

The effect of deoxyribonucleic acid (DNA) addition on mechanical properties of gelatin gels

Wpływ dodatku kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) na właściwości mechaniczne żeli żelatynowych

DOI: 10.15199/62.2019.8.3

Two pork gelatin solns. were prepd. in deionized H₂O (6.66 and 10% by mass) at 65°C and then gelled at 10°C for 24 h. The well-defined portions of the gelatin were added to solns. of two types of nucleic acids (short- and long-chain, gDNA and fDNA, resp.) dissolved in a buffer (Tris-HCl and EDTA, pH 7.5) and mixed with deionized H₂O to obtain concns. in the range of 0.001–0.1% by mass. The hardness, cohesiveness, elasticity, gumminess and viscosity at 40°C of obtained gelatin gels were detd. The mech. parameters of gelatin gels were deteriorated in the presence of gDNA but an improvement of these parameters was obsd. for the gel cong. 10% gelatin and 0.1% fDNA.

Kwasy nukleinowe cieszą się coraz większym zainteresowaniem pod względem zastosowania ich w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz żywnościowym. Określono wpływ dodatku długo- i krótkołańcuchowych kwasów nukleinowych na właściwości mechaniczne żeli żelatynowych. Badania wykazały występowanie specyficznych interakcji pomiędzy żelatyną a kwasami nukleinowymi oraz pozwoliły na ocenę wpływu tych oddziaływań na twardość, kohezję, gumowatość oraz lepkość żeli.

Kwasy nukleinowe (KN) obecne są w większości żywych komórek zwierzęcych i roślinnych. Stanowią podstawowe źródło informacji

genetycznej wykorzystywanej przez komórki do funkcjonowania oraz przekazywanej komórkom potomnym w wyniku podziałów komórkowych. Istnieją dwa rodzaje natywnych KN, kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) i kwas rybonukleinowy (RNA). Szkielet łańcucha KN stanowią cząsteczki cukrów, deoksyrybozy dla DNA i rybozy dla RNA, połączonych wiązaniem fosfodiesterowym pomiędzy atomami węgla 3' i 5' dwóch kolejnych nukleotydów. Zasady azotowe KN dzielą się na zasady pirymidynowe oraz zasady purynowe. Do zasad pirymidynowych zalicza się cytozynę oraz tyminę w przypadku DNA, a uracyl w RNA. Adenina i guanina występujące w obu rodzajach KN zaliczane są do zasad purynowych, składających się z pierścienia pirymidynowego skondensowanego z pięcioczłonowym pierścieniem imidazolowym. Zasady azotowe wykazują komplementarność względem siebie, adenina łączy się dwoma wiązaniami wodorowymi z tyminą, a guanina z cytozyną trzema. Wiązania te utrzymują DNA w formie dwuniciowej, komplementarnej struktury przestrzennej podwójnej helisy, gdzie zasady azotowe tworzą rdzeń struktury otoczony cukrowo-fosforanowymi ujemnie naładowanymi łańcuchami^{1,2}.

Ze względu na właściwości fizykochemiczne, takie jak charakter polijonowy warunkujący zdolność wiązania wody, a także dużą lepkość, w szczególności w przypadku wielkocząsteczkowych polimerów DNA, KN mogą wpływać na cechy reologiczne produktów, w których występują³. W przemyśle kosmetycznym są one uważane za składnik poprawiający elastyczność, nawilżenie oraz regenerację skóry⁴. KN mają ogromny potencjał także dla przemysłu farmaceutycznego, a tworzenie leków na ich bazie, np. z użyciem oligodeoksynukleotydów antysensownych, siRNA, aptamerów i oligonukleotydów CpG znajduje się w kręgu zainteresowania środowisk badawczych oraz



Mgr inż. Joanna GŁAZOWSKA w roku 2012 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, na kierunku biotechnologia. Obecnie jest doktorantką w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności tejże uczelni oraz specjalistą w Zakładach Farmaceutycznych Polpharma SA. Specjalność – badania nad obecnością kwasów nukleinowych w żywności.

* Autor do korespondencji:

Katedra Chemii Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, tel.: (58) 347-12-46, fax: (58) 347-26-94, e-mail: glazowska.joanna@gmail.com



Dr inż. Robert TYLINGO jest absolwentem Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, doktorem nauk technicznych. Pracuje na Politechnice Gdańskiej w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności. Specjalność – reologia żywności oraz chemia biopolimerów, w tym białek żywności, chemii i technologii żywności, systemy jakości stosowanych w przemyśle spożywczym, właściwości biopolimerów.

komercyjnych. W terapii genowej KN stanowią bezpośredni czynnik terapeutyczny⁵). Obecnie największym wyzwaniem jest bezpieczne dla pacjenta dostarczenie terapeutycznych cząsteczek KN do miejsca ich przeznaczenia w organizmie. Naskórne zastosowanie KN oferuje potencjalne rozwiązanie tych problemów, zwłaszcza w leczeniu chorób dermatologicznych⁶).

KN mogą oddziaływać z białkami, lipidami lub polisacharydami wpływając na właściwości fizykochemiczne i funkcjonalne produktów spożywczych, ale także układów syntetycznych, w tym tych wykorzystywanych jako nośniki genów w terapiach genowych⁷). Spośród dostępnych polikationów w oddziaływaniach z DNA zastosowanie znajdują glikole, w tym glikol polietylenowy (PEG). PEG jest polimerem rozpuszczalnym w wodzie i nietoksycznym, tworzącym hydrożele z KN. Spośród różnych typów hydrożeli, PEG tworzy rozgałęzione struktury charakteryzujące się wysocą jednorodną strukturą wewnętrzną o dużej użyteczności. Dzięki modyfikacji końców łańcuchów, PEG może tworzyć komplementarne wiązania z DNA, zwiększając stopień usieciowania i trwałość hydrożelu. Zaletą powstałych w ten sposób hydrożeli jest ich wysoka biokompatybilność, spontaniczny proces sieciowania, odwracalna termiczna denaturacja wiązań pomiędzy nukleotydami oraz wysoka specyficzność oddziaływań pomiędzy komplementarnymi parami zasad azotowych⁸).

Innym polimerem wykorzystywanym do tworzenia kompleksów z KN jest chitozan. Jest to tani, biokompatybilny, biodegradowalny i nietoksyczny kationowy polimer, który tworzy kompleksy polielektrolitowe z DNA, np. plazmidowym, zapewniając cząsteczkom DNA ochronę przed degradacją nukleazową. Chitozan wykorzystywany jest jako nośnik KN zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*, a dzięki zastosowaniu takich ligandów, jak transferyna lub galaktoza możliwe jest zwiększenie specyficzności jego oddziaływań z transfekowanymi komórkami. Kompleksy chitozanu z DNA tworzą w wodzie trwałe struktury, które pozostają stabilne przez ponad 3 miesiące, podczas gdy niesieciowane nanocząstki przechowywane w roztworze soli fizjologicznej są stabilne tylko przez kilka godzin. Liofilizowane nanocząstki chitozanu z DNA zachowują swoją zdolność transfekcji przez ponad 4 tygodnie⁹).

Kolejną grupą polimerów tworzących z DNA trwałe struktury są białka. Mogą one wchodzić w interakcje z KN na zasadzie oddziaływań specyficznych i niespecyficznych. W przypadku oddziaływań niespecyficznych sekwencja nukleotydów nie ma znaczenia. Interakcje histon-DNA są przykładem takich oddziaływań, które występują między grupami funkcyjnymi białka i grupami fosforanowymi szkieletu cukrowego łańcucha KN. Specyficzne oddziaływania DNA-białko zależą przede wszystkim od sekwencji zasad w DNA, a także od ich orientacji w zależności od formy skręcania helisy. Te interakcje białko-DNA są silniejsze od oddziaływań niespecyficznych i są głównie pochodną wiązań wodorowych poprzez cząsteczki wody, oddziaływań jonowych, takich jak tworzenie mostków solnych pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów w białku a szkieletem DNA, oddziaływań van der Waalsa, a także oddziaływań hydrofobowych. Tworzące się biomakromolekuły, zbudowane z białka i DNA, w roztworze tworzą żelowe struktury supramolekularne¹⁰). Takie cechy białek, jak szeroki zakres mas cząsteczkowych, duża liczba grup podatnych na derywatację, szeroka dostępność, stabilność, hydrofilowość i biodegradowalność, od dawna gwarantują im zastosowanie jako nośników w różnych systemach dostarczania leków oraz w przemyśle żywnościowym¹¹).

Jednym z najczęściej wykorzystywanych biopolimerów białkowych jest żelatyna. Żelatyna to biodegradowalny polimer otrzymywany z kolagenu białkowego, izolowany głównie ze skór, kości oraz ścięgien zwierzęcych. Otrzymywana jest w procesie alkalicznej lub kwasowej hydrolizy, a uzyskana żelatyna różni się wartością punktu izoelektrycznego, występującego przy pH 9,0–9,4 w przypadku warunków zasadowych i przy pH 4,8–5,1 dla warunków kwasowych. Żelatyna jest heterogeniczną mieszaniną jedno- lub wieloniciowych polipeptydów zawierających 300–4000 aminokwasów. Systemy oparte na żelatynie wykorzystywane są jako nośniki w transporcie leków, produktach do higieny osobistej, ale przede wszystkim jako dodatki do żywności¹²).

Żelatyna jest polimerem łatwo ulegającym bioabsorpcji, charakteryzującym się jako nośnik leków brakiem toksyczności i niską immunogennością. Te cechy spowodowały, że stosuje się ją także jako nośnik DNA. Dzięki występowaniu zjawiska koacerwacji możliwe jest tworzenie struktur żelatynowych zawierających KN w swoim wnętrzu (koacerwacie), wykazującym stabilność zewnątrzkomórkową¹⁰). KN obecne wewnątrz żelatynowej otoczki są chronione przed degradacją enzymatyczną i wykazują stabilność w trakcie kilkugodzinnej ekspozycji na surowicę¹³). Struktury żelatynowe pozwalają także na transport cząsteczek KN o szerokim zakresie długości oraz umożliwiają łączenie w tym samym nośniku różnych związków, w celu np. zwiększenia skuteczności transfekcji lub połączenia terapii lekowej i genowej. Ponadto dzięki zastosowaniu zjawiska przedładowania ładunku dają możliwość zaprojektowania kompleksów o określonym ładunku powierzchniowym, od neutralnego (wyrównany ładunek DNA i żelatyny) do dodatniego (przewaga ładunku żelatyny). Dzięki temu możliwe jest ułatwienie transportu elektrostatycznego kompleksów żelatyna-DNA do wnętrza komórek¹⁴). Dodatkowo w wyniku odpowiedniej modyfikacji powierzchni, nanosfery żelatynowe zawierające DNA mogą być poddane liofilizacji oraz długotrwałemu przechowywaniu bez utraty ich bioaktywności¹³).

Innym aspektem zastosowania kompleksów żelatyna-KN jest powszechnie stosowana obróbka chemiczna oraz modyfikacje białek w przemyśle spożywczym. W żywności żelatyna stosowana jest do żelowania i modyfikacji właściwości reologicznych produktów spożywczych. Kompleksy DNA-żelatyna mają wpływ na właściwości mechaniczne poprzez zachodzące między tymi makromolekułami interakcje i asocjacje prowadzące do powstania struktur o przeważającym ładunku dodatnim. Zjawisko to prowadzi do zmniejszenia twardości i lepkości powstających żeli. Kompleksy DNA-żelatyna wykazują również dobrą stabilność termiczną, co potencjalnie pozwala na stworzenie kapsułek będących nośnikami lub wzmacniaczami smaku umami (poprzez obecność wolnych nukleotydów, takich jak inozyno-5-monofosforan (IMP), 5-monofosforan guanozyny (GMP) i 5-monofosforan adenozy (AMP) w ich strukturze)¹⁵), które pękając w temperaturze ciała w jamie ustnej, uwalniałyby transportowane cząsteczki¹⁴).

Celem pracy było zbadanie właściwości reologicznych żeli żelatynowych o różnym stężeniu żelatyny, zawierających dodatek krótko- i długołańcuchowych polimerów DNA, jako kompleksów mogących służyć za nośniki w przemyśle żywnościowym, ale także w terapii genowej. Z tego względu do przeprowadzenia badań wybrano żelatynę.

Część doświadczalna

Surowce

Do przygotowania żeli żelatynowych wykorzystano żelatynę wierzbową 250° Bloom (Fluka), którą rozpuszczano w wodzie dejonizowanej (Millipore, Merck). Długołańcuchowe kwasy nukleinowe (gDNA), o długości fragmentów 20000–50000 par zasad, otrzymano poprzez izolację odczynnikami fenol-chloroform-alkohol izoamylowy (Sigma Aldrich) z lizatu komórek nowotworowych ludzkiej linii HT29. Jako krótkołańcuchowe kwasy nukleinowe (fDNA) wykorzystano komercyjnie dostępne liofilizowane KN o średniej długości ok. 100 par zasad (Sigma Aldrich). Roztwory KN przygotowano poprzez rozpusz-



Dr hab. inż. Agnieszka BARTOSZEK, prof. nadzw. PG jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, gdzie po uzyskaniu tytułu magistra inżyniera rozpoczęła prace badawcze w Katedrze Technologii Leków i Biochemii w zespole prof. Jerzy Konopy. Badania dotyczyły mechanizmu działania związków przeciwnowotworowych z grupy 1-nitroakrydyn i zakończone były obroną doktoratu w 1990 r. Stopień doktora habilitowanego uzyskała w 2012 r. Specjalność – żywność funkcjonalna.

czenie izolatów w buforze TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5, Sigma-Aldrich).

Aparatura

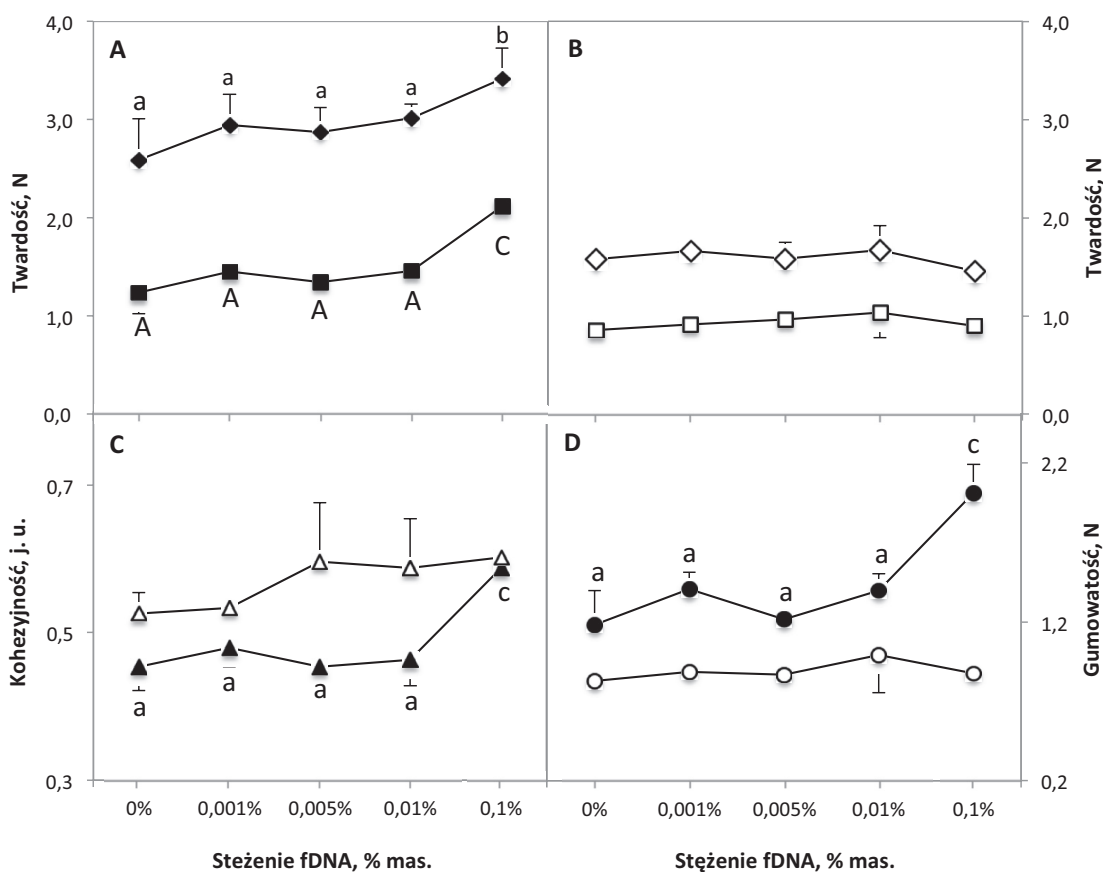
Badania ściskania żeli żelatynowych bez oraz z dodatkiem KN wykonano z użyciem maszyny wytrzymałościowej Instron 5543. Badania lepkości wykonano lepkościomierzem rotacyjnym Brookfield LV DVIII Ultra.

Metodyka badań

W przeprowadzonych badaniach dotyczących oceny wpływu dodatku KN na właściwości reologiczne żelatyny wykorzystano dwa poziomy stężenia żelatyny: 6,66% mas. (stężenie standardowe) oraz 10% mas. (stężenie badane) charakteryzujące się tworzeniem stałych żeli. Zastosowanie dwóch stężeń żelatyny pozwalało na ocenę oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy łańcuchami polipeptydów żelatyny i KN w zależności od stosunku zawartości KN:białko. Proporcje te mogły mieć wpływ na organizację struktury żelu^{10, 14}. W celu przygotowania żeli żelatynowych naważkę żelatyny zalano odpowiednią ilością wody dejonizowanej, tak aby uzyskać stężenie 6,66 oraz 10% mas. Żelatynę pozostawiono na 30 min w temperaturze pokojowej do spęcznienia, a następnie ogrzewano w bloku grzejnym (typ QB, Grant) w temp. 65°C do rozpuszczenia. Rozpuszczoną żelatynę przelano po

bagietce do szklanych krystalizatorów o płaskim dnie i pozostawiano do zastygnięcia w 10°C na 24 ± 2 h. Porcje żelu wykorzystywane w pomiarach wycinano cylindrycznym, stalowym korkoborem o średnicy 16,38 mm. Wysokość każdej próbki określana była za pomocą cyfrowej suwmiarki. KN do badanych żeli wprowadzano poprzez zmieszanie odpowiedniej objętości roztworu KN z wodą wykorzystywaną do spęcznienia żelatyny do uzyskania stężeń w zakresie 0,001–0,1% mas.

Pomiar twardości prowadzono zgodnie ze zmodyfikowanym testem analizy tekstury. Oznaczenia wykonywano ze stałą prędkością przesuwu głowicy (0,005 mm/s) z trzpieniem (o średnicy 0,5 cala) do uzyskania 30-proc. odkształcenia żelu. Parametry opisujące właściwości mechaniczne badanych żeli wyznaczono zgodnie ze standardową profilowaną analizą tekstury. Pierwszą i drugą twardość żeli wyznaczono jako maksymalną siłę z jaką trzpień naciskał na żel przy pierwszym i drugim cyklu ściskania. Kohezyjność wyznaczono jako stosunek dodatnich pól powierzchni pod krzywą ściskania w drugim i pierwszym cyklu. Sprężystość wyrażono stosunkiem odległości, jaką przemierza trzpień od początku kompresji do osiągnięcia siły maksymalnej w drugim i pierwszym cyklu. Gumowatość żelu określono obliczając iloczyn wartości twardości pierwszej oraz kohezyjności. Lepkość żeli mierzono umieszczając próbkę płynnego żelu termostatowanego w 40°C w naczynku pomiarowym wiskozymetru. Pomiar wykonywano w warunkach stałej temp. 40°C, wykorzystując wrzeciono sc4-18 przy jego prędkości obrotowej 250 rpm, co odpowiadało szybkości ścinania 330 1/s.



g. 1. The effect of the addition of short-chain nucleic acids (fDNA) on the mechanical properties of gelatin gels; A – changes in the hardness 1 (◆) and hardness 2 (■) values depending on the addition of fDNA to 10% gelatin gels; B – changes in the hardness 1 (◇) and hardness 2 (□) values depending on the addition of fDNA to 6.66% gelatin gels; C – changes in the cohesiveness value depending on the content of fDNA in gelatin gels: 6.66% (△) and 10% (▲); D – changes in gumminess depending on the content of fDNA in gelatin gels: 6.66% (○) and 10% (●); the results represent means ± SD of three independent experiments; significantly different values determined by ONE-WAY Anova with Dunnett's test were marked as: P < 0.05 – aA, P < 0.01 – bB, P < 0.001 – cC.

ys. 1. Wpływ dodatku krótkołańcuchowych kwasów nukleinowych (fDNA) na właściwości mechaniczne żeli żelatynowych; A – zmiany wartości twardości 1 (◆) oraz twardości 2 (■) w zależności od dodatku fDNA do 10-proc. żeli żelatynowych; B – zmiany wartości twardości 1 (◇) oraz twardości 2 (□) w zależności od dodatku fDNA do 6,66-proc. żeli żelatynowych; C – zmiany wartości kohezyjności w zależności od zawartości fDNA w żelach żelatynowych: 6,66% (△) oraz 10% (▲); D – zmiany wartości gumowatości w zależności od zawartości fDNA w żelach żelatynowych: 6,66-proc. (○) oraz 10-proc. (●); podane wyniki stanowią wartości średnie ± SD z trzech niezależnych oznaczeń; w analizie statystycznej wykorzystano jednokierunkową analizę nowa z testem Dunnetta; istotność statystyczną ustalono na poziomie P < 0,05 – aA, P < 0,01 – bB, P < 0,001 – cC

W celu określenia długości fragmentów KN wykorzystanych w badaniach wykonano elektroforezę roztworów kwasów nukleinowych w 1-proc. mas./obj. żelu agarozowym, przygotowanym w buforze 1xTBE (8,9 mM Tris-base, 8,9 mM kwas borowy, 0,05 mM EDTA, pH 8,3) z dodatkiem 2 μ L barwnika GelRed (10000x). Do studzienek żelu wprowadzano po 10 μ L mieszaniny badanego roztworu kwasów nukleinowych oraz buforu obciążającego (6x, DNA-Gdańsk). Jako marker wielkości wykorzystano marker DNA M10 kpz o długościach fragmentów DNA 10000–200 pz, (DNA-Gdańsk). Elektroforezę prowadzono w buforze 1xTBE, przez 1,5 h przy 100 V. Otrzymane wyniki rozdzielania elektroforetycznego analizowano z wykorzystaniem skanera ChemiDoc™ System, firmy Bio Rad.

Statystyczne opracowanie wyników

Jeśli nie podano inaczej, wszystkie przedstawione wyniki stanowiły średnią z trzech niezależnych powtórzeń \pm odchylenie standardowe (SD). Istotność statystyczna różnic pomiędzy analizowanymi parametrami została ustalona na poziomie co najmniej $p < 0,05$ za pomocą jednokierunkowej analizy Anova z testem Dunnetta.

Wyniki

Na rys. 1 i 2 przedstawiono wpływ dodatku fDNA w ilości 0–0,1% mas. zawartości w żelu na wybrane parametry mechaniczne 10-proc.

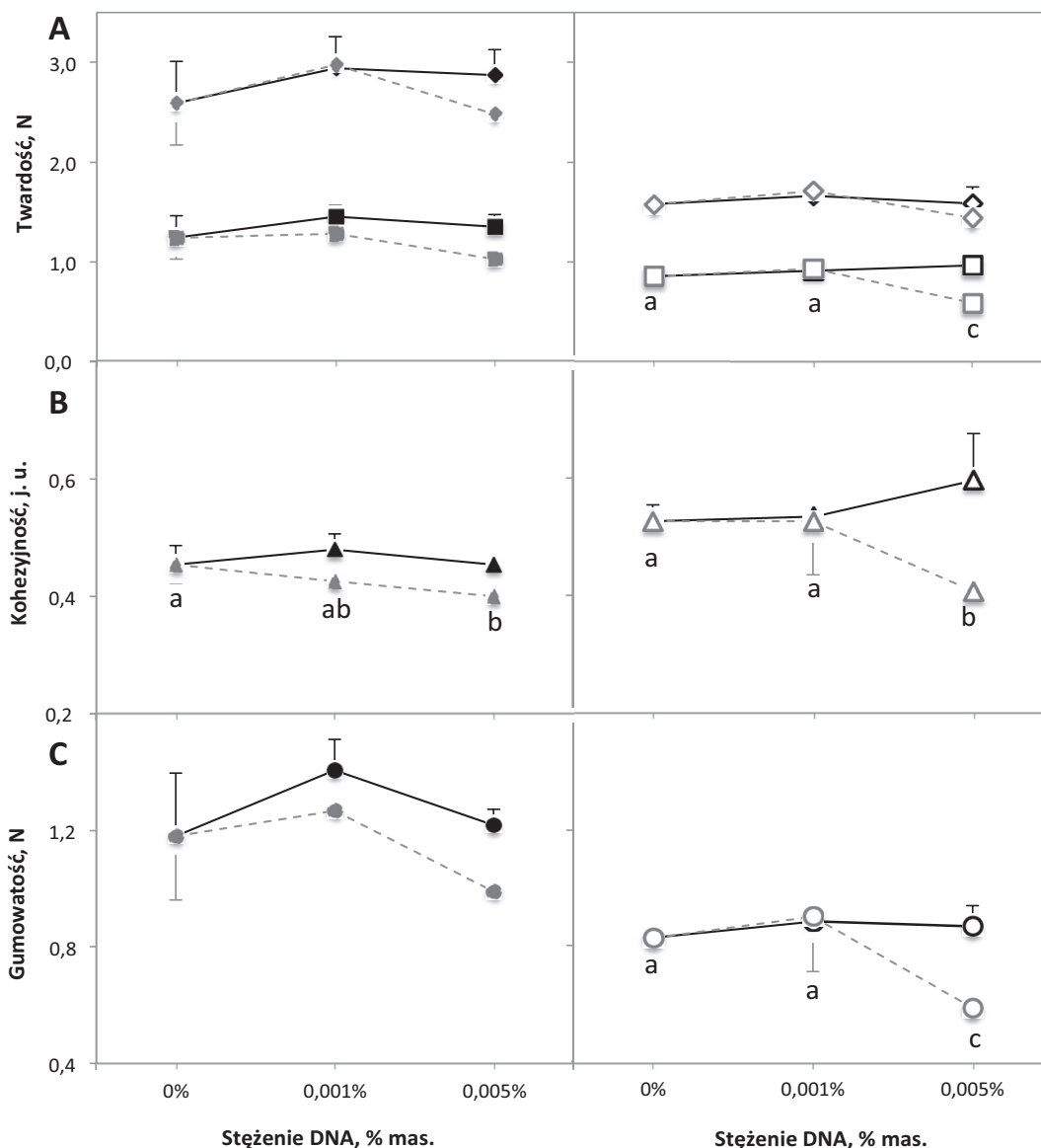


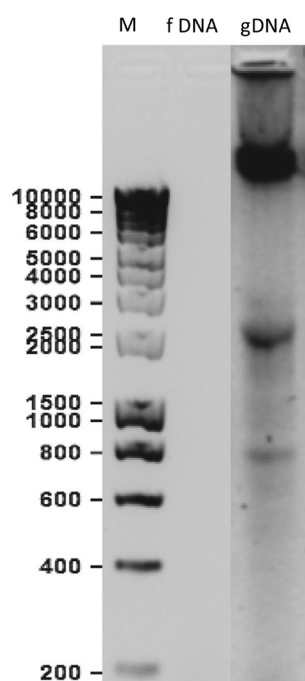
Fig. 2. The effect of the addition of short-chain (fDNA) and long-chain nucleic acids (gDNA) on the mechanical properties of gelatin gels; A – left side – the effect of the addition of fDNA (◆) and gDNA (◆) on the hardness 1 and the effect of the addition of fDNA (■) and gDNA (■) on the hardness 2 in 10% gelatin gels; right side – the effect of the addition of fDNA (◇) and gDNA (◇) on the hardness 1 and the effect of the addition of fDNA (□) and gDNA (□) on the hardness 2 in 6.66% gelatin gels; B – left side – the effect of the addition of fDNA (▲) and gDNA (▲) on the cohesiveness of 10% gelatin gels; right side – the effect of the addition of fDNA (△) and gDNA (△) on the cohesiveness of 6.66% gelatin gels; C – left side – the effect of the addition of fDNA (●) and gDNA (●) on the gumminess of 10% gelatin gels. Right side – effect of the addition of fDNA (○) and gDNA (○) on the gumminess of 6.66% gelatin gels; the results represent means \pm SD of three independent experiments; significantly different values determined by ONE-WAY Anova with Dunnett's test were marked as: $P < 0.05$ – b, $P < 0.01$ – c

ys. 2. Wpływ dodatku krótkołańcuchowych (fDNA) oraz długołańcuchowych kwasów nukleinowych (gDNA) na właściwości mechaniczne żeli żelatynowych; A – lewa strona – wpływ dodatku fDNA (◆) i gDNA (◆) na wartości twardości 1 oraz wpływ dodatku fDNA (■) i gDNA (■) na wartości twardości 2 w 10-proc. żelach żelatynowych; prawa strona – wpływ dodatku fDNA (◇) i gDNA (◇) na wartości twardości 1 oraz wpływ dodatku fDNA (□) i gDNA (□) na wartości twardości 2 w 6,66-proc. żelach żelatynowych; B – lewa strona – wpływ zawartości fDNA (▲) oraz gDNA (▲) na kohezję 10-proc. żeli żelatynowych; prawa strona – wpływ zawartości fDNA (△) oraz gDNA (△) na kohezję 6,66-proc. żeli żelatynowych; C – lewa strona – wpływ zawartości fDNA (●) oraz gDNA (●) na gumowatość 10-proc. żeli żelatynowych; prawa strona – wpływ dodatku fDNA (○) oraz gDNA (○) na gumowatość 6,66-proc. żeli żelatynowych; podane wyniki stanowią wartości średnie \pm SD z trzech niezależnych oznaczeń; w analizie statystycznej wykorzystano jednokierunkową analizę Anova z testem Dunnetta; istotność statystyczną ustalono na poziomie $P < 0,05$ – b, $P < 0,01$ – c.

oraz 6,66-proc. żeli żelatynowych. Na rys. 2 porównano wpływ gDNA i fDNA kwasów nukleinowych (KN) na badane parametry mechaniczne żeli żelatynowych. Wielkość cząstek fDNA oraz gDNA w porównaniu z markerem mas molekularnych przedstawiono na rys. 3. Jako próby odniesienia zastosowano żele zawierające albo jedynie wodę albo dodatek buforu TE, w ilości odpowiadającej objętości dodawanego roztworu KN. Ponieważ tylko w przypadku pomiarów lepkości dla 6,66-proc. żelu żelatynowego (rys. 4) zaobserwowano statystycznie istotną różnicę pomiędzy próbami odniesienia, wszystkie wyniki interpretowano, wykorzystując jako kontrolę żele z dodatkiem buforu TE, w którym sporządzano roztwory DNA.

Twardość

Dane przedstawione na rys. 1 i 2 ilustrują różnice we właściwościach mechanicznych żeli żelatynowych podczas 1. i 2. nacisku głowicy maszyny wytrzymałościowej. Wprawdzie stężenie żelatyny miało decydujące znaczenie dla twardości żelu, zgodnie z oczekiwaniem 10-proc. żele (rys. 1A) charakteryzowały się większą twardością niż 6,66-proc. żele (rys. 1B), jednakże wzbogacenie żeli w KN miało zdolność modyfikowania tych właściwości. Dodatek fDNA wpłynął istotnie na twardość tylko w przypadku 10-proc. żeli żelatynowych i to wyłącznie przy zastosowaniu największego testowanego stężenia fDNA (0,1% mas., rys. 1A), powodując ponad 20-proc. wzrost tego parametru. Odmienne efekty zaobserwowano gdy żele żelatynowe były mieszane z długołańcuchowymi KN. Dodatek gDNA, szczególnie w większym stężeniu (0,005% mas.), zmniejszał twardość obu rodzajów żeli żelatynowych (rys. 2A), przy czym zmiany te tylko w jednym przypadku osiągnęły poziom statystycznej istotności, dla 6,66-proc. żelu z dodatkiem 0,005% mas. gDNA.



g. 3. Profiles of DNA fragmentation obtained as a result of agarose electrophoresis; M – molecular mass marker; fDNA – short-chain DNA; gDNA – long-chain DNA.

ys. 3. Profile fragmentów DNA uzyskane w wyniku elektroforezy agarozowej; M – marker mas molekularnych; fDNA – krótkołańcuchowy DNA; gDNA – długołańcuchowy DNA.

Kohezyjność

Badane 6,66-proc. żele żelatynowe generalnie charakteryzowały się wyższymi wartościami kohezyjności w porównaniu z żelami 10-proc. (rys. 1C i 2B). W przypadku kohezyjności wpływ fDNA i gDNA także wykazał odmienny trend. Zawartość 0,1% mas. fDNA spowodowała, że kohezyjność obu rodzajów żeli żelatynowych zrównała się (odpowiednio $0,588 \pm 0,011$ oraz $0,588 \pm 0,066$), bowiem parametr ten dla składu 10% żel/0,1% fDNA wzrósł o ok. 50% w porównaniu z żelem kontrolnym niezawierającym DNA (rys. 1C). Dodatek gDNA w sposób zależny od zawartości KN w żelu obniżał kohezyjność obu rodzajów żeli (rys. 2B). Dodatek 0,005% mas. gDNA spowodował istotne statystycznie spadki kohezyjności, dla 10-proc. żeli żelatynowych

o 13,5%, a w przypadku 6,66-proc. żeli o 29,2% w porównaniu z próbkami kontrolnymi (rys. 2C).

Sprężystość

Parametr ten zależny był od sposobu wykonania oznaczenia. W omawianych badaniach wykorzystano pomiar sprężystości przy stałej prędkości poruszania się trzpienia. Tak prowadzone pomiary nie wykazały zależności ani pomiędzy dodatkiem krótko- ani długołańcuchowych KN a sprężystością 6,66-proc. i 10-proc. żeli żelatynowych.

Gumowatość

Gumowatość żeli żelatynowych wzrastała wraz ze stężeniem żelatyny. Obecność KN w żelu, tak jak w przypadku pozostałych oznaczanych parametrów, w odmienny sposób modyfikowała gumowatość zależnie od tego, czy dodatkiem był fDNA czy gDNA. Żele żelatynowe 6,66-proc. wzbogacone w fDNA charakteryzowały się zbliżoną gumowatością w porównaniu z próbkami żeli kontrolnych. Tylko największe testowane stężenie (0,1% mas.) i tylko w przypadku 10-proc. żelu żelatynowego miało istotny statystycznie wpływ na gumowatość żelu, zwiększając ją o ponad 70% (rys. 1D). Żel ten charakteryzował się największą gumowatością spośród badanych próbek. W przypadku obu rodzajów żeli z dodatkiem gDNA wielkość tego parametru malała wyraźnie ze stężeniem KN, choć tylko w przypadku 6,66-proc. żelu i 0,005% mas. gDNA spadek ten (o 54,2%) osiągnął statystyczną istotność (rys. 2C).

Lepkość

Badania lepkości przeprowadzono dla obu rodzajów żeli żelatynowych z dodatkiem fDNA (rys. 4). Ponieważ obecność buforu TE wpływała na lepkość żelu, wyniki odnoszono do żeli kontrolnych z dodatkiem buforu TE. W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie lepkości 10-proc. żeli żelatynowych zawierających dodatek fDNA, przy czym spadek ten nie był w sposób istotny zależny od stężenia fDNA w badanym zakresie. Żele żelatynowe 6,66-proc. charakteryzowały się większą wrażliwością na dodatek buforu TE. W porównaniu z żelami sporządzonych z dodatkiem wody zaobserwowano w ich przypadku istotny statystycznie spadek lepkości w wyniku dodatku buforu. Lepkość 6,66-proc. żeli wzbogaconych w KN utrzymywała się na podobnym poziomie, niezależnie od stężenia fDNA, który dodawany był do żelu w postaci roztworu w buforze TE.

Wnioski

W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano, że zarówno długo- jak i krótkołańcuchowe KN mogą powodować istotne statystycznie różnice w parametrach mechanicznych żeli żelatynowych. KN były mieszane z żelami w postaci roztworów w buforze TE. Obecność składników buforu miała pewne znaczenie dla lepkości badanych żeli, ale nie zmieniała innych analizowanych parametrów. Może to świadczyć o tym, że za cechy reologiczne żeli żelatynowych odpowiadały głównie interakcje pomiędzy białkami a KN, a wpływ soli i charakter jonowy rozpuszczalnika nie odgrywały znaczącej roli w kształtowaniu tych cech.

Właściwości mechaniczne żeli zawierających białka i KN wynikały z interakcji pomiędzy tymi makromolekułami, stąd też zarówno stężenie żelatyny, jak i stężenie oraz długość łańcucha KN miały znaczenie, co zaobserwowano w przypadku badanych żeli żelatynowych. Łańcuchy KN to cząsteczki naładowane ujemnie wskutek dysocjacji reszt kwasu fosforowego(V) w łańcuchu polinukleotydom. Cząsteczki białek z kolei są łańcuchami poliaminokwasowymi o stosunkowo słabym dodatnim ładunku powierzchniowym, wynikającym z obecności reszt aminokwasowych o charakterze zasadowym.

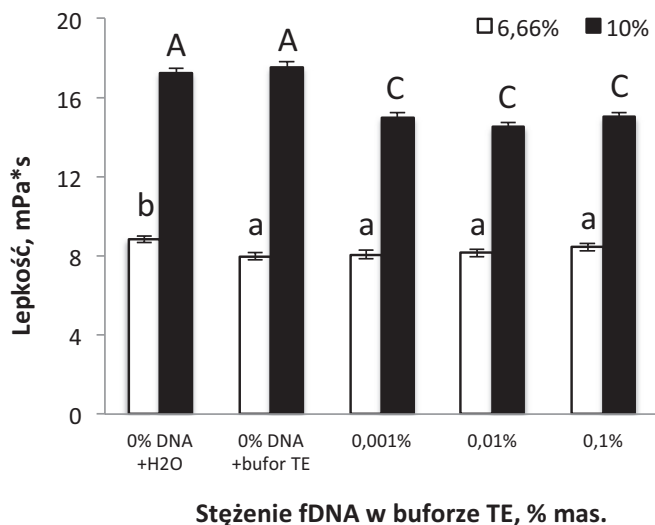


Fig. 4. Viscosity of gelatin solutions with and without the addition of short-chain nucleic acids (fdDNA) measured at 40°C. The results represent means \pm SD of three independent experiments. Significantly different values determined by ONE-WAY Anova with Dunnett's test were marked as: $P < 0.01$ – b, $P < 0.001$ – C.

Rys. 4. Lepkość roztworów żelatyny bez oraz z dodatkiem fdDNA mierzona w 40°C; istotność statystyczną ustalono na poziomie $P < 0,01$ – b, $P < 0,001$ – C

Ze względu na budowę cząsteczkową, stosunek ładunków pomiędzy KN a żelatyną szacuje się na 16:1^{10, 12}), stąd też więcej cząsteczek żelatyny potrzebnych jest do wyrównania ładunku cząsteczki KN o podobnej liczbie monomerów. W związku z tym, im większe jest stężenie KN, tym więcej cząsteczek żelatyny potrzebnych jest do zrównoważenia ładunków wprowadzonych do żelu wraz z cząsteczkami KN. Innymi interakcjami, których można oczekiwać są wiązania wodorowe i oddziaływania van der Waalsa. Ich częstotliwość jest związana z zawartością, składem chemicznym i strukturą makrocząsteczek tworzących żel. Te założenia teoretyczne znalazły odzwierciedlenie w pomiarach.

W przypadku mniejszych stężeń żelatyny (6,66% mas.), dodatek fdDNA nie wpływał na właściwości mechaniczne badanych żeli. Zmianie nie ulegała także lepkość. Dopiero przy większym stężeniu żelatyny (10% mas.) i największej zawartości fdDNA (0,1%) żele cechowało, w porównaniu z żelami kontrolnymi, zwiększenie twardości, kohezji i gumowatości, przy jednoczesnym obniżeniu lepkości. Wzrost kohezji dla 10-proc. żeli żelatynowych z dodatkiem fdDNA sugerować może większą organizację cząsteczek wewnątrz żelu, a zatem silniejsze oddziaływania w postaci wiązań wodorowych oraz sił van der Waalsa z cząsteczkami żelatyny. Także wyższa gumowatość wskazywała na to, że wartości siły potrzebnej do zerwania wiązań wewnątrz tych żeli były większe, co potwierdziło pojawienie się silniejszych oddziaływań. Stwierdzono, że niezbędnym jest pewien, osiągnięty dopiero przy stężeniu 10% żelatyny i 0,1% fdDNA, poziom interakcji pomiędzy makromolekułami wchodzącymi w skład badanych żeli aby ujawnił się ich wpływ na właściwości mechaniczne. Z kolei na lepkość takich mieszanin największy wpływ miały oddziaływania kwasowo-zasadowe pomiędzy cząsteczkami żelatyny i KN. W momencie osiągnięcia równowagi pomiędzy dodatnimi ładunkami żelatyny a ujemnie naładowanymi łańcuchami KN, niezależnie od stężenia KN, dochodziło do zaburzenia oddziaływań pomiędzy cząsteczkami białka, co powodowało obniżenie lepkości^{10, 14}).

Odmienne znaczenie dla właściwości mechanicznych żeli żelatynowych miał dodatek gDNA. Stężenie KN w przypadku dodatku fdDNA i gDNA było takie samo, a zatem teoretycznie również i liczba możliwych oddziaływań kwasowo-zasadowych, van der Waalsa i wiązań wodorowych. Sugeruje to, że czynnikiem decydującym o właściwościach mechanicznych była w tym przypadku raczej długość łańcucha polinukleotydowego wymuszająca specyficzną organizację cząsteczek tworzących żel. W przypadku zarówno 6,66-proc., jak i 10-proc. żeli żelatynowych, obecność gDNA zmniejszała ich twardość, kohezję i gumowatość w porównaniu z żelami kontrolnymi. Wyniki te sugerują, że rozmiar cząsteczek gDNA był wystarczająco duży by zaburzyć oddziaływania pomiędzy cząsteczkami żelatyny, a przez to parametry wytrzymałościowe żeli żelatynowych.

Podsumowanie

Celem pracy było oznaczenie właściwości reologicznych modelowych żeli żelatynowych wzbogaconych w KN i zbadanie możliwości występowania interakcji między długo- lub krótkołańcuchowymi cząsteczkami DNA a żelatyną. Z przeprowadzonych badań wynika, że zaproponowany model pozwala na ocenę występujących w badanych układach interakcji. Zaobserwowano również różnice w wynikach uzyskanych dla KN o długości do 300 pz oraz fragmentów sięgających 50000 pz. Interakcje pomiędzy KN a żelatyną wpłynęły na takie cechy reologiczne żeli, jak twardość, kohezja oraz gumowatość. Nie stwierdzono natomiast wpływu dodatku KN na sprężystość badanych żeli niezależnie od zastosowanego stężenia żelatyny. Uzyskane wyniki sugerują, że manipulując wielkością kwasów nukleinowych i ich zawartością można modyfikować właściwości reologiczne żeli żelatynowych, co może mieć znaczenie przy proponowaniu nowych rozwiązań, tak w projektowaniu nośników czynników terapeutycznych w terapiach genowych, jak i funkcjonalnej żywności.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2016/23/N/NZ9/02227 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Otrzymano: 10-01-2019

LITERATURA

- [1] J. Głazowska, U. Stankiewicz, A. Bartoszek, *Żywność. Nauk. Technol. Jakość.* 2017, **110**, 18.
- [2] F. Geinguenaud, E. Guenin, Y. Lalatonne, L. Motte, *ACS Chem. Biol.* 2016, **11**, 1180.
- [3] J. Głazowska, U. Stankiewicz, R. Tylingo, A. Bartoszek, *Żywność. Nauk. Technol. Jakość.* 2016, **109**, 5.
- [4] L. Rigano, C. Andolfatto, F. Rastrelli, *Cosmet. Toilet. Mag.* 2006, **121**, 57.
- [5] S.D. Patil, D.G. Rhodes, D.J. Burgess, *AAPS J.* 2005, **7**, 61.
- [6] M. Zakrewsky, S. Kumar, S. Mitragotri, *J. Control. Release* 2016, **15**, 477.
- [7] D. Luo, W.M. Saltzman, *Nat. Am.* 2000, **18**, 33.
- [8] K.W. Wang, T. Betancourt, C.K. Hall, *Macromolecules* 2018, **51**, nr 23, 9758.
- [9] G. Borchard, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, **52**, 145.
- [10] N. Arfin, H.B. Bohidar, *J. Phys. Chem. B* 2012, **116**, 13192.
- [11] A.K. Verma, K. Sachin, A.S. Bohidar, H.B. Bohidar, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2005, **6**, 121.
- [12] K. Rawat, *J. Surf. Sci. Technol.* 2014, **30**, 77.
- [13] K.W. Leong, H.-Q. Mao, V.L. Truong-Le, K. Roy, S.M. Walsh, J.T. August, *J. Control. Release* 1998, **53**, 183.
- [14] N. Arfin, V.K. Aswal, H.B. Bohidar, *RSC Adv.* 2014, **4**, 11705.
- [15] O.G. Mouritsen, H. Khandelia, *FEBS J.* 2012, **279**, 3112.