

УДК 544.77

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ И ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫМИ МИКРОКАПСУЛАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

© 2024 г. Е. С. Герасимович^{а, *}, Г. О. Нифонтова^б, И. С. Крюкова^а, И. Набиев^{а, б}, А. Суханова^б

^а Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, 115409 Россия

^б Университет Реймса Шампань-Арденны, Реймс, 51100 Франция

*E-mail: gerasimovich.evg@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 12.06.2023 г.

Исследование особенностей взаимодействия систем для адресной доставки лекарств с компонентами биологических жидкостей человека является одним из актуальных направлений в области разработки персонализированных стратегий терапии различных заболеваний человека. Инкапсуляция лекарственных средств в микроносители обеспечивает интактность лекарственных средств и их пролонгированное высвобождение в органе-мишени. Структура и свойства поверхности микроносителей определяют их общую биосовместимость и особенности их взаимодействий с биомолекулами. В представленной работе были получены микрочастицы структуры ядро/полиэлектrolитная оболочка и полиэлектролитные микрокапсулы (микрочастицы с растворённым ядром), отличающиеся друг от друга степенью жесткости своей структуры, и проведен анализ их взаимодействий с белками сыворотки и плазмы крови человека. Полученные результаты показали наличие выраженных отличий в профиле белков, связывающихся с поверхностью полиэлектролитных микрочастиц и микрокапсул с различной степенью жесткости.

Ключевые слова: микроносители, микрочастицы, полиэлектролитные микрокапсулы, адсорбция белков

DOI: 10.56304/S2079562924050129

ВВЕДЕНИЕ

Конструирование микроносителей на основе полимерных микрочастиц и микрокапсул, полученных методом послойного нанесения полиэлектролитов, является важным направлением разработок технологий создания инновационных систем направленной доставки лекарственных средств [1]. Принципиальной задачей при синтезе таких микроносителей является обеспечение их биосовместимости. Физико-химические свойства микроносителей, такие как высокая площадь их поверхности, определяющаяся диаметром частиц, а также жесткость создаваемых микроструктур и наличие химически-активных групп на их поверхности могут влиять на их взаимодействия с компонентами биологических жидкостей человека, в частности, с белками крови. Белки сыворотки или плазмы крови человека адсорбируются на поверхности микроносителей, образуя дополнительный слой [2, 3], что может приводить к агрегации и/или изменению конформации этих белков, что, в свою очередь, способствует изменению реологических свойств крови и активации иммунной системы. Ранее было показано, что на-

личие в адсорбционном слое на поверхности микрочастиц определённых белков (например, иммуноглобулинов и белков системы комплемента) значительно влияет на взаимодействие микрочастиц с иммунными клетками [4]. Образование белкового слоя на поверхности микроносителей может изменять и функциональные свойства систем для направленной доставки лекарств, приводя к уменьшению их способности распознавать клетки-мишени и уменьшению аффинности их связывания с биорецепторами [5]. Следует заметить, что для некоторых из исследованных микроносителей с определенными структурными свойствами наличие дополнительного белкового слоя на поверхности приводило, напротив, к увеличению специфичности их связывания с клетками [6]. Таким образом, понимание механизмов структурно-функциональных взаимодействий микрочастиц с белковыми компонентами биологических жидкостей человека является важной предпосылкой получения эффективных и биосовместимых систем направленной доставки лекарственных средств.

В настоящей работе были получены микроносители одного и того же размера и имеющие

идентичные химические группы молекул электролитов на своей поверхности, и отличающиеся лишь наличием или отсутствием жесткого ядра в своих структурах типа ядро/полиэлектролитная оболочка. Результаты исследования влияния жесткости структуры микроносителей на их взаимодействие с белками сыворотки и плазмы крови человека выявили отличия в наборе белков, связывающихся с поверхностью микрокапсул структуры ядро/полиэлектролитная оболочка и полиэлектролитных микрокапсул.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кальций-карбонатные ядра диаметром ~ 2 мкм были синтезированы в водной реакционной смеси, содержащей поливиниловый спирт и метилцеллюлозу в качестве загустителей. Форму и размер микрокапсул оценивали с использованием оптической микроскопии. Далее, для получения полимерной оболочки структуры (ПАГ/ПСС)₄/ПАГ/ПАК, на отрицательно заряженную поверхность кальций-карбонатных ядер наносили слои противоположно заряженных полиэлектролитов поли(аллил-амин гидрохлорида) (ПАГ), поли(натрий 4-стиролсульфоната) (ПСС) и полиакриловой кислоты (ПАК), как было описано ранее [7]. Для получения полых микрокапсул ядра полученных микрокапсул, имеющих структуру ядро/полиэлектролитная оболочка, растворяли проведением дополнительной инкубации суспензии микрокапсул в водном растворе, содержащем ЭДТА. Полученные очищенные препараты микрокапсул и микрокапсул инкубировали с сывороткой или плазмой крови человека при 37°C в течение 24 ч. Контрольные образцы, очищенные препараты микрокапсул и микрокапсул, инкубировали с фосфатно-солевым буфером (рН 7.4) в аналогичных условиях. Белки, связавшиеся с поверхностью микрокапсул и микрокапсул, элюировали с поверхности микроносителей с помощью стандартного загрузочного буфера для электрофореза и разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). После обработки изображений гелей с помощью программы Image Lab (Bio-Rad) были рассчитаны кажущиеся молекулярные массы белковых полос, для чего в качестве стандартов для построения калибровочной кривой использовали окрашенные маркеры молекулярных масс, также нанесенные на гель. Для проведения количественного сравнения профиля элюированных белков в исследуемых образцах с помощью программы Image Lab (Bio-Rad) была определена суммарная интенсивность белковых полос в геле, а затем рассчитана относительная интенсивность каждой белковой полосы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате электрофоретического разделения белков, элюированных с поверхности различных микрокапсул и микрокапсул после их инкубации с сывороткой или плазмой крови, были получены изображения гелей. Рассчитанные кажущиеся молекулярные массы, соответствующие выделенным полосам белков в полиакриламидном геле, представлены на рис. 1а.

Сравнительный анализ суммарной интенсивности белковых полос в геле для различных образцов элюатов показал, что общее количество белка, связавшегося с поверхностью жестких микрокапсул со структурой ядро/полиэлектролитная оболочка, оказалось меньшим, чем в образцах менее жестких полиэлектролитных микрокапсул с удаленным ядром (рис. 1а). Кроме этого, были обнаружены отличия в интенсивности индивидуальных белковых полос с одинаковой кажущейся молекулярной массой между образцами элюатов (рис. 1б).

Так, белковые полосы 3, 7 и 8 с кажущимися молекулярными массами 98, 73 и 67 кДа, соответственно, встречались во всех проанализированных образцах. Относительная интенсивность полосы 3 была примерно одинаковой во всех образцах. Однако, относительная интенсивность полосы 7 была заметно выше для образцов жестких микрокапсул со структурой ядро/полиэлектролитная оболочка, чем для образцов менее жестких полиэлектролитных микрокапсул с удаленным ядром. Относительная интенсивность полосы 8, предположительно соответствующей сывороточному альбумину человека, напротив, была выше в образцах полиэлектролитных микрокапсул после их инкубации как с сывороткой, так и с плазмой крови, чем в аналогичных образцах жестких микрокапсул.

Полученные данные позволили выявить ряд отличий в белковом профиле (наборе белковых полос, соответствующих отдельным белкам на дорожках геля) между образцами с разной структурой: жестких микрокапсул со структурой ядро/полиэлектролитная оболочка и менее жестких полиэлектролитных микрокапсул с удаленным ядром. Полоса 2 с кажущейся молекулярной массой 110 кДа была обнаружена в образцах элюатов, полученных от микрокапсул, проинкубированных с плазмой крови, и микрокапсул, проинкубированных как с сывороткой, так и с плазмой крови. Относительная интенсивность этой полосы оказалась более высокой для элюатов, полученных от микрокапсул. Белковые полосы 1, 6 и 10 (кажущиеся молекулярные массы 167, 80, 44 кДа, соответственно) встречались только в образцах элюатов, полученных от микрокапсул. Полоса 9 (56 кДа) была обнаружена только в образце элюата от микрокапсул, проинкубированных с плазмой крови.

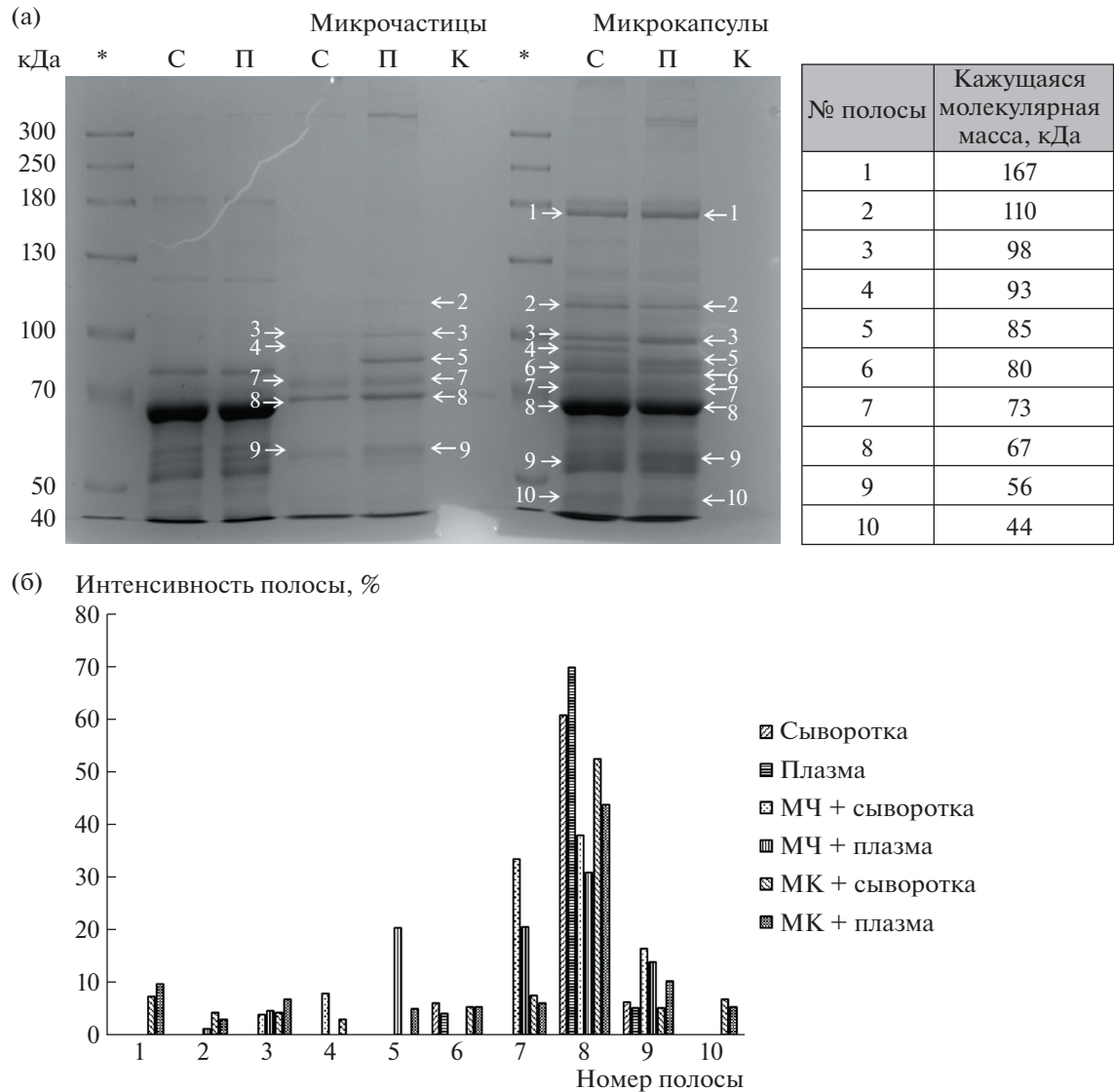


Рис. 1. (а) Результаты разделения белков, элюированных с поверхности микрочастиц и микрокапсул, проинкубированных с сывороткой или плазмой крови человека, в 7% полиакриламидном геле. С — сыворотка, П — плазма, К — контроль, * — маркеры молекулярных масс (слева указаны значения в кДа). Цифрами обозначены полосы, которые были вырезаны из геля для дальнейшего анализа, в таблице указаны определенные для них кажущиеся молекулярные массы, кДа. (б) Сравнение относительной интенсивности полос на геле.

Таким образом, сравнительный анализ белковых полос в дорожках геля продемонстрировал, что профили белков, связывающихся с поверхностью микроносителей одного размера, имеющих идентичные полиэлектролиты на своей поверхности, но отличающиеся наличием или отсутствием жесткого ядра, существенно различаются.

Кроме того, некоторые отличия были выявлены между образцами в зависимости от типа производных препаратов крови, использованных для инкубации. Так, полоса 4 (93 кДа) встречалась в образцах, полученных с использованием только сыво-

ротки крови, а полоса 5 (85 кДа) — только плазмы крови. Полученные результаты должны быть приняты во внимание при проведении дальнейших исследований по идентификации компонентов биологических жидкостей человека, способных взаимодействовать с поверхностью микроносителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структура и свойства поверхности микроносителей определяют их общую биосовместимость и особенности их взаимодействий с биомолекулами. В настоящей работе нами были получены

микрочастицы структуры ядро/полиэлектролитная оболочка и полиэлектролитные микрокапсулы (микрочастицы с растворенным ядром), отличающиеся друг от друга степенью жесткости своей структуры, и проведен анализ их взаимодействий с белками сыворотки и плазмы крови человека. Полученные результаты показывают, что жесткость структуры микроносителей обуславливает взаимодействие с их поверхностью определенных белков сыворотки и плазмы крови человека. Дальнейший анализ профилей белков элюатов с помощью масс-спектрометрии поможет идентифицировать белки крови человека, непосредственно взаимодействующие с поверхностью таких микроносителей. Результаты данной работы найдут свое применение при конструировании биосовместимых систем для направленной доставки лекарственных средств с целью усовершенствования терапевтических стратегий лечения различных заболеваний человека.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящее исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда, грант № 22-75-10103.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Skirtach A.G., Yashchenok A.M., Möhwald H. // Chem. Commun. 2011. V. 47 (48). P. 12736.
2. Nifontova G., Tsoi T., Karaulov A., et al. // Biomater. Sci. 2022. V. 10. P. 5092.
3. Dai Q., Yan Y., Ang C.S., et al. // ACS Nano. 2015. V. 9 (3). P. 2876.
4. Ju Y., Kelly H.G., Dagley L.F., et al. // ACS Nano. 2020. V. 14. (11). P. 15723.
5. Dai Q., Yan Y., Guo J., et al. // ACS Macro Lett. 2015. V. 4 (11). P. 1259.
6. Ju Y., Dai Q., Cui J., et al. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2016. V. 8 (35). P. 22914.
7. Kalenichenko D., Nifontova G., Karaulov A., et al. // Nanomaterials. 2021. V. 11 (11). P. 3055.

Interaction of Human Serum and Plasma Proteins with Polyelectrolyte Microcapsules of Different Structures

E. S. Gerasimovich^{1, *}, G. O. Nifontova², I. S. Kriukova¹, I. Nabiev^{1, 2}, and A. Sukhanova²

¹National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia

²Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, 51100 France

*e-mail: gerasimovich.evg@gmail.com

Received May 30, 2023; revised June 6, 2023; accepted June 12, 2023

Abstract—The study of the interactions between systems for targeted drug delivery and components of human biological fluids is one of the actual directions in the development of personalized therapy strategies for a variety of human diseases. Encapsulation of drugs in microcarriers enables drug intactness and their prolonged release in their target organ. The structure and surface properties of microcarriers determine their overall biocompatibility and features of their interaction with biomolecules. In the presented work, the core/polyelectrolyte shell microparticles and polyelectrolyte microcapsules with a dissolved core, which have different degrees of structural rigidity, were obtained. Their interaction with human serum and plasma proteins was analyzed. The obtained results demonstrate that the proteins that bind to the surface of polyelectrolyte microparticles with different structures have a distinctive profile.

Keywords: microcarriers, microparticles, polyelectrolyte microcapsules, protein absorption