

УДК 544.723+546.11.027*3

ВЫЯВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОГИДРОКСИАПАТИТА С АЛЬБУМИНАМИ С ПОМОЩЬЮ РАДИОНУКЛИДНО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

А.В. Северин, Г.А. Бадун, М.Г. Чернышева

(кафедра радиохимии; e-mail: severin@radio.chem.msu.ru)

Методами радионуклидно-микроскопической диагностики выявлен многоступенчатый характер изотермы адсорбции сывороточного (человеческого и бычьего) альбумина на наночастицах гидроксиапатита в водном растворе. Такой вид изотерм отражает следующие физико-химические процессы: 1) образование комплексов макромолекул белка с наночастицами гидроксиапатита; 2) их последующую агрегацию как в жидкой, так и в твердой фазе. Данные рентгенофазового анализа и динамического светорассеяния подтверждают сделанные предположения. При синтезе гидроксиапатита в растворе альбумина образование подобных комплексов сопровождается морфологическими и структурными изменениями самого гидроксиапатита.

Ключевые слова: *альбумин, гидроксиапатит, радионуклидно-микроскопическая диагностика, сорбция.*

Создание на основе наногидроксиапатита (ГАП) оптимальной нанотехнологии лекарственных и транспортных форм, в том числе и нового поколения гибридных органо-минеральных материалов, призванных решать проблемы профилактики и лечения костных заболеваний, остеопороза и общего кальциевого дефицита (болезнями, связанными с недостатком этого элемента, ежегодно страдает около 1 млн человек [1]), требует информации о механизмах и закономерностях процессов, протекающих в человеческом организме с участием ГАП [2]. Поэтому исследование особенностей взаимодействия наночастиц гидроксиапатита с биомacroмолекулами, в частности белками, приобретает в настоящее время особую актуальность.

Влиянию альбумина (одного из важнейших для функционирования человеческого организма белков) на зарождение и рост ГАП или его предшественников (октакальций фосфата, трикальцийфосфата) посвящено много экспериментальных исследований, в том числе и ориентированных на выяснение механизма физиологической минерализации костной ткани [3, 4]. В работах [5, 6] альбумин рассматривается как белковая макромолекула, способствующая образованию ГАП на коллагене. Авторы полагают, что он может действовать как специфический ингибитор роста, когда находится в растворе, и

как нуклеационная матрица при адсорбции на твердом субстрате.

Цель настоящей работы – исследовать особенности взаимодействия макромолекул альбумина (в процессе сорбции белка из водных растворов) с индивидуальными нанокристаллами ГАП, их агрегатами и иерархическими текстурами, а также влияние альбумина на структуру и морфологию самого гидроксиапатита в процессе его синтеза. В качестве объектов исследования выбраны сывороточный альбумин человека (САЧ) как важнейших белков человеческого организма и бычий сывороточный альбумин (БСА) как аналог САЧ, используемый во многих препаратах медицинского назначения. В работе была поставлена задача выявить сходство и различие в поведении САЧ и БСА при взаимодействии с ГАП, а также возможность образования органо-минеральных комплексов ГАП–белок как основы для создания гибридных материалов для медицины. В качестве основного метода исследования был выбран метод радионуклидно-микроскопической диагностики [7], который позволяет получать обширную информацию о кинетических и структурно-морфологических параметрах взаимодействия объектов исследования, дополненного рентгенофазовым анализом (РФА) и методом динамического светорассеяния.

Методика эксперимента

В качестве сорбентов в работе выступали: водная суспензия нанокристаллов ГАП (5,5%), полученная по методике [8], и изготовленный из нее порошок с размерами частиц 45–63 мкм и удельной свободной поверхностью, равной 62 м²/г. Сорбенты характеризовали методами РФА, электронной микроскопии и методом порометрии БЭТ («Quantachrom Nova», США).

Методика исследования сорбционных процессов с применением меченных тритием препаратов описана в работах [7, 9]. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (295±2 К).

Введение радиоактивной метки в альбумин осуществляли с помощью метода термической активации трития в варианте, описанном в работе [10]. Меченый препарат подвергли очистке от лабильной метки и побочных продуктов с помощью диализа через мембраны MWCO 14 кДа в соляном фосфатном буфере (рН 7,2), а также методом эксклюзионной хроматографии на колонке 1,2×35 см Sephadex 75F. Концентрацию белка в растворе определяли по спектрам поглощения в диапазоне 240–290 нм (спектрофотометр «Shimadzu», Япония). Удельная радиоактивность полученных препаратов [³H]-БСА и [³H]-САЧ составила 0,26 ТБк/ммоль.

Для определения кинетики сорбции и количества сорбированного альбумина к раствору меченых макромолекул в соляном фосфатном буфере (рН 7,2) добавляли навеску ГАП, систему выдерживали при комнатной температуре (295±2 К) и постоянном перемешивании с помощью вортекса «Reaxtop» («Heidolph», Германия) в течение времени, необходимого для установления стационарного режима. После этого проводили разделение фаз с помощью центрифугирования (3000g) и отбирали пробы из прозрачной жидкой фазы для измерения радиоактивности, которое проводили на жидкостном сцинтилляционном спектрометре «RackBeta 1215» (Финляндия).

Так как при проведении сорбционных экспериментов раствор меченого белка разбавляли носителем, то для подтверждения идентичности сорбционных свойств исходных и меченных тритием молекул альбумина было проведено несколько экспериментов, в которых концентрацию белка в растворе определяли по спектрам поглощения. В результате были получены одинаковые результаты. Кроме того, было показано, что на результаты опытов не влияет изменение удельной радиоактивности используемых растворов и

соотношения «количество сорбента/объем раствора белка».

Синтез ГАП в растворе БСА различной концентрации (5 г/л (0,5%) и 40 г/л (4%)) осуществляли при комнатной температуре и медленном добавлении Н₃Р₄ в интенсивно перемешиваемую смесь суспензии Са(ОН)₂ с раствором альбумина (лопастная мешалка, 4000 об/мин) с рН-метрическим контролем (в начале синтеза рН 12, в конце – рН 7).

Исходные образцы ГАП и композиции с альбуминами, полученные при синтезе и в адсорбционных экспериментах, исследовали методами РФА (ДРОН-3).

Размер агрегатов макромолекул в жидкой фазе контролировали методом динамического светорассеяния на приборе «Malvern Nanosither» (США).

Морфологический анализ частиц твердой фазы проводили с помощью методов сканирующей («CamScan», Япония) и трансмиссионной («Jeol», Япония) электронной микроскопии.

Сорбционные эксперименты проводили в (2–3)-кратной повторности для проверки воспроизводимости результатов. Точность определения величины сорбции составляла 10–20 %.

Результаты и их обсуждение

Данные по кинетике сорбции САЧ были получены для порошка ГАП. Оказалось, что время достижения стационарного состояния возрастало с 60 до 270 мин с увеличением начальной концентрации белка в растворе от 6 до 50 г/л (рис. 1). Дальнейшее увеличение времени эксперимента до 3 сут не приводило к существенному изменению стационарной концентрации белка. Кинетика сорбции БСА на ГАП описывается

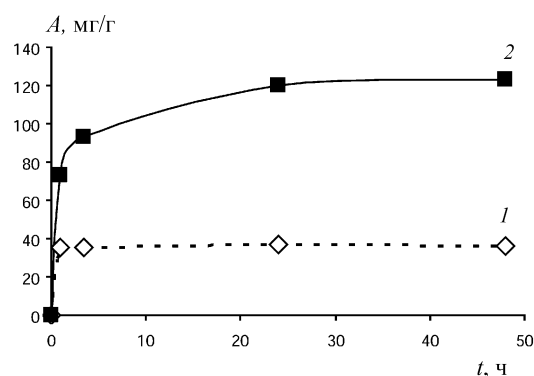


Рис. 1. Кинетика сорбции альбумина на ГАП при различной начальной концентрации белка (г/л): 1 – 6, 2 – 50

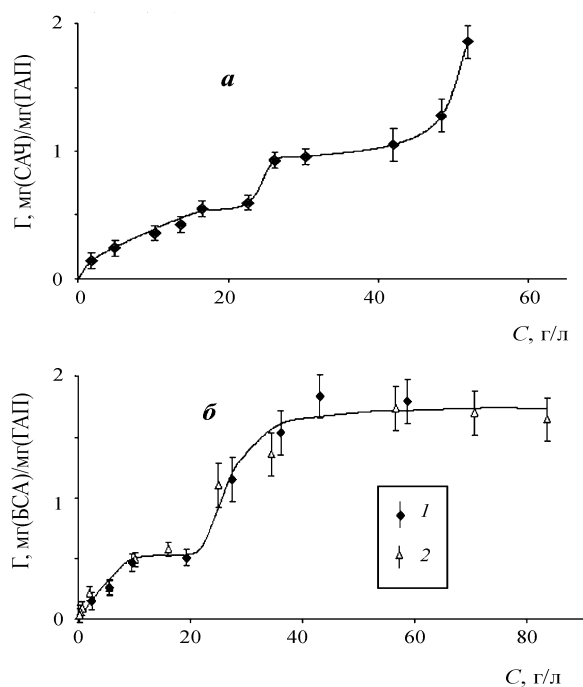


Рис. 2. Изотерма адсорбции альбуминов (а – САЧ, б – БСА): 1 – на порошке ГАП (БСА), 2 – на суспензии ГАП (БСА)

аналогичными кривыми. В дальнейшем сорбцию САЧ и БСА на ГАП проводили на протяжении 24 ч.

Изотермы адсорбции САЧ и БСА в диапазоне равновесных концентраций насыщающего раствора от 0,2 до 84 г/л представлены на рис. 2. Изотермы имеют сложный вид и содержат в рассмотренном диапазоне концентраций два плато. Первое плато достигалось в диапазоне концентраций 10–20 г/л. Величина адсорбции САЧ и БСА в области этого плато составляла $0,5 \pm 0,1$ г на 1 г ГАП или 8 ± 1 мг/м², что соответствует монослойному покрытию ГАП молекулами нативного белка. При более высокой концентрации белка адсорбция начинала снова расти, пока не достигала следующего плато. Необходимо отметить, что оно расположено в области значений равновесных концентраций, соответствующих физиологической концентрации альбумина в крови. При этом достигалась величина связывания 1 г САЧ и 1,6 г БСА на 1 г ГАП (предельная адсорбция 16 ± 3 и 26 ± 4 мг/м² соответственно). Это свидетельствует или о полислойном покрытии частичек ГАП белком, или об увеличении доступной поверхности сорбента (вследствие взаимодействия его с молекулами белка). Для САЧ было обнаружено дальнейшее увеличение связывания с ГАП при равновесной концентрации белка в растворе

выше 50 г/л. Однако воспроизводимость результатов значительно ухудшалась. Вероятно, в области этих концентраций происходят процессы, приводящие к существенной текстурной перестройке частичек ГАП и образованию минерально-белкового комплекса сложного строения. Интересно, что для БСА плато на изотерме адсорбции наблюдалось вплоть до равновесной концентрации (84 г/л). Полученные значения предельной адсорбции более чем на порядок превышают величину предельной адсорбции альбуминовых макромолекул на крупнокристаллическом ГАП, используемом в хроматографии [11].

Были проведены эксперименты по десорбции белка в соляном фосфатном буфере, которые показали, что в данных условиях сорбция САЧ (БСА) на ГАП происходит практически необратимо. Это означает, что альбумин образует прочносвязанный хемосорбированный слой на поверхности сорбента. Кроме того, было обнаружено явление адсорбционной инактивации, при котором альбумин после контакта с ГАП менял свои свойства и не участвовал в дальнейшей сорбции при добавлении новой порции сорбента.

Большие величины адсорбции САЧ и БСА на ГАП, а также изменение свойств их растворов после контакта с сорбентом свидетельствуют о специфическом взаимодействии макромолекул белка с нанокристаллами ГАП. Прежде всего можно предположить, что при адсорбции альбумина на ГАП происходит частичная или полная денатурация белка. Кроме того, возможно образование в растворе частиц, состоящих из комплексов альбумина с ГАП и/или с избыточными ионами Ca^{2+} , присутствующими в жидкой фазе за счет повышенной растворимости наногидроксипатита. Если такие частицы имеют небольшой размер, то они могут оставаться в растворе и после центрифугирования. Для подтверждения этого предположения был проведен анализ размера частиц, находящихся в растворах альбумина (БСА) до и после проведения сорбционного эксперимента, с помощью метода динамического светорассеяния. Оказалось, что в исходном растворе обнаружены преимущественно частицы размером около 6 нм (мономерные белковые макромолекулы) и их агрегаты размером порядка 100 нм. По окончании сорбционного процесса в растворе стали преобладать агрегаты размером порядка 300 нм (рис. 3), доля частиц размером 6 нм существенно уменьшилась, и появились частицы размером 3–4 мкм.

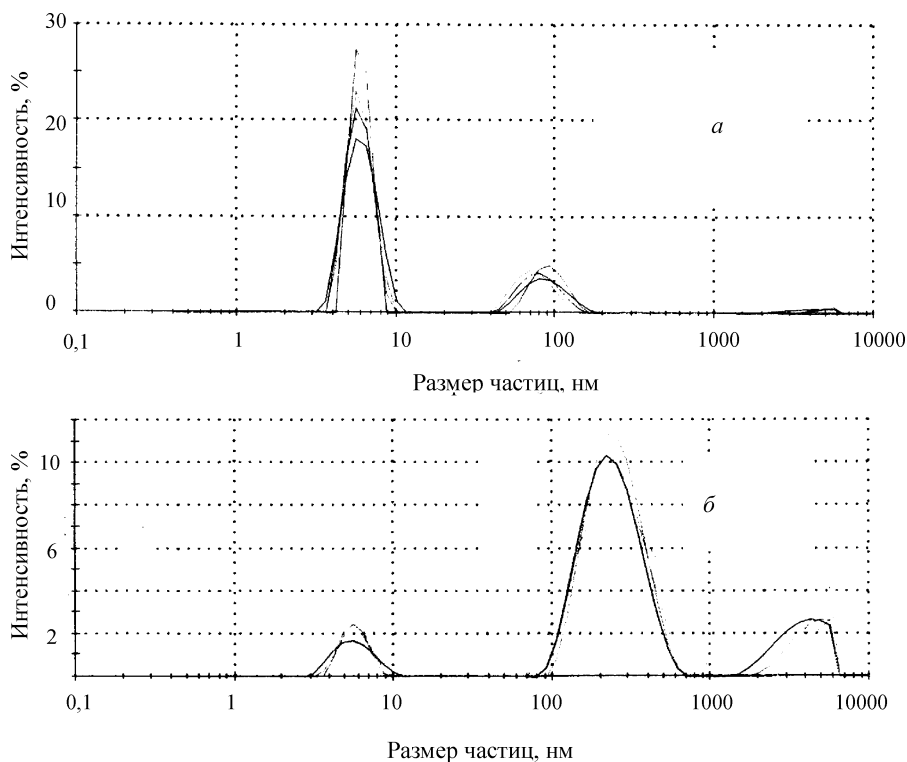


Рис. 3. Размеры белковых частиц в растворе альбумина (5 г/л) по данным динамического светорассеяния: *a* – в исходном растворе; *б* – в стационарном растворе после сорбции

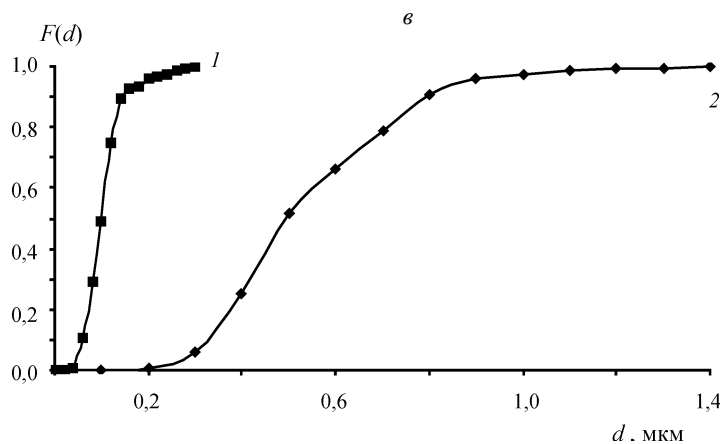
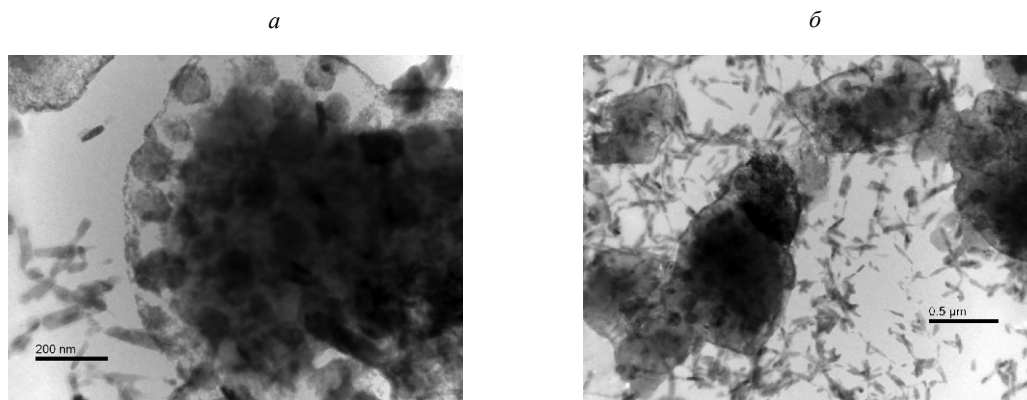


Рис. 4. Электронная микроскопия агрегатов альбуминовых комплексов различных иерархических уровней (*a*, *б*) и их интегральные функции распределения по размерам (*в*): *1* – первичные агрегаты комплексов ГАП-альбумин; *2* – вторичные флокулярные агрегаты

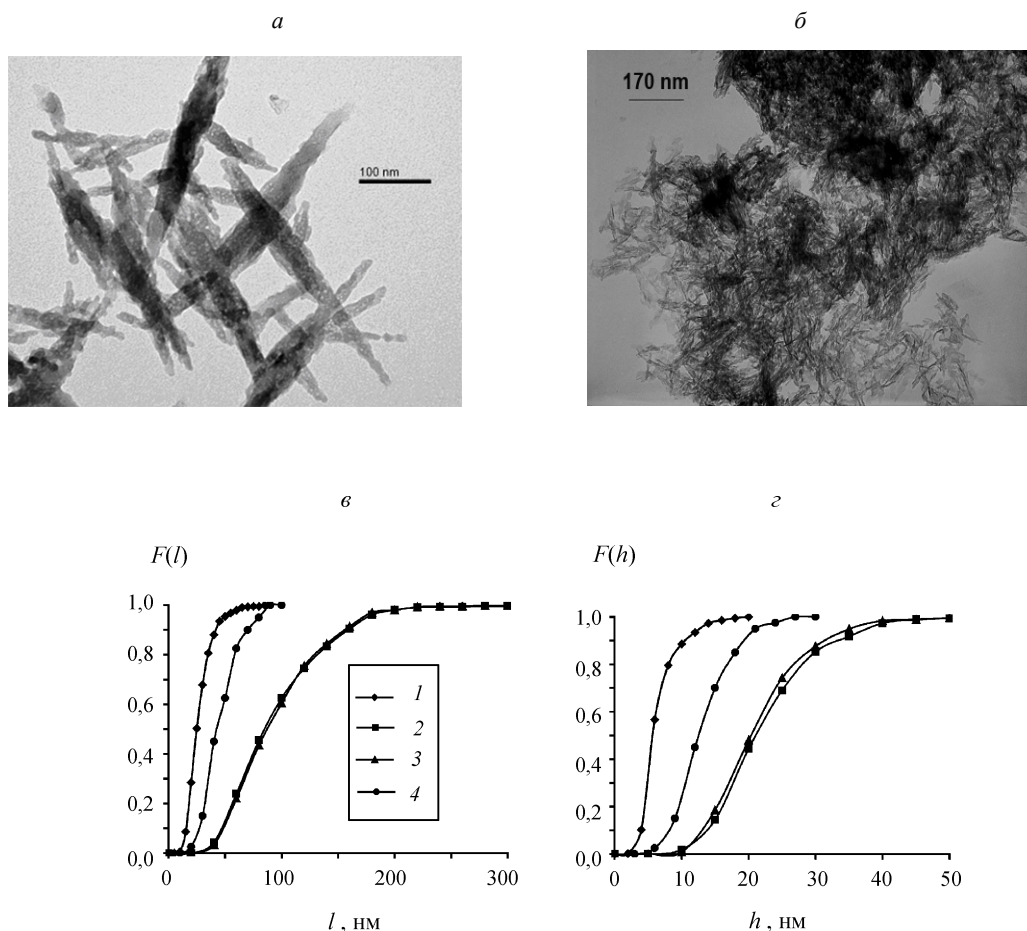


Рис. 5. Наночастицы чистого ГАП (*а*) и синтезированного в 4%-м растворе БСА (*б*) (данные просвечивающей электронной микроскопии) и их функции распределения по длине l (*в*) и ширине h (*г*): 1 – синтез ГАП в 4%-м растворе БСА; 2 – сорбция БСА на ГАП; 3 – чистый гидроксиапатит; 4 – частицы гидроксиапатита, обнаруженные в плазме крови человека

Подобные агрегаты обнаружены и при морфологическом анализе с помощью просвечивающей электронной микроскопии (рис. 4, *а*, *б*). Выявлено как минимум три уровня иерархической организации агрегатов белковых молекул. В ее основе лежат частицы, образованные комплексами ГАП с альбумином, средний размер которых для сухих образцов составляет ~130 нм, в растворе они соответствуют фракции 200–300 нм. Далее они собираются в продолговатые флоккулы с размером порядка 0,5–0,7 мкм, которые впоследствии способны складываться в более сложные структуры дендритного типа. Распределение таких частиц по размерам представлено на рис. 4, *в*.

В случае синтеза ГАП в растворе БСА по данным трансмиссионной электронной микроскопии обнаружено существенное изменение формы нанокристаллов, а также функции распределения их по размерам (рис. 5). Если в процессе сорбции нанокристаллы

практически не меняют свой размер, то их синтез в растворе белка резко уменьшает ширину и длину нанокристаллов, приближая их размер к размеру «нативного ГАП» (т.е. частиц ГАП, обнаруженных в кровотоке человека [12]).

РФА-анализ (рис. 6) показал несимметричное уширение пиков ГАП по мере увеличения концентрации БСА и их стабильное положение по сравнению с положением пиков чистого ГАП. Кроме того, существенно увеличился уровень фона. Это означает уменьшение размеров кристаллитов, что и наблюдается при анализе данных электронной микроскопии, и, возможно, анизотропное изменение структуры ГАП при образовании органо-минеральных комплексов, а также частичную аморфизацию нанокристаллов.

Таким образом, можно предположить, что взаимодействие между наногидроксиапатитом и альбумином не является физической адсорбцией, а представляет

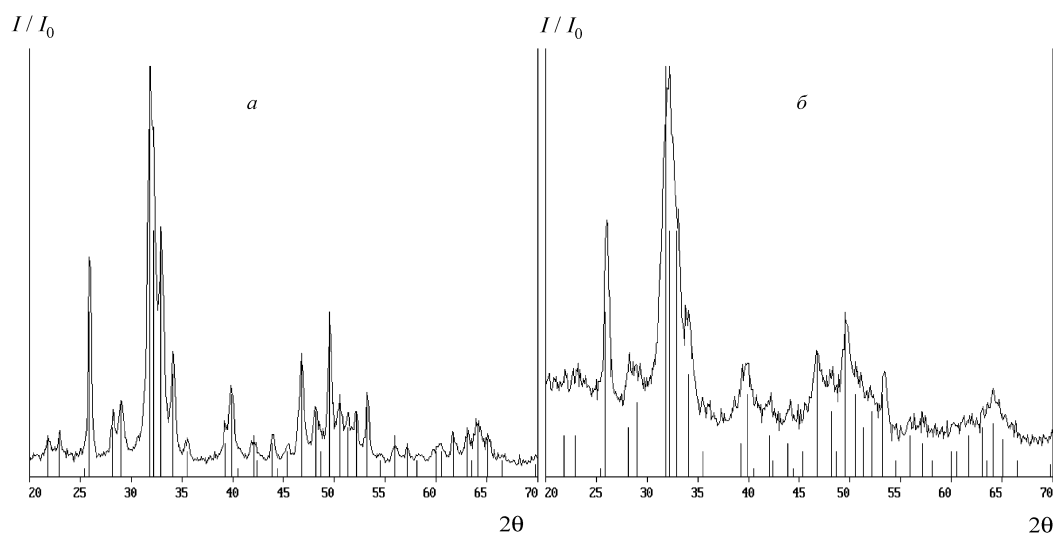


Рис. 6. РФА-спектры чистого ГАП (а) и ГАП, синтезированного в 0,5% БСА (б)

собой многоступенчатый физико-химический процесс, при котором сначала образуется монослой белка на поверхности ГАП (до концентрации, равной 10–20 г/л), а затем происходит химическая реакция (или хемосорбционное взаимодействие) между частицами ГАП и альбумином с изменением конформационного состояния белка и образования прочно связанного органо-минерального комплекса (при концентрации белка 40–90 г/л), которые могут агрегировать между собой, оставаясь в растворе, или уходить в твердую фазу. Можно предположить, что макромолекула белка (или несколько макромолекул) заключает нанокристалл ГАП внутри своей третичной структуры, образуя с ним прочную химическую связь через молекулы воды на поверхности нанокристалла и ионы Ca^{2+} и PO_4^{3-} . О возможности такой связи и образования комплексов наночастицы с белковой макромолекулой говорят данные ЯМР-исследования комплексов ГАП–коллаген [13]. При этом внешнюю оболочку такой структуры, скорее всего, будут образовывать гидрофобные части белковой молекулы, не способные взаимодействовать с гидрофильной поверхностью нанокристаллов, чем и объясняется явление сорбционной инактивации исследуемой системы. Многоступенчатость изотермы адсорбции в этом случае отражает последовательность стадий химической реакции, которая идет до полной стехиометрии между нанокристаллами ГАП и белковыми макромолекулами, поэтому такая трактовка представляется нам наиболее обоснованной.

Более подробное изучение и обсуждение природы химической связи между наночастицами ГАП и альбумином предполагается осуществить в последующих работах на основании анализа ЯМР-спектров экспериментальных образцов.

В случае синтеза ГАП в альбуминовом растворе молекулы белка являются, скорее всего, нуклеационными матрицами [6]. В условиях синтеза может происходить частичная или полная денатурация белка, подобная той, которая возможна при сорбции альбумина на наночастицах ГАП. Однако это не препятствует (а может, наоборот, способствует) формированию наночастиц ГАП, близких по морфологическим характеристикам к «нативному» ГАП и гидроксиапатиту костной ткани. Такая морфологическая модификация прослеживается и при синтезе ГАП в среде коллагена и некоторых других биологических макромолекул. Следовательно, существует возможность реализации единого механизма образования и эволюции ГАП в биологической среде, выявлению которого (в том числе анализу изменения структуры альбумина) посвящена наша дальнейшая работа.

Таким образом, образование органо-минеральных комплексов между альбумином и гидроксиапатитом в процессе сорбции белка или синтеза нанофазы может служить способом химической модификации ГАП. Эти препараты могут стать базовым материалом для создания нового поколения лекарственных наноформ, направленных на лечение костных заболеваний, остеопороза и ликвидации кальциевого дефицита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мелихов И.В. Нанотехнология обеспечения «кальциевого здоровья» нации http://www.nanometer.ru/2009/03/10/bad_110053.html (дата обращения 2009 г.).
2. Мелихов И.В., Божевольнов В.Е., Симонов Е.Ф. // ТОХТ. 2009. **43**. № 5. С. 509.
3. Koutsopoulos S., Dalas E. // J. Crystal Growth. 2000. **216**. P. 443.
4. Matsumoto T., Okazaki M., Inoue M. // Biomaterials. 2002. **23**. P. 2241.
5. Combes C.R., Frecke M. // J. Mater. Sci: Mater. Med. 1999. **10**. P. 153.
6. Morgues P.A., Serro, A.P., Saramago B.J. // Biomaterials. 2003. **24**. P. 451.
7. Северин А.В., Бадун Г.А., Тясто З.А. // Радиохимия. 2009. **51**. № 1. С. 47.
8. Комаров В.Ф., Божевольнов В.Е., Мелихов И.В., Северин А.В. // ДАН. 2000. **373**. № 3. С. 355.
9. Северин А.В., Бадун Г.А., Тясто З.А., Коробков В.И., Рудин В.Н. // Радиохимия. 2009. **51**. № 6. С. 551.
10. Chernysheva M.G., Badun G.A. // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2010. **286**. P. 835.
11. Fargues C., Bailly M., Grevillot G. // Adsorption. 1998. **4**. P. 5.
12. Ларионов П.М., Литасова Е.Е., Тимов А.Т. // Патология кровообращения и кардиохирургия. 1999. № 1. С. 28.
13. Galiullina L.F., Galyavich A.S., Khayrullin R.N., Salakhov M.Kh., Silkin N.I., Severin A.V. // XII International Youth Scientific School Actual Problems of Magnetic Resonance and its Application. Kazan, 2009. P. 154.

Поступила в редакцию 17.03.11

STUDYING THE NATURE OF INTERACTION BETWEEN NANOHYDROXYAPATITE AND ALBUMINS BY RADIONUCLIDE-MICROSCOPY DIAGNOSTICS.

A.V. Severin, G.A. Badun, M.G. Chernysheva

(Division of Radiochemistry)

Multistage character of adsorption isotherms of human and bovine serum albumins on hydroxyapatite nanoparticles from aqueous solution have been developed by radionuclide-microscopy method. Such isotherms character indicated the number of physicalchemical processes: formation of the peptide-nano hydroxyapatite complex and following by aggregation in liquid and solid phases. This hypothesis was conformed by X-ray and dynamic light-scattering analysis. It was shown, that when hydroxyapatite is formed in albumin solution the peptide-nano hydroxyapatite complex formation is followed by morphology and structure exchange of hydroxyapatite nanocrystals.

Key words: *adsorption, albumin, hydroxyapatite, radionuclide-microscopy diagnostic.*

Сведения об авторах: *Северин Александр Валерьевич* – доцент кафедры радиохимии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (severin@radio.chem.msu.ru); *Бадун Геннадий Александрович* – доцент кафедры радиохимии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (badunga@yandex.ru); *Чернышева Мария Григорьевна* – доцент кафедры радиохимии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (masha.chernysheva@gmail.com).