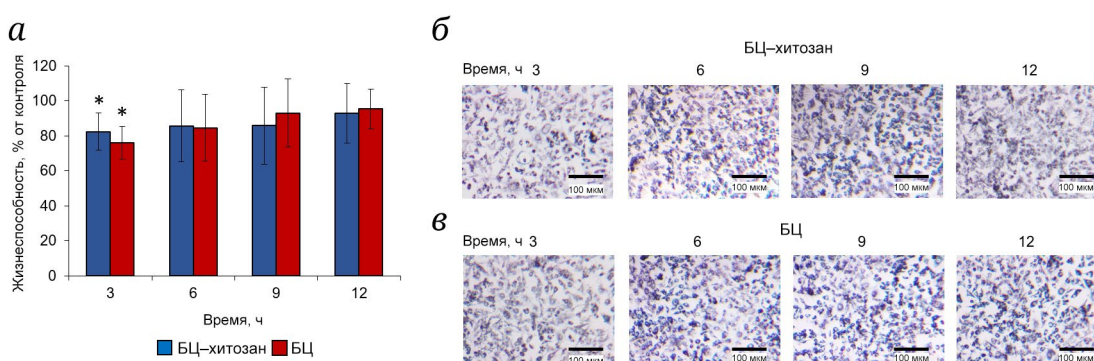


Рис. 7. Продолжительность цитотоксического действия L-АСП, иммобилизованной на плёнке БЦ и БЦ-хитозан, на условно-нормальные фибробласты линии WI-38. *a* – Жизнеспособность клеток, измеренная методом МТТ-теста, после инкубации с плёнками и последовательных переносов каждые 3 ч. Микрофотографии в режиме светлого поля клеток, синтезирующих кристаллы формазана, после инкубации с плёнками БЦ-хитозан (*а*) или БЦ (*б*) с иммобилизованной L-АСП. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам, инкубированным с пустыми плёнками БЦ или БЦ-хитозан

Для оценки продолжительности действия L-АСП, иммобилизованной на БЦ или БЦ–хитозан, на клетки меланомы А875 или условно-нормальные фибробласты было проведено исследование, в котором плёнки последовательно переносили каждые 3 ч в новые лунки с клетками (рис. 6 и 7). Фермент на модифицированных хитозаном БЦ сохранял цитотоксическую активность даже после четырёх последовательных инкубаций с клетками (рис. 6). Через 6 ч жизнеспособность опухолевых клеток составляла ~50%, а через 12 ч – 80%. В то же время БЦ не сохраняли цитотоксическую активность после первой инкубации и уже через 3 ч жизнеспособность клеток была на уровне контрольных, не обработанных L-АСП клеток. Таким образом, иммобилизация L-АСП на композит БЦ–хитозан способствует её пролонгированному действию на опухолевые клетки меланомы.

Ожидаемо, фермент EwA, иммобилизованный на плёнки, практически не вызывал цитотоксического эффекта на условно-нормальные фибробласты WI-38 (рис. 7). Наблюдали небольшое понижение жизнеспособности клеток только при первой трёхчасовой инкубации до уровня 66,5–85,4% для EwA, иммобилизованной на БЦ, и до уровня 71,7–93,0% – для фермента, иммобилизованного на БЦ–хитозан.

Таким образом, иммобилизация L-АСП на композит БЦ–хитозан способствует её пролонгированному действию на опухолевые клетки меланомы. Пролонгированного действия на условно-нормальные клетки не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на уникальные свойства нативной БЦ, её использование в качестве носителя терапевтических агентов ограничено их профилями абсорбции и высвобождения лекарственного агента. Зачастую высокая скорость этих процессов ограничивается несколькими первыми часами [37, 70, 86, 87]. В некоторых ситуациях это может привести к первоначальному локальному высокому накоплению препарата и вызывать токсические эффекты в клетках нормальных тканей [88].

На данный момент разработано несколько композитов (полупроницающих гидрогелей) на основе БЦ и хитозана с улучшенными механическими и антибактериальными свойствами [43, 51, 55, 89]. Гидрогели обычно готовят путём смешивания БЦ с раствором хитозана с последующей сшивкой глутаровым альдегидом. В такой системе один полимер шит, а другой полимер остаётся линейным. Однако линейный полимер остаётся физически связанным со шшитым полимером посредством сил Ван-дер-Ваальса, электро-

статических взаимодействий, водородных связей, гидрофобных взаимодействий или комбинации этих взаимодействий [89]. Известно, что сшивка сети гидрогелей может препятствовать преждевременной протеолитической деградации иммобилизованных высоколабильных макромолекулярных препаратов (например, антител), что может способствовать увеличению времени полужизни препаратов в крови и улучшить стабильность гидрогелей за счёт увеличения плотности поперечных связей [90].

В нашем исследовании для БЦ, выращенной в течение 96 ч, наблюдали более медленное высвобождение L-АСП, по сравнению с 72-часовыми плёнками, и сравнимое с тонкими 48-часовыми плёнками (рис. 2, а). Такой результат соотносится с исследованием Pavaloiu et al. [43], в котором композиты поливиниловый спирт–хитозан–БЦ применяли для достижения контролируемого высвобождения ибупрофена. Диффузия ибупрофена снижалась по мере увеличения концентрации БЦ в составе плёнок. В нашем случае это указывает на то, что толщина БЦ (которая зависит от времени выращивания продуцента) значительно влияла на высвобождение L-АСП через 24 ч: активность плёнок, выращенных в течение 72 ч, была в 2 раза выше, чем у таковых, выращенных за 48 или 96 ч.

При анализе высвобождения L-АСП из плёнок БЦ и БЦ–хитозан было показано, что концентрация хитозана не влияла на активность L-АСП (рис. 2, б; рис. 3). Это можно объяснить тем, что частицы хитозана могли агрегировать между собой, и хитозан не успевал полностью пропитать плёнки БЦ. В подтверждение этому в работе Li et al. [72] было показано, что адсорбционная способность композита БЦ–гиалуроновая кислота не зависела от концентрации последней в первые часы инкубации.

Ранее композиты БЦ–хитозан в основном разрабатывались как перевязочный материал для ран [91, 92] и БЦ с хитозаном инкубировали 6–12 ч. Нами было предложено подобрать оптимальное время инкубации хитозана и БЦ для доставки L-АСП в опухолевые клетки меланомы. Длительное время инкубации (6 ч) с хитозаном (рис. 2, в) приводило к уменьшению активности L-АСП практически до нуля, в то время как инкубация БЦ с хитозаном в течение 1–2 ч не влияла на активность L-АСП через 24 ч. Это указывает на то, что для иммобилизации нашего фермента время инкубации БЦ с хитозаном должно быть значительно снижено.

Кроме того, на активность фермента влияло время инкубации БЦ–хитозан с глутаровым альдегидом (рис. 2, г). Ранее в исследовании Monteiro et al. [85] были подобраны условия реак-

ции глутарового альдегида и хитозана. Реакция проводилась в нейтральной среде, а время инкубации составляло 1 ч при комнатной температуре. Таким образом, данные условия подходят для получения композита БЦ–хитозан для иммобилизации L-АСП.

При оценке высвобождения L-АСП для композита БЦ–хитозан (концентрация хитозана 0,05%) был показан более длительный кумулятивный релиз в течение 24 ч, чем для нативных плёнок БЦ. Эти данные соотносятся с результатами исследования по применению БЦ-хитозановых композитных гидрогелевых шариков для иммобилизации липазы из *Candida rugosa* [51]. В результате иммобилизации время полужизни липазы увеличилось более чем в 3 раза. Хитозан при сшивании с глутаровым альдегидом образовывал дополнительную трёхмерную структуру на волокнах БЦ, в результате чего происходило утолщение волокон (это подтверждается изображениями СЭМ на рис. 5) и более эффективное удержание L-АСП в композите.

Данные характера высвобождения L-АСП из плёнок БЦ или композита, а также сопоставление кинетической модели Хигучи и коэффициента диффузии со значением $n < 0,45$ указывает на контролируемое диффузией высвобождение фермента [93]. Модель Хигучи предполагает, что высвобождение лекарственного средства основано на диффузии Фика, где основным результатом является зависимость транспорта лекарства от квадратного корня времени [94, 95]. В то время как для описания высвобождения L-АСП из БЦ без модификации наиболее соответствовала модель Корсмейера–Пеппаса и была характерна аномальная диффузия ($n > 0,45$) с характеристиками субдиффузии [96] и более быстрое высвобождение L-АСП в первые часы.

Диффузия веществ тесно связана со структурой материала, через который происходит диффузия [95], поэтому модификация БЦ–хитозаном позволила получить пролонгированное высвобождение L-АСП. На степень адсорбции белка на БЦ влияют такие характеристики, как её пористость и плотность волокон, зависящие от времени культивирования и состава среды [97]. В нашем исследовании пористость композита БЦ–хитозан была в 1,6 раза выше, чем немодифицированной БЦ, и включение в матрицу БЦ–хитозана с последующей сшивкой глутаровым альдегидом способствовало уменьшению пор. Это создало стерические препятствия для быстрого высвобождения фермента из матрицы и пролонгировало действие на клетки *in vitro*. Наиболее важной особенностью плёнок является размер сетки, образуемый фибриллами БЦ. Размер влияет на стерические взаимодействия между

БЦ и терапевтическим средством и в конечном итоге определяет, как средство высвобождается из матрицы [90]. Эффект стерических затруднений вызывает блокировку средства внутри сети до тех пор, пока не произойдёт разрушение сети или увеличение размера сетки за счёт набухания или деформации [98].

Данные, полученные на клетках (рис. 6), соответствовали общей тенденции высвобождения L-АСП из БЦ и композитов БЦ–хитозан в растворе. Иммобилизованный фермент обладал цитотоксическим действием на опухолевые клетки линии увеальной меланомы A875, а использование композита БЦ–хитозан увеличило продолжительность его действия до четырёх последовательных инкубаций. Это указывает на то, что даже при нескольких переносах небольшого количества высвободившейся L-АСП было достаточно для цитотоксического эффекта, в то время как высвобождение L-АСП из БЦ было практически 100% после первой инкубации. На условно-нормальных клетках WI-38 пролонгации цитотоксического эффекта не обнаружено. В недавних исследованиях цитотоксическая активность свободной формы L-АСП была показана на нескольких культурах клеток солидных опухолей [99], а ПЭГ–L-АСП обладала хорошей противоопухолевой активностью в отношении злокачественной меланомы в клинических испытаниях фазы I [100]. Ранее были разработаны конъюгаты EwA с ПЭГ [22], альбумином [101], гликоль–хитозаном [102] и ПЭГ–хитозаном [103]. Конъюгаты EwA и ПЭГ–хитозан имели в 3–5 раз большую специфическую активность в отношении клеток K562 и Jurkat, а состав и структура конъюгата имели критическое влияние на цитотоксический эффект [103]. На данный момент ведётся рандомизированное клиническое исследование препарата инкапсулированного в эритроциты для терапии тройного негативного рака молочной железы [104]. Кроме того, известно, что переключение на альтернативные типы L-АСП рекомендуется для пациентов с реакцией гиперчувствительности, иммунной или протеолитической инактивацией фермента [105]. Меланомы представляют собой поверхностный тип рака, который эффективно лечится хирургическим путём [106]. Однако существуют клинически и генетически различные подгруппы меланомы, для которых данная стратегия неэффективна [106, 107], что определяет актуальность разработки подходов к терапии отдельных видов меланом. Именно поэтому клетки линии меланомы были выбраны для данного исследования.

Некоторые традиционные методы лечения меланомы оказались неэффективны, что привело к исследованию комбинированных подходов

для терапии данного заболевания [106]. Терапия, основанная на истощении аминокислот с помощью ферментов, расщепляющих аминокислоты, может иметь потенциальное применение для лечения некоторых типов опухолей [108], в том числе меланом. Подобный эффект на меланомы продемонстрирован для таких ферментов, как аргининдеминаза и аргиназа [109].

Разработано несколько систем для доставки лекарств к клеткам с минимальными побочными эффектами. Одним из видов носителей для таких систем доставки являются гидрогели с использованием натуральных и синтетических полимеров [110]. Трансдермальная доставка имеет ряд преимуществ перед инъекцией белков в системный кровоток – это неинвазивность, предотвращение метаболизма первого прохождения, пролонгированное и контролируемое действие, уменьшение частоты введения лекарства, улучшенная биодоступность, простота самостоятельного применения [111, 112]. Доставка EwA с помощью БЦ позволит увеличить концентрацию EwA в месте опухоли, а также может быть альтернативой для пациентов, которые не могут быть оперированы или имеют противопоказания к системной химиотерапии. Однако для данного подхода есть ряд ограничений. Роговой слой действует как барьер для больших молекул, в том числе белков [113]. Другим ограничением является то, что L-АСП, иммобилизованная на плёнках БЦ, применима только к поверхностным опухолям. Также опухолевые клетки могут обходить чувствительность к L-АСП из-за высокой экспрессии аспарагинсинтетазы, в результате чего может потребоваться терапия более высокими дозами L-АСП [114]. Определение уровня экспрессии аспарагинсинтетазы [109] в клетках перед терапией позволит определить потенциальную чувствительность клеток к ферменту.

Таким образом, локализованное непрерывное высвобождение L-АСП EwA может быть перспективным для терапии солидных опухолей, обеспечивая пролонгированное локальное воздействие на опухолевые клетки меланомы при снижении частоты применения препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общеизвестным механизмом цитотоксической активности L-АСП является гидролиз аспарагина. Однако альтернативные механизмы, такие как подавление теломеразы [115–117], высвобождение 2-HS гликопротеина фетуина [118] и разрушение рецепторов конконовилина [119], также могут быть вовлечены в развитие цитотоксиче-

ских эффектов. Широкий спектр известных L-АСП различных продуцентов с индивидуальными свойствами, прежде всего термофильных организмов [120–122], а также подходы к получению рекомбинантных аналогов делают возможным создание биоплёнок с заданной характеристикой биологического действия [6]. Новые композиты БЦ–хитозан были успешно получены путём смешивания суспензии хитозана с мембранами БЦ и последующей сшивкой с помощью глutarового альдегида. По сравнению с немодифицированными мембранами, композиты БЦ–хитозан показали более высокую пористость, водоудерживающую способность и меньший средний размер пор. L-АСП *Erw. carotovora*, иммобилизованная на композиты БЦ–хитозан, обладала в 3 раза более длительным высвобождением и сохраняла цитотоксические свойства в отношении клеток меланомы, но не условно-нормальных фибробластов (даже после трёх последовательных переносов), в то время как цитотоксичность при её иммобилизации на БЦ сохранялась лишь при первой инкубации с клетками.

Вклад авторов. А.Н. Шишпарёнок – концепция работы, планирование и проведение экспериментов по модификации плёнок и анализу цитотоксичности, написание чернового варианта статьи; Е.Р. Петряев, С.А. Королёва – эксперименты по изучению высвобождения фермента; Е.Н. Комедчикова, О.А. Колесникова – получение СЭМ-изображений; Н.В. Добрякова, И.Д. Злотников, Е.В. Кудряшова – ИК-спектроскопия; Д.Д. Жданов – концепция работы, общее руководство работой, привлечение финансирования, редактирование финальной версии.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Шипуновой Виктории Олеговне (Московский физико-технический институт) за проведение работ по получению СЭМ-изображений и Козлову Андрею Фёдоровичу (НИИ Биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича) за лиофильное высушивание плёнок. Работа проводилась с использованием оборудования Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова (ИК-Фурье-микроскоп MICRAN-3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pokrovskaya, M. V., Pokrovsky, V. S., Aleksandrova, S. S., Sokolov, N. N., and Zhdanov, D. D. (2022) Molecular analysis of L-asparaginases for clarification of the mechanism of action and optimization of pharmacological functions, *Pharmaceutics*, **14**, 599, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030599>.
2. Castro, D., Marques, A. S. C., Almeida, M. R., de Paiva, G. B., Bento, H. B. S., Pedrolli, D. B., Freire, M. G., Tavares, A. P. M., and Santos-Ebinuma, V. C. (2021) L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **105**, 4515-4534, <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11359-y>.
3. Chand, S., Mahajan, R. V., Prasad, J. P., Sahoo, D. K., Mihooliya, K. N., Dhar, M. S., and Sharma, G. (2020) A comprehensive review on microbial L-asparaginase: bioprocessing, characterization, and industrial applications, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **67**, 619-647, <https://doi.org/10.1002/bab.1888>.
4. Suresh, S. A., Ethiraj, S., and Rajnish, K. N. (2022) A systematic review of recent trends in research on therapeutically significant l-asparaginase and acute lymphoblastic leukemia, *Mol. Biol. Rep.*, **49**, 11281-11287, <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07688-4>.
5. Jia, R., Wan, X., Geng, X., Xue, D., Xie, Z., and Chen, C. (2021) Microbial L-asparaginase for application in acrylamide mitigation from food: current research status and future perspectives, *Microorganisms*, **9**, 1659, <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081659>.
6. Shishparenok, A. N., Gladilina, Y. A., and Zhdanov, D. D. (2023) Engineering and expression strategies for optimization of L-asparaginase development and production, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 15220, <https://doi.org/10.3390/ijms242015220>.
7. Chan, W. K., Horvath, T. D., Tan, L., Link, T., Harutyunyan, K. G., Pontikos, M. A., Anishkin, A., Du, D., Martin, L. A., Yin, E., Rempe, S. B., Sukharev, S., Konopleva, M., Weinstein, J. N., and Lorenzi, P. L. (2019) Glutaminase activity of L-Asparaginase contributes to durable preclinical activity against acute lymphoblastic leukemia, *Mol. Cancer Ther.*, **18**, 1587-1592, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-1329>.
8. Tsegaye, K., Tsehai, B. A., and Getie, B. (2024) Desirable L-asparaginases for treating cancer and current research trends, *Front. Microbiol.*, **15**, 1269282, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1269282>.
9. Liu, W., Wang, H., Wang, W., Zhu, M., Liu, C., Wang, J., and Lu, Y. (2016) Use of PEG-asparaginase in newly diagnosed adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia compared with *E. coli*-asparaginase: a retrospective single-center study, *Sci. Rep.*, **6**, 39463, <https://doi.org/10.1038/srep39463>.
10. Mazloun-Ravasan, S., Madadi, E., Mohammadi, A., Mansoori, B., Amini, M., Mokhtarzadeh, A., Baradaran, B., and Darvishi, F. (2021) *Yarrowia lipolytica* L-asparaginase inhibits the growth and migration of lung (A549) and breast (MCF7) cancer cells, *Int. J. Biol. Macromol.*, **170**, 406-414, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.141>.
11. Van Trimont, M., Peeters, E., De Visser, Y., Schalk, A. M., Mondelaers, V., De Moerloose, B., Lavie, A., Lammens, T., Goossens, S., and Van Vlierberghe, P. (2022) Novel insights on the use of L-asparaginase as an efficient and safe anti-cancer therapy, *Cancers (Basel)*, **14**, 902, <https://doi.org/10.3390/cancers14040902>.
12. Talluri, V. P., Mutaliyeva, B., Sharipova, A., Ulaganathan, V., Lanka, S. S., Aidarova, S., Suigenbayeva, A., and Tleuova, A. (2023) L-Asparaginase delivery systems targeted to minimize its side-effects, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **316**, 102915, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102915>.
13. Bahreini, E., Aghaiypour, K., Abbasalipourkabir, R., Mokarram, A. R., Goodarzi, M. T., and Saidijam, M. (2014) Preparation and nanoencapsulation of l-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and *in vitro* release study, *Nanoscale Res. Lett.*, **9**, 340, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-340>.
14. Aghaeepoor, M., Akbarzadeh, A., Mirzaie, S., Hadian, A., Jamshidi Aval, S., and Dehnavi, E. (2018) Selective reduction in glutaminase activity of l-Asparaginase by asparagine 248 to serine mutation: a combined computational and experimental effort in blood cancer treatment, *Int. J. Biol. Macromol.*, **120**, 2448-2457, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.015>.
15. Chan, W. K., Lorenzi, P. L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D. M., Sukharev, S., Rempe, S. B., and Weinstein, J. N. (2014) The glutaminase activity of l-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells, *Blood*, **123**, 3596-3606, <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-535112>.
16. Rizzari, C., Möricke, A., Valsecchi, M. G., Conter, V., Zimmermann, M., Silvestri, D., Attarbaschi, A., Niggli, F., Barbaric, D., Stary, J., Elitzur, S., Cario, G., Vinti, L., Boos, J., Zucchetti, M., Lanvers-Kaminsky, C., von Stackelberg, A., Biondi, A., and Schrappe, M. (2023) Incidence and characteristics of hypersensitivity reactions to PEG-asparaginase observed in 6136 children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the AIEOP-BFM ALL 2009 study protocol, *HemaSphere*, **7**, e893, <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000893>.
17. Figueiredo, L., Cole, P. D., and Drachtman, R. A. (2016) Asparaginase *Erwinia chrysanthemi* as a component of a multi-agent chemotherapeutic regimen for the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia who have developed hypersensitivity to *E. coli*-derived asparaginase, *Expert Rev. Hematol.*, **9**, 227-234, <https://doi.org/10.1586/17474086.2016.1142370>.

18. Ko, R. H., Jones, T. L., Radvinsky, D., Robison, N., Gaynon, P. S., Panosyan, E. H., Avramis, I. A., Avramis, V. I., Rubin, J., Ettinger, L. J., Seibel, N. L., and Dhall, G. (2015) Allergic reactions and anti-asparaginase antibodies in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group report, *Cancer*, **121**, 4205-4211, <https://doi.org/10.1002/cncr.29641>.
19. Papageorgiou, A. C., Posypanova, G. A., Andersson, C. S., Sokolov, N. N., and Krasotkina, J. (2008) Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase, *FEBS J.*, **275**, 4306-4316, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06574.x>.
20. Faret, M., de Morais, S. B., Zanchin, N. I. T., and de Souza, T. (2019) L-Asparaginase from *Erwinia carotovora*: insights about its stability and activity, *Mol. Biol. Rep.*, **46**, 1313-1316, <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4459-2>.
21. Singh, M., Hassan, N., Verma, D., Thakur, P., Panda, B.P., Panda, A.K., Sharma, R.K., Mirza, A., Mansoor, S., Alrokayan, S.H., Khan, H.A., Ahmad, P., and Iqbal Z. (2020) Design of expert guided investigation of native L-asparaginase encapsulated long-acting cross-linker-free poly (lactic-co-glycolic) acid nanoformulation in an Ehrlich ascites tumor model, *Saudi Pharm. J.*, **28**, 719-728, <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.04.014>.
22. Melik-Nubarov, N. S., Grozdova, I. D., Lomakina, G. Y., Pokrovskaya, M. V., Pokrovski, V. S., Aleksandrova, S. S., Abakumova, O. Y., Podobed, O. V., Grishin, D. V., and Sokolov, N. N. (2017) PEGylated recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*: production, properties, and potential applications, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **53**, 165-172, <https://doi.org/10.1134/S0003683817020119>.
23. Fonseca, M. H. G., Fiúza, T. da S., de Morais, S. B., Souza, T., and de Trevizani, R. (2021) Circumventing the side effects of L-asparaginase, *Biomed. Pharmacother.*, **139**, 111616, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111616>.
24. Meneguetti, G. P., Santos, J. H. P. M., Obreque, K. M. T., Barbosa, C. M. V., Monteiro, G., Farsky, S. H. P., Marim de Oliveira, A., Angeli, C. B., Palmisano, G., Ventura, S. P. M., Pessoa-Junior, A., and de Oliveira Rangel-Yagui, C. (2019) Novel site-specific PEGylated L-asparaginase, *PLoS One*, **14**, e0211951, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211951>.
25. Feenstra, L. R., Gehring, R., van Geijlswijk, I. M., König, T., Prinsen, H. C. M. T., Vandemeulebroecke, K., Lammens, T., Krupa, A., and Teske, E. (2022) Evaluation of PEG-L-asparaginase in asparagine suppression and anti-drug antibody development in healthy Beagle dogs: a multi-phase preclinical study, *Vet. J.*, **286**, 105854, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105854>.
26. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., and Wahab, R. A. (2015) An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **29**, 205-220, <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.
27. Zhang, D.-H., Yuwen, L.-X., and Peng, L.-J. (2013) Parameters affecting the performance of immobilized enzyme, *J. Chem.*, **2013**, 1-7, <https://doi.org/10.1155/2013/946248>.
28. Ulu, A., and Ates, B. (2017) Immobilization of L-asparaginase on carrier materials: a comprehensive review, *Bioconjug. Chem.*, **28**, 1598-1610, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00217>.
29. Dobryakova, N. V., Zhdanov, D. D., Sokolov, N. N., Aleksandrova, S. S., Pokrovskaya, M. V., and Kudryashova, E. V. (2023) *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase conjugates with polyamines of improved biocatalytic properties as a new promising drug for the treatment of leukemia, *Appl. Sci.*, **13**, 3373, <https://doi.org/10.3390/app13053373>.
30. Qian, G., Zhou, J., Ma, J., He, B., and Wang, D. (1997) Chemical modification of L-asparaginase with N, O-carboxymethyl chitosan and its effects on plasma half-life and other properties, *Sci. China Ser. B Chem.*, **40**, 337-341, <https://doi.org/10.1007/BF02877748>.
31. Dobryakova, N. V., Zhdanov, D. D., Sokolov, N. N., Aleksandrova, S. S., Pokrovskaya, M. V., and Kudryashova, E. V. (2022) Improvement of biocatalytic properties and cytotoxic activity of L-asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* by conjugation with chitosan-based cationic polyelectrolytes, *Pharmaceuticals*, **15**, 406, <https://doi.org/10.3390/ph15040406>.
32. Imam, H. T., Marr, P. C., and Marr, A. C. (2021) Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment, *Green Chem.*, **23**, 4980-5005, <https://doi.org/10.1039/D1GC01852C>.
33. Zalewska-Szewczyk, B., Gach, A., Wyka, K., Bodalski, J., and Młynarski, W. (2009) The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different l-asparaginase preparations, *Clin. Exp. Med.*, **9**, 113-116, <https://doi.org/10.1007/s10238-008-0026-9>.
34. Wang, N., Ji, W., Wang, L., Wu, W., Zhang, W., Wu, Q., Du, W., Bai, H., Peng, B., Ma, B., and Li, L. (2022) Overview of the structure, side effects, and activity assays of L-asparaginase as a therapy drug of acute lymphoblastic leukemia, *RSC Med. Chem.*, **13**, 117-128, <https://doi.org/10.1039/D1MD00344E>.
35. Liang, S. (2023) Advances in drug delivery applications of modified bacterial cellulose-based materials, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **11**, 1252706, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1252706>.
36. Shah, N., Ul-Islam, M., Khattak, W. A., and Park, J. K. (2013) Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material, *Carbohydr. Polym.*, **98**, 1585-1598, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.018>.

37. Adepu, S., and Khandelwal, M. (2020) *Ex-situ* modification of bacterial cellulose for immediate and sustained drug release with insights into release mechanism, *Carbohydr. Polym.*, **249**, 116816, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116816>.
38. Gregory, D. A., Tripathi, L., Fricker, A. T. R., Asare, E., Orlando, I., Raghavendran, V., and Roy, I. (2021) Bacterial cellulose: a smart biomaterial with diverse applications, *Mater. Sci. Eng. R Reports*, **145**, 100623, <https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100623>.
39. Stumpf, T. R., Yang, X., Zhang, J., and Cao, X. (2018) *In situ* and *ex situ* modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C*, **82**, 372-383, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.121>.
40. Cacicedo, M. L., Islan, G. A., León, I. E., Álvarez, V. A., Chourpa, I., Allard-Vannier, E., García-Aranda, N., Díaz-Riascos, Z. V., Fernández, Y., Schwartz, S., Jr, Abasolo, I., and Castro, G. R. (2018) Bacterial cellulose hydrogel loaded with lipid nanoparticles for localized cancer treatment, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **170**, 596-608, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.056>.
41. Autier, L., Clavreul, A., Cacicedo, M. L., Franconi, F., Sindji, L., Rousseau, A., Perrot, R., Montero-Menei, C. N., Castro, G. R., and Menei, P. (2019) A new glioblastoma cell trap for implantation after surgical resection, *Acta Biomater.*, **84**, 268-279, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.027>.
42. Pandey, A., Singh, M. K., and Singh, A. (2024) Bacterial cellulose: a smart biomaterial for biomedical applications, *J. Mater. Res.*, **39**, 2-18, <https://doi.org/10.1557/s43578-023-01116-4>.
43. Pavaloiu, R.-D., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Jinga, S. I., and Dobre, T. (2014) Composite films of poly(vinyl alcohol)-chitosan-bacterial cellulose for drug controlled release, *Int. J. Biol. Macromol.*, **68**, 117-124, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.040>.
44. Mohamed, M. H., Udoetok, I. A., Wilson, L. D., and Headley, J. V. (2015) Fractionation of carboxylate anions from aqueous solution using chitosan cross-linked sorbent materials, *RSC Adv.*, **5**, 82065-82077, <https://doi.org/10.1039/C5RA13981C>.
45. Udoetok, I. A., Dimmick, R. M., Wilson, L. D., and Headley, J. V. (2016) Adsorption properties of cross-linked cellulose-epichlorohydrin polymers in aqueous solution, *Carbohydr. Polym.*, **136**, 329-340, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.032>.
46. Mohamed, M. H., and Wilson, L. D. (2016) Sequestration of agrochemicals from aqueous media using cross-linked chitosan-based sorbents, *Adsorption*, **22**, 1025-1034, <https://doi.org/10.1007/s10450-016-9796-7>.
47. Wilson, L. D., and Xue, C. (2013) Macromolecular sorbent materials for urea capture, *J. Appl. Polym. Sci.*, **128**, 667-675, <https://doi.org/10.1002/app.38247>.
48. Poon, L., Wilson, L. D., and Headley, J. V. (2014) Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties, *Carbohydr. Polym.*, **109**, 92-101, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.086>.
49. Udoetok, I. A., Wilson, L. D., and Headley, J. V. (2016) Self-assembled and cross-linked animal and plant-based polysaccharides: chitosan-cellulose composites and their anion uptake properties, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8**, 33197-33209, <https://doi.org/10.1021/acsami.6b11504>.
50. Udoetok, I. A., Wilson, L. D., and Headley, J. V. (2018) "Pillaring Effects" in cross-linked cellulose biopolymers: a study of structure and properties, *Int. J. Polym. Sci.*, **2018**, 1-13, <https://doi.org/10.1155/2018/6358254>.
51. Kim, H. J., Jin, J. N., Kan, E., Kim, K. J., and Lee, S. H. (2017) Bacterial cellulose-chitosan composite hydrogel beads for enzyme immobilization, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **22**, 89-94, <https://doi.org/10.1007/s12257-016-0381-4>.
52. Ribeiro-Viana, R. M., Faria-Tischer, P. C. S., and Tischer, C. A. (2016) Preparation of succinylated cellulose membranes for functionalization purposes, *Carbohydr. Polym.*, **148**, 21-28, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.033>.
53. Wacker, M., Riedel, J., Walles, H., Scherner, M., Awad, G., Varghese, S., Schürlein, S., Garke, B., Veluswamy, P., Wippermann, J., and Hülsmann, J. (2021) Comparative evaluation on impacts of fibronectin, heparin-chitosan, and albumin coating of bacterial nanocellulose small-diameter vascular grafts on endothelialization *in vitro*, *Nanomaterials*, **11**, 1952, <https://doi.org/10.3390/nano11081952>.
54. Jantararat, C., Attakitmongkol, K., Nicholsapa, S., Sirathanarun, P., and Srivaro, S. (2020) Molecularly imprinted bacterial cellulose for sustained-release delivery of quercetin, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **31**, 1961-1976, <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1787602>.
55. Arikibe, J. E., Lata, R., Kuboyama, K., Ougizawa, T., and Rohindra, D. (2019) pH-responsive studies of bacterial cellulose/chitosan hydrogels crosslinked with genipin: swelling and drug release behaviour, *ChemistrySelect*, **4**, 9915-9926, <https://doi.org/10.1002/slct.201902290>.
56. Mohammadi, S., Jabbari, F., and Babaeipour, V. (2023) Bacterial cellulose-based composites as vehicles for dermal and transdermal drug delivery: a review, *Int. J. Biol. Macromol.*, **242**, 124955, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124955>.
57. Pasaribu, K. M., Ilyas, S., Tamrin, T., Radecka, I., Swingler, S., Gupta, A., Stamboulis, A. G., and Gea, S. (2023) Bioactive bacterial cellulose wound dressings for burns with collagen *in-situ* and chitosan *ex-situ* impregnation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **230**, 123118, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.123118>.

58. Abu Hasan, N. S., Mohamad, S., Sy Mohamad, S. F., Arzmi, M. H., and Supian, N. N. I. (2023) *Ex-situ* development and characterization of composite film based on bacterial cellulose derived from oil palm frond juice and chitosan as Food packaging, *Pertanika J. Sci. Technol.*, **31**, 1173-1187, <https://doi.org/10.47836/pjst.31.3.03>.
59. Kitaoka, K., Yamamoto, H., Tani, T., Hoshijima, K., and Nakauchi, M. (1997) Mechanical strength and bone bonding of a titanium fiber mesh block for intervertebral fusion, *J. Orthop. Sci.*, **2**, 106-113, <https://doi.org/10.1007/BF02489521>.
60. Wu, S., Wu, S., and Su, F. (2017) Novel process for immobilizing an enzyme on a bacterial cellulose membrane through repeated absorption, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **92**, 109-114, <https://doi.org/10.1002/jctb.4994>.
61. Isobe, N., Lee, D.-S., Kwon, Y.-J., Kimura, S., Kuga, S., Wada, M., and Kim, U.-J. (2011) Immobilization of protein on cellulose hydrogel, *Cellulose*, **18**, 1251-1256, <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9561-8>.
62. Krasotkina, J., Borisova, A. A., Gervaziev, Y. V., and Sokolov, N. N. (2004) One-step purification and kinetic properties of the recombinant l-asparaginase from *Erwinia carotovora*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **39**, 215-221, <https://doi.org/10.1042/BA20030138>.
63. Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., and Jones, K. M. (1989) *Data for Biochemical Research*, 3rd ed. Oxford, Clarendon Press.
64. Meister, A. (1955) Glutaminase, asparaginase, and α -keto acid- ω -amidase, *Methods Enzym.*, **2**, 380-385.
65. Cooney, D. A., Capizzi, R. L., and Handschumacher, R. E. (1970) Evaluation of L-asparagine metabolism in animals and man, *Cancer Res.*, **30**, 925-935.
66. Dave, P. N., Macwan, P. M., and Kamaliya, B. (2023) Biodegradable Gg-cl-poly(NIPAm-co-AA)/-o-MWCNT based hydrogel for combined drug delivery system of metformin and sodium diclofenac: *in vitro* studies, *RSC Adv.*, **13**, 22875-22885, <https://doi.org/10.1039/D3RA04728H>.
67. Looi, C. Y., Moharram, B., Paydar, M., Wong, Y. L., Leong, K. H., Mohamad, K., Arya, A., Wong, W. F., and Mustafa, M. R. (2013) Induction of apoptosis in melanoma A375 cells by a chloroform fraction of *Centrathurum anthelminticum* (L.) seeds involves NF-kappaB, p53 and Bcl-2-controlled mitochondrial signaling pathways, *BMC Complement. Altern. Med.*, **13**, 166, <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-166>.
68. Denizot, F., and Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, *J. Immunol. Methods*, **89**, 271-277, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6).
69. Horue, M., Silva, J. M., Berti, I. R., Brandão, L. R., Barud, H. da S., and Castro, G. R. (2023) Bacterial cellulose-based materials as dressings for wound healing, *Pharmaceutics*, **15**, 424, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020424>.
70. Ul-Islam, M., Khan, T., and Park, J. K. (2012) Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by *in situ* and *ex situ* modification, *Carbohydr. Polym.*, **88**, 596-603, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.006>.
71. Li, G., Nandgaonkar, A. G., Habibi, Y., Krause, W. E., Wei, Q., and Lucia, L. A. (2017) An environmentally benign approach to achieving vectorial alignment and high microporosity in bacterial cellulose/chitosan scaffolds, *RSC Adv.*, **7**, 13678-13688, <https://doi.org/10.1039/C6RA26049G>.
72. Li, Y., Jiang, H., Zheng, W., Gong, N., Chen, L., Jiang, X., and Yang, G. (2015) Bacterial cellulose-hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair, *J. Mater. Chem. B*, **3**, 3498-3507, <https://doi.org/10.1039/C4TB01819B>.
73. Ul-Islam, M., Shah, N., Ha, J. H., and Park, J. K. (2011) Effect of chitosan penetration on physico-chemical and mechanical properties of bacterial cellulose, *Korean J. Chem. Eng.*, **28**, 1736-1743, <https://doi.org/10.1007/s11814-011-0042-4>.
74. Ojagh, S. M. A., Vahabzadeh, F., and Karimi, A. (2021) Synthesis and characterization of bacterial cellulose-based composites for drug delivery, *Carbohydr. Polym.*, **273**, 118587, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118587>.
75. Bayer, I. S. (2023) Controlled drug release from nanoengineered polysaccharides, *Pharmaceutics*, **15**, 1364, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051364>.
76. Zhu, W., Long, J., and Shi, M. (2023) Release kinetics model fitting of drugs with different structures from viscose fabric, *Materials (Basel)*, **16**, 3282, <https://doi.org/10.3390/ma16083282>.
77. Fu, Y., and Kao, W. J. (2010) Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **7**, 429-444, <https://doi.org/10.1517/17425241003602259>.
78. Hu, Y., Catchmark, J. M., Zhu, Y., Abidi, N., Zhou, X., Wang, J., and Liang, N. (2014) Engineering of porous bacterial cellulose toward human fibroblasts ingrowth for tissue engineering, *J. Mater. Res.*, **29**, 2682-2693, <https://doi.org/10.1557/jmr.2014.315>.
79. R. Rebelo, A., Archer, A.J., Chen, X., Liu, C., Yang, G., and Liu, Y. (2018) Dehydration of bacterial cellulose and the water content effects on its viscoelastic and electrochemical properties, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **19**, 203-211, <https://doi.org/10.1080/14686996.2018.1430981>.
80. Numata, Y., Kono, H., Mori, A., Kishimoto, R., and Tajima, K. (2019) Structural and rheological characterization of bacterial cellulose gels obtained from *Gluconacetobacter* genus, *Food Hydrocoll.*, **92**, 233-239, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.060>.

81. Munim, S. A., Saddique, M. T., Raza, Z. A., and Majeed, M. I. (2020) Fabrication of cellulose-mediated chitosan adsorbent beads and their surface chemical characterization, *Polym. Bull.*, **77**, 183-196, <https://doi.org/10.1007/s00289-019-02711-4>.
82. Urbina, L., Guaresti, O., Reques, J., Gabilondo, N., Eceiza, A., Corcuera, M. A., and Retegi, A. (2018) Design of reusable novel membranes based on bacterial cellulose and chitosan for the filtration of copper in wastewaters, *Carbohydr. Polym.*, **193**, 362-372, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.007>.
83. Kalyani, P., and Khandelwal, M. (2021) Modulation of morphology, water uptake/retention, and rheological properties by *in situ* modification of bacterial cellulose with the addition of biopolymers, *Cellulose*, **28**, 11025-11036, <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04256-0>.
84. Maity, M., Pramanik, U., Hathwar, V. R., Brandao, P., Mukherjee, S., Maity, S., Maity, R., Maity, T., and Chandra Samanta, B. (2022) Biophysical insights into the binding capability of Cu(II) schiff base complex with BSA protein and cytotoxicity studies against SiHa, *Heliyon*, **8**, e11345, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11345>.
85. Monteiro, O. A., and Airoidi, C. (1999) Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system, *Int. J. Biol. Macromol.*, **26**, 119-128, [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00068-9).
86. Vasconcellos, V., and Farinas, C. (2018) The effect of the drying process on the properties of bacterial cellulose films from *Gluconacetobacter hansenii*, *Chem. Eng. Trans.*, **64**, 145-150.
87. Ciecholewska-Juśko, D., Żywicka, A., Junka, A., Drozd, R., Sobolewski, P., Migdał, P., Kowalska, U., Toporkiewicz, M., and Fijałkowski, K. (2021) Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings, *Carbohydr. Polym.*, **253**, 117247, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117247>.
88. Ciecholewska-Juśko, D., Junka, A., and Fijałkowski, K. (2022) The cross-linked bacterial cellulose impregnated with octenidine dihydrochloride-based antiseptic as an antibacterial dressing material for highly-exuding, infected wounds, *Microbiol. Res.*, **263**, 127125, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127125>.
89. Wahid, F., Hu, X.-H., Chu, L.-Q., Jia, S.-R., Xie, Y.-Y., and Zhong, C. (2019) Development of bacterial cellulose/chitosan based semi-interpenetrating hydrogels with improved mechanical and antibacterial properties, *Int. J. Biol. Macromol.*, **122**, 380-387, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.105>.
90. Li, J., and Mooney, D. J. (2016) Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat. Rev. Mater.*, **1**, 16071, <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>.
91. Kim, J., Cai, Z., Lee, H. S., Choi, G. S., Lee, D. H., and Jo, C. (2011) Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application, *J. Polym. Res.*, **18**, 739-744, <https://doi.org/10.1007/s10965-010-9470-9>.
92. Lin, W.-C., Lien, C.-C., Yeh, H.-J., Yu, C.-M., and Hsu, S. (2013) Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications, *Carbohydr. Polym.*, **94**, 603-611, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.076>.
93. Shishparenok, A. N., Koroleva, S. A., Dobryakova, N. V., Gladilina, Y. A., Gromovych, T. I., Solopov, A. B., Kudryashova, E. V., and Zhdanov, D. D. (2024) Bacterial cellulose films for L-asparaginase delivery to melanoma cells, *Int. J. Biol. Macromol.*, **276**, 133932, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133932>.
94. Paul, D. R. (2011) Elaborations on the Higuchi model for drug delivery, *Int. J. Pharm.*, **418**, 13-17, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.037>.
95. Siepmann, J., and Peppas, N. A. (2011) Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse, *Int. J. Pharm.*, **418**, 6-12, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.051>.
96. Danyuo, Y., Ani, C. J., Salifu, A. A., Obayemi, J. D., Dozie-Nwachukwu, S., Obanawu, V. O., Akpan, U. M., Odusanya, O. S., Abade-Abugre, M., McBagonluri, F., and Soboyejo, W. O. (2019) Anomalous release kinetics of prodigiosin from poly-N-isopropyl-acrylamid based hydrogels for the treatment of triple negative breast cancer, *Sci. Rep.*, **9**, 3862, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39578-4>.
97. Drozd, R., Szymańska, M., Przygodzka, K., Hoppe, J., Leniec, G., and Kowalska, U. (2021) The simple method of preparation of highly carboxylated bacterial cellulose with Ni- and Mg-ferrite-based versatile magnetic carrier for enzyme immobilization, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 8563, <https://doi.org/10.3390/ijms22168563>.
98. Ciolacu, D. E., Nicu, R., and Ciolacu, F. (2020) Cellulose-based hydrogels as sustained drug-delivery systems, *Materials (Basel)*, **13**, 5270, <https://doi.org/10.3390/ma13225270>.
99. Kislyak, I. A., Pokrovskaya, M. V., Zhanturina, D. Y., and Pokrovsky, V. S. (2023) The use of L-asparaginase for the treatment of solid tumors: data from experimental studies and clinical trials, *Russ. J. Oncol.*, **28**, 79-94, <https://doi.org/10.17816/onco562802>.
100. Taylor, C. W., Dorr, R. T., Fanta, P., Hersh, E. M., and Salmon, S. E. (2001) A phase I and pharmacodynamic evaluation of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with advanced solid tumors, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **47**, 83-88, <https://doi.org/10.1007/s002800000207>.
101. Nerkar, D. P., and Gangadharan, M. (1989) Modification of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* using human serum albumin, *Mol. Biother.*, **1**, 152-4.

102. Sukhoverkov, K. V., and Kudryashova, E. V. (2015) PEG-chitosan and glycol-chitosan for improvement of biopharmaceutical properties of recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, *Biochemistry (Mosc)*, **80**, 113-119, <https://doi.org/10.1134/S0006297915010137>.
103. Sukhoverkov, K. V., Sokolov, N. N., Abakumova, O. Y., Podobed, O. V., and Kudryashova, E. V. (2016) The formation of conjugates with PEG-chitosan improves the biocatalytic efficiency and antitumor activity of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **71**, 122-126, <https://doi.org/10.3103/S0027131416020073>.
104. Rossi, L., Pierigè, F., Aliano, M. P., and Magnani, M. (2020) Ongoing developments and clinical progress in drug-loaded red blood cell technologies, *BioDrugs*, **34**, 265-272, <https://doi.org/10.1007/s40259-020-00415-0>.
105. Burke, M. J., and Zalewska-Szewczyk, B. (2022) Hypersensitivity reactions to asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia: immunology and Clinical consequences, *Futur. Oncol.*, **18**, 1285-1299, <https://doi.org/10.2217/fon-2021-1288>.
106. Villani, A., Potestio, L., Fabbrocini, G., Troncone, G., Malapelle, U., and Scalvenzi, M. (2022) The treatment of advanced melanoma: therapeutic update, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 6388, <https://doi.org/10.3390/ijms23126388>.
107. Klinac, D., Gray, E. S., Millward, M., and Ziman, M. (2013) Advances in personalized targeted treatment of metastatic melanoma and non-invasive tumor monitoring, *Front. Oncol.*, **3**, <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00054>.
108. Pokrovsky, V. S., Chepikova, O. E., Davydov, D. Z., Zamyatnin Jr, A. A., Lukashev, A. N., and Lukasheva, E. V. (2019) Amino acid degrading enzymes and their application in cancer therapy, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 446-464, <https://doi.org/10.2174/0929867324666171006132729>.
109. Pokrovsky, V. S., Abo Qoura, L., Morozova, E., and Bunik, V. I. (2022) Predictive markers for efficiency of the amino-acid deprivation therapies in cancer, *Front. Med.*, **9**, 1035356, <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1035356>.
110. Vishnubhakthula, S., Elupula, R., and Durán-Lara, E. F. (2017) Recent advances in hydrogel-based drug delivery for melanoma cancer therapy: a mini review, *J. Drug Deliv.*, **2017**, 1-9, <https://doi.org/10.1155/2017/7275985>.
111. Rastogi, V., and Yadav, P. (2012) Transdermal drug delivery system: an overview, *Asian J. Pharm.*, **6**, 161, <https://doi.org/10.4103/0973-8398.104828>.
112. Ramadon, D., McCrudden, M. T. C., Courtenay, A. J., and Donnelly, R. F. (2022) Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **12**, 758-791, <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00909-6>.
113. Kalluri, H., and Banga, A. K. (2011) Transdermal delivery of proteins, *AAPS PharmSciTech*, **12**, 431-441, <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9601-6>.
114. Shakambari, G., Sameer Kumar, R., Ashokkumar, B., Ganesh, V., Vasantha, V. S., and Varalakshmi, P. (2018) Cloning and expression of L-asparaginase from *Bacillus tequilensis* PV9W and therapeutic efficacy of Solid Lipid Particle formulations against cancer, *Sci. Rep.*, **8**, 18013, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36161-1>.
115. Zhdanov, D. D., Pokrovsky, V. S., Pokrovskaya, M. V., Alexandrova, S. S., Eldarov, M. A., Grishin, D. V., Basharov, M. M., Gladilina, Y. A., Podobed, O. V., and Sokolov, N. N. (2017) *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase targets tumor growth by a dual mechanism involving telomerase inhibition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **492**, 282-288, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.078>.
116. Zhdanov, D. D., Pokrovsky, V. S., Pokrovskaya, M. V., Alexandrova, S. S., Eldarov, M. A., Grishin, D. V., Basharov, M. M., Gladilina, Y. A., Podobed, O. V., and Sokolov, N. N. (2017) Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase in cancer Jurkat cell line and normal human CD4⁺ T lymphocytes, *Cancer Med.*, **6**, 2697-2712, <https://doi.org/10.1002/cam4.1218>.
117. Plyasova, A. A., Pokrovskaya, M. V., Lisitsyna, O. M., Pokrovsky, V. S., Alexandrova, S. S., Hilal, A., Sokolov, N. N., and Zhdanov, D. D. (2020) Penetration into cancer cells via clathrin-dependent mechanism allows l-asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* to inhibit telomerase, *Pharmaceuticals*, **13**, 1-18, <https://doi.org/10.3390/ph13100286>.
118. Bosmann, H. B., and Kessel, D. (1970) Inhibition of glycoprotein synthesis in L5178Y mouse leukemic cells by L-asparaginase *in vitro*, *Nature*, **226**, 850-851, <https://doi.org/10.1038/226850a0>.
119. Ankel, E. G., Zirneski, J., Ring, B. J., and Holcenberg, J. S. (1984) Effect of asparaginase on cell membranes of sensitive and resistant mouse lymphoma cells, *In Vitro*, **20**, 376-384, <https://doi.org/10.1007/BF02619582>.
120. Dumina, M. V., Zhgun, A. A., Pokrovskaya, M. V., Aleksandrova, S. S., Zhdanov, D. D., Sokolov, N. N., and El'darov, M. A. (2021) Comparison of enzymatic activity of novel recombinant L-asparaginases of extremophiles, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **57**, 594-602, <https://doi.org/10.1134/S0003683821050057>.
121. Dumina, M., Zhgun, A., Pokrovskaya, M., Aleksandrova, S., Zhdanov, D., Sokolov, N., and El'darov, M. (2021) A novel L-asparaginase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus*: heterologous expression and characterization for biotechnology application, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9894, <https://doi.org/10.3390/ijms22189894>.
122. Dumina, M., Zhgun, A., Pokrovskaya, M., Aleksandrova, S., Zhdanov, D., Sokolov, N., and El'darov, M. (2021) Highly active thermophilic L-asparaginase from *Melioribacter roseus* represents a novel large group of type II bacterial L-asparaginases from chlorobi-ignavibacteria-bacteroidetes clade, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13632, <https://doi.org/10.3390/ijms222413632>.

BACTERIAL CELLULOSE AND CHITOSAN COMPOSITE FOR PROLONGED ACTION OF L-ASPARAGINASE ON MELANOMA CELLS

A. N. Shishparenok¹, E. R. Petryaev², S. A. Koroleva³, N. V. Dobryakova¹,
I. D. Zlotnikov⁴, E. N. Komedchikova⁵, O. A. Kolesnikova⁵,
E. V. Kudryashova⁴, and D. D. Zhdanov^{1*}

¹ *Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Russia, Moscow; e-mail: zhdanovdd@mail.ru*

² *Moscow Polytechnic University, 107023 Moscow, Russia*

³ *Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University),
117198 Moscow, Russia*

⁴ *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

⁵ *Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

A significant challenge associated with the therapeutic use of L-ASNase for the treatment of tumors is its rapid clearance from plasma. The effectiveness of L-ASNase is limited by dose-dependent toxicity. Therefore, new approaches are being developed for L-ASNase to improve its therapeutic properties. One of the approaches to enhance the properties of enzymes, including L-ASNase, is immobilization on various types of biocompatible polymers. The immobilization of enzymes on a carrier allows for the improvement of enzyme stability and the alteration of enzymatic activity duration. Bacterial cellulose (BC) is a promising carrier for various drugs due to its biocompatibility, non-toxicity, high porosity, and high drug loading capacity. Therefore, this material has a high potential for application in biomedicine. Native BC is known to have a number of disadvantages related to structural stability, which has led to the consideration of modified BC as a potential carrier for the immobilization of various proteins, including L-ASNase. In our study, a BC-chitosan composite in which chitosan is cross-linked with glutaraldehyde was proposed for the immobilization of L-ASNase. The physicochemical characteristics of BC-chitosan films were found to be superior to those of native BC films, resulting in an increase in the release time of L-ASNase in vitro from 8 to 24 hours and from 2 to 10 hours in a melanoma cell line upon transfer. Consequently, chitosan-modified BC films exhibit an augmented duration of cytotoxic action of immobilized L-ASNase on melanoma tumor cells in comparison to BC. This effect is associated with a transformation in the structure of BC due to cross-links between chitosan, which altered the physicochemical properties of BC.

Keywords: L-asparaginase, bacterial cellulose, chitosan, kinetic models, cytotoxicity, melanoma