

**ВЛИЯНИЕ ПАВ НА ОСНОВЕ ПОЛИОКСИЭТИЛЕНА-
ПОЛИОКСИПРОПИЛЕНА, СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ЭМУЛЬСИЮ
ПЕРФТОРУГЛЕРОДОВ, НА АДСОРБЦИЮ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ ЧЕЛОВЕКА**

Жалимов В.К., Склифас А.Н., Капцов В.В., Кукушкин Н.И.

Учреждение РАН ИБК РАН, 142290, Московская обл.

г. Пущино, ул. Институтская 3.

+74967739523

E-mail: student-iam@rambler.ru

Абстракт

Было проведено исследования влияния следующих ПАВ: проксанол 268, проксанол 168, Synperonic® F-108, Pluronic® P-123 на качественную и количественную адсорбцию белков плазмы человека на поверхности ПФУ эмульсии. В результате исследования установлено, что наибольшее количество белков (3.2 мг/мл) адсорбируется на поверхности эмульсии, стабилизированной проксанолом 268; на поверхности эмульсии, стабилизированной проксанолом 168 или Synperonic® F-108, адсорбируется 2.05 и 0.75 мг/мл белка, соответственно; на поверхности эмульсии, стабилизированной Pluronic® P-123, наблюдается наименьшее количество адсорбированного белка (0,15 мг/мл). Показана обратно пропорциональная зависимость между размером гидрофобной части молекулы ПАВ и количеством адсорбированного на эмульсии белка.

Для всех эмульсий наблюдались значительные различия в качественном составе адсорбированных белков. При этом было установлено, что на эмульсии, стабилизированной Pluronic® P-123, практически не происходит адсорбция липопротеидов.

Ключевые слова: эмульсия, адсорбция белков, человеческая плазма, белки, перфторуглероды.

**INFLUENCE OF POLYOXYETHYLENE-POLYOXYPROPYLENE BASED
SURFACTANTS STABILIZING THE EMULSION OF PERFLUOROCARBONS, ON
THE ADSORPTION OF HUMAN PLASMA PROTEINS**

Zhalimov V.K., Scifas A.N., Kaptsov V.V., Kukushkin N.I.

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya st. 3, 142290

Pushchino, Moscow Region, Russia

+74967739523

E-mail: student-iam@rambler.ru

Abstract

We studied the influence of the surfactants: proxanol 268, proxanol 168, Synperonic® F-108, Pluronic® P-123,- on the qualitative and quantitative adsorption of human plasma proteins on the surface of PFC emulsion. We found out that the maximum amount of protein (3.2 mg/ml) was adsorbed on the surface of the emulsion stabilized by proxanol 268; 2.05 and 0.75 mg/ml protein was adsorbed on the surface of the emulsion stabilized by proxanol 168 or Synperonic® F-108, respectively; we observed the least amount of adsorbed protein (0.15 mg/ml) on the surface of the emulsion stabilized by Pluronic® P-123. The inverse relationship between the size of the hydrophobic part of surfactant molecules and the amount of adsorbed protein on the emulsion was shown.

Significant differences in the qualitative composition of adsorbed proteins were observed for all the emulsions. At the same time it was established, that there was no adsorption of lipoproteins on the emulsion stabilized by Pluronic® P-123.

Keywords: emulsion, protein adsorption, human plasma, protein, perfluorocarbons.

Введение

Успех применения дисперсных форм лекарственных препаратов, а также микроконтейнеров в качестве носителей лекарственных веществ зависит от того, насколько мы понимаем биофизическую основу механизмов взаимодействия микрочастиц с различными физиологически активными соединениями и системами организма [1]. Использование в качестве носителей эмульсий ПФУ, которые сравнительно быстро (от 3-7 суток до 2-6 месяцев) покидают организм, и полностью химически инертны, дает неоспоримые преимущества перед соединениями, выведение которых может занимать длительное время (а иногда невозможно вообще), а также соединениями образующими различные метаболиты в процессе их биодеструкции. Кроме того, в отличие от многих микроразмерных носителей, которые высвобождают липофильные препараты только после интернализации носителей в клетку или после разрушения носителей, ПФУ

микрочастицы могут высвобождать препараты при простом контакте поверхности микрочастиц с плазмолеммой клетки-мишени [2].

Ранее была показана адсорбция различных белков плазмы крови человека на поверхности ПФУ эмульсии, стабилизированной проксанолом 268 [3, 4]. Известно также, что существенную роль в процессе адсорбции белков на поверхности ПФУ эмульсии играет природа ПАВ, использованного в качестве стабилизатора. Так *in vitro*, на микрочастицах, стабилизированных проксанолом 268, адсорбируется ряд плазменных белков, в то время как при замене проксанола на фосфолипиды яичного желтка, адсорбции белков плазмы не наблюдается [3]. С другой стороны, в литературе нет сведений относительно изменений адсорбции при замене стабилизирующего ПАВ на другой, сходный по структуре и отличающийся лишь числом мономеров в полимерной цепи. Целью нашей работы было изучить, какое влияние оказывает различия между собой следующих ПАВ: проксанол 268, проксанол 168, Synperonic® F-108, Pluronic® P-123, на качественную и количественную адсорбцию белков плазмы человека на поверхности ПФУ эмульсии.

Материалы и методы

Состав и приготовление экспериментальных ПФУ эмульсий

В экспериментах использовали полученные на гомогенизаторе “Донор-1” эмульсии ПФУ со средним диаметром частиц от 133 до 348 нм, следующего состава: 10 об. % смеси перфтордекалина и перфторциклогексилпиперидина в соотношении 2:1, NaCl 0,15М, KCl 5мМ, MgCl 1мМ, NaHCO₃ 8мМ, NaH₂PO₄ 1,5мМ, глюкоза 10мМ. В зависимости от необходимости в смесь добавлялся один из следующих ПАВ: 4% проксанол 268, 4% проксанол 168, 4% Synperonic® F-108, 4% Pluronic® P-123.

Определение зависимости максимальной адсорбционной емкости эмульсии по белкам от соотношения инкубационных объемов эмульсии и плазмы крови человека

Эмульсию смешивали с плазмой человека в соотношении 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:28. Во все пробы (кроме пробы с соотношением 1:1) добавляли раствор ПАВ, используемого в эмульсии, до концентрации 0,75 вес/об.%. ПАВ добавлялся с целью, чтобы концентрация ПАВ во всех пробах была одной и той же, такой, какой она наблюдалась при смешивании эмульсии и плазмы в соотношении 1:1, то есть 0,75 вес/об.%. Пробы инкубировали при 37°C в течении 30 минут. После этого эмульсию осаждали при 18000g в течение 15 минут. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1мл 0,2% раствора ПАВ, использовавшегося для приготовления данной эмульсии. Процедуру повторяли трижды.

После этого осадок (препарат высококонцентрированной эмульсии с адсорбированными белками) использовался для дальнейшего анализа.

Определение количества белка, адсорбированного на эмульсии

Измерения проводили на спектрофотометре Cary 100 UV–Vis, при длине волны 280 нм. Готовый препарат концентрированной эмульсии с адсорбированными на ней белками смешивали с 200 мкл метанола и интенсивно перемешивали до полного растворения осадка. К полученному раствору, содержащему хлопья белка и капли фторуглеродов, добавляли 0,8 мл 10 М мочевины и тщательно перемешивали. После этого смесь центрифугировали при 18000g в течение 5 минут. Водную фазу отбирали и переносили в кварцевую кювету, содержащую 1 мл дистиллированной воды. Базовую линию получали, используя 2 мл 4,4 М раствора мочевины.

Электрофорез

Качественный состав белков, снятых с частиц ПФУ эмульсии, определяли с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле.

Для нанесения белков на гель использовали буфер следующего состава: 50мМ ТрисHCl, pH 6,8, 0.01% бромфеноловый синий, 1% SDS, 10% глицерин. Пробы перед нанесением прогревали в течение 5 мин при 95°C.

Электрофорез проводили в денатурирующих условиях в трис-глицин-ДСН буфере без добавления восстановителей на оборудовании VE-10 (Helicon, Россия) с усовершенствованной системой охлаждения верхнего электродного буфера. В работе использовали гель с градиентом концентрации акриламида 5-18% и 7,5-18% на трис-буфере (375мМ Трис-HCl, pH 8.8) содержащем 0.1% SDS, 0.125% PSA и 0.075% TEMED. Электродным буфером служил раствор: 25мМ Триса, 192мМ глицина и 0.1% SDS, pH 8.4.

Электрофорез проводили при постоянном напряжении 299 В. Разделение прекращали по достижении фронта бромфенолового синего точки выхода из геля. После разделения гель трехкратно отмывали в дистиллированной воде по 5 мин. Окраску осуществляли коллоидным кумасси G-250 [5].

Идентификацию белков проводили методом MALDI-TOF с использованием масс-спектрометра Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics).

Расчет корреляции проводили с помощью соответствующей функции в программе Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и обсуждения

С целью выяснить, какое влияние оказывает ПАВ на общее количество и состав адсорбированных на частицах эмульсии плазменных белков, мы изучили четыре эмульсии

с одинаковым гидрофобным ядром (перфтордекалин и перфторциклогексилпиперидин в соотношении 2:1), и разными ПАВ (проксанолы 268 и 168, Pluronic® P-123 и Synperonic® F-108). Все вышеперечисленные ПАВ представляют собой блоксополимеры полиоксиэтилена, представляющего гидрофильную части молекулы ПАВ, и полиоксипропилена, представляющего гидрофобную часть. Различия заключаются в размерах гидрофильной и гидрофобной частей молекулы, а также в соотношении между размерами гидрофильных концов и гидрофобной площадки.

Химические параметры ПАВ, а также физические параметры полученных на их основе эмульсий представлены в таблице.

Таблица. Физические параметра ПАВ и эмульсий на их основе

Название ПАВ	Мол. масса. кДа	Соотношение PEG-PPG-PEG	Средний размер частиц, нм	Площадь поверхности 1 см ³ , см ²
Проксанол – 268	13	130–38–130	133	45113
Проксанол – 168	8	73–28–73	279	21505
Synperonic® F-108	14,6	133–50–133	261	22989
Pluronic® P-123	5,8	19–69–19	348	17241

Результаты экспериментов по определению качественного состава адсорбированных белков плазмы в зависимости от химической структуры ПАВ представлены на рисунке 1. На поверхности эмульсии стабилизированной Pluronic® P-123, который имеет большую гидрофобную площадку и относительно небольшие гидрофильные концы, адсорбируются только белки с массой свыше 50 кДа (Рис. 1, трек 123). На поверхности эмульсии, стабилизированной Synperonic® F-108, адсорбируются белки с массой от 25 кДа до 50 кДа, а высоко молекулярные белки практически не адсорбируются (Рис. 1, трек 108).

Качественный состав белков, адсорбированных на эмульсии, стабилизированной проксанолом 168, соответствует качественному составу белков, адсорбированных на эмульсии, стабилизированной проксанолом 268 (Рис. 1, треки 168 и 268). Необходимо отметить, что, несмотря на идентичный качественный состав адсорбированных белков на эмульсиях, стабилизированных указанными ПАВ, соотношение между адсорбированными белками меняется. Так на эмульсии, стабилизированной проксанолом

268, белки с молекулярными массами около 14 кДа, 18 кДа, 25 кДа, 40 кДа, 50 кДа и 80 кДа адсорбируются в значительно меньших количествах в сравнении с теми же белками, адсорбированными на эмульсии, стабилизированной Проксанолом 168.

Как можно видеть, при изменении ПАВ, может проявляться не только изменение

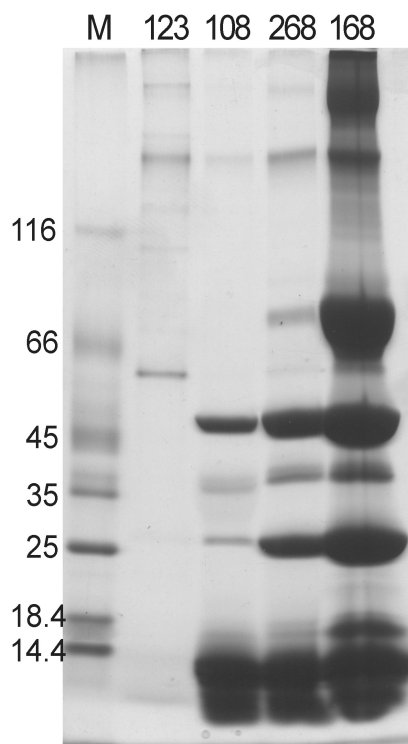


Рис 1. Электрофорез белков адсорбированных на эмульсии стабилизированной различными ПАВ: 123 – Pluronic® P-123; 108 – Synperonic® F-108; 268 – проксанол 268; 168 – проксанол 168; М – маркер молекулярных масс. Соотношение эмульсий к плазме 1:1.

соотношения адсорбированных белков, но и происходить адсорбция качественно новых. Так на эмульсии, стабилизированной Pluronic® P-123, происходит адсорбция белка с массой ≈ 60 кДа, который отсутствует при адсорбции на других трех эмульсиях. На эмульсии, стабилизированной Synperonic® F-108, адсорбируется белок с массой ≈ 35 кДа, отсутствующий при адсорбции на остальных эмульсиях.

Важно обратить внимание на то, что эмульсия, стабилизированная Pluronic® P-123, адсорбирует существенно меньшее количество белков плазмы по сравнению с остальными эмульсиями (Рис. 2). Важно также отметить, на ней не адсорбируются гидрофобно-связывающиеся белки, такие как ApoE (36 кДа), ApoJ (75 кДа), SAA (12.5 кДа), ApoAI (25 кДа), ApoC2 (14 кДа), ApoA4 (46 кДа), которые, за исключением SAA являются липопротеинами (указанные белки были идентифицированы нами при

исследовании белков, адсорбированных на эмульсии, стабилизированной проксанолом 268). Если проанализировать отношение длин гидрофобной к гидрофильной частей молекул использованных нами ПАВ, то можно отметить, что для всех ПАВ, кроме

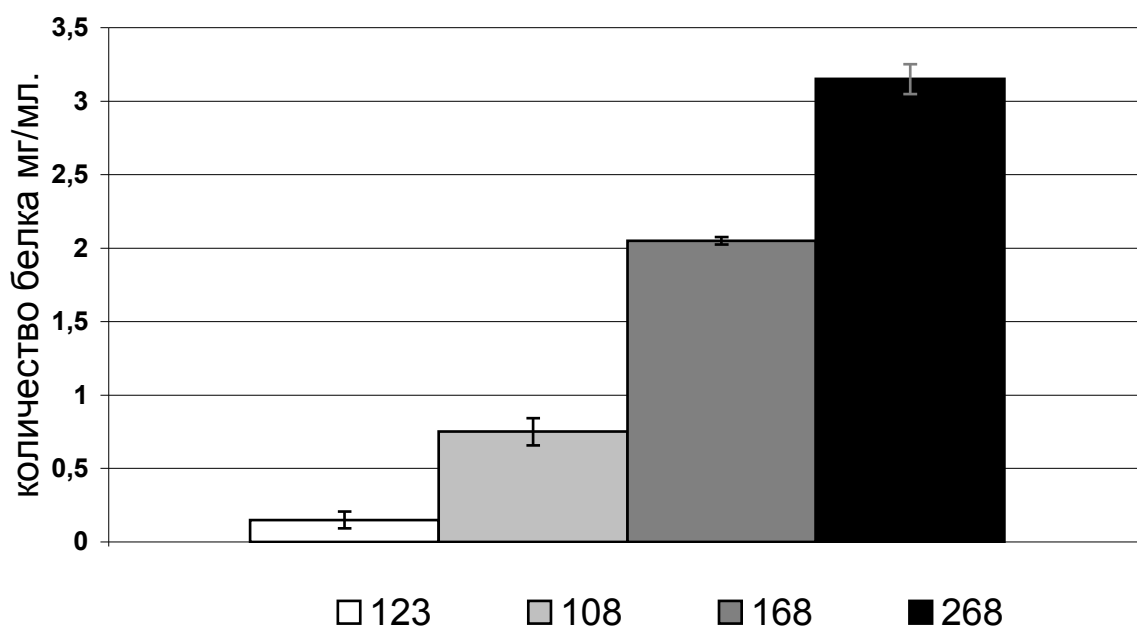


Рис. 2. Количество белков плазмы крови адсорбированных на поверхности эмульсии перфторуглеродов стабилизированных различными ПАВ. Для эмульсий, стабилизированных Synperonic® F-108, Pluronic® P-123 и проксанолом 268 использованы соотношения эмульсии к плазме 1:10, для эмульсии стабилизированной проксанолом 168, использовано соотношение 1:15.

Pluronic® P-123 это соотношение < 1 и только для Pluronic® P-123 это соотношение значительно > 1 . Возможно, что наличие большой гидрофобной площадки и коротких гидрофильных концов приводит к тому, что происходит образование плотного слоя ПАВ на поверхности гидрофобного ядра, препятствующего закреплению белков на гидрофобном ядре частицы.

Результаты экспериментов по определению общего количества адсорбированных белков представлены на рисунке 2. Анализируя эти данные, можно отметить, что

изменение стабилизирующего ПАВ приводит не только к изменению спектра адсорбированных белков, но также к значительному изменению в количестве адсорбированного белка. Удельная (на 1 мл эмульсии) адсорбционная емкость различных эмульсий представлена на рис 2. Из этих данных видно, что наибольшее количество белка адсорбируется на эмульсии, стабилизированной проксанолом 268, а наименьшее - Pluronic® P-123. Эмульсии, стабилизированные Synperonic® F-108 и проксанолом 168 занимают промежуточные значения.

Однако, поскольку мы использовали эмульсии различной дисперсности, отличающиеся средним размером частиц, то дополнительно нами был произведен расчет количества адсорбированного белка на 1см^2 адсорбирующей поверхности эмульсии (рис. 3). Согласно этому расчету, адсорбционная емкость эмульсий в пересчете на 1см^2 поверхности частиц, стабилизированных проксанолами 268 и 168, приблизительно равна и составляет $\approx 7 \cdot 10^{-7}$ мг/см ^{2} . Таким образом, разницу в удельной (на 1 мл эмульсии)

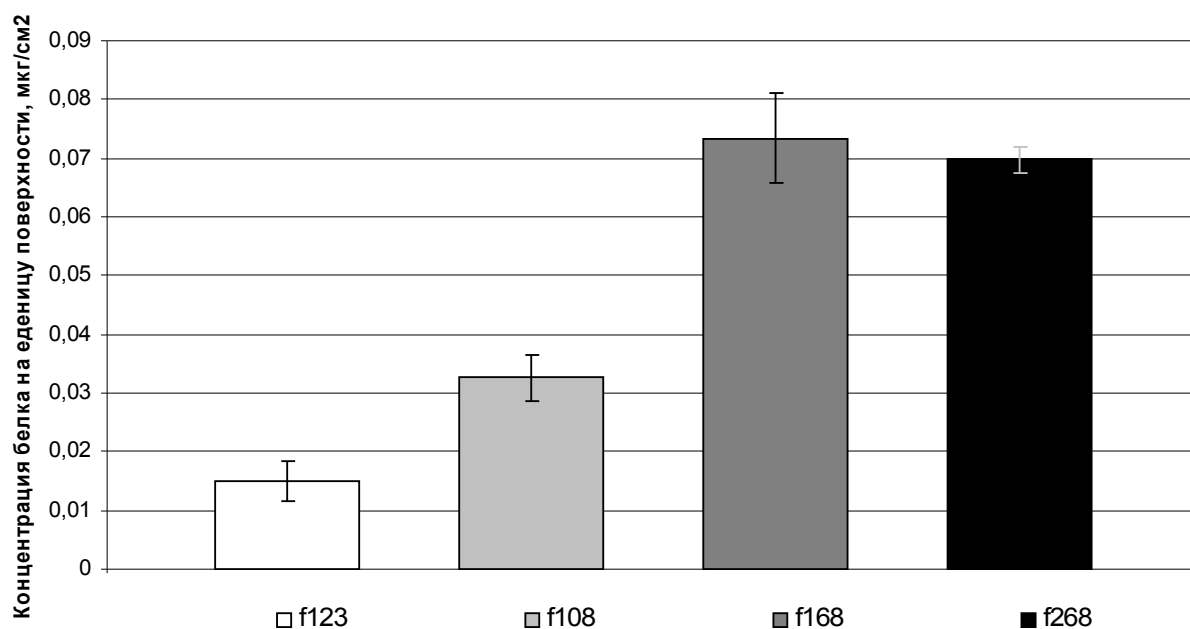


Рис. 3. Количество белков плазмы крови адсорбированных на поверхности эмульсии перфторуглеродов стабилизированных различными ПАВ в перерасчете на 1см^2 адсорбирующей поверхности.

адсорбционной емкости этих эмульсий можно объяснить тем, что площадь поверхности 1 мл эмульсии, стабилизированной проксанолом 168, примерно в 2 раза меньше, чем 1 мл эмульсии, стабилизированной проксанолом 268.

Исходя из имеющихся данных, можно предположить, что между структурой молекулы ПАВ и количественной адсорбцией наблюдается, обратно пропорциональная зависимость от размера гидрофобной части молекулы ПАВ (коэффициент корреляции -0.97 , $n = 4$).

Как видно из рис. 4, несмотря на то, что общее количество белка, адсорбирующегося на поверхности эмульсии, стабилизированной проксанолом 168, меньше, чем на поверхности эмульсии, стабилизированной проксанолом 268 (см. рис. 3). Насыщение достигается при большем соотношении плазмы к эмульсии (насыщение эмульсии, стабилизированной проксанолом 168, наступает при соотношении эмульсии к плазме равном 1:15, эмульсии, стабилизированной проксанолом 268, – при 1:10). Мы предполагаем, что это может быть связано с тем, что при относительно небольшой

молекулярной массе проксанола 168 (8000Да) и относительно малой

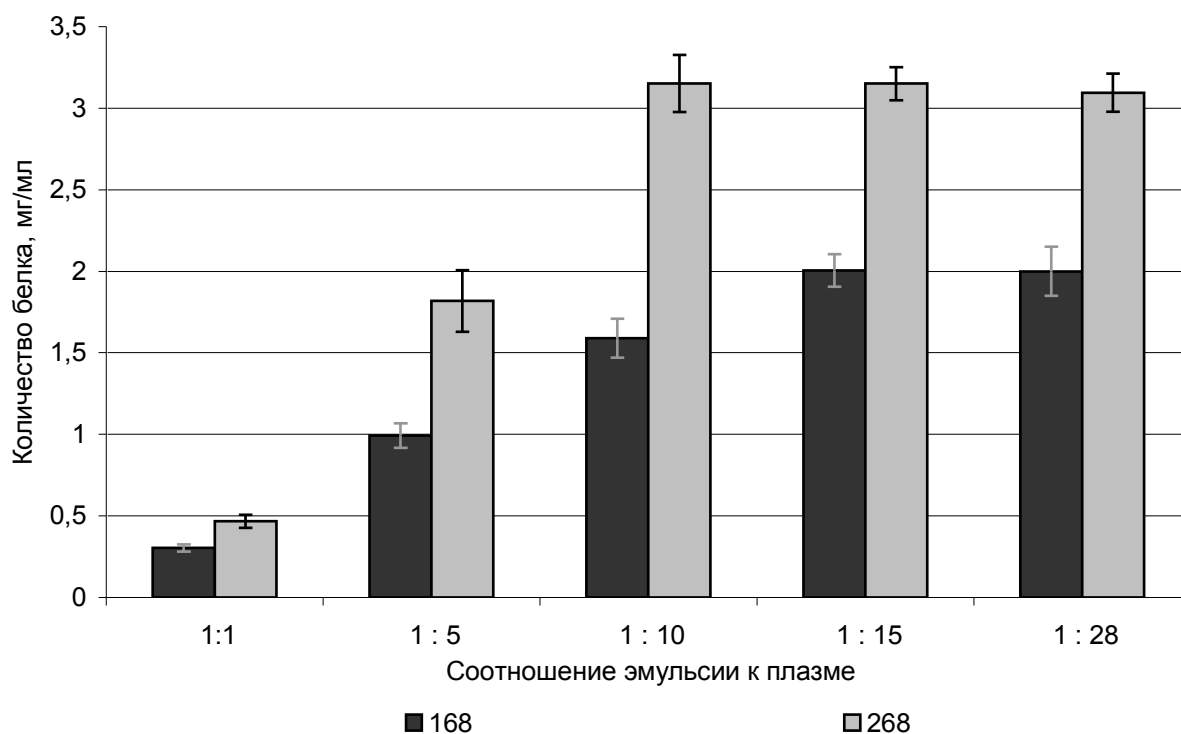


Рис. 4. Сравнение достижения насыщения белками плазмы человека эмульсиями стабилизированными проксанолом 168 и 268.

гидрофобной площадке, молекула проксанола 168 недостаточно прочно связана с гидрофобным ядром и легко диффундирует с частицы в раствор, уступая место плазменным белкам, концентрация в плазме которых невелика, что и приводит к увеличению количества необходимой плазмы и, тем самым, к увеличению соотношения эмульсии к плазме, при которой происходит насыщение белками.

Заключение

Показано, что адсорбция белков плазмы крови человека на поверхности ПФУ эмульсии в значительной мере зависит от используемого ПАВ. Причем стабилизирующий

ПАВ оказывает влияние, как на качественный состав, так и на количество адсорбированных белков.

Также нами было установлено, что при стабилизации эмульсии Pluronic® P-123, практически не наблюдается адсорбции липопропротеидов, характерных для всех остальных исследованных нами эмульсий.

Существует обратно пропорциональная зависимость между размером гидрофобной части молекулы ПАВ и количеством адсорбированного на эмульсии белка.

Список литературы

1. Нанотехнология в ближайшем десятилетии. Прогноз направлений исследований. Ред. М. Роко, З. Уильямс, П. Аливисатос. Мир, М, 2002.
2. Winter P.M., Cai K., Caruthers S.D. et al. // Expert. ReVol. Med. Devices., 2007, Vol. 4(2), P. 137–145.
3. Склифас А.Н., Шехтман Д.Г., Евдокимов В.А., Темнов А.А., Анташов А.В., Капцов В.В., Кукушкин Н.И // Биофизика, 2002, т.47, вып.5, С. 926–932.
4. Склифас А.Н., Евдокимов В.А., Кукушкин Н.И. // Биофизика, 2008, том 53, вып.2, С. 359–366.
5. Candiano G., Bruschi M., Musante L., et al., Electrophoresis, 2004, Vol. 25, P. 1327–1333.