

УДК 576.858:539.12:61

**Л.Ю. Вергун¹, Д.А. Климчук², П.П. Горбик³,
Л.А. Бондарь³, П.М. Перехрестенко¹**

¹ ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии АМНУ»,
ул. М. Берлинского, 12, Киев, 04060, Украина

² Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601, Украина

³ Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины,
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина

СИНТЕЗ ИММУНОМАГНИТНЫХ СОРБЕНТОВ ДЛЯ СЕПАРАЦИИ ВИРУСОВ ГЕПАТИТОВ В И С

Исследование посвящено созданию биомагнитных сорбентов, способных удалять вирусные частицы из сыворотки крови человека. С этой целью из сывороток реконвалесцентов после острого вирусного гепатита В (ВГВ) и гепатита С (ВГС) были выделены специфические глобулины, которые использовали в дальнейшем в качестве молекул-векторов (лигандов). Для прочности иммуноглобулины (Ig) ковалентно связывали с магнетитом, инкапсулированным матрицей, несущей на поверхности аминпропильные группы. Была изучена динамика сорбции иммуноглобулинов на магнитоуправляемом носителе. Сыворотки, положительные по ДНК ВГВ, по РНК ВГС в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и по поверхностному антигену (HBsAg) в иммуноферментном анализе (ИФА), апробировали с целью сепарации вирусов иммуномагнитными сорбентами. Согласно результатам ПЦР на ДНК ВГВ, достигнута полная вирус-

© Л.Ю. Вергун, Д.А. Климчук, П.П. Горбик, Л.А. Бондарь, П.М. Перехрестенко, 2009

ная деконтаминация сыворотки, в то же время результаты ИФА свидетельствуют о присутствии HBsAg в исследуемых образцах сыворотки, что может быть связано с наличием большого количества дефектных вирусных частиц в популяции или недостаточным количеством биомагнитного сорбента для полной элиминации. Результаты качественной ПЦР на РНК ВГС сывороток после деконтаминации свидетельствуют об отсутствии полной элиминации ВГС.

Ключевые слова: вирусный гепатит В (ВГВ), вирусный гепатит С (ВГС), полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА), биомагнитный сорбент, сепарация.

Магнитные наночастицы широко используются в биомолекулярном разделении, распознавании, а также в молекулярно-диагностических методах. Специфичность, аффинность и связывающая способность магнитных наночастиц зависят от их размера, формы, дисперсности и химии поверхности [9, 12, 17]. Известны методы удаления патогенов (прионов, вирусов, бактерий, простейших) из биологических жидкостей с использованием высокоплотностных частиц [14]. Распространение получили методы биомагнитного разделения (бактерий, белков, клеток) с применением магнитных наночастиц [17], а также иммуномагнитных сорбентов для экспресс-индикации патогенных микроорганизмов в биопробах, объектах окружающей среды, питьевой воде и пищевых продуктах [8]. Магниточувствительные частицы можно легко диспергировать в жидкой среде, затем быстро осаждать с помощью магнитного поля.

Цель данной работы – изучение возможности создания иммуномагнитных биосовместимых сорбентов для удаления возбудителей трансмиссивных инфекций из сыворотки крови человека.

Материалы и методы. Сыворотки. Использовали сыворотки крови больных в стадии реконвалесценции после острого ВГВ и ГС, в начале ремиссии после хронического ВГС. Все сыворотки прошли скрининг молекулярно-генетическим методом ПЦР (тест-системами «АмплиСенс HCV240/ВКО-440», «АмплиСенс HBV») и ИФА (тест-системами «DIA-HCV», «DIA-HBV», «DIA-HBcore», «Anti-HBsAg Vitrotest»). Сыворотки отрицательные по ДНК ВГВ и РНК ВГС в ПЦР и по HBsAg в ИФА были отобраны для выделения специфических иммуноглобулинов (Ig-ВГС, Ig-ВГВ), положительные по ДНК ВГВ и РНК ВГС в ПЦР анализе – использовали в дальнейшей работе по удалению вирусов.

Имуноглобулины. Специфические иммуноглобулины человека выделяли из высокоактивных сывороток и использовали для получения иммуномагнитного сорбента. Иммуноглобулины выделяли преципитацией риванолом и сульфатом аммония, диализовали против физиологического раствора, концентрировали ПЭГ-40000, вновь диализовали. Определяли уровень Ig ИФА согласно инструкциям к используемым тест-системам, спектр антител (АТ) иммуноэлектроосмофорезом (ИЭОФ), концентрацию белка методом Лоури. Постановку ИЭОФ осуществляли общепринятым методом (Scheidegger, 1955) с использованием 0,8 % агарозы, 0,1 М веронал-ацетатного буферного раствора pH 8,6, гипериммунной антивидовой сыворотки, полученной нами на кролях.

Магнитоуправляемые частицы. Для получения биомагнитного сорбента были использованы композиты высокодисперсного магнетита, модифицированного силика- γ -аминопропилсилоксаном, синтезированным золь-гель методом. Весовое отношение $\text{SiO}_2 : \text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{O}_3/2$ в нанесенных сорбентах составляло 2 : 0,5 либо 2 : 1. Удельная поверхность частиц была 31 и 36 м²/г. Образцы легко суспендировались и быстро осаждались с помощью внешнего магнитного поля.

Биомагнитный сорбент. Для предотвращения десорбции Ig с поверхности носителя в процессе использования магнитоуправляемого сорбента предпочтительным является их химическое связывание [7]. Образцы магнетита несли на поверхности функциональные группы $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3-$. В качестве связывающего агента для силика- γ -аминопропилсилоксана и глобулинов использовали глутаральдегид (25 %, Merck-820603).

Получение иммуномагнитного сорбента. Функционализированные магнитные частицы перед работой стерилизовали озоном и диспергировали ультразвуком. С этой целью использовали комплекс озонирования и ультразвуковой диспергатор УЗДН-2.

Растворы Ig стерилизовали, используя фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Sarstedt). Для исследовательских целей обычно использовали 100 мг функционализированных магнитных частиц. Зная вес, удельную поверхность, определяли количество белка (им-

муноглобулинов), для биофункционализации из расчета, что на 1 мм² поверхности необходимо 2,5 нг белка [3, 5, 4].

Подготовленные образцы суспендировали в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4; добавляли равный объем 5 % раствора глутаральдегида в 0,1 М фосфатном буфере. Полученную смесь мягко перемешивали в течении 3 часов. Не прореагированный глутаральдегид отмывали пятикратно 0,1 М фосфатным буфером, применяя магнитное разделение между отмывками. К активированным частицам добавляли рассчитанное количество Ig, затем смесь снова перемешивали 17–20 часов.

Для изучения динамики сорбции Ig на магнитных частицах отбирали пробы белка в ходе сорбции. По окончании этапа сорбции частицы, связанные с антителами, отмывали 0,1 М фосфатным буфером и суспендировали в 0,2 М растворе глицина, для «блокирования» оставшихся, не прореагировавших функциональных (альдегидных) групп. Суспензию перемешивали 30 минут, частицы, связанные с антителами, отмывали 0,1 М фосфатным буфером, этанолом, дважды фосфатным буфером с 0,2 % бычьим сывороточным альбумином (БСА), далее фосфатным буфером с 0,05 % Tween-20. Полученный таким образом иммуномагнитный сорбент использовали для вирусной деконтаминации сыворотки.

Удаление вирусных частиц. К иммуномагнитному сорбенту добавляли вируссодержащую (ГВ или ГС) сыворотку известной активности, оставляли при мягком перемешивании, отбирали пробы сыворотки для последующего тестирования через 3 часа и 18–20 часов. Активность сывороток проверяли на ДНК ВГВ, РНК ВГС в ПЦР и на HBsAg в ИФА.

Электронномикроскопический анализ. Образцы магнитных частиц изучали методом растровой и трансмиссионной электронной микроскопии. Частицы наносили на адгезивную поверхность предметного столика, напыляли тонким слоем золота и изучали в растровом электронном микроскопе JSM 6060 LA (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 30 кв. Для трансмиссионной электронной микроскопии из верхнего слоя водной суспензии частиц отбирали пробу для тестирования, наносили на бленду с формваровой подложкой, стабилизированной углеродом, высушивали под лампой и изучали в электронном микроскопе TEM 1230 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кв.

Результаты и их обсуждение. Для выделения Ig ВГС использовали пулы сывороток с показателями оптической плотности (ОП) в ИФА (на анти – ВГС тест-системой «DIA-HCV») от 2 о.е. и выше, для Ig ВГВ (на анти – HBs тест-системой «Anti-HBsAg Vitrotest») – от 15 до 400 мМЕ/мл.

Электронно-микроскопический анализ показал, что магнитные частицы характеризовались незначительным разбросом размеров и были представлены округлой, эллипсоидной, реже геометрически неправильной формой. Указанный разброс наблюдался также после функционализации поверхности частиц силика-γ-аминопропилсилоксаном (рис. 1). Согласно данным трансмиссионной электронной микроскопии, частицы имели электронноплотную центральную часть, которая варьировала в зависимости от размера частицы от 50 до 200 нм (рис. 2), и менее электронноплотную периферическую часть.

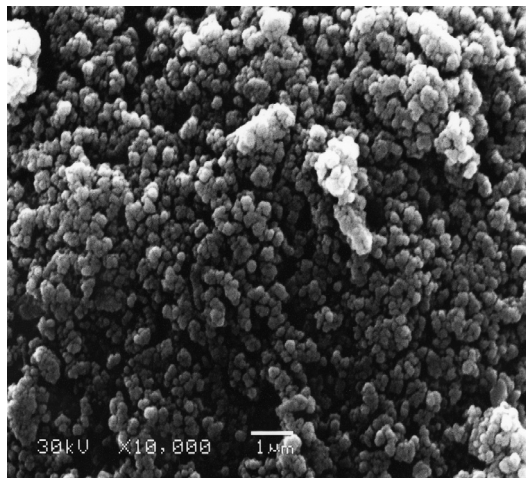


Рис. 1. Растровая электронная микроскопия (РЭМ) частиц магнетита, содержащих на своей поверхности силика-γ-аминопропилсилоксан, синтезированный золь-гель осаждением

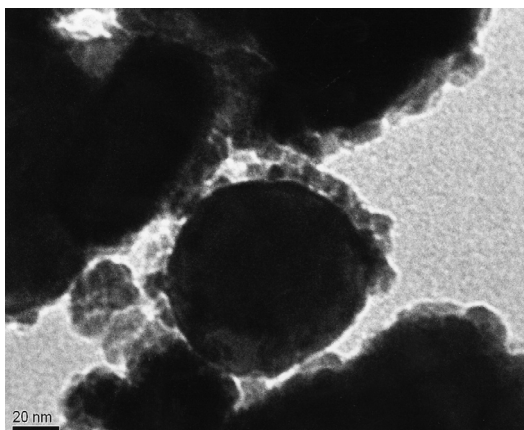


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) частиц магнетита, содержащих на своей поверхности силика- γ -аминопропилсилоксан, синтезированный золь-гель осаждением

В отобранных по ходу приготовления иммуносорбента образцах белка (специфических Ig) определяли концентрацию методом Лоури, в конечных пробах определяли активность Ig – ВГС тест-системой «DIA-HCV», Ig – ВГВ тест-системой «Anti-HBsAg Vitrotest» и ИЭОФ, как описывалось в «Материалах и методах», графически изображали динамику сорбции специфических Ig (рис. 3, 4, 5).

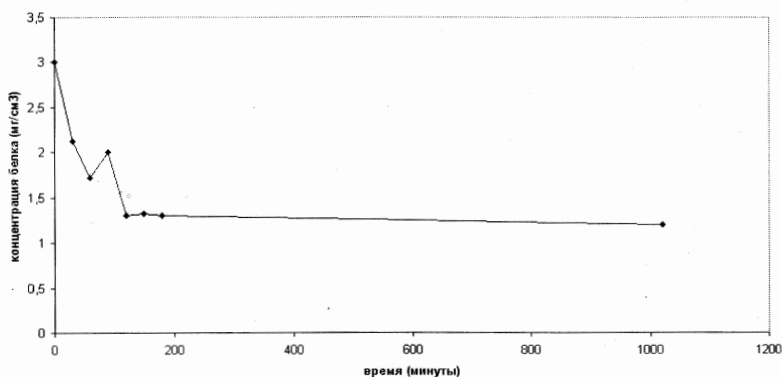


Рис. 3. Динамика поверхностного связывания Ig-ВГВ с частицами функционализованного магнетита

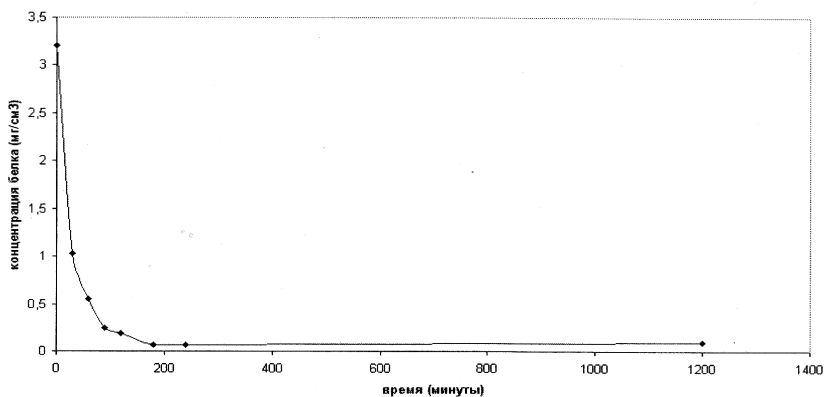
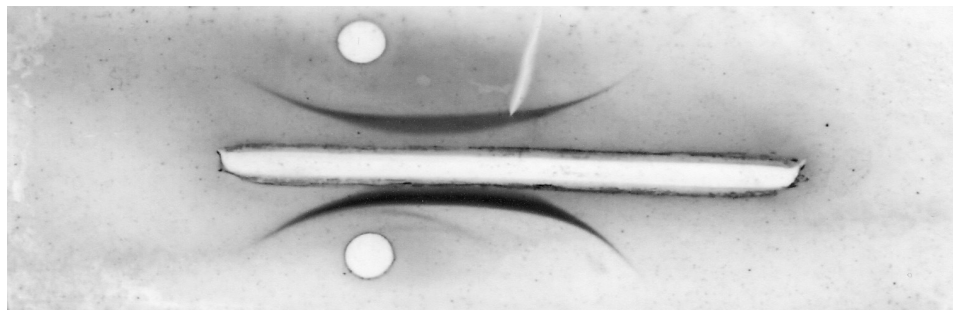
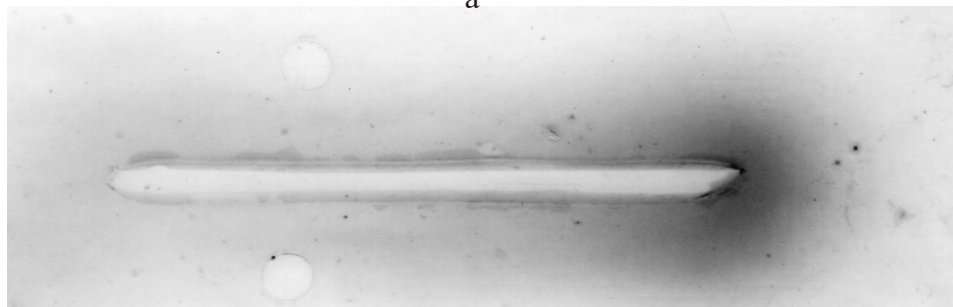


Рис. 4. Динамика поверхностного связывания Ig-ВГС с частицами функционализованного магнетита



а



б

Рис. 5. Оценка сорбции специфических иммуноглобулинов человека на магнетите, функционализированном силика- γ -аминопропилсилоксаном, с помощью ИЭОФ. В лунки внесены: (а) раствор специфических иммуноглобулинов человека, подготовленный для сорбции на функционализированном магнетите; (б) тот же раствор после завершения сорбции (спустя 18–20 часов). В канавки внесена: антисыворотка к цельной сыворотке человека.

Как видно из графиков (рис. 3, 4) эффективность ковалентного связывания специфических Ig на магниточувствительных сорбентах, функционализированных силика- γ -аминопропилсилоксаном, составляла 60 % для Ig-вируса ГВ и 97 % для Ig-вируса ГС. На рис. 5 представлены результаты ИЭОФ исходных образцов специфических иммуноглобулинов (рис. 5а) и после окончания биофункционализации сорбента (рис. 5б).

Величина сорбционной емкости (количество связанного белка (мкг) на 1 мг носителя) является важной характеристикой иммуномагнитных микросфер, заметно влияющей на эффективность сепарации [3]. При выборе метода связывания необходимо учитывать структуру активного соединения, которое будет закрепляться на поверхности, а также условия, при которых препарат будет использоваться после иммобилизации. Обработка поверхности аминоорганокремнеземов с помощью глутарового альдегида, которая была предложена R.J. Robinson et al.(1971), получила наибольшее распространение при создании активированных матриц [16]. Типы связи матрицы и антител (АТ) или антигена (АГ) определяются их функциональными или реактивными группами, которые, в свою очередь, определяют выбор связывающего агента [13].

После связывания Ig с матрицей не исключены свободные для белков сайты на ее поверхности. Для их блокировки использовали БСА наиболее распространенный и доступный для этих целей. Возможно использование сывороточного альбумина человека, чаще всего для иммуномагнитных микросфер, предназначенных для сепарации клеток крови [3]. Снижения уровня неспецифической сорбции можно достичь также внесением в готовый иммуномагнитный биосорбент декстрана лейкоцита [6, 8], казеина.

Как правило, полученные таким способом иммуносорбенты в тот же день испытывали на вирусоудаление, однако допускается их консервирование и хранение. Сыворотка, содержащая вирус гепатита С, не изменила свою активность до и после контакта с иммуносорбентом, т.е. была положительной по РНК ВГС в качественной ПЦР (тест-система «АмплиСенс HCV 240/ВКО-440»), хотя поверхностное связывание матрицы и Ig-ВГС было максимальным (97 %) (рис. 4). Такие результаты можно объяснить, во-первых, отсутствием количественного метода учета (качественная ПЦР), во-вторых, реальным

отсутствием нейтрализации вируса гепатита С иммуносорбентом ввиду того, что многие вирионы вируса гепатита С ассоциированы с сывороточными липопротеинами (β -липопротеинами низкой и очень низкой плотности), которые экранируют вирусные АГ, защищая вирус гепатита С от АТ [11].

Сыворотка, содержащая вирус гепатита В, после контакта с иммуносорбентом была отрицательной в ПЦР и была положительной в ИФА (HBsAg), но значения оптической плотности (ОП) были ниже ОП исходной сыворотки. Содержание неполных вирусных форм («пустых», дефектных) в сыворотке, обычно, значительно превышает концентрацию полных вирионов, в некоторых сыворотках их количество превышает количество вирионов в 10000 и больше раз [15]. На каждый обнаруженный интактный вирус гепатита В (частицу Дейна) приходится сотни «пустых» оболочек, что объясняется циклом развития вируса гепатита В [10]. Неинфекционные, полые частицы HBs-АГ с небольшим содержанием preS2-АГ, в избытке обнаруживаемые в крови носителей инфекции, по-видимому, являются продуктами параллельной экспрессии вирусных генов, встроенных в клеточный геном [1]. Мы также наблюдали подобное явление: в 20 % HBsAg позитивных сывороток не обнаруживали ДНК-ВГВ методом ПЦР [2].

В результате проведенной работы получены образцы иммуномагнитных сорбентов на основе силика- γ -аминопропилсилоксана и лигандов-Ig, специфичных к вирусу гепатита В и вирусу гепатита С. Иммуноглобулины эффективно связываются с поверхностью матрицы. Иммуномагнитный сорбент, специфичный к вирусу гепатита В, способен удалять инфекционный полноценный вирус из сыворотки человека. Однако, несмотря на высокую величину сорбционной емкости при получении иммуномагнитного сорбента специфичного к вирусу гепатита С, не удалось достичь эффекта вируснейтрализации в сыворотке человека.

Таким образом, проведенное исследование показало возможность создания иммуномагнитного биосорбента, способного удалять вирусные частицы из сложной биологической жидкости – сыворотки крови человека.

Авторы выражают благодарность зав. отделением инфекционной больницы № 15 г. Киева Т.А. Елизаровой за сотрудничество при подборе сывороток больных гепатитом В и С, научному сотруднику института ботаники Д.П. Дьоменко за электронно-микроскопические исследования.

Л.Ю. Вергун¹, Д.О. Климчук², П.П. Горбик³, Л.О. Бондар³, П.М. Перехрестенко¹

¹ ДУ «Институт гематології та трансфузіології АМНУ», Київ

² Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ

³ Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, Київ

СИНТЕЗ ІМУНОМАГНІТНИХ СОРБЕНТІВ ДЛЯ СЕПАРАЦІЇ ВІРУСІВ ГЕПАТИТІВ В І С

Резюме

Дослідження присвячено створенню біомагнітних сорбентів, здатних видаляти вірусні частки з сироватки крові людини. З цією метою із сироваток реконвалесцентів після гострого вірусного гепатиту В (ВГВ) і гепатиту С (ВГС) було виділено специфічні глобуліни, які використовували далі у ролі молекул-векторів (лігандів). Для міцності імуноглобуліни (Ig) хімічно зв'язували з магнетитом, інкапсульованим матрицею, яка несе на поверхні амінопропільні групи. Було вивчено динаміку сорбції імуноглобулінів на магніточутливому носії. Сироватки, що були позитивні по ДНК ВГВ, по РНК ВГС у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) і по поверхневому антигену (HBsAg) в імуноферментному аналізі (ІФА), апробували з метою сепарації вірусів імуномагнітними сорбентами. Згідно з результатами ПЛР, на ДНК ВГВ досягнена повна вірусна деконтамінація сироваток, в той самий час результати ІФА свідчать про присутність HBsAg в дослідних зразках сироватки, що може бути пов'язано з наявністю великої кількості пустих дефектних вірусних часток у популяції або недостатньою кількістю біомагнітного сорбенту для повної елімінації. Результати якісної ПЛР на РНК ВГС сироваток після деконтамінації свідчать про відсутність повної елімінації ВГС.

Ключові слова: вірусний гепатит В (ВГВ), вірусний гепатит С (ВГС), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), імуноферментний аналіз (ІФА), біомагнітний сорбент, сепарація.

SYNTHESIS OF IMMUNOMAGNETIC SORBENTS FOR SEPARATION OF HEPATITIS B AND C VIRUSES

Summary

This study was devoted to the creation of biomagnetic sorbents, capable of removing the virus particles from the human blood serum. With this purpose specific globulins were isolated from convalescents sera after acute hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV), which were later used as molecules-vectors (ligands). Ligands were covalently bound to magnetite encapsulated by the matrix, carrying aminopropyl groups on its surface. The dynamics of immunoglobulin sorption with magnet controllable bearer was studied. Sera which were positive by DNA HBV, by RNA HCV in polymerase-chain reaction (PCR) and by surface antigen HBsAg in immunosorbent assay (ELISA) were approbated with the purpose of virus separation by immunomagnetic sorbents. Completed virus decontamination of the serum was achieved according to results of PCR on DNA HBV, at the same time the results of ELISA testify to the presence of HBsAg in the tested samples of the serum, it can be associated with the presence of many defect virus particles in population or with the lack of biomagnetic sorbent for complete elimination. Results of quality PCR on RNA HCV of sera after decontamination testify to the absence of complete HCV elimination.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), polymerase-chain reaction (PCR), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), biomagnetic sorbent, separation.

The author's address: Vergun L. Yu., ST Institute of Haematology and Transfusiology, AMS of Ukraine; 17/26 Kurchatov St., Kyiv, 02166, Ukraine.

1. Аммосов А.Д. Гепатит В. – Новосибирск, 2006. – 127с.
2. Вергун Л.Ю., Годзь В.А., Заневская Л.И., Тимченко А.С. Отбор HBV- и HCV-содержащих проб сывороток для деконтаминации вирусов // Міжвідомчий зб. „Гематологія і переливання крові”. – К.: Нора-Друк, 2006. – Вип. 33. – С. 77–82.
3. Голенкина Е.А., Буркова А.А., Филиппов В.И., Ершов О.Г., Иванов П.К. Иммуномагнитные сорбенты в селекции Т-лимфоцитов человека // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – 1, № 3. – С. 41 – 48.
4. Esser P. Principles in adsorption to polystyrene // Nunc Bulletin. – 1988. – N 6. – P. 1–5.
5. Cheng Zh., Friedt J.-M., Angelova A., Choi K.-H., Laureyn W., Frederix F., Francis L. A., Campitelli A., Engelborghs Y., Borghs G. Human immunoglobulin adsorption investigated by means of quartz crystal microbalance dissipation, atomic force microscopy, surface acoustic wave, and surface plasmon resonance techniques // Langmuir. – 2004. – 20, N 14. – P. 5870–5878.
6. Кузиков А.Н., Бондаренко В.М., Латкин А.Т. Применение биолюминисцентного метода определения бактериального аденозинтрифосфата (АТФ-метрии) в микробиологии // Журн. микробиол. – 2003. – № 1. – С. 80–89.
7. Ларин М.Ю., Иванов П.К., Блохин Д.Ю., Голубцова Н.В., Голенкина Е.А., Филиппов В.И., Ершов О.Л., Мошечков Н.Г. Биодegradуемые иммуномагнитные сорбенты в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – 4, № 3. – С. 24 – 29.
8. Латкин А.Т. Иммуномагнитная сепарация с последующей АТФ-метрией в экспресс-индикации шигел Зонне: Автореф. дис....канд. мед. наук. – Москва, 2005. – 26 с.
9. Lu A.-H., Salabas E.L., Schuth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalisation, and application // Angew.Chem.Int.Ed.Engl. – 2007. – 46, N 8. – P. 1222–1244.
10. Майер К.-П. Гепатит и последствия гепатита. – Москва: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. – С. 491.
11. Маянский А.Н., Обрядина А.П., Уланова Т.И., Блинова Т.В., Бочкова Г.А., Бурков А.Н. Диагностика гепатита С. Информационные материалы. – Нижний Новгород, 2006. – 46 с.
12. Magnani M., Galluzzi L., Bruce I. J. The use of magnetic nanoparticles in the development of new molecular detection systems // J. Nanosci Nanotechnol. – 2006. – 6, N 8. – P. 2302.
13. Pat. 3652761 USA, IC G01N 1/00, 1/34, 31/06. Immunochemical composites and antigen or antibody purification therewith / Howard H. Weetall. – Publ. 28.03.72.
14. Pat. 6730230 USA, IC B03C 001/00; G01N 033/53; G01N 033/569. Use of high density microparticles for removal of pathogens / Cook David N., Monroy Rodney L. – Publ. 04.05.2004.
15. Робинсон У.С. Вирус гепатита В // Вирусология. – Москва: Мир, 1989. – Т.3. – С.292.
16. Тертых В.А., Янишпольский В.В. Имобилизованные на кремнеземах ферменты и их применение // Медицинская химия. – Киев: Наук. думка, 2003. – С. 42–65.
17. Jun Y.-W., Choi J.-S., Cheon J. Heterostructured magnetic nanoparticles: their versatility and high performance capabilities // Chem Commun (Camb). – 2007. – N12. – P. 1203–1214.

Получено 31.01.2008