

Харківський медичний інститут

На правах рукопису

ТЕРТИШНА Олена Володимирівна

**БІЛОКСОРБЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ
ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ
ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ
ОБГРУНТУВАННЯ ЙОГО
ВИКОРИСТАННЯ В БІОХІМІЧНІЙ
ПРАКТИЦІ**

03.00.04—біохімія

02.00.04—фізхімія

Автореферат

дисертації на здобуття вченого ступеня кандидата
біологічних наук

Харків 1994



Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті хімії поверхні АН України та
Вінницькому медичному інституті ім. М.І.Пирогова

Науковий керівник: докт. мед. наук, проф. **М.Б.Луцюк**

Науковий консультант: канд. хім. наук **В.І.Богомаз**

Офіційні опоненти: докт. біол. наук, проф. **В.Й.Луговий**
докт. хім. наук **О.О.Пономарьов**

Ведуча установа: Кримський медичний інститут

Захист дисертації відбудеться " 10 " лютого 1994 р.
о 16⁰⁰ год. на засіданні спеціалізованої ради Д. 088.23.04 по захисту
дисертацій при Харківському медичному інституті
(310002, м.Харків, пр. Леніна, 4).

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Харківського медич-
ного інститута (м.Харків, пр.Леніна, 4).

Автореферат розісланий " 4 " січня 1994 року

Вчений секретар спеціалізованої ради
канд. мед. наук

Л.О.Жубрікова

Загальна характеристика роботи

Актуальність проблеми. В останні роки значно підвищився інтерес до високодисперсних кремнеземів /ВДК/. Матеріали, що створені на їх основі, знайшли широке застосування у різних галузях промисловості, сільському господарстві, медицині та фармації /В.І.Вогмаз та співав., 1989; М.М.Астраханова, 1991; О.О.Чуйко, Ю.І.Горлов, 1992; М.В.Луцок та співав., 1993/.

Медиків та біохіміків приваблює у ВДК комплекс таких властивостей як висока хімічна чистота, гідрофільність, відсутність токсичності та, особливо, здатність адсорбувати речовини білкової природи.

Властивість ВДК швидко та міцно приєднувати до своєї поверхні білки робить їх унікальними серед сорбентів.

Білоксорбентні або протеонектичні *nextam* - зв'язувати/ властивості ВДК дозволяють використовувати їх у вигляді певних лікарських форм як медикаменти місцевого та внутрішнього призначення /О.І.Бондарчук та співав., 1986; Т.Л.Полєся, 1992; М.В.Луцок, 1993 та інші/. Ми вважали доцільним більш глибоко вивчити протеонектичні властивості ВДК, визначити можливий вплив медичного сорбента кремнеземної природи "Полісорб Мі" на білковий обмін в експерименті, а також розробити підходи до створення методів визначення білків та антитіл за допомогою реагентів / колоїдний розчин, аеросилгелъ/ - похідних ВДК.

Мета роботи. Вивчити деякі механізми взаємодії ВДК з білками, та вплив ВДК на білковий обмін у експериментальних тварин, а також розробити принципи визначення білка та антитіл за допомогою препаратів, що створені на базі ВДК.

Задачі роботи.

1. Вивчити деякі закономірності адсорбції білків ВДК, його фракціями, колоїдним розчином ВДК, кремнекислотою та гранульованими формами кремнезему.

2. Встановити зв'язок технологічного процесу синтезу ВДК та умов зберігання ВДК з його протеонектичними властивостями.

3. Вивчити вплив створеного на базі ВДК ентеросорбента "Полісорб Мі" на показники білкового обміну в експерименті на лабораторних тваринах.

4. Використати виявлені закономірності адсорбції білків на ВДК для створення реагента, придатного для визначення білків та розробити відповідні методи індикації білків.

5. На основі похідного ВДК - аеросилогеля - створити імуносорбент, придатний для кількісного визначення антитіл.

Наукова новизна. Вивчені деякі механізми адсорбції білка ВДК та іншими похідними кремнезему, показана роль питомої поверхні, кількості силанольних груп та фізико-хімічних властивостей білків. Вперше доведено, що створений на основі ВДК ентеросорбент "Полісорб АП" в терапевтичних дозах не змінює основні показники білкового обміну у експериментальних тварин.

Показана принципова можливість використання ВДК для створення реагентів, придатних для якісного та кількісного визначення у водному середовищі білків, у тому числі антитіл.

Практичне значення

1. В результаті вивчення технології синтеза ВДК, властивостей його фракцій фіксувати білок та інших властивостей показано, що найбільш доцільною для створення ентеросорбента медичного призначення можна вважати так звану "середню фракцію". Нами сумісно з іншими розробниками направлені в Фармкомітет України матеріали доклінічного випробування препарату "Полісорб МП" як антидіарейного засоба та препарату для лікування вірусного гепатиту. Препарат дозволений для клінічного застосування /протокол № 1 засідання Фармакомітету МОЗ України від 28 січня 1993/, пройшов успішні клінічні випробування, затверджена відповідна ТФС.

Для довготривалого збереження протеонектичних властивостей препарату "Полісорб МП" необхідно його зберігання у герметичній упаковці.

На прикладі білкового обміну нами показана відсутність у препарату "Полісорб МП" токсичності у терапевтичних дозах.

2. Розроблено метод одержання стійкого колоїдного розчину ВДК, придатного для якісного та кількісного визначення білка.

3. Розроблено декілька варіантів метода якісного, напівкількісного та кількісного визначення білка у водних розчинах, у тому числі в сечі, за допомогою колоїдного розчину ВДК.

4. Показана можливість використання гранульованного ВДК - аеросилогея - як імуносорбента, на основі якого розроблено метод кількісного визначення антитіл.

5. По результатам роботи одержано:

- а/ авторське свідоцтво на винахід /№ 1313403, СРСР/
- б/ інформаційний лист /Київ, 1989.в.2 по проблемі "Вірусні інфекції"
- в/ акт впровадження від 14 лікарень України
- г/ II рацпропозиції

Положення, що виносяться на захист

1. ВДК та інші досліджені препарати кремнеземної природи /колоїдний розчин ВДК, кремнієва кислота, гранульовані форми/ мають високу спорідненість до білка. Сорбція білків на ВДК залежить від таких властивостей сорбента як питома поверхня, концентрація силанольних груп, терміну та умов збереження, а також від показника рН та фізико-хімічних властивостей сорбата.

2. Здатність ВДК зв'язувати велику кількість білка може бути використана для створення ефективних сорбентів медичного призначення, а також для розробки методів кількісного визначення білка та антитіл до білкових антигенів.

3. Створений на основі ВДК ентеросорбент "Полісорб М1" в терапевтичних дозах не порушує у експериментальних тварин показники білкового обміну.

4. Розроблені методи визначення білків та антитіл за допомогою реагентів, одержаних з ВДК - колоїдного розчину та аеросилогея.

Апробація роботи. Матеріали та положення дисертації викладені в доповідях на У Українському біохімічному з'їзді в м.Івано-Франківську / 1987 /, на підсумкових науково-практичних конференціях Вінницького медінституту / 1986, 1987, 1989, 1990, 1992 рр/, міжобластному семінарі для лікарів ЛТЕК та ЛКК м. Вінниця / 1986/, конференціях молодих вчених м.Вінниця / 1987/, X Мечніковській конференції в м. Одесі / 1987/, Міжнародному симпозиумі " Роль бронхіального та легеневого кровообігу в обміні рідини та білка у леге-

нях", м.Ленінград; IV Всесоюзній конференції " Біологічна активність сполук кремнія, германія, олова " м. Іркутськ /1990/; на конгресі по захворюванням органів дихання, м.С.-Петербург /1992/; на засіданнях Вінницького відділення українського біохімічного товариства /1987, 1990 /. По темі дисертації надруковано 21 роботу, одержано I авторське свідоцтво та II рацпропозицій.

Об'єм та структура роботи.

Дисертація викладена на 168 сторінках машинопису, складається з передмови, огляду літератури, п'яти глав власних досліджень, обговорення одержаних даних, висновків та вказівника літератури. Дисертація містить 41 таблицю та 7 малюнків. Список літератури включає посилання на 147 робіт вітчизняних та 155 робіт закордонних авторів.

З М І С Т Р О Б О Т И

Матеріали та методи дослідження

Вивчення сорбції білка на ВДК у процесі його виготовлення проводилось на 3 етапах : а/ після коагуляції; б/ в кінці десорбції; в/ в готовому продукті. Визначали питому поверхню методом газо-рідинної хроматографії та концентрацію силанольних груп на поверхні методом ІК - спектроскопії.

Досліджувалась білоксорбційна активність пірогенного ВДК з поверхнею 300 м²/г колоїдного розчину; сілікагелю марки "Сілікагель", ЧСФР /; силохрому КСК-2 з поверхнею 300 м²/г; колоїдної кремнекислоти, яку одержували кислотним гідролізом силіката натрія; ксерогелю, здобутого з цієї кислоти висушуванням при 200⁰С; аеросилогеля - гранульованого похідного ВДК з розміром пор 400 - 600 А⁰ та діаметром сфер біля 2 мм.

Використані слідуючі препарати білків: яєчний альбумін /Олаїе, Латвія, сироваточний альбумін людини / "keanal", Угорщина/, кінський гемоглобін / "Sigma", США /, трипсин / Спофа, ЧСФР/, гама-глобулін та інсулін / препарати фармакопеї СРСР /.

Сорбцію білків вивчали *in vitro*, будували та аналізували ізотерми адсорбції / Г.Парфіт, К.Рочестер, 1986 /. Цифровані дані оброблялись статистично на ЕОМ по спеціальній програмі. Концентрації білка в розчинах визначали біуретовим методом, а гемоглобіна - гемоглобінціанідним методом /В.В.Меньшиков, 1987/.

Сорбцію нуклеотидів вивчали таким чином: до розчинів УМФ, УДФ, УТФ, АМФ, АДФ, АТФ та ц-АМФ / виробництва фірми "lean-al", Угорщина / добавляли по 50 мг ВДК, змішували на протязі 1 години при кімнатній температурі та центригували 30 хвилин при 3000, у центрифугаті визначали кількість нуклеотидів по вмісту рибози орциновим методом. Адсорбцію нуклеїнових кислот вивчали таким же чином, кількісне дослідження проводили за допомогою дифеніламінового методу / С.Е.Северин, Г.А.Соловйова, 1989 /.

Після сорбції вуглеводи визначали: глюкозу - орциновим методом, фруктозо-6-фосфат - антроновим методом, D - галактозамін - по реакції з реактивом Ерліха, крохмаль - антроновим методом, N - ацетилгалактозамін - з реактивом Ерліха / Е.Медді, 1979 /. Вміст сечової кислоти та амінокислот визначали по поглинанню світла в УФ частині спектра, сечовини - по біуретовій реакції.

Вивчення впливу ентеросорбента "Полісорб МП" на показники білкового обміну проводили на 279 білих щурах. Піддослідним тваринам одноразово вводили за допомогою металічного зонду 15% водну суспензію препарату в дозах 0,1; 0,33; 1,0; 2,0; 3,0; 6,0; 8,0 та 10,0 г на кг ваги тіла. Контрольні тварини одержували воду. Застосовували також довготривале введення сорбента у вигляді 15% суспензії в дозах 0,1 / терапевтична доза /; 0,33 та 1,0 г/кг на протязі 10, 20, 30, 60 та 90 днів молодим тваринам / початкова вага - 95-115 г /.

Для дослідження використовували центральну кров. Біохімічні показники білкового та азотневого обміну вивчались за допомогою уніфікованих методів: загальний білок - біуретову реакцією, креатинин - реакцією Яффе, з використання набору виробництва "Лахема" /ЧСФР/, лужну фосфатазу - з α -гліцеринфосфатом натрія по

Боданському, АСТ та АЛТ - дифенілгідразиним методом, гемоглобін - гемоглобінціанатним способом.

Методика виготовлення колоїдного розчину ВДК: порошок ВДК змішували з бідистильованою водою або з фізіологічним розчином у співвідношенні 1:18 - 1:22, вносили у склянку подрібнювача тканин РТ-І. Компоненти змішували при швидкості обертів 8000 на хвилину. Суспензію центрифугували на протязі 20 хвилин при 4000_g. У центрифугаті нефелометрично визначали концентрацію кремнезему по змутненню / $\lambda = 315$ нм, $l = 0,5$ см, ФЕК КФ - К2/ за допомогою калібровочного графіка. Абсолютну кількість кремнезему в розчині визначали шляхом висушування до постійної ваги та зважуванням на аналітичних терезах. Одержаний розчин доводили до робочої концентрації 0,5%.

Проведено вимірювання розмірів часток колоїдного розчину ВДК методом лазерної доплеровської спектроскопії /Е.Каммінгс, Г.Пайк, 1978/. Визначення проводили на експериментальному приладі в НДІ племінної справи в тваринництві. Прилад складається з джерела когерентного випромінювання, мікро ЕОМ та цифрово-друкарського пристосування. Використовувалась зациклена програма підрахунків, які велися безперервно.

В конденсаті повітря, що видихалось, визначалась концентрація середніх молекул /Н.И.Габриелян, В.И.Липатова, 1984/ та білка за Лоурі та нашим методом/.

Кількість оїлка в сироватці крові тварин визначали методами гемоліза та гемаглютинації у полістиролових платах /Фримель, 1983/. Протипечінкових аутоантитіл у хворих на вірусний гепатит визначали методом зустрічного імуноелектрофорезу та реакцією пасивної гемаглютинації з використанням імунодіагностикуму Горьківського НДІ епідеміології та мікробіології.

Печінковий антиген готували з печінки практично здорових молодих осіб, що загинули від травми, використовуючи при цьому метод водно-хлороформного екстрагування /Т.А.Алексеева, 1963/.

Результати досліджень були оброблені методом варіаційної статистики /Е.В.Гублер, 1978; В.М.Носов, 1990/.

Автор висловляє особливу подяку проф.О.О.Пентюку за велику допомогу в засвоєнні ряду методів дослідження та оформленні отриманих даних, а також І.Ф.Миронюку та І.І.Герашенку за допомогу у виконанні досліджень.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

I. Деякі закономірності сорбції білків на ВДК та інших препаратах кремнеземів

Знайдено, що в межах середніх концентрацій білка /0,5-3,0 мг/мл / ізотерми адсорбції для усіх вивчених препаратів кремнезему можуть бути задовільно описані рівнянням Ленгмюра та відображають високовибірковий процес на еквіпотенціальній поверхні. Розміри граничної сорбції сироваточного альбуміна людини та яєчного альбуміна наведені у таблиці I.

Таблиця I

Гранична сорбція білків на сорбентах кремнеземної природи

Вид сорбента	Гранична сорбція, Γ_{∞} мг/г	
	Альбумін людини	Яєчний альбумін
ВДК - аеросил А-300, партія 296, виробництво 1989 р.	720 \pm 23	480 \pm 75
Колоїдний розчин ВДК, 2%	1150 \pm 264	544 \pm 61
Колоїдна кремнекислота, 2%	1154 \pm 33	622 \pm 47
Сілохром	190 \pm 8	118 \pm 15
Ксерогель	176 \pm 11	107 \pm 11
Сілікагель L 5/40 M	54 \pm 4	20
Аеросилогель	270 \pm 15	167 \pm 17

З таблиці I видно, що найвищою сорбційною активністю володіють колоїдний розчин ВДК та кремнекислота, що можна пояснити відсутністю у них крупних агрегатів, що зменшують питому поверхню. Високою також є сорбція білків на ВДК - аеросилі А-300. Характерно, що сорбція альбуміна людини у всіх випадках вище, ніж сорбція яєчного альбуміну.

Розміри сорбції білків на ВДК в мг/г / у протилежність

моль/г / збільшуються відповідно збільшенню їх молекулярної маси / таблиця 2/, а максимальне значення для кожного білка спостерігається в зоні ізоелектричної точки.

Таблиця 2.

Сорбція білків з різною молекулярною масою на ВДК

Білки	Молекулярна маса, дальтон	Гранична сорбція мг/г	Гранична сорбція моль/г · 10 ⁻³	Константа адсорбції, W
1	2	3	4	5
Інсулін	5 700	290 _± 87	50,9 _± 1,4	-
Трипсин	21 000	270 _± 54	12,9 _± 2,44	-
Ячний альбумін	45 000	489 _± 71	10,7 _± 1,6	1,2
Гемоглобін	68 000	623 _± 15	9,1 _± 0,2	4,6
Сироваточний альбумін людини	69 000	723 _± 14	10,5 _± 0,2	11,5
γ-глобулін людини	160 000	896 _± 25	5,6 _± 0,3	13,3

Примітка: W - константа сорбції, що вказує на ступінь спорідненості білка до сорбента.

Виявлено, що білосорбційні властивості ВДК зменшуються при його зберіганні, особливо у негерметичній упаковці / табл.3/. Це свідчить про те, що сорбенти медичного призначення, виготовлені на основі ВДК / "Полісорб" та "Полісорб ІП" / потрібно зберігати в умовах герметичності.

При ознайомленні з технологічним процесом виготовлення ВДК виявлено, що протеїнів'язуюча здатність досягає максимуму лише на останньому етапі синтеза - коагуляції. Промислові партії ВДК значно відрізняються між собою по адсорбційній здатності щодо білків, а значить, і по фармацевтичній ефективності. Виникла проблема стандартизації ВДК медичного призначення, для чого ст.наук. співроб. ІХП І.Ф.Миронюком проведено фракціонування сорбента на три фракції - "легку", "середню" та "тяжку". Нами показано, що

найбільш придатною для використання в медицині є "середня" фракція, яка однородна по розміру часток /а/, по протеїнонектичній здатності /б/ та по показнику насипної маси /в/.

Таблиця 3

Вплив терміну та умов зберігання ВДК на його протеїнсорбційну вмістивність

Строки зберігання, місяці	Вид упаковки	
	Паперова	Герметична поліетеленова
Гранична сорбція білка, мг/г		
0	805 ± 17	805 ± 17
1	729 ± 25	788 ± 14
2	654 ± 4	777 ± 10
6	434 ± 24	720 ± 23
9	388 ± 28	654 ± 24
12	297 ± 23	592 ± 22

Вивчення сорбції на ВДК інших біологічно активних речовин показало, що нуклеїнові кислоти та полісахариди не мають спорідненості до поверхні ВДК, а інші не сорбуються / мононуклеотиди, глюкоза, сечова кислота та ін./, або сорбуються в малій кількості / фосфоліпіди, гліколіпіди, амінокислоти/. Цікаво, що деякі з них добре адсорбуються на комплексах білок-ВДК /П.Г. Рибак, 1993/.

2. Вплив ентеросорбента "Полісорб МП" / препарата, одержаного з пірогенного ВДК / на білковий обмін в експерименті

Проведені дослідження показали, що одноразове перорально введення препарата навіть в дозі 10 г/кг не викликає зміни у стані білкового обміну.

При багаторазовому застосуванні сорбенту в дозах 0,1 / терапевтична доза/; 0,33 чи 1,0 г/кг на протязі 10 - 90 днів по-

казники білкового обміну змінювались незначно : лише дози 1 г/кг тимчасово збільшували рівені сечовини. Після 90 днів введення препарату всі показники нормалізувались, що свідчить про дуже низьку токсичність препарату. Частина з одержаних даних наведена в таблиці 4.

Вказані та інші одержані дані увійшли до складу документації, надісланої у Фармкомітет МОЗ України на ентаросорбент "Полісорб МП". Препарат дозволено для медичного застосування при лікуванні гострих кишечних інфекцій та вірусного гепатита.

3. Розробка методу визначення білка у біологічних об'єктах з використанням ВДК

Здатність ВДК швидко і міцно зв'язувати великі кількості білка дають можливість використовувати цю властивість в аналітичних цілях. Так, запропоновано метод депротейнізації водних середовищ за допомогою ВДК / М.Б.Луцук та співав., 1984 /.

Ми вперше спостерігали явище взаємної флокуляції часток кремнезему та білка у водному середовищі, яке лягло в основу нового метода визначення білка. При взаємодії колоїдного розчину ВДК з білком спостерігаються фізико-хімічні зміни у системі, які легко реєструються візуально та інструментально. Важливо, що колоїдний розчин, виготовлений по розробленому нами способу відповідає двом основним вимогам : високій власній стійкості при зберіганні та здатністю коагулювати у присутності білка.

Одержаний по нашій методиці колоїдний розчин має відповідні зовнішні ознаки / напівпрозорість, опалесценція, дихроїзм т.і./ та характерні для колоїдного розчину розміри часток $1,34 \pm 0,02$ нм, виміряні за допомогою лазерної спектроскопії.

Виявлено, що колоїдний розчин ВДК в присутності білка в концентрації нижче 4 мкг/мл не змінюється. Це свідчить про те, що молекул білка недостатньо для злипання часток кремнезему у великі конгломерати. Це нижня межа стійкості колоїдного розчину і одночасно чутливості метода визначення білка.

У присутності великої кількості білка / 3 мкг/мл та вище/ колоїдний розчин також на коагулює, що пов'язано, на нашу думку,

Таблиця 4

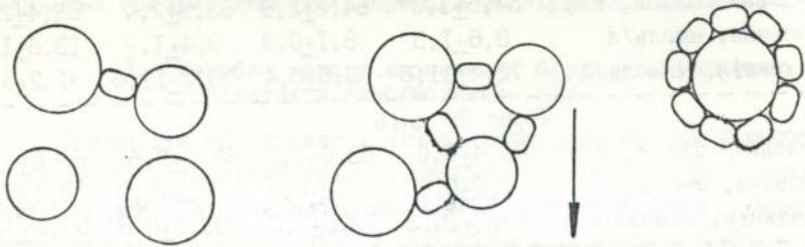
Вплив тривалого перорального введення ентеросорбента
"Полісорб МП" на показники білкового обміну сироватки
крові щурів / $M \pm m, n = 5$ /

Показники	Контроль	Дози препарату, мг/г		
		0,1	0,33	1,0
Через 10 днів				
Загальний білок, г/л	57,6 \pm 3,0	64,2 \pm 2,8	63,6 \pm 2,4	63,4 \pm 2,4
Сечовина, ммоль/л	8,6 \pm 1,3	8,1 \pm 0,9	9,4 \pm 1,9	13,6 \pm 1,6 ^x
Креатинін, мкмоль/л	72,4 \pm 11,8	80,6 \pm 6,4	70,2 \pm 11,6	91,2 \pm 9,7
Через 20 днів				
Загальний білок, г/л	69,4 \pm 6,0	63,6 \pm 1,3	63,5 \pm 3,6	62,8 \pm 1,9
Сечовина, ммоль/л	7,2 \pm 0,6	7,0 \pm 0,8	6,5 \pm 0,9	9,4 \pm 0,6 ^x
Креатинін, мкмоль/л	79,2 \pm 10,3	73,6 \pm 9,2	89,2 \pm 8,8	99,0 \pm 9,1
Через 30 днів				
Загальний білок, г/л	54,7 \pm 4,8	55,6 \pm 0,9	49,6 \pm 6,6	51,4 \pm 3,1
Сечовина, ммоль/л	7,2 \pm 0,8	8,9 \pm 0,6	9,1 \pm 1,4	12,6 \pm 1,6
Креатинін, мкмоль/л	86,0 \pm 6,9	86,8 \pm 7,3	83,4 \pm 9,7	98,8 \pm 5,4
Через 60 днів				
Загальний білок, г/л	54,0 \pm 4,1	53,0 \pm 3,4	62,3 \pm 3,4	64,0 \pm 3,4
Сечовина, мкмоль/л	6,3 \pm 1,2	7,0 \pm 2,3	7,3 \pm 1,2	9,7 \pm 0,8
Креатинін, мкмоль/л	73,4 \pm 8,8	84,0 \pm 7,7	83,0 \pm 9,7	96,8 \pm 6,4
Через 90 днів				
Загальний білок, г/л	55,8 \pm 3,0	54,0 \pm 2,2	56,0 \pm 1,6	62,7 \pm 0,2
Сечовина, ммоль/л	7,4 \pm 0,92	7,6 \pm 0,34	7,7 \pm 0,29	9,6 \pm 1,1
Креатинін, мкмоль/л	74,3 \pm 6,5	83,1 \pm 6,7	82,7 \pm 6,9	98,3 \pm 0,3

Примітка: знаком "x" означена достовірна різниця показників
в порівнянні з контролем $P < 0,05$

з відомим явищем колоїдного захисту. Це, так звана, верхня межа стійкості.

Між нижньою та верхньою межами стійкості лежить зона концентрацій білка, що закономірно викликає флокуляцію колоїдного розчину ВДК. Ми її зазначаємо як зону еквівалентності / малюнок I/. Нагадаємо, що таке саме явище спостерігається при реакції між антигеном та антитілом, коли осад комплексу антиген-антитіло утворюється лише в зоні еквівалентності / Р.С.Незлін, 1966 /.



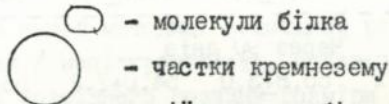
а. низька концентрація білка /відсутність флокуляції /

б. еквівалентна концентрація білка /флокуляція /.
Утворення осаду

в. дуже висока концентрація білка - колоїдний захист/відсутність флокуляції /

Малюнок I. Стан колоїдного розчину ВДК при взаємодії з різними концентраціями білка

Примітка :



Визнаний феномен взаємодії молекул білка та часток колоїдного розчину ВДК дозволяє розробити цілу низку конкретних методів якісних, напівякісного та кількісного визначення білка. Наведемо деякі з них, розроблених нами більш детально.

Напівкількісне визначення білка методом розведення. Досліджувану рідину у ряді пробірок послідовно розводять у 2,4,8 і т.д. разів, у кожному з пробірок вносять по 2 мл 0,3% колоїдного розчину ВДК. Знаходять останню пробірку, де відбулася протягом 30 хвил.

флокуляція /це відповідає приблизно концентрації 4 мкг/мл білка/. Далі проводять математичний розрахунок. Цей метод придатний для визначення білка в сечі хворих, бо порівняно з розповсюдженим методом Стольнікова більш чутливий, безлечний та екологічно чистий, спостерігається добре відтворюваність результатів аналізу.

Експрес-метод визначення білка полягає у послідовному розведенні досліджуваної рідини у 10, 100 та 1000 разів, внесснні у кожену пробірку колоїдного розчину кремнезему та фіксуванні через 30 хвилин результатів. По запропонованій нами таблиці можливе приблизне визначення кількості білка в діапазоні від 100 мкг/мл до 4 мкг/мл.

Метод кількісного визначення білка полягає в тому, що при змішуванні розчинів білка та колоїдного розчину кремнезему в результаті взаємодії часток білка та кремнезему спочатку спостерігається тимчасове підвищення оптичної щільності /змутнення/ пропорційно концентрації білка з подальшим падінням до нуля. Вимірювання оптичної щільності проведено на ФЕК при довжині хвилі 315нм, попередньо будують графік залежності екстинції від концентрації білка, який визначають.

Показано, що на перебіг реакції взаємодії часток колоїдного розчину ВДК та молекул білка мають значний вплив такі фактори, як рН, температура, іонний склад середовища та речовини в концентраціях, які часто присутні у досліджуваних об'єктах / глюкоза, сахарин, сульфат амонію, ДНК, дезоксихолат натрія, тритон X-100, ацетон, гліцерин, етиловий спирт, кислоти т.і./.

Можлива розробка інших варіантів метода кількісного визначення білка за допомогою розробленого нами принципа.

4. Використання гранульованого ВДК аеросилогеля як імуносорбента

ВДК виявляє високу спорідненість до білків, у тому числі, природно, і до білків-антигенів. Тому ВДК і їх похідні є, на наш погляд, перспективним імуносорбентом. Нами використано як імуносорбент гранульований ВДК - аеросилогель, синтезований в інституті хімії поверхні АН України / АС №9983392, 1983 /. Аеросилогель являє собою нерозчинні у воді крупнопористі гранули діаметром біля 2 мм. Протеїнзв'язуюча здатність аеросилогеля значно

нижча, ніж у ВДК / 270 ± 15 мг/г /, але цілком достатня для функції імуносорбента.

Сорбція антигенів на аеросилогелі відбувається самовільно і швидко, не потребує додаткових операцій по хімічному модифікуванню поверхні та кон'югування антигена. Виявлено, що сорбцію антигенів на аеросилогелі треба проводити на протязі 10-30 хвилин при кімнатній температурі у діапазоні рН 4,5-7,0. Необхідна кількість антигена встановлюється шляхом вимірювання граничної сорбції, характерної для кожного конкретного антигену.

Принцип методу полягає у визначенні кількості білка на імуносорбенті до контакту з антисироваткою та після нього. Грнули аеросилогелю, що містяться на дні пробірки легко відмиваються від надлишків білка за допомогою фізрозчина та звичайної пастеровської піпетки.

В процесі розробки метода використовувалась сироватка крові щурів, імунізованих еритроцитами барана та 36 хворих на вірусний гепатит, в крові яких циркулюють антитіла до антигенів печінки. Наявність антитіл у сироватках крові, чи їх відсутність після імуносорбції, контролювалась класичними методами імунохімії. Імуносорбція антитіл супроводжується деякою неспецифічною сорбцією, але її розміри можна значно зменшити розбавленням дослідженої сироватки. На запропонований метод одержано авторське свідоцтво / АС № І5І3403, 1989 /.

На прикладі визначення антитіл у сироватці крові хворих на вірусний гепатит виявлено вміст аутоантитіл до печінкового антигену, який був максимальним / $129,1 \pm 4,6$ мкг/мл / у хворих з тяжкою стадією захворювання.

В И С Н О В К И

І. Високодисперсний кремнезем / ВДК / та виготовлені з нього реагенти / колоїдний розчин та аеросилогель /, а також інші матеріали кремнеземної природи / кремнієва кислота, сілохром, ксерогель т.і. / здатні швидко та міцно приєднувати до себе значні кількості білка - від 270 до 1150 мг/г. Протеїнозв'язуюча активність ВДК може бути використана для створення на його основі сорбентів

медичного призначення та лабораторних методів визначення білків та антитіл.

2. Здатність до сорбції білків ВДК, його фракціями, проміжними продуктами синтезу, похідними ВДК та іншими кремнеземами залежить від питомої поверхні, концентрації силанольних груп на поверхні, вида кремнезема, показників рН, фізико-хімічних властивостей сорбата та умов зберігання сорбента. Кінетика сорбції білків на ВДК задовільно описується рівнянням Ленгмюра.

3. В доклінічних дослідженнях нами показано, що ентеросорбент медичного призначення "Полісорб МП" - кремнеземної природи - в терапевтичних дозах не порушує білковий обмін.

4. Розроблено спосіб виготовлення колоїдного розчину ВДК та принцип визначення за його допомогою білка у біологічних об'єктах. Метод специфічний, визначає лише речовини білкової природи в діапазоні концентрацій 4,0 мкг/мл - 3,0 мг/мл білка.

5. Розроблена методика використання гранульованого ВДК /аеросилогеля / у якості імуносорбента, що відрізняється від відомих високим рівнем порідненості до антигенів білкової природи та не потребує додаткової хімічної обробки поверхні. Імуносорбент придатний для кількісного визначення у сироватці крові антитіл білкової природи.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. М.В.Луцук, О.В.Тертишна, Г.В.Брянцева . Новий метод кількісного визначення білка / твердофазний, адсорбційно-коагуляційний / // Укр.біох. з'їзд: Тез. доп.- Ів.-Жранківськ.-1987.-ч.2.-С.64.
2. О.В.Тертишна, В.В.Гавура, І.Ф.Миронюк та ін. Шляхи використання кремнеземів / аеросилів, силохромів / у імунологічній практиці. // там же .- С.256-257.
3. Н.В.Луцук, Е.В.Тертышная. Использование пирогенных кремнеземов в лабораторной практике. // У научн. конф.: Тез. докл. .- Винница, 1987.- С.77-78.
4. Н.В.Луцук, Е.В.Тертышная. Способ адсорбции антигенов на микро-сферах и их количественное определение. // XIУ Объед. конф. изобр. и рац. : Тез. докл.- Винница, 1987 .- С.126.

5. Е.В.Тертышная, Н.Б.Луцк, Ю.В.Однорогов. Применение азросила в иммунологических исследованиях // IV науч. конф. : Тез докл. - Винница, 1988. - С. 20-21.
6. А.А.Чуйко, В.И.Богомаз, Н.Б.Луцк, А.А.Пентюк, Е.В.Тертышная и др. К обоснованию применения азросила /оксила/ в лечебно-профилактических целях. // IV Республ. конф. : "Сорбенты мед. назначения и механизмы их лечебного действия." : Тез. док. - Донецк, 1988. - С. 39-40.
7. Е.В.Тертышная, В.В.Гавура, Н.Б.Луцк. Иммуносорбентный метод количественного определения противопеченочных аутоантител у больных вирусным гепатитом // ЖЭИ. - 1988, №10. - С. 64-66.
8. А.В.Ильченко, Е.В.Тертышная. Сорбция органических веществ на пироганном кремнеземе / Конф. "Рез. НИР в практ. здравоохран.", Тез. докл.: Винница, 1989. - С. 19-20.
9. В.В.Гавура, Е.В.Тертышная. Изучение аутоиммунных процессов у больных вирусным гепатитом путем определения противопеченочных аутоантител // МРЖ. - 1989 - в.6, разд.3. - С. 86.
10. С.В.Ладутько, Е.В.Тертышная. К характеристике сорбционных свойств некоторых энтеросорбентов // Там же, где работа 8. - С. 25-26.
11. О.А.Яковлева, Н.Б.Луцк, Е.В.Тертышная. Диагностический комплекс конденсата выдыхаемого воздуха // XXXI Межд. симп. "Роль бронх. и легочн. кровообр. в обмене жидк. в легком": Тез. докл. - Ленинград, 1989. - С. 107.
12. АС № 1513403, Способ количественного определения антител к эритроцитам барана. / Н.Б.Луцк, А.А.Чуйко, Е.В.Тертышная и др. // БИ. - 1989. - №37. - С. 203-204.
13. А.А.Фролов, В.В.Гавура, Н.Б.Луцк, Е.В.Тертышная, В.И.Богомаз. Иммуносорбентный метод исследования аутоиммунных процессов у больных вирусным гепатитом. // Инф. письмо МЗ УССР. - по проблеме "Вирусные инфекц. заболеваний." - 1989. - В. 2. - 3 с.
14. Н.Б.Луцк, В.И.Богомаз, А.А.Пентюк, Е.В.Тертышная и др. // Сорбируемость биологически активных веществ на высокодисперсном кремнеземе как предварительный критерий выбора направлений медико-биологических исследований // IV Всесоюзн. конф. "Биолог. активн. соед. кремния, олова, германия": Тез. докл. - Иркутск, 1990. - С. 12
15. И.И.Герашенко, Е.В.Тертышная. Изменение сорбируемости сывороточного альбумина на кремнеземе в присутствии протеолитических ферментов // Деп. в Укр.НИИ НТИ. - № 1664, УК. 90 от 09.10.90.

16. О.А.Яковлева, Е.В.Тертышная . Влияние эндогенных факторов и физической нагрузки на формирование влаговыведения и детоксикации легкими // Терап. архив.- 1991 .- т.63, №12 .- С.11-14.
17. И.И.Герашенко, Е.В.Тертышная, Н.Б.Луцук, В.И.Богомаз. Сравнительное изучение сорбционной способности кремнезёмсодержащих фаз различной природы по отношению к белку.// Укр. хим. журн. 1992.- №6.- С. 256-258.
18. О.В.Тертышна, М.Б.Луцук, П.К.Загниборода. Виготовлення та властивості колоїдного розчину аеросилу // X Об'єдн. конф.: Тез. доп. - Вінниця, 1992 .- С.84-85.
19. Е.В.Тертышная, О.А.Яковлева. Оценка выделительной функции легкими // 3 Нац. конгр. по болезням органов дыхания.: Ж. Пульмонология.- 1992.-№4.- С.426.
20. Е.В.Тертышная, Н.Б.Луцук, О.А.Яковлева, Б.А.Борисенко. Применение полисорба для определения белка. // Сб. научн. трудов под ред. акад. А.А.Чуйко "Кремнеземы в медицине и биологии" / Киев-Ставрополь.- 1993.- С. 175-180.
21. И.И.Герашенко, А.А.Пентюк, Т.Л.Полесья, Е.В.Тертышная. Избирательная адсорбция высокодисперсным кремнеземом липидсодержащих компонентов крови./ Коллоидн. журн. ,1993, т.55, №4.- С. 132-134.

AB 29.143

AB 29.143