

І. Т. Тарнавчик, Н. Г. Носова, А. В. Панченко, А. Б. Максимів, С. М. Варваренко
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра органічної хімії

СОРБЦІЯ АЛЬБУМІНУ НА ПОВЕРХНІ ЧАСТИНОК ДИСПЕРСНОЇ ФАЗИ ПОЛІЕСТЕРЕТЕРІВ

© Тарнавчик І. Т., Носова Н. Г., Панченко А. В., Максимів А. Б., Варваренко С. М., 2015

Проведено комплексне дослідження впливу сорбції бичачого сироваткового альбуміну (BSA) на агрегативну стійкість частинок дисперсної фази кополіестеретерів (одержаних на основі суміші діолів (поліетиленгліколів та поліпропіленгліколів) різної природи та N-захищеної глутамінової кислоти) та їх розміри. Показано, що внаслідок сорбції бичачого сироваткового альбуміну (BSA) відбувається підвищення агрегаційної стійкості системи. Комплекс властивостей синтезованих кополіестеретерів та їх водних дисперсій створює передумови для їх використання як дисперсних полімерних систем транспорту терапевтичних препаратів.

Ключові слова: сорбція, альбумін, дисперсія.

A comprehensive study of the effect of bovine serum albumin (BSA) sorption on the aggregative stability of the copolyestereter dispersed phase particles and their size has been conducted. The copolyestereter has been obtained on the basis of diol mixture (polyethyleneglycol, polypropyleneglycol) of different origin and N-substituted glutamic acid). It has been demonstrated that due to bovine serum albumin sorption the aggregation stability of the system increases. The complex of properties of synthesized copolyestereters and their aqueous dispersions preconditions their use as dispersed polymer transport systems for therapeutic drugs.

Keywords: sorption, albumin, dispersion.

Постановка проблеми. Пошук можливостей отримання матеріалів з новими властивостями для потреб медицини залишається важливою тенденцією у розвитку сучасної хімії полімерів. Створення нових засобів доставки терапевтичних препаратів, здатних до самоорганізації макромолекул та утворення дисперсних систем, які б забезпечили пролонгований захист ліків та активних речовин від гідролітичної дії середовища та імунної атаки організму, постійно спонукає до всебічного вивчення поведінки цих систем у середовищі організму, їх стійкість, можливості виведення з організму, а також на фармакокінетику лікувальних засобів. Тому дослідження сорбції білкових сполук на наночастинках нових полімерних носіїв як потенційної основи для систем доставки терапевтичних препаратів є актуальним завданням.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Сьогодні кополімери поліоксиетилену та поліоксипропілену (Pluronic) як основи сучасних полімерних систем доставки є найпоширеніші, як такі, що якнайкраще відповідають сучасному рівню вимог до полімерних компонентів систем транспорту ліків [1]. Однак відсутність деградабельності та складність функціоналізації таких полімерів значною мірою обмежує ефективність їх у нових поколіннях систем доставки і спонукає до пошуків нових полімерів.

Сьогодні є багато повідомлень про розроблення полімерних наносистем доставки, але тільки невелика їх кількість (близько десяти) пройшла клінічні випробування за рекомендацією FDA (US Food and Drug Administration). Важливим є те, що полімерна основа цих носіїв у більшості випадків

(80 %) містить блок-кополімери на основі похідних поліетиленгліколю та поліамінокислот (аспарагінової та/або глутамінової).

Тому особливий інтерес викликає відносно новий клас полімерів – амінофункційні кополіестери природних α -амінокислот та поліетердіолів, які отримали назву “псевдополіамінокислоти” [2, 3]. На відміну від поліамінокислот вони не сприймаються організмом як фрагменти білка і тому не викликають відповідної реакції (чужий білок).

Концепція створення поліестерів на основі поліетердіолів та природних двоосновних амінокислот об’єднує основні переваги полімерів типу “плюронік” та унікальні властивості амінокислот: біосумісність, нетоксичність, хімічну і структурну різноманітність, просте вивільнення продуктів деградації. За таким підходом, використовуючи модифікацію аміногруп у складі макромолекул, можна регулювати колоїдно-хімічні властивості, а також ковалентно закріплювати ліки, маркери або біологічно-активні молекули у макромолекулі носія [4–6].

Структура одержаних кополіестеретерів передбачає їх біотолерантність, а також відсутність токсичного впливу продуктів їх розпаду на організм людини. Складна будова дисперсної фази дає їм змогу солюбілізувати в значних кількостях водонерозчинні сполуки різної природи, а також транспортувати їх до середовищ ліпофільної природи. Такий комплекс властивостей синтезованих поліестеретерів та їх водних дисперсій створює передумови для їх використання як дисперсних полімерних систем транспорту терапевтичних препаратів через парентеральне введення в організм.

Парантеральне введення передбачає, що частинки дисперсної фази контактуватимуть з плазмою крові і тому необхідно відслідкувати хоча б у першому наближенні їх взаємодію з водорозчинними білками плазми.

Мета роботи – дослідження впливу сорбції бичачого сироваткового альбуміну (BSA) на агрегативну стійкість частинок дисперсної фази кополіестеретерів та їх розміри.

Експериментальна частина. Реагенти та розчинники. Поліетиленгліколі (ПЕГ-400÷1200) (PEG), діпропіленгліколь (DPG) (Aldrich) сушили від слідів води методом азеотропної відгонки бензолу. N-стеароїлглутамінову кислоту (GluSt), N, N'-дициклогексилкарбодіімід (ДЦК), N, N'-диметиламінопіридин (ДМАП) (Aldrich) використовували без додаткового очищення. Використовували розчинники бензол, метиленхлорид марок “ХЧ”, очищені за методиками [7].

Кополіестеретери co-Glu(St)-co-DPG-co-PEG1000 синтезували згідно із методикою [8]. Кількість сорбованого альбуміну визначали кондуктометрично за зміною провідності розчину. Паралельно реєстрували середньочисельний розмір частинок, ζ -потенціал дисперсної фази та її мобільність. Для аналізу до 0,2 % міцелярних розчинів кополіестеру вносили визначену кількість води, концентрат бичачої сироватки (BS) та розчин KCl з концентрацією 4 ммоль/л так, щоб забезпечити задані концентрації компонентів у суміші.

Результати і обговорення. Для проведення досліджень щодо взаємодії білків з частинками дисперсної фази кополіестеретерів використовували кополіестеретери, структуру яких наведено на рис. 1.

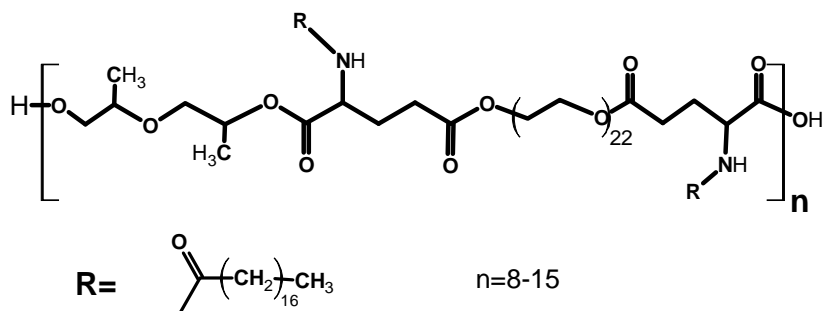


Рис. 1. Структура кополіестерів

Як модельний об'єкт використовували co-Glu(St)-co-DPG-co-PEG1000. Як модель водорозчинного білка використовували бичачий сироватковий альбумін. У табл. 1 наведено концентрації кожного з компонентів у розчинах, що тестувались, та відповідні результати досліджень. Аналіз результатів досліджень провідності розчину та значення ζ -потенціалу дає змогу зробити висновок, що відбувається значна сорбція альбуміну на поверхні частинок дисперсної фази кополіестеретерів. Зокрема на рис. 2 наведено залежність маси сорбованого альбуміну (на 1 г полімеру) від концентрації останнього в дисперсії (рис. 2, а) та частку сорбованого альбуміну від його початкової концентрації (рис. 2, б).

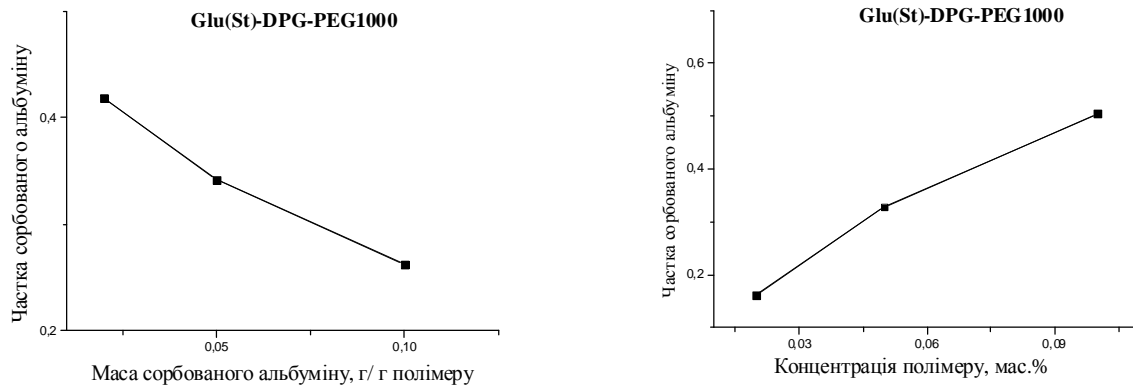


Рис. 2. Залежність сорбції альбуміну на поверхню частинок дисперсної фази полімеру co-Glu(St)-co-DPG-co-PEG1000 від концентрації частинок дисперсної фази. Початкова концентрація BSA у розчині 0,13 %

Таблиця 1

Умови проведення сорбції BSA на поверхні частинок дисперсної фази co-Glu(St)-co-DPG-co-PEG1000 та результати досліджень провідності розчину та значення ζ -потенціалу.

№	Концентрація			ζ -потенціал	Мобільність, $m^2/Vs \cdot 10^{-8}$	Провідність, mS/cm
	полімеру, %	BSA, %	KCl, mmol/l			
BS**	-	0,13	-	-17,5	-1,35	0,205
GluSt-DPG-PEG1000	0,02	0,13	-	-19,5	-1,55	0,190
	0,05	0,13	-	-35	-2,73	0,181
	0,1	0,13	-	-35	-2,71	0,185
	0,05	-	1	-36,5	-2,86	0,166
	0,05	0,13	1	(-0,4)-(0,6)	0,02	0,318
co-GluSt-co-DPG-co-PEG1000	0,02	0	1	-32,5	-2,55	0,161
	0,02	0,01	1	-33,2	-2,61	0,169
	0,02	0,05	1	-34,1	-2,67	0,226
	0,02	0,15	1	-30,9	-2,42	0,349
	0,02	0,3	1	-27,7	-2,17	0,583
	0,02	0,5	1	-26	-2,04	0,841
	0,1	0	1	-21,1	-1,65	0,169
	0,1	0,05	1	-31,3	-2,45	0,213
	0,1	0,15	1	-31,8	-2,49	0,356
	0,1	0,3	1	-29,5	-2,32	0,549
	0,1	0,5	1	-26,3	-2,06	0,840
	0,1	2	1	-18,1	-1,42	2,86

Як видно з даних табл. 1, ефективність сорбції альбуміну на поверхні частинок дисперсної фази полімеру co-Glu(St)-co-DPG-co-PEG1000 знижується із підвищенням концентрації полімеру. Так, за концентрації полімеру в дисперсії 0,02 % та початкової концентрації альбуміну 0,13 % його сорбція становить 0,42 г на 1 г полімеру в дисперсії (або 16,1 % сорбованого альбуміну від початкового). Із збільшенням концентрації дисперсної фази до 0,1 % відсоток сорбованого альбуміну зростає до 50,4 %, проте лише завдяки збільшенню фактичної площі поверхні дисперсної фази, оскільки ефективність сорбції становить лише 0,26 г сорбованого альбуміну на 1 г полімеру.

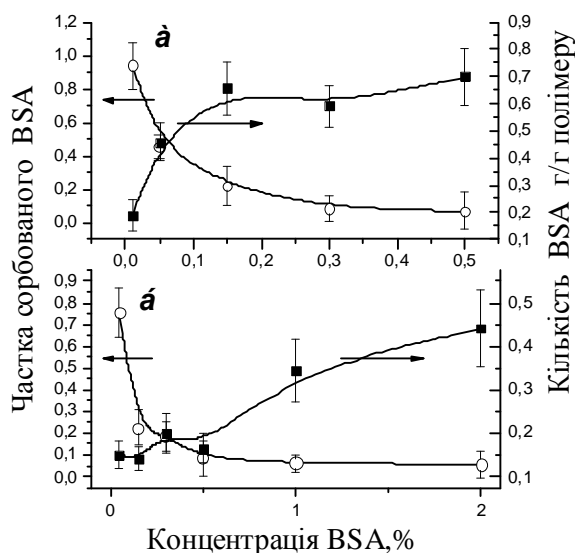


Рис. 3. Залежність частки сорбованого BSA (ліва ордината) та кількості сорбованого BSA на одиницю маси дисперсної фази кополіестеретеру co-Glu(St)-co-DPG-co-PEG1000 від початкової концентрації BSA у розчині за концентрації дисперсної фази а) 0,02 % та б) 0,1 %

На рис. 3 наведено залежності частки сорбованого альбуміну та кількості сорбованого альбуміну на одиницю маси полімеру від концентрації альбуміну в розчині. Дані рис. 3, а одержано за концентрації дисперсної фази у розчині 0,02 %, а дані рис. 3, б – за концентрації 0,1 %. Можна побачити, що характер кривих за обох концентрацій однаковий.

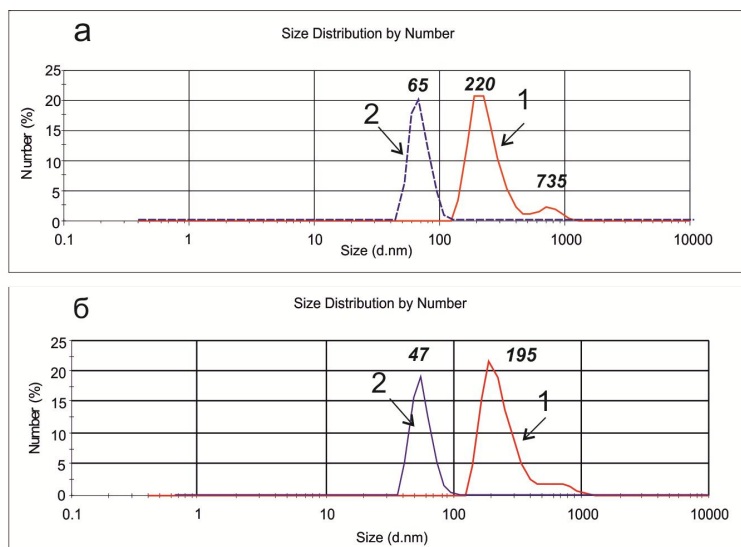


Рис. 4. Гістограми середньочисельного розподілу за розмірами частинок дисперсної фази кополіестеретеру co-Glu(St)-co-DPG-co-PEG1000 при їх концентрації в дисперсії а) 0,02 % та б) 0,1 % до сорбції BSA (криві 1) та після сорбції альбуміну (криві 2)

Збільшення концентрації BSA приводить до зменшення частки сорбованого альбуміну з переходом цієї кривої на плато, де частка сорбованого альбуміну перестає залежати від його початкової концентрації і, очевидно, визначається рівновагою між сорбованим альбуміном і альбуміном у розчині. Кількість сорбованого альбуміну на одиницю маси полімеру зростає із насиченням у випадку його концентрації 0,02 %. Насичення при концентрації кополіестеретеру 0,1 % при досягненні концентрації альбуміну в розчині 2 % ще не спостерігається.

Таку залежність зростання кількості сорбованого альбуміну на одиницю маси полімеру може пояснити аналіз зміни розподілу частинок дисперсної фази за розміром. На рис. 4 наведено гістограми середньочисельного розподілу частинок за розміром, отримані методом DLS за обох концентрацій. Гістограми з номером 1 відповідають розподілу частинок за відсутності альбуміну, з номером 2 – в присутності альбуміну. Так, крива 1 рис. 4, б демонструє, що за концентрації 0,02 % розподіл частинок дисперсної фази має мономодальний характер із середнім розміром частинок 195 нм.

За концентрації 0,1 % спостерігається незначне збільшення середнього розміру частинок до 220 нм, що несуттєво відрізняється від середнього розміру частинок при концентрації 0,02 %, але разом з тим в розподілі з'являється значна частка частинок із середнім розміром 735 нм. Отже, можна побачити, що розподіл частинок у водному середовищі, в якому є 1 ммоль/дм³ альбуміну, суттєво не відрізняється від аналогічних розподілів у воді, що були раніше описані [8].

Криві 2 на цих рисунках відображають розподіл частинок за розмірами після сорбції на їхній поверхні альбуміну. В обох випадках спостерігається суттєве зменшення середнього діаметра частинок дисперсної фази, а частинки великих розмірів повністю зникають з розподілу. Така поведінка дисперсної фази означає, що сорбований на поверхні альбумін виконає роль додаткового стабілізатора дисперсної фази, і зменшення розміру є результатом дроблення частинок на менші з закономірним збільшенням загальної площі поверхні частинок. До того моменту, поки збільшення концентрації альбуміну приводить до зменшення лінійних розмірів частинок, спостерігається зростання кількості сорбованого альбуміну на одиницю маси дисперсної фази. Крива на рис. 2, а при концентрації 0,02 % вийшла на плато із значенням 0,7 г альбуміну на грам полімеру і середньому розмірі частинок 45÷50 нм. Можна вважати, що це граничне значення сорбції альбуміну частинками дисперсної фази кополіестеретеру ко-Glu(St)-ко-DPG-ко-PEG1000. Подальше збільшення концентрації альбуміну в розчині більше не приводить до зменшення розміру дисперсної фази, і кількість сорбованого альбуміну визначається рівновагою до його кількості в розчині. Це підтверджується і тим фактом, що при концентрації полімеру 0,1 % і альбуміну 2 % розмір частинок в результаті подрібнення практично досягає того самого значення (60÷70 нм), що і при концентрації полімеру 0,02 %.

Висновки. Проведені дослідження підтверджують сорбцію бичачого сироваткового альбуміну (BSA) частинками дисперсної фази кополіестеретерів. Сорбція альбуміну не приводить до втрати стабільності системи, а, навпаки, спричиняє зменшення середніх розмірів частинок дисперсної фази, що може свідчити про підвищення агрегаційної стійкості системи загалом.

1. Romberg B., Metselaar J., Baranyi L., Snel C., Bungler R., Hennink W., Szebeni J., Storm G. *Poly(aminoacids): Promising enzymatically degradable stealth coatings for liposomes* // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2007. – V. 331, p. 186–189. 2. Kohn J. *Design, synthesis, and possible applications of pseudo-poly(amino acids)* // *Trends Polym. Sci.* – 1993. – V. 1, p. 206–212. 3. Bourke S. L., Kohn J. *Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: polycarbonates, polyarylates and copolymers with poly(ethylene glycol)* // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2003. – V. 55. –

p. 447– 466. 4. C. Y. Won, C. C. Chu, J. D. Lee Novel biodegradable copolymers containing pendant amine functional groups based on aspartic acid and poly(ethylene glycol) // *Polymer* – 1998. – V. 39, № 25, p. 6677–6681. 5. Kensuke Osada, R. James Christie and Kazunori Kataoka Polymeric micelles from poly(ethylene glycol)–poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery. // *Japan J. R. Soc. Interface* – 2009. – № 6, – p. 325–339. 6. Sergiy Varvarenko, Ihor Tarnavchuk, Andriy Voronov, Nataliia Fihurka, Iryna Dron, Nataliia Nosova, Roman Taras, Volodymyr Samaryk, Stanislav Voronov. Synthesis and colloidal properties of polyesters based on glutamic acids and glycols of different nature // *Chemistry and Chemical Technology*. – 2013. – Vol.7, N.2. – P.164–168. 7. Вайсберг А., Проскауэр Э., Риддис Д. и др. *Органические растворители*. – М.: Иностранная литература. – 1976. – 541 с. 8. С. М. Варваренко, Н. В. Фігурка, В. Я. Самарик, А. С. Воронов, І. Т. Тарнавчик, Н. Г. Носова, І. А. Дронь, Р. С. Тарас, С. А. Воронов. Синтез та поверхнево-активні властивості нових поліестерів – псевдополіамінокислот на основі природних двоосновних α -амінокислот // *Доповіді НАН України*. – 2013. – № 5. – С.131–139.