

БІОФУНКЦІОНАЛІЗАЦІЯ ПОВЕРХНІ МАГНІТОКЕРОВАНИХ НАНОКОМПОЗИТІВ ИМУНОГЛОБУЛІНОМ ЛЮДИНИ

Д.Г. Усов, А.Л. Петрановська, П.П. Горбик, М.П. Івахненко

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова 17, 03164 Київ-164*

Розроблено методики іммобілізації нормального імуноглобуліну людини на поверхні нанокмпозитів магнетит/поліакриламід та магнетит/γ-амінопропілсілоксан.

Вивчено процеси неспецифічної адсорбції та ковалентної іммобілізації антитіл та співставлено ізотерми ковалентного приєднання окисненого імуноглобуліну людини та неспецифічної (фізичної) адсорбції нормального імуноглобуліну людини. Проведено дослідження кінетики вивільнення імуноглобуліну у модельне середовище.

Встановлено, що при ковалентному щепленні на поверхні нанокмпозитів іммобілізується більша кількість імуноглобуліну, ніж при фізичній адсорбції. Така іммобілізація є стійкішою до зворотного вивільнення імуноглобуліну у розчин.

Вступ

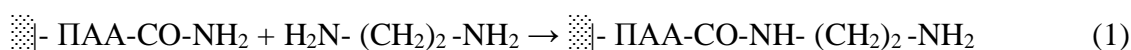
Використання методів нанотехнології, супрамолекулярної хімії та біотехнології обґрунтовує цілеспрямоване створення новітніх наноструктурних матеріалів із багаторівневою ієрархічною архітектурою та поліфункціональними властивостями, які розпізнають та селективно взаємодіють з клітинами, бактеріями, вірусами та іншими організмами [1]. Особливе місце у нанохімії належить розробці наноматеріалів, які беруть участь у процесах метаболізму біооб'єктів та можуть змінювати його у заданому напрямку. У першу чергу це відноситься до таких функціональних систем, як медико-біологічні нанороботи [2, 3]. Досконались нативних біопроектів, принципів саморегуляції біосистем викликає необхідність їх моделювання у лабораторних умовах та створення на цій основі високоефективних засобів розпізнавання мікробіологічних об'єктів, прицільної доставки лікарських препаратів, діагностики та терапії на клітинному і генному рівнях [4-6].

Методи досліджень

Дослідження процесів іммобілізації нормального імуноглобуліну людини проводили на нанокмпозитах з різними поверхнями: магнетит/поліакриламід ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$), та магнетит/γ-амінопропілсілоксан ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$).

Синтез магнетиту детально описаний в [7].

Нанесення мономеру акриламід (АА) і зшивального реагенту N,N'-метилен-біс-акриламід на поверхню нанорозмірного магнетиту проведено на роторному випаровувачі при 30 С°, в розчині мономеру і зшивального реагенту в етиловому спирті [7, 8]. Поверхню поліакриламідного шару активували етилендіаміном для утворення реакційно здатних $-\text{NH}_2$ груп на поверхні [9] за реакцією:



Модифікування поверхні наночастинок магнетиту γ-амінопропілсілоксаном проводили рідиннофазовим способом у толуолі за відпрацьованою раніше методикою [10].

Методики адсорбції антитіл на поверхнях наноконкомпозитів різної природи на прикладі нормального імуноглобуліну (Ig) людини

Нормальний імуноглобулін людини з концентрацією $C = 100$ мг/мл діалізували проти 2 л 0,02 М ацетатного буфера на фізіологічному розчині протягом доби. З очищеного Ig виготовляли серію розчинів для побудови калібрувального графіку. Вимірювання оптичної густини (D) та зняття спектрів поглинання Ig здійснювали на Spektrometer Lambda 35 uv/vis Perkin Elmer Instruments при $\lambda = 280$ нм. Спектри поглинання наведені на рис. 1, калібрувальний графік показаний на рис. 2.

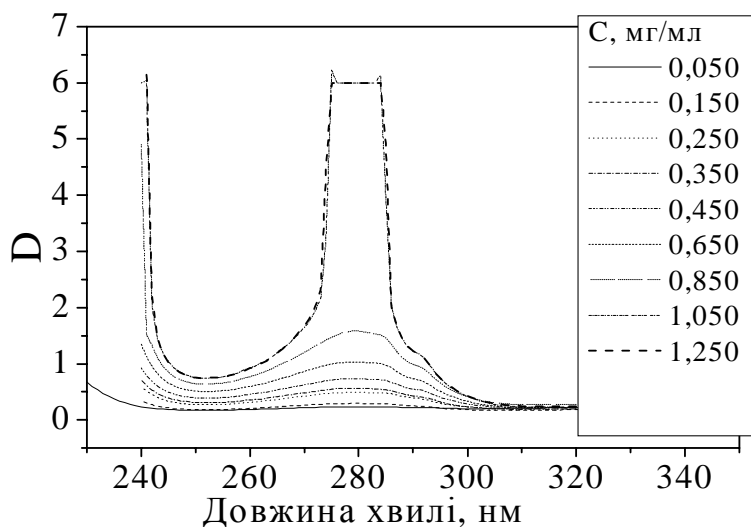


Рис. 1. Спектри поглинання нормального Ig людини в середовищі фізіологічного розчину.

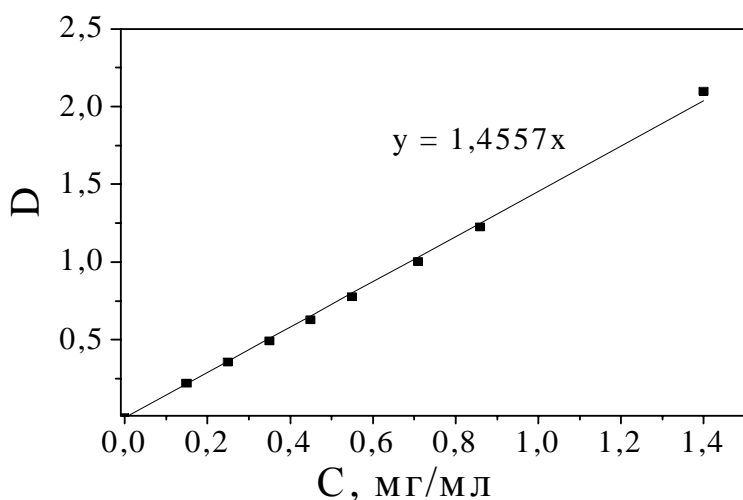


Рис. 2. Калібрувальний графік нормального імуноглобуліну людини в середовищі фізіологічного розчину.

Дослідження ізотерм неспецифічної (фізичної) адсорбції Ig

Наважки наноконкомпозитів Fe_3O_4 /ПАА та Fe_3O_4 / γ -АПС по 100 мг заливали розчинами нормального Ig людини (після діалізу) різної концентрації.

Адсорбцію Ig проводили у фізіологічному середовищі протягом 2 год в динамічному режимі при кімнатній температурі. Кількість адсорбованої речовини на поверхні наноконкомпозитів визначали вимірюванням концентрації Ig контактних розчинів до і після адсорбції. Концентрацію вимірювали за допомогою спектрофотометра при $\lambda = 280$ нм за калібрувальним графіком.

Дослідження ізоTERM ковалентного зв'язування Ig з активованою поверхнею нанокompозитів, покритих шаром ПАА та γ -АПС

Хімічна іммобілізація антитіл на поверхні нанокompозитів може бути здійснена шляхом ковалентної взаємодії реакційноздатної аміногрупи з альдегідними функціональними групами окисненого імуноглобуліну. Окиснення очищеного нормального Ig людини проводили 0,1 М NaIO₄ в ацетатному буфері (рН 5,0) за реакцією:



Окиснений Ig очищали діалізом проти 2 л 0,02 М ацетатного буфера (рН 5,0). Розчин окиснених антитіл після діалізу був доведений до рН 8 – 9 0,06 М карбонатно-гідроксидним буфером на фізіологічному розчині (рН 9,5).

З окисненого Ig виготовляли серію розчинів для побудови калібрувального графіку. Вимірювання оптичної густини (D) та зняття спектрів поглинання Ig здійснювали при $\lambda = 280$ нм. Спектри поглинання наведені на рис. 3, вихідні концентрації і значення D – на рис. 4.

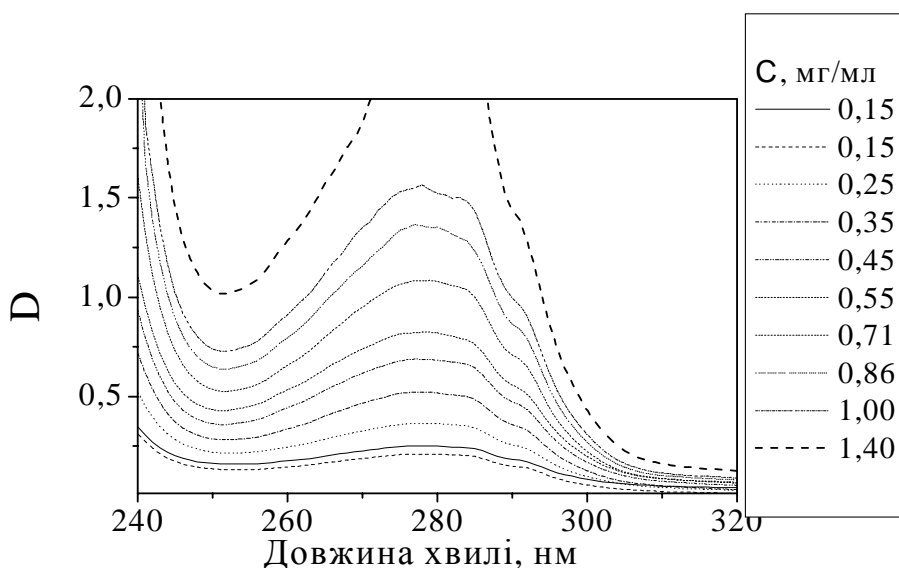


Рис. 3. Спектри поглинання окисненого Ig людини в середовищі карбонатного буфера на основі фізіологічного розчину.

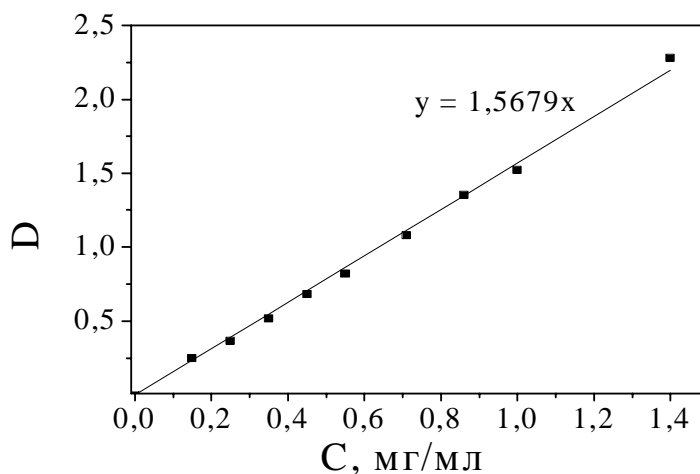


Рис. 4. Калібрувальний графік нормального імуноглобуліну людини, окисненого 0,1 М NaIO₄ в 0,02 М ацетатному буфері (рН 5,0).

Ковалентне зв'язування Ig на нанокompозитах Fe₃O₄/ПАА та Fe₃O₄/γ-АПС проводили у 0,06 М карбонатному буфері (рН 9,0) на фізіологічному розчині протягом 2 год в динамічному режимі при кімнатній температурі. Ковалентне зв'язування Ig з поверхнею відбувалося за реакцією:



Кількість іммобілізованої речовини на поверхні нанокompозитів визначали вимірюванням концентрації Ig контактних розчинів до і після адсорбції. Концентрацію вимірювали за спектрофотометричним методом УФ-поглинання при λ = 280 нм за калібрувальним графіком.

Вивчення вивільнення ковалентно зв'язаного Ig з поверхні нанокompозитів магнетит/ПАА і магнетит/γ-АПС у модельне середовище

Вивільнення Ig у модельне середовище (фізіологічний розчин) досліджували на зразках Fe₃O₄/ПАА та Fe₃O₄/γ-АПС, котрі містили ковалентно іммобілізований Ig і були досліджені при побудові відповідних ізотерм. Зразки нанокompозитів (0,03 г) з різною кількістю ковалентно приєднаного Ig заливали фізіологічним розчином (7 мл) і через певний час вимірювали оптичну густину УФ-поглинання при λ = 280 нм та розраховували відповідну C_{дес.} (концентрацію десорбованої речовини) за калібрувальним графіком.

Результати та обговорення

В роботі було досліджено неспецифічну (фізичну) адсорбцію нормального імуноглобуліну людини (Ig) та його ковалентне приєднання на поверхнях нанокompозитів Fe₃O₄/ПАА та Fe₃O₄/γ-АПС. Одержані ізотерми неспецифічної адсорбції (табл. 1, 2) та ковалентного приєднання Ig (табл. 3, 4) для вказаних нанокompозитів мають форму прямих залежностей без виходу на насичення (рис. 5, 6). Було виконано їх лінеаризацію відповідно рівнянню y = E·x та визначено відповідні коефіцієнти розподілу E (мл/г) імуноглобуліну між поверхнею нанокompозиту та розчином.

Таблиця 1. Ізотерма неспецифічної адсорбції нормального Ig людини на поверхні нанокompозиту Fe₃O₄/ПАА

C ₀ , мг/мл	D(280 нм)	C _{рівн.} , мг/мл	A _{фіз.} , мг/г
0,35	0,485	0,33	0,84
0,45	0,629	0,43	0,90
0,55	0,776	0,53	0,85
0,71	0,966	0,66	2,32
0,86	1,153	0,79	3,40
1,40	1,762	1,21	9,48

Ковалентне приєднання антитіл до аміно-функціоналізованих нанокompозитів виконували наступним чином. Амінні групи, розташовані на поверхні нанокompозитів, реагували з альдегідними функціональними групами, які було утворено на молекулах Ig шляхом періодатного окиснення карбогідратних залишків Ig. При цьому утворювалися основи Шиффа (іміни). Ковалентне приєднання антитіл за цим методом до поверхні носіїв має перевагу в порівнянні з іншими методами ковалентної іммобілізації, яка полягає в тому, що відбувається орієнтоване закріплення молекул антитіла, а саме Fe

фрагментом (fragment crystalline) до поверхні, тоді як Fab фрагмент (fragment antigen binding) залишається незмінним і орієнтованим назовні [11, 12].

Таблиця 2. Ізотерма неспецифічної адсорбції нормального Іg людини на поверхні нанокомпозиту Fe₃O₄/γ-АПС

C ₀ , мг/мл	D(280 нм)	C _{рівн} , мг/мл	A _{фіз} , мг/г
0,15	0,249	0,18	0,00
0,25	0,305	0,22	0,00
0,45	0,607	0,44	0,64
0,55	0,745	0,54	0,66
0,71	0,964	0,69	0,80
0,86	1,178	0,85	0,568
1,00	1,361	0,98	0,97
1,40	1,911	1,38	1,18

Таблиця 3. Ізотерма ковалентного приєднання окисненого Іg людини на поверхні нанокомпозиту Fe₃O₄/ПАА

C ₀ , мг/мл	D(280 нм)	C _{рівн} , мг/мл	A(Ig/ПАА), мг/г
0,15	0,201	0,128	5,07
0,25	0,288	0,184	15,52
0,35	0,420	0,268	19,14
0,45	0,528	0,337	26,48
0,55	0,630	0,402	34,59
0,71	0,841	0,536	40,57
0,86	0,974	0,621	55,79
1,00	1,144	0,730	63,04
1,40	1,416	0,903	116,00

Таблиця 4. Ізотерма ковалентного приєднання окисненого Іg людини на поверхні нанокомпозиту Fe₃O₄/ γ-АПС

C ₀ , мг/мл	D (280 нм)	C _{рівн} , мг/мл	A(Ig/γ-АПТЕС), мг/г
0,15	0,282	0,140	2,42
0,25	0,352	0,224	6,14
0,35	0,468	0,298	12,07
0,45	0,594	0,379	16,67
0,55	0,723	0,461	20,70
0,71	0,924	0,590	28,08
0,86	1,025	0,653	48,19
1,00	1,207	0,770	53,71
1,40	1,742	1,111	67,41

Обчислені коефіцієнти розподілу (E) та кількості Іg, іммобілізованого на поверхні нанокомпозитів при максимальній концентрації його вихідного розчину C = 1,4 мг/мл, зведено в табл. 5. У випадку ковалентного приєднання, коефіцієнти розподілу перевищують більш ніж на порядок відповідні коефіцієнти розподілу для неспецифічної адсорбції, що відображає зміщення рівноваги в бік іммобілізації речовини на поверхні.

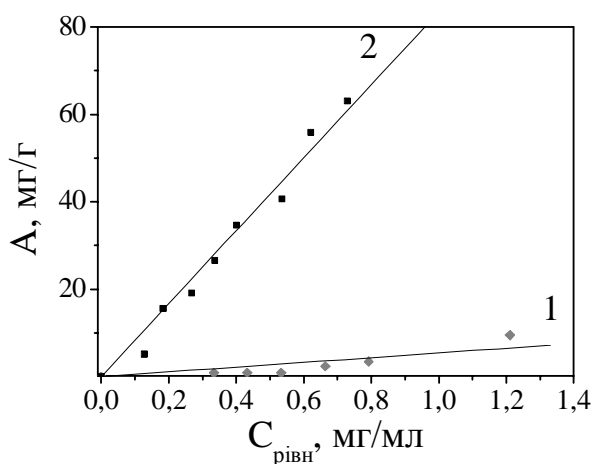


Рис. 5. Порівняння ізотерм неспецифічної адсорбції нормального Іg людини (1) та ковалентного приєднання окисненого Іg людини (2) наноконкомпозитом $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$. Неспецифічна адсорбція, $E=5,40$ мл/г; ковалентне приєднання, $E=83,53$ мл/г.

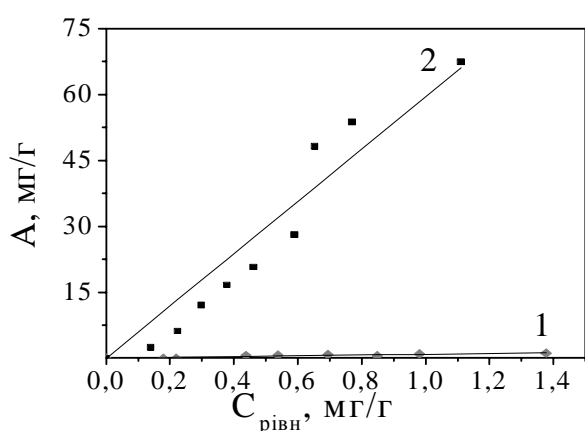


Рис. 6. Порівняння ізотерм неспецифічної адсорбції нормального Іg людини (1) та ковалентного приєднання окисненого Іg людини (2) наноконкомпозитом $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$. Неспецифічна адсорбція $E=0,92$ мл/г; ковалентне приєднання, $E=59,51$ мл/г.

Таблиця 5. Кількість іммобілізованого Іg людини на наноконкомпозитах з різними поверхнями при максимальній концентрації вихідного розчину імуноглобуліну $C = 1,4$ мг/мл

Наноконкомпозит	$A_{\text{фіз.}}, \text{ мг/г}$	$E_{\text{фіз.}}, \text{ мл/г}$	$A_{\text{ков.}}, \text{ мг/г}$	$E_{\text{ков.}}, \text{ мл/г}$
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$	9,48	6,1	116,00	83,53
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$	1,18	0,92	67,41	59,51

При ковалентному приєднанні імуноглобуліну на поверхні наноконкомпозитів, значна його частина (64 – 80 %) залишається в розчині, оскільки реакція утворення основ Шиффа перебігає як у прямому, так і у зворотньому напрямку (табл. 3, 4).

Природа поверхні наноконкомпозиту також впливає на величину як фізичної, так і ковалентної іммобілізації Іg. Кількості іммобілізованого Іg та коефіцієнти розподілу є вищими у випадку наноконкомпозиту $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$.

Дослідження десорбції фізично адсорбованого Іg показало, що після промивання наноконкомпозитів у 5 мл фізіологічного розчину практично весь Іg переходить у розчин протягом 1 – 2 хв.

Вивільнення ковалентно іммобілізованого Іg у модельне середовище (фізіологічний розчин) досліджували на зразках $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$ та $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$, котрі були отримані при побудові відповідних ізотерм. Кінетику вивільнення ковалентно зв'язаного Іg наведено на рис. 7 і 8. Параметри кінетичних кривих було обчислено за методом найменших квадратів із застосуванням рівняння $y(x) = y_0 + Ae^{-x/t}$, де y_0 – кількість зв'язаного Іg, що

не переходить у модельне середовище з часом за даних умов, A – кількість зв’язаного Ig , що вивільняється в модельне середовище, $1/t$ – характеризує швидкість вивільнення Ig та визначає кривизну кінетичної кривої.

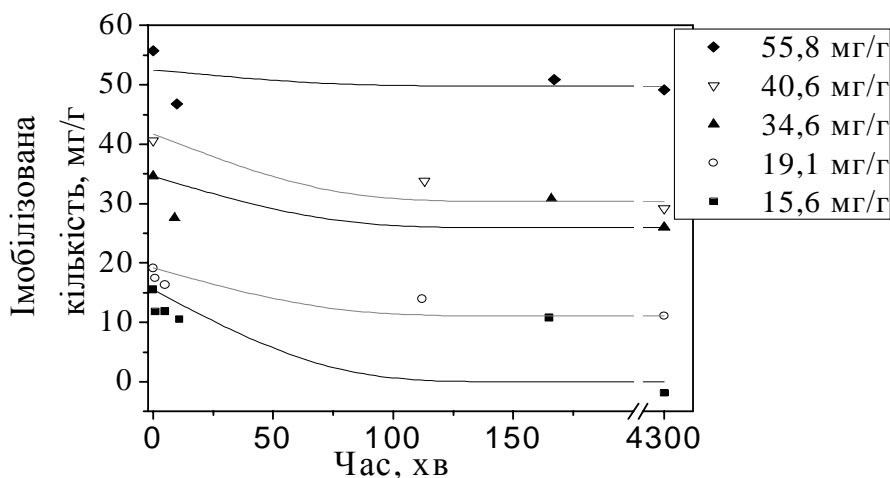


Рис. 7. Кінетика десорбції окисненого імуноглобуліну людини з $Fe_3O_4/П\text{АА}$. Праворуч вказані вихідні адсорбовані кількості окисненого імуноглобуліну людини. Криві $y = y_0 + Ae^{-x/t}$ обчислені за методом найменших квадратів.

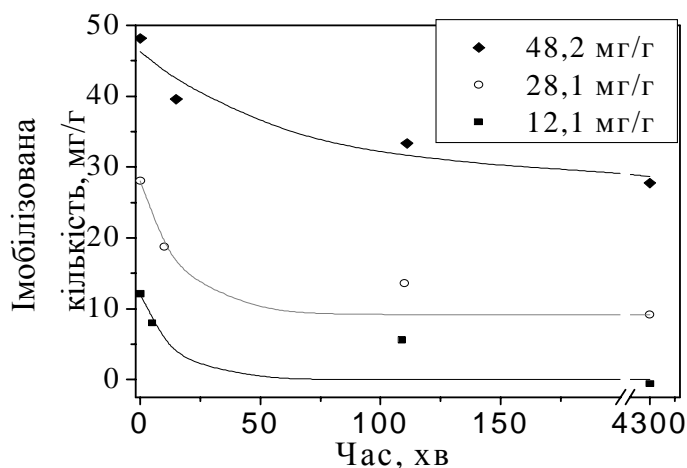


Рис. 8. Кінетика десорбції окисненого імуноглобуліну людини з $Fe_3O_4/\gamma\text{-АПТЕС}$. Праворуч вказані вихідні адсорбовані кількості окисненого імуноглобуліну людини. Криві $y = y_0 + Ae^{-x/t}$ обчислені за методом найменших квадратів

Таблиця 6. Параметри обчислених кінетичних кривих вивільнення ковалентно зв’язаного імуноглобуліну людини $y = y_0 + Ae^{-x/t}$ для нанокompозиту $Fe_3O_4/П\text{АА}$.

	$y(0) = 55,8 \text{ мГ/Г}$	$y(0) = 40,6 \text{ мГ/Г}$	$y(0) = 34,6 \text{ мГ/Г}$	$y(0) = 19,1 \text{ мГ/Г}$	$y(0) = 15,6 \text{ мГ/Г}$
y_0	$49,77 \pm 3,25$	$30,40 \pm 41,22$	$25,94 \pm 0$	$11,09 \pm 0$	0 ± 0
A	$2,76 \pm 5,62$	$11,35 \pm 0$	$8,65 \pm 0$	$8,05 \pm 0$	$15,52 \pm 0$
t	$0,27 \pm 1,45$	$1,80 \pm 19,54$	$2,64 \pm 1,24$	$4,37 \pm 1,35$	$6,51 \pm 2,45$

З одержаних кінетичних кривих можна бачити, що відносно вивільнення зменшується з ростом кількості іммобілізованого імуноглобуліну на обох поверхнях нанокompозитів. При кількості іммобілізованого Ig 55,8 мГ/Г ($Fe_3O_4/П\text{АА}$) та 48,2 мГ/Г ($Fe_3O_4/\gamma\text{-АПС}$) за перші 10 – 15 хв десорбується відповідно 16 – 18 % імуноглобуліну,

тоді як при малих кількостях іммобілізованого Ig 15,5 мг/г (Fe₃O₄/ПАА) і 12,0 мг/г (Fe₃O₄/γ-АПС) вже за перші 5 – 10 хв десорбується до 30 % білку. Вивільнення імуноглобуліну, що іммобілізований за допомогою ковалентного зв'язку, перебігає повільніше і в меншій мірі, ніж у випадку неспецифічної іммобілізації.

Таблиця 7. Параметри обчислених кінетичних кривих вивільнення ковалентно зв'язаного імуноглобуліну людини $y = y_0 + Ae^{-x/t}$ для нанокompозиту Fe₃O₄/γ-АПТЕС.

	y(0) = 48,2 мг/г	y(0) = 28,1 мг/г	y(0) = 12,1 мг/г
y ₀	28,69±3,89	9,13±0	0±0
A	17,60±4,89	18,93±3,11	12,06±3,97
t	60,15±55,12	14,93±8,03	12,18±17,68

Висновки

Розроблено методики модифікування поверхні нанокompозитів магнетит/поліакриламід та магнетит/γ-амінопропілсилоксан нормальним імуноглобуліном людини.

Вивчено процеси неспецифічної адсорбції та ковалентної іммобілізації Ig на вказаних нанокompозитах. Порівняно ізотерми ковалентного приєднання окисненого Ig людини та неспецифічної (фізичної) адсорбції нормального Ig людини. Досліджено кінетику вивільнення Ig у модельне середовище. Показано, що природа поверхні нанокompозиту впливає на величину як фізичної, так і ковалентної іммобілізації Ig. Кількості іммобілізованого Ig та коефіцієнти розподілу є вищими у випадку нанокompозиту Fe₃O₄/ПАА. Визначено співвідношення коефіцієнтів розподілу E імуноглобуліну для ковалентної іммобілізації та фізичної адсорбції для кожного з досліджуваних нанокompозитів, які дорівнюють: E_{ков.}/E_{фіз.}(ПАА) = 13,7; E_{ков.}/E_{фіз.}(γ-АПС) = 64,7. Фізично адсорбований імуноглобулін повністю десорбується у модельне середовище протягом 1 – 2 хв. Відносне вивільнення зменшується з ростом кількості ковалентно іммобілізованого імуноглобуліну на вивчених поверхнях нанокompозитів.

Показано, що ковалентне приєднання має суттєві переваги по відношенню до неспецифічної адсорбції: збільшуються термодинамічна стійкість іммобілізованого шару за рахунок утворення ковалентного зв'язку та кінетична стійкість внаслідок ускладнення вивільнення імуноглобуліну за рахунок повільного гідролізу основ Шиффа.

Робота виконана в рамках Договору № 112/07-н наукового проекту „Синтез поліфункціональних нанокompозитів з біосумісними і мінералізованими компонентами та дослідження їх властивостей” програми "Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології".

Література

1. Нанотехнология в ближайшем десятилетии. Прогноз направлений исследований // под. ред. М. К. Роко, Р.С. Уильямса и П. / пер. с англ. – М: Мир, 2002. – 292 с.
2. Gupta A. K; Gupta M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – P. 3995 – 4021.
3. Горбик П.П. Супрамолекулярна хімія на межі розподілу фаз: пріоритетні напрямки та перспективи. // Тези конф.: Нанорозмірні системи. Будова – Властивості – Технології. – НАНСИС 2007.-Київ, Україна (21-23 листопада 2007). – Київ: Вип. «Комплекс, 2007. – С. 9.
4. Шпак А.П., Горбик П.П. Фізико-хімія наноматеріалів і супрамолекулярних структур. Сборник научных трудов. – Киев: Наук. думка. – 2007. – Т. 1. – 428 с.

5. Биотехнология. Итоги науки и техники. – М: ВИНТИ Серия биотехнология. Мир, 1988. – 480 с.
6. Принципы и применения. Под ред. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – Е. 20. – 1989. – 132 с.
7. Медико-біологічні наноконпозити на основі магнетиту: синтез, модифікація, функціоналізація поверхні для застосування *in vitro* / П.П. Горбик, А.Л. Петрановська, Л.П. Сторожук, І.В. Дубровін, Л.С. Семко, В.Ф. Чехун // Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2006. – Вип. 11-12. – С 374 – 397.
8. Розробка та властивості магніточутливих наноконпозитів для спрямованого транспорту лікарських засобів / А.Л. Петрановська, О.М. Федоренко, П.П. Горбик, О.О. Чуйко, В.Ф. Чехун, І.В. Дубровін, Л.С. Семко, Л.П. Сторожук, М.В. Абрамов, С.Л. Рево // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. – 2005. – Т. 3, вип. 3. – С. 817 – 823.
9. Коршак В.В., Штиль ман М.И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. – Москва: Наука, 1984. – 261 с.
10. Модифікування наночастинок магнетиту γ -амінопропілтриетоксисиланом рідинно-фазовим методом / А.Л. Петрановська, О. Федоренко, Л.П. Сторожук, П.П. Горбик, О.О. Чуйко, Л.С. Дзюбенко, О.І. Оранська // Доповіді НАН України. – 2006. – № 1. – С. 157 – 162.
11. Wilson B.M., Nakane P.K. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies // IST – 1978. – P. 215 – 244.
12. Orient antibody immobilization to polystyrene macrocarriers for immunoassay modified with hydrazide derivatives of poly(meth)acrylic acid / V.V. Shmanai, T.A. Nikolaeva, L.G. Vinokurova, A.A. Litoshka // BMC Biotechnology.– 2001.– V. 1, № 4.– P. 128 – 133.

BIOFUNCTIONALIZATION OF THE SURFACE OF MAGNETOCARRIED NANOCOMPOSITES BY HUMAN IMMUNOGLOBULINE

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
General Naumov Str. 17, 03164 Kyiv -164*

Methods have been developed of normal human immunoglobuline (Ig) immobilization on the surface of magnetite/polyacrylamide and magnetite/ γ -aminopropyltriethoxysilane (Fe₃O₄/ γ -APTES) nanocomposites.

The processes of nonspecific adsorption and covalent hemosorption of Ig on the surface of nanocomposites mentioned were studied. The isotherms of covalent addition of oxidized Ig were compared with those of non-specific (physical) adsorption of normal human immunoglobuline. Kinetics of Ig releasing into a model environment was studied.

Larger amount of Ig was found to be adsorbed due to covalent addition rather than physical one. Covalent immobilization is more stable to releasing of immunoglobuline into solution.