

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ПОЛИАКРИАМИДНЫЙ ГЕЛЬ НАНОЧАСТИЦ УГЛЕРОДА УДАЛЯТЬ БИЛИРУБИН ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Макаревич Д. А.¹, Рябцева Т. В.¹, Ковганко Н. Н.¹, Жалейко Г. А.¹, Штемплук Р. Г.²

*¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;*

*²Научно-производственное закрытое акционерное общество «Синта»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Исследована сорбционная активность полиакриамидного геля по отношению к билирубину. Показано, что наиболее эффективными в отношении сорбции и удержания в объеме геля молекул билирубина являются наноалмазы детонационного синтеза типа УДА-СП(тип $\zeta+$) и УДА-ГО-СП(30).

Ключевые слова: билирубин, сорбция, наноалмаз, полиакриламид, плазма.

Введение. Наноразмерные детонационные алмазы (нДА), получаемые с использованием взрывчатых веществ в изолированном объеме, представляют собой уникальный тип алмазных материалов [1, 2]. Наноразмерные детонационные алмазы — наноматериал со средним раз-

мером зерен примерно 4 нм. Отличительной морфологической особенностью нДА является кубическая, редко октаэдрическая форма, организованная из составных беспорядочно ориентированных кубических блоков. Доля поверхностных атомов составляет около 15 % в отличие от фуллеренов, все атомы которых являются поверхностными. Наличие кристаллической решетки типа алмаза центрального ядра наночастицы и разветвленной поверхности нДА, содержащей различные активные химические группы (CO_2H , CO_2R , CH_x , C-N , C=N , C-O-O , OH , CO , C_6H_x), наделяет частицы уникальными физико-химическими свойствами по сравнению с другими углеродными материалами [3, 4].

Наноалмазы являются перспективными для разработки новых терапевтических подходов в медицине, так как в практических исследованиях учеными доказана низкая токсичность, хорошая биодоступность и высокая удельная поверхность по сравнению с фуллеренами, графеном и нанотрубками [5, 6]. Гидроксильные, карбоксильные, амидные и другие активные группы на поверхности дают возможность модифицировать наноалмазы различными лекарственными веществами, биосенсорами. В настоящий момент область применения нДА в медицине включает внутриклеточную доставку лекарственных средств, противоопухолевую и антибактериальную терапию, клеточную фототерапию, визуализацию маркеров на тканевых срезах (биосенсорика, биодиагностика, визуализация) [7].

Наноалмазы обладают также высокой адсорбционной способностью, имеют большое количество свободных электронов на поверхности (множественный радикал-донор), химически инертны и характеризуются гидрофильным характером поверхности [4, 7]. Исследования, проведенные в ИСМ НАН Украины по изучению адсорбционных свойств микропорошков синтетических алмазов различных зернистостей и различной модификации поверхности, показали, что нДА являются селективными адсорбентами альбуминов и глобулинов плазмы крови. Группы CH_x , C-N , C=N , C_6H_x на поверхности придают наноалмазным сорбентам способность адсорбции ионов тяжелых металлов (железо, никель, кобальт) [4].

Интерес представляет окисленная поверхность нДА, так как это место проведения на поверхности нДА различных реакций. Для дополнительной очистки поверхности наноалма-

за применяют реакции окисления, которые проводят как в жидкой, так и в газовой фазе, что оказывает влияние на степень окисления и состав химически активных поверхностных групп [7].

Актуальной задачей в эфферентной медицине является удаление токсических продуктов метаболизма из внутренней среды организма посредством сорбции крови. Для этого широко применяются углеродные сорбенты СКТ-6А, БАУ, ВНИИТУ-1, Гемос-Бел. Однако они имеют ряд недостатков: низкое качество углеродных гранул с высоким содержанием минеральных примесей (золы) и шероховатым рельефом поверхности, способных травмировать оболочку элементов крови и способствовать их адгезии на поверхности, а также низкая адсорбционная активность. Упомянутые недостатки ограничивают применение сорбентов этого типа в эфферентной терапии, поэтому разработка новых более эффективных и безопасных является актуальной задачей современной биохимии.

Цель работы — изучение эффективности иммобилизованных в полиакриламидный гель наночастиц углерода сорбировать билирубин из плазмы крови человека.

Материалы и методы. Изучали 3 типа углеродных наночастиц. УДА-СП (тип $\xi+$), и УДА-ГО-СП (30 нм) — наноалмаз глубокой очистки — сухой порошок серого цвета (содержание окисляемых форм углерода 1,2 %; степень окислительного разложения 0,98; химические функциональные поверхностные группы: CO_2H , CO_2R , CH_x , C-N , C=N , C-O-O , OH , CO). УДА-ЧОШ-СП — наноалмаз селективного окисления, сухой порошок черного цвета (количество окисляемых форм углерода 38,4 %, степень окислительного разложения 0,28; функциональные поверхностные группы: CO_2H , CO_2R , CH_x , C_6H_x).

Сополимер акриламида с наночастицами углерода синтезировали путем добавления в смесь при радикальной полимеризации акриламида с N,N -метиленабисакриламидом [6]. Объем реакционной смеси составлял 50 мл. Содержание УДА в реакционной смеси — 500 мг. Таким образом, концентрация наночастиц в экспериментальном образце составляла 10 мг/мл.

Протокол изучения эффективности адсорбции проводили шихтовым методом (Batchwise adsorption test) [7]. Использовали круглодонные пробирки диаметром 10 мм, высотой 100 мм и общим объемом заполнения 7 мл. В пробирки загружали 3,0 г полимера, что

соответствует 10 мл полимера в виде нитей и 5,0 мл полимера исходного после полимеризации. Количество наночастиц, участвующих в адсорбции в пробирке, составила 50 мг. В каждую пробирку добавляли 5 мл плазмы, полученной от пациентов при проведении лечебного плазмафереза, с концентрацией общего билирубина ≥ 100 мкмоль/л. Инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Затем собирали элюат. Для расчета коэффициента распределения проводили дополнительную элюцию раствором NaCl (5 мл, 0,9 %). Количество сорбированного билирубина рассчитывали как разницу между концентрацией билирубина до и после контакта с сорбентом. Концентрация билирубина в элюате, полученном после смыва, включала вещество в подвижной фазе. Разница между всем адсорбированным билирубином и его количеством в элюате указывала на количество билирубина в неподвижной фазе (внутри гранул геля и/или внутри пор, образуемых в нДА). Отношение концентрации билирубина между неподвижной и подвижной фазами является коэффициентом распределения и свидетельствует о сорбенте по отношению к сорбируемому веществу. Для низкомолекулярных веществ, к

которым относится билирубин, данный коэффициент для ПААГ без лиганда приближается к нулю.

Определение концентрации билирубина модифицированным методом Ендрашика – Грофа. Метод проводили с помощью коммерческих наборов реагентов. Биуретовый метод использовали для определения концентрации общего белка. Метод с бромкрезоловым зеленым применяли для оценки концентрации альбумина.

Для регистрации результатов методом спектроскопии использовали спектрофотометр Multiskan GO (Япония). Результаты описывали в виде медианы, 25 и 75 перцентилей, статистический анализ проводили методами непараметрической статистики.

Результаты и их обсуждение. В результате химического синтеза из 10 мл раствора для полимеризации и 50 мг углеродных наночастиц синтезировано по 30 г каждого образца для изучения адсорбционной активности иммобилизованных наночастиц углерода. Качество полимеризации и иммобилизации оценивали с помощью визуального и спектрофотометрического анализа растворов после промывки полученных образцов (таблица 1).

Таблица 1 — Физико-химические показатели геля с иммобилизованными углеродными наночастицами

Показатель	Образец НА-1	Образец НА-2	Образец НА-3	Образец НА-4
Характеристика исходного сырья для лигандизации,	Тонкодисперсный порошок черного цвета	Тонкодисперсный порошок серого цвета	Тонкодисперсный порошок серого цвета	Тонкодисперсный порошок серого цвета
Внешний вид иммобилизованных частиц наночуглерода	Тонкие нити (диаметром 1–2 мм) полимера (ПААГ) с включениями черного цвета	Тонкие нити (диаметром 1–2 мм) полимера (ПААГ) с включениями серого цвета	Тонкие нити (диаметром 1–2 мм) полимера (ПААГ) с включениями серого цвета	Тонкие нити (диаметром 1–2 мм) полимера (ПААГ) с включениями серого цвета
pH раствора при хранении геля с НА	6,61	6,45	6,51	6,55
1-я промывка	9,19 [9,10–9,30]	9,57 [9,40–9,80]	10,20 [10,0–10,35]	8,79 [8,50–8,90]
2-я промывка	8,58 [8,18–8,60]	9,27 [9,10–9,75]	9,76 [9,50–10,10]	8,30 [8,15–8,68]
3-я промывка	7,93 [7,50–8,15]	8,10 [8,05–8,48]	8,20 [8,05–8,30]	7,40 [7,15–7,70]
4-я промывка	7,95 [7,30–8,05]	7,67 [7,54–7,86]	7,40 [7,15–7,65]	7,10 [6,80–7,20]
5-я промывка	7,25 [7,15–7,64]	6,90 [6,40–7,10]	6,70 [6,50–6,80]	6,60 [6,50–6,65]
Спектральная характеристика раствора после промывки, $\lambda = 230$ нм				
1-я промывка	3,53 [3,20–3,80]	1,74 [1,50–1,80]	3,34 [3,30–3,60]	3,31 [3,28–3,40]
2-я промывка	2,17 [2,10–2,60]	1,13 [1,10–1,18]	2,01 [1,98–2,15]	1,93 [1,88–1,96]
3-я промывка	0,28 [0,26–0,33]	0,16 [0,10–0,22]	0,29 [0,20–0,36]	0,29 [0,15–0,32]
4-я промывка	0,10 [0,06–0,15]	0,06 [0,03–0,10]	0,09 [0,07–0,11]	0,08 [0,05–0,12]
5-я промывка	0,01 [0,01–0,02]	0,01 [0,01–0,05]	0,01 [0,01–0,02]	0,03 [0,01–0,06]

Анализ показал, что при промывке происходит установление pH раствора в диапазоне нейтральных значений. Снижение оптической плотности промывочных растворов при 230 нм до нулевых значений свидетельствует об удалении из объема геля практически всего непрореагировавшего акриламида и других ненасыщенных соединений. Визуальный анализ показал, что промывочные растворы не содержат черных или серых частиц исходного сырья для иммобилизации. Первый промывочный раствор после иммобилизации частиц типа УДА-ЧОШ-СП оказался желтого цвета, что свидетельствует о возможном содержании примесей железа в образце.

Исследование влияния контакта иммобилизованных углеродных наночастиц на целостность эритроцитов показало, что после

долговременного контакта полиакриламидного геля с наночастицами наблюдается гемолиз, не превышающий 10 %. Минимальные значения гемолиза наблюдали после контакта крови с иммобилизованными частицами типа УДА-СП+(М2). Максимальный гемолиз — после контакта с частицами УДА-ЧОШ-СП (рисунок 1). Полученные результаты свидетельствуют о влиянии метода получения углеродных наночастиц и степени очистки на их гемосовместимость.

Тем не менее, иммобилизованные углеродные наночастицы можно считать гемосовместимыми, так как кратковременный контакт (менее 5 мин) крови с иммобилизованными наноалмазами, который происходит при перфузии крови через емкость с гелем, не вызывал значимого гемолиза (таблица 2).

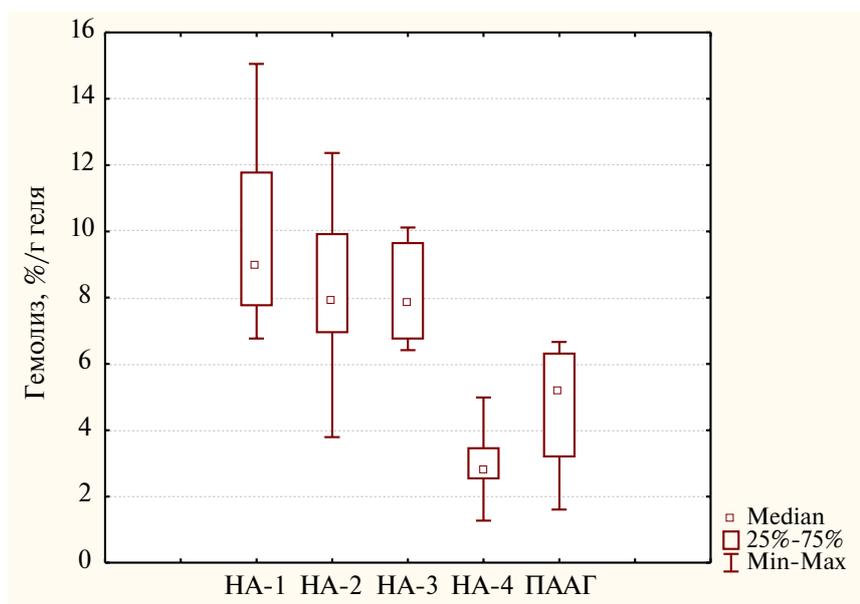


Рисунок 1 — Оценка гемолиза после длительного (60 мин) контакта крови с иммобилизованными на полиакриламидном геле углеродными наночастицами

Таблица 2 — Процент гемолиза крови после кратковременного контакта с полиакриламидным гелем лигандизированным наноалмазами

Образец	Процент гемолиза, %
Кровь + дист. вода	100
УДА-ЧОШ-СП-ПААГ	0,38 (0,32; 0,43)
УДА-ГО-СП-ПААГ	0,18 (0,12; 0,25)
УДА-СП — ПААГ	0,14 (0,09; 0,19)
УДА-СП+(М2)- ПААГ	0,30 (0,26; 0,37)
ПААГ	0,48 (0,42; 0,53)

Изучение неспецифической адсорбции метиленового синего наноалмазами в растворе показало, что максимально эффективными явля-

ются наноалмазы типа УДА-ЧОШ-СП (HA-1). На 1 мг наноалмазов сорбция МС составляет 25,63 [23,53–28,49] мг (рисунок 2). Адсорбция

остальных образцов, по сравнению с НА-1, невелика и примерно одинаковая: для НА-2 — 6,25 [4,95–7,10] мг, для НА-3 — 8,72 [7,93–9,80] мг, для НА-4 — 8,41 [7,84–9,23] мг. Полученная раз-

ница в адсорбции объясняется тем, что наноалмазы типа УДА-ЧОШ-СП обладают удельной поверхностью 399 м²/г, которая больше, чем у других образцов наноалмазов (см. таблицу 2).

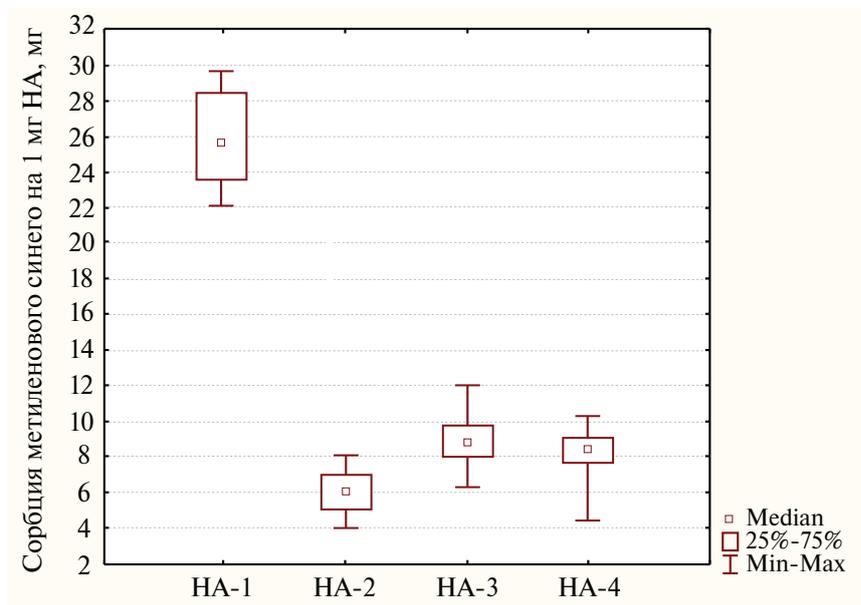


Рисунок 2 — Адсорбция метиленового синего наноалмазами (50 мг) различной модификации

Исследование адсорбционных свойств иммобилизованных наноалмазов подтвердило тенденцию: максимальной адсорбционной активностью обладают наноалмазы типа УДА-ЧОШ-СП (рисунок 3). При этом значение адсорбции иммобилизованными наноалмазами,

по сравнению со свободными, увеличивается в несколько раз, что объясняется собственной неспецифической адсорбционной способностью полиакриламидного геля по отношению к метиленовому синему.

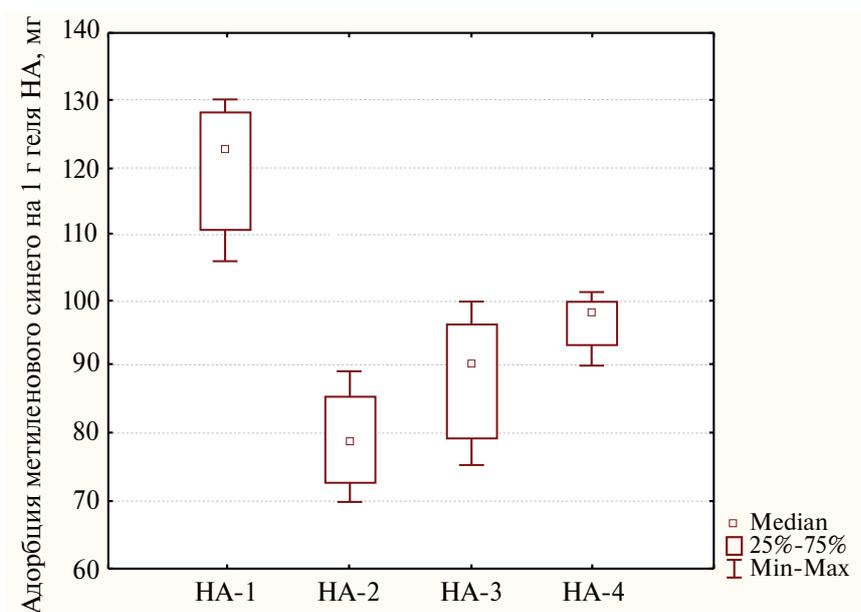


Рисунок 3 — Адсорбция метиленового синего иммобилизованными наноалмазами

Дальнейшее исследование концентрации общего билирубина в ходе экспериментов с иммобилизованными нДА показало достоверное снижение концентрации общего билирубина после контакта со всеми экспериментальными образцами по сравнению с контролем (ПААГ без нДА). Изменение концентрации общего билирубина для образцов УДА-ГО-СП-ПААГ (30) составило 36,7 (33,7;

45,5) мкмоль/ на 1 мл сорбента, для УДА-СП(тип $\xi+$)-ПААГ образцов 43,0 (40,8; 56,1) мкмоль/на 1 мл сорбента, для УДА-ЧОШ-СП-ПААГ — 22,8 (21,6; 25,1) мкмоль / на 1 мл сорбента. В контрольных образцах, полученных после контакта плазмы с ПААГ без нДА, изменение концентрации билирубина было равно 8,8 (6,6;9,4) мкмоль/на 1 мл сорбента (таблица 3).

Таблица 3 — Результаты определения эффективности сорбции билирубина ПААГ с иммобилизованными наноалмазами

Образец	Количество сорбированного билирубина, мкмоль на 1 мл сорбента	Количество билирубина в подвижной фазе, мкмоль/л	Коэффициент распределения
УДА-ЧОШ-СП-ПААГ	22,8 (21,6; 25,1)*	13,5 (11,2; 14,0)*	0,81 (0,65; 1,08)*
УДА-ГО-СП(30)-ПААГ	36,7 (33,7; 45,5)*	16,5 (14,4; 17,3)*	1,46 (1,06; 1,73)*
УДА-СП(тип $\xi+$)-ПААГ	43,0 (40,8; 56,1)*	16,5 (14,4; 18,5)*	1,55 (1,28; 2,54)*
ПААГ (контроль без НА)	8,8 (6,6; 9,4)	1,4 (0,9; 1,5)	0,16 (0,15; 0,23)

* $p \leq 0,05$, при сравнении с ПААГ без наноалмазов, тест Манна – Уитни.

Коэффициент распределения для сорбентов с иммобилизованными нДА статистически значимо был больше, чем для ПААГ без нДА. Однако только иммобилизация нДА типа УДА-СП(тип $\xi+$) и УДА-ГО-СП (30) привела к увеличению коэффициента распределения больше единицы.

Заключение. Результаты экспериментов свидетельствуют, что включение в трехмерную сетку ПААГ нДА увеличивают сорбционную активность геля по отношению к билирубину.

Наиболее эффективны в отношении сорбции и удержания в объеме геля молекул билирубина являются нДА типа УДА-СП(тип $\xi+$) и УДА-ГО-СП(30), возможно, это связано с тем, что их степень окисленности в 3 раза выше, чем у УДА-ЧОШ-СП-ПААГ. Таким образом, использование нДА данной степени окисленности можно рекомендовать в качестве лигандов для разработки гемосорбентов с целью снижения концентрации билирубина в плазме крови.

Список цитированных источников

1. Даниленко, В. В. Из истории открытия синтеза наноалмазов / В. В. Даниленко // Физика твердого тела, 2004. — Т. 46, № 4. — С. 581–584.
2. Osawa, E. Superaromacity / E. Osawa, K. Kagaku // Chem. Abs., 1970. — Vol. 25. — P. 854–863.
3. Vapor deposition of diamond particles from methane / S. Matsumoto [et al.] // Jpn. J. Appl. Phys., 1982. — Vol. 21. — P. 183–185.
4. Bogatyreva, G. P. Diamond — an adsorbent of a new type / G. P. Bogatyreva, M. A. Marinich, V. L. Gvyazdovskaya // Diamond. Relat. Mater., 2000. — Т. 9, № 12. — P. 2002–2005.
5. Surface functionalisation of detonation diamond suitable for biological applications / A. Kryger [et al.] // J. Mater. Chem., 2006. — Vol. 16, № 24. — P. 2322–2328.
6. Shenderova, O. A. Carbon Nanostructures / O. A. Shenderova, V. V. Zhirnov, D. W. Brenner // Critical reviews in solid state and materials sciences, 2002. — Vol. 27, № 3–4. — P. 227–356.
7. Turcheniuk, K., Biomedical applications of nanodiamond (Review) / K. Turcheniuk, V. N. Mochalin // Nanotechnology, — 2017. — Vol. 28, № 25. — P. 1–28.



Efficiency of carbon nanoparticles immobilized in polyacrylamide gel to remove bilirubin from human blood plasma

*Makarevich D. A.¹, Ryabtseva T. V.¹, Kauhanaka M. M.¹,
Zhaleika H. A.¹, Shtemplyuk R. G.²*

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

²Scientific and production closed joint-stock company "Sinta", Minsk, Republic of Belarus

The sorption activity of polyacrylamide gel with respect to bilirubin was studied. It has been shown that the most effective in terms of sorption and retention of bilirubin molecules in the gel volume are detonation synthesis nanodiamonds of the UDD-SP type (ζ^+ type) and UDD-GO-SP(30) type.

Keywords: bilirubin, sorption, nanodiamond, polyacrylamide, plasma.

Поступила 08.06.2022