

УДК 53.082.55:615.246.2:611.844.7

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КРЕМНИЙ-И АЛЮМИНИЙСОДЕРЖАЩИХ СОРБЕНТОВ С КОМПОНЕНТАМИ СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Маркина А.И. ^{1*}, Горчев В.Ф. ², Геращенко И.И. ¹

¹ Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина

² Институт биохимии им. А.В. Палладина Национальной академии наук Украины
ул. Леонтовича, 9, Киев, 01601, Украина

Изменение с ростом рН величин адсорбции основных компонентов стекловидного тела – белка и гиалуронана – на силиксе, энтеросгеле, каолине, смектите и оксиде алюминия свидетельствует о значительном вкладе в механизм адсорбции электростатической составляющей. Данные лазерной корреляционной спектроскопии адекватно отражают степень взаимодействия сорбентов и компонентов стекловидного тела.

ВВЕДЕНИЕ

Стекловидное тело (СТ) является уникальным биообъектом, сочетающим свойства организованной ткани и биологической жидкости живого организма, его основные функции – преломление света, попадающего на сетчатку глаза, и обеспечение тургора тканей. СТ на 99 % состоит из воды, 0.9 % приходится на минеральную составляющую (NaCl, KCl, CaCl₂, и MgCl₂) и около 0.1 % делят между собой коллагеновые волокна и цепи гиалуронана [1, 2]. Гиалуронан (синоним – гиалуроновая кислота) – длинный, неразветвленный полимер с молекулярной массой около 4·10⁶ Да, состоящий из повторяющихся дисахаридных звеньев D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина, связанных β-1,4 и β-1,3 гликозидными связями. Гетеротипические коллагеновые волокна на 75 % состоят из коллагена II типа и содержат преимущественно глицин (18 %), пролин (8.4 %), гидроксипролин (15.4 %) и небольшое количество цистеина [3]. В целом, с химической точки зрения СТ следует отнести к гидрогелям. Учитывая, что вся удерживаемая матрицей СТ вода благодаря высокогидрофильному гиалуронану является связанной [4], его можно рассматривать как своеобразный композит. Близкими по составу к

глазному гидрогелю являются суставная жидкость и слизистый (муциновый) слой желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), содержащие белково-полисахаридный комплекс.

Относительно простой состав и доступность стандартизованного фармацевтического препарата СТ послужили основанием для использования последнего в качестве экспериментальной модели при изучении взаимодействия наноразмерных частиц энтеросорбентов с муциновым слоем ЖКТ. Обнадеживающим в этом плане является сообщение о том, что глазной гидрогель может служить селективным диффузионным барьером, который контролирует обмен молекул между разными отделами глаза: в эксперименте обнаружена способность СТ задерживать одни и свободно пропускать другие молекулы красителей малых размеров [5], что можно перенести на диффузионные процессы в муциновом слое ЖКТ.

В данной работе, кроме сорбционных измерений, нами был использован метод лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС), нашедший применение в экспериментальной и практической медицине [6], в том числе для исследования стекловидного тела [7].

* контактный автор alyonamarkina1987@mail.ru
ХФТП 2013. Т. 4. № 3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Объектами исследования служили энтеросорбенты, представленные в

таблице, а также препарат «Стекловидное тело», полученный из глаз крупного рогатого скота (ЧАО «Биофарма», Украина).

Таблица. Энтеросорбенты, использованные в работе

Энтеросорбент	Состав активного компонента	$S_{уд}$, м ² /г
силикс	SiO ₂	302
энтеросгель	(CH ₃ SiO _{1,5} ·nH ₂ O) _∞ , где n=30–46	494 (ксерогель)
каолин фармакопейный	каолинит, Al ₄ [Si ₄ O ₁₀](OH) ₈	13
смекта	смектит, Al ₄ [Si ₈ O ₂₀](OH) ₄ ·nH ₂ O	25
оксид алюминия пирогенный*	Al ₂ O ₃	111

*не является энтеросорбентом и использован в работе в качестве препарата сравнения

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Измерение удельной поверхности сорбентов проводили методом низкотемпературной десорбции аргона. Энтеросгель предварительно высушивали до постоянного веса, переводя его в ксерогель – полиметилсилоксан (ПМС); смекту отмывали от вспомогательных веществ и также высушивали. Непосредственно перед измерениями все образцы прогревали при 120 °С в течение 1 ч.

Адсорбционную активность препаратов изучали по отношению к белку и гиалуронану стекловидного тела при значениях pH 2.09; 3.29; 4.1; 5.02; 6.09; 7.0 и 8.36, которые создавали с помощью универсальной буферной смеси на основе фосфорной, уксусной и борной кислот. Величину адсорбции определяли по убыли сорбата в растворе, концентрацию белка измеряли методом Бенедикта [8], гиалуроновой кислоты – карбазольным методом по Дише [9].

Размерные характеристики изучали методом ЛКС с помощью прибора Zetasizer-3 (Malvern Instruments, UK), оснащенного He-Ne-лазером мощностью 25 мВт, при длине волны 633 нм. При этом определяли распределение частиц по размерам в 0.2 % (для ПМС – 0.5 %) водных суспензиях сорбентов, предварительно обработанных ультразвуком, до и после прибавления равных объемов стекловидного тела. Измерения для каждого образца проводили три раза с интервалом 10 мин. Ошибка определения не превышала 5 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из таблицы, наибольший показатель $S_{уд}$ зафиксирован для ПМС, что следует из его пористой структуры с

преобладанием мезопор [10]. Относительно невысокий показатель $S_{уд}$ смектита, не согласующийся со значительной величиной адсорбции малых молекул, например метиленового синего [11], объясняется тем, что данный показатель был определен без учета внутренней, межслоевой поверхности, которая становится доступной после набухания смектита в воде.

В ходе адсорбционных измерений установлено, что для всех сорбентов, кроме энтеросгеля, наблюдается монотонное уменьшение адсорбции белка СТ с ростом pH, связанное с увеличением отрицательного заряда поверхности сорбентов (рис. 1). При малых значениях pH определенный вклад в адсорбцию могут вносить и водородные связи. Отсутствие характерного для индивидуальных белков максимума адсорбции в изoeлектрической точке можно объяснить гетерогенностью белкового компонента. Для неионогенного энтеросгеля адсорбция белка колеблется около 14 мг/г во всем изученном интервале pH. Адсорбция гиалуронана для большинства сорбентов невелика и составляет 1–3 мг/г, а на энтеросгеле практически отсутствует для всех значений pH. Для оксида алюминия характерна повышенная адсорбция при pH 2.09, когда поверхность сорбента несет значительный положительный заряд и активно взаимодействует с полианионом гиалуронана. Таким образом, сравнение величин адсорбции полиэлектролитов – белка и гиалуронана – на разнозаряженных поверхностях кремний- и алюминийсодержащих сорбентов позволяет сделать вывод об определяющей роли электростатического взаимодействия в механизме адсорбции. Особенно наглядно это

иллюстрирует различие в адсорбции при $\text{pH} \sim 2$ (рис. 1 б), когда поверхность оксида алюминия по величине и знаку заряда резко отличается от поверхностей остальных сорбентов.

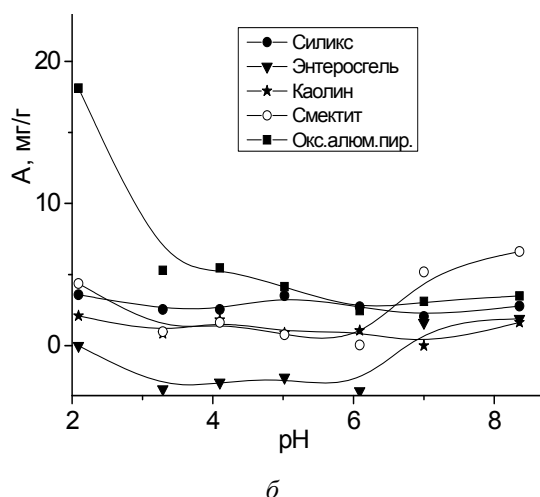
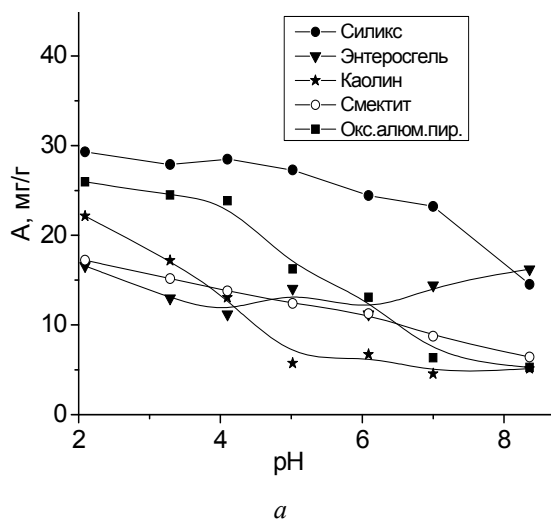


Рис. 1. Зависимость величины адсорбции белка (а) и гиалуронана (б) стекловидного тела от pH среды

Особенность метода ЛКС состоит в том, что результаты отдельного измерения можно рассчитать в виде мономодального или полимодального приближения (с помощью программы Contin [12, 13]). Мономодальное приближение позволяет получить средний размер всех присутствующих в суспензии частиц, тогда как полимодальное показывает средний размер и количество каждого типа частиц для полидисперсной суспензии.

На ЛК-спектре (гистограмме) стекловидного тела (рис. 2) наблюдается несколько фракций. Частицы размером более 1 000 нм относятся к крупным жестким молекулам

коллагена, обладающим меньшей подвижностью, чем более гибкие молекулы гиалуронана, которые составляют фракцию частиц размером 30–100 нм [7].

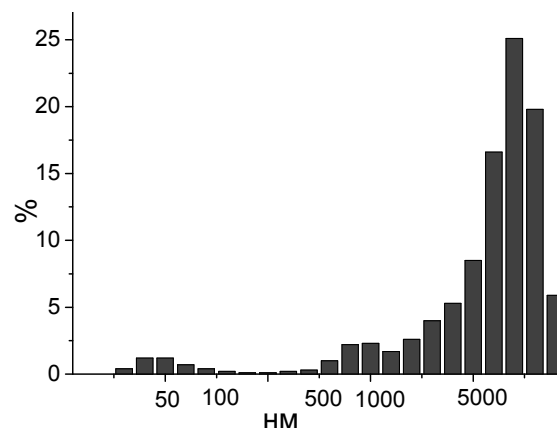


Рис. 2. Распределение компонентов стекловидного тела по размерам

Суспензия силикса после ультразвуковой обработки представляет собой монодисперсный объект, содержащий частицы размером ~145 нм (рис. 3 а). После добавления в суспензию СТ происходит разделение на две фракции размером ~50 и 420 нм, соотношение фракций по массе примерно 1:1 (рис. 3 б). Суспензия Al_2O_3 состоит из двух фракций (рис. 3 в) размером ~55 (масса 60 %) и ~430 нм (масса 40 %). После введения СТ (рис. 3 г) объект содержит три фракции размером 60 (масса 6.5 %), 610 (масса 22 %) и ~2 000 нм (масса 71 %). Суспензия смектита представлена одной фракцией ~600 нм (рис. 3 д); после введения СТ состоит из фракций ~40 и 1000 нм, соотношение масс которых 3:7 (рис. 3 е). Суспензия ПМС, при приготовлении которой в качестве гидрофилизатора использовали этанол, также является монодисперсной со средним размером частиц ~9 000 нм (рис. 3 ж). При введении СТ распределение по размерам практически не изменяется: в мономодальном приближении размер частиц составляет ~7 000 нм; в полимодальном рассмотрении суспензия состоит из двух фракций размером ~450 и 7 000 нм, однако масса первой фракции составляет всего 0.1 % (рис. 3 з). Суспензия каолина состоит из одной фракции размером ~5 000 нм (рис. 3 и). После введения СТ образец содержит две фракции 35 и 5 900 нм, соотношение масс которых 1.5 и 98 %, соответственно (рис. 3 к).

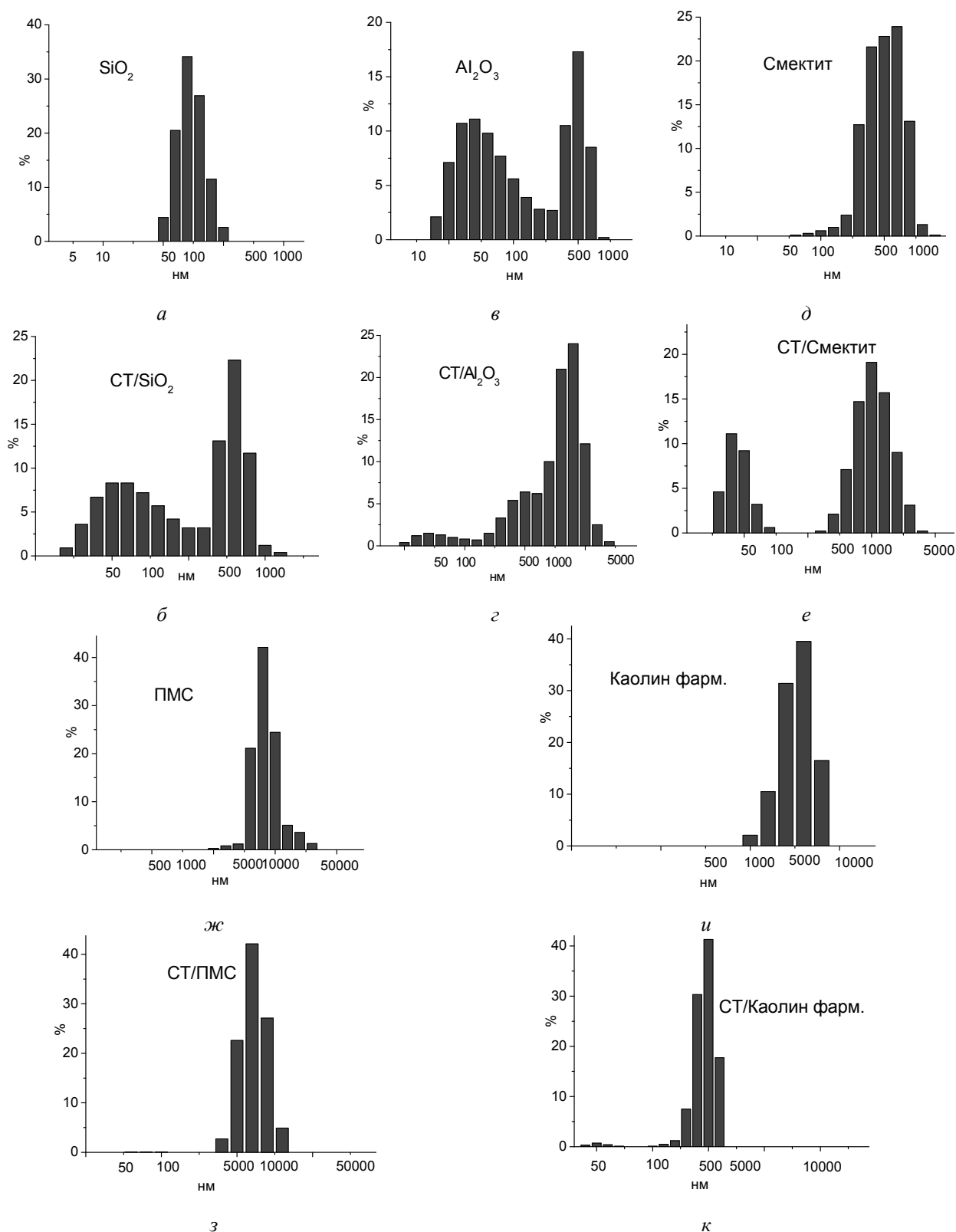


Рис. 3. Распределение частиц в суспензиях сорбентов по данным ЛКС до и после взаимодействия с компонентами стекловидного тела: *а, б* – силикс; *в, г* – пирогенный оксид алюминия; *д, е* – смектит; *ж, з* – ПМС; *и, к* – каолин

Анализ полученных ЛК-спектров показывает, что их можно разделить на два типа. К первому относятся спектры суспензий, где присутствуют высокодисперсные оксиды кремния и алюминия (рис. 3 а–г). Частицы данных оксидов сопоставимы по размерам с макромолекулами гиалуронана, поэтому в результате взаимодействия между ними происходит видимое укрупнение частиц, что и наблюдается на ЛК-спектрах после введения СТ. Второй тип представлен ЛК-спектрами суспензий ПМС и каолина (рис. 3 д–з), которые после добавления СТ изменяются не столь значительно. Основная фракция суспензий ПМС и каолина – довольно крупные частицы, поэтому адсорбция гиалуронана не должна приводить к заметному увеличению их размеров, напротив, наблюдается даже некоторое уменьшение среднего гидродинамического радиуса частиц (это отчетливо видно в случае каолина). Промежуточное положение как по размерным характеристикам исходной суспензии так и по результатам взаимодействия с компонентами СТ занимает смектит (рис. 3 и, к). Следует отметить, что на всех спектрах суспензий, в которые добавлено СТ, в

том или ином количестве присутствует фракция свободного гиалуронана (~50 нм). Остается невыясненной причина отсутствия фракции коллагена на спектрах суспензий силикса, Al_2O_3 и смектита; можно предположить, что в результате адсорбционного взаимодействия с частицами сорбента образуются довольно крупные агрегаты (процесс коагуляции), не фиксируемые методом ЛКС. Судить однозначно о присутствии фракции коллагена в суспензиях ПМС и каолина трудно, поскольку соответствующая область спектра (1 000–10 000 нм) занята фракцией частиц сорбента.

ВЫВОДЫ

Анализ зависимости величин адсорбции от рН основных компонентов стекловидного тела – белка и гиалуронана – на изученных в работе сорбентах свидетельствует о значительном вкладе в механизм адсорбции электростатической составляющей. ЛК-спектры адекватно отражают степень взаимодействия между данными сорбентами и компонентами стекловидного тела.

Вивчення взаємодії кремній- та алюмінійвмісних сорбентів з компонентами склоподібного тіла методом лазерної кореляційної спектроскопії

Маркіна А.І., Горчев В.Ф., Геращенко І.І.

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, alyonamarkina1987@mail.ru*

*Інститут біохімії ім. О.В Палладіна Національної академії наук України
вул. Леонтовича, 9, Київ, 01601, Україна*

Зміна величин адсорбції із зростанням рН основних компонентів склоподібного тіла – білка і гіалуронану – на силіксі, ентеросгелі, каоліні, смектиті і оксиді алюмінію свідчить про значний вклад у механізм адсорбції електростатичної складової. ЛК-спектри адекватно відображають ступінь взаємодії між даними сорбентами і компонентами склоподібного тіла.

Interaction of Si- and Al-containing sorbents with components of vitreous humor by PCS measurements

Markina A.I., Gorchev V.F., Gerashchenko I.I.

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, alyonamarkina1987@mail.ru
Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
9 Leontovych Str., Kiev, 01601, Ukraine*

A change of adsorption with growth of pH of main components of vitreous humor (ptotein and gialuronan) on silics, enterosgel, kaolin, smectite and aluminium oxide testifies to the considerable contribution to the mechanism of adsorption of electrostatic constituent. PC-spectra adequately reflect the degree of interaction between these sorbents and components of vitreous humor.

Keywords: vitreous humor, ptotein, gialuronan, oxide sorbents, laser correlation spectroscopy

ЛИТЕРАТУРА

1. Sharif-Kashani P., Hubschman J.P., Sassoon D., Kavehpour H.P. Rheology of the vitreous gel: Effects of macromolecule organization on the viscoelastic properties // *J. Biomechanics*. – 2011. – V. 44. – P. 419–423.
2. Bishop P.N. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel // *Prog. Retinal Eye Res.* – 2000. – V. 19, N 3. – P. 323–344.
3. Sebag J. Macromolecular structure of the corpus viterus // *Prog. Polym. Sci.* – V. 23. – 1998. – P. 415–446.
4. Геращенко І.І., Маркіна А.І., Туров В.В. Структура зв'язаної води в склоподібному тілі за даними ¹H-ЯМР-спектроскопії // *Мед. хімія*. – 2011. – № 2. – С. 102–106.
5. Lieleg O. Biological hydrogels as selective diffusion barriers // *Trends Cell Biol.* – 2011. – V. 21, N 9. – P. 543–551.
6. Бажора Ю.І., Носкин Л.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине. – Одесса: Друк, 2002. – 400 с.
7. Sebag J. Molecular biology of pharmacologic vitreolysis // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* – 2005. – V. 103. – P. 473–494.
8. Государственная фармакопея СССР, вып.2, 11-е изд. – Москва: Медицина, 1989. – 400 с.
9. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. – Москва: Медицина, 1987. – 368 с.
10. Николаев В.Г. Энтеросгель. – Киев: Богдана, 2010. – 156 с.
11. Геращенко І.І., Маркіна А.І., Пахлов Е.М., Горчев В.Ф. Порівняння структурно-адсорбційних характеристик препаратів каоліну і діоктаєдричного смектиту // *Фарм. журн.* – 2012. – № 3. – С. 58–64.
12. Provencher S.W. A constrained regularization method for invertring data represented by linear algebraic or integral equations // *Comput. Phys. Commun.* – 1982. – V. 27. – P. 213–227.
13. Gun'ko V.M., Klyueva A.V., Levchuk Yu.N., Leboda R. Photon correlation spectroscopy investigations of proteins // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2003. – V. 105. – P. 201–328.

Поступила 14.01.2013, принята 17.06.2013