

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Применение метода Бредфорда для изучения адсорбции белков на
поверхности наноструктурированных частиц ватерита**

АВТОРЕФЕРАТ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ БАКАЛАВРА

студентки 4 курса физического факультета 434 группы
направления 03.03.02 «Физика»
профиль «Физика живых систем»
физического факультета
Алебастровой Альбины Анатольевны

Научный руководитель

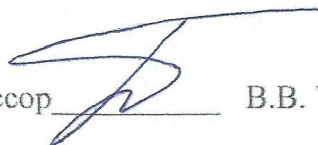
Доктор химических наук, профессор



Д.А.Горин

Заведующий кафедрой

Доктор физико-математических наук, профессор



В.В. Тучин

Саратов, 2017 г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы исследования. Одним из стремительно развивающихся направлений в исследовании и применении нано- и микроструктур является включение высокомолекулярных биологически активных веществ в эти структуры. Особенно это актуально при поиске систем направленной доставки и контролируемого высвобождения лекарственных препаратов.

Основные методы включения биологически активных веществ в микрообъекты фиксированного размера и формы (сферы, капсулы) основываются на физико-химических процессах преципитации полимеризации, коацервации и др.

Однако данные методы предполагают использование органических растворителей, поверхностно-активных соединений, а также поперечно-сшивающих агентов, что может повлечь снижение биологической активности иммобилизованного препарата. В связи с этим, необходима разработка новых методов иммобилизации биологически активных веществ в микрообъекты в мягких условиях.

Данная работа посвящена разработке новых подходов к включению биологически активных веществ (на примере белков) в микрочастицы карбоната кальция с применением методов адсорбции и со-осаждения. Эти процессы осуществляются в водных растворах, которые являются естественной средой для существования биологически активных веществ.

Полученные экспериментальные данные показывают, что система «ватерит-белок» обладает высокой загрузочной емкостью и эффективностью загрузки. Преимущество такой системы заключается в том, что взаимодействие белков с частицами-переносчиками открывает широкие возможности для регулирования каталитической активности и стабильности иммобилизованных белков.

Цель выпускной квалификационной работы: изучить адсорбционные свойства частиц карбоната кальция с помощью метода Бредфорда на модели «ватерит-белок».

Задачи выпускной квалификационной работы:

1. Установить закономерности между условиями синтеза частиц ватерита и их характеристиками.

2. Оценить эффективность загрузки и загрузочную емкость бычьего сывороточного альбумина (БСА) в полученные пористые частицы ватерита двумя способами: адсорбцией на поверхности частиц и совместным со-осаждением в процессе формирования частиц с помощью метода Бредфорд и спектрофотометрии.

3. Получение контейнеров на основе белка, методом ультразвуковой сшивки молекул, иммобилизованных в неорганической матрице, с последующим ее растворением.

Научная новизна исследования состоит в следующем:

- были установлены соответствия между условиями получения частиц карбоната кальция в форме ватерита и их размерами и морфологией;

- проведенные 3 типа синтезов позволяют получать частицы ватерита сферической формы размерами от 0.5 до 3 мкм в зависимости от поставленной прикладной задачи.

- в экспериментах по адсорбции и со-осаждению молекул белка и частиц ватерита доказана их высокая эффективность загрузки и загрузочная емкость. На основе таких частиц возможно создавать системы-переносчики для транспортировки различных биологически активных веществ.

- изучена возможность получения контейнеров на основе белка, методом ультразвуковой сшивки молекул белка иммобилизованных в неорганической матрице, с последующим ее удалением. Такие контейнеры могут иметь практическое значение при адресной доставке лекарственных веществ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выявлены закономерности между условиями синтеза частиц ватерита и их параметрами. Оценено влияние различного времени синтеза, воздействия ультразвука и среды.

В ходе работы были получены биodeградируемые и биосовместимые частицы карбоната кальция с контролируемым размером в диапазоне от 500 ± 30 нм до 3 ± 0.3 мкм.

Показана возможность получение композитного материала на основе частиц ватерита и бычьего сывороточного альбумина двумя различными методами:

1) методом адсорбции на поверхность заранее синтезированных частиц ватерита;

2) совместным осаждением молекулы бычьего сывороточного альбумина и солей хлорида кальция и карбоната натрия в процессе формирования ватерита.

2. Методом Бредфорд определено количество адсорбированного на поверхности и встроенного в структуру частицы белка. Оценена эффективность загрузки и эффективность адсорбции в зависимости от времени адсорбции с соотношения белок/ватерит. Наибольшая эффективность загрузки белка составила 70-80%. При оптимальных условиях синтеза процент включение БСА в частицы ватерита составил 1 -2 вес.%.

3. Впервые показана принципиальная возможность получения контейнеров на основе белка, методом ультразвуковой сшивки молекул белка иммобилизованных в неорганической матрице, с последующим ее растворением.

Апробация исследования

1. Алебастрова А.А. "Система – переносчик: ватерит – белок». Саратов, ИЦ «Наука», 2016. – 291 с. С.46-51.
2. SARATOV FALL MEETING 2016 The XX International School for Junior Scientists, Students and the IV Symposium on Optics and Biophotonics, стендовый доклад «Protein-vaterite system: loading efficiency versus loading capacity».
3. Всероссийская школа-семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине», «Система-переносчик: ватерит-белок» Изд-во Саратовский источник, 2016. – с.227, С.43.
4. Алебастрова А.А. XXIX-ой Международная научная конференция «Потенциал современной науки», «Использование адсорбционных свойств ватерита при транспортировке лекарств», Липецк, 2016. – 68 с. С.22-24

Структура работы

Выпускная квалификационная работа состоит из введения, трех глав, разделенных на параграфы, заключения, списка 40 используемых источников. Общий объем работы составляет 42 страниц, 18 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении сформулирована основная цель и задачи выпускной квалификационной работы. Изучение свойств частиц ватерита представляет особый интерес, поскольку к настоящему моменту не существует единого мнения не только о механизме образования, но и о кристаллической структуре ватерита.

В первой главе представлен аналитический обзор литературы, посвященный методам получения частиц карбоната кальция и их основным характеристикам. По литературным данным изучены представления о росте кристаллов ватерита, оценены влияния различных сред на ход образования

частиц. Так же описывается принцип и особенности аналитического метода Бредфорд, используемого для количественного анализа белка.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов, использованных в работе. Проведены три типа синтеза по получения частиц ватерита. Изучено влияние времени перемешивания, среды и ультразвука на формирование микрочастиц.

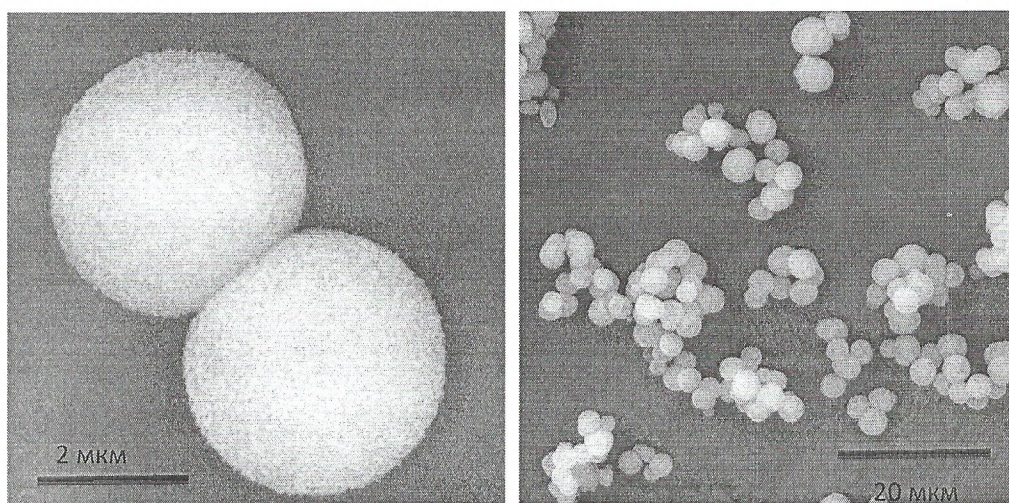


Рис. 1 Частицы, полученные при перемешивании на магнитной мешалке водных растворов солей.

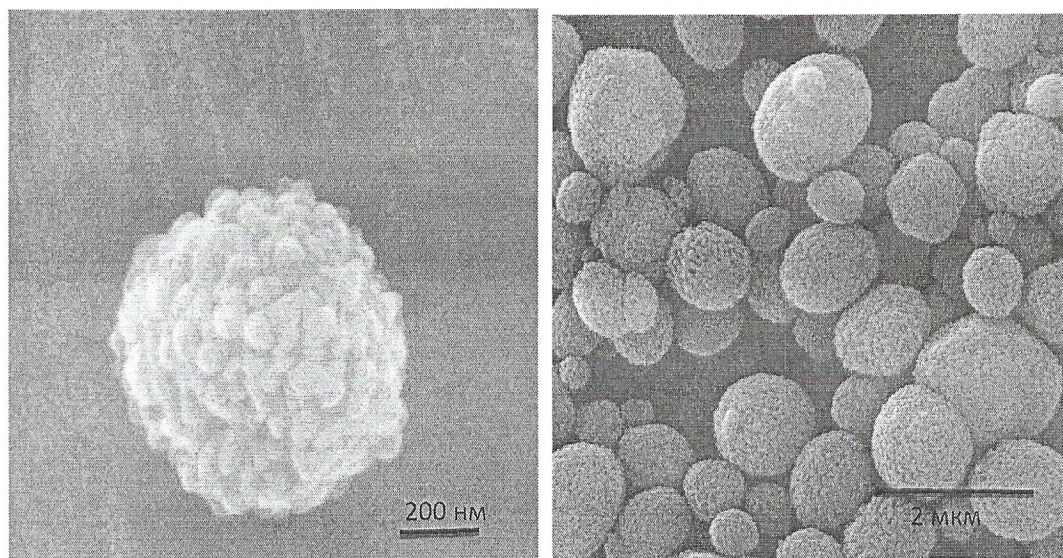


Рис. 2 Синтез при перемешивании с помощью УЗ водных растворов солей.

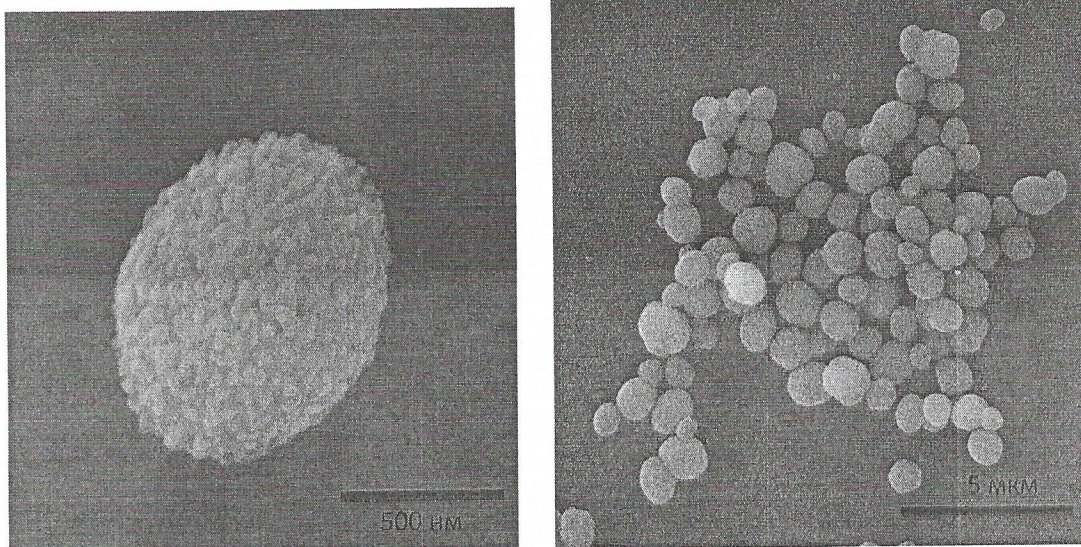
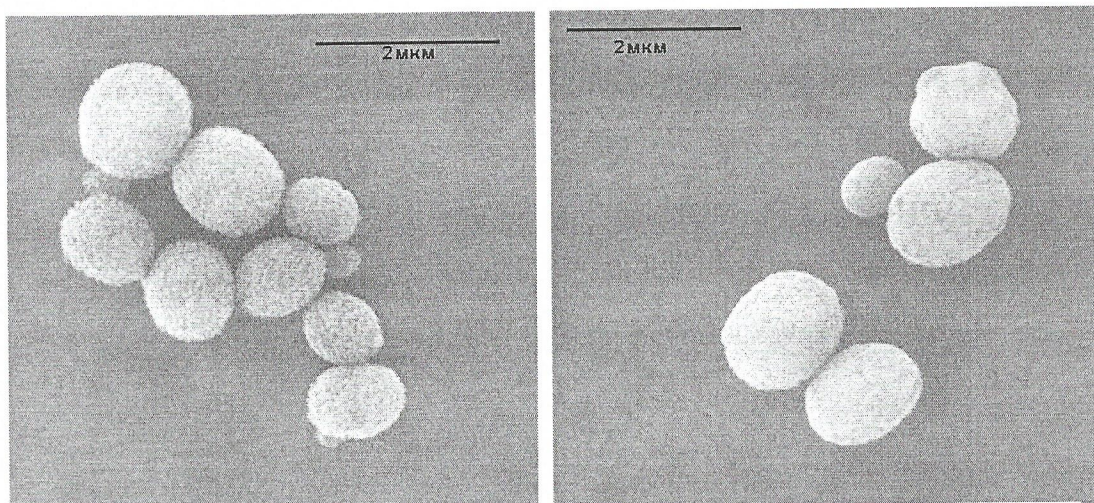


Рис. 3 Синтез с использованием среды ЭГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В третьей главе изучалась инкапсуляция БСА в микрочастицы карбоната кальция методами адсорбции и со-осаждения. Проводилось исследование с помощью метода Бредфорд и обсуждение полученных результатов. Рассчитаны величины загрузочной емкости и эффективности загрузки. Со-осаждение и адсорбция белка на поверхности частиц привело к экспериментам по получению микрокапсул, образующихся при удалении самой частицы.



а Рис.4 Частицы до (а) и после (б) адсорбции б

Для адсорбции 10 мг высушенных частиц ватерита инкубировали с 2 мл водного раствора БСА (1,5 – 200 мг/мл) в течение 60 мин на шейкере (800 –

1000 об/мин) для лучшего перемешивания. Через 10, 30 и 60 минут образцы центрифугировались и отбирался супернатант для измерения оптической плотности методом Бредфорд.

Метод соосаждения применялся для включения в частицы молекул БСА. На магнитной мешалке к 0,3 мл воды добавлялось различное количество БСА (5– 40 мг), затем приливали 1,7 мл 1 М раствора Na_2CO_3 , 2 мл 0,33 М раствора CaCl_2 .

Смесь перемешивали в течение 3 часов, в результате чего образовывались пористые частицы карбоната кальция, со-осажденные с БСА. Полученный в ходе такого эксперимента частицы имели размер 800 ± 30 нм. После завершения синтеза, образовавшиеся частицы промывались 2 раза водой и один раз этанолом и сушились при температуре 50-60 °C . около 2 часов.

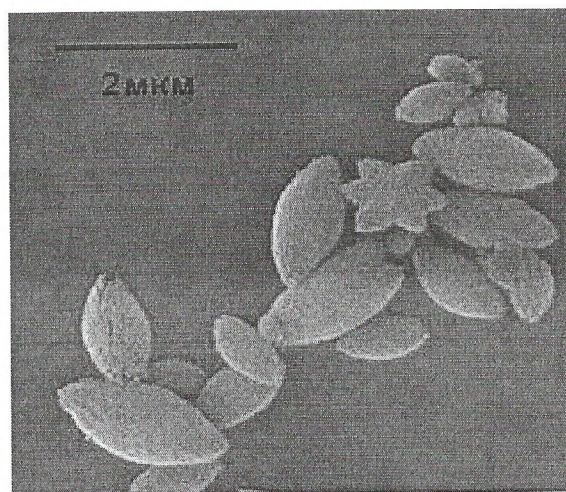


Рис. 5 Частицы карбоната кальция с БСА в структуре.

Метод Бредфорда применялся следующим образом: в случае адсорбции белка на поверхности частиц карбоната кальция суспензия из частиц с осевшим белком центрифугировалась, отбирался супернатант, содержащий не адсорбированный белок. Затем, в кювету спектрофотометра помещалось 5 мкл супернатанта и 250 мкл реагента Бредфорд. Параллельно раскапывались

образцы известной концентрации белка и к ним тоже добавлялся реагент, чтобы построить по этим измерениям калибровочную кривую.

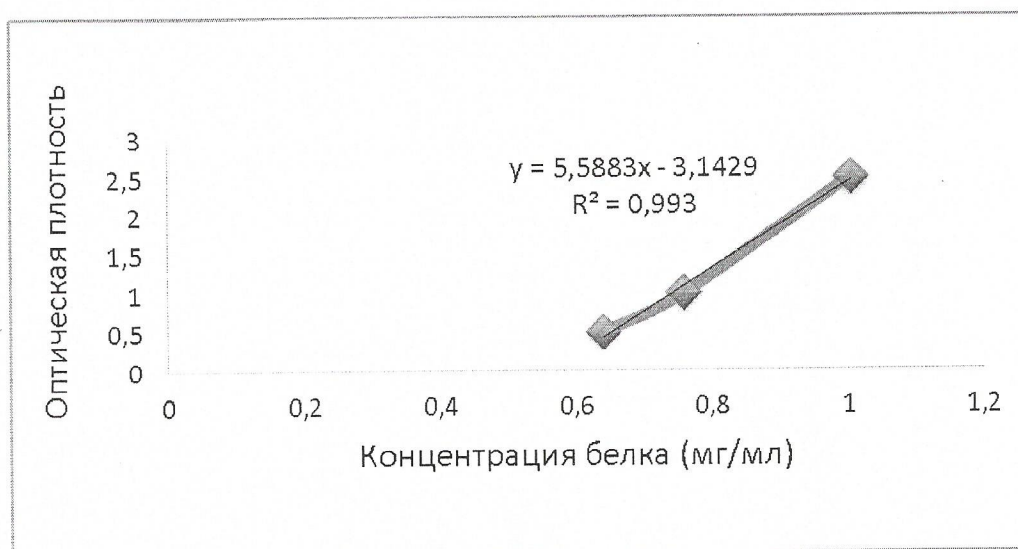


Рис.6 Пример одной из калибровочных кривых.

После измерений оптической плотности растворов рассчитывалось содержание в них белка в граммах. Затем считалась разница Δm между полученным значением массы и начальной массой белка, использовавшегося при адсорбции из раствора. Δm считалась для супернатантов, отобранных на 10, 30 и 60 минутах адсорбции, чтобы построить график изменения адсорбции во времени. Таким образом, количество адсорбированного на поверхность частиц белка было определено вычитанием из оптической плотности раствора белка оптической плотности раствора супернатанта на такой же длине волны после адсорбции.

В случае со-осаждения водного раствора белка и растворов солей, после самого синтеза образец центрифугировался, отбирался супернатант, оптическую плотность которого не удалось померить, возможно, из-за содержания ЭГ. В связи с этим, частицы промывались водой и этанолом, после чего к ним добавлялась ЕДТА 20ммоль 1 мл, и, дождавшись полного растворения частиц карбоната кальция, измерялась оптическая плотность полученного раствора методом Бредфорда с помощью спектрофотометра.

Спектры поглощения суспензий капсул, содержащих красители, и растворов в ультрафиолетовой/видимой областях спектра снимали с помощью двулучевого сканирующего спектрофотометра Lambda-650 (Perkin-Elmer, Германия) с диапазоном длин волн 190 - 900 нм.

После определения концентраций во всех растворах была рассчитана эффективность загрузки и загрузочная емкость. Для этого были рассчитаны отношения массы белка, адсорбированного частицами, к начальной массе белка в растворе и той же величины к массе частиц.

При со-осаждении загрузочная емкость составила 12% и 20%, а эффективность загрузки - 26% и 29% в зависимости от количества со-осажденного белка (5 мг и 40 мг).

Для адсорбции были построены графики зависимости этих величин от времени и концентраций. Максимальная загрузочная емкость достигается после 80 минут адсорбции для концентрации белка 20 мг-мл и ее значение в два раза больше начального значения загрузочной емкости на 1ой минуте.

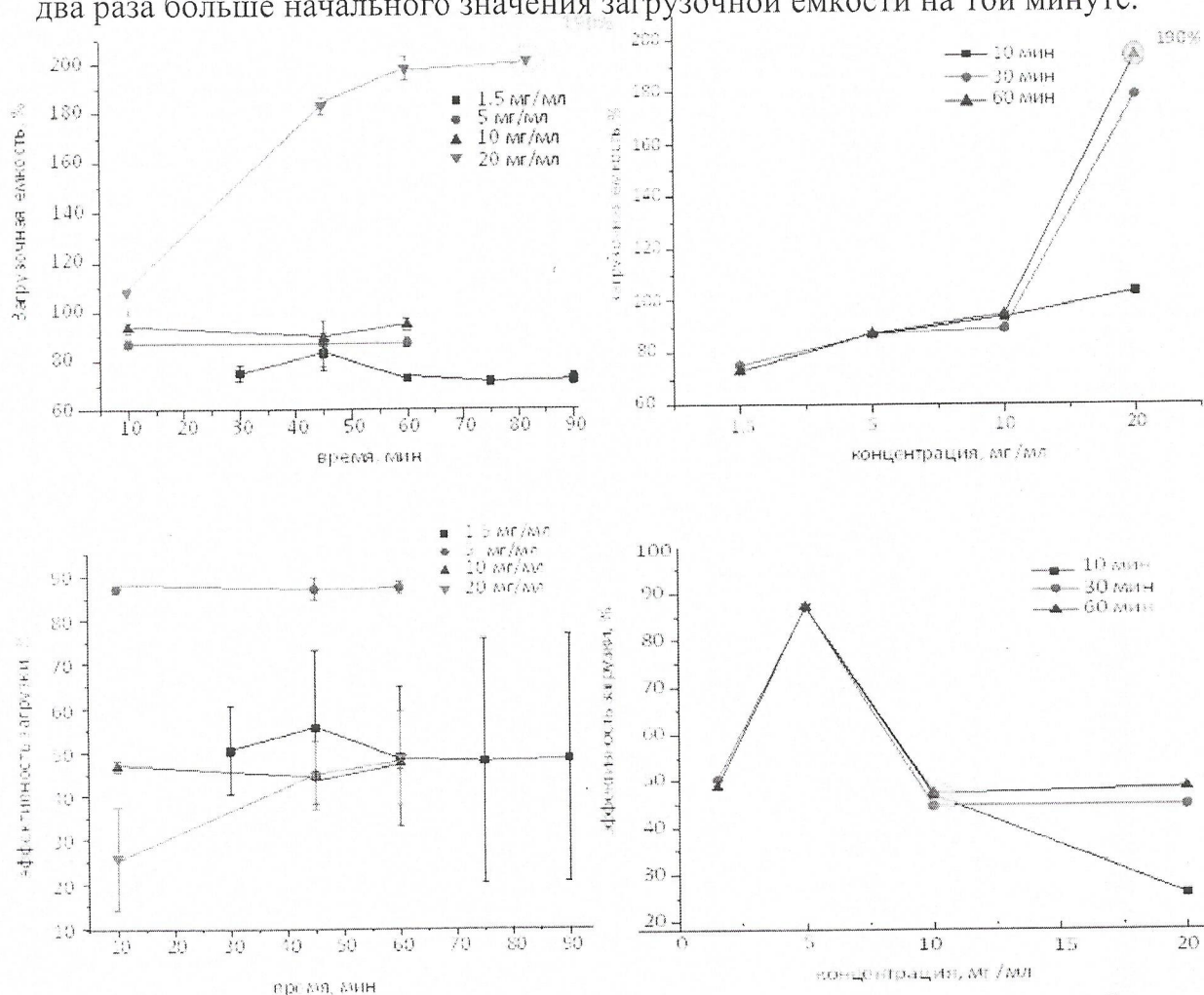


Рис.7 Эффективность загрузки и загрузочная емкость для частиц, адсорбировавших белок, в зависимости от времени и концентрации белка.

Со-осаждение и адсорбция белка на поверхности частиц карбоната кальция, послужило началом получения микрокапсул, образующихся при удалении самой частицы (ядра).

Для осуществления такого метода в качестве каркасной матрицы использовались частицы ватерита, полученные со-осаждением растворов солей и водного раствора белка, с последующей адсорбцией белка из раствора на этих полученных частицах (концентрация белка 20 мг/мл). Через час инкубирования, суспензия центрифугировалась и удалялся супернатант. Подготовленные частицы (10мг) помещались в пробирку, куда добавлялось 5 мл воды. Эту пробирку с суспензией размещали в более крупной кювете, заполненной водой со льдом. Затем щуп УЗ помещался в суспензию и на максимальной мощности производилось воздействие ультразвуком в течение 5 минут. По истечению этого времени, отмечалось сильное нагревание, так как весь лед переходил в воду. В результате воздействия ультразвука высокой интенсивности происходило образование радикалов $\text{OH}\cdot$ и $\text{H}\cdot$, которые затем формируют H_2 , H_2O_2 и в присутствии O_2 , супероксид ($\text{HO}_2\cdot$). Таким образом, возникновение $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 , $\text{HO}_2\cdot$ приводит к формированию дисульфидных связей между молекулами БСА, находящихся в порах микрочастиц карбоната кальция.

Для образования таких частиц с использованием матрицы карбоната кальция необходимо выполнение двух основных условий. Во-первых, условия, при которых происходит удаление самой матрицы не должны приводить к растворению образовавшейся белковой оболочки. Во-вторых, продукты разрушения частицы должны свободно проникать через оболочку после полного растворения.

Размер микросфер в растворе сравним с размером исходной матрицы - CaCO_3 микрочастиц. Данный факт подтверждается наблюдениями за микрочастицами в процессе удаления карбонатной матрицы.

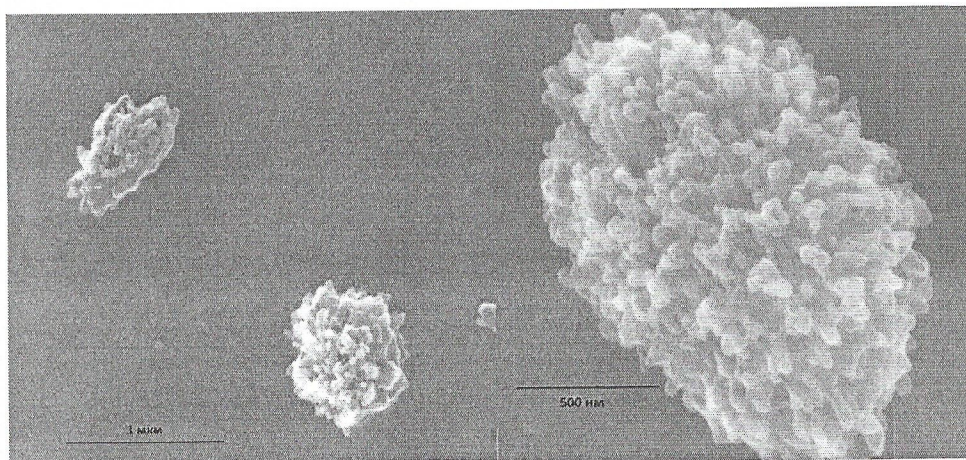


Рис.8 Результаты по сшивке
молекул белка на матрице частиц
ватерита

Растворение ядер и получение «белковых» частиц, осуществляли путем растворения ядер CaCO_3 при добавлении тринатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). ЭДТА такой концентрации позволяет мягко растворить частицы карбоната кальция. В результате происходит удаление кальция из капсулы. 20мМ водный раствор ЭДТА с pH 7.5 приливали к суспензии капсул и перемешивали в течение часа, затем суспензию три раза промывали водой (осаждение центрифугированием, 200 g, 5 мин. Представлены СЭМ изображения получившихся «белковых» частиц на матрице ватерита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, метод Бредфорд является удобным и точным для измерения количества белка в лабораторных исследованиях. Так как множество лекарственных препаратов содержат белок в своем составе, то проводя как можно больше экспериментов по адсорбции и со-осаждению БСА и измеряя количество иммобилизованных молекул белка, можно добиться создания идеальной системы-переносчика. В качестве частицы-переносчика подойдут частицы ватерита, благодаря своей сферической форме, большой удельной площади поверхности, биоразлагаемости и высоким значениям эффективности загрузки и загрузочной емкости.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Трушина Д.Б., Сульянов С.Н., Букреева Т.В., Ковальчук М.В. Об управлении размером и структурных особенностях сферических частиц карбоната кальция // Кристаллография. 2015. Т. 60. № 4. С. 625–633.
2. Parakhonskiy B.V. et al. Tailored intracellular delivery via a crystal phase transition in 400 nm vaterite particles // Biomater. Sci. 2013. Vol. 1, № 12. P. 1273-1274.
3. Букреева Т.В. и др. Частицы карбоната кальция и диоксида титана как основа контейнеров для доставки соединений в мозг // Доклады Российской Академии наук. 2011. Т. 440, № 2. С. 191–194.
4. Vater H. Ueber den Einfluss der Loesungsgenossen auf die Krystallisation des Calciumcarbonates // Zeitschrift für Krist. 1897. Vol. 27. P. 477–504.
5. Devenney M., Fernandez M., Morgan S.O. Non-cementitious compositions comprising vaterite and methods thereof. 2013. Vol. 1, № 13. P. 1–45.
6. Li Q. et al. Solvothermal growth of vaterite in the presence of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerin // J. Cryst. Growth. 2002. Vol. 236, № 1-3. P. 357–362.
7. Liu S.S. et al. Design of silk–vaterite microsphere systems as drug carriers with pH-responsive release behavior // J. Mater. Chem. B. 2015. Vol. 3, № 42. P. 8314–8320.
8. Алексеев К.В. и др. Наноразмерные системы доставки лекарственных веществ // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. 16, № 2. С. 17–20
9. Andreassen, Jens-Petter Formation mechanism and morphology in precipitation of vaterite–nano-aggregation or crystal growth?// Journal of Crystal Growth. 2005. P. 256-264.
10. Tai C.Y., Chen F.-B. Polymorphism of CaCO_3 , precipitated in a constant-composition environment // AIChE J. 1998. Vol. 44, № 8. P. 1790–1798.

11. Volodkin D. V, von Klitzing R., Möhwald H. Pure protein microspheres by calcium carbonate templating. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2010. Vol. 49, № 48. P. 9258–9261.
12. Spinning up the polymorphs of calcium carbonate. Boulos, Ramiz A. Zhang, FeiTjandra, Edwin S Martin, Adam DSpagnoli, Dino Raston, Colin L
13. Muriel Schmidt, Stephan Hartmann, Jürgen Volodkin, Dmitry V. Hartmann Synthesis of porous PEG microgels using CaCO_3 microspheres as hard templates. Laura// *Scientific reports*. 2013. P.3016-1032.
- 14 Parakhonskiy B. V., Haase A., Antolini R. Sub-Micrometer Vaterite Containers: Synthesis, Substance Loading, and Release // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012. Vol. 51, № 5. P. 1195–1197.
15. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.// *Anal. Biochem.* 72, 1976, P.248-254.
16. Muriel Schmidt, Stephan Hartmann, Jürgen Volodkin, Dmitry V. Hartmann, Laura Synthesis of porous PEG microgels using CaCO_3 microspheres as hard templates. // *Macromol Rapid Commun.* 2012 P. 1049-1054
17. Гончарук В.В., Багрий В.А., Чеботарева Р.Д., Баштан С.Ю. // *Известия вузов. Химия и технология воды*. 2006. 28, №3. С. 311 – 314
- 18.. Гончарук В.В, Багрий В.А., Баштан С.Ю. Кристаллизация карбоната кальция из водных растворов при наложении электрического и магнитного полей// *Известия вузов*. 2011. №9. С. 53-57.
19. Румянцев К.А., Шеметов А.А., Набиев И.Р., Суханова А.В. Взаимодействие белков и пептидов с наночастицами: структурные и функциональные аспекты // *Российские нанотехнологии*. 2013. №11. С. 18-34
20. B. Palazzo, M. Iafisco, M. Laforgia, N. Margiotta, G. Natile, C.L. Bianchi Biomimetic hydroxyapatite–drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties // *Advanced Functional Materials*, Vol. 17, № 13, 2007, p. 2180-2188

21. Карпович Н.Ф., Пугачевский М.А., Штарев Д.С. Влияние условий синтеза на форму и размерные характеристики нанокристаллов TiO_2 // Российские нанотехнологии. 2013. №13. С. 65-68
22. Jianwei wang and Udo Becker, Structure and carbonate orientation of vaterite CaCO_3 //American Mineralogist, Vol. 94, 2009 p. 380–386.
23. Antipov A.A., Shchukin D., Fedutik Y., Petrov A.I., Sukhorukov G.B. and Mohwald H. Carbonate microparticles for hollow polyelectrolyte capsules fabrication. Colloid. Surf.: Physicochem. Eng. Aspects, 2003, Vol. 224, p. 175.
24. Shenoy D.B., Antipov A.A., Sukhorukov G.B. et al. Layer-by-layer engineered capsules and their applications // Biomacromolecules. 2003. Vol. 4. P.265-266.
25. Sukhorukov G. B., Antipov A. A. et al. pH-controlled macromolecule encapsulation in and release from polyelectrolyte multilayer nanocapsules. - Macromolecular Rapid Communications. 2001. Vol. 22, № 1. P. 44-46.
26. Nakamura J. et al. Tracking the formation of vaterite particles containing aminopropyl-functionalized silsesquioxane and their structure for bone regenerative medicine // J. Mater. Chem. B. 2013. Vol. 1, № 35. P. 4446–4449.
27. Ma M., Su R.-C. Biomineralization and Biomimetic Synthesis of Biomineral and Nanomaterials // Advances in Biomimetics. InTech, 2011. P. 13–50.
28. Feng Z. et al. Polyphosphazene Microcapsules Fabricated through Covalent Assembly // Macromol. Rapid Commun. 2009. Vol. 30, № 6. P. 448–452.
29. Volodkin D.V., Petrov A.I., Prevot M., Sukhorukov G.B. Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation // Langmuir. 2004. Vol. 20. P. 3398-3406.
28. Volodkin D. V, Larionova N.I., Sukhorukov G.B. Protein Encapsulation via Porous CaCO_3 Microparticles Templating // Biomacromolecules. 2004. Vol. 5, № 5. P. 1962– 1972.
29. Sukhorukov G.B. et al. Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: a novel approach to colloid design // Polym. Adv. Technol. 1998. Vol. 9, № 10-11. P. 759–767.

30. Yang L. et al. Cooperativity between Bovine Serum Albumin (BSA) and Crystal Line of Calcium Carbonate in Distilled Water // J. Chinese Chem. Soc. 2002. Vol. 49, № 1. P. 45–50.
31. Sukhorukov G.B. et al. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds // J. Mater. Chem. 2004. Vol. 14, № 14. P. 2073.
32. Petrov A.I., Volodkin D. V, Sukhorukov G.B. Protein-Calcium Carbonate Coprecipitation: A Tool for Protein Encapsulation // Biotechnol. Prog. 2008. Vol. 21, № 3. P. 918–925.
33. Berdonosov S. S., Znamenskaya I. V. and Melikhov I. V., Mechanism of the Vaterite to Calcite Phase Transition under Sonication // Inorg. Mater. 2005, V.41, P. 1308–1312.
34. K. S. Suslick and M. F. Grinstaff // J. Am. Chem. Soc., 1990, Vol. 112, P. 7807.
35. Trushina D.B., Bukreeva T. V., Antipina M.N. Size-Controlled Synthesis of Vaterite Calcium Carbonate by the Mixing Method: Aiming for Nanosized Particles // Crystal Growth & Design. 2016. Vol. 16. № 3. P. 1311–1319.
36. Borodina T.N., Trushina D.B, Marchenko I.V., Bukreeva T.V. Calcium Carbonate-Based Mucoadhesive Microcontainers for Intranasal Delivery of Drugs Bypassing the Blood–Brain Barrier // BioNanoScience. 2016. Vol. 6. № 3. P. 261–268.
37. Kakran M., Muratani M., Tng W.J., Liang H., Trushina D.B., Sukhorukov G.B.,
Ng H.H., Antipina M.N. Layered polymeric capsules inhibiting the activity of RNases for intracellular delivery of messenger RNA // Journal of Materials Chemistry B. 2015. Vol. 3. № 28. P. 5842–5848.
38. Трушина Д.Б., Сульянов С.Н., Букреева Т.В., Ковальчук М.В. Об управлении размером и структурных особенностях сферических частиц карбоната кальция // Кристаллография. 2015. Т. 60. № 4. С. 625–633.
39. Trushina D.B., Bukreeva T.V., Kovalchuk M.V., Antipina M.N. CaCO₃ vaterite

microparticles for biomedical and personal care applications // Materials Science and Engineering: C. 2014. Vol. 45. P. 644–658.

40. Sukhorukov G.B. et al. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds. 2004. P. 2073–2081.

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'A. Sed' or similar, located in the upper right quadrant of the page.