

На правах рукописи

ЖАЛИМОВ ВИТАЛИЙ КАСИМОВИЧ

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АДсорбции БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ НА ПОВЕРХНОСТИ ЭМУЛЬСИЙ ПЕРФТОРУГЛЕРОДОВ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ БЛОКСОПОЛИМЕРАМИ ПОЛИОКСИЭТИЛЕНА-ПОЛИОКСИПРОПИЛЛЕНА

03.00.04 - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

19 ДПР 2012

Пушино 2012

005018024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биофизики клетки РАН.

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор

Кукушкин Николай Ильич

кандидат биологических наук Склифас Алла Николаевна

Официальные оппоненты: Озолинь Ольга Николаевна - доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки РАН, заведующая лабораторией

Терешина Елена Владимировна - доктор биологических наук, Российский национальный исследовательский медицинский институт им. Н.И. Пирогова, заведующая лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное

учреждении науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Защита диссертации состоится 26 апреля 2012 года в 14.00 часов на заседании совета Д002.038.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биофизики клетки РАН по адресу: 142290, г. Пушино Московской области, ул. Институтская 3. 0 1

С диссертацией можно ознакомиться в центральной библиотеке ПНЦ РАН, г. Пушино Московской области, ул. Институтская 3.

Автореферат разослан 9 марта 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета кандидат биологических наук

Т.И. Смолихина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Появление в настоящее время широкого круга лекарственных препаратов на дисперсной основе, а также применение различных наноконтейнеров для адресной доставки лекарств к различным органам и тканям, могут дать хорошие клинические результаты. Однако применение таких лекарственных форм в медицинской практике ставит ряд очень важных вопросов.

Во-первых, успех лечения при применении дисперсных форм лекарственных препаратов зависит, прежде всего, от того, насколько полную информацию о судьбе наночастиц в

организме мы имеем. Поэтому очень важным является вопрос деградации наноносителей, которая в одних случаях может быть неполной, в других - полностью отсутствовать, что приводит к необратимому накоплению их в организме. Использование в качестве носителей эмульсий ПФУ, которые сравнительно быстро (от 3-7 суток до 1,5-2 лет) покидают организм, дает неоспоримые преимущества. Во-вторых, в отличие от многих наноразмерных носителей, которые высвобождают липофильные препараты только после интернализации носителей в клетку или после разрушения носителей, ПФУ наночастицы могут высвобождают препараты при простом контакте поверхности наночастиц с плазмалеммой клетки-мишени [Winter et al. 2007].

В последнее время установлено также, что адсорбция лекарственных препаратов на поверхности ПФУ наночастиц может иметь существенное значение для обеспечения процесса "загрузки" этих препаратов в стволовые клетки. Стволовые клетки, содержащие комплекс "ПФУ частица - лекарственный препарат", могут быть использованы в качестве транспортной системы адресной доставки загруженных в них веществ [Темпов и др. 2010, Темнов и др. 2010].

Успех применения дисперсных форм лекарственных препаратов, а также наноконтейнеров в качестве носителей лекарственных веществ зависит также от того, насколько мы понимаем биофизическую основу механизмов взаимодействия наночастиц с различными физиологически активными соединениями и системами организма [М. Роко и др. 2002]. Так, при внутривенном применении дисперсий и эмульсий вводится большая чужеродная поверхность дисперсных частиц, способная адсорбировать и, тем самым, на какое-то время частично выводить из кровотока различные компоненты плазмы крови (белки, липиды, липопротеидные комплексы и т.д.) [Склифас и др. 2002, Склифас и др. 2008, Goppert et al. 2005], что само по себе может привести к возникновению побочных реакций на введение мелкодисперсных эмульсий.

В настоящее время нет ясности относительно механизмов адсорбции плазменных белков на поверхности ПФУ наночастиц, а также практически отсутствуют сведения о том, в каком количестве и с какой динамикой происходит эта адсорбция. Известно лишь, что определенную роль в процессе адсорбции играет природа ПАВ, использованного в качестве стабилизатора эмульсии. Так *in vitro* на наночастицах, стабилизированных проксанолом 268, адсорбируется ряд плазменных белков, в то время как при замене проксанола на фосфолипиды яичного желтка, адсорбции белков плазмы не наблюдается [Склифас и др. 2002].

Таким образом, в настоящее время актуальными являются исследования, нацеленные на изучение механизмов взаимодействия мелкодисперсных сред с различными компонентами плазмы крови, где в качестве модели использованы ПФУ эмульсии, стабилизированные проксанолами, для получения высокоэффективных, безопасных и стабильных дисперсных лекарственных форм и наноносителей лекарственных препаратов. Цель

Исследование механизмов взаимодействия белков плазмы крови и ПФУ эмульсий, стабилизированных блоксополимерами полиоксиэтилена-полиоксипропилена. Задачи

1. Определить состав плазменных белков, адсорбированных на поверхности частиц ПФУ эмульсий, стабилизированных блоксополимерами полиоксиэтилена-полиоксипропилена.
2. Определить временные характеристики процесса адсорбции белков в условиях *in vivo* и *in vitro*.

3. Изучить зависимость состава и количества адсорбированных белков от химической природы ПФУ ядра и химической природы ПАВ и поверхности частиц эмульсии.
4. Изучить механизмы адсорбции белков на поверхности частиц ПФУ эмульсии (определить тип взаимодействия, ответить на вопросы: влияет ли липидное окружение белков на их адсорбцию; происходит ли адсорбция белков непосредственно на гидрофобном ядре частицы или на ее поверхностно-активном слое; происходит ли изменение конформации белков при их адсорбции).
5. Определить сорбционную емкость эмульсии по белкам плазмы в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Научная новизна Впервые:

- определен состав плазменных белков, сорбированных на поверхности ПФУ эмульсий, стабилизированных различными ПАВ (Проксанол - 268, Проксанол - 168, Synpreonic® F-108, Pluronic® P—123).
- идентифицированы плазменные белки (фибронектин, фибриноген, иммуноглобулин G, кластерин, аполипопротеин AI, аполипопротеин AIV, аполипопротеин C2, аполипопротеин E, сывороточный амилоидный белок A), сорбирующиеся на поверхности ПФУ эмульсии, стабилизированной проксанолом 268.
- определена сорбционная емкость различных эмульсий ПФУ по белкам плазмы крови *in vitro* (для человека и кролика) и *in vivo* - по белкам плазмы крови кролика.
- исследована динамика состава и количества адсорбированных белков плазмы на поверхности ПФУ эмульсии, стабилизированной проксанолом 268, в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, показано, что в условиях *in vitro* состав сорбированных белков не зависит ни от времени инкубации, ни от соотношения эмульсия/плазма; показано, что в условиях *in vivo* с увеличением времени циркуляции происходит увеличение сорбционной емкости эмульсии, причем максимальное значение достигается после 24 часов циркуляции; в течение первых 6 часов циркуляции не происходит изменения состава сорбированных белков, через 24 часа циркуляции состав сорбированных белков существенно изменяется.
- установлено, что состав сорбированных белков и сорбционная емкость эмульсии зависят от соотношения гидрофобных-гидрофильных блоков в молекуле ПАВ.
- установлено, что взаимодействие всех белков с массами ниже 200 кДа (за исключением белка с массой =55 кДа) на поверхности частиц происходит по гидрофобному, а белка с массой 200 кДа (IgG) - по электростатическому типу.
- показано, что липидное окружение белков препятствует полностью (белки плазмы человека с массой =50 и =60 кДа) или частично (аполипопротеин AI и фибриноген) адсорбции указанных белков на эмульсии.
- установлено, что флуоресценция белков, адсорбция которых идет по гидрофобному типу, является полностью или частично затухенной, что указывает на изменение конформации этих белков при их адсорбции.

Практическая значимость работы

Полученные данные представляют экспериментальные исследования механизмов сорбции белков на частицах эмульсий ПФУ, стабилизированных проксанолами, и имеют как теоретический, так и практический интерес. Они расширяют представления о

взаимодействии белков со сложной структурой частицы эмульсии, приводящем к конформационным изменениям в молекуле белка. Данные по удельной сорбционной емкости эмульсии при циркуляции ее в кровотоке должны учитываться при введении больших объемов любых дисперсных препаратов, стабилизированных проксанолами, особенно при определенных патологиях. Адсорбция на частицах белков плазмы, находящихся в небольших количествах, и изменение их физиологического состояния, пусть даже временно, может иметь негативные последствия для больного. В работе также показаны перспективы

использования эмульсий ПФУ, стабилизированных проксанолами 268 и 168, для препаративного выделения и очистки отдельных плазменных белков, что убедительно показано на примере выделения ApoJ.

#### Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на IV Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Казань, 2009 г.), на XIV международной Путинской школе-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века" (Пушино, 2010 г.), на IV международной конференции молодых ученых "Биология - от молекулы до биосферы" (Харьков, 2011 г.).

#### Публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе три статьи в реферируемых журналах.

#### Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 206 источников. Работа изложена на 101 страницах машинописного текста и содержит 36 рисунков и 2-таблицы.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Материалы

Для проведения экспериментов по адсорбции, а также при очистке белков использовалась цитратная плазма человека, полученная не менее чем от 30 индивидов. Время хранения плазмы при температуре -28°C не превышало 2-х недель.

#### Состав и приготовление экспериментальных ПФУ эмульсий

В экспериментах использовали полученные на гомогенизаторе Донор-1 эмульсии со средним диаметром частиц от 133 до 348 нм, следующего состава: 10 об.% смеси перфтордекалина и перфторциклогексилпиперидина в соотношении 2:1 либо вазелинового масла, 0.15M NaCl, 5мМ KCl, 1мМ MgCb, 8мМ  $\text{NaHCO}_3$ , 1.5мМ  $\text{NaH}_2\text{P}_4$ , ЮгаМ глюкоза. В зависимости от необходимости в смесь добавлялся одно из следующих ПАВ: 4% проксанол 268, 4% проксанол 168, 4% Synperonic® -F-108, 4% Pluronic® -P-123.

#### Методы работы с животными

В экспериментах использовались кролики породы Шиншилла с массой 3250-3700 г in питомника лабораторных животных ИБК РАН. Эмульсию вводили в краевую вену уха плеторически, в дозе 20мл/кг. Пробы крови, отбирали путем пункции краевой вены уха в пробирку, содержащую 3.7% цитрат натрия в соотношении 9:1 соответственно.

#### Определение времени насыщения эмульсин белками плазмы человека in vitro

Эмульсию в количестве 100 мкл инкубировали с плазмой крови человека в соотношении 1:1 в течение 5, 30 и 60 минут при 37°C. После этого эмульсию осаждали при 18000g в течение 15 минут. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл 0.2% проксанола 268. Процедуру повторяли трижды. После этого осадок (препарат высококонцентрированной эмульсии с адсорбированными белками) использовался для дальнейшего анализа.

Определение зависимости максимальной сорбционной емкости эмульсии по белкам от соотношения инкубационных объемов эмульсии и плазмы крови человека и кролика *in vitro*

Эмульсию смешивали с плазмой в соотношении 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:10, 1:15, 1:28, 1:30 для человеческой и 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:15 для кроличьей плазмы. Во все пробы (кроме пробы с соотношением 1:1) добавляли раствор ПАВ, используемого в эмульсии, до концентрации 0.75 вес/об%. ПАВ добавлялся с целью, чтобы концентрация проксанола во всех пробах была одной и той же, такой, какой она наблюдалась при смешивании эмульсии и плазмы в соотношении 1:1, то есть 0.75 вес/об.%. Пробы инкубировали при 37°C в течении 30 минут. В дальнейшем исследования проводили, как описано в пункте "Определение времени насыщения эмульсии белками плазмы человека *in vitro*".

Динамика сорбционной емкости эмульсии от времени циркуляции в кровотоке кролика

Эмульсию в дозе 20 мл/кг вводили в краевую вену уха кролика породы Шиншилла, Вес кроликов составлял 3250-3700 г. Пробы крови отбирали из краевой вены уха по 4 мл через 0.5, 1, 3, 6, 24 и 48 часов циркуляции эмульсии в кровотоке. Эмульсию осаждали центрифугированием в три стадии. На первой стадии 3 мл свежееотобранной крови центрифугировали при 200g в течение 10 минут. Плазму собирали в отдельную пробирку. На второй стадии осадок (эритроцитарная масса) центрифугировали при 4500g в течение 10 минут. Супернатант и форменные элементы отбрасывали, нижний гелеобразный осадок ресуспендировали в плазме, полученной на первой стадии. На третьей стадии полученную смесь центрифугировали при 15000g в течение 15 минут. Супернатант удаляли. Последующую отмывку осадка (препарат высококонцентрированной эмульсии, покрытой адсорбированными белками) от свободных белков плазмы проводили согласно пункту "Определение времени насыщения эмульсии белками плазмы человека *in vitro*". После процедуры отмывки препарат высококонцентрированной эмульсии использовался для дальнейшего анализа белков методом электрофореза.

Определение количества белка, адсорбированного на эмульсии в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

Измерения проводили на спектрофотометре Cary 100 UV-Vis, при длине волны 280 нм. Готовый препарат концентрированной эмульсии с адсорбированными на ней белками смешивали с 200 мкл метанола и интенсивно перемешивали до полного растворения осадка эмульсии (это действие вызывает разрушение дисперсии и разделение содержимого на 2 фазы: Г1ФУ и раствор спирта). К полученному раствору, содержащему хлопья белка и капли фторуглеродов, добавляли 0.8 мл ЮМ мочевины и тщательно перемешивали. После этого смесь центрифугировали при 18000g в течение 5 минут. Водную фазу отбирали и переносили в кварцевую ювету, содержащую 1 мл дистиллированной воды. Базовую линию получали, используя 2 мл 4.4М раствора мочевины.

Использование других методов определения концентрации белка (методы Лоури и Мэрион Брэдфорд) оказалось невозможным в связи с тем, что наличие детергента (проксанола) в пробе приводит к значительному искажению результатов, получаемых с помощью этих методов.

#### Экстракция липидов плазмы крови человека

Плазму человека смешивали с 1,1,2-трифтортрихлор-этаном (F-113) в соотношении 1:1, после чего интенсивно перемешивали в течение 10 минут. Полученную смесь центрифугировали в течение 10 минут при 23000g. Нижнюю фазу и интерфазу удаляли. К верхней фазе добавляли F-113, в соотношении 1:1. Процедуры смешивания с F-113 и центрифугирования повторяли трижды. Полученную в результате верхнюю фазу, содержащую плазму крови человека, лишенную липидов, использовали сразу не замораживая.

#### Очистка ApoA1

Плазму человека разводили в два раза фосфатным буфером и наносили на колонку с сефарозой С1-4В с иммобилизованными моноклональными антителами мыши к человеческому ApoA1 (ООО "ИМТЕК"). Колонку промывали 100 мл PBS (1.7 мМ KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>, 5.2 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 мМ NaCl, pH 7.4). Для элюции использовали 5 мл буфера, содержащего 0,1М NaCl, 0,1М СПзСООЫа, pH 2.5. Элюент собирали непосредственно в мембранный концентратор Amicon'1' Ultra 50000 MWCO (Millipore, Ireland), в который предварительно добавляли 9 мл фосфатного буфера и 0.7 мл 1М дитиотреитола. Полученную смесь концентрировали и диализовали против фосфатного буфера в этом же концентраторе. Концентрированный раствор белка переносили в отдельную пробирку и центрифугировали при 18000g в течение 10 мин. Осадок удаляли. Чистота белка по электрофорезу в полиакриламидном геле составила >95%.

#### Насыщение эмульсии белками плазмы

Плазму крови человека инкубировали в течение 30 минут при 37°C со 100 мкл эмульсии в соотношении 10:1 (для экспериментов по измерению флуоресценции белка) и 1:1 (для экспериментов с замещающими растворами), либо с 0.5 мл раствора чистого ApoA1 в концентрации 1 мг/мл в фосфатном буфере (PBS) (KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub> - 1.7мМ, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 5.2мМ, NaCl

-б- - 150мМ). Затем частицы эмульсии осаждали при 18000g в течение 15 минут. Супернатант удаляли. Осадок, представляющий собой осажденные частицы эмульсии, покрытые адсорбированными белками, ресуспендировали в 1мл 0.2% раствора проксанола в воде, полученную эмульсию вновь центрифугировали при тех же условиях. Процедуры ресуспендирования и центрифугирования повторяли трижды. После этого полученный осадок эмульсии ресуспендировали в 0.5 мл 0.2% раствором проксанола, готовый препарат эмульсии с адсорбированными белками использовался в дальнейших экспериментах.

Отмывка эмульсии от адсорбированных плазменных белков водными растворами веществ» деадсорбирующих эти белки

Эмульсию инкубировали с плазмой человека, как описано в пункте "Определение времени насыщения эмульсии белками плазмы человека *in vitro*". При первом ресуспендировании в отмывочный раствор добавляли одно из нижеперечисленных веществ до концентраций: Tween 20 (3.5%), Triton X305 (3.5%), NaCl (1.5М). Две последующие отмывки от свободного белка проводили с использованием 1мл 0.2% раствора проксанола в воде.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для решения поставленных выше задач нами было решено разбить работу на 3 основных этапа: (1) определение удельной сорбционной емкости эмульсии; (2) определение механизмов сорбции плазменных белков; (3) изучение влияния химического состава ПАВ на адсорбцию белков плазмы.

Усовершенствование метода отделения эмульсии от неадсорбированных белков. Перед проведением экспериментов по определению качественной и количественной сорбции, с целью снижения потерь белка с поверхности эмульсии, необходимо было произвести оптимизацию методики по очистке эмульсии от неадсорбированных белков. При стандартном методе подготовки препаратов адсорбированных белков [Склифас и др. 2002] эмульсия трижды отмывается дистиллированной водой. Однако, в виду того, что слой стабилизирующего ПАВ не закреплен на поверхности ПФУ ядра, а находится в динамическом равновесии с окружающей средой, при отмывке водой происходит постоянная диссоциация молекул ПАВ в окружающий раствор. Вследствие этого происходит слияние части ПФУ ядер, приводящее к снижению общей сорбционной поверхности и, как следствие, десорбции части белка.

Для стабилизации эмульсии в процессе отделения от неадсорбированных белков, нами было предложено проводить ее отмывку 0.2% раствором проксанола. На рисунке 1 представлены результаты эксперимента по сравнению концентрации белка, остающегося в супернатанте, после осаждения эмульсии при отмывке от неадсорбированных белков.

Хорошо видно, что уже при первой отмывке появляется незначительное различие в концентрации белка в супернатанте. При второй отмывке это различие становится достоверным. Концентрация белка в супернатанте третьей отмывки пробы, содержащей 0.2% проксанола 268, не превышает 1мкг/мл.

0 12 3

номер отмывки ■ H<sub>2</sub>O H<sub>0.2%</sub> проксанол 268

Рис. 1. Оптическая плотность супернатанта, оставшегося после осаждения эмульсии, в процессе отмывки от несорбированных белков (п—8). НЮ — эмульсия, промываемая водой, 0.2% проксанол 268 — эмульсия, промываемая 0.2% раствором проксанола. Оптическая плотность измерялась в области максимума поглощения пептидной связи для получения максимальной чувствительности детекции белка. Здесь и далее по всем рисункам, область погрешности отображает стандартное отклонение.

Исходя из полученных результатов, для отделения эмульсии от неадсорбированных белков нами было решено использовать 0.2% раствор проксанола вместо дистиллированной воды.

Определение оптимального времени инкубации эмульсии с плазмой. В экспериментах с плазмой крови важно было определить время инкубации, по истечении которого практически достигается величина максимальной сорбционной емкости эмульсии по белкам для какого-либо конкретного значения соотношения объемов эмульсии и плазмы. При выбранном соотношении эмульсии и плазмы 1:1 время инкубации составляло 5, 30 и 60 минут. Как видно из представленных на Рис. 3 данных, в закрытой системе при смешивании плазмы и эмульсии 1:1 после 5 мин инкубации достигается практически полное насыщение эмульсии белками плазмы крови, достоверной разницы в количестве адсорбированных белков на частицах эмульсии при увеличении времени инкубации до 30 и 60 минут не наблюдается. Электрофорез адсорбированных на эмульсии белков показал,

что состав их (Рис. 2) в зависимости от времени инкубации также практически не меняется. Основными белками, адсорбированными на эмульсии, являются белки с молекулярными массами около 12, 25, 32, 44, 55, 70 200 кДа и выше. Исходя из полученных данных, в дальнейших экспериментах нами было выбрано время инкубации равное 30 минутам.

30 60

Рис. 2. Электрофорез белков, адсорбированных на поверхности эмульсии в условиях *in vitro*. Соотношение эмульсии к плазме 1:1. Цифрами обозначены: 5 - инкубация эмульсии с плазмой в течение 5 минут: 30 — инкубация эмульсии с плазмой в течение 30 минут: 60 — инкубация эмульсии с плазмой в течение 60 минут: М - маркер молекулярных масс.

Зависимость адсорбции белков от времени инкубации

i время инкубации

Рис. 3. Количество общего белка плазмы крови человека, адсорбированного на эмульсии в зависимости от времени инкубации в условиях  $pH \approx 7.4$  ( $p=6$ ).

Влияние ПАВ и гидрофобного ядра на адсорбцию плазменных белков

Рассматривая процесс белковой адсорбции в целом, возникает закономерный вопрос: какое влияние на этот процесс оказывают химическая природа гидрофобного ядра и используемое ПАВ?

Для выяснения влияния стабилизирующего ПАВ на общее количество и состав адсорбированных плазменных белков мы использовали четыре эмульсии с одинаковым гидрофобным ядром (перфтордекалин и перфторциклогексилпиперидин в соотношении 2:1) и различными стабилизирующими ПАВ: проксанолом 168, проксанолом 268, Pluronic® P-123 и Synperonic® F-108. Молекулы всех вышеперечисленных ПАВ имеют одинаковые по химическому составу гидрофобные (PPG) и гидрофильные (PEG) блоки, различие состоит лишь в размере этих блоков.

Физико-химические параметры ПАВ, а также физические параметры полученных на их основе эмульсий представлены в таблице 1.

Таблица 1. Химико-физические параметры ПАВ и эмульсий на их основе

Название Мол. масса, кДа Соотношение PEG-PPG-PEG Ср. разм. частиц эмульсии, нм Пл. поверх. 1 см<sup>3</sup> эмульсии, см<sup>2</sup>

Проксанол - 268 13 130-38-130 133 45113

Проксанол - 168 8 73-28-73 279 21505

Synperonic® F-108 14.6 133-50-133 261 22989

Pluronic® P-123 5.8 19-69-19 348 17241

Результаты эксперимента по качественному составу адсорбированных белков плазмы в зависимости от химической структуры ПАВ представлены на рисунке 4. На поверхности эмульсии, стабилизированной Pluronic® P-123, молекула которого имеет наиболее длинную гидрофобную площадку и относительно короткие гидрофильные концы, адсорбируются только белки с массой выше 50 кДа (Рис. 4, трек 123). На поверхности эмульсии, стабилизированной Synperonic® F-108, адсорбируются белки с массой от 25 кДа до 50 кДа, а высокомолекулярные белки практически не адсорбируются (Рис. 4, трек 108). Состав белков, адсорбированных на эмульсии, стабилизированной проксанолом 168, соответствует качественному составу белков, адсорбированных на эмульсии,

стабилизированной проксанолом 268 (Рис. 4, трек 168 и 268). Необходимо отметить, что несмотря на идентичный состав белков, адсорбированных на эмульсиях, стабилизированных проксанолами 268 и 168, соотношение между адсорбированными белками меняется. Так на

M 123 108 268 168

116 ц

60 ..

3S • • ' -

Рис. 4. Электрофорез белков, адсорбированных на эмульсии, стабилизированной различными ПАВ: 123 - РЫготс® Р-123; 108 - Вупреготс® Г-108; 268 - проксанол 268; 168 - проксанол 168; М—маркер молекулярных масс. Соотношение эмульсий к плазме 1:1.

- 10-

эмульсии, стабилизированной проксанолом 268, соотношение адсорбированных белков с молекулярными массами около 18 кДа, 40 кДа, 80 кДа к белкам с массами около 14 кДа, 25 кДа и 50 кДа будет значительно меньше, чем соотношение этих же белков на эмульсии, стабилизированной проксанолом 168. При изменении ПАВ может проявляться не только изменение соотношения адсорбированных белков, но и происходить сорбция новых. Так на эмульсии, стабилизированной Р1гошс\*<sup>1</sup> Р-123, происходит сорбция белка с массой = 60 кДа, а на эмульсии стабилизированной Бупрегошс® Р—108 белка с массой = 35 кДа.

Важно обратить внимание на то, что из всех эмульсий только эмульсия, стабилизированная Р1гошс® Р—123, адсорбирует незначительное количество белков плазмы по сравнению с остальными эмульсиями (Рис. 4). Кроме того, на ней не адсорбируются гидрофобно-связывающиеся белки, такие как АроЕ (36 кДа), Аро] (75 кДа), вАА (12.5 кДа), 0,09 ,

5 0,08 -----т— ■ -----

г ^ о,07

го °

х 0,06

га 5

g к" 0,05

f í";

ю о 0 04

I & °. °з

а. ш £ g 0,02 а)

? 0,01 о

\* О

□ 123

0168

Рис. 5. Количество белков плазмы крови, адсорбированных на 1 см<sup>2</sup> поверхности эмульсии перфторуглеродов, стабилизированных различными ПАВ. На диаграмме представлены

результаты для эмульсий, стабилизированных: 123 — Pluronic P-123; IOS — Synperonic" F-108; 268 - проксанол 268; 168 — проксанол 168.

АроА1 (25 кДа), АроС2 (14 кДа). АроА4 (46 кДа). Если проанализировать соотношение длин

гидрофобной и гидрофильных частей молекул использованных нами ПАВ, то можно отметить, что для всех ПАВ, кроме Pluronic® P-123, это соотношение  $< 1$ , и только для Pluronic" P-123 это соотношение значительно  $> 1$ . Из имеющихся данных следует, что между размером гидрофобной части молекулы ПАВ и количественной сорбцией белка наблюдается обратно пропорциональное соотношение с коэффициентом корреляции  $-0.97$ .

Возможно, что наличие большой гидрофобной площадки и коротких гидрофильных концов

приводит к тому, что происходит образование плотного слоя ПАВ на поверхности гидрофобного ядра, что препятствует закреплению белков на поверхности частицы.

Результаты эксперимента по определению общего количества белков представлены на рисунке 5. Из данных видно, что наибольшая сорбционная емкость наблюдается у эмульсий,

стабилизированных проксанолами 268 и 168, а наименьшая в эмульсии, стабилизированной

- 11 -

Р1игошс4 P-123. Анализируя эти данные, можно отметить, что изменение стабилизирующего ПАВ приводит к значительному изменению в количестве и составе адсорбированных белков.

Для определен<sup>TM</sup>, в какой степени на адсорбцию белков оказывает гидрофобное ядро эмульсии, нами была подготовлена эмульсия, стабилизированная проксанолом 268, но с гидрофобным ядром, состоящим из вазелинового масла. Это вещество было выбрано нами, т.к. оно обладает высокой текучестью и крайне высокой гидрофобностью (т.к. является смесью насыщенных углеводов), чем физически сильно схоже с используемыми нами ПФУ. Размер частиц для этой эмульсии составил около 348 им. На рисунке 6 представлен электрофорез белков плазмы человека, сорбированных на такой эмульсии. Как можно видеть, на эмульсии, содержащей гидрофобное ядро из вазелинового масла, наблюдается адсорбция всех основных

'Щ

200 „-4

150;

120:

100:1

85

70 \* '

60

50

40 —...

30 ■■■■/ж

25

» 15§

Рис. 6. Электрофорез белков плазмы человека, сорбированных на эмульсии, содержащей вазелиновое масло в качестве гидрофобного ядра и стабилизированной проксанолом 268. белков, адсорбирующихся на поверхности эмульсии с ПФУ ядром (АроА1 (25 кДа), АроЕ (36

кДа), АроА4 (46 кДа), АроД (75 кДа)), при этом их пропорциональное соотношение не претерпевает значительных изменений. Несмотря на это есть некоторые различия по сорбции минорных белков (с массами = 52, = 60, = 130, = 170 и > 200 кДа). Адсорбция этих

белков может быть объяснена тем, что ядро из углеводов может иметь несколько иную

силу и форму взаимодействия со стабилизирующим ПАВ, что и может приводить к изменению состава адсорбирующихся белков. Важно отметить, что изменения преимущественно затронули высокомолекулярную область, сорбция в которой (как было нами показано выше) не основывается на гидрофобном взаимодействии, а значит, определяется лишь свойствами стабилизирующего ПАВ.

Таким образом, выполненные эксперименты показали, что состав сорбированных белков и сорбционная емкость эмульсии зависят, главным образом, от соотношения гидрофобных-

гидрофильных блоков в молекуле ПАВ и мало зависят от химической природы гидрофобного ядра.

Механизмы адсорбции белков на эмульсии

Исходя из литературных данных, в отношении ПФУ эмульсий можно было ожидать, что адсорбция белков на частицах происходит либо вследствие электростатического взаимодействия белков с поверхностью частиц, поскольку частицы эмульсии отрицательно заряжены, либо вследствие гидрофобного взаимодействия белков с поверхностью фторуглеродного ядра частиц. Поэтому нами была поставлена задача выяснить, по каким механизмам происходит связывание белков плазмы с частицами эмульсии. Для решения этой задачи был использован метод снятия плазменных белков с поверхности эмульсионных частиц веществами, способными конкурентно по заранее известному механизму замещать эти белки. В качестве таких веществ нами были выбраны Tween 20 и Triton X305 для тестирования гидрофобного взаимодействия, и NaCl для проверки электростатического взаимодействия.

Рис. 7. Электрофорез белков плазмы крови, адсорбированных на поверхности эмульсии и отмытых: / - 0.2% раствором проксанола (контроль); 2 - 0.2% раствором проксанола + 1.5M NaCl, (а - отсутствует IgG'■); 3 0.2% раствором проксанола (плазма после экстракции с F-113, б, в - белки, адсорбированные после экстракции липидов, г, д -увеличившиеся в количестве фибриноген и АроА1); 4 - 0.2% раствором проксанола + 3% Triton X305, (е -

отсутствует ApoJ); 5 - 0.2% раствором проксанола + 3% Tween 20 (деадсорбированы все белки с массами ниже 200кДа, за исключением белка с массой ~50кДа); M-маркер молекулярных масс.

Выявление плазменных белков, сорбция которых происходит в результате электростатического взаимодействия

На Рис. 7 представлен электрофорез белков плазмы крови человека, адсорбированных на частицах эмульсии (Рис. 7, дорожка 1 (контроль)). Как видно из Рис. 7 (дорожка 2),

-13-

добавление NaCl приводит к десорбции белка с молекулярной массой около 200 кДа, идентифицированного нами методами MALDI-TOF и иммуноблоттингом как IgG, что указывает на то, что IgG связывается с поверхностью частиц ПФУ эмульсий посредством электростатического взаимодействия. Из литературных данных известно, что IgG проявляет значительное неспецифическое сорбционное сродство к заряженной поверхности [Fischer 1982, Дин и др. 1988]. При создании в наших экспериментах достаточно высокой концентрации NaCl, вероятно, происходит образование многослойной ионной оболочки между заряженными группами белка и поверхностью частиц эмульсии, что и приводит к ослаблению электростатического взаимодействия между белковой глобулой и поверхностью частицы эмульсии. IgG был единственным бежом, который десорбировался при добавлении NaCl.

Выявление плазменных белков, сорбция которых происходит в результате гидрофобного эффекта

Для определения белков, связанных с частицами эмульсии по типу гидрофобного эффекта, мы использовали в качестве конкурентных веществ Triton X305 и Tween 20, имеющие различные химические структуры и, тем самым, отличающиеся по способности проникать в области гидрофобного взаимодействия белка и эмульсии. Как видно из рисунка 7 (дорожка 4) при добавлении Triton X305 практически полностью исчезает полоса, содержащая ApoJ.

При использовании Tween 20 наблюдается десорбция с эмульсии не только ApoJ, но и всех остальных белков с молекулярными массами ниже 200 кДа (за исключением белка с массой = 55 кДа). Вероятно, это происходит в связи с отсутствием у молекулы Tween 20 длинного октального конца, что позволяет молекуле этого детергента более легко входить в зазор между поверхностью частицы эмульсии и молекулой белка в отличие от Triton X305. Из десорбируемых Tween 20 белков методом MALDI-TOF был идентифицирован белок ApoAI с молекулярной массой == 28 кДа, который был использован для дальнейшего, более детального изучения механизма адсорбции.

Влияние липидов в составе ApoAI на его адсорбцию

Поскольку ApoAI входит в состав комплексов ЛПВП [Silva et al. 2008], то важно было проверить, происходит ли сорбция этого белка опосредованно, через липидные мостики, или же непосредственно на поверхности частицы эмульсии. С этой целью эмульсия была проинкубирована с плазмой, из которой с помощью F-113 были экстрагированы липиды [Ceneviva and Camargo 1979, Yu-Chen et al. 1999]. Как видно из рисунка 7, дорожка 3, удаление липидных компонентов не воспрепятствовало сорбции ApoAI, а наоборот привело к увеличению его количества, а также к сорбции новых белков с массой = 60кДа и = 50кДа, и к повышению количества адсорбированного IgG. Также, нами было установлено, что после

экстракции липидов с помощью F-113, общее количество адсорбированных белков увеличивается на  $35 \pm 2\%$  (на основании данных фотоколориметрии), причем наибольший вклад в увеличение сорбции приходится на ApoA1 и фибриноген (см. Рис. 7, трек 3).

Объяснить увеличение количества адсорбированных белков после экстракции липидов из плазмы можно тремя различными предположениями. Во-первых, удаление связанных с белками липидов, вероятно, приводит к высвобождению гидрофобных областей этих белков, а следовательно, к увеличению их адсорбционной способности (увеличению аффинности белков по отношению к частицам эмульсии). Во-вторых, есть вероятность того, что при удалении липидного лиганда создаются условия, в которых белки могут принять более компактную конфигурацию, что приводит к повышению общего уровня плотности белковой оболочки на поверхности частицы. И, в-третьих, эмульсия способна адсорбировать на своей поверхности значительное количество липидов [Borges et al., 1967, Ladbroke et al., 1968, Lecuer et al., 1969], что приводит к конкуренции между липидами и белками за адсорбирующую поверхность эмульсии. Удаление же липидов устраняет эту конкуренцию, что позволяет адсорбироваться большему количеству белков.

#### Изучение влияния адсорбции на флуоресценцию ApoA1

Известно, что спектр флуоресценции белка, а так же ее интенсивность может отражать состояние областей белка непосредственно прилегающих к триптофану. Например, спектр может сместиться в синюю область при снижении полярности в окружении триптофана. Также может произойти снижение квантового выхода, связанное с добавлением тушителя (например, кислорода).

Эксперименты выполнялись на ApoA1, который был получен, как указано в разделе "материалы и методы", и который затем был адсорбирован на эмульсию. ApoA1, как было показано выше, связан с поверхностью частиц эмульсии по гидрофобному типу

j

/

ч

N

ч

ч

I

1 / Ч

! ? (

2,3

300 " " " ^ " зЗГ " 1 ..... МО ..... " 360 380 " ..... " 300

Длина волны, нм

Рис. 8. Интенсивность флуоресценции: 1 - не связанный с липидами ApoA1 в PBS; 2 - ApoA1 в адсорбированном на эмульсии состоянии; 3 - ApoA1, адсорбированный на эмульсии после барботирования аргоном. ^ \_

взаимодействия, и в результате увеличения гидрофобности окружения белка можно было ожидать смещение спектра в синюю область по отношению к спектру белка в водном

растворе. Оказалось (см. рисунок 8, кривая 2), что эмиссия фотонов молекулами AroAl, адсорбированными на поверхности эмульсии, практически полностью отсутствует.

Поскольку эмульсия является многокомпонентной системой, возникает вопрос, (1) не являются ли отдельные составляющие эмульсии тушителями флуоресценции белков, (2) не является ли светорассеивание на поверхности мелкодисперсных частиц или (3) присутствие растворенного в ПФУ кислорода причиной отсутствия флуоресценции белка. Известно, что кислород является сильным тушителем триптофановой флуоресценции [Лакович 1986, Пермяков 2003]. Флуоресценция BSA снижается в 2.5 раза при концентрации  $O_2$ , равной 0.1М [Лакович 1986]. Поскольку растворимость кислорода в ПФУ примерно в 20 раз выше (концентрация  $O_2$  в используемых нами ПФУ составляла примерно 1М при нормальных условиях), чем в воде [Wessler et al., 1977], необходимо было проверить возможный эффект тушения со стороны кислорода, растворенного во фторуглеродном ядре. Для этого эмульсию барботировали аргоном или углекислым газом, пропуская объем газа не менее 2000 объемов эмульсии в течение 30 мин, после чего полученную эмульсию насыщали AroAl в контролируемой атмосфере. Затем снимали спектр флуоресценции. Из рисунка 8, кривая 3 можно видеть, что после процедуры барботации и снижения концентрации кислорода во фторуглероде, тушение флуоресценции адсорбированного на эмульсию AroAl не устранялось.

Для проверки одного из компонентов эмульсии - проксанола, как тушителя триптофановой флуоресценции, мы сравнили интенсивность флуоресценции растворов нативного AroAl в концентрации 40мкг/мл в присутствии 2.5% проксанола и без него, а также чистого d-триптофана (концентрация подбиралась по совпадению максимума флуоресценции с максимумом полученным для 40мкг/мл AroAl) в присутствии 2.5% проксанола и без него. Ни для AroAl, ни для d-триптофана нами не было обнаружено различий в интенсивности флуоресценции после добавления проксанола.

Для проверки возможного влияния рассеивания света на поверхности частиц собственно эмульсии на регистрацию флуоресценции, мы сравнили интенсивность флуоресценции белка, не адсорбирующегося на эмульсии (человеческий сывороточный альбумин (HSA)), в чистом растворе и в присутствии эмульсии. В результате этих экспериментов мы установили, что добавление эмульсии к раствору белка снижает интенсивность флуоресценции белка примерно на 30%, однако не приводит к полному ее затуханию.

Проверить, какое влияние на флуоресценцию оказывают входящие в состав эмульсии перфторуглероды, не представлялось возможным, поскольку мы использовали нерастворимые в воде перфторуглероды. Однако Chen et al. в работе [Chen and Guo, 2009] рассматривали влияние различных растворимых в воде фторуглеродных соединений, которые содержат

большое количество атомов фтора относительно других атомов, на интенсивность флуоресценции раствора HSA. Согласно их данным, интенсивность флуоресценции снижалась в несколько раз при концентрации фторсодержащих соединений, не превышающих  $3 \times 10^{-4}$  мМ.

Полное затухание белка может казаться методической ошибкой, однако в литературе имеется еще одно описание эффекта полного затухания флуоресценции белка [Borah et al., 2010] - полное тушение флуоресценции бычьего сывороточного альбумина (BSA), адсорбированного на поверхности частиц магнетита ( $Fe_3O_4$ ), модифицированного тримезиновой кислотой. Авторы полагают, что это тушение вызвано контактом большого

количества карбоксильных групп на поверхности частиц модифицированного магнетита с триптофановыми остатками молекулы BSA.

Таким образом, мы полагаем, что белок, несущий большие гидрофобные области на своей поверхности и при этом имеющий достаточно маленький размер, проникает в проксанольную оболочку и приближается к гидрофобному перфторуглеродному ядру, экспонируя на него свои гидрофобные области (Рис. 9). Следствием этого является появление в области контакта достаточно высокой концентрации фторуглерода, который вызывает тушение триптофановых остатков.

В своей работе Бипёду<sup>^</sup> Й а1. показал, что увеличение радиуса частицы до размера, при котором она становится значительно крупнее размера адсорбирующегося на её поверхности белка, приводит к увеличению конформационных изменений в структуре этого белка, приводящих к его изменению на адсорбирующей поверхности [Бипс<sup>^</sup>У1з1 е1 а1., 2004]. Учитывая тот факт, что частицы эмульсии в сравнении с белком имеют относительно большой размер, можно предположить, что при контакте АроА1 с поверхностью перфторуглеродной частицы происходит изменение пространственной структуры белка аналогично тому, как изменялась конформация адсорбированного белка в описанной выше работе. По-видимому, в нашем случае происходит контакт с ПФУ ядром всех гидрофобных областей белка, в результате чего, молярная концентрация фторуглерода в окружении триптофана становится

настолько высока, что происходит полное тушение его флуоресценции.

" - 17-

Влияние ПФУ на флуоресценцию белков плазмы человека, связанных с поверхностью частиц эмульсии по гидрофобному типу

В экспериментах с использованием АроА1, связанного с частицами эмульсии по гидрофобному типу, мы показали эффект полного тушения флуоресценции. Однако при сорбции белков плазмы крови на частицах эмульсии присутствуют и другие гидрофобно связанные белки, а также белки, связанные с ее поверхностью, например, электростатически. С

Дама еоякм. км

Рис 10. Интенсивность флуоресценции: 1 - всех белков плазмы человека, способных к адсорбции на эмульсии; 2 белков плазмы, адсорбция которых основана на негидрофобном эффекте.

целью выяснить, оказывает ли тушащее воздействие на эти белки гидрофобное ядро частиц эмульсии, мы провели сравнительное изучение интенсивности флуоресценции белков плазмы крови, адсорбированных на эмульсии в контрольных условиях (отмывка 0.2% проксанолом), и белков плазмы, адсорбированных на эмульсию и оставшихся на ней после отмывки Tween 20. Результаты этих экспериментов представлены на рисунке 10. Как видно, полный набор сорбированных белков, адсорбированных на эмульсии в контрольных условиях (кривая 1) имеет почти в два раза меньшую интенсивность флуоресценции, чем только часть сорбированных белков плазмы, оставшихся на эмульсии после отмывки Tween 20 (кривая 2). Полученный результат указывает не только на то, что все белки, адсорбирующиеся по гидрофобному типу в адсорбированном состоянии имеют сниженную либо полностью потушенную флуоресценцию, но и, учитывая пониженную флуоресценцию всего набора адсорбированных белков по сравнению с флуоресценцией

части белков, на то, что флуоресцентно-активные белки частично экранированы белками с полностью или частично потушенной флуоресценцией.

Сорбционная емкость эмульсии

Поскольку ПФУ эмульсии могут вводиться внутривенно в больших количествах (до  $U >$  от объема крови), важно было определить, какое максимальное количество белка может связаться

с эмульсией и таким образом быть выключенным из циркуляции в кровотоке. С этой целью

мы провели ряд экспериментов по определению зависимости адсорбции от соотношения

- 18 -

между эмульсией и плазмой, а также величину максимальной сорбционной емкости эмульсии по белкам плазмы человека и кролика в условиях *in vitro*, а для кролика также *in vivo*. Зависимость сорбционной емкости от соотношения эмульсии к плазме В следующей серии экспериментов была изучена зависимость сорбционной способности эмульсии от соотношения объемов эмульсии и плазмы крови.

объемное соотношение эмульсии к плазме

Рис. 11. Количество белков плазмы человека, адсорбирующихся на поверхности эмульсии, стабилизированной проксанолом 268 в зависимости от соотношения эмульсии к плазме при инкубации *in vitro* ( $n=8$ ). Коэффициент Хилла для приведенных в диаграмме данных составляет  $h = 0.004$ .

Результаты измерений суммарного количества адсорбированных на эмульсии плазменных белков после 30 минутной инкубации при разных соотношениях эмульсии и плазмы представлены на рисунке 11. Из представленной на рисунке диаграммы видно, что с уменьшением соотношения объема эмульсии к объему плазмы от 1:1 до 1:10 наблюдается рост сорбционной емкости эмульсии. Предельная сорбционная емкость по белкам, равная  $3.2 \pm 0.18$  мг белка на 1 мл эмульсии, достигается при соотношениях эмульсии к плазме 1:10 и ниже.

На Рис. 12 представлены данные электрофореза белков плазмы крови человека, адсорбированных на эмульсии в зависимости от соотношения эмульсии и плазмы. Как видно

из рисунка, качественная картина адсорбированных на эмульсии белков не меняется, однако

наблюдается увеличение количества каждого белка при уменьшении соотношения эмульсии

к плазме. Аналогичные результаты были получены в экспериментах по изучению зависимости сорбционной способности эмульсии от соотношения объемов эмульсии и плазмы крови кролика - предельная сорбционная емкость эмульсии по белкам также достигается при соотношениях эмульсии и плазмы, равными 1:10 и ниже. Однако при этом

количество адсорбированного белка на 1 мл эмульсии оказывается существенно ниже (более

чем в 2 раза) и равно  $1.5 \pm 0.13$  мг белка. Существенно более низкая сорбционная емкость эмульсии по белкам плазмы крови кролика в сравнении с аналогичной величиной плазмы человека, вероятно, связана с видовой специфичностью, поскольку суммарное количество

- 19-

Рис. 12. Электрофорез белков плазмы крови человека, адсорбированных на поверхности эмульсии при различных соотношениях эмульсии к плазме в процессе инкубации *in vitro*. Цифрами обозначены соотношения эмульсии к плазме.

белков в плазме кролика и человека практически одинаково.

Сорбционная емкость эмульсии по белкам плазмы кролика в условиях *in vivo*

Полученные данные в экспериментах *in vitro* показали, что количество адсорбированного на эмульсии белка зависит в значительной степени от соотношения эмульсии и плазмы. Как

известно из литературы [Склифас и др. 1998], при длительной циркуляции эмульсии в кровотоке, количество эмульсии постепенно снижается, так что соотношение эмульсия/плазма также снижается, что само по себе может приводить к увеличению сорбционной емкости эмульсии, как это следовало из данных экспериментов *in vitro*. Далее, выведение проксанола как свободного, так и с поверхностно-активного слоя частиц, который

достаточно быстро покидает кровеносное русло [Воробьев и др. 1988] и, по-видимому, замещается компонентами плазмы крови, также может повлиять на величину сорбционной способности остающейся в кровотоке эмульсии. Поэтому, исходя из указанных соображений, важно было исследовать сорбцию плазменных белков на частицах эмульсии при длительной циркуляции ее в кровотоке.

На Рис. 14 приведены данные электрофореза белков, адсорбированных на частицах эмульсии в зависимости от времени циркуляции ее в кровеносном русле. При циркуляции эмульсии в кровеносном русле до 6 часов включительно состав адсорбированных белков аналогичен составу адсорбированных белков в условиях *in vitro* (белки с молекулярной массой около 10 кДа, 13 кДа, 27 кДа, 40 кДа, 55 кДа и выше 200 кДа (Рис. 13)). После 24-часовой циркуляции эмульсии в кровотоке (Рис. 14, дорожка 5) наблюдаются значительные

изменения в качественном составе адсорбированных белков. На частицах ПФУ эмульсии появляются новые белки с молекулярными массами около 28,

-20-

M 1 2 3 4 S ^

Рис. 13. Электрофорез белков плазмы крови кролика, адсорбированных на поверхности эмульсии, после инкубации в условиях *in vitro*. Соотношение эмульсии к плазме 1:1, время инкубации 30 мин.

Рис. 14. Электрофорез белков плазмы крови кролика, адсорбированных на поверхности эмульсии, после инкубации в условиях *in vivo*. Результаты представлены на двух рисунках и отображают одну и ту же картину, но с разным масштабом. Под номерами обозначены пробы эмульсии, отобранные через разные временные промежутки после введения эмульсии в кровоток: 1 - через 15 минут; 2 - через 1 час; 3 - через 3 часа; 4 - через 6 часов; 5 - через 24 часа; М - маркер молекулярных масс.

50 и 150 кДа и исчезают белки с молекулярными массами 25 и 40 кДа.

Изменения в качественном составе адсорбированных белков, вероятно, происходят в связи с тем, что проксанол, как указано выше, достаточно быстро выводится из кровеносного русла, и десорбция указанных

выше белков (25 и 40 кДа) на поздних сроках циркуляции может быть связана с тем, что эти белки были адсорбированы не на гидрофобной поверхности частицы, а на поверхностно-активном слое (проксаноле), в процессе выведения которого они также покидают частицы эмульсии. Кроме того, появление новых белков (28, 50 и 150 кДа) на частицах эмульсии при длительной (до 24 часов) циркуляции, косвенно указывает на то, что на частицах эмульсии в качестве стабилизатора выступают компоненты плазмы крови, в том числе и новые плазменные белки, которые при наличии проксанола на частице не могли адсорбироваться на ее гидрофобной поверхности.

Как указано выше, при циркуляции эмульсии в кровотоке снижается не только содержание проксанола [Воробьев и др. 1988], но и содержание ПФУ, которое с увеличением времени циркуляции эмульсии в кровотоке падает [Склифас и др. 1998]. Это приводит к снижению отношения объема эмульсии к объему плазмы, что необходимо учитывать при определении сорбционной емкости эмульсии. Содержание ПФУ эмульсии в образцах крови в зависимости от времени циркуляции (определялось по количеству ПФУ методом ЯМР - спектроскопии), представлено на Рис. 15.

ш

Зч еч 24ч 48ч

Е1 Кролик 1 ШКролик 2 QКролик 3

Рис. 15. Количество ПФУ эмульсии, циркулирующей в кровотоке кролика в различные моменты времени после ее введения. Количество ПФУ, находящееся в кровотоке в различные моменты времени после введения эмульсии, составляет 1:10 от указанного количества ПФУ эмульсии. Приведены данные измерений отдельно для каждого животного.

1ч 3ч 6ч 24ч 48ч

О Кролик 1 В Кролик 2 □ Кролик 3

Рис. 16. Количество белков плазмы крови кролика, адсорбирующихся на поверхности эмульсии, отобранной через разные временные промежутки в процессе инкубации в условиях *in vivo*. Приведены данные измерений отдельно для каждого животного.

Изменение сорбционной емкости эмульсии по плазменным белкам в зависимости от времени циркуляции эмульсии в кровеносной системе кролика показано на Рис. 16. Как видно из рисунка, удельная сорбционная емкость эмульсии с увеличением времени циркуляции ее в кровотоке кролика от 1 часа до 24 часов постоянно возрастает. После 24 часов циркуляции достигается максимальное значение этого показателя и в разных сериях экспериментов составляет в среднем  $4 \pm 0.5$  мг/мл при соотношении эмульсии к плазме примерно 1:7 (от первоначального количества примерно 60 мл эмульсии в кровотоке после

24 часов остается около 15 мл (см. Рис. 15)). Таким образом, сорбционная емкость эмульсии после 24-х часовой циркуляции примерно в 4 раза превышает сорбционную емкость, полученную в условиях *in vitro*.

Использование эффекта сорбции белков на поверхности ПФУ эмульсий для пренаративной очистки белков

Выяснив, что на поверхности ПФУ эмульсии адсорбируется значительное количество белков плазмы, мы разработали метод выделения одного из таких белков, используя ПФУ эмульсию. Эмульсия ПФУ, стабилизированная проксанолом 268, может быть использована в роли не специфического аффинного сорбента для проведения хроматографического выделения ApoJ из плазмы человека. Важной особенностью этой эмульсии является то, что на ней может проходить адсорбция минорных плазменных белков, в то время как адсорбция основных белков плазмы, такие как альбумин или иммуноглобулины, практически не выражена.

В сравнении с традиционными хроматографическими методами (ионообменная, гель-фильтрационная хроматографии), данный метод значительно ускоряет процесс получения

Nf.WVS. i 2 M

Рис. 17. Очистка ApoJc использованием ПФУ эмульсии. 2 — промежуточная стадия очистки; 1 — конечный продукт; M - маркер молекулярных масс.

конечного продукта (учитывая время наполнения колонок сорбентом), упрощает процесс фракционирования, а также позволяет использовать сорбент многократно, без ущерба качеству разделения. В сравнении с аффинными иммунными сорбентами, эмульсия ПФУ имеет значительно более низкую цену.

Полученный конечный препарат обладает чистотой не ниже 90% (см. Рис. 17) и обладает способностью реадсорбироваться на поверхности ПФУ эмульсии, что позволяет предположить, что после выделения белок сохраняет свою нативность.

Мы предполагаем, что предложенный нами метод очистки ApoJ также применим (с определенными модификациями) и для выделения и очистки других белков не только из плазмы, но и из лизатов и гомогенатов.

## ВЫВОДЫ

1. При инкубации плазмы крови с эмульсией, стабилизированной проксанолом 268, происходит быстрая адсорбция следующих плазменных белков на частицах: фибронектин, фибриноген, иммуноглобулин G, кластерин, аполипопротеин AI, аполипопротеин AIV, аполипопротеин C2, аполипопротеин E, сывороточный амилоидный белок A. Предельная сорбционная емкость эмульсии по белкам плазмы достигается при соотношении эмульсии к плазме 1:10 и носит видоспецифичный характер: удельная сорбционная емкость по белкам плазмы кролика оказывается в 2 раза ниже, чем по белкам плазмы человека.
2. Сорбционная емкость эмульсии после 24 ч циркуляции *in vivo* в 4 раза превышает сорбционную емкость эмульсии *in vitro*.
3. Было определено, что состав сорбированных белков и сорбционная емкость эмульсии зависят от соотношения гидрофобных-гидрофильных блоков в молекуле ПАВ и не имеют выраженной зависимости от химической природы гидрофобного ядра эмульсии.
4. Наличие связанных с белками липидов частично (белки плазмы человека с массой =50 и =60 кДа) или полностью (аполипопротеин AI и фибриноген) препятствует адсорбции указанных белков на эмульсии.

5. Адсорбция белков плазмы крови человека с массой до 200 кДа на поверхности ПФУ эмульсии, стабилизированной проксанолом 268, основывается на гидрофобном эффекте. Взаимодействие иммуноглобулина IgG с поверхностью частицы основывается на электростатическом взаимодействии.

6. Методом собственной флуоресценции белка показано наличие изменений в конформации белков, взаимодействие с эмульсией которых проходит по гидрофобному типу, при их адсорбции на поверхности частиц эмульсии.

#### ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

##### Статьи

Склифас А.Н., Жалимов В.К., Темное А.А., Кукушкин Н.И. Сорбционная емкость по белкам плазмы крови перфторуглеродных эмульсий, стабилизированных проксанолом 268 в экспериментах *in vitro* и *in vivo* // Биофизика, 2012, том 57, с. 317-324.

Жалимов В.К., Склифас А.Н., Кукушкин Н.И. Механизмы сорбции белков плазмы человека на поверхности перфторуглеродной эмульсии, стабилизированной проксанолом 268 // Биофизика, 2012, том 57, с. 308-316.

Жалимов В.К., Склифас А.Н., Капцое В.В., Кукушкин Н.И. Влияние ПАВ на основе полиоксготилена-полиоксипропилена, стабилизирующих эмульсию перфторуглеродов, на адсорбцию белков плазмы человека // Медлайн.ру, 2011, том 12, с. 1361-1371.

##### Тезисы докладов

Жалимов В.К., Склифас А.Н., Кукушкин Н.И. Белки плазмы крови, сорбированные на частицах перфторуглеродных эмульсий, стабилизированных проксанолом 268, механизмы сорбции // IV Российский симпозиум "Белки и пептиды". Казань, 2009, с. 340.

Жалимов В.К., Склифас А.Н., Кукушкин Н.И. Изучения механизмов сорбции белков плазмы крови на частицах перфторуглеродных эмульсий, стабилизированных проксанолом 268 в экспериментах *in vitro* // XIV международная Путинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века". Пущино, 2010, с. 204-205.

Жалимов В.К. Влияние свойств ПАВ на сорбцию белков плазмы крови на поверхности перфторуглеродных эмульсий стабилизированных различными ПАВ // IV международная конференция молодых ученых "Биология - от молекулы до биосферы". Харьков, 2011, с. 16-17.

Подписано в печать:

22.03.2012

Заказ № 6863 Тираж - 75 экз. Печать трафаретная. Типография «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900 115230, Москва, Варшавское ш., 36 (499) 788-78-56 [www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)

**Текст научной работы** **Диссертация по биологии,**  
**кандидата биологических наук, Жалимов, Виталий**  
**Касимович, Пущино**

61 12-3/830

ЖАЛИМОВ ВИТАЛИЙ КАСИМОВИЧ

на правах рукописи

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АДСОРБЦИИ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ НА  
ПОВЕРХНОСТИ ЭМУЛЬСИЙ ПЕРФТОРУГЛЕРОДОВ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ  
БЛОКСОПОЛИМЕРАМИ ПОЛИОКСИЭТИЛЕНА-ПОЛИОКСИПРОПИЛЕНА

03.01.04 - биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители: д.б.н. Кукушкин Н.И. к.б.н. Склифас А.Н.

Пушино - 2012

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Мелкодисперсные эмульсии на основе ПФОС, пригодные для внутривенного введения.....	И
1.2 Применение эмульсий на основе ПФОС.....	12
1.3 Биологическая активность ПФОС и эмульсий ПФОС.....	15
1.4 Выведение эмульсий ПФОС из кровотока.....	16
1.5 Сорбция белков на поверхности субмикронных дисперсных сред.....	18
1.6 Влияние свойств белков на их адсорбцию.....	21
1.7 Влияние свойств поверхности на белковую адсорбцию.....	22
1.8 Поведение белковых молекул при адсорбции.....	23
1.9 Изменение конформации белка при адсорбции.....	25
1.10 Овершут в кинетике адсорбции.....	27
1.11 Структура и функции AроAI.....	31
1.12 Структура и функции AроJ.....	32
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	35
2.1 Материалы.....	35
2.1.1 Реактивы.....	35
2.1.2 Красители.....	35
2.1.3 Антитела.....	36
2.2 Методы.....	36
2.2.1 Состав и приготовление экспериментальных ПФУ эмульсий.....	36
2.2.2 Методы работы с животными.....	36
2.2.3 Определение концентрации ПФОС в крови кролика после внутривенного введения методом <sup>19</sup> P-ЯМР-спектроскопии.....	36
2.2.4 Определение концентрации белка в супернатанте при отмывке эмульсии от неадсорбированных белков.....	37
2.2.5 Определение времени насыщения эмульсии белками плазмы человека in vitro.....	37

2.2.6	Определение зависимости максимальной сорбционной емкости эмульсии по белкам от соотношения инкубационных объемов эмульсии и плазмы крови человека и кролика <i>in vitro</i> .....	38
2.2.7	Динамика изменения сорбционной емкости эмульсии от времени циркуляции в кровотоке кролика.....	38
2.2.8	Определение количества белка, адсорбированного на эмульсии в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .....	39
2.2.9	Электрофорез.....	39
2.2.10	Экстракция липидов плазмы крови человека.....	40
2.2.11	Очистка ApoA1.....	40
2.2.12	Насыщение эмульсии белками плазмы.....	40
2.2.13	Отмывка эмульсии от адсорбированных плазменных белков водными растворами веществ, деадсорбирующих эти белки.....	41
2.2.14	Определение точки начала агрегации плазменных белков.....	42
2.2.15	Идентификация белков.....	42
2.2.16	Иммуноблоттинг.....	42
2.2.17	Измерение флуоресценции.....	43
2.2.18	Исследование адсорбции ApoA1 в реальном времени.....	43
2.2.19	Методы <i>in silico</i> .....	44
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	45
3.1	Усовершенствование метода выделения адсорбированных на частицах эмульсии белков плазмы.....	45
3.2	Определение оптимального времени инкубации эмульсии с плазмой.....	46
3.3	Влияние ПАВ и гидрофобного ядра на адсорбцию плазменных белков.....	48
3.4	Механизмы адсорбции белков на эмульсии.....	56
3.4.1	Выявление плазменных белков, сорбция которых происходит в результате электростатического взаимодействия.....	57
3.4.2	Выявление плазменных белков, сорбция которых происходит в результате гидрофобного эффекта.....	59
3.4.3	Влияние липидов в составе ApoA1 на его сорбцию.....	60
3.4.4	Теоретический анализ возможных путей адсорбции ApoA1 на поверхности ПФУ эмульсии.....	61
3.4.5	Изучение влияния адсорбции на флуоресценцию ApoA1.....	64
3.4.6	Динамика затухания флуоресценции ApoA1 в процессе адсорбции на поверхности ПФУ эмульсии.....	70
3.4.7	Влияние ПФУ на флуоресценцию белков плазмы человека, связанных с поверхностью частиц эмульсии по гидрофобному типу.....	70
3.5	Сорбционная емкость эмульсии.....	73

3.5.1 Зависимость сорбционной емкости от соотношения эмульсии к плазме.....	73
3.5.2 Сорбционная емкость эмульсии по белкам плазмы кролика в условиях <i>in vivo</i> .....	75
3.5.3 Расчет сорбционной емкости эмульсии по белкам плазмы человека <i>in vivo</i> на основании соотношения данных по емкости <i>in vitro</i> для кролика и человека.....	81
3.5.4 Биологическое значение сорбции плазменных белков на частицах эмульсии.....	81
3.6 Использование эффекта сорбции белков на поверхности ПФУ эмульсий для препаративной очистки белков.....	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	85
ВЫВОДЫ.....	87
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	89
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	

ПФУ - перфторуглероды

ПФОС - перфторорганические соединения

ПАВ - поверхностно-активное вещество

PEG - полиоксиэтилен

PPG - полиоксипропилен

ApoJ - аполипопротеин J

ApoAI - аполипопротеин A

IgG - иммуноглобулин G

HSA - человеческий сывороточный альбумин

PBS - фосфатный буфер

ЛПВП - липопротеины высокой плотности

## ВВЕДЕНИЕ

Появление в настоящее время широкого круга лекарственных препаратов на дисперсной основе, а также применение различных наноконтейнеров для адресной доставки лекарств к различным органам и тканям, могут дать хорошие клинические результаты. Однако применение таких лекарственных форм в медицинской практике ставит ряд очень важных вопросов.

Во-первых, успех лечения при применении дисперсных форм лекарственных препаратов зависит, прежде всего от того, насколько полную информацию о судьбе наночастиц в организме мы имеем. Поэтому очень важным является вопрос деградации наноносителей, которая в одних случаях может быть неполной, в других - полностью отсутствовать, что приводит к необратимому накоплению их в организме. Использование в качестве носителей эмульсий ПФУ, которые сравнительно быстро (от 3-7 суток до 1,52 лет) покидают организм, дает неоспоримые преимущества. Во-вторых, в отличие от многих

наноразмерных носителей, которые высвобождают липофильные препараты только после интернализации носителей в клетку или после разрушения носителей, ПФУ наночастицы могут высвободить препараты при простом контакте поверхности наночастиц с плазмалеммой клетки-мишени [Winter et al. 2007].

В последнее время установлено также, что адсорбция лекарственных препаратов на поверхности ПФУ наночастиц может иметь существенное значение для обеспечения процесса "загрузки" этих препаратов в стволовые клетки. Стволовые клетки, содержащие комплекс "ПФУ частица - лекарственный препарат", могут быть использованы в качестве транспортной системы адресной доставки загруженных в них веществ [Темнов и др. 2010, Темнов и др. 2010].

Успех применения дисперсных форм лекарственных препаратов, а также наноконтейнеров в качестве носителей лекарственных веществ зависит также от того, насколько мы понимаем биофизическую основу механизмов взаимодействия наночастиц с различными физиологически активными соединениями и системами организма [М. Роко и др. 2002]. Так, при внутривенном применении дисперсий и эмульсий вводится большая чужеродная поверхность дисперсных частиц, способная адсорбировать и, тем самым, на какое-то время частично выводить из кровотока различные компоненты плазмы крови (белки, липиды, липопротеидные комплексы и т.д.) [Склифас и др. 2002, Склифас и др. 2008, Goppert et al. 2005], что само по себе может привести к возникновению побочных реакций на введение мелкодисперсных эмульсий.

В настоящее время нет ясности относительно механизмов адсорбции плазменных белков на поверхности ПФУ наночастиц, а также практически отсутствуют сведения о том, в каком количестве и с какой динамикой происходит эта адсорбция. Известно лишь, что определенную роль в процессе адсорбции играет природа ПАВ, использованного в качестве стабилизатора эмульсии. Так *in vitro* на наночастицах, стабилизированных проксанолом 268, адсорбируется ряд плазменных белков, в то время как при замене проксанола на фосфолипиды яичного желтка, адсорбции белков плазмы не наблюдается [Склифас и др. 2002].

Несмотря на то, что в нашей стране свойства ПФУ эмульсий изучаются с 80-х годов, первые отечественные работы по исследованию адсорбции на таких эмульсиях были проведены лишь в 2000-х [Склифас и др. 2002, Склифас и др. 2008], вследствие чего процессы, происходящие при адсорбции белков на такого рода частицах, до сих пор остаются малоизученными.

Таким образом, в настоящее время актуальными являются исследования, нацеленные на изучение механизмов взаимодействия мелкодисперсных сред с различными компонентами плазмы крови, где в качестве модели использованы ПФУ эмульсии, стабилизированные проксанолами, для получения высокоэффективных, безопасных и стабильных дисперсных лекарственных форм и наноносителей лекарственных препаратов.

## Цель

Исследование механизмы взаимодействия белков плазмы крови и ПФУ эмульсий, стабилизированных блоксополимерами полиоксиэтилена-полиоксипропилена.

## Задачи

1. Определить состав плазменных белков, адсорбированных на поверхности частиц ПФУ эмульсий, стабилизированных блоксополимерами полиоксиэтилена-полиоксипропилена.

2. Определить временные характеристики процесса адсорбции белков в условиях *in vivo* и *in vitro*.
3. Изучить зависимость состава и количества адсорбированных белков от химической природы ПФУ ядра и химической природы ПАВ на поверхности частиц эмульсии.
4. Изучить механизмы адсорбции белков на поверхности частиц ПФУ эмульсии (определить тип взаимодействия, ответить на вопросы: влияет ли липидное окружение белков на их адсорбцию; происходит ли адсорбция белков непосредственно на гидрофобном ядре частицы или на ее поверхностно-активном слое; происходят ли изменение конформации белков при их адсорбции).
5. Определить сорбционную емкость эмульсии по белкам плазмы в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Научная новизна

Впервые:

- определен состав плазменных белков, сорбированных на поверхности ПФУ эмульсий, стабилизированных различными ПАВ (проксанол 268, проксанол 168, Synperonic® F-108, Pluronic® P-123).
- идентифицированы плазменные белки (фибронектин, фибриноген, иммуноглобулин G, кластерин, аполипопротеин AI, аполипопротеин AIV, аполипопротеин C2, аполипопротеин E, сывороточный амилоидный белок A), сорбирующиеся на поверхности ПФУ эмульсии, стабилизированной проксанолом 268.
- определена сорбционная емкость различных эмульсий ПФУ по белкам плазмы крови *in vitro* (для человека и кролика) и *in vivo* - по белкам плазмы крови кролика;
- исследована динамика состава и количества адсорбированных белков плазмы на поверхности ПФУ эмульсии, стабилизированной проксанолом 268 в экспериментах *in vivo* и *in vitro*; показано, что в условиях *in vitro* состав сорбированных белков не зависит ни от времени инкубации, ни от соотношения эмульсия : плазма; показано, что в условиях *in vivo* с увеличением времени циркуляции происходит увеличение сорбционной емкости эмульсии, причем максимальное значение достигается после 24 часов Циркуляции; в течение первых 6 часов циркуляции не происходит изменения состава сорбированных белков, через 24 часа циркуляции состав сорбированных белков существенно изменяется;
- установлено, что состав сорбированных белков и сорбционная емкость эмульсии зависят от соотношения гидрофобных-гидрофильных блоков в молекуле ПАВ;
- установлено, что взаимодействие всех белков с массами ниже 200 кДа (за исключением белка с массой -55 к Да) на поверхности частиц происходит по гидрофобному, а белка с массой 200 кДа (IgG) - по электростатическому типу;
- показано, что липидное окружение белков препятствует полностью (белки плазмы человека с массой -50 и -60 кДа) или частично (аполипопротеин AI и фибриноген) адсорбции указанных белков на эмульсии;
- установлено, что флуоресценция белков, адсорбция которых идет по гидрофобному типу, является полностью или частично затухенной, что указывает на изменение конформации этих белков при их адсорбции.

Практическая значимость работы

Полученные данные представляют экспериментальные исследования механизмов сорбции белков на частицах эмульсий ПФУ, стабилизированных проксанолами, и имеют как теоретический, так и практический интерес. Они расширяют представления о взаимодействии белков со сложной структурой частицы эмульсии, приводящем к конформационным изменениям в молекуле белка. Данные по удельной сорбционной емкости эмульсии при циркуляции ее в кровотоке должны учитываться при введении больших объемов любых дисперсных препаратов, стабилизированных проксанолами, особенно при

определенных патологиях. Адсорбция на частицах белков плазмы, находящихся в небольших количествах, и изменение их физиологического состояния, пусть даже временно, может иметь негативные последствия для больного. В работе также показаны перспективы использования эмульсий ПФУ, стабилизированных проксанолами 268 и 168, для препаративного выделения и очистки отдельных плазменных белков, что убедительно показано на примере выделения Apo1.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Мелкодисперсные эмульсии на основе ПФОС, пригодные для внутривенного введения

Перфторорганические соединения, в основном, используются в виде субмикронных эмульсий, которые пригодны для внутривенного введения. В качестве эмульгаторов используются различные синтетические (плюроники и их отечественные аналоги проксаноламы 168 или 268: блок-сополимеры окиси этилена и пропилена (Рис. 1)) и природные (яичного желтка, сои) ПАВ. [Апросин и др. 1983, Тзиёа & а1. 1988].

н н

Г Г

н-о-е-с-Г Г н н

н н

Г Г

о-с-с Г Г н н Г

н

Г

н-с-нн Г Г

о-с—с Г Г н н

н

н

Г

■с—о

|\_н Н н н

н н

Г Г

-с-с—о-н

Г Г

Рис. 1. Структурная формула молекулы проксанолов.

Проксанолы являются синтетическими поверхностно-активными веществами, которые широко изучаются и применяются в различных биологических исследованиях [Илларионов и др. 1984, УатапоисЫ а1. 1985, 8кй)1а е1 а1. 1985, Мйвипо е1 а1. 1981, Образцов, 1990]. Они имеют общую формулу:



где

-t- число звеньев полиоксипропиленового блока; -p-, -l- число звеньев полиоксиэтиленового блока.

В медико-биологических исследованиях используют проксанолы, имеющие молекулярную массу 5-10 кДа, а доля гидрофобного оксипропиленового блока не должна превышать 20% [Кирш и др. 1984].

Получают мелкодисперсные эмульсии ПФОС либо гомогенизацией под высоким давлением [Gaulin High Pressure Technology 1984], либо с помощью ультразвуковых колебаний [Шерман 1972]. Предпочтительным методом для получения эмульсий медико-биологического назначения является метод гомогенизации под высоким давлением, с помощью которого получают стабильные мелкодисперсные эмульсии с допустимыми, концентрациями ионов фтора  $\sim 10^{-5}\text{M}$  [Fujuta et al. 1971, Geyer et al. 1976, Blank and Riess 1981]. Для таких эмульсий характерны следующие параметры: средний размер частиц - 0,1 мкм, относительная вязкость 2-4 сПз, концентрация кислорода 6-7 об.%, концентрация фторуглеродов 10-12 об.% (до 40% при использовании фосфолипидов). При внутривенном введении эмульсий ПФОС необходимо присутствие компонентов, поддерживающих онкотическое и осмотическое давление.

На Рис. 2 показана схема строения частиц эмульсий ПФОС, стабилизированных: а) проксанолом 268, б) фосфолипидами яичного желтка. Все вышеперечисленные особенности эмульсий ПФОС, а также их химическая инертность и отсутствие метаболических превращений в организме при внутри