

## THE LOCAL IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS AT EARLY POST-SURGERY PERIOD AFTER DENTAL IMPLANTATION DEPENDING ON THE SCHEMES OF ANTIBACTERIAL TREATMENT

Pivovarov N.A.<sup>1</sup>, Kapitanova K.S.<sup>2</sup>, Toptygina A.P.<sup>2</sup>,  
Manuilov B.M.<sup>2</sup>, Drobyshev A.Yu.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Moscow State Medical Stomatological University n.a. A. I. Evdokimov (MSMSU);

<sup>2</sup>G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Successful performing of dental implantation is one of the major aims of dentistry. Surgery induces violation of the integrity of the mucosa, activation of the mucosal immunity, reparation and regulation processes, that can be measured by levels of IgM, IgG, sIgA and also IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  on the local or systemic level. Some antibiotics and phytotherapy can be applied to prevent potential onset of postoperative complications. Differences in its efficiency and action on the mucosal immunity can be measured with comparative assay of the features of the local immunity in the saliva of patients before dental implantation and after applying the therapies. Application of antibiotics leads to decreasing activity of pathogenic microorganisms and reparative potential of the mucosa cells, that is manifested in statistically significant reduction of the IgG and increased IgM and sIgM levels, whereas phytotherapy enhances activity of the immune system due to stimulation of marked increase in the level of IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the patients' saliva.

**Key words:** Dental implantation, mucosal immunity, phytotherapy, antibioticotherapy, prevention of postoperative complications

---

---

## ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ АНТИ-IgE АПТАМЕРОМ

Раев М. Б.<sup>1,2</sup>, Кропанева М. Д.<sup>1</sup>, Храпцов П. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет;

<sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Разработана и оптимизирована технология синтеза конъюгатов углеродных наночастиц с ДНК-аптамером на основе связи биотин-стрептавидин. Показано, что при сорбции аптамера в соотношении 125–500 пМ/мг углеродных наночастиц уровень сорбции составляет 30–60 пМ ДНК/мг углеродных наночастиц.

**Ключевые слова:** аптамеры, иммуноглобулин E, углеродные наночастицы, стрептавидин

**Введение.** В настоящее время углеродные наночастицы, а также нанокompозиты с углеродной оболочкой широко используются в различных отраслях биомедицины: *in vitro* диагностика [1, 2], таргетная доставка лекарственных веществ [3], медицинская визуализация [4, 5], терапия опухолей [6, 7], биоспецифической экстракции биологических соединений из растворов и смесей [8], трансфекция генов в ткани растений при помощи магнитоуглеродных наночастиц [9], регуляция активности генов при

помощи малых интерферирующих РНК [10], иммуномагнитная сепарации из крови циркулирующих опхолоевых клеток [11], управляемая магнитным полем трансдукция генов [12], *ex vivo* очистка крови от токсинов и возбудителей инфекций [13, 14] и т.д. Все перечисленные области применения наночастиц связаны с распознаванием конкретной молекулы-мишени: клеточного рецептора, ананта или экстрагируемого вещества. Наиболее распространенным способом обеспечить специфическое рас-

познавание наночастицей молекулы-мишени является функционализация ее поверхности моноклональными антителами. Помимо моноклональных антител для этой цели используются молекулярно-импринтированные полимеры и аптамеры [15].

Аптамеры представляют собой искусственно синтезированные олигонуклеотиды, обладающие способностью к специфическому и высокоаффинному (сравнимы по этому показателю с антителами) взаимодействию с целевой молекулой. В сравнении с моноклональными антителами они обладают рядом преимуществ: термостабильность, низкая иммуногенность, возможность синтеза без использования клеток живых организмов, простота и многообразие вариантов модификаций и т.д. Более подробно преимущества аптамеров, технология их синтеза и спектр применений рассмотрены в работах [16–18].

В настоящее время, несмотря на существенное количество публикаций, посвященных применению углеродных наночастиц в биомедицине, их конъюгаты с аптамерами практически не используются. Исключением являются работы в области *in vitro* диагностики, в которых иммобилизация аптамеров на углеродных наночастицах осуществляется нековалентно [19, 20].

**Целью** работы является разработка и оптимизация метода функционализации поверхности углеродных наночастиц ДНК-аптамером при помощи биотин-стрептавидинового взаимодействия.

**Материалы и методы.** Реактивы: бычий сывороточный альбумин (БСА), стрептавидин «Prospec Bio» (Израиль), хлорид натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, хлорид магния, хлорид калия, трис, Твин-20 «Panreac» (Испания), азид натрия «Fluka» (Германия), ЭДТА «Bio-Rad» (США), планшеты из матового белого полистирола с объемом лунок 2 мл «Linbro» (Германия). ДНК-аптамер 5'-GGGGCACGTTTATCCGTCCCTCCTAGTGGCGTGCCCC-3', специфичный к IgE человека [21] в двух модификациях: меченный биотином по 5'-концу и карбоксифлуоресцеином по 3'-концу (bi-Apt) и аналогичный аптамер, не содержащий биотиновой метки (k-Apt) «Синтол» (Россия). Концентрированный (100 мМ) раствор аптамера в ТЕ-буфере с 1мМ ЭДТА хранили в замороженном виде при -20 °С, перед началом работы его размора-

живали, разводили до рабочей концентрации в ЗФР, прогревали при +95 °С в течение 5 мин, а затем охлаждали до комнатной температуры в течение 15–10 мин.

**Приборы:** спектрофотометр Shimadzu UV-VIS UVmini 1240 (Япония), многофункциональный планшетный ридер Synergy H1 “Biotek” (США) ультразвуковой дезинтегратор MSE Soniprep 150 (Великобритания).

**Буферные растворы:** 0,15М раствор NaCl, забуференный 0,015М Na-фосфатами+0,1% NaN<sub>3</sub>+0,1% Tween 20+3мМ KCl+5мМ MgCl<sub>2</sub> рН 7,25 (ЗФР) и 0,02М карбонатный буфер рН 9,6 (КББ). Все растворы, использованные в работе были приготовлены на деионизированной воде.

**Конъюгирование углеродных наночастиц со стрептавидином.** Конъюгаты углеродных наночастиц со стрептавидином (C-Str) были синтезированы согласно методике, описанной в статье [22]. В работе использовали суспензию с массовой долей углеродных частиц 0,75%.

**Количественная оценка сорбции аптамера на углеродных наночастицах.** В растворы ДНК-аптамеров с концентрациями 400, 100, 25, 6,25, 1,5 нМ в ЗФР вносили C-Str до конечных концентраций  $3 \cdot 10^{-3}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$ % (массовая доля) и конечного объема 500 мкл. После часовой инкубации наночастицы осаждали центрифугированием в течение 100 мин при 20000g и отбирали пробы супернатантов. Количество сорбированного аптамера определяли по разнице между флуоресценцией в исходном растворе и супернатанте. Эксперимент с каждой концентрацией углеродных наночастиц воспроизводили трехкратно, каждый эксперимент в свою очередь включал в себя три технических повторности.

**Оценка функциональной активности сорбированного аптамера.** Способность аптамеров, иммобилизованных на поверхности углеродных частиц, связываться с молекулами IgE производили методом твердофазного дот-анализа на полистироле. На поверхность лунок полистирольного планшета наносили каплями по 3 мкл IgE, разведенного в КББ до концентраций 100, 10, 5 и 2,5 мкг/мл. В качестве негативного контроля поверхность соседних лунок сенсibilizировали IgG и БСА в таких же концентрациях. После получасовой сорбции во влажной камере при +37 °С капли удаляли с поверхности планшетов водоструйным насосом, лунки трехкратно промывали 300 мкл ЗФР.

Таблица. Зависимость сорбции аптамеров на C-Str в зависимости от их исходного соотношения

Исходное количество аптамера на 1 мг C-Str, пМ/мг	Сорбировано bi-Apt на 1 мг C-Str, пМ/мг	Процент специфической сорбции, %	Сорбировано k-Apt на 1 мг C-Str, пМ/мг	Процент неспецифической сорбции, %
31	8,2	26,3	1,6	19,6
125	34,6	27,7	1,0	2,9
313	22,6	7,2	1,0	4,4
500	56,8	11,4	12,0	21,0
1250	43,4	3,5	24,7	56,8
2000	84,0	4,2	39,6	47,2
3125	145,7	4,7	96,2	66,1
5000	149,7	3,0	75,8	50,6
8000	281,0	3,5	315,3	112,2
12500	147,3	1,2	216,1	146,8
20000	291,1	1,5	758,9	260,7
50000	957,4	1,9	1041,4	108,8
80000	2328,9	2,9	2379,8	102,2
200000	4206,0	2,1	5544,4	131,8
800000	17145,8	2,1	22216,8	129,6

Растворы bi-Apt и k-Apt в ЗФР с концентрацией 75нМ инкубировали с C-Str в течение часа. Концентрация C-Str составляла 0,03%, конечный объем смеси – 1 мл. Частицы отмывали от не связавшегося аптамера шестью циклами центрифугирования при 20000 в течение 15 мин и добавления 950 мкл ЗФР. Отмытые от аптамера частицы разводили в 1 мл ЗФР и подвергали минутной ультразвуковой обработке. Затем 300 мкл суспензии C-Str, конъюгированных с bi-Apt и k-Apt помещали в сенсibilизированные лунки полистирольных планшетов, которые оставляли на качалке на 15 мин при комнатной температуре. Далее лунки промывали ЗФР и оценивали результаты анализа по наличию темного окрашивания на дне лунок в области нанесения лигандов.

**Результаты и обсуждение.** В ходе проведения исследования была установлена зависимость сорбции биотинилированного и небиотинилированного аптамера на углеродных наночастицах, конъюгированных со стрептавидином, от исходного соотношения количества аптамера и наночастиц, выраженное как количество аптамера в пМ на единицу массы (мг) наночастиц. При этом количество сорби-

рованного k-Apt отражает уровень неспецифической сорбции аптамера на наночастицах, обусловленной гидрофобными, электростатическими, ван-дер-Ваальсовыми и иными взаимодействиями. Задачей нашего исследования было определить условия, в которых неспецифическая сорбция минимальна, а специфическая, напротив, максимальна. В качестве дополнительной характеристики процесса иммобилизации аптамера мы использовали два параметра:

1) процент неспецифической сорбции:

$$\frac{\text{сорбировано } k\text{-Apt на 1 мг C-str, пМ}}{\text{сорбировано } bi\text{-Apt на 1 мг C-str, пМ}} \times 100\%$$

2) процент специфической сорбции:

$$\frac{\text{сорбировано } bi\text{-Apt на 1 мг C-str, пМ}}{\text{исходное количество } bi\text{-Apt на 1 мг C-Str, пМ}} \times 100\%$$

Согласно полученным данным (таблица), наибольший процент специфической сорбции и наименьший процент неспецифической сорбции наблюдались при исходном соотношении 125–500 пМ аптамера на 1 мг C-Str (выделенный фрагмент таблицы). При превышения относительного количества апта-

мера наблюдалось существенное увеличение процента неспецифической сорбции до 100% и более (при исходном соотношении 8000 пМ аптамера на 1 мг С-Str), что свидетельствовало о том, что на наночастицы неспецифически сорбируется больше аптамера нежели за счет взаимодействия биотин-стрептавидин.

Полученные данные были подтверждены при помощи дополнительного эксперимента, в котором исходные соотношения углеродных наночастиц составляли 62–1000 пМ аптамера/1 мг С-Str.

Функциональная активность углеродных наночастиц была подтверждена методом дот-анализа на полистироле. Функционализированные bi-Apt углеродные наночастицы позволяли детектировать сорбированный на полистироле IgE в концентрации 5 мкг/мл. При этом было отмечено неспецифическое взаимодействие с IgG в концентрации 100 мкг/мл. Углеродные наночастицы, конъюгированные с k-Apt давали слабый сигнал с IgE в концентрации 100 мкг/мл. В задачи настоящей работы не входила разработка диагностической системы, предназначенной для выявления Ig E. Тем не менее, если оценивать перспективы использования результатов работы для этих целей, то существует очевидная необходимость повышения чувствительности анализа, поскольку она ниже, чем у ИФА-тестов, а также современных методов детекции общего IgE в сыворотке крови, основанных на применении аптамера [23–25].

**Заключение.** Разработана и оптимизирована технология синтеза конъюгатов углеродных наночастиц с ДНК-аптамером на основе связи биотин-стрептавидин. Показано, что при соотношении 125–500 пМ аптамера/мг углеродных наночастиц уровень сорбции составляет 30–60 пМ ДНК/мг углеродных наночастиц. Функциональная активность иммобилизованных аптамеров подтверждена при помощи прямой детекции IgE методом дот-анализа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 16–44–590427 p\_a»

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bahadır, E.B., Sezgintürk, M.K. (2016) Lateral flow assays: Principles, designs and labels, *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.006>.
2. Huang, X., Aguilar, Z.P., Xu, H., Lai, W., Xiong, Y. (2015) Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.032>.
3. Bayda, S., Hadla, M., Palazzolo, S. et al. (2017) Bottom-up synthesis of carbon nanoparticles with higher doxorubicin efficacy, *Journal of Controlled Release*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.022>.
4. Misra, S.K., Srivastava, I., Tripathi, I. et al. (2017) Macromolecularly caged carbon nanoparticles for intracellular trafficking via switchable photoluminescence, *Journal of the American Chemical Society*, <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.6b11595>.
5. Lee, H.-J., Sanetuntikul, J., Choi, E.-S. et al. (2015) Photothermal cancer therapy using graphitic carbon-coated magnetic particles prepared by one-pot synthesis, *International Journal of Nanomedicine*, <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S7312>.
6. Sadhasivam, S., Savitha, S., Wu, C.-J., Lin, F.-H., Stobiński, L. (2015) Carbon encapsulated iron oxide nanoparticles surface engineered with polyethylene glycol-folic acid to induce selective hyperthermia in folate over expressed cancer cells, *International Journal of Pharmaceutics*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.029>.
7. Li, X., Ding, J., Wang, X., Wei, K., Weng, J., Wang, J. (2014) One-pot synthesis and functionalisation of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@C-NH<sub>2</sub> nanoparticles for imaging and therapy, *IET Nanobiotechnology*, <http://dx.doi.org/10.1049/iet-nbt.2012.0015>.
8. Zlateski, V., Fuhrer, R., Koehler, F.M. et al. (2014) Efficient magnetic recycling of covalently attached enzymes on carbon-coated metallic nanomagnets, *Bioconjugate Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1021/bc400476y>.
9. González-Melendi, P., Fernández-Pacheco, R., Coronado, M.J. et al. (2008) Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: Assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues, *Annals of Botany*, <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm283>.
10. Sengupta, A., Mezenzev, R., McDonald, J.F., Prausnitz, M.R. (2015) Delivery of siRNA to ovarian cancer cells using laser-activated carbon nanoparticles, *Nanomedicine*, <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.15.27>.
11. Li, F.-R., Li, Q., Zhou, H.-X., Qi, H., Deng, C.-Y. (2013) Detection of circulating tumor cells in breast cancer with a refined immunomagnetic nanoparticle enriched assay and nested-RT-PCR, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2013.03.002>.
12. Weber, W., Lienhart, C., Daoud-El Baba, M. et al. (2009) Magnet-guided transduction of mammalian cells and mice using engineered magnetic lentiviral particles, *Journal of Biotechnology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.02.023>.
13. Herrmann, I.K., Beck-Schimmer, B., Schumacher, C.M. et al. (2016) In vivo risk evaluation of carbon-coated iron carbide nanoparticles based on short- and long-term exposure scenarios, *Nanomedicine*, <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.16.22>.

14. Herrmann, I.K., Urner, M., Hasler, M. et al. (2011) Iron core/shell nanoparticles as magnetic drug carriers: possible interactions with the vascular compartment, *Nanomedicine*, <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.11.33>.
15. Maximilien, J., Beyazit, S., Rossi, C., Haupt, K., Tse Sum Bui, B. (2016) Nanoparticles in biomedical applications, *Bioanalytical Reviews*, [http://dx.doi.org/10.1007/11663\\_2015\\_12](http://dx.doi.org/10.1007/11663_2015_12).
16. Zhou, J., Rossi, J., (2017) Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges, *Nature Reviews Drug Discovery*, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.199>.
17. Nezlin, R. (2016) Use of aptamers in immunoassays, *Molecular Immunology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.12.009>.
18. Davydova, A., Vorobjeva, M., Pyshnyi, D. et al. (2016) Aptamers against pathogenic microorganisms, *Critical Reviews in Microbiology*, <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2015.1070115>.
19. Lin, X., Cui, L., Huang, Y. (2014) Carbon nanoparticle-protected aptamers for highly sensitive and selective detection of biomolecules based on nuclease-assisted target recycling signal amplification, *Chemical Communications*, <http://dx.doi.org/10.1039/c4cc02184c>.
20. Duan, N., Gong, W., Wang, Z., Wu, S. (2016) An aptasensor based on fluorescence resonance energy transfer for multiplexed pathogenic bacteria determination, *Analytical Methods*, <http://dx.doi.org/10.1039/c5ay02608c>.
21. Raev, M.B., Khramtsov, P.V., Bochkova, M.S. (2015) Investigation into size distribution of carbon nanoparticles covalently functionalized with proteins, *Nanotechnologies in Russia*, <http://dx.doi.org/10.1134/S1995078015010152>.
22. Wiegand, T.W., Williams, P.B., Dreskin, S.C. et al. // *J Immunol*. 1996. N157. P. 221–230.
23. He, J.-L., Wu, Z.-S., Zhang, S.-B., Shen, G.-L., Yu, R.-Q. (2009) Novel fluorescence enhancement IgE assay using a DNA aptamer, *Analyst*, <http://dx.doi.org/10.1039/b812450g>.
24. Gokulrangan, G., Unruh, J.R., Holub, D.F. et al. (2005) DNA aptamer-based bioanalysis of IgE by fluorescence anisotropy, *Analytical Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1021/ac0483926>.
25. Jiang, P., He, M., Shen, L., Shi, A., Liu, Z. (2017) A paper-supported aptasensor for total IgE based on luminescence resonance energy transfer from up-conversion nanoparticles to carbon nanoparticles, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.005>.

## FUNCTIONALIZATION OF CARBON NANOPARTICLES WITH ANTI-IGE APTAMER

Rayev M. B.<sup>1,2</sup>, Kropaneva M. D.<sup>1</sup>, Khramtsov P. V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Perm State National Research University; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UrB RAS, Perm, Russia

Technology of conjugation of carbon nanoparticles with DNA aptamer based on biotin-streptavidin interaction was developed and optimized. Sorption of 30–60 pM DNA per mg of nanoparticles was obtained at the initial ration of 125–500 pM/mg.

*Key words:* aptamer, immunoglobulin E, carbon nanoparticles, streptavidin