

ИЗУЧЕНИЕ КОЛЛОИДНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ И ЧАСТИЦ НАНОАЛМАЗОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Митрюшкина Д.А.
Научный руководитель – к. б. н. Пуртов К.В.

Институт биофизики СО РАН

На сегодняшний день не создано такого лекарственного препарата, который не обладал бы побочным действием. Все потому, что кровь, циркулирующая по всему организму, доставляет лекарство не только в клетку-мишень, но и разносит его в другие системы органов, что негативно сказывается на здоровье человека.

В последние годы широкое внимание получило изучение и применение микро- и нано- объектов различной физико-химической природы в качестве средства доставки лекарства в клетку-мишень. Предполагается, что такой подход позволит снизить побочное действие лекарственного препарата, увеличить его эффективность, а также значительно снизить количество активного препарата, вводимого в организм. Было предложено создать капсулу с рецепторами на ее поверхности, в которую можно было бы поместить лекарство. Рецепторы служат своеобразными «почтальонами». На сегодняшний день в качестве лекарств направленного действия предлагается использовать не микро-, а наноматериалы. Такие как: липосомы, наночастицы золота и других металлов, нанотрубки, ДНК-коробочки и даже нанороботы.

Для того чтобы использовать такие наноконтейнеры необходимо, чтобы такие носители были не токсичными, биосовместимыми и не аффинными к различным биологическим тканям. Для создания систем адресной доставки веществ могут представлять интерес наноалмазы детонационного синтеза, обладающие высокой коллоидной устойчивостью в дисперсионных средах. В ряде работ было показано, что эти наноалмазы: хорошо адсорбируют различные биомолекулы; позволяют получать стерильные гидрозолы и применять их для всех видов инъекций, включая внутривенные; обладают высокой биосовместимостью с организмами животных *in vivo*.

Транспортная система должна обладать рядом необходимых свойств, нести на своей поверхности жестко закрепленную активную адресную молекулу, быть коллоидно-устойчивой в плазме крови, не захватываться клетками крови.

Целью данной работы является исследование коллоидной стабильности супрамолекулярных комплексов наноалмаза с молекулами белка в сыворотке крови.

Впервые эффект коллоидной устойчивости был замечен на цельной сыворотке. Было показано (Рис. 1), что даже после центрифугирования образца сыворотки, содержащего комплекс наноалмаз-BSA¹¹²⁵, при 16000 g в течение 1 часа около 50% радиоактивности, связанной с комплексом, обнаруживается в супернатанте. Предполагается, что такая устойчивость может определяться белковыми молекулами адсорбированными на поверхности частиц из сыворотки крови. Было обнаружено, что концентрация стабилизирующего агента либо очень высока, либо он проявляет активность даже в очень маленькой концентрации.

С помощью хроматографии на колонке с сорбентом биогель Р-4 и измерения радиоактивной метки было показано, что компонент, ответственный за коллоидную устойчивость, имеет высокомолекулярную природу. Для выделения такого стабилизатора был проведен ряд разделений сыворотки на колонках с сорбентами АсА

44 и Q-Sepharose, последний является анионообменником. В случае со вторым разделением, было нанесено 50 мл разведенного дистиллированной водой образца (1:50). После чего адсорбированные белки снимали градиентом 1 молярного NaCl от 0% до 100% и измеряли спектры. Хроматограмма приведена на рисунке 2.

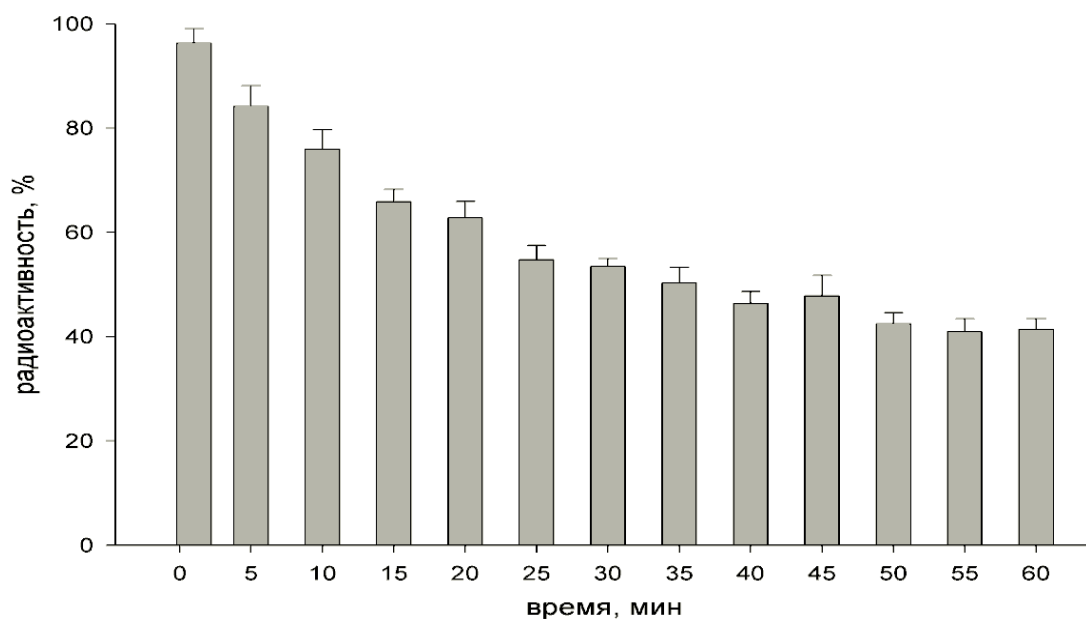


Рисунок 1. Уровень остаточной радиоактивности в супернатантах в зависимости от времени центрифугирования при 16000 g образцов сыворотки, содержащих комплекс наноалмаз-BSA¹¹²⁵.

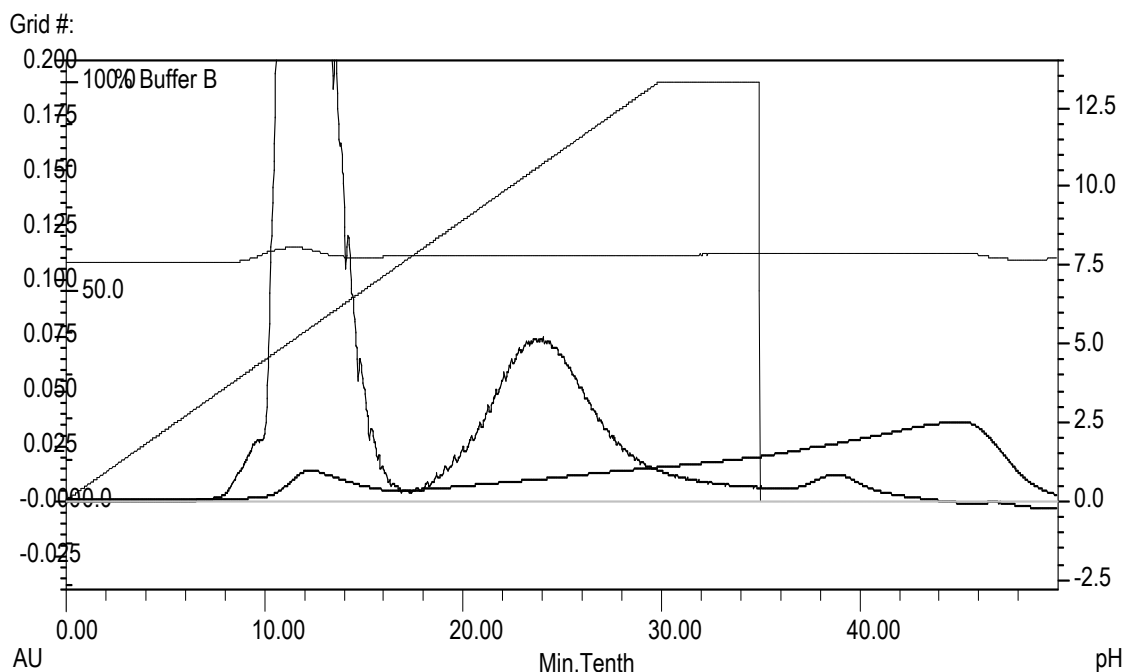


Рисунок 2. Хроматограмма образца сыворотки крови на сорбенте Q-Sepharose.

После анионообменной хроматографии собирали образцы, соответствующие пику на хроматограмме и измеряли спектры.

На рисунке 3 можно увидеть, данные спектры при длине волны 350 нм еще больше отличаются друг от друга, а это еще раз подтверждает, что присутствующие в сыворотке стабилизированные нанодиазмы влияют на поглощение образцов. А также значит то, что мы еще в большей степени сконцентрировали и очистили выделяемый нами компонент.

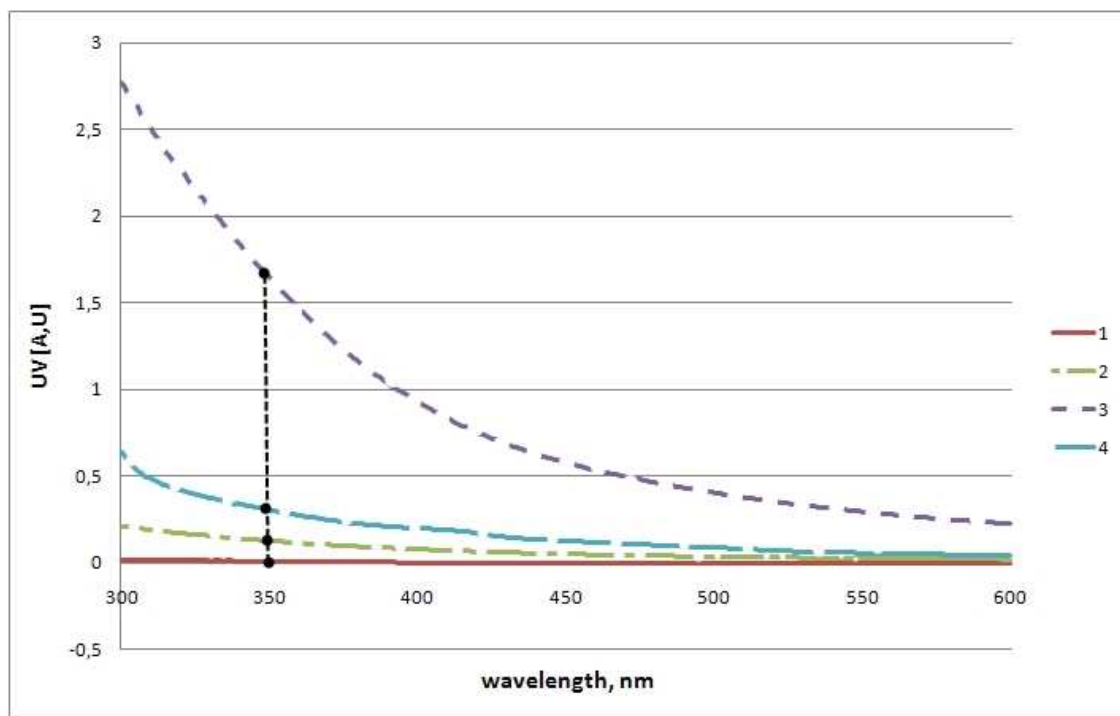


Рисунок 3. Оптическая плотность образцов полученных в ходе хроматографии сыворотки крови на колонке с сорбентом AcA 44 и Q-Sepharose при длине волны 350 нм, 1- до добавления нанодиазмов, 2 - после добавления нанодиазмов, образец №3, 3 - после добавления нанодиазмов, образец №2, 4 - после добавления нанодиазмов, образец №1.

Далее сделали электрофорез. Для этого было отобрано по 10 мкл образца, собранного после гель-фильтрации на сорбенте AcA 44. Результаты можно наблюдать на рисунке 4.

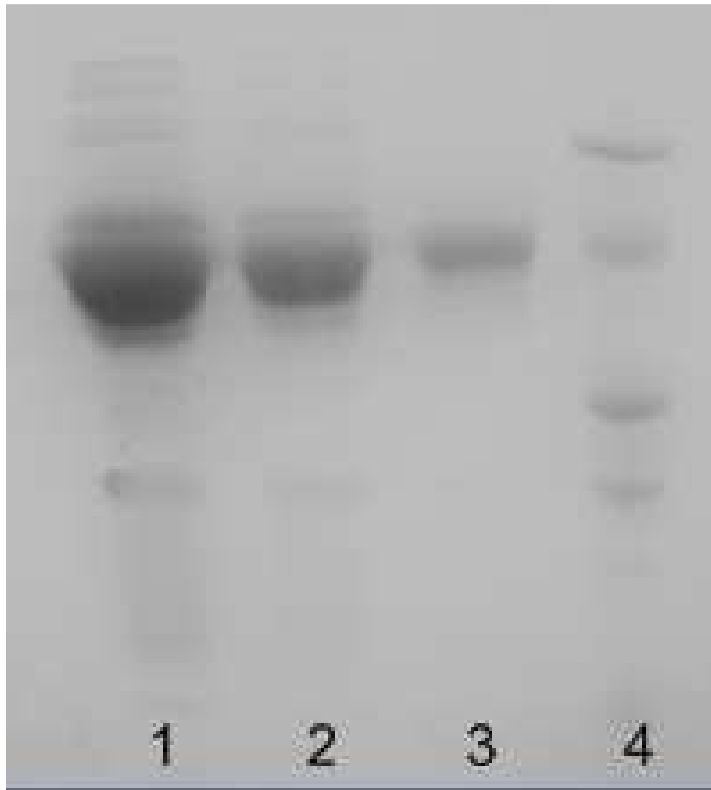


Рисунок 4. Электрофорез образцов, полученных в ходе хроматографии сыворотки крови на колонке с сорбентом AcA 44 и Q-Sepharose. 1 – образец № 1, 2 – образец № 2, 3 - образец № 3, 4 – маркерные белки.

Образцы на рисунке 4 соответствуют пику на хроматограмме, разделенному на 3 пробирки (рисунок 2). Исходя из рисунка 4 можно сделать вывод о том, что, в образце под номером 1 сконцентрировано большее количество компонента, ответственного за коллоидную стабильность наноалмазов в сыворотке крови. Применив это заключение к рисунку 3 мы можем наблюдать еще одно подтверждение, так как у образца № 1 наибольшая оптическая плотность. Судя по рисунку 4 данный компонент соответствует маркеру BSA, что говорит нам о том, что компонентом может быть сывороточный альбумин.