

Конструирование и изучение свойств ветеринарного лечебного препарата на основе силимарина и наночастиц золота

Дмитрий Алексеевич Солдатов, Наталия Игоревна Скворцова, Анна Дмитриевна Клюкина, Михаил Андреевич Чекунов, Екатерина Дмитриевна Чекунова

Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, г. Саратов, Россия, e-mail: dmitrys97@yandex.ru

Аннотация. Исследование наноматериалов является перспективным направлением, благодаря которому можно доставлять необходимое вещество, минуя барьеры организма. Силимарин обладает противовоспалительным эффектом за счет антиоксидантных свойств, которые были многократно подтверждены экспериментами. Работу выполняли на базе кафедры «Болезни животных и ВСЭ» и ЦКП «Молекулярная биология» ФГБОУ ВО Вавиловский университет. Работа состояла из нескольких этапов: проводили синтез препарата силимарин-КЗ, получали поликлональные антитела на силимарин, осуществляли маркировку антител, занимались детекцией силимарина в клетках ретикулоэндотелиальной системы. Исследование созданного конъюгата силимарина и наночастиц коллоидного золота позволило определить, что животные, иммунизированные полученным препаратом, способны вырабатывать на него антитела, а размеры наночастиц в нем не превышают 20–23 нм.

Ключевые слова: силимарин; наночастицы; коллоидное золото; наночастицы золота.

Для цитирования: Солдатов Д. А., Скворцова Н. И., Клюкина А. Д., Чекунов М. А., Чекунова Е. Д. Конструирование и изучение свойств ветеринарного лечебного препарата на основе силимарина и наночастиц золота // Аграрный научный журнал. 2023. № 8. С. 92–96. <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2023i8pp92-96>.

VETERINARY MEDICINE AND ZOOTECHNICS

Original article

Construction and study of the properties of a veterinary medicine based on silymarin and gold nanoparticles

Dmitry A. Soldatov, Natalia I. Skvortsova, Anna D. Klyukina, Mikhail A. Chekunov, Ekaterina D. Chekunova

Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia, e-mail: dmitrys97@yandex.ru

Abstract. Research on nanomaterials is currently very promising, thanks to them we can deliver the necessary substance, bypassing the barriers of the body. Silymarin has an anti-inflammatory effect due to its antioxidant properties, which have been repeatedly confirmed by experiments. The work was carried out on the basis of the Department of “Animal Diseases and VSE” and the CCP “Molecular Biology” of the Vavilov University. The work consisted of several stages, where we synthesized the drug silymarin-gnp, obtained polyclonal antibodies for silymarin, and carried out antibody labeling. And they were engaged in the detection of silymarin in the cells of the reticuloendothelial system. Thus, the study of the created conjugate of silymarin and colloidal gold nanoparticles made it possible to determine that animals immunized with the resulting drug are able to produce antibodies to it, and the sizes of nanoparticles in it do not exceed 20-23 nm.

Keywords: silymarin; nanoparticles; colloidal gold; gold nanoparticles.

For citation: Soldatov D. A., Skvortsova N. I., Klyukina A. D., Chekunov M. A., Chekunova E. D. Construction and study of the properties of a veterinary medicine based on silymarin and gold nanoparticles. Agrarnyy nauchnyy zhurnal = The Agrarian Scientific Journal. 2023;(8):92–96. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2023i8pp92-96>.

Введение. Наночастицы являются неотъемлемой частью оптимизации лекарственных форм из-за их способности к повышенной гидрофобной растворимости в воде и стабилизации быстрорастворимых соединений. Наносистемы имеют большой потенциал, заключенный в стимуляции к удержанию лекарств в различных тканях, а также защите от ферментативной деградации, усилении клеточного поглощения и адресной доставки [5]. Все это значительным образом влияет на эффективность терапии.





Как наночастицы часто используются наночастицы некоторых драгоценных металлов. Особый интерес представляют наночастицы золота (AuNP), так как они наиболее стабильные и универсальные из остальных типов. Наиболее значимыми особенностями коллоидного золота являются его химическая и ферментативная стабильность, низкая цитотоксичность [6].

Во многих медицинских приложениях отражено, что наночастицы золота имеют высокую эффективность и благодаря своим оптическим свойствам могут использоваться в фототермальной терапии [8, 10]; дополнительно улучшены путем нанесения селективных фрагментов на них [4].

Силимарин – это синтез высокоактивных природных веществ, получаемых из плодов расторопши пятнистой. Он состоит из семи флавоноидов, обладающих гепатопротекторными, антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами. Основное действующее вещество – силибин, составляет около 83 % силимарина и отвечает за его фармакологическую активность.

Экстракты плодов расторопши используются в таких лекарственных препаратах, как карсил, легалон и силибор [2], для защиты печени. Печень – центральный метаболический орган, отвечающий за обработку большинства веществ, поступающих в организм. Нарушение его функциональной активности – серьезная проблема для организма [1, 9, 11], поэтому необходимо разрабатывать эффективные методы лечения заболеваний печени.

Расторопша содержит флавоноиды, которые являются сильными антиоксидантами, защищающими клетки от свободных радикалов и других вредных веществ. Они участвуют в защите клеточных мембран, препятствуя транспорту токсинов внутрь клеток. Флавоноиды расторопши также уменьшают активность клеток – макрофагов, что приводит к противовоспалительному, иммуномодулирующему и антиканцерогенному действию [7]. Кроме того, они оказывают цитопротекторный эффект на гепатоциты [2], защищая печень от повреждения.

Силимарин, содержащийся в расторопше, обладает антиоксидантными свойствами и способен нейтрализовать свободные радикалы, превращая их в безопасные соединения, что объясняет его терапевтическое действие при заболеваниях печени.

Содержание флавонолигнанов в расторопше пятнистой позволяет использовать препараты, основанные на этом растении, для лечения таких заболеваний печени, как токсический и вирусный гепатит, цирроз, лекарственные, лучевые и ишемические поражения, а также канцерогенез [1]. Противовоспалительный эффект препаратов на основе расторопши связан с их антиоксидантными свойствами, которые были подтверждены многолетними исследованиями и экспериментами.

Эксперименты на крысах с использованием четыреххлористого углерода показали, что флавоноиды расторопши снижают уровень холестаза и повреждения клеток, а введение силибина в исследовании хронической токсичности значительно снижало цитолиз.

Цель исследований – конструирование ветеринарного лекарственного средства на основе силимарина и наночастиц золота, а также получение поликлональных антител.

Методика исследований. Работу выполняли на базе кафедры «Болезни животных и ВСЭ» и ЦКП «Молекулярная биология» ФГБОУ ВО Вавиловский университет. Объекты исследований – силимарин, наночастицы золота.

Синтез препарата силимарин-КЗ. Препараты на основе наночастиц золота получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты (HAuCl_4), разбавленной в воде milliQ, раствором силимарина, по следующей методике.

1. К 213 мкл 4%-й золотохлористоводородной кислоты (HAuCl_4) добавляли 25 мл воды milliQ.
2. Параллельно готовили навеску щелочи (NaOH) 138 мг, которую растворяли в 10 мл воды milliQ.
3. К полученному щелочному раствору добавляли силимарин (76,8 мг).
4. Раствор, после полного растворения силимарина, фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр (0,22 мкм).
5. Отфильтрованный раствор силимарина (5 мл) добавляли по каплям к раствору HAuCl_4 .
6. Реакции давали протекать в течение 1 ч при интенсивном перемешивании.

Получение поликлональных антител на силимарин. Поликлональные антитела против силимарина получали следующим способом.

1. Исходную сыворотку получали от интактного кролика, который был иммунизирован четырехкратно с интервалом в 10 дней конъюгатом КЗ-силимарин в дозе 10 мг силимарина на животное.
2. Перед введением 0,5 мл препарата силимарина-КЗ смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда.



3. Препарат вводили вдоль позвоночного столба в десять точек по 100 мкл.
4. Сыворотку отбирали у животных через 10 дней после последней иммунизации.
5. Антитела выделяли из нативной сыворотки поэтапным осаждением 25–45 % сульфатом аммония и подвергали диализу против фосфатно-солевого буфера.
6. Чистоту полученных антител подтверждали электрофорезом Лэммли. Концентрацию антител определяли по Лоури.
7. Связывание антител с силимарином проверяли дот-блоттингом. Водный раствор силимарина в концентрации 80–2,5 мкг/мл, 5 мкл/точку наносили на две мембранные полоски из ПВДФ, и блокировали мембраны 2%-м сухим молоком в PBS. Одну дорожку инкубировали с 2%-м сухим молоком в PBS в присутствии 0,2 мкг/мл антител из иммунной сыворотки. Вторую дорожку инкубировали с 0,2 мкг/мл нативных антител на шейкере в течение 30 мин, инкубировали 1 ч; после инкубации были обнаружены антитела, которые связывались с силимарином, стафилококковым коллоидным конъюгатом золота с белком А.

Маркировка антител. Полученные антитела метили TRITC следующим способом. Антитела в концентрации 6 мг/мл в объеме 2 мл диализовали против 100 мМ карбонатно-бикарбонатного буфера pH 9,0. К полученному раствору добавляли 70 мкл ТРИТС в разведении 1 мг/мл ДМСО, антитела инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 2 ч и подвергали диализу против PBS.

Детекция силимарина в клетках ретикулоэндотелиальной системы. Мышей эвтаназировали в соответствии с Европейской директивой 2010/63. Выделение перитонеальных макрофагов: животных подвергали эвтаназии и помещали в положение, лежа на спине. Разрез делали по средней линии передней брюшной стенки, осторожно удаляли лоскут, не нарушая брюшины. Иглу, прикрепленную к шприцу, вводили в брюшную полость и добавляли 50 мл PBS (pH 7,2). Передняя брюшная стенка мягко размягчается. Через 5–7 мин содержимое брюшной полости извлекали из разреза брюшины с помощью пастеровской пипетки и переливали через нейлоновый фильтр в пробирку. Клетки трижды промывали центрифугированием при 750 g в PBS. После центрифугирования клетки ресуспендировали в 1 мл PBS и подсчитывали в камере Горяева. Перитонеальные макрофаги культивировали по стандартным методикам [3].

Клетки брюшины мыши, выделенные по стандартной методике в концентрации 10⁵ клеток/мл, инкубировали с ХГ и конъюгатом силимарина в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, в течение 2 ч при 37⁰ °C. Перитонеальные клетки промывали свежим DMEM и фиксировали на предметных стеклах метанолом.

Результаты исследований. Изучение физико-химических свойств полученного препарата проводили при помощи TEM и DLS. По данным TEM (TEM – трансмиссивная электронная микроскопия считается методом золотого стандарта для определения размеров наночастиц) и DLS (DLS – динамическое светорассеивание измеряет гидродинамический диаметр эквивалентной сферы наночастиц), преобладали наночастицы со средним диаметром 20–23 нм (рис. 1).

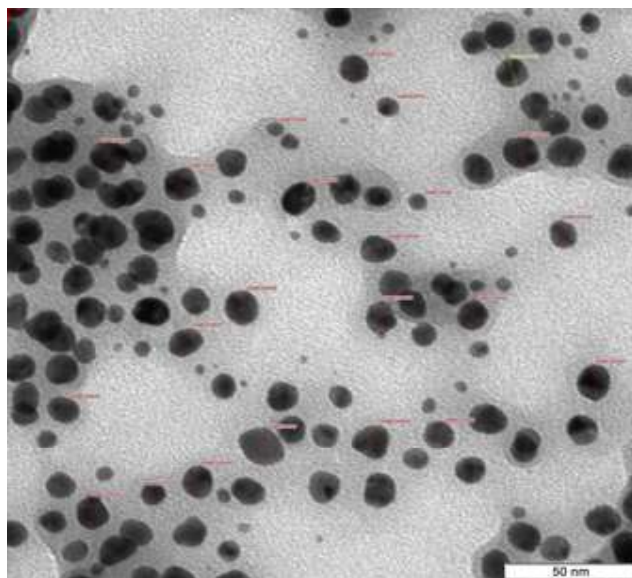


Рис. 1. TEM

Дот-блот иммуноанализ показал связывание антител с силимарином. Произошла реакция с сывороткой иммунизированного животного, антитела связывались с силимарином и стафилококковым коллоидным конъюгатом золота с белком А. Полоска, меченная сывороткой от нативных животных, не показала реакции (рис. 2).

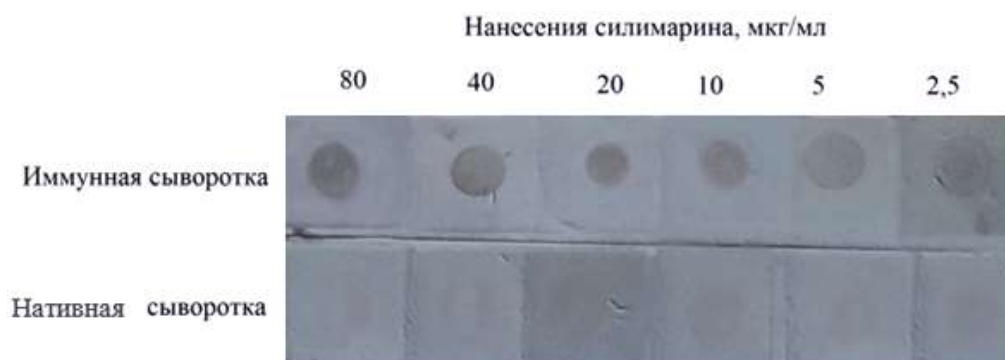


Рис. 2. Дот-блот иммунных и нативных антител с силимарином

На рис. 3 показано взаимодействие связанных с силимарином наночастиц золота с клетками ретикулоэндотелиальной системы экспериментальных животных. TRITC-конъюгированное антитело в концентрации 0,5 мкг/мл наносили на тампон, инкубировали в течение 15 мин и микроскопически регистрировали флуоресценцию. Красный свет показывает взаимодействие между силимарином и макрофагами, наночастицы играют важную роль в этом взаимодействии.

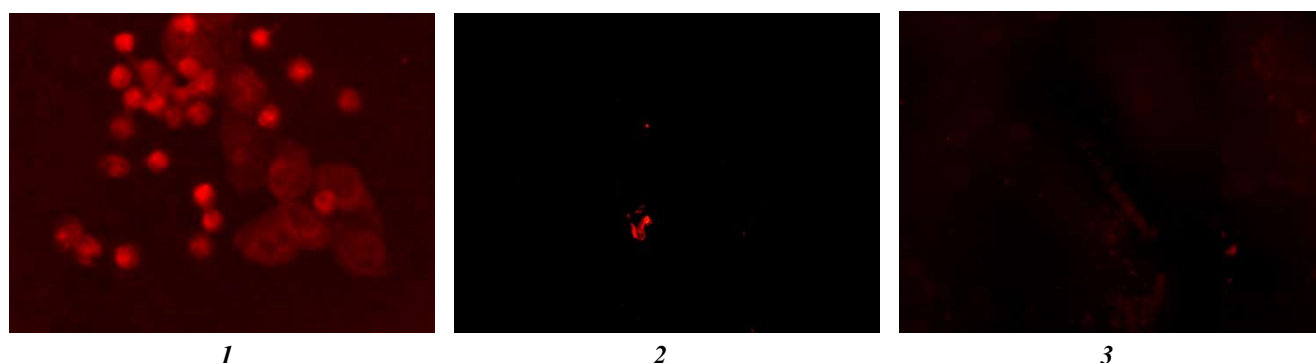


Рис. 3. Детекция силимарина в клетках ретикулоэндотелиальной системы:
1) макрофаги, культивированные с Syl-Au; 2) макрофаги, культивированные с силимарином; 3) контроль

Заключение. Синтезированный препарат содержал наночастицы диаметром 20–23 нм. Антитела против силимарина были получены из сыворотки кролика, затем мечены TRITC и исследованы методом дот-блоттинга. Для обнаружения силимарина в клетках ретикулоэндотелиальной системы были выделены мышинные перитонеальные макрофаги.

Полученные клетки инкубировали с силимарином и конъюгатами силимарина с КЗ в среде DMEM. Флуоресцентная микроскопия показала, что силимарин с наночастицами золота может взаимодействовать и образовывать связи с клетками ретикулоэндотелиальной системы, поскольку наночастицы выступают в качестве носителей активного вещества. Поглощение препарата может происходить непосредственно в результате броуновского столкновения наноносителя с мембраной (механизм столкновения) или диффузии через водную фазу до поглощения в клеточной мембране (механизм диффузии). Способность макрофагов захватывать сконструированный препарат – перспективная тема для дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Изучение потенциала использования наночастиц селена в качестве носителей для антигена вируса ящура / С. А. Старовров [и др.] // Ветеринарная патология. 2016. № 3 (57). С. 38–46.





2. Лощина Е. В. Оценка безопасности и эффективности применения препарата «Гепасейф» при гепатитах животных: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.01. Саратов, 2015. 20 с.
3. Патент 2504347 Российская Федерация, МПК A61D 7/00. Инъекционная лекарственная форма для лечения и профилактики заболеваний печени у животных / Козлов С. В., Староверов С. А., Волков А. А., Енгашев С. В. № 2012140353/13; заявл. 21.09.2012; опубл. 20.01.2014. 3 с.
4. Biomedical applications of green synthesized Nobel metal nanoparticles / Z. U. Khan et al. // *J. Photochem. Photobiol.* 2017. Vol. 173. P. 150–164.
5. Langer R. Drug delivery and targeting / R. Langer // *Nature*. 1998. Vol. 392. P. 5–10.
6. Ritschel W. A. Microemulsions for improved peptide absorption from the gastrointestinal tract // *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 1991. Vol. 13. P. 205–220.
7. Shaw P. G. Diseases old dog // *Radiology*. 1991. Vol. 178. P. 63–66.
8. Physico-Chemical Characteristics of Gold Nanoparticles / V. Amendola et al. // *In Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry Elsevier*. 2014. Vol. 66. P. 81–152.
9. Van Zuylen L., Verweij J., Sparreboom A. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology // *Inv. New. Drug*. 2001. Vol. 19. P. 125.
10. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy / J. B. Vines et al. // *Front. Chem.* 2019. No.7. P. 167.
11. Yeh Y. C., Creran B., Rotello V. M. Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology // *Nanoscale*. 2012. No. 4. P. 1871–1880.

REFERENCES

1. Studying the potential of using selenium nanoparticles as carriers for the FMDV antigen / Staroverov S. A. et al. *Veterinary Pathology*. 2016;3(57):38–46. (In Russ.).
2. Loshchinina E. V. Evaluation of the safety and effectiveness of the use of the drug “Hepasafe” in animal hepatitis: author. dis. ... cand. vet. Sciences: 06.02.01. Saratov; 2015. 20 p. (In Russ.).
3. Patent 2504347 Russian Federation, IPC A61D 7/00. Injectable dosage form for the treatment and prevention of liver diseases in animals / Kozlov S.V., Staroverov S.A., Volkov A.A., Engashev S.V. No. 2012140353/13; appl. 09.21.2012; publ. 20.01.2014. 3 p. (In Russ.).
4. Biomedical applications of green synthesized Nobel metal nanoparticles / Z. U. Khan et al. *J. Photochem. Photobiol.* 2017;173:150–164.
5. Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature*. 1998;392:5–10.
6. Ritschel W. A. Microemulsions for improved peptide absorption from the gastrointestinal tract. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 1991;13:205–220.
7. Shaw P. G. Diseases old dog. *Radiology*. 1991;178:63–66.
8. Physico-Chemical Characteristics of Gold Nanoparticles / V. Amendola et al. *In Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry Elsevier*. 2014;66:81–152.
9. Van Zuylen L., Verweij J., Sparreboom A. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Inv. New. Drug*. 2001;19:125.
10. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy / J. B. Vines et al. *Front. Chem.* 2019;(7):167.
11. Yeh Y. C., Creran B., Rotello V. M. Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*. 2012;(4): 1871–1880.

*Статья поступила в редакцию 28.03.2023; одобрена после рецензирования 20.06.2023; принята к публикации 29.06.2023.
The article was 28.03.2023; approved after 20.06.2023; accepted for publication 29.06.2023.*