

УДК 547.962

ВКЛЮЧЕНИЕ БЕЛКОВ В ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ ИЗ ДЕКСТРАН СУЛЬФАТА, ПРОТАМИНА И МЕЛАМИН ФОРМАЛЬДЕГИДА

Н.Г. Балабушевич*, Г.Б. Сухоруков*, Н.И. Ларионова

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: balab@enzyme.chem.msu.ru)

Микрокапсулы получены ступенчатой адсорбцией декстран сульфата и протамина на меламина формальдегидных ядрах с последующим растворением ядер при pH 1,7. Исследовано включение белков с различными общим зарядом и молекулярной массой в полученные полиэлектролитные микрокапсулы. Показано, что независимо от заряда белки способны быстро проходить через мембрану и накапливаться внутри микрокапсул, включаясь в pH-чувствительную, слабо сшитую гелеобразную структуру. Количество белка в микрокапсулах уменьшалось с увеличением молекулярной массы белка от $58,6 \times 10^8$ молекул на микрокапсулу для инсулина до $2,2 \times 10^8$ – для пероксидазы. Продемонстрировано, что удерживание белков матрицей, находящейся внутри микрокапсул, увеличивалось с возрастанием их молекулярной массы и может регулироваться путем биodeградации компонентов микрокапсулы. Полиэлектролитные микрокапсулы могут найти применение для концентрирования и фракционирования белков, а также для создания систем доставки белковых лекарственных средств.

Включение белков в полимерные сферы и капсулы представляет большой научный и практический интерес [1]. Внимание заслуживают публикации по капсулированию белков в полиэлектролитные частицы. Ступенчатое нанесение противоположно заряженных полиэлектролитов на матрицу, в качестве которой могут выступать твердые частицы различного размера, позволяет проводить иммобилизацию в мягких условиях и в водных растворах [2]. В частности, микрокапсулирование белков может быть осуществлено последовательным нанесением нескольких слоев положительно заряженного полистиролсульфоната и отрицательно заряженного полиаллиламина на агрегаты, полученные при высаливании белков [3]. Следует заметить, что не все белки высаливаются и, как правило, проведение этого процесса требует подбора индивидуальных условий для каждого протеина. Полученные микроагрегаты неоднородны по форме и размерам, но имеют высокую емкость по белку, зависящую от количества слоев полиэлектролитов: 70 и 30 мас.% для 3- и 11-слойных частиц соответственно [3]. При изменении pH среды происходит процесс высвобождения белка из микроагрегатов, скорость которого определяется значением pH и количеством нанесенных слоев. Частицы с такими свойствами могут быть использованы для контролируемой доставки белков [4].

Альтернативным методом капсулирования белков является их включение в полые полиэлектролитные микрокапсулы [5, 6]. Такие микрокапсулы могут быть получены ступенчатым нанесением определенного числа слоев от 3 до 13 противоположно заряженных полиэлектролитов на твердые меламина формальдегидные (МФ) ядра [7]. Далее МФ-ядра растворяют в сильно кислых растворах (pH 1,0). Продукты, образующиеся при кислотном гидролизе меламина формальдегида, выходят через полиэлектролитную оболочку частиц. В результате получают полые микрокапсулы строго определенного размера, имеющие тонкую полиэлектролитную оболочку и полую внутреннюю сферу. Емкость таких капсул по белку небольшая. Так при включении химотрипсина (мол. масса 25 кД) из раствора 5 мг/мл в каждую 8-слойную микрокапсулу из полистиролсульфоната и полиаллиламина входит около 10^7 молекул белка [5]. При этом 90% белка сорбируется в стенках микрокапсул. При использовании 46%-го раствора этанола, содержащего 10 мг/мл уреазы (мол. масса 482 кД), в микрокапсулу входит $1,7 \times 10^5$ молекул белка [6]. Полые микрокапсулы из сильных синтетических полиэлектролитов с включенными ферментами могут найти применение в качестве биокатализаторов [5].

Можно предположить, что использование природных и биodeградируемых полиэлектролитов позволит создать

* Макс-Планк Институт коллоидов и поверхностей раздела фаз, Потсдам/Голм, 14476, Германия.

полые капсулы и частицы с новыми свойствами и расширить тем самым область их потенциального применения.

Цель данной работы состояла в получении микрокапсул на основе МФ-частиц с использованием природных полиэлектролитов и исследовании их взаимодействия с разными белками.

Методы исследования

В работе использованы декстран сульфат (500 кД), протамин (5 кД), инсулин быка, трипсин (ЕС 3.4.21.4), пероксидаза хрена (ЕС 1.11.1.7) и пероксидаза, меченная флюоресцеин изотиоцианатом (“Sigma”, США); меламин формальдегидные частицы (“Microparticles GmbH”, Германия).

Получение микрокапсул. Капсулы получали на МФ-частицах с диаметром $5,12 \pm 0,15$ мкм последовательной адсорбцией декстран сульфата (5 мг/мл) и протамин (5 мг/мл) в 0,02 NaCl (рН 5,0). Нанесение каждого слоя полиэлектролитов проводили в течение 10 мин, затем частицы центрифугировали и дважды промывали в 0,02 NaCl (рН 5,0). После нанесения 4 слоев декстран сульфата и 4 слоев протамин МФ-частицы растворяли в HCl (рН 1,7). Суспензию капсул с концентрацией $(7 \pm 3) \times 10^7$ частиц/мл хранили при рН 3,0 и $T = 5^\circ$.

Характеристика микрокапсул. Морфологию микрокапсул изучали с помощью конфокальной лазерной микроскопии. Концентрацию микрокапсул определяли путем разбавления раствора и микроскопического подсчета количества частиц в фиксированном объеме.

Включение белков в микрокапсулы. К 0,05 мл суспензии микрокапсул добавляли 0,95 мл раствора белка (4 мг/мл) в универсальном буфере (0,02 M H_3PO_4 , 0,02 M CH_3COOH , 0,02 M H_3BO_3 + 0,1 M NaOH, с рН 8,0). Смесь выдерживали в течение 1 ч при 20° , центрифугировали (2000 об/мин, 2 мин), супернатант отделяли. Капсулы, содержащие белок, и супернатант анализировали.

Высвобождение белка из капсул. К капсулам с включенным белком ($0,35 \times 10^7$ частиц) добавляли 1 мл универсального буфера. Через 10, 30 мин, 1, 3 и 7 ч отбирали аликвоты суспензии, центрифугировали и в супернатанте определяли белок (см. ниже). Количество высвободившегося белка относили к количеству закапсулированного белка.

Определение концентрации белка. Содержание белка в микрокапсулах оценивали по разности концентраций белка (определенных методом Лоури) в растворе, использованном для капсулирования, и в супернатанте.

Количество молекул белка в единичной микрокапсуле рассчитывали по формуле: $L = [c]N_A/M_w[N]$, где $[c]$ – концентрация белка в суспензии капсул (мг/мл), N_A – константа Авогадро, M_w – молекулярная масса белка (г/моль), $[N]$ – концентрация микрокапсул в суспензии (мл). Концентрацию белка в капсуле определяли

по формуле: $C_k = 3L \cdot M_w / 4N_A \pi r^3$, где r – радиус капсулы, равный 5×10^{-6} м.

Результаты и их обсуждение

Полиэлектролитные микрокапсулы были получены по модифицированной нами методике [7] ступенчатой адсорбцией противоположно заряженных декстран сульфата и протамин на твердых МФ-частицах. Далее МФ-ядра растворяли в выбранных нами мягких условиях при рН 1,7. Меламин формальдегидная смола, входящая в состав ядер, представляет собой сложное соединение, содержащее эфирные связи, первичные, вторичные и третичные аминогруппы, метиленовые мостики, гидроксильные группы [8]. Как мы установили ранее [9], при рН 1,7 гидролиз C–N–C-групп в ядрах идет медленно, и вновь образующиеся положительно заряженные аминогруппы начинают взаимодействовать с сульфогруппами декстран сульфата, входящего в оболочку микрокапсул. Это вызывает перераспределение полиэлектролитов из оболочки с образованием внутри капсул однородной, слабо сшитой гелеобразной структуры.

Приготовленные полиэлектролитные микрокапсулы были однородны по размеру (рис. 1, а); их диаметр, зависящий от рН среды ($8,0 \pm 0,2$ мкм при рН 3–5, $9–10$ мкм при рН 7–8), был больше диаметра исходных МФ-частиц ($5,12 \pm 0,15$ мкм). Микрокапсулы оказались стабильными в течение всего срока наблюдения за ними (9 мес).

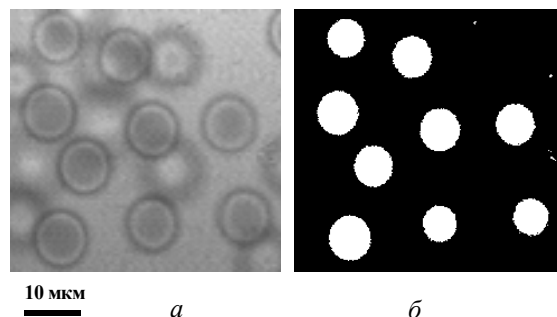


Рис. 1. Микрофотографии полиэлектролитных капсул без включения (а) и с включением пероксидазы, меченой флюоресцеин изотиоцианатом (б)

С помощью конфокальной микроскопии проведено исследование проницаемости микрокапсул. Низкомолекулярные флюоресцентные красители: отрицательно заряженный 6-карбоксийфлюоресцеин (376 Д) и положительно заряженный родамин 6G (479 Д), как и высокомолекулярная пероксидаза (44 кД, рН 8,8), меченная флюоресцеин изотиоцианатом (рис. 1, б) в течение нескольких секунд проникали через оболочку, равномерно распределялись внутри микрокапсул и удерживались в них при рН 8. Включение разноименно заряженных веществ с различной молекулярной массой, как и изменение диаметра капсул под действием рН свидетельствовали о наличии в

Включения белков с различными молекулярными массами и изоэлектрическими точками в полиэлектролитные микрокапсулы из декстран сульфата, протамина и меламина формальдегида (рН 8,0)

Белок	Мол. масса, кД	pI	Количество молекул в микрокапсуле, $\pm 40\%$
Инсулин	6,5	5,5	$58,6 \cdot 10^8$
Трипсин	24	10,5	$6,1 \cdot 10^8$
Пероксидаза	44	8,8	$2,2 \cdot 10^8$

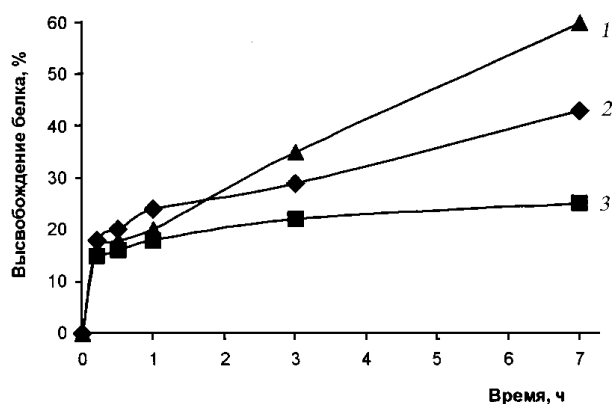


Рис. 2. Кинетические кривые высвобождения белков из полиэлектролитных капсул при рН 8,0: 1 – трипсин, 2 – инсулин, 3 – пероксидаза

микрокапсулах рН-чувствительной однородной гелеобразной сетки, имеющей отрицательные и положительно заряженные группы и обладающей крупными порами.

С целью выявления закономерностей процесса включения белков в полиэлектролитные микрокапсулы из декстран сульфата, протамина и меламина формальдегида изучено влияние величины молекулярной массы и общего заряда белков на эффективность этого процесса. Результаты этого исследования представлены в таблице. Для этого при рН 8,0 капсулы помещали в растворы белков с концентрацией, достаточной для полного насыщения капсул. В этих условиях инсулин имел отрицательный заряд, а трипсин и пероксидаза – положительный. Как видно из таблицы, независимо от заряда белки входили в частицы. Коли-

чество молекул белка в микрокапсуле на один-два порядка превышало аналогичную величину для полых микрокапсул из сильных полиэлектролитов (10^7 молекул химотрипсина на частицу [5]), и уменьшалось с увеличением молекулярной массы белка. Следует заметить, что расчетная концентрация белка внутри капсулы оказалась во много раз больше концентрации в исходном растворе (4 мг/мл) и составляла 121, 46 и 31($\pm 40\%$) мг/мл соответственно для инсулина, трипсина и пероксидазы.

Далее нами была исследована прочность удерживания белков матрицей внутри микрокапсул. Белки высвобождались из микрокапсул при смене раствора, из которого они сорбировались, на буфер с тем же значением рН. Как видно из рис. 2, для инсулина (6,5 кД) и пероксидазы (44 кД) скорость выхода белка из капсул тем меньше, чем больше молекулярная масса. Для трипсина (24 кД) данная закономерность наблюдалась в течение 1 ч нахождения капсул в буфере, а затем скорость его высвобождения начинала превышать аналогичную величину для инсулина. Поскольку трипсин является протеиназой с рН-оптимумом действия, близким к 7–8, а входящий в состав капсул протамин – его прекрасным белковым субстратом [10], ферментативное разрушение одного из компонентов матрицы полиэлектролитных микрокапсул приводит к увеличению степени высвобождения белка в этом случае.

Выявленные закономерности поведения микрокапсул подобны свойствам сферических декстрановых гелей, поперечно сшитых эписхлоргидрином [11]. В зависимости от степени сшивки такие сефадексы различаются по степени набухания и размерам пор и широко используются для разделения белков по молекулярным массам.

Таким образом, полиэлектролитные капсулы на основе декстран сульфата, протамина и меламина формальдегида содержат гелеобразное содержимое, обладают порами достаточно большого размера и способны как к включению, так и к высвобождению белков. Можно предположить, что исследованные нами капсулы благодаря своим уникальным свойствам представляют собой исключительный интерес и могут найти применение для концентрирования и фракционирования белков, а также создания систем контролируемого высвобождения белковых лекарственных средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы С. Ковалевской фонда А. Гумбольдта Министерства образования и исследований Германии, а также Министерства промышленности, науки и технологий РФ в рамках российско-германского сотрудничества.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Arshady R.* Microspheres. Microcapsules & Liposomes. London. 1999. V. 1, 2.
2. *Sukhorukov G.B., Donath E., Lichtenfeld H. et al.* // Colloids Surfaces, A. 1998. **137**. P. 253.

3. *Balabushevich N.G., Sukhorukov G.B., Moroz N.A. et al.* // *Biotech. Bioeng.* 2001. **76**. P. 207.
4. Володькин Д.В., Балабушевич Н.Г., Сухоруков Г.В., Ларионова Н.И. // *Биохимия*. 2003 (в печати).
5. *Tiourina O.P., Antipov A.A., Sukhorukov G.B. et al.* // *Macromol. Biosci.* 2001. **1**. P. 209.
6. *Lvov Y., Antipov A., Mamedov A. et al.* // *Nano Letters*. 2001. **1**. N 3. P. 125.
7. *Donath E., Sukhorukov G.B., Caruso F. et al.* // *Angew. Chem.* 1998. **37**. P. 2201.
8. *Gao C., Moya S., Lichtenfeld H. et al.* // *Macromol. Mater. Eng.* 2001. **286**. P. 355.
9. *Balabushevich N.G., Tiourina O.P., Larionova N.I., Sukhorukov G.B.* // *Biomacromolecules*. 2003 (in press).
10. *Веремеенко К.Н.* Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. Киев, 1971.
11. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. М., 1991.

Поступила в редакцию 25.10.02