

УДК 541.16, 546.344,
541.183

*А.Р. КЕРИМКУЛОВА, А.Н. САБИТОВ, Ж.М. БАСЫГАРАЕВ,
М.А. БИЙСЕМБАЕВ, З.А. МАНСУРОВ, М.К. ГИЛЬМАНОВ*

НОВЫЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ УГЛЕРОДНЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ПРЕПАРАТИВНОЙ ОЧИСТКИ БИОМОЛЕКУЛ

Впервые разработаны новые наноструктурированные углеродные сорбенты «Нанокарбосорб» типа РЗМ для гидрофобной хроматографии и гидрофилизированный «Нанокарбосорб» типа АРК для разделения белков и липидно-белковых комплексов. Установлена высокая эффективность «Нанокарбосорба» типа РЗМ для препаративной очистки МЦ – мощного биостимулятора растений. Показано, что гидрофилизированный «Нанокарбосорб» типа АРК обладает высокоэффективной сорбцией цитокина – Ронколейкина. Поэтому этот сорбент может с успехом использоваться как для очистки цитокина в производственных масштабах, так и для детоксикации крови от избытка цитокинов.

Большую перспективу имеет применение «Нанокарбосорба» типа АРК для очистки ЛБК, которые могут широко применяться для препаративного получения липидов и белков.

Впечатляющие достижения в области протеомики, ферментной инженерии и биотехнологии позволили создать целый ряд принципиально новых и высокоэффективных биопрепаратов, применение которых оказало революционизирующее влияние на медицину и сельское хозяйство. Поэтому настало время для индустриального получения этих биопрепаратов, в основе которых ле-

жат биоорганические соединения, белки и даже биоструктуры. [1,2]

Однако, дальнейшее совершенствование хроматографических сорбентов становится невозможным без применения идей и методов нанотехнологий. В этом плане большой интерес представляют собой наноструктурированные сорбенты, имеющие улучшенные характеристики, по

сравнению со стандартными сорбентами (например, сефарозы и сорбенты для гидрофобной хроматографии – октил и фенил агарозные гели). На мировом рынке практически не имеется сорбентов пригодных для очистки биомолекул в производственных масштабах [3]. Существующие сорбенты крайне дороги, их стоимость колеблется от нескольких сот до нескольких тысяч долларов и предназначены они в основном для аналитических целей. Эти сорбенты большей частью изготовлены из таких углеводных полимеров как декстрановые или агарозные гели. Они имеют очень слабую механическую прочность. Эти гели легко атакуются грибками и микробами, поэтому все эти сорбенты недолговечны и срок их эксплуатации не превышает нескольких месяцев. Они малопригодны для разделения веществ в препартивных количествах. Поэтому созрела острая необходимость основываясь на принципах нанотехнологий создания принципиально нового поколения сорбентов предназначенных для очистки биомолекул и биоструктур в производственных масштабах.

Эффективные сорбенты необходимы также для очистки крови в связи с проблемой сепсиса. Известно, что каждый год во всем мире регистрируется свыше 18 миллионов случаев сепсиса, а также из-за отсутствия эффективных лекарств и методов лечения, эта систематическая воспалительная реакция на инфекцию является одной из причин, приводящих к летальному исходу [4]. По масштабам, сравнимым с раком легких и груди (~2700 и ~ 1100), тяжелая форма сепсиса, которая составляет свыше 17 % от общего количества случаев этим заболеванием, и уровень смертности при котором, на сегодняшний день, равен 30-40%, несет ответственность за смерть 1500 людей каждый день во все мире [4].

Активированные углероды (АУ), о которых уже известно в течение 3000 лет, до сих пор считаются самыми сильными традиционными адсорбентами [5], главным образом, благодаря, их весьма развитой пористой структуре и большой поверхностной площади.

В [6] использованы новые мезопористые углеродные материалы, синтезированные из тройных карбидов MAX-фазы (Ti_3AlC_2), которые можно оптимизировать для эффективной адсорбции больших воспалительных протеинов. Синтезированные углероды, обладающие подхо-

дящим размером поры с большим объемом мезопор, форма которых напоминает щель, превзошли все другие материалы или методы по эффективности отщепления $TNF-\alpha$. Однако следует отметить, что лучшие АУ имеют ограниченные эксплуатационные характеристики, связано с ограниченной площадью поверхности, открытой для адсорбата.

Однако, необходимо отметить что получение мезопористого углерода из карбида путем удаления металла хлорированием, является двухстадийным и трудоемким процессом.

Таким образом, в настоящее время актуальным является разработка таких сорбентов, которые бы отличались высокой механической прочностью и выдерживали большое давление жидкости при работе, обладающие большой емкостью и высокой износостойчивостью, позволяющей им работать в течение года и более.

Исходя из вышесказанного, целью нашего исследования явилось создание новых наноструктурированных углеродных сорбентов индустриального применения для очистки биомолекул. В соответствии с поставленной целью решались следующие конкретные задачи: создание и испытание наноструктурированного углеродного сорбента для гидрофобной хроматографии ценных биоорганических соединений и создание и испытание наноструктурированного углеродного сорбента специально модифицированного для разделения белков и биоструктур и очистке крови. Разрабатываемые в последнее время в институте проблем горения в лаборатории наноуглеродных материалов им. Р.М. Мансуровой соответствуют поставленным целям [7-10].

В первую очередь особый интерес представляло изучение применения данного «Нанокарбосорба» для очистки одного из цитокинов крови человека «Ронколейкина».

Известно, что чрезмерное накопление цитокина в крови человека приводит к такому тяжелейшему заболеванию как сепсис, которое почти всегда имеет летальный исход. Для спасения больных в первую очередь необходимо резко снизить концентрацию цитокинов в крови, путем их сорбции на каком-либо сорбенте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились сухие и трехдневные проросшие семена мягкой пшени-

цы (*Triticum aestivum*) сорта «Саратовская-29». Семена проращивали в стерильных условиях на фильтровальной бумаге в чашках Петри при температуре 20°C в термостате.

Бесклеточные экстракты из изучаемых растений получали путем их гомогенизации в охлажденной фарфоровой ступке в 0,05М трис-HCl буфере, pH=7,4. После чего проводили центрифugирование при 10000 x g в течение 10 мин. на рефрижераторной центрифуге типа «К-24» (Германия).

Техника хроматографического разделения подробно описана в книге Гильманова и др. [11]. Описание очистки медиатора цитокинина (МЦ) на нанокарбосорбе типа РЗМ приведено в следующей главе. Для контроля хроматографического разделения использовали UV монитор типа Uvicord SII производства фирмы LKB (Швеция).

Фракцию очищенных сферосом получали согласно методу Дильбаркановой Р. и Гильманова М.К. [12].

В работе был использован метод электронной микроскопии с помощью сканирующего электронного микроскопа, типа JEOL SUPER PROBE 733 (Япония). На специальную стеклянную пластину наносили 1 каплю препарата ЛБК и помещали в вытяжной шкаф до полного высушивания. Затем пластина помещалась в аппарат ion sputter (fine coat) (JFC-1100) при напряжении 1000В и при вакууме 10^{-3} мм рт. ст. на 30 минут для покрытия ЛБК тончайшим слоем золота. Подготовленные таким образом образцы исследовали в электронном микроскопе.

Концентрацию белка определяли микробиуретовым методом по Бэйли [13] при длине волны 330 нм на спектрофотометре типа Ultraspec-1100 Pro, Amersham-Bioscience.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из поставленной цели, в лабораторииnanoуглеродных материалов Института проблем горения, КазНУ им. аль-Фараби синтезированы наноструктурированные углеродные сорбенты – «Нанокарбосорб» типа-РЗМ для гидрофобной хроматографии биоорганических соединений и гидрофилизованный «Нанокарбосорб» типа-АРК для хроматографии белков и биоструктур. Следует отметить, что наноструктурированные элементы каркаса этих сорбентов придают им необычайно высокую механическую прочность.

Благодаря ним эти сорбенты выдерживают большое давление жидкости при работе, имеют высокую износостойчивость, поэтому они могут эксплуатироваться годами, имеют очень большую внутреннюю поверхность и, соответственно, большую емкость и не обладают паразитической сорбцией. Для препаративного разделения белков и биоструктур нами создан специальный гидрофилизованный «Нанокарбосорб» типа АРК.

Проведенные исследования показали, что «Нанокарбосорб» типа РЗМ пригоден для очистки медиатора цитокинина (МЦ) – мощного биостимулятора растений. Об эффективности этого биостимулятора говорит тот факт, что для повышения и ускорения созревания, для обработки семян на 100 гектаров посева расходуется лишь 2г препарата МЦ. Для опыта брали зерна пшеницы, которые проращивали в течение 3 суток в стерильной водопроводной воде.

Один килограмм проросших семян гомогенизировали в 3 литрах 50% этанола на ножевом гомогенизаторе типа MPW-302 (Польша). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 10000 x g. Полученный спиртовый экстракт подвергали очистке на «Нанокарбосорбе» типа РЗМ на колонке размером о 3см на 20см, которая предварительно была уравновешена дистиллированной водой. На колонку наносили экстракт, содержащий МЦ в объеме 20мл. После чего колонку промывали 200мл дистиллированной воды, затем 10% этанолом, десорбцию проводили 200мл 50% этанола. (Рис.1.)

В настоящее время проводятся испытание МЦ направленное на повышение продуктивности озимой ржи, ячменя и сахарной свеклы.

К сожалению, в настоящее время эффективных сорбентов для удаления цитокинов из крови

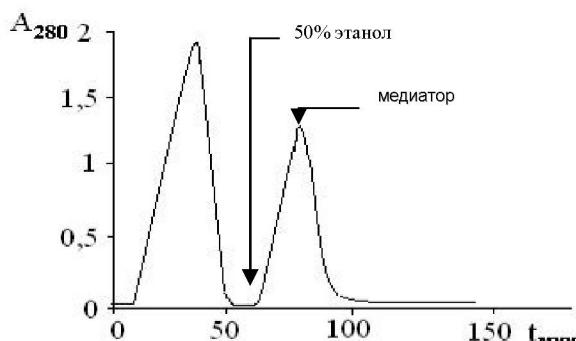


Рис.1. Очистка медиатора цитокинина на колонке с «Нанокарбосорбом» типа РЗМ

больных практически нет. Поэтому мы предложили для эффективного связывания цитокина разработанный нами гидрофилизованный «Нанокарбосорб» типа АРК. Для опыта был использован гомогенный коммерческий препарат цитокина – «Ронколейкин», производства ООО «Биотех», Санкт-Петербург, Россия. Сорбция «Ронколейкина» проводилась на колонке с гидрофилизованным «Нанокарбосорбом» типа АРК, размером о 3см на 20см, которая предварительно была уравновешена 0,05М трис-HCl буфером, pH 7,4. На колонку наносили 2мг «Ронколейкина» после чего колонку промывали 200мл 0,05М трис-HCl буферным раствором, pH 7,4. Затем элюцию проводили 200мл 1М раствором NaCl, и сорбированный «Ронколейкин» был десорбирован этанолом.(Рис.2)

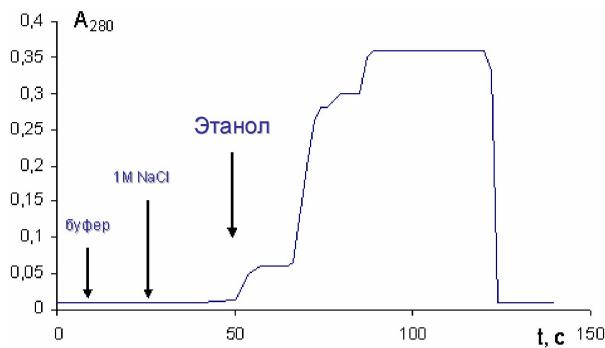


Рис.2. Хроматографическая очистка цитокина (ронколейкина) на колонке с «Нанокарбосорбом» типа АРК

Полученные результаты говорят о прочной сорбции цитокина «Нанокарбосорбом» типа АРК. Это открывает реальный путь борьбы с сепсисом, поскольку «Нанокарбосорб» может использоваться для удаления из крови цитокинов. Кроме того «Нанокарбосорб» типа АРК может с успехом использоваться для очистки цитокина в производственных масштабах. Цитокины с успехом используются для повышения иммунитета организма.

Большой интерес представляло изучение применения «Нанокарбосорба» для очистки сложных липид-белковых комплексов (ЛБК). Уникальность одного из таких липид-белковых комплексов состоит в том, что он содержит в своем составе только один липид – фосфатидилинозитол (ФИ) и один белок – глутаматдегидрогеназу (ГДГ). Поэтому получение этих комплексов открывает прямой путь для препаративного получения ФИ и ГДГ.

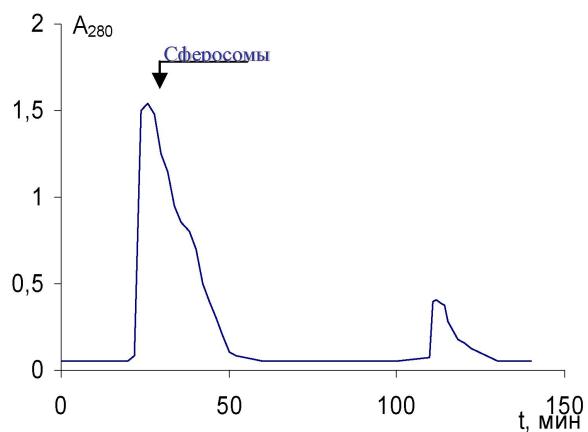


Рис.3. Хроматографическая очистка белок-липидного комплекса из зерна пшеницы на колонке с «Нанокарбосорбом» типа АРК

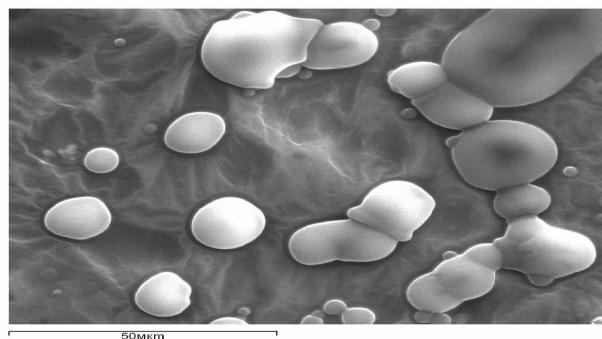


Рис. 4. Электронная микроскопия ЛБК, очищенных на колонке с «Нанокарбосорбом» типа АРК

Сухие семена пшеницы сорта «Саратовская-29» тщательно растирали в 0,05М трис-хлоридном буфере, pH 7,4, гомогенат центрифугировался при 10000g в течение 10мин. затем полученный бесклеточный экстракт фракционировали на колонке с «Нанокарбосорбом» типа АРК, размером о 3см на 20см. Результаты фракционирования представлены на рис.3.

Как видно из этого графика, сферосомы выходят в первом высокомолекулярном пике. Была проведена электронная микроскопия фракции этого пика (рис. 4) и было установлено, что она действительно содержит высокоочищенные структуры ЛБК.

Заключение

Таким образом «Нанокарбосорб» типа АРК оказался превосходным сорбентоми открывает путь для получения препаративных количеств ЛБК. Это в свою очередь позволит получать такие ценные препараты как ФИ, который необходим для создания систем транспорта лекарств

и для создания высококачественной парфюмерии и косметики, и ГДГ, широко применяемую для клинической диагностики заболеваний путем определения концентрации глютамата, 2-оксоглютарата, пиридиновых коферментов в биологических жидкостях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Twyman R.M. / Principles of Proteomics // BIOS Seintific Publishers. 2004: 217-234.*
2. *Patterson S.D. and Aebersold R.H.(2003) Proteomics: the first decade and beyond. Nature Genet 33 (Suppl): 311-323.*
3. *PJA Brom. Particle toxicology: from coal mining to nanotechnology. Inhalation Toxicol 14: 311-324, 2002.*
4. *Slade E., Tamber PS., Vincent JL. The surviving sepsis campaign: raising awareness to reduce mortality. Crit Care 2003;7(1):1-2.*
5. *Mikhovskiy SV. Emerging technologies in extracorporeal treatment: Focus on adsorption. Perfusion-UK 2003;16(2):47-54.*
6. *Gleb Yashin, Yury Gogotsi / Mesoporous carbide-derived carbon with porosity tuned for efficient adsorption of cytokines/ / Biomaterials 27 (2006) 5755-5762.*
7. *Мансурова Р.М. Физико-химические основы синтеза углеродсодержащих композиций // Монография. Алматы, XXI век. 2001. 180 с.*
8. *Мансуров З.А. /Наноуглеродные материалы // Вестник КазНУ, серия химическая, № 2 (30). 2003. С. 29-31.*
9. *Mansurov Z.A. Some Applications of Nanocarbon Materials for Novel Devices // R. Gross et al (eds.), Nonoscale-Devices – Fundamentals, 355- 368. 2006. Springer. P. 355-368.*

10. *Mansurov Z.A. , Gilmanov M.K., Kerimkulova A.R., Basygaraev Zh.M., Biisenbaev M., Emmuranov M.M. Development of novel nanostructural carbon sorbents for separation of biomolecules for industrial application. // Portugal-2007*

11. *Гильманов М., Фурсов О., Францев А. Методы очистки и изучение ферментов растений // Наука, 1981.*

12. *Дильбарканова Р., Гильманов М.К. Сферосома растительной клетки // Монография, Алматы «Фылым»-1997.*

13. *Бэйли Дж. Методы химии белка. Москва, изда-тельство иностранной литературы. 1965.*

Резюме

Алғаш рет жаңа наноқұрылышты қөміртекті РЗМ типті гидрофобты хроматографияяға арналған «Нанокарбосорб» және гидрофилденген АРК типті «Нанокарбосорб» сорбенттері алынды. РЗМ типті «Нанокарбосорбың» есімдіктердің күшті биостимулаторы – цитокиннин медиаторынын препаративті тазалаудағы жоғары эффективтілігі анықталды. Гидрофилденген АРК типті «Нанокарбосорб» цитокин – Ронколейкиннің жоғарыэффективті сорбциясына ие. Сондықтан бұл сорбент цитокинді өндірістің масштабта тазалауда және қаннан цитокиннің артық мөлшерін шығаруда қолданыла алады.

ЛАЖ-ні тазалауда АРК типті «Нанокарбосорбың» келешегі зор және олар липидтермен ақызыздарды препаративті алуша кеңінен қолданыла алады.

*Институт проблем горения,
КазНУ им. аль-Фараби,*

*Институт молекулярной биологии
и биохимии им. М.А. Айтхожисина,
г.Алматы*

Поступила 25.09.2007 г.