

ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОЙ ИММОБИЛИЗИРОВАННОЙ ФОРМЫ КАРДИОЛИПИНА КАК МЕТОД ПРОМЫШЛЕННОГО СИНТЕЗА АНТИГЕННЫХ НАНООБЪЕКТОВ

Гонтарь И.П.¹, Емельянова О.И.¹, Парамонова О.В.², Красильников А.Н.²,
Трубенко Ю.А.²

¹ФГБУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии» РАМН, (400138, г. Волгоград, ул. Землячки, 76),
e-mail: stella243@mail.ru

²ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» Минздрава России (400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1)

На основе интеграции антигенных нанобъектов, нами были созданы и апробированы иммобилизованные магнитоуправляемые антигенные наносистемы. Они представляют собой полиакриламидные гранулы с включенным в их структуру антигеном. Наиболее интересным в этом отношении нам представляется, как модель, антигенный препарат – кардиолипин. Для получения стабильных иммобилизованных биопрепаратов многократного использования с заданными свойствами (формой, диаметром частиц, размером пор, плотностью), мы использовали метод эмульсионной полимеризации в наших модификациях с использованием полиакриламидного геля в качестве носителя. Данный метод позволил существенно увеличить сорбционную емкость, сохранить антиген в максимально нативном состоянии и открыл возможности контролируемого модифицирования.

Ключевые слова: нанобъекты, полиакриламидные гранулы, кардиолипин.

OBTAINING A STABLE IMMOBILIZED FORM OF CARDIOLIPIN AS METHOD INDUSTRIAL SYNTHESIS OF ANTIGENIC NANOOBJECTS

Gontar I.P.¹, Emelyanova O.I.¹, Paramonova O.V.², Krasilnikov A.N.²,
Trubenko Y.A.²

¹Scientific-Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Russia, Volgograd (400138, Russia, Volgograd, Zemlyatchky str., 76), e-mail: stella243@mail.ru

² Volgograd State Medical University, Russia, Volgograd (400131, Russia, Volgograd, Pavshikh Bortsov Sq., 1)

On the basis of integration antigenic properties, we have created and tested immobilized magnetic antigenic nanosystems. They represent a polyacrylamide granules with included in their structure of the antigen. Most interesting in this respect, it seems to us, as a model, antigenic preparation - cardiolipin. To obtain a stable immobilized biological reusable with specified properties (shape, particle diameter, pore size, density), we used the method of emulsion polymerization in our modifications using polyacrylamide gel as the carrier. This method made it possible to significantly increase the sorption capacity, to keep the antigen in the most native state and opened up the possibility of controlled modification.

Keywords: nanoobjects, polyacrylamide granules, cardiolipin.

Современный этап развития науки характеризуется высоким темпом роста нанотехнологий с использованием веществ и материалов размером от нескольких десятков до сотен нанометров. Правительством Российской Федерации были утверждены (распоряжение от 7 июля 2011г № 1192-р) требования к продуктам nanoиндустрии в случае соответствия их параметрам составляющих характеристик и размеров, хотя бы в одном измерении находящихся в пределах от 1 до 100 нанометров (верхний предел определяется размерами белков, ДНК, биологических молекул и иных органических соединений). Одной из таких сфер применения нанотехнологической продукции и является создание

медицинских препаратов, предназначенных для диагностики и лечения ревматических заболеваний.

Ревматические заболевания представляют собой хронический вялотекущий процесс, для которых характерно большое разнообразие форм и вариабельность темпов прогрессирования. Важное место среди них занимает системная красная волчанка (СКВ). Наиболее частой причиной летальности и развития стойкой нетрудоспособности при данной патологии являются Lupus-нефрит и Lupus-ЦНС, сопровождающиеся множественными поражениями внутренних органов. Так, антитела к нативной ДНК и фосфолипидным антигенам обуславливают развитие соответственно волчаночного гломерулонефрита и антифосфолипидного синдрома (АФС), включающего рецидивирующие артериальные и венозные тромбозы, эмболии, поражение центральной нервной системы, акушерскую патологию. Данные проявления часто выходят на ведущее место в клинической картине заболевания, определяя его тяжесть и неблагоприятный прогноз. Так, антитела к кардиолипину обуславливают развитие субтипа системной волчанки с признаками АФС, при котором часто невозможно подавить активность заболевания традиционными средствами базисной терапии, в связи с чем и возникает необходимость изучения этих патогенетических иммунологических процессов. Обнаружение в сыворотке крови различных аутоантител может иметь большое диагностическое значение. Кроме того, такие антитела обладают значительным патогенным действием, и их удаление из организма оказывает благоприятное лечебное воздействие на течение основного заболевания [6].

На основе интеграции антигенных нанообъектов, нами были созданы и апробированы иммобилизованные магнитоуправляемые антигенные наносистемы (АНС). Они представляют собой полиакриламидные гранулы с включенным в их структуру антигеном.

Нанообъектами мы называем химические группы, которые формируют активные центры ферментов, антигенные детерминанты, клеточные рецепторы и т.д. Наиболее интересным в этом отношении нам представляется, как модель, антигенный препарат – кардиолипин.

Кардиолипин – фосфолипид, структурный компонент внутренней мембраны клетки и митохондрий, построенный на основе глицерола и остатков фосфатидной кислоты. Кардиолипин может обладать антигенными свойствами, они заключены в гидрофильной части молекулы, а не в гидрофобной его части.

Формула кардиолипина $C_{81}-H_{152}-O_{17}-P_2$. Схема его структурной формулы может быть представлена в виде параллелепипеда. Учитывая длины связей $C-C - 0,154$ нм; $C=C - 0,133$ нм; $C-H - 0,112$; $C=O - 0,123$ нм (Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Баюков, 1985) можно примерно вычислить объем молекулы кардиолипина, представленной по первичной

структуре, размер которого $V = a \times b \times c$, $V = 2,772 \times 0,154 \times 1,034 = 0,4414 \text{ нм}^3$, что соответствует определению нанобъектов как частиц размерами менее 100 нм [8].

Для получения стабильных иммобилизованных биопрепаратов многократного применения с заданными свойствами (формой, диаметром частиц, размером пор, плотностью), мы использовали метод эмульсионной полимеризации в наших модификациях с использованием полиакриламидного геля в качестве носителя. Данный метод позволил существенно увеличить сорбционную емкость, сохранить антиген в максимально нативном состоянии и открыл возможности контролируемого модифицирования нанобъектов [1].

Целью нашей работы являлось изучение влияния метода эмульсионной полимеризации на активные центры антигенных детерминант кардиолипина при АФС у больных системной красной волчанкой.

Методика исследования

Существует несколько методических подходов для использования кардиолипина в качестве антигена в иммунологических реакциях, от хаотичной иммобилизации до пространственно-ориентированной.

Один из способов включения кардиолипинового антигена на основе иммобилизованных гранулированных антигенных препаратов (ИГАП) заключается в том, что предварительно полученные, высушенные, обезвоженные полиакриламидные гранулы с включенными ферромагнитными материалами помещали в спиртовой раствор кардиолипинового антигена. После инкубации, полученные гранулы приобретали шаровидную форму, и они переносились в гидрофильную фазу.

Полученный, таким образом, кардиолипиновый антиген находился в свободном состоянии и его фиксация в гранулах была только за счет электростатических Вандервальсовских сил и т.п. Концентрацию антигена (липидов) определяли по Лазарову (табл.1) [7].

Таблица 1

Потери кардиолипина при I способе иммобилизации

Концентрация кардиолипина в растворе, мг	Иммобилизованный кардиолипин, мг M±m	Потери кардиолипина M±m	Эффективность иммобилизации %
28	10,6±0,68	17,4±0,68	37,8%
24	8,8±0,83	15,2±0,37	36,1%
20	8,8±0,84	11,2±0,84	44%
16	6,6±0,89	9,4±0,89	41,3%
12	3,8±0,84	8,2±0,84	31,6%

Существует еще один из способов получения кардиолипинового иммуносорбента путем связывания полиакриламидного носителя с антигеном, смешанным с раствором полиметилметакрилата в хлороформе в соотношении 1: 1 и выделения целевого продукта, отличающейся тем, что в качестве носителя используют гранулированный полиакриламидный гель с концентрацией поперечносшивающего агента 25% и с включением в него 10%-ным оксидом железа [2,3]. Концентрированный кардиолипинового антиген получали из коммерческого препарата «Кардиолипинового антигена для реакции микропреципитации». Три ампулы по 2 мл раствора кардиолипина в абсолютном этаноле концентрировали до полного испарения в термостате при 37С° в течение 48ч. Приготовленный концентрированный кардиолипинового антиген в количестве 28 мг вносили в 2 мл 0,5%-ного раствора полиметилметакрилата в хлороформе, доводя концентрацию липидов до 14 мг/мл, т.е., по сравнению с исходной концентрацией, произошло концентрирование липидов в три раза. Полученный раствор смешивали с полиакриламидными гранулами в соотношении 1:1. Суспензию инкубировали в течение 3 ч. на магнитной мешалке в термостате при 37С°. После инкубации, пропитанные в растворе антигена полиакриламидные гранулы вносили в 10 мл воды и энергично встряхивали для получения эмульсии вода/хлороформ. В пробирку с суспензией подавали газообразный азот под давлением 0,5 атм. по трубке с сечением 0,5 мм, таким образом, чтобы создать интенсивное перемешивание в течение 15 мин. Пробирку постепенно нагревали на водяной бане до температуры кипения хлороформа (60 С°) до его полного испарения. После исчезновения запаха хлороформа в растворе определялась концентрация несвязанных липидов, которая составила 5 мг/мл, т.е. в носитель включалось 23 мг кардиолипина (табл 2).

Таблица 2

Потери кардиолипина при II способе иммобилизации

Концентрация кардиолипина в растворе, мг	Иммобилизованный кардиолипин, мг M±m	Потери кардиолипина M±m	Эффективность иммобилизации %
28	23,6±0,63	4,4±0,67	84,2%
24	20,6±0,83	3,4±0,78	85,8%
20	17,4±0,68	2,6±0,86	87,1%
16	13,6±0,69	2,4±0,83	85%
12	10,2±0,67	1,8±0,86	85%

Полученные гранулы при постановке иммунологических реакций (иммуноферментный) в процессе отмывки, применения детергентов приводило к некоторым

потерям кардиолипинового антигена, за счет чего и снижалась чувствительность этих примененных методов.

Используя различия гидрофобных и гидрофильных частей молекулы кардиолипина и новый метод иммобилизации с использованием полиакриламидного геля в качестве носителя, можно получать стабильные, пространственно-ориентированные, гранулированные с магнитными свойствами нанообъекты, с последующим применением их в диагностике и лечении больных ревматическими заболеваниями [4,5,6, 9, 10].

Учитывая это, в дальнейшей своей работе мы остановились именно на II способе включения антигенов в магнитные гранулы.

Результаты исследования и обсуждение

По описанной выше методике была произведена сорбция антикардиолипиновых антител из плазмы крови больных СКВ с клиническими проявлениями антифосфолипидного синдрома. В качестве контроля использовались сыворотки крови 10 практически здоровых лиц. Уровень антител к кардиолипину определяли до и после сорбции непрямым твердофазным иммуноферментным методом. В элюате измеряли концентрацию общего белка по Лоури. Полученные результаты представлены в таблице 3. Как видно из таблицы, после сорбции на полученном II способом сорбенте происходило достоверное снижение концентрации антител до уровня здоровых лиц. Использование же I способа получения сорбента также сопровождалось достоверным снижением концентрации антител ($p \leq 0,001$) по сравнению с исходным уровнем до сорбции, однако показатели не достигали уровня концентрации таковых у доноров и превышали их почти в два раза, что легко объяснить двукратным различием в сорбционной емкости предлагаемого иммуносорбента по сравнению с сорбентом, полученным I способом.

Таблица 3

Сорбция антител к кардиолипинового антигену из плазмы крови СКВ.

Метод получения сорбента	Концентрация АТ к КЛ до сорбции, е.о.п. M±m	Концентрация АТ к КЛ после сорбции, е.о.п. M±m	Сорбционная емкость мг/мл
II способ	0,328±0,0289	0,059±0,0170	8,00±0,390
I способ	0,328±0,0289	0,119±0,0331	3,90±0,331
p		0,014	

Контроль специфичности сорбента определяли путем смешивания 1 г гранул с 4 мл сыворотки крови донора на магнитной мешалке с интервалом 15 мин, в ней определяли концентрацию белка по Лоури, иммуноглобулинов по Манчини классов G,A,M. Результаты представлены в таблице 4.

Контроль специфичности сорбента

Время	Общий белок мг/мл	IgG мг/мл	IgA мг/мл	IgM мг/мл
Исходный фон	73	10,5	1,3	1,25
15	75	11,8	1,2	1,25
30	72	9,90	1,36	1,25
45	71	10,9	1,28	1,04
60	75	11,9	1,27	1,02

Нами был проведен сравнительный анализ классического ИФА и ИФА с использованием иммобилизованных гранулированных препаратов, полученных II способом. Использование иммобилизованного гранулированного кардиолипина в предложенном нами варианте ИФА и раствора кардиолипина в традиционном твердофазном ИФА для фосфолипидов показало, что максимальное значение экстинкции с одинаковым рабочим разведением пула сывороток было $0,280 \pm 0,033$ мг в классическом варианте и $0,342 \pm 0,027$ мг в нашей модификации. Минимальные положительные значения экстинкции в традиционном методе соответствовали разведению пула сывороток $1 \div 800$, а с использованием иммобилизованных препаратов $1 \div 6400$. Применение иммобилизованной формы кардиолипина в предлагаемом методе позволило увеличить чувствительность ИФА в 8 раз по сравнению с традиционным методом на полистероловых планшетах.

Заключение

Метод эмульсионной полимеризации с учетом гидрофобных и гидрофильных свойств молекул липидов позволяет контролируемым образом получать и модифицировать биомолекулы с характерными свойствами. Этот метод дает возможность придать химическим группам нанообъектов, входящим в активные центры ферментов антигенных детерминант, клеточных рецепторов и токсинов, принципиально новые качества и осуществляет их интеграцию в полноценно функционирующие системы большего масштаба, коими и являются иммобилизованные гранулированные антигенные препараты (ИГАП). Поэтому такие биологические структуры можно считать полноценными нанообъектами, а используя методы иммобилизации, осуществлять их практическое применение в биотехнологии, иммунологии, ревматологии.

Список литературы

1. Возможности исследования иммобилизованных наносистем в ревматологии/ Зборовский А.Б., Гонтарь И.П., Александров А.В., Алехина И.Ю., Трофименко А.С. //Доктор Ру, 2009, №3, с. 53-57
2. Гонтарь И.П., Зборовский А.Б., Левкин С.В. Способ получения иммобилизованного кардиолипинового антигена для определения специфических антител. // Патент на изобретение РФ №1649807, 1993г.
3. Гонтарь И.П., Зборовский А.Б., Левкин С.В., Сычева Г. Ф. Способ получения магнитных полиакриламидных гранул. // Патент на изобретение РФ №1582657, 1993г.
4. Зборовский А.Б., Гонтарь И.П. Иммобилизованные антигенные препараты с магнитными свойствами в диагностике и лечении ревматических заболеваний. // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. №5, 1999, с. 45-49
5. Зборовский А.Б., Гонтарь И.П., Александров А.В. Иммобилизованные нанообъектные системы на основе кардиолипина в диагностике и лечении воспалительных ревматических заболеваний. // Материалы III Национального конгресса терапевтов «Новый курс консолидация усилий по охране здоровья нации» Москва 5-7 ноября 2008 – М, Издательство «Бионика», 2008г, с. 94-95
6. Иммунопатогенетические аспекты современной лабораторной диагностики системной красной волчанки, системной склеродермии и ювенильного ревматоидного артрита /Александров А.В., Шилова Л.Н., Емельянов Н.Н., Алехина И.Ю., Парамонова О.В., Новикова О.В., Макарова Т.С., Емельянов Н.И., Курбанова Р.Д., Емельянова О.И. //Международный журнал по иммунореабилитации. Том 12, №2, 2010, стр. 150.
7. Перспективы применения антигенных наносистем в диагностике и лечении воспалительных ревматических заболеваний /Александров А.В., Гонтарь И.П., Алехина И.Ю., Зборовский А.Б. //Терапевтический архив, № 12- 2009, с. 48-51
8. Ченас Н.К., Ракаускене Г.А., Кулис Ю.Ю. //Биохимия. 1989 - Т3, Вып. 7 – С 1090-1097.
9. Эмульсионная полимеризация как метод, модифицирующий ферменты с сохранением биологических свойств их наноструктур /Гонтарь И.П., Сычева Г.Ф., Александров А.В., Шилова Л.Н., Симакова Е.С., Емельянов Н.Н., Матасова Н.А., Маслакова Л.А., Зборовский А.Б. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010, №12, - с. 715-719.
10. Love P. E., Santoro S. A. Antiphospholipid Antibodies: Anticardiolipin and the Lupus Erythematosus (SLE) and in Non - SLE Disorders. //Ann of Internal Medicine, 1990.- №112,- № 9 p. 682- 698.

Рецензенты:

Грехов Р.А., д.м.н., зав. лабораторией клинической психологии ФГБУ «НИИ КиЭР» РАМН,
г. Волгоград;

Мартемьянов В.Ф., д.м.н., профессор, зав. клинико-биохимической лабораторией ФГБУ
«НИИ КиЭР» РАМН, г. Волгоград.