

УДК 54-126:547.458:678.6

Дослідження комплексів включення на основі циклодекстринів і білка альбуміну

І.В. Бабич¹, С.В. Рябов¹, О.Ю. Скоробогатов², О.В. Козлов², С.В. Лаптії¹, В.В. Давиденко¹

¹Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України
48, Харківське шосе, Київ, 02160, Україна

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
150, вул. акад. Заболотного, Київ, 03680, Україна

Методами ІЧ-спектроскопії та диференційної сканувальної калориметрії (ДСК) вивчено особливості комплексів включення, отриманих на основі циклодекстринів (β -ЦД і ГП- β -ЦД) та білка – бичачого сироваткового альбуміну (БСА) за різних мольних співвідношень компонентів. Отримані результати можуть слугувати підґрунтям для подальших досліджень зі створення аналогічних систем на основі різних протеїнів для потреб медицини.

Ключові слова: β -циклодекстрин, білки, бичачий сироватковий альбумін (БСА), комплекси включення на основі циклодекстрину, ДСК, лікарські препарати.

Незважаючи на швидкий прогрес у біотехнології та молекулярній біології, пов'язаний із розробкою нових лікарських препаратів, істотною проблемою залишається створення засобів доставки протеїнівмісних ліків [1]. Використання циклодекстринів (ЦД) – досить багатообіцяюча альтернатива до вже існуючих підходів для вирішення цього завдання [2, 3]. Циклодекстрини – циклічні олігомери глюкози, можуть бути віднесені до природних макроциклів, тому що їх отримують ферментативним гідролізом крохмалю. Вони нетоксичні, біосумісні, біодеградабельні і мають широке застосування у фармацевтичній індустрії завдяки їх здатності утворювати в водному середовищі комплекси включення типу „гість-хазяїн” з різноманітними органічними сполуками [4].

ЦД можуть “упізнавати” не тільки розмір і форму, а й хіральність амінокислот, які входять до складу протеїнів. При цьому, взаємодія внутрішньої порожнини ЦД відбувається, головним чином, з бічними (гідрофобними) ланцюгами (ароматичними фрагментами амінокислот), що впливає на їх міжмолекулярну асоціацію, хімічні та біологічні властивості білків.

Розробка та вивчення особливостей комплексів включення (КВ) з використанням модельного об'єкту – БСА (бичачого сироваткового альбуміну) та β -ЦД (за різних мольних співвідношень компонентів) може слугувати підґрунтям для подальших досліджень зі створення систем на основі різних протеїнів, що дасть змогу стабілізувати їхню структуру, зменшити агрегацію у розчині, підвищити транспортні характеристики лікарських засобів і, таким чином, розширити коло їх терапевтичного застосування.

Відомо, що БСА (білок плазми крові великої

рогатої худоби, мол. маса ~64000 Да) має один ланцюг (витагнута глобула з розмірами 40×140 ангстрем), який містить близько 600 амінокислотних залишків. Він широко використовується у лабораторній практиці як зручна модель для вивчення властивостей глобулярних білків, застосовується як стандарт для кількісного визначення білків і молекулярної маси білків (маркер) у рідинній хроматографії та електрофорезі.

У цій роботі ми використали метод ІЧ-спектроскопії та диференційної сканувальної калориметрії (ДСК) для вивчення можливості ідентифікації створених комплексів включення.

Отже, спочатку нами були отримані комплекси на основі β -ЦД і гідроксипропіл- β -ЦД (ГП- β -ЦД) та БСА за співвідношень, наведених у табл. 1.

Отримували КВ таким чином: 50 мг БСА розчиняли в 20 мл 0,01 М фосфатного буферного розчину (рН 8) за кімнатної температури, потім при перемішуванні додавали відповідний ЦД (25 або 50 мг) і після

Таблиця 1. Склад комплексів включення БСА і циклодекстринів

Зразок	Масове співвідношення	% співвідношення
β -ЦД:БСА 1:1	1:1	50,0:50,0
β -ЦД:БСА 1:2	1:2	33,3:66,6
ГП- β -ЦД:БСА 1:1	1:1	50,0:50,0
ГП- β -ЦД:БСА 1:2	1:2	33,3:66,6

Молекулярна маса (ММ) β -ЦД = 1135; ММ ГП- β -ЦД = 1309; ММ БСА = 64000.

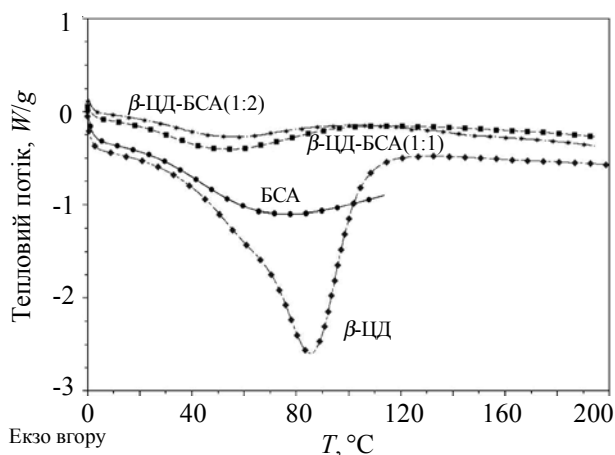


Рис. 1. Дані ДСК для вихідних сполук β -ЦД і БСА та їхніх комплексів включення за мольних співвідношень 1:1 і 1:2

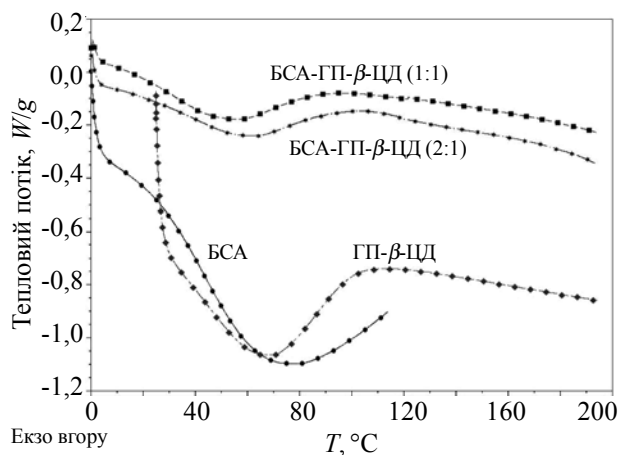


Рис. 2. Дані ДСК для ГП- β -ЦД і БСА та їхніх комплексів включення за мольних співвідношень 1:1 і 1:2

його розчинення перемішували цю суміш протягом 2 год. Для отримання цільового продукту його ліофільно висушували.

Одним із доказів існування комплексу включення БСА з β -ЦД і ГП- β -ЦД є дані ДСК. Криві залежності теплового потоку від температури зображені на рис. 1. Досліджений β -ЦД характеризується наявністю чіткого ендотермічного піка за температури близько 84–85 °С, що відповідає його дегідратації. Температура, за якої відбувається денатурація білка, становить 78–80 °С, а як свідчать отримані дані, комплекси включення β -ЦД з БСА (за мольних співвідношень компонентів 1:1 або 1:2) мають невеликий пік за температури 60 °С (рис. 1).

Така ж картина спостерігається і для систем БСА - ГП- β -ЦД. ГП- β -ЦД має досить чіткий ендотермічний пік в області 70 °С (температура дегідратації), рис. 2.

Утворення комплексу включення приводить до

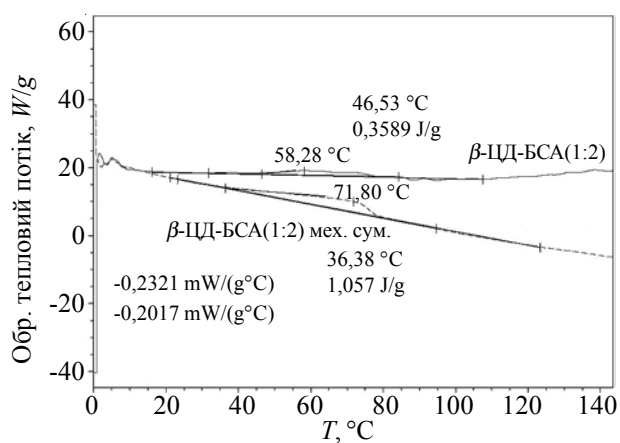


Рис. 3. Залежності оберненого теплового потоку від температури, отримані за допомогою методу модульованої ДСК для механічної суміші та комплексу включення β -ЦД-БСА за мольного співвідношення 1:2

Таблиця 2. Дані ІЧ-спектроскопії комплексів включення БСА з циклодекстринами

Зразок			Віднесення коливань, згідно літературних даних [5]	Віднесення коливань
БСА	БСА- β -ЦД	БСА-ГП- β -ЦД		
ν_{CM}^{-1}	ν_{CM}^{-1}	ν_{CM}^{-1}		
3300	3381	3361	3300–3500 Амід А вал. N–H (95 %) [5]	$\nu_{\text{NH}} + \nu_{\text{OH}}$
1656	1658	1659	1700–1600: вал. C=O (70–85 %), вал. C–N (10–20 %) [5]	Амід I
1543	1537	1540	1580–1510 Амід II: деф. коливання в площині гетероциклу N–H (40–60 %), вал. C–N (18–40 %), вал. C–C (10 %) [5]	Амід II

неадитивного зменшення абсолютної величини піків (площин піків) систем з БСА (рис. 1 і 2).

Комплекси ж включення БСА-ГП- β -ЦД (мольні співвідношення 1:1 і 1:2) характеризуються невеликими ендотермічними піками в області температур 50–60 °С.

На рис. 3 наведені залежності оберненого теплового потоку від температури, які отримані за допомогою методу модульованої ДСК.

Екзоефект для механічної суміші БСА- β -ЦД (2:1) спостерігається за температури 71,8 °С, що відповідає температурі денатурації БСА, а для комплексу БСА- β -ЦД того ж складу він практично відсутній, що напевне, можна пов'язати з тим, що частина фрагментів молекули БСА входить у порожнину ЦД з утворенням комплексу включення і, як відомо з літератури, температура денатурації альбуміну за наявності ЦД зменшується [3].

Отримані комплекси включення досліджували і методом ІЧ-спектроскопії (табл. 2).

Амід А. Зміни в цій області спектра можна пояс-

нити як наявністю взаємодії між N–H групами білкової молекули з β -ЦД і ГП- β -ЦД, в результаті якої N–H групи можуть утворювати водневі зв'язки з –O- β -ЦД, а OH групи β -ЦД утворюють водневі зв'язки з C=O альбуміну, так і простим накладанням ν_{NH} та ν_{OH} .

Амід I, амід II. Наявність зміщення максимумів поглинання в області Амиду I, Амиду II є свідченням ослаблення водневих зв'язків груп C=O альбуміну не в ядрі глобули, а на периферії за наявності β -ЦД, що може бути пов'язано з утворенням комплексу включення з бічними гідрофобними фрагментами альбуміну. Сама ж глобулярна конформація БСА не змінюється за наявності β -ЦД.

Отже, проведені дослідження комплексоутворення бичачого сироваткового альбуміну та циклодекстринів відкривають можливість для подальших розробок систем протеїн – функційні похідні ЦД з використанням більш складних об'єктів, зокрема, рекомбінантних білків, що мають значні перспективи для створення нових лікарських форм.

Література

1. Soares A., Francisca C., Rui de A., Francisco V. // *Nanomedicine*. – 2007. – No.2. – P. 183-202.
2. Irie T., Uekama K. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 1999. – No. 36. – P. 101-123.
3. Yamamoto T., Yoshikiyo K. // *Current Organic Chem.* – 2011. – **15**, No. 6. – P. 831-838.
4. Szejtli J. // *Chem. Rev.*-1998. – 98. – P. 1743-1753.
5. Инфракрасная спектроскопия полимеров / Под ред. И. Деханта. ГДР. – 1972. Пер. с нем., под ред. к.х.н. Э. Ф. Олейника. – М.: Химия, 1976.

Надійшла до редакції 12 березня 2012 р.

Исследование комплексов включения на основе циклодекстринов и белка альбумина

И.В. Бабич¹, С.В. Рябов¹, А.Ю. Скоробогатов², А.В. Козлов², С.В. Лаптий¹, В.В. Давиденко¹

¹Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины
48, Харьковское шоссе, Киев, 02160, Украина

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
150, ул. акад. Заболотного, Киев, 03680, Украина

Методами ИК-спектроскопии и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) изучены особенности комплексов включения циклодекстринов (β -ЦД и ГП- β -ЦД) и белка – бычьего сывороточного альбумина (БСА) при разных мольных соотношениях компонентов. Полученные результаты могут служить основой для дальнейших исследований по созданию аналогичных систем на основе различных протеинов для медицинских целей.

Ключевые слова: β -циклодекстрин, белки, бычий сывороточный альбумин, (БСА), комплексы включения на основе циклодекстринов, ДСК, лекарственные препараты.

Studying of inclusion complexes based on cyclodextrins and bovine serum albumine

I.V. Babych¹, S.V. Riabov¹, A.Yu Skorobogatov², A.V. Kozlov², S.V. Laptiy¹, V.V. Davidenko¹

¹Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine
48, Kharkivske shause, Kyiv, 02160, Ukraine

²Institute of Molecular Biology and Genetics the NAS of Ukraine
150, Zabolotnogo str., Kyiv, 03680, Ukraine

Involving FT-IR method and DSC (differential scanning calorimetry), peculiarities of inclusion complexes based on cyclodextrins (β -CD and HP- β -CD) and bovine serum albumine, BSA (at different molar ratios) are investigated. The results obtained could be a basis for further development and research of analogue systems based on a different proteins to be applied for medicine.

Keywords: β -cyclodextrin, proteins, bovine serum albumine (BSA), cyclodextrins' based inclusion complexes, DSC, medicine application.