

Житков М.Ю., Орлов А.А.

Влияние ионов кальция и фосфата на скорость адсорбции щелочной фосфатазы и некоторых белков из сыворотки крови на гидроксиапатите

ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Избирательная адсорбция щелочной фосфатазы (ЩФ) на гидроксиапатите (ГАП) ускоряется ионами фосфата и тормозится ионами кальция. Поскольку биологическая функция ЩФ состоит в синтезе фосфат ионов из органических фосфатов, активность фермента способствует его адсорбции в минерализованных тканях на ГАП, что можно связать с особенностями действия адсорбированного фермента по сравнению с растворенным. По-видимому, избирательная сорбция сигнальных молекул и ферментов в межклеточном матриксе создает необходимое для дифференцировки и функционирования клеток тканей микроокружение. Состав сорбата определяет тип дифференцировки клеток, который, в свою очередь, определяет свойства синтезируемого ими матрикса. Этим замыкается петля обратной связи, поддерживающей гомеостаз тканей. Полученные результаты могут быть использованы при разработке биомиметических материалов для медицины, а также при создании многослойных покрытий с заданными свойствами путем регулируемого по скорости избирательного осаждения коллоидных частиц (наночастиц). В случае анизотропных частиц возможно получение слоев не только частиц одного типа, но и с заданной их ориентацией в каждом слое путем создания частиц с локализованными участками связывания с сорбентом.

Ключевые слова: щелочная фосфатаза, гидроксиапатит, адсорбция, минерализация, коллоиды

Zhitkov M.Yu., Orlov A.A.

Influence of calcium and phosphate ions on the adsorption rate of alkaline phosphatase and some of serum proteins on the hydroxyapatite

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS (NIIOPP RAMS), 125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

Calcium ions accelerate selective adsorption of AP on HAP and phosphate ions inhibit it. Since the biological function of AP is in the synthesis of phosphate ions from organic phosphates, enzyme activity contributes to its adsorption on mineralized tissues HAP, which can be associated with the peculiarities of the action of the enzyme adsorbed compared with dissolved. Apparently, the selective adsorption of enzymes and signaling molecules in the extracellular matrix to produce the microenvironment necessary for cell differentiation and function of tissue. Sorbate composition determines the type of cell differentiation, which, in turn, determines the properties of the synthesized matrix. Thereby circuiting occurs a feedback loop, to maintain homeostasis of tissues. These results can be used to develop a biomimetic material for medicine as well as the fabrication of multilayer coatings with desired properties by means of controlled speed by selectively depositing colloidal particles (nanoparticles). In the case of anisotropic particles the layers it is possible to obtain particles not only one type, but also with their desired orientation in each layer of particles by creating localized sorbent binding sites.

Key words: alkaline phosphatase, hydroxyapatite adsorption, mineralization, colloids

В синтезе минерального компонента костной ткани, основную массу которого составляют кальций-фосфатные гидроксиапатит (ГАП) и карбонатапатит ключевую роль играет фермент щелочная фосфатаза (ЩФ). В этом процессе ЩФ участвует как в растворе, так и будучи адсорбированной на мине-

ральной фазе [1, 2]. Апатиты способны адсорбировать широкий круг биологически активных веществ [3], роль этого явления в биохимии костной ткани изучена недостаточно.

Кислые белки с $pI < 7$, к которым относится и сывороточная ЩФ [4], адсорбируются на ГАП за счет карбоксильных групп аспарагината и глутамата, имеющих кислый характер [3, 5, 6, 7]. Однако ЩФ вероятно взаимодействует с ГАП участками, богатыми аминокислотными группами [1]. При адсорбции вещества по

Для корреспонденции: Житков Михаил Юрьевич (Zhitkov Michail Yur'evich), к.б.н., и.о. ведущего научного сотрудника лаборатории клеточной биологии и патологии развития, e-mail: hongma@yandex.ru

ионному механизму, ее скорость будет зависеть от потенциала двойного электрического слоя поверхности сорбента. Этот потенциал в значительной степени определяется специфически сорбирующимися ионами, которыми в случае ГАП являются, в частности, ионы кальция и фосфата [8]. Избыток ионов кальция придает поверхности ГАП положительный заряд и усиливает сорбцию кислых белков, а при избытке фосфата заряд будет отрицательным и сильнее сорбироваться будут основные белки [3, 6]. Соответственно, измеряя скорость адсорбции различных белков на ГАП при избытке в растворе ионов кальция или фосфата можно определить механизм адсорбции этого белка.

Цель исследования — определение механизма адсорбции ЦФ сыворотки крови человека на ГАП путем исследования влияния концентрации ионов кальция и фосфата в этой биожидкости на скорость адсорбции содержащихся в ней ЦФ и других белков на ГАП.

Методика

В работе использовали бидистиллированную воду, полученную в кварцевом перегонном аппарате; ГАП и другие реактивы — производства фирмы Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Германия; наборы реактивов для определения общего белка (ОБ) биуретовым методом, кальция с арсеназо III, фосфата с молибдатом и ЦФ по скорости гидролиза п-нитрофенилфосфата в диэтиламинном буфере — производства фирмы BioSystems, Испания; пластиковая посуда — производства фирмы Erpendorf AG, Германия. Сыворотку получали из крови пациентов (32 чел.), сдавших кровь для обследования перед плановыми операциями в хирургических отделениях ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» МЗ РФ. Определения проводили на биохимическом анализаторе BTS-370 (BioSystems, Испания).

Сыворотку крови, объединенную в единый пул, разделили на 3 равные части. В первую (1-я серия) вносили 0,5 М раствор хлорид кальция, (рН последнего был доведен добавлением 5% NaOH до значения 7,2), до концентрации 5 мМ Ca^{+2} . Во вторую (2-я серия) — 1 М натрий-фосфатный буфер (рН = 7,2) до концентрации фосфата 10 мМ. В третью (3-я серия) — 0,9%-ный раствор хлорида натрия в количестве 1/100 от объема сыворотки.

Навески ГАП по 40 мг в пластиковых пробирках уравнивали 5 сут. при 37°C в растворах 5 мМ хлорида кальция (1-я серия) или 10 мМ натрий-фосфатного буфера (рН = 7,2) (2-я серия) или 0,9%-ный хлорид натрия (3-я серия), взятых в объемах 1,5 мл. Растворы ежедневно заменяли свежими.

Во всех случаях разделение ГАП и жидкости проводили центрифугированием 10 мин при 3000 об./мин. Затем ГАП дважды промывали водой (по 2,0 мл) воды и высушивали при 37°C до воздушно-сухого состояния. Пробирки с навесками ГАП подогревали до 37°C и добавляли в них по 0,5 мл сыворотки соответствующей серии, подогретой до этой же температуры. После инкубации при 37°C в течение 2, 15, 150 и 330 мин, ГАП отделяли центрифугированием и в супернатанте определяли содержание ОБ, ЦФ, кальция (Ca) и фосфата. В каждой серии проводили по 5 определений в каждой временной точке. Для каждой серии рассчитывали константу скорости адсорбции ОБ и ЦФ, среднюю концентрацию Ca и фосфата. Для каждой величины рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение. Значимость отклонения от нормального распределения оценивали по показателям асимметрии и эксцесса. Поскольку абсолютные величины этих показателей не превышали их ошибки репрезентативности, распределения определяемых величин можно считать нормальными. Значимость различий оценивали по критерию Стьюдента. Кроме того, рассчитывали коэффициенты корреляции констант скорости и концентраций ионов.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования приведены в табл. 1 и 2.

Приведенные в табл. 1 и 2 значения константы скорости адсорбции на ГАП общего белка и соответствующих коэффициентов корреляции указывают, что в исследованном интервале концентраций Ca и фосфата скорость адсорбции ОБ практически постоянна: различия между сериями незначимы ($p \geq 0,05$) и коэффициенты корреляции невелики. Константа скорости адсорбции ЦФ напротив, сильно зависит от концентраций ионов Ca и фосфата, причем их влияние противоположно. Во всех случаях константы скорости для ЦФ существенно выше, чем для ОБ, уровень значимости различий: $p < 0,01$. Наблюдается торможение адсорбции ЦФ на ГАП под влиянием ионов Ca и ускорение — ионов фосфата (для серий 1 и 2: $p < 0,001$). Это указывает на ионный механизм адсорбции ЦФ на ГАП [8]: участок связывания содержит положительно заряженные группы (аминогруппы), взаимодействующие с отрицательно заряженной поверхностью ГАП, что противоположно механизму, обычно наблюдаемому для кислых белков [5].

ОБ сыворотки крови представляет собой сложную смесь различных по свойствам белков, кинетика взаимодействия которых с ГАП отражает в усредненном виде неспецифические механизмы адсорбции [3, 5—7]. Ранее нами было показано, что скорость ад-

Таблица 1

Средние концентрации ионов кальция и фосфата и константы скорости адсорбции ОБ и ЩФ ($M \pm \sigma$)

	Ca, mM	Фосфат, mM	Константа скорости для:	
			ОБ, $k \times 10^{-6}, c^{-1}$	ЩФ, $k \times 10^{-6}, c^{-1}$
Серия 1 (n = 5)	5,27 ± 0,81	0,27 ± 0,10	5,15 ± 3,20	15,1 ± 5,0
Серия 2 (n = 5)	0,23 ± 0,08	10,2 ± 2,0	5,01 ± 3,11	82,6 ± 9,5
Серия 3 (n = 5)	2,12 ± 0,20	1,24 ± 0,17	4,14 ± 2,03	68,3 ± 8,8

Таблица 2

Коэффициенты корреляции констант скоростей адсорбции ОБ и ЩФ и концентраций ионов кальция и фосфата

	Коэффициенты корреляции с концентрациями ионов	
	Кальций	Фосфат
Константа скорости для ОБ	0,27	0,30
Константа скорости для ЩФ	-0,98	0,73

сорбции белков сыворотки крови по неспецифическим механизмам на порядок ниже, чем для ЩФ. При этом адсорбция молекул ЩФ на ГАП сопровождается их ориентацией относительно поверхности ГАП [1], что можно связать с необходимостью предотвращения экранирования активного центра фермента поверхностью сорбента.

Полученные результаты показывают, что изменение состава жидкой фазы модулирует адсорбцию одного из компонентов биожидкостей (ЩФ) на структурах межклеточного матрикса.

Как мы указывали ранее, здесь мы имеем дело с частным проявлением общей закономерности: избирательная сорбция сигнальных молекул и ферментов в межклеточном матриксе создает необходимое для дифференцировки и функционирования клеток тканей микроокружение, состав сорбата определяет тип дифференцировки, который, в свою очередь, определяет свойства синтезируемого клетками матрикса. Тем самым происходит замыкание петли обратной связи, поддерживающей гомеостаз тканей [1].

Создание имплантатов с поверхностями, имитирующими сорбционные свойства межклеточного матрикса определенных тканей, открывает новые возможности управляемой гистокондукции и гистоиндукции.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке биомиметических материалов для медицины, а также при создании многослойных покрытий с заданными свойствами путем регулируемого по скорости избирательного осаждения коллоидных частиц (наночастиц). В случае анизотропных частиц возможно получение слоев не только частиц одного типа, но и с заданной их ориентацией в каждом слое путем создания частиц с локализованными участками связывания с сорбентом. При наличии нескольких

подобных участков с различными механизмами связывания путем изменения условий можно добиться различной ориентации частиц одного вида в разных слоях. Кроме того, исследование механизмов адсорбции биомолекул на различных поверхностях необходимо для разработки избирательных сорбентов для гемодиализа и аналитических целей [9].

Список литературы

1. Житков М.Ю. *Механизмы иммобилизации ферментов на эмали зубов и их действия в полости рта*. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. ЦНИИ стоматологии Министерства здравоохранения Российской Федерации. Москва, 2000, 22 с.
2. Леонтьев В.К., Алексина О.А., Веселова М.Н., Полторак О.М., Чухрай Е.С. Иммобилизация ферментов на эмали зубов и их вероятная роль в физиологии и патологии полости рта. *Стоматология*. 1992; 71 (2): 6–7.
3. Скоупс Р. *Методы очистки белка*: Пер. с англ. М.: Мир; 1985.
4. McComb R.B., Bowers G.H., Posen S. *Alkaline phosphatase*. New York and London: Plenum Press, 1979.
5. Gorbunoff M.J. The interaction of proteins with hydroxyapatite: I. Role of protein charge and structure. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 425–32.
6. Gorbunoff M.J. The interaction of proteins with hydroxyapatite: II. Role of acidic and basic groups. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 433–39.
7. Gorbunoff M.J., Timasheff S.N. The interaction of proteins with hydroxyapatite: III. Mechanism. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 440–45.
8. Goldberg S. *Adsorption models incorporated into chemical equilibrium models*. Chemical equilibrium and reaction models, SSSA Special Publication: 42–95.
9. Архипова Е.Н., Дедаев С.И., Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Goldenberg L., Карганов М.Ю. Исследование взаимодействия наночастиц диоксида титана и сыворотки крови больных аутоиммунными заболеваниями. *Патогенез*. 2011; 9(1): 67–70.

References

1. Zhitkov M.Yu. *Mechanisms of enzymes immobilizing on the enamel of the teeth and their operations in the oral cavity*. Diss. Moscow; 2000, 22 c. (in Russian)
2. Leont'ev V.K., Alexina O.A., Veselov M.N., Poltorak O.M., Chukhray E.S. Immobilization of enzymes on the tooth enamel and their probable role in the physiology and pathology of the oral cavity. *Stomatologiya*. 1992; 71 (2): 6–7. (in Russian)
3. Scopes R. *Methods for protein purification*: Translate from English. M.: Mir; 1985. (in Russian)
4. McComb R.B., Bowers G.H., Posen S. *Alkaline phosphatase*. New York and London: Plenum Press, 1979.
5. Gorbunoff M.J. The interaction of proteins with hydroxyapatite: I. Role of protein charge and structure. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 425–32.
6. Gorbunoff M.J. The interaction of proteins with hydroxyapatite: II. Role of acidic and basic groups. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 433–39.
7. Gorbunoff M. J., Timasheff S.N. The interaction of proteins with hydroxyapatite: III. Mechanism. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 440–45.
8. Goldberg S. *Adsorption models incorporated into chemical equilibrium models*. Chemical equilibrium and reaction models, SSSA Special Publication: 42–95.
9. Arkhipova E.N., Dedaev S.I., Alchinova I.B., Cherepov A.B., Goldenberg L., Karganov M.Yu. Study of interaction of titanium dioxide nanoparticles and blood serum of patients with autoimmune diseases. *Pathogenesis*. 2011; 9(1): 67–70. (In Russian)

Поступила (Received) 17.06.14

Сведения об авторах:

Орлов Андрей Александрович (Orlov Andrey Aleksandrovich) — e-mail: doctororlov@gmail.com