

УДК 539.211:544.723.23

## ОСОБЛИВОСТІ ПРОЦЕСІВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ІМУНОГЛОБУЛІНУ НА ПОВЕРХНІ МАГНІТОЧУТЛИВОГО НАНОКОМПОЗИТУ МАГНЕТИТ/ГІДРОКСОПАТИТ

А.Л. Петрановська, В.М. Міщенко, М.П. Турелик\*, Г.М. Гуня, П.П. Горбик

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

*Розроблено методики іммобілізації нормального імуноглобуліну людини (Ig) на поверхні нанокompatитів магнетит/гідроксоапатит та магнетит/гідроксоапатит/срібло. Досліджено ізотерми адсорбції Ig на поверхні одержаних нанокompatитів у двох буферних розчинах – фосфатному та фізіологічному. Встановлено, що наночастинки срібла виступають у ролі додаткових адсорбційних центрів імуноглобуліну. Показано, що адсорбція Ig на поверхні нанокompatиту з включеннями срібла перевищує адсорбцію на поверхні магнетит/гідроксоапатит в обох досліджених буферних системах. Вивчено залежність кінетики десорбції імуноглобуліну в модельне середовище від буфера, в якому проводилась адсорбція.*

### ВСТУП

Впровадження принципів нанотехнології у методи синтезу нанокompatитних матеріалів відкриває широкі перспективи створення новітніх високоефективних біосумісних нанорозмірних носіїв для спрямованого транспорту лікарських препаратів *in vivo* [1–3]. Модифікування поверхні нанорозмірного магнетиту гідроксоапатитом є виправданим і перспективним, оскільки сприяє підвищенню біосумісності нанорозмірного носія, створеного для роботи у біологічному середовищі.

Одним з етапів синтезу поліфункціонального нанокompatиту є іммобілізація на його поверхні біологічно активних молекул, зокрема, імуноглобулінів. Така функціоналізація поверхні сприяє доставці лікарського препарату лише у цільові клітини організму. Важливим напрямком досліджень є моделювання умов адсорбції продуктів розпаду клітин та виведення їх з організму, вивчення механізму адсорбції антитіл на поверхні магніточутливого носія.

Створення "універсальних" кон'югатів, які містять на поверхні спейсерні ділянки для зв'язування моноклональних антитіл, є вирішальним етапом синтезу магнітокерованих біофункціоналізованих нанокompatитів. Такими спейсерними ділянками можуть бути наночастинки благородних металів. Використання срібла та золота в сучасних технологіях виготовлення лікарських форм

обумовлює доцільність модифікування нанокompatитів даними елементами. З метою мінімізації витрат срібла та одержання препаратів пролонгованої дії дрібнодисперсне срібло наносить на поверхню біологічно інертного адсорбенту з розвиненою поверхнею [4].

Досліджено [5] взаємодію іонів  $Ag^+$  і атомів срібла з дендримерами поліамідоамінів, широко використовуваних у біології та медицині. Встановлено константи стійкості продуктів, стехіометричні співвідношення, коефіцієнт дифузії комплексів і ступінь адсорбції  $Ag^+$  на дендримерах. Вивчена взаємодія  $Ag^+$  із альбуміном людини, доведено утворення зв'язків  $Ag-S$  та  $Ag-N$  [6]. Представлені літературні дані підтверджують можливість використання срібла в якості спейсера для міцного закріплення протеїнів на поверхні магнітокерованого носія неорганічної або органічної природи.

Останніми роками у відділі наноматеріалів ІХП НАН України розробляються способи одержання нанодисперсних магнітокерованих носіїв, які являють собою композити на основі магнітно-м'яких ферромагнетиків  $Fe_3O_4$ , одержаних рідиннофазним і твердофазним способами [7]. Залежно від мети подальшого використання їх поверхня може бути сформована поліакриламідом [8],  $(SiO_2)_n$ ,  $(TiO_2)_n$  із подальшою кон'югацією з векторними молекулами, наночастинками біометалів, благородних металів (срібла, золота).

Метою даної роботи було дослідження процесів адсорбції/десорбції імуноглобуліну

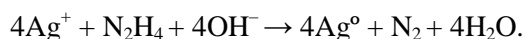
\* "Контактний" автор [ayravata@gmail.com](mailto:ayravata@gmail.com)

на поверхні нанокompatитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$  та  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$  для створення багатофункціональних біосумісних нанокompatитів медико-біологічного призначення.

#### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

**Синтез нанокompatитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$  та  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$ .** Синтез магнетиту проведено за методикою [7]. Для створення магнітних носіїв використовували фракцію частинок магнетиту розміром 20–50 нм, які є переважно однодоменими. Синтез нанокompatиту магнетит/гідроксоапатит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$ ) детально описано в [8]. Питома поверхня ( $S_{\text{птг.}}$ ) дослідних зразків становила  $105 \text{ м}^2/\text{г}$ .

Модифікування наночастинками срібла нанокompatиту  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  проводили з 0,005 н розчину  $\text{AgNO}_3$ . Кількість срібла, введеного до реакційної суміші, складає 1% від маси зразка  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Відновлення іонів срібла проведено 0,005%-им гідразин-гідратом при нагріванні та перемішуванні [9] за реакцією



Визначено, що для нанокompatиту магнетит/гідроксоапатит/срібло ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$ )  $S_{\text{птг.}} = 104 \text{ м}^2/\text{г}$ . Наявність наночастинок срібла на поверхні підтверджено рентгенофазовим аналізом на рентгенівському дифрактометрі ДРОН-УМ 1 з використанням фокусування рентгенівських променів за Бреггом-Брентано,  $\text{Co K}\alpha$  випромінювання аноду ( $\lambda = 0,179021 \text{ нм}$ ) та  $\text{Fe}$ -фільтра у відбитих променях. Обчислений за формулою Шерера середній розмір кристалітів  $\text{Ag}$  складає  $\sim 10 \text{ нм}$ .

**Дослідження ізотерм адсорбції  $\text{Ig}$  на поверхню нанокompatитів з різних буферних систем.** Нормальний імуноглобулін людини очищали діалізом проти 0,02 моль/л ацетатного буфера на фізіологічному розчині. Адсорбцію  $\text{Ig}$  проводили у заданому середовищі протягом 2 годин в динамічному режимі за кімнатної температури. Кількість адсорбованої речовини ( $A$ ) на поверхні нанокompatитів визначали вимірюванням концентрації  $\text{Ig}$  в контактних розчинах до та після адсорбції. Вимірювання оптичної густини ( $D$ ) та зняття спектрів поглинання  $\text{Ig}$  (на фосфатному буфері ( $\text{pH} = 7,0$ ) та фізіологічному розчині) здійснювали на приладі Spectrometer Lambda 35 UV/vis Perkin Elmer Instruments при  $\lambda = 280 \text{ нм}$ .

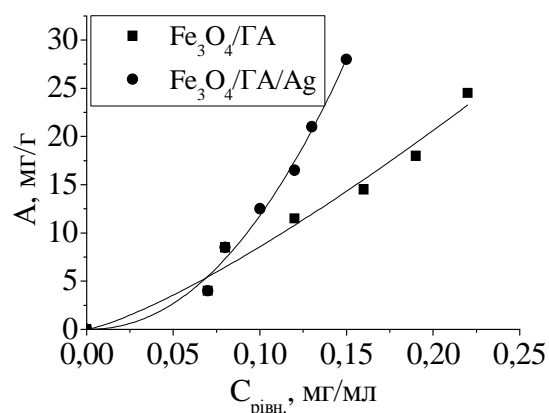
Концентрацію визначали за калібрувальним графіком згідно рівняння  $y = 0,0029 + 1,15x$  для фосфатного буфера та рівняння  $y = 0,033 + 1,24x$  для фізіологічного розчину.

**Вивчення кінетики десорбції  $\text{Ig}$ .** Вивільнення  $\text{Ig}$  у модельне середовище (фізіологічний розчин) досліджували на зразках  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$  та  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$ , які містили імуноглобулін, іммобілізований з різних буферних систем (фосфатний буфер, фізіологічний розчин). Відповідні концентрації десорбованої речовини ( $C_{\text{дес}}$ ) розраховували за графіками ізотерм десорбції.

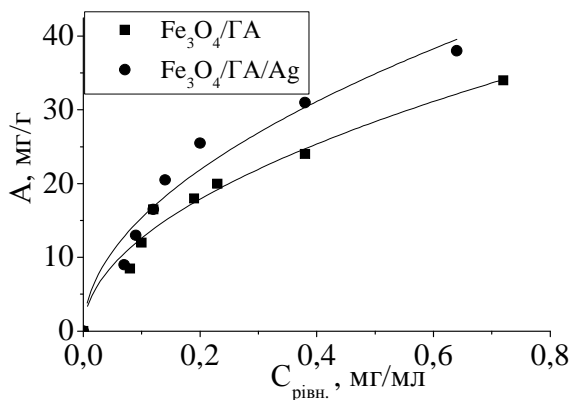
#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Адсорбція протеїнів на гідроксоапатиті включає як аніонний, так і катіонний обмін. Реакційні центри  $\text{Ca}^{2+}$  взаємодіють з карбоксилатними функціональними групами  $\text{Ig}$ , тоді як  $\text{PO}_4^{2-}$ -реакційні центри взаємодіють з основними ділянками молекули. Визначено, що форма одержаних ізотерм адсорбції імуноглобуліну є відмінною для різних буферних систем (рис. 1, 2).

Так, ізотерми адсорбції  $\text{Ig}$  у середовищі фосфатного буфера (рис. 1) мають вигнуту форму відносно осі концентрацій внаслідок виникнення конкуренції адсорбтиву та фосфат-іонів розчинника за адсорбційні центри адсорбента. Згідно з літературними даними [10, 11], така форма кривої притаманна системам, у яких взаємодія між адсорбованими молекулами є більш сильною, ніж взаємодія між розчиненими сполуками та адсорбентом. Імуноглобуліни, зазвичай, адсорбуються за низьких концентрацій (10–20 мМ) на поверхні носія з фосфатного буфера, хоча деякі кислі протеїни адсорбуються лише у водному середовищі, розчинах солей або нефосфатних буферах.



**Рис. 1.** Ізотерми адсорбції нормального  $\text{Ig}$  людини на поверхні нанокompatитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$  та  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$  з фосфатного буфера



**Рис. 2.** Ізотерми адсорбції нормального Ig людини на поверхні нанокompatивів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$  та  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$  з фізіологічного розчину

Коефіцієнт розподілу  $E$  імуноглобуліну між поверхнею нанокompatивів та розчином становить для  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$  111,36 мл/г, а для  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$  – 186,67 мл/г.

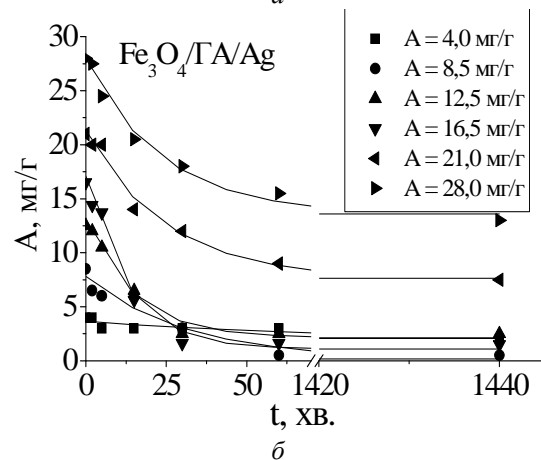
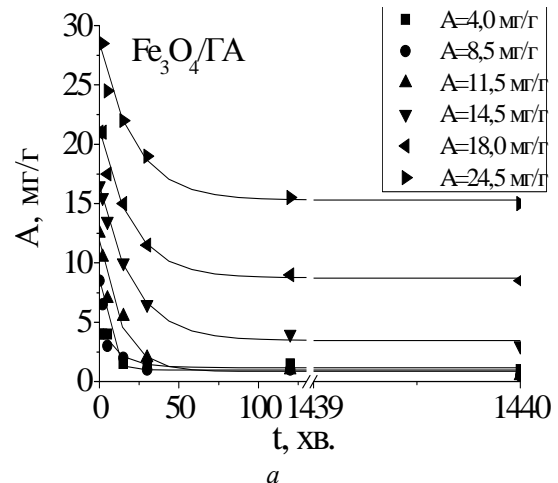
При адсорбції з фізіологічного розчину  $E$  для  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$  становить 47,2 мл/г, для  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$   $E = 59,4$  мл/г. Адсорбція Ig на поверхні нанокompatиву з наночастинками срібла перевищує адсорбцію на поверхні магнетит/ГА у двох буферних системах. Це є свідченням того, що наночастинки срібла на поверхні композиту виступають в ролі додаткових адсорбційних центрів.

Природа поверхні нанокompatиву також впливає на адсорбцію Ig. Доцільно порівняти попередні результати досліджень ізотерм адсорбції Ig (табл. 1) на нанокompatивах з активними  $-\text{NH}_2$  групами поверхні: магнетит/поліакриламід ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$ ) та магнетит/ $\gamma$ -амінопропілсілоксан ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$ ) [12–14].

**Таблиця.** Величини адсорбції Ig людини та коефіцієнти розподілу на нанокompatивах з різними поверхнями

Нанокompatив	$A$ , мг/г фіз. розчин	$E$ , мл/г фіз. розчин
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$	34,0	47,2
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$	38,0	59,4
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ПАА}$	9,48	6,1
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-АПС}$	1,18	0,92

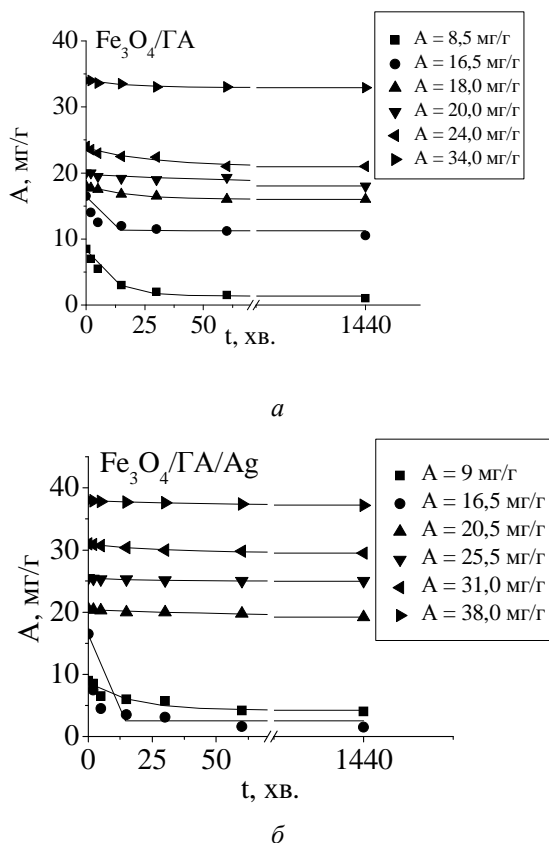
Згідно даним літератури [15, 16] зростання кількості біомолекул у розчині до рівня, що перевищує їх кількість в адсорбованому моношарі, сприяє упорядкуванню біомолекул і утворенню щільної упаковки. У випадку антигін їх орієнтація є, переважно, перпендикулярною до поверхні.



**Рис. 3.** Кінетика десорбції імуноглобуліну людини з поверхні нанокompatивів: *a* –  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$ , *б* –  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$ . На вставках наведена вихідна адсорбція імуноглобуліну з фосфатного буферу

Враховуючи більшу адсорбцію імуноглобуліну ( $A = 34\text{--}38$  мг/г) в порівнянні з адсорбцією на поверхнях нанокompatивів, функціоналізованих аміногрупами ( $A = 1,18\text{--}9,48$  мг/г), можна припустити утворення компактної упаковки адсорбованих антигін на поверхні нанокompatивів, модифікованих ГА та сріблом.

Кінетику десорбції імуноглобуліну у модельне середовище (фізіологічний розчин) досліджували на зразках  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$  та  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$  (рис. 3, 4). Одержані кінетичні криві свідчать про зниження десорбції Ig з ростом кількості імуноглобуліну на двох поверхнях нанокompatивів у фосфатному буфері. За низької адсорбції в перші 10–15 хвилин десорбується до 50% імуноглобуліну, тоді як за більш високої адсорбції впродовж того самого часу десорбується 10–20%. Десорбція імуноглобуліну з поверхні  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$  є меншою.



**Рис. 4.** Кінетика десорбції імуноглобуліну людини з поверхні наноконкомпозитів: *а* –  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$ , *б* –  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$ . На вставках наведена вихідна адсорбція імуноглобуліну з фізіологічного розчину

Вивільнення імуноглобуліну, іммобілізованого з фізіологічного розчину, за великих концентрацій  $A = 17\text{--}38$  мг/г не відбувається. Відомо [16], що великі біомолекули, в тому числі антитіла, не десорбуються при розведенні розчину тим самим буфером, в якому відбувалася адсорбція, природа адсорбенту також істотно впливає на здатність адсорбованих біомолекул десорбуватися. Така тенденція є характерною для досліджуваних поверхонь.

#### ВИСНОВКИ

Вивчено процеси іммобілізації імуноглобуліну людини на поверхні наноконкомпозитів магнетит/гідроксиапатит та магнетит/гідроксиапатит/срібло у фосфатному буфері і фізіологічному розчині. Експериментальна залежність сумісної адсорбції від концентрації адсорбенту свідчить про особливості механізму адсорбції у цих

буферних системах, а саме, ймовірну конкуренцію молекул імуноглобуліну та фосфат-іонів на активних центрах адсорбенту у фосфатному буфері. Встановлено, що наночастинки срібла є додатковими адсорбційними центрами адсорбента. Антитіла, іммобілізовані на поверхні наноконкомпозитів  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}$  та  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ГА}/\text{Ag}$ , характеризуються слабкою десорбцією в модельному середовищі, вивільнення імуноглобуліну, іммобілізованого з фізіологічного розчину, відбувається лише за низької адсорбції.

Важливими напрямками застосування біофункціоналізованих імуноглобулінами магнітокерованих наноматеріалів є видалення збудників інфекційних захворювань із крові та інших біологічних рідин, діагностика захворювань (контрастування та візуалізація), розпізнавання мікробіологічних об'єктів (за допомогою специфічних антитіл) та терапія на клітинному рівні.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Gupta A.K., Gupta M.* Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26, N 18. – P. 3995–4021.
2. *Dorozhkin S.V., Epple M.* Biological and medical significance of calcium phosphates // *Angev. Chem.* – 2002. – V. 41, N 17. – P. 3130–3146.
3. *Kokubo T., Kum H.M., Kawashita M.* Bioactive materials with different mechanical properties // *Biomaterials*. – 2003. – V. 24, N 13. – P. 2161–2175.
4. *Радионон Л.П., Одегова Г.В., Бурмистров В.А. и др.* Лекарственные препараты серебра на органических и неорганических носителях. // *Серебро и висмут в медицине: науч.-практич. конф. (25–26 февраля 2005, Новосибирск, Россия)*. – С. 87–104.
5. *Fan F.F., Marzitelli C.L., Brodbeld J.S., Bard A.J.* Electrochemical, Spectroscopic, and Mass Spectrometric Studies of the Interaction of Silver Species with Polyamidoamine Dendrimers // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77, N 14. – С. 4413–4422.
6. *Shen X., Liang H., Guo J.H. et al.* Studies on the interaction between  $\text{Ag}^+$  and human serum albumin // *J. Inorg. Biochem.* – 2003. – V. 95, N 2–3. – P. 124–130.
7. *Горбик П.П., Петрановська А.Л., Сторожук Л.П. та ін.* Медико-біологічні

- наноккомпозити на основі магнетита: синтез, модифікація, функціоналізація поверхні для застосування *in vitro* // Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2006. – №. 11–12. – С. 374–397.
8. Горбик П.П., Міщенко В.Н., Петрановська А.Л. та ін. Синтез наноккомпозитів магнетит / гідроксоапатит та дослідження їх властивостей // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. – 2009. – Т. 6, №. 4. – С. 1273–1281.
  9. Ostwald W. Kleines Praktikum der Kolloidchemie – 7<sup>th</sup> Ed. – Dresden: Verlag Th. Steinkopff, 1930. – 174 p.
  10. Скоупс Р. Методы очистки белков. – Москва: Мир, 1985. – 358 с.
  11. Волков В.А. Коллоидная химия. – Москва: МГТУ им. А.Н. Косыгина, 2001. – 640 с.
  12. Усов Д.Г., Петрановська А.Л., Горбик П.П., Івахненко М.П. Біофункціоналізація поверхні магнітокерованих наноккомпозитів імуноглобуліном людини // Хімія, фізика і технологія поверхні. – 2008. – № 14. – С. 548–556.
  13. Шпак А.П., Горбик П.П., Чехун В.Ф. и др. Наноккомпозиты медико-биологического назначения на основе ультрадисперсного магнетита // Физико – химия наноматериалов и супрамолекулярных структур. – 2007. – Т. 1. – С. 45–87.
  14. Gorbik P.P., Dubrovin I.V., Petranovska A.L. et al. Chemical construction of magneto-sensitive medico-biological nanocomposites with functions of nanorobots // Nanomaterials and Supramolecular Structures: Physics, Chemistry, Applications. – London: Springer, 2009 – P. 63–78.
  15. Биотехнология. Принципы и применения / Под ред. А. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – Москва: Мир, 1989. – 480 с.
  16. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. – San Diego: Academic Press, 2008. – 1202 p.

Надійшла 27.04.2010, прийнята 11.05.2010

### Особенности процессов иммобилизации иммуноглобулина на поверхности магниточувствительного наноккомпозита магнетит/гидроксиапатит

А.Л. Петрановская, В.Н. Мищенко, М.П. Турелик, Г.М. Гуня, П.П. Горбик

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины  
ул. Генерала Наумова 17, Киев 03164, Украина, ayravata@gmail.com*

*Разработаны методики иммобилизации нормального иммуноглобулина человека (Ig) на поверхности наноккомпозитов магнетит/гидроксиапатит и магнетит/гидроксиапатит/серебро. Исследованы изотермы адсорбции Ig на поверхности полученных наноккомпозитов в двух буферных растворах – фосфатном и физиологическом. Установлено, что наночастицы серебра выступают в роли дополнительных адсорбционных центров иммуноглобулина. Показано, что адсорбция Ig на поверхности наноккомпозита с включениями серебра превышает адсорбцию на поверхности магнетит/гидроксиапатит в обеих исследованных буферных системах. Изучена зависимость кинетики десорбции иммуноглобулина в модельную среду от буфера, в котором проводилась адсорбция.*

### The Features of Immunoglobulin Immobilization Processes on the Surface of Magnetite/Hydroxyapatite Magnetosensitive Nanocomposite

A.L. Petranovska, V.N. Mishchenko, M.P. Turelyk, G.M. Gun'a, P.P. Gorbyk

*Chuiiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine  
17 General Naumov Street, Kyiv 03164, Ukraine, ayravata@gmail.com*

*Techniques of normal human immunoglobulin (Ig) immobilization on the surface of magnetite/hydroxyapatite and magnetite/hydroxyapatite/silver nanocomposites were developed. The isotherms of Ig adsorption on the surface of nanocomposites obtained in two buffer solutions, phosphate and saline, were analyzed. It was found that silver nanoparticles act as additional adsorption sites of immunoglobulin. It was shown that Ig adsorption on the surface of the nanocomposite with silver inclusions is higher than that on the surface of magnetite/hydroxyapatite in both buffer systems studied. A dependence of the kinetics of immunoglobulin desorption to a model environment on the adsorption buffer was studied.*