

УДК 615.218.3

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ АЛЛЕРГЕНОВ

Романовская И.И.

Исследована иммобилизация аллергенов пыльцы ржи и белка куриного яйца включением в поли-N-винилкапролактam и адсорбцией на аэросиле А-380. Получены препараты аллергенов с высокой степенью связывания белка, стабильные при хранении, пролонгированного действия в средах, моделирующих рН желудка и кишечника.

Ключевые слова: аллергены, иммобилизация, поли-N-винилкапролактam, аэросил.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с постоянным увеличением частоты аллергических заболеваний, внимание исследователей направлено на создание их стабильных форм пролонгированного действия и новых путей введения. Известны различные методы иммобилизации аллергенов для неинвазивного пути введения: включение в состав драже [1], полимерные пленки [2]; сорбция на гидроксиде алюминия и фосфате кальция [3], l-тирозине [4], кусочках сахара-рафинада [5], активированном угле, ковалентная сшивка при помощи глутарового альдегида и хлористого цианура с полимерными носителями (ПВС, ПЭГ, ПВП) [6]. Однако в ряде случаев, существенной стабилизации достичь не удалось, а используемые методы - сложны и неэкономичны.

Перспективными носителями для иммобилизации являются поли-N-винилкапролактam и аэросил А-380. ПВК- высокогидрофильный термоосаждаемый полимер, с широким диапазоном растворимости, ярко выраженной склонностью к комплексообразованию, отсутствием токсичности, что позволяет использовать его для иммобилизации БАВ в самых различных направлениях [7]. С рядом низкомолекулярных (фенол, резорцин, *o*- и *p*-крезолы, пирокатехин, хлорфенолы, 2-нитро-2-бром-пропандиол-1,3, триклозан) и высокомолекулярных (овальбумин, Na-КМЦ) стабилизаторов образует частично растворимые гранулы [8, 9]. Аэросил А-380 – непористый высокодисперсный кремнезем (удельная поверхность 380 м²/г, размер частиц 7 нм), основными адсорбционными центрами которого являются силанольные группы SiOH; обладает высокими адсорбционными свойствами по отношению к белкам, ферментам, экзо- и эндотоксинам, микроорганизмам; нетоксичен; отсутствие пор обеспечивает быстроту протекания адсорбции [10].

Аллергены белка куриного яйца (АБКЯ) и пыльцы ржи (АПР) - представители многочисленных групп пыльцевых и пищевых аллергенов, используемых как для диагностики, так и для проведения СИТ [3, 6] в комплексном лечении

аллергических заболеваний – характеризуются широкой распространенностью и высокой алергоопасностью. Для пыльцевых аллергенов – это поллиноз, часто сопровождающийся развитием бронхиальной астмы, для пищевых – анафилактические реакции [3].

Основные аллергенные компоненты пыльцы злаков (М.м. 38-40000) и белка куриного яйца: (лизоцим, овомуцин, овальбумин, овомукоид) представлены гликопротеидами.

Целью настоящего исследования явилось изучение иммобилизации пищевых и пыльцевых аллергенов методом включения в поли-N-винилкапролактамы и адсорбции на аэросиле

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коммерческие препараты АПР и АБКЯ (ОАО «Иммунолוג») в форме водно-солевых растворов, стандартизованные по белковому азоту (PNU/см³), стабилизированные 0,4 % фенолом. Содержание белка в аллергенах определяли по методу Брадфорда [11], фенола и резорцина - 4-аминоантипириновым методом [12]. Включение аллергенов в ПВК проводили согласно [13]. Адсорбцию аллергенов аэросилом проводили в статическом режиме из растворов: 4 см³ водно-солевого раствора аллергена (рН 7,2) с концентрацией белка 50-2000 мкг перемешивали с навеской аэросила при $t_{\text{комн.}}$ на встряхивателе до установления равновесия. Несвязанный белок и фенол удаляли многократной промывкой образцов. Связывание белка и фенола определяли по разности их содержания в исходном препарате и надосадочной жидкости после включения в ПВК. Измерение вязкости водных растворов полимеров ПВК со стабилизаторами и лизоцимом проводили с помощью вискозиметра Оствальда с диаметром капилляра 0,73 мм [14]. Для изучения влияния стабилизаторов на включение белка АПР использовали диализированный против воды в течение 3-суток препарат аллергена. Десорбцию белка и фенола из иммобилизованного в ПВК АПР проводили при рН=3,0 и рН=8,2 в соответствующих буферных растворах на протяжении 280 мин. Для построения изотерм адсорбции одинаковые навески аэросила А-380 (20 мг) помещали в растворы аллергенов. Через 1 ч инкубации при постоянном перемешивании при 20°C определяли остаточные концентрации сорбируемого белка и рассчитывали удельную емкость сорбента. Количество белка, адсорбированного 1 г аэросила (Г), рассчитывали по формуле:

$$Г = \frac{(C_0 - C_{\text{равн.}})a}{1000v}, \text{ где:}$$

C_0 - исходная концентрация белка, мг/дм³;

$C_{\text{равн.}}$ - остаточная (равновесная) концентрация белка, мг/дм³;

a - объем раствора белка, добавленный к навеске аэросила, см³;

v - масса аэросила, г.

Десорбцию белка из иммобилизованных на аэросиле препаратов АПР и АБКЯ (4,78 мг/ г носителя и 41,4 мг/г носителя, соответственно) изучали при рН 1,9, 7,2, и 8,2; t 37 °С. Отбор проб проводили на протяжении 120 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием ПВК в качестве матрицы показано, что при температуре 40°C степень включения белка и фенола была максимальной, составляя 92,6 и 74,3 %; получены иммобилизованные препараты в виде устойчивых при высыхании гранул правильной сферической формы, диаметром 2 мм. Установлено, что для всех изученных соотношений белок: ПВК степень связывания белка и фенола АПР составила 82-96,0 % и 55,0-83,4 %; АБКЯ – 42,5-50,7 % и 52,2 – 74,6 %, соответственно, в зависимости от концентрации белка и фенола (рис.1).

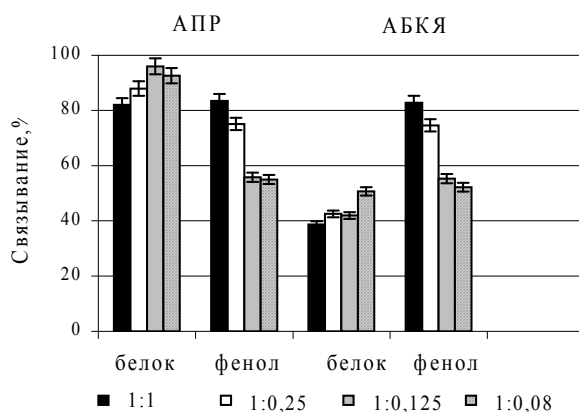


Рис. 1. Зависимость связывания белка и фенола АПР и АБКЯ от соотношения белок аллергена: ПВК

При увеличении соотношения белок : носитель по мере возрастания степени связывания белка апр и абкя матрицей отмечена тенденция к снижению связывания фенола. Так, если при соотношении белок апр: пвк 1:1 включалось 83,4 % фенола, то при 1: 0,08 – всего 55 % , что вероятно, можно объяснить конкуренцией белка и фенола за связывание с полимером. Аналогично, при иммобилизации абкя в пвк при увеличении соотношения белок: носитель связывание фенола уменьшалось. О взаимодействии матрица-аллерген свидетельствует уменьшение значений приведенной вязкости растворов пвк с лизоцимом (компонентом абкя), пвк с фенолом, пвк с лизоцимом и фенолом (рис. 2); взаимодействие носит достаточно сложный характер и происходит как путем комплексообразования фермента и стабилизатора с носителем, так и механического включения в структуру полимера.

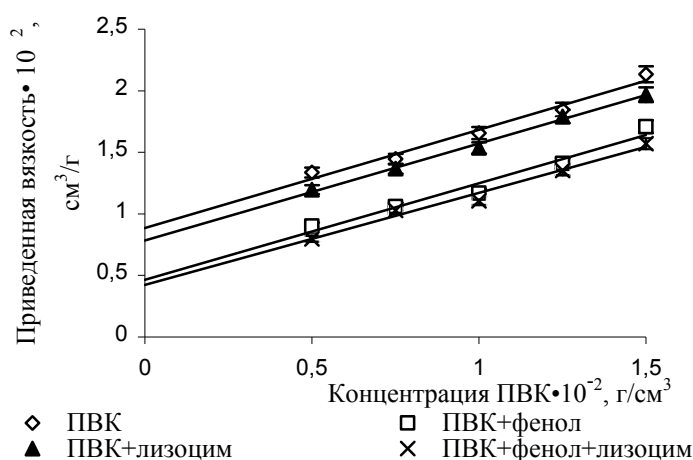


Рис.2. Влияние лизоцима и фенола на приведенную вязкость растворов ПВК

В экспериментах с обесфеноленным АПР использовали 0,38 % резорцин и 0,5 % аспирин как стабилизаторы гранулообразования при связывании белка аллергена с ПВК; вследствие низкой концентрации белка в диализированном АПР степень включения белка была невысокой (12,3 и 24,0 %, соответственно).

При исследовании динамики выхода белка и фенола из иммобилизованного АПР (рис.3 а, б) показано, что при рН 3,0 количественный выход белка и фенола достигается за 160 и 150 мин; при рН 8,2, соответственно, за 275 и 130 мин. Т.е. в кислой среде отмечен более быстрый выход белка и более медленный фенола, чем в щелочной. Следует также подчеркнуть, что фенол в используемых средах десорбируется быстрее белка, что, возможно, связано с образованием более прочных комплексов белок-ПВК; аналогичная закономерность отмечена и в отношении АБКЯ.

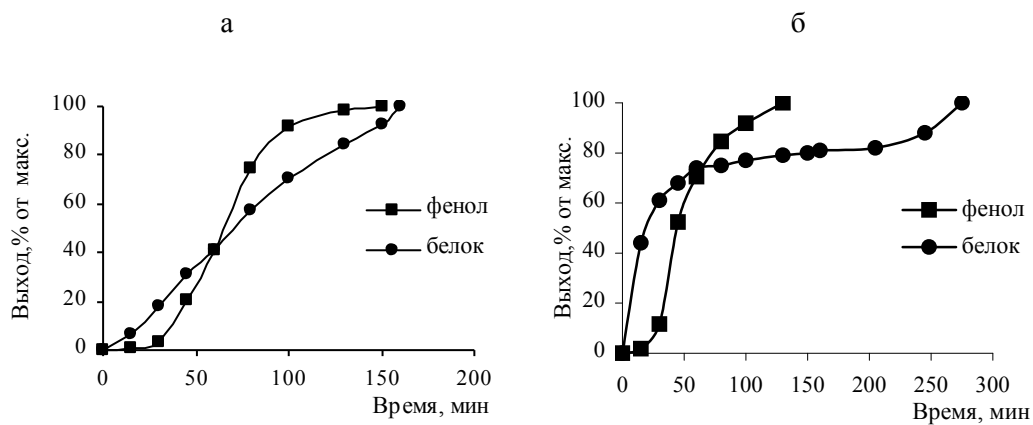


Рис. 3. Динамика выхода белка и фенола из включенного АПР в ПВК при рН 3 (а) и рН 8,2 (б)

Исследование адсорбции аллергенов аэросилом показало, что степень связывания белка АПР и АБКЯ возростала по мере увеличения концентрации белка. Оптимальный диапазон соотношений белок: носитель составил для АПР и АБКЯ – 1:100 – 1:70 и 1:20 – 1:10, соответственно; при этом с аэросилом связалось 50,0 % белка АПР, белка АБКЯ, соответственно, 83,7% (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние соотношения белок: носитель на связывание АПР и АБКЯ аэросилом

АПР		АБКЯ	
Массовые соотношения белок:носитель	Связывание белка,%	Массовые соотношения белок:носитель	Связывание белка,%
1 : 420	26,0	1 : 400	4,3
1 : 210	30,9	1 : 200	45,2
1 : 100	50,0	1 : 50	74,5
1 : 70	49,7	1 : 20	79,4
–	–	1 : 10	83,7

Связывание белка АПР и АБКЯ во времени увеличивается, достигая через 60 мин 4,78 и 41,28 мг/г, соответственно (табл. 2); т.е. равновесие в обоих случаях устанавливалось за 60 мин, что согласуется с данными о времени достижения равновесия при адсорбции бычьего сывороточного и яичного белков на высокодисперсном кремнеземе [1, 9].

Таблица 2.

Адсорбция АПР* и АБКЯ аэросилом**

Время, мин	Белок АПР	Белок АБКЯ
	Связывание, мг/г носителя	Связывание, мг/г носителя
5	–	13,05
15	2,04	32,39
30	3,77	37,06
45	4,40	–
60	4,78	41,28
90	4,82	41,40
90	4,82	41,40

Массовое соотношение белок : аэросил составило: * 1:100 , ** 1:20

В обоих случаях не отмечено связывания фенола носителем, 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]. Построенные изотермы адсорбции белка АПР и АБКЯ аэросилом (рис.3 а,б) отнесены к L-типу [10].

Изучение десорбции аллергенов показало, что при pH 7,2 белок остается в связанном состоянии; при pH 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. При pH 8,2 максимальный выход белка из иммобилизованного препарата АПР (55,0 % от исходного) отмечен через 120 мин; белок АБКЯ десорбируется в этих условиях в незначительных количествах: через 120 мин его выход составил всего 2,2 %.

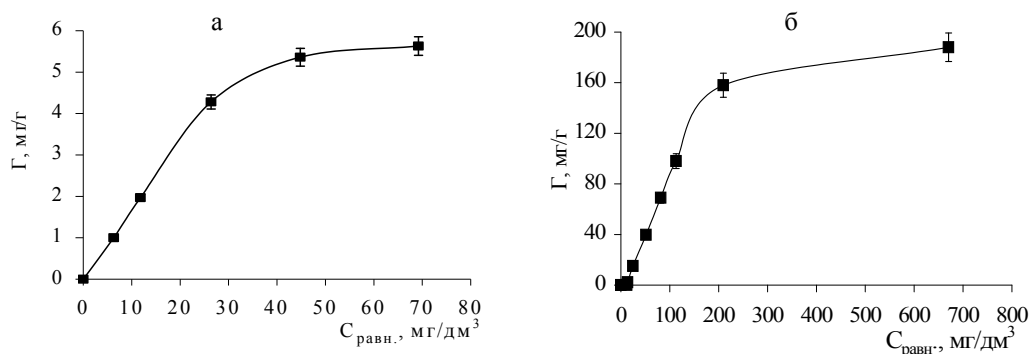


Рис.3 Изотермы адсорбции белка АПР (а) и АБКЯ (б) аэросилом

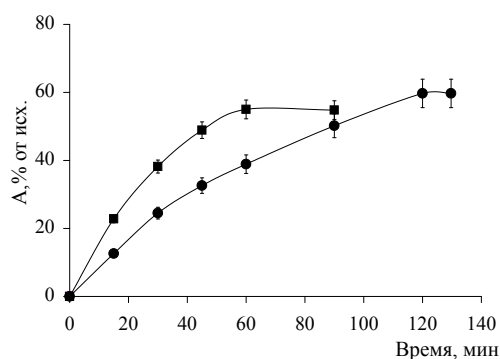


Рис. 4 Десорбция белка из иммобилизованных на аэросиле АБКЯ при pH 1,9 (■) – и АПР при pH 8,2 (●)

После 8-ми месяцев хранения (t 4°C) иммобилизованных в ПВК препаратах АПР и АБКЯ сохранилось 83,0 % – 72,9 % белка и 69,2 % – 72,8 % фенола, соответственно; в иммобилизованных на аэросиле препаратах аллергенов определен количественный уровень сохранения белка/

ВЫВОД

В результате использования ПВК и аэросила в качестве матриц, получены иммобилизованные препараты аллергенов с высокой степенью связывания белка, устойчивые при хранении; показано применение как стабилизаторов ПВК менее

токсичных, чем фенол, аспирина и резорцина, селективное связывание белка аэросилом, пролонгированность действия в средах, моделирующих рН желудка и кишечника.

Список литературы

1. Современные взгляды на проблему лечения аллергического ринита / Б. М. Пухлик, С. М. Пухлик, И. В. Корицкая [и др.] // Укр.пульмонол.журн. – 2004. - №2. - С. 18-21.
2. Романовська І. І. Імобілізація алергенів для створення потенційних діагностичних та лікарських засобів інтраназального способу введення / І. І. Романовська, С. М. Пухлік, Б. М. Пухлік // Одеський мед. журн. – 2006. - Т. 94. - № 2. - С. 25-29.
3. Райкис Б. Н. Настоящее и будущее лечебных аллергенов / Б. Н. Райкис, А. Х. Казиев. - М.: Триада-Х, 2001. - 246 с.
4. Hypersensitization with a tyrosine adsorbed extract of *Dermatophagoides pteronyssimus* in adults with perennial rhinitis / A. D. Blainey, M. J. Philips, S. Olivier [et al.] // *Allergy*. - 1984. - V. 39. - № 7. - P. 521-528.
5. Пероральный метод специфической иммунотерапии поллиноза / Е. В. Передкова, Н. В. Медуницин, Ю. А. Порошина [и др.] // *Иммунология*. - 1986. - № 6. - С.49-51.
6. Фрадкин В. А. Диагностические и лечебные аллергены / В. А. Фрадкин. - М.: Медицина, 1990. – 260 с.
7. Кирш Ю. Э. Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды / Ю. Э. Кирш. – М.: Наука, 1998. – 252 с.
8. Соединения включения фенолов в поли-N-винилкапролактамы / Ю. Е. Шапиро, Т. И. Давиденко, И. И. Кравченко [и др.] // *Доповіді НАН України*. - 1996. - № 6. - С. 125-129.
9. Стабилизация поли-N-винилкапролактама / Т. И. Давиденко, И. И. Пашкин, Ю.Е. Шапиро [и др.] // *Доп. НАН України*. – 2002. – №12. – С.108-113.
10. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / [под ред. А. А. Чуйко]. - К.: Наукова думка, 2003. - 415 с.
11. Якубке Х. Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х. Д. Якубке. – М.: Наука, 1985. – С. 335-356.
12. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений / И. М. Коренман. - М.: Химия, 1975. - 360 с.
13. Имобилизация пероксидазы в поли-N-винилкапролактамы / И. И. Романовская, О. В. Осейчук, О. В. Севастьянов [и др.] // *Вісник ОНУ*. – 2005. – Т. 10. - № 8. – С. 49-54.
14. Баргеньев Г. М. Физика полимеров / Г. М. Баргеньев, С. Я. Френкель. - Л.: Химия, 1990. - 332 с.

Романовська І.І. Перспективні матриці для іммобілізації алергенів // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2009. – Т.22 (61). – № 2. – С. 200-206.

Досліджена іммобілізація алергенів пилку жита і білка курячого яйця включенням у полі-N-вінілкапролактамы і адсорбцією на аеросилі А-380. Отримані препарати алергенів з високим ступенем зв'язування білка, стабільні при зберіганні, пролонгованої дії у середовищах, що моделюють рН шлунку і кишечнику.

Ключові слова: алергени, іммобілізація, полі-N-вінілкапролактамы, аеросил.

Romanovskaya I.I. The perspective matrices for allergens immobilization // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2009. – V.22 (61). – № 2. – P. 200-206.

The immobilization of rye pollen- and hen egg's white allergen was studied by entrapment in poly-N-vinyl caprolactam and by adsorption on aerosil A-380. The preparations of allergens with high level of protein binding, stable at storage, prolonged action in model stomach- and intestine- pH-modeling media, were obtained.

Keywords: allergens, immobilization, poly-N-vinyl caprolactam, aerosil.

Поступила в редакцію 25.05.2009 г