

МОЛЕКУЛЯРНІ ВЗАЄМОДІЇ В СИСТЕМІ ІМУНОГЛОБУЛІН-ВОДА-КРЕМНЕЗЕМ ЗА ДАНИМИ ІЗОТЕРМ АДСОРБЦІЇ ТА ЯМР СПЕКТРОСКОПІЇ

А.А. Ключко, В.М. Барвінченко, В.В. Туров

*Інститут хімії поверхні НАН України
вул. Ген. Наумова 17, 03164 Київ-164*

Методами ^1H ЯМР спектроскопії в умовах виморожування рідкої фази та адсорбції з водних розчинів вивчено міжмолекулярні взаємодії в системі імуноглобулін-вода-кремнезем. Ізотерми адсорбції мають ленгмюрівський тип, а максимальна величина сорбції в ізоелектричній точці ($\text{pH}=6,6$) становить 120 мг/г. Побудовано карту молекулярних взаємодій в цій системі; встановлено відсутність коагуляції.

Intermolecular interactions in the system immunoglobulin–water–silica have been studied by means of ^1H NMR spectroscopy under conditions of liquid phase freezing and adsorption from water solution. Adsorption isotherms are of the Langmuir type and maximum value of adsorption at isoelectric point ($\text{pH}=6,6$) is 120 mg/g. A map has been built of intermolecular interactions in this system; no coagulation has been found.

Вступ

Важливим завданням імунології на сьогодні є розробка нових засобів активування імунної системи за допомогою штучних антигенів або вакцин, а також створення нових методів контролю за концентрацією та активністю антигенів (антитіл) у біологічних рідинах [1]. Антитіла являють собою білкові молекули - імуноглобуліни з молекулярною масою близько 160000. Вони, як і інші білки крові, незворотно сорбуються на частинках високодисперсного кремнезему (ВДК) [2]. Структурні особливості і властивості імуноглобулінів детально описано в багатьох статтях і монографіях [3-6].

Одним з перспективних способів виділення антигенів з біологічних рідин може стати використання імуносорбентів. Вони можуть бути створені шляхом адсорбційного модифікування ВДК, на поверхню якого наносяться незворотно сорбовані молекули імуноглобуліну, комплементарні обраному типу антигенів.

Оскільки взаємодії антиген-антитіло зазвичай відбуваються у складних біологічних розчинах, необхідно ретельно вивчити самоасоціацію білкових молекул, їхню взаємодію з водним середовищем і з твердими частинками ВДК. Поєднання методів адсорбції з водних розчинів та ^1H ЯМР спектроскопії в умовах виморожування рідкої фази дає змогу не лише виміряти величину адсорбції білкових молекул на поверхні ВДК, але і визначити, як під час взаємодії трансформується гідратна оболонка та змінюється міжфазна енергія всіх наночастинок, що беруть участь у взаємодії.

Експериментальна частина

Матеріали. Використовували аеросил марки А-300 (Калуш, Україна) з питомою поверхнею 300 м²/г, 10% розчин імуноглобуліну людини (Біофарма, Київ). Вміст імуноглобуліну (Іг) складає 97% від загальної кількості білка з молекулярними параметрами: полімери – 3%, димери і мономери - 92%, фрагменти – 5%.

Розчини імуноглобуліну одержували розведенням стандартного 10 % розчину водою або буферними розчинами до необхідної концентрації, яку визначали спектрофотометрично при довжинах хвиль 278 нм і 550 нм за біуретовою реакцією [7]. Кислотність розчинів вимірювали на рН-метрї ЭВ-74 зі скляним електродом. Необхідне значення рН встановлювали за допомогою розчинів НСІ, КОН, або фосфатних буферів.

Адсорбційні виміри. Адсорбцію/десорбцію імуноглобуліну вивчали в статичних умовах при $20 \pm 1^\circ\text{C}$ для розведених розчинів (0,015-0,15%) на спектрофотометрі Specord M-40 (Німеччина). Відношення маси сорбента до маси розчину імуноглобуліну було постійним і складало 1:200. Для досягнення рівноваги систему витримували при кімнатній температурі протягом 1,5 год., а потім центрифугували 15 хв. при швидкості 8000 об/хв.

^1H ЯМР спектроскопія. Спектри ЯМР реєстрували на спектрометрі Bruker WP-100 SY з робочою частотою 100 МГц і смугою пропускання 50 кГц. Температура в датчику регулювалася термоприставкою Bruker VT-1000 з точністю ± 1 град. Інтенсивності сигналів визначалися електронним інтегратором з точністю $\pm 10\%$. Для запобігання переохолодження суспензій вимір концентрації незамерзаючої води виконувався при нагріванні суспензій, попередньо охолоджених до температури 210 К.

Умовою замерзання води на міжфазній границі адсорбент(біополімер)/вода є рівність вільних енергій молекул адсорбованої води і льоду. При цьому зниження температури замерзання адсорбованої води ($273 - T$) визначається зменшенням вільної енергії води, яке обумовлене адсорбційними взаємодіями ($\Delta G = G_o - G$, де G_o – вільна енергія льоду при 273 К) [8]. Вільна енергія льоду при зниженні температури змінюється за лінійним законом: $\Delta G = 0,036(273 - T)$. Площа під кривою $\Delta G(C_{\text{H}_2\text{O}})$ визначає величину міжфазної енергії колоїдних частинок (γ_s):

$$\gamma_s = K \int_0^{C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{max}}} \Delta G dC_{\text{H}_2\text{O}}$$

де $C_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{max}}$ – товщина шару незамерзаючої води при $T \rightarrow 273$ К.

Результати та їхнє обговорення

На рис. 1 представлена залежність величини адсорбції імуноглобуліну від рН розчину, що має колоколоподібну форму з максимумом в області ізоелектричної точки імуноглобуліну (рН 6,6 [9]). Аналогічна залежність спостерігається і для інших білків крові [10] і є характерною для систем, у яких взаємодія білка з поверхнею кремнезему відбувається головним чином за рахунок електростатичних сил.

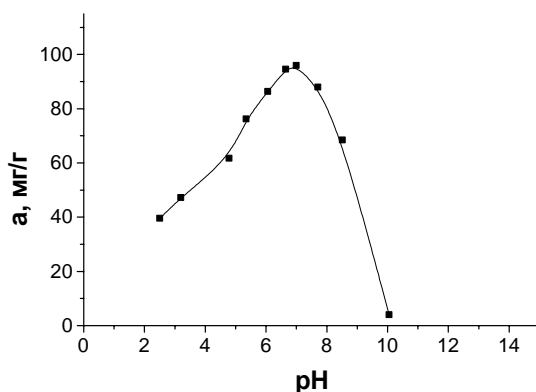


Рис. 1. Залежність адсорбції імуноглобуліну кремнеземом від рН розчину.

На рис. 2, а наведені ізотерми адсорбції імуноглобуліну з водних розчинів на поверхні ВДК при різних значеннях рН, а на рис. 2, б - залежність концентрації десорбованого імуноглобуліну в розчині від його вихідної концентрації на поверхні при рН 2. Ізотерми мають Ленгмюрівську форму і дозволяють визначити граничну адсорбцію імуноглобуліну, яка при рН 6,2 дорівнює 120 мг/г, а при рН 7,4 - 105 мг/г. Для білкових молекул ізотерми адсорбції і десорбції не співпадають, що пояснюється багатоцентровим зв'язуванням білкових глобул з поверхнею, а десорбція можлива лише при розриві всіх зв'язків одночасно. Як видно з рис. 2, б, навіть при значній зміні рН, десорбція імуноглобуліну з поверхні кремнезему незначна.

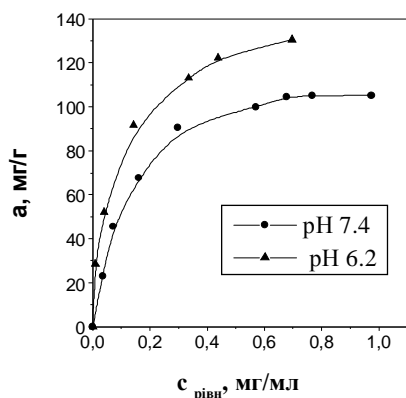


Рис. 2, а. Ізотерми адсорбції імуноглобуліну при різних значеннях рН.

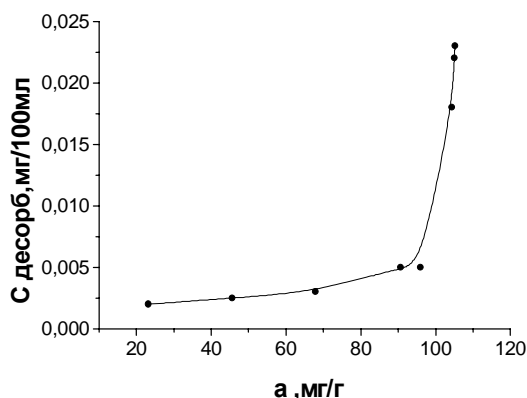
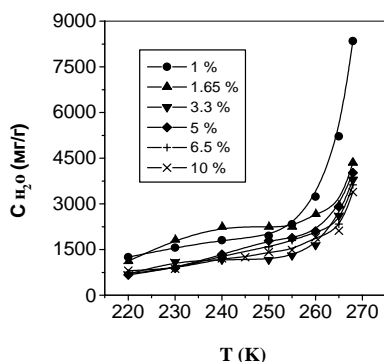
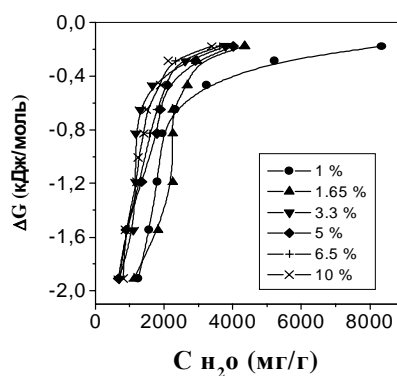


Рис. 2, б. Залежність концентрації десорбованого імуноглобуліну в розчині від його вихідної концентрації на поверхні при рН 2.

На рис. 3 наведені температурні залежності концентрації незамерзаючої води для розчинів з різним вмістом імуноглобуліну і розраховані на їхній основі величини вільної енергії Гіббса. Зміна концентрації незамерзаючої води відбувається переважно за рахунок слабозв'язаної води, яка замерзає близько 273 К. Навпаки, сильнозв'язана вода може не замерзати навіть при сильному охолодженні суспензії [8]. Кількісні значення товщини шарів кожного типу води ($C_{H_2O}^s$ і $C_{H_2O}^w$ для сильно- і слабозв'язаної води відповідно) і максимальні величини зниження вільної енергії води, обумовлене адсорбцією (ΔG^s і ΔG^w) можуть бути одержані екстраполяцією відповідних ділянок залежностей до осей абсцис і ординат.



а



б

Рис. 3. Температурні залежності концентрації незамерзаючої води (а) та розраховані на їхній основі залежності зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води для розчинів імуноглобуліну (б).

Зростання міжфазної енергії із зменшенням концентрації імуноглобуліну свідчить про сильну асоційованість білкових молекул. У розведених розчинах, коли імовірність утворення комплексів білок-білок низька, гідратна оболонка білкових молекул не деформована і має максимальну товщину. Відповідно, для такого розчину реєструється найбільша величина міжфазної енергії. Для утворення білкових асоціатів із зони міжчастинкового контакту повинна витіснитися частина зв'язаної води. При цьому зміна міжфазної енергії системи білок-вода повинна компенсуватися зміною вільної енергії в результаті взаємодії білок-білок. Тоді вільну енергію взаємодії білкових молекул можна оцінити як зміну міжфазної енергії, що відбувається при концентруванні розчину. З ростом концентрації імуноглобуліну число білкових агрегатів зростає, а кількість молекул, що входять до їхнього складу, залишається постійною.

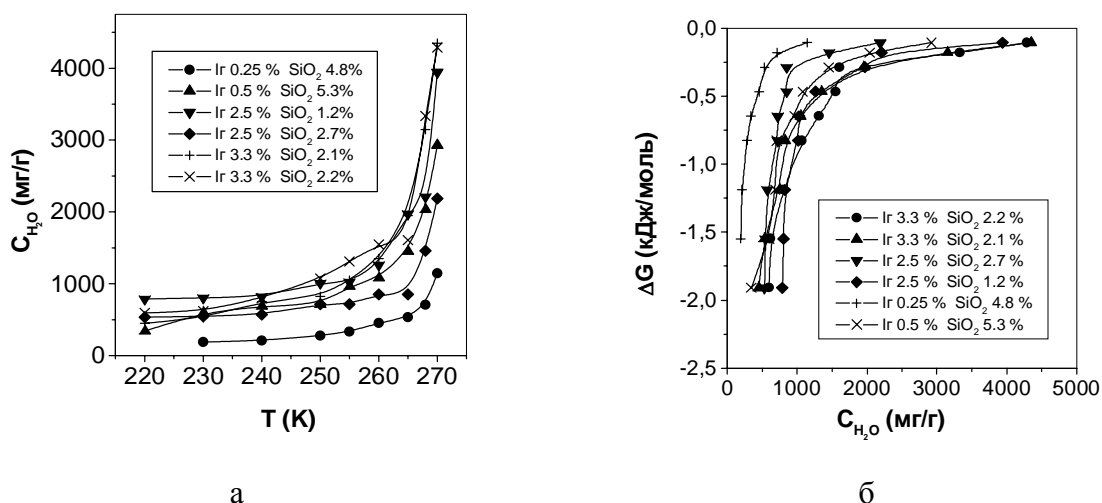


Рис. 4. Температурні залежності концентрації незамерзаючої води (а) і розраховані на їхній основі величини вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води для водних суспензій імуноглобуліну (Іг) з добавками кремнезему (б).

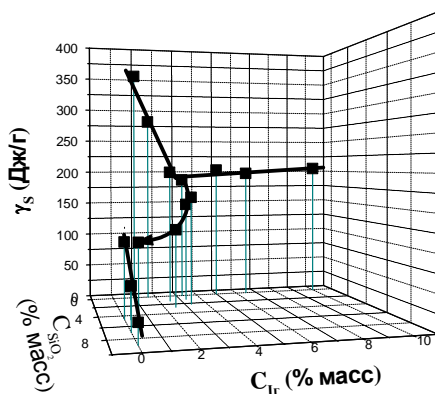


Рис. 5. Карта молекулярних взаємодій для системи імуноглобулін–вода–кремнезем.

Введення в розчин імуноглобуліну частинок ВДК призводить до значного зниження міжфазної енергії системи, що особливо помітно при малих концентраціях імуноглобуліну (рис. 4). На рис. 5 представлена залежність міжфазної енергії від концентрації компонентів у системі Іг– H_2O – SiO_2 . Вона являє собою тривимірну карту молекулярних взаємодій, на якій величина міжфазної енергії відкладена по вісі Z, а концентрація імуноглобуліну і SiO_2 по осях X та Y. На цій карті можна виділити три ділянки. Якщо $C_{SiO_2}=0$, то залежність

$\gamma_S(C_{Ig})$ являє собою зміну міжфазної енергії в результаті самоасоціації білкових молекул. У випадку $C_{Ig}=0$ залежність $\gamma_S(C_{SiO_2})$ описує зміну міжфазної енергії в результаті взаємодій між частинками. При $C_{SiO_2} \rightarrow 0$, $\gamma_S \rightarrow 150$ Дж/г. Якщо концентрація обох складових дисперсної фази має ненульове значення, то залежність $\gamma_S(C_{Ig}, C_{SiO_2})$ визначається процесами адсорбції або коагуляції. З огляду на ленгмюрівський вид ізотерм адсорбції імуноглобуліну на поверхні ВДК (рис. 2, а) можна припустити, що на поверхні частинок SiO_2 адсорбується не більше ніж 1 моношар білка і коагуляції білкових молекул під впливом поверхні кремнезему не відбувається.

Висновки

Молекули імуноглобуліну незворотно сорбуються на поверхні частинок ВДК. У залежності від рН середовища гранична адсорбція в моношарі складає 100–120 мг/г. У потрійних колоїдних системах, що містять воду, ВДК і білкові молекули в умовах, коли $C_{Ig} \ll C_{ВДК}$, практично весь імуноглобулін переходить з розчину в адсорбований стан. Цей процес супроводжується різким зменшенням величини γ_S . Якщо $C_{Ig} > C_{ВДК}$, то зміни γ_S відносно невеликі, що свідчить про слабку взаємодію частинок ВДК з адсорбованим білком з молекулами імуноглобуліну, що перебувають в розчині. Виходячи з ленгмюрівського типу ізотерм адсорбції, можна стверджувати, що коагуляції білкових молекул не відбувається.

Отже, використання методів адсорбції з водних розчинів та ЯМР спектроскопії в умовах виморожування рідкої фази дає можливість вивчити на простих моделях взаємодії в складних біологічних системах.

Література

1. Фримель Х, Брок Й. Основы иммунологии. - М.: Мир, 1986. – 254 с.
2. Larsericsdotter H., Oscarsson S., Buijs J. Thermodynamic analysis of proteins adsorbed on silica particles: Electrostatic effects // J. Colloid Interface Sci. - 2001. – V. 237. - N 98. – P.103–109.
3. Ленниджер А. Биохимия. М: Мир. – 1976. – 957 с.
4. Pink J.R.L., Skvaril F. Ability of the isoelectric focusing technique to distinguish between structurally different immunoglobulins // FEBS Letters. - 1975. - V. 58. N 1. – P.207-210.
5. Bentley G.A., Boulot G., Mariuzza R.A. The structure of the antigen-binding site of immunoglobulins and T-cell receptors // Res. Immunol. - 1995. – V. 146. – P.277-290.
6. Aitken R., Hosseini A., MacDuff R. Structure and diversification of the bovine immunoglobulin repertoire // Veterinary Immunology and Immunopathology. - 1999. – V. 72. – P.21-29.
7. Государственная фармакопея СССР: В 2-х т. – XI изд. – М.: Медицина, 1990.
8. Urano H., Fukuzaki S. Kinetic study of desorption of two species of bovine serum albumin from alumina during alkali elution process // J. Colloid Interface Sci. - 2002. – V. 252. – P.284–289.
9. Химия белка. Часть 2 / Под ред. И.П. Ашмарина. - Изд-во Ленинградского ун-та, 1971. – 111 с.
10. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А.А. Чуйко. – К.: Наук. думка, 2003. – С.134-144.