

И. И. Романовская<sup>1</sup>, Т. И. Давиденко<sup>1</sup>, А. Эльсаббаг<sup>1</sup>, О. В. Заколюдяжная<sup>1</sup>,  
Б. М. Пухлик<sup>2</sup>, С. М. Пухлик<sup>3</sup>

## АДСОРБЦИЯ АЛЛЕРГЕНОВ ПЫЛЬЦЫ РЖИ И БЕЛКА КУРИНОГО ЯЙЦА АЭРОСИЛОМ

<sup>1</sup> Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины;

<sup>2</sup> Винницкий государственный медицинский университет;

<sup>3</sup> Одесский государственный медицинский университет

Нетоксичные высокодисперсные кремнеземы аэросилы, благодаря большой площади поверхности (200 – 400 м<sup>2</sup>/г) и особенностям ее строения, обладают высокими адсорбционными свойствами по отношению к белкам, ферментам, экзо- и эндотоксинам, микроорганизмам. Отсутствие пор обеспечивает быструю протекания процессов адсорбции, что позволяет их использовать в качестве перспективных медицинских сорбентов и носителей для иммобилизации широкого спектра биологически активных веществ [1].

Известны сорбционные методы иммобилизации аллергенов для проведения специфической иммунотерапии (СИТ) с использованием неорганических (фосфат кальция [2, 3], гидроксид и фосфат алюминия [4], и органических (L-тирозин) носителей [5]; для диагностики в качестве матрицы предложен активированный уголь [3].

Целью настоящей работы было изучение иммобилизации пыльцевых и пищевых аллергенов аэросилом.

Аэросил А-380 как матрица для иммобилизации аллергенов рассматривается впервые. Сорбент был предоставлен Институтом химии поверхности НАН Украины. Аэросил А-380 — непористый высокодисперсный кремнезем с удельной поверхностью 380 м<sup>2</sup>/г, размером частиц 7 нм, концентрацией поверхностных атомов кремния 5,09 ммоль/г. Основными адсорбционными центрами поверхности являются силанольные группы SiOH<sup>+</sup>.

В работе использовали предоставленные Винницким ОАО “Иммунолог” коммерческие препараты аллергенов пыльцы ржи (АПР) и белка куриного яйца (АБКЯ) в форме водно-солевых растворов, стандартизованные по белковому азоту (PNU/см<sup>3</sup>), стабилизированные 0,4 % фенолом.

АПР и АБКЯ являются представителями многочисленных групп пыльцевых и пищевых препаратов аллергенов, используемых как для диагностики, так и для проведения СИТ [6, 7] в комплексном лечении аллергических заболеваний; характеризуются широкой распространенностью и высокой аллергоопасностью.

Известно, что гликопротеиды являются основными аллергенными компонентами как пыльцы злаков (молек. масса 38 – 40000); так и белка куриного яйца — лизоцим, овомуцин, овальбумин, овомукоид.

Нами исследовалось влияние соотношения белок – носитель и времени на адсорбцию аллергенов аэросилом.

Из данных, представленных в табл. 1 (концентрации белка составляли 47,5 – 2000 мкг в общем объеме), следует, что степень связывания белка АПР и АБКЯ возрастала по мере увеличения концентрации белка. Оптимальным соотношением белок – носитель при иммобилизации АПР и АБКЯ является соотношение 1:105 – 1:69 и 1:20 и 1:10, соответственно; при этом с аэросилом связывается 50,0 % белка АПР, белка АБКЯ, соответственно, 83,7 %.

В обоих случаях не отмечено связывания фенола аэросилом, что согласуется с имеющимися в литературе сведениями, объясняющими отсутствие хемосорбции фенола на поверхности аэросила его меньшей основностью по сравнению с гидроксильной группой поверхности кремнезема [8].

Исследование адсорбции АПР и АБКЯ аэросилом показало, что связывание белка АПР и АБКЯ во времени увеличивается, достигая через 60 мин 4,78 и 82,9 мкг/г, соответственно (табл. 2); т.е. достижение равновесия в обоих случаях составило 60 мин, что согласуется с литературными данными о времени достижения равновесия при адсорбции бычьего сывороточ-

Таблица 1  
Влияние соотношения белок: носитель на связывание АПР и АБКЯ аэросилом

Аллерген	Массовое соотношение белок: носитель	Белок		
		до иммобилизации в общем объеме, мкг	после иммобилизации в НОЖ*, мкг	связывание, % от исходного
АПР	1:418	47,8 ± 4,2 <i>P</i> < 0,01	35,4 ± 2,5 <i>P</i> < 0,01	26,0
	1:209	95,5 ± 7,6 <i>P</i> < 0,01	65,9 ± 4,0 <i>P</i> < 0,01	30,9
	1:105	191,0 ± 17,5 <i>P</i> < 0,02	95,5 ± 6,3 <i>P</i> < 0,001	50,0
	1:69	286,5 ± 20,8 <i>P</i> < 0,001	144,1 ± 11,8 <i>P</i> < 0,002	49,7
АБКЯ	1:400	50,0 ± 4,3 <i>P</i> < 0,01	47,8 ± 3,9 <i>P</i> < 0,01	4,3
	1:200	100,0 ± 7,7 <i>P</i> < 0,001	54,8 ± 5,1 <i>P</i> < 0,002	45,2
	1:50	400,0 ± 20,8 <i>P</i> < 0,001	102,6 ± 8,9 <i>P</i> < 0,001	74,5
	1:20	1000,0 ± 95,1 <i>P</i> < 0,002	206,0 ± 14,4 <i>P</i> < 0,001	79,4
	1:10	2000,0 ± 130,0 <i>P</i> < 0,01	334,1 ± 25,9 <i>P</i> < 0,01	83,7

\* НОЖ — надосадочная жидкость

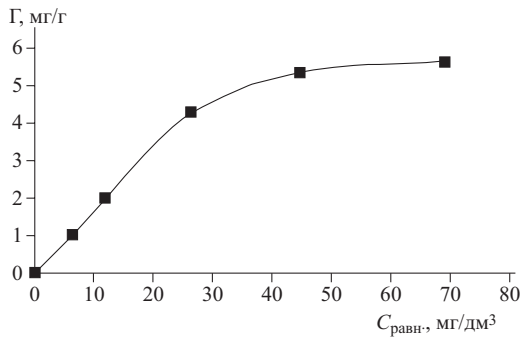


Рис. 1. Изотерма адсорбции АПР на аэросиле

ного и яичного белков на высокодисперсном кремнеземе [1, 9].

Были построены изотермы адсорбции АПР и АБКЯ аэросилом (рис. 1, 2), которые, согласно [10] были отнесены к L-типу.

При рассмотрении влияния рН среды на десорбцию белка аллергенов аэросилом отмечено, что при рН 7,2 белок остается в связанном состоянии. На рис. 3 представлены результаты исследования динамики выхода белка из иммобилизованных аэросилом препаратов АБКЯ и АПР при кислых и щелочных значениях рН среды. Как следует из полученных результатов, при рН 1,9 максимальный выход белка АБКЯ: 59,7 % от исходного — адсорбированного аэросилом препарата — достигается за 60 мин; выход белка АПР составил 5,9 % от исходного через 120 мин проведения эксперимента. При рН 8,2 максимальный выход белка из иммобилизованного препарата АПР (55,0 % от исходного) отмечен через 120 мин; белок АБКЯ десорбируется в этих условиях в очень малых количествах: через 120 мин его выход составил всего 2,2 %.

Таким образом, впервые осуществлена иммобилизация АПР и АБКЯ адсорбцией на аэросиле; изучено влияние соотношения белок – носитель и времени на адсорбцию, построены изотермы адсорбции аллергенов аэросилом, отмечена зависимость выхода белка сорбированных аэросилом АПР и АБКЯ от рН среды.

### Экспериментальная часть

Содержание белка в аллергенах определяли по методу Бадфорда [11]: к пробам аллергенов в объеме

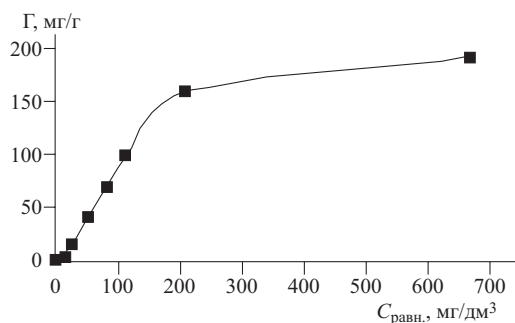


Рис. 2. Изотерма адсорбции АБКЯ на аэросиле

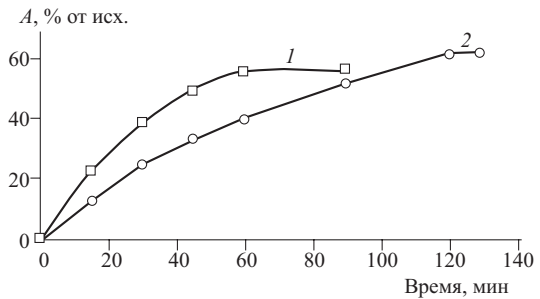


Рис. 3. Выход белка из иммобилизованных на аэросиле АБКЯ при рН 1,9 (1) и АПР при рН 8,2 (2)

1 см<sup>3</sup> прибавляли 4 см<sup>3</sup> основного реактива, взбалтывали и через 10 мин фотометрировали при  $\lambda = 595$  нм. Для построения калибровочной кривой в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Фенол определяли согласно [12], для чего к пробе (1 см<sup>3</sup>), содержащей 1,69 – 28 мкг фенола прибавляли 1 см<sup>3</sup> 0,2 М раствора NH<sub>4</sub>OH и 0,3 см<sup>3</sup> 0,2 % раствора 4-аминоантипирина, перемешивали и непосредственно перед фотометрированием прибавляли 1 см<sup>3</sup> 0,2 % раствора K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], перемешивали и фотометрировали при  $\lambda = 510$  нм.

Определение величины сорбции аллергенов аэросилом проводили в статическом режиме из растворов: 4 см<sup>3</sup> водно-солевого раствора аллергена (рН 7,2) с концентрацией белка аллергена 50 – 2000 мкг перемешивали с навеской аэросила при комнатной температуре на встряхивателе в течение 1 ч до установления равновесия. Доказательством установления равновесия служило постоянство значений концентраций белка в растворе. Отношение объема жидкой фазы к массе навески составляло 1:0,005. Несвязанный белок и фенол удаляли многократной промывкой полученного образца 0,01 М Na-фосфатным буфером (рН 7,2).

Таблица 2

### Адсорбция АПР\* и АБКЯ\*\* аэросилом

Время адсорбции, мин	Белок АПР		Белок АБКЯ	
	Содержание в НОЖ после иммобилизации, мкг, $M \pm m$	Связывание, мг/г носителя	Содержание в НОЖ после иммобилизации, мкг, $M \pm m$	Связывание, мг/г носителя
5	–	–	739,0 ± 40,6 $P < 0,001$	13,05
15	150,1 ± 8,4 $P < 0,002$	2,04	352,2 ± 21,1 $P < 0,002$	32,39
30	115,5 ± 5,1 $P < 0,001$	3,77	258,9 ± 18,3 $P < 0,001$	37,06
45	102,9 ± 2,9 $P < 0,001$	4,40	–	–
60	95,5 ± 3,5 $P < 0,001$	4,78	174,5 ± 10,2 $P < 0,001$	41,28
90	96,4 ± 2,8 $P < 0,001$	4,82	172,1 ± 7,3 $P < 0,001$	41,40

Массовое соотношение белок – аэросил составило: \* 1:105, \*\* 1:20

Связывание белка и фенола определяли по разности их содержания в исходном препарате и надосадочной жидкости после адсорбции на аэросиле.

Для построения изотерм адсорбции одинаковые навески аэросила А-380 (20 мг) помещали в растворы аллергенов (50 – 2000 мкг белка) в 0,01 М Na-фосфатный буфер, рН 7,2. Через 1 ч инкубации при постоянном перемешивании при 20 °С определяли остаточные концентрации сорбируемого белка и для каждой концентрации рассчитывали количество сорбата, поглощенного единицей массы (1 г) сорбента, т.е. удельную емкость сорбента. Количество белка, адсорбированного 1 г аэросила ( $\Gamma$ ), рассчитывали по формуле:

$$\Gamma = \frac{(C_0 - C_{\text{равн}})a}{1000v}$$

где:  $C_0$  — исходная концентрация белка, мг/дм<sup>3</sup>,  $C_{\text{равн}}$  — остаточная (равновесная) концентрация белка, мг/дм<sup>3</sup>,  $a$  — объем раствора белка, добавленный к навеске аэросила, см<sup>3</sup>,  $v$  — вес аэросила, г.

Полученные результаты представляли графически — по оси ординат откладывали удельную емкость сорбента (мг/г), а по оси абсцисс — соответствующие им значения остаточной концентрации ( $C_{\text{равн}}$ , мг/дм<sup>3</sup>).

Десорбцию белка из иммобилизованных на аэросиле препаратов АПР и АБКЯ (4,78 мг/г носителя и 41,4 мг/г носителя, соответственно) изучали при зна-

чениях рН 7,2 (0,01 М раствор Na-фосфатного буфера), 1,9 (0,02 М HCl) и рН 8,2 (0,01 М раствор боратного буфера) и температуре 37 °С. Отбор проб проводили в течение 120 мин.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Чуйко (ред.), *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния*, Наукова думка, Киев (2003).
2. Е. В. Передкова, Н. В. Медуницин, Ю. А. Порошина и др., *Иммунология*, № 6, 49 – 51 (1986).
3. В. А. Фрадкин, *Диагностические и лечебные аллергены*, Медицина, Москва (1990).
4. Б. Н. Райкис, А. Х. Казиев, *Настоящее и будущее лечебных аллергенов*, Триада-Х, Москва (2001).
5. A. D. Blainey, M. J. Philips, S. Olivier, et al., *Allergy*, **39**(7), 521 – 528 (1994).
6. Г. Н. Драник, *Клиническая иммунология и аллергология*, Астропринт, Одесса (1999).
7. Б. М. Пухлик, *Элементарная аллергология*, Велес, Винница (2002).
8. В. А. Тертых, Л. А. Белякова, *Химические реакции с участием поверхности кремнезема*, Наукова думка, Киев (1991).
9. M. A. Kohen, G. F. Fleer, A. Lyklema, et al., *Adv. Colloid and Interface Sci.*, **34**(2), 477 – 535(1991).
10. Г. Парфит, К. Рочестер (ред.), *Адсорбция из растворов на поверхностях твердых тел*, Мир, Москва (1986).
11. Х. Д. Якубке, *Аминокислоты, пептиды, белки*, Наука, Москва (1985).
12. И. М. Коренман, *Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений*, Наука, Москва (1983).

Поступила 07.10.2003