

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СФЕРИЧЕСКИХ АМОРФНЫХ НАНОЧАСТИЦ ИЗ ТРИТЕРПЕНОИДОВ БЕРЕСТЫ С БИЛИРУБИНОМ

Л.А. Поручикова, аспирант, Т.Н. Лыу, магистр, Д.А. Безруков, ассистент,
А.П. Каплун, профессор

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: alex.kaplun@mtu-net.ru

Показано, что сферические аморфные наночастицы тритерпеноидов лупанового ряда в концентрации 0.835 мг/мл адсорбируют от 47 до 62% билирубина при его содержании в плазме крови, превышающем норму от 1.5 до 12 раз.

It has been shown that spherical amorphous nanoparticles of lupane series triterpenoids at 0.835 mg/ml concentration adsorb 47 ÷ 62% of bilirubin when the content of the latter in blood plasma is 1.5 ÷ 12 times higher than normal.

Ключевые слова: сферические аморфные наночастицы, тритерпеноиды бересты, билирубин, адсорбция.

Key words: spherical amorphous nanoparticles, birchbark triterpenoids, bilirubin, adsorption.

Билирубин — желчный пигмент, образующийся из гемоглобина в результате распада эритроцитов в клетках ретикулоэндотелиальной системы печени и селезенки. В нормальных условиях билирубин аккумулируется в печени и экскретируется с желчью. Избыточное содержание билирубина в крови наблюдается при заболевании гепатитами; он накапливается в крови и по достижении определенных концентраций диффундирует в ткани, окрашивая их в желтый цвет. При высоких концентрациях билирубин обладает выраженной токсичностью: он легко проникает через плазматическую мембрану нервных клеток, нарушает процессы окислительного фосфорилирования и приводит к повреждениям нервной системы.

Очищение крови от находящихся в ней

вредных веществ производится путем экстракорпоральных методов: гемодиализ, гемофильтрация и гемодиофильтрация, плазмаферез, иммуносорбция, реоферез, плазмасорбция. Однако данные методы имеют ряд недостатков — это дорогие процедуры; некоторые из них могут привести к увеличению риска инфекционных осложнений, гипотонии. Поэтому остается востребованным поиск новых методов очистки крови.

Ранее нами было показано, что сферические аморфные наночастицы (САНЧ), полученные из смеси гидрофобных лупановых тритерпеноидов бересты (основные компоненты: бетулин, лупеол и кофеат бетулина, рис. 1), служат переносчиками гидрофобных лекарственных субстанций, таких как лидокаин, силимарин, доксорубин, рифабутин [1] и др.

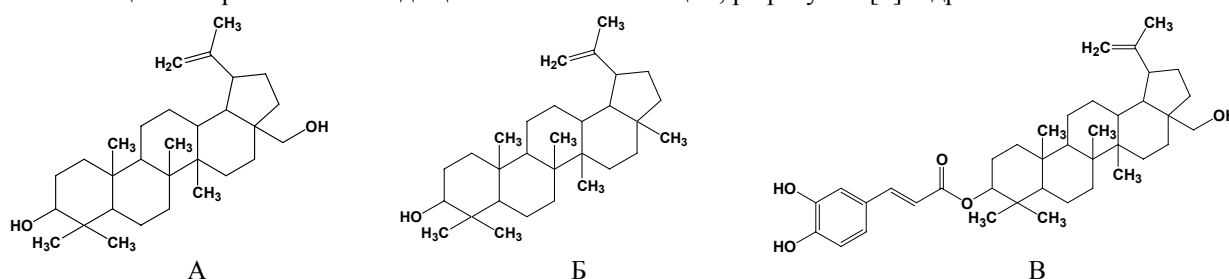


Рис. 1. Структура бетулина (А), лупеола (Б) и кофеата бетулина (В).

Вероятно, САНЧ, благодаря гидрофобной поверхности, могут адсорбировать гидрофобные вещества, находящиеся в крови, например, билирубин, тем самым очищая кровь.

Таким образом, актуальным представляется исследование взаимодействия САНЧ с билирубином, так как это, возможно, окажет помощь в создании нового метода очистки крови.

Экспериментальная часть

В работе использовали смесь лупановых тритерпеноидов бересты (ООО «Березовый мир», Москва); реактивы и растворители квалификации ч.д.а. или х.ч. («Химмед», Москва).

Получение САНЧ

В круглодонную колбу к раствору смеси лупановых тритерпеноидов бересты в ТГФ (1 мл, 5 мг/мл) при интенсивном перемешивании

быстро добавляли 25 мл дистиллированной воды путем впрыскивания по каплям с помощью шприца и перемешивали в течение 5 мин при комнатной температуре. Растворитель удаляли на роторном испарителе при 35–40°C. Полученную дисперсию обрабатывали на ультразвуковой бане Sonorex TK-52 (Bandelin, Германия) в течение 3 мин при комнатной температуре и концентрировали на роторном испарителе до конечного объема 3 мл.

Изучение адсорбции билирубина на САНЧ

Билирубин (15 мг) растворяли в 2 мл водного раствора NaOH (25 мг/мл). К 1 мл пулированной гепаринизированной плазмы добавляли 4, 8, 12 и 16 мкл раствора билирубина (до конечной концентрации 50, 100, 150 и 200 мкМ, соответственно). Каждый полученный об-

разец, а также образец исходной плазмы (1 мл) смешивали с 1 мл дисперсии САНЧ (1.67 мг/мл) и инкубировали 30 мин при 37°C. Смесь центрифугировали 60 мин при 10000 g, отбирали 100 мкл каждого образца и определяли концентрацию билирубина спектрофотометрически (спектрофотометр DU®-7, Beckman, США). Для этого к 100 мкл пробы добавляли 1 мл реактива 1 (30 мМ сульфаниловая кислота, 50 мМ соляная кислота, 7 М ДМСО), 50 мкл реактива 2 (29 мМ нитрит натрия) и определяли оптическую плотность при 555 нм относительно дистиллированной воды. В случае образца сравнения к 1 мл реактива 1 добавляли 100 мкл пробы и измеряли оптическую плотность. Концентрацию билирубина определяли по формуле:

$$C_{\text{общий билирубин}} (\text{мкМ}) = 327 \times (A_{\text{пробы}} - A_{\text{образца сравнения}}).$$

Результаты и их обсуждение

Свободный билирубин, попадая из клеток ретикулоэндотелиальной системы в сыворотку крови, связывается с альбумином и транспортируется в печень. В гепатоцитах билирубин взаимодействует с глюкуроновой кислотой, образуя конъюгат – водорастворимое соединение, которое вы-

водится почками. Также гепатоциты обладают способностью экскретировать билирубин с желчью [2, 3].

Связывание билирубина с альбумином играет ключевую роль в понижении концентрации билирубина в крови, и, следовательно, токсичности билирубина. Сферические аморфные наночастицы, по-видимому, действуют аналогично, уменьшая пиковую концентрацию билирубина в крови.

Мы предположили, что гидрофобная поверхность САНЧ может адсорбировать билирубин, находящийся в крови. Для определения количества билирубина в плазме крови использовали реакцию Ван ден Берга [4–6], которая основана на взаимодействии билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой, в результате чего образуется окрашенное соединение. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию билирубина в исследуемой пробе [7]. Результаты исследования адсорбции билирубина на САНЧ представлены в табл. 1.

Установлено, что сферические аморфные наночастицы в концентрации 0.835 мг/мл адсорбируют от 47 до 62% билирубина при его содержании в крови, превышающем нормальное от 1.5 до 12 раз (т.е. от 29 до 229 мкМ).

Таблица 1. Адсорбция билирубина на САНЧ (0.835 мг/мл) после инкубации с плазмой крови.

Исходная концентрация билирубина, мкМ	29	79	129	179	229
Концентрация билирубина после инкубации с САНЧ, мкМ	18	46	80	96	108
Доля билирубина, адсорбированного на САНЧ, %	62	58	62	54	47

Таким образом, можно рассчитать предельно допустимую концентрацию билирубина в крови (38 мкМ), при которой введение САНЧ (0.835 мг/мл) позволит существенно понизить влияние токсического действия билирубина на ткани организма, приводя его содержание к нормальному, составляющему от 3.5 до 19 мкМ [8]. Желтушная окраска кожи появляется при содержании билирубина в крови 30 ÷ 35 мкМ. В этом случае САНЧ, возможно, могут рассматриваться как перспективные системы для очистки крови. Однако, при заболевании гепатитами содержание билирубина в крови значительно превышает данные значения, например, при тяжелых формах гепатита В его концентрация

может составлять более 170 мкМ. При этом использование САНЧ будет недостаточно эффективным, т.к. даже если они адсорбируют 50% билирубина, его «остаточная» концентрация будет превышать нормальную в 4.5 раза.

Таким образом, что полученные нами результаты могут оказаться полезными при разработке нового метода очистки крови, а также внесут вклад в исследуемые в настоящее время свойства и применение сферических аморфных наночастиц тритерпеноидов бересты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям РФ (Государственный контракт № 02.512.11.2328).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Сферические аморфные наночастицы, загруженные противотуберкулезной субстанцией рифабутином / А. П. Каплун, Н. И. Пахарькова, Л. А. Поручикова, Д. А. Безруков, В. И. Попенко, В. И. Швец // Вестник МИТХТ. – 2010. – Т. 5, № 2. – С. 73–75.
2. Щербинина, М. Б. Низкий уровень билирубина крови: возможное диагностическое и прогностическое значение / М. Б. Щербинина // Клиническая медицина. – 2007. – Т. 85, № 10. – С. 10–14.
3. Титов, В. Н. Методические приемы исследования билирубина / В. Н. Титов, М. Г. Творогова // Клиническая лабораторная диагностика. – М.: Медицина, 1994. – № 5. – С. 36–38.
4. Landis, J. B. Kinetics of the reactions of unconjugated and conjugated bilirubins with *p*-diazobenzenesulfonic acid / J. B. Landis, H. L. Pardue // Clin. Chem. – 1978. – Vol. 24. – P. 1690–1699.
5. Michaelsson, M. Bilirubin determination in serum and urine / M. Michaelsson // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1961. – Vol. 13, № 56. – P. 1–80.
6. Nosslin, B. The direct diazo reaction of bile pigments in serum. Experimental and clinical studies / B. Nosslin // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1960. – Vol. 12, № 49. – P. 1–176.
7. Meites, S. Studies on the use of the van den Bergh reagent for determination of serum bilirubin / S. Meites, C. K. Hogg // Clin. Chem. – 1959. – Vol. 5. – P. 470–478.
8. Биохимия человека / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. – Т. 2. – М.: Мир, 1993. – 415 с.