

УДК 544.723: 611.844.7

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ ОКСИДОВ КРЕМНИЯ И АЛЮМИНИЯ С КОМПОНЕНТАМИ БИОГИДРОГЕЛЯ

Маркина А.И. *, Геращенко И.И., Пахлов Е.М.

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

Измерениями величины адсорбции и методом ИК-спектроскопии изучено взаимодействие наноразмерных оксидов кремния и алюминия с гиалуроновой кислотой и белком стекловидного тела, а также с хондроитинсульфатом, как основными компонентами биогидрогеля. Установлена более высокая адсорбция исследованных биополимеров на оксиде алюминия по сравнению с кремнеземом, из чего сделан вывод о ведущей роли электростатического притяжения в механизме адсорбционного взаимодействия.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с широким распространением метода энтеросорбции актуальной задачей является изучение механизмов действия энтеросорбентов на уровне молекулярных структур слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Работа со слизистой сопряжена с определенными трудностями, поэтому один из подходов может заключаться в использовании субстратов, имитирующих мукозу в целом и ее макромолекулярные компоненты по отдельности. Как известно, слизистая ЖКТ покрыта вязкоупругим секретом, основным компонентом которого являются муцины, выделенные в отдельный подкласс гликопротеинов. Муцины содержат до 50–80 % углеводов, образующих разветвленные олигосахаридные цепочки, связанные О-гликозидной связью с белком. С физико-химической точки зрения муциновый слой представляет собой гидрогель, в котором все макромолекулы связаны друг с другом поперечными связями, что приводит к образованию сетки или макромолекулярного агрегата [1]. Сообщается также [2], что в слизистом секрете желудка птиц обнаружено две фракции гликозаминогликанов, по электрофоретической подвижности соответствующие гиалуроновой кислоте и хондроитинсульфату. Качественно близкими к муциновому слою являются стекловидное тело, суставная жидкость и пупочные канатики – все они содержат белково-полисахаридный

комплекс. Среди перечисленных биогидрогелей стекловидное тело представляет собой относительно простой и наиболее доступный объект, который, по нашему мнению, можно рассматривать как модель для исследования взаимодействия наноразмерных частиц энтеросорбентов со слизистыми секретами организма [3].

По химическому составу стекловидное тело на 99 % состоит из воды, связанной с молекулами протеогликанов и гликозаминогликанов, представленными главным образом гиалуроновой кислотой. Гиалуроновая кислота относится к гетерополисахаридам, ее элементарное звено состоит из остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, связанных β -1,4 и β -1,3 гликозидными связями. Молекулярная масса составляет 10^5 – 10^7 Да, а большое количество групп $-\text{COO}^-$ придает молекуле отрицательный заряд, что способствует удержанию воды и катионов Na^+ . Белковый компонент стекловидного тела представлен в основном коллагеновыми волокнами, состоящими на 75 % из коллагена II типа [4], присутствуют также минорные белки. Основанием для использования стекловидного тела в качестве модели муцинового слоя ЖКТ послужили элементы сходства, приведенные в таблице.

Хондроитинсульфаты относятся к самым распространённым гликозаминогликанам в организме человека. Существует 2 вида хондроитинсульфатов: хондроитин-4-сульфат и

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

хондроитин-6-сульфат. Они построены одинаковым образом, отличие касается только положения сульфатной группы в молекуле N-ацетилгалактозамина. Одна полисахаридная

цепь хондроитинсульфата содержит около 40 повторяющихся дисахаридных единиц и имеет молекулярную массу 10^4 – 10^6 Да [6].

Таблица. Структурно-химическая характеристика стекловидного тела и слизистого секрета ЖКТ

Элементы сходства	Стекловидное тело	Муциновый слой
консистенция	вязкий гель	вязкий гель
состав	<ul style="list-style-type: none"> • содержит воды до 99 %; • матрица – гликозаминогликаны и коллаген (гликопротеин); • N-ацетил-D-глюкозамин – структурный компонент гиалуроновой кислоты 	<ul style="list-style-type: none"> • содержит воды до 95 %; • матрица – гликопротеины; • N-ацетил-D-глюкозамин – обязательный структурный компонент муцинов
заряд полимерной матрицы	гиалуроновая кислота в составе стекловидного тела находится в виде полианиона, сообщая матрице отрицательный заряд	наличие сульфатных групп в сульфомуцинах и карбоксильных групп в сиаломуцинах создает отрицательный заряд муцинового слоя
свойство селективного барьера	задерживает одни и свободно пропускает другие молекулы малых размеров [5]	не пропускает внутрь молекулы размером более 1 кДа [1]

Цель работы – изучение взаимодействия наноразмерных оксидов кремния и алюминия с гиалуроновой кислотой и белком стекловидного тела, а также с хондроитинсульфатом, как основными компонентами биологического гидрогеля.

Наноразмерный диоксид кремния является субстанцией энтеросорбента “Силикс” (препараты-копии: “Полисорб МП”, “Атоксил”), применяемого в комплексном лечении инфекционных, онкологических, аллергических и других заболеваний. Непористые наночастицы препарата можно представить объемным полимером $(\text{SiO}_2)_n$, где $n = 10^4$ – 10^5 ; поверхность частиц покрыта гидроксильными группами (0.6–0.9 ммоль/г), придающими препарату высокую гидрофильность и белоксорбирующую активность. Изoeлектрическая точка SiO_2 находится при pH 2.2, то есть в нейтральной среде его частицы заряжены отрицательно [7].

Пирогенный оксид алюминия был взят для сравнения как субстанция, существенно отличающаяся от кремнезема соотношением кислотных и основных центров различной силы (в нейтральном водном растворе поверхность Al_2O_3 заряжена положительно, $pH_{\text{ИЭГ}} \approx 9.8$ [8]).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Стекловидное тело крупного рогатого скота (ОАО “Березовский мясо-

консервный комбинат”, Беларусь) хранили в холодильнике при температуре -20 °С и непосредственно перед измерениями размораживали при комнатной температуре. Методом высушивания до постоянной массы установлено, что сухого остатка в препарате содержится 9 мг/мл; pH составляет 8.5.

Хондроитинсульфат использовали французского производства (Naturex).

Наноразмерный кремнезем марки А-300 ($S_{\text{уд}} = 300$ м²/г) и оксид алюминия ($S_{\text{уд}} = 110$ м²/г) синтезированы на Калушском опытно-экспериментальном заводе Института химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины.

Методы исследования. Адсорбционное исследование выполняли согласно методике [9]. Готовили несколько смесей стекловидного тела с водой с возрастающим содержанием биосубстрата (показатель pH при этом изменялся в диапазоне от 6.5 до 8.5). К точным навескам сорбентов прибавляли по 3 мл полученных растворов стекловидного тела, встряхивали в течение 1 ч. После этого центрифугировали и в центрифугате определяли равновесную концентрацию белка по методу Бенедикта [10]. По разности исходной и равновесной концентраций белка рассчитывали величину адсорбции (A , мг/м²), после чего результаты представляли в виде зависимости величины адсорбции от равновесной концентрации. Изучение адсорбции гиалуро-

новой кислоты и хондроитинсульфата проводили аналогично, определяя их равновесные концентрации по методу Дише [11].

ИК-спектроскопическое исследование кремнезема, оксида алюминия, стекловидного тела, а также композитов $\text{SiO}_2/\text{стекл.тело}$ и $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{стекл.тело}$ проводили с помощью спектрофотометра Specord M80 (Carl Zeiss, Jena, Germany) методом разбавления с бромидом калия. Прозрачные пластинки смеси образца с KBr (1 : 100) приготавливали с помощью гидравлического пресса. Регистрацию спектров вели в режиме пропускания в диапазоне частот $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$. Образцы перед исследованием прогревали при $150\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 2 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сорбция белка стекловидного тела.

Изотерма адсорбции белка стекловидного тела на кремнеземе (рис. 1) имеет ленгмюровскую форму, что характерно для монослойной адсорбции. Изотерма адсорбции белка на Al_2O_3 относится к линейному типу, что указывает на постоянный коэффициент распределения сорбата между стекловидным телом и поверхностью сорбента в изученном диапазоне концентраций (изотерма Генри). По классификации Гильса первая кривая относится к L-типу, вторая – к C-типу [12].

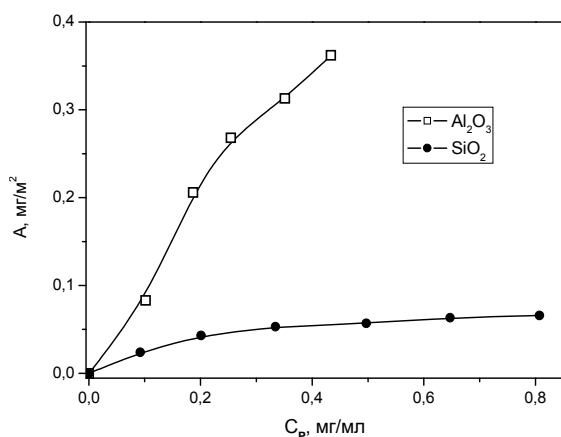


Рис. 1. Адсорбция белка стекловидного тела на SiO_2 и Al_2O_3

Экспериментально наблюдаемая максимальная величина адсорбции белка из неразведенного стекловидного тела на SiO_2 (0.066 мг/м^2) в 5.5 раз меньше, чем на Al_2O_3 (0.362 мг/м^2). Это можно объяснить тем, что

ИЭТ большинства животных белков находится при $\text{pH} = 5.0\text{--}6.5$ (для коллагена $\text{pH}_{\text{ИЭТ}}$ составляет $7.0\text{--}7.5$ [13–15]), т.е. белок в стекловидном теле присутствует в анионной форме, что уменьшает его адсорбцию на поверхности SiO_2 , несущей в щелочной среде значительный отрицательный заряд, и практически не мешает адсорбции на Al_2O_3 , плотность отрицательного заряда на поверхности которого существенно меньше.

Сорбция гиалуроновой кислоты стекловидного тела. Кривые адсорбции гиалуроновой кислоты на изученных оксидах имеют четко обозначенные максимумы, причем адсорбция на SiO_2 в максимуме (при $\text{pH} 7$) почти в 10 раз меньше, чем на Al_2O_3 (рис. 2). Более высокие величины адсорбции гиалуроновой кислоты на Al_2O_3 можно объяснить, как и в случае с белком, электростатическим притяжением разноименно заряженных групп COO^- гиалуроновой кислоты и поверхности оксида алюминия и, соответственно, отталкиванием этих групп от одноименно заряженной поверхности кремнезема. Резкое уменьшение адсорбции с ростом концентрации стекловидного тела можно связать с увеличением pH в среде, поскольку последние точки на кривых получены для адсорбции из неразведенного стекловидного тела, имеющего pH около 8.5. При данном значении pH отрицательный заряд поверхности оксидов достаточно велик (в случае SiO_2 больше, чем для Al_2O_3), что противодействует адсорбции полианиона гиалуроновой кислоты.

Вторая причина появления максимумов на кривых, возможно, связана с преимущественной сорбцией из нативного стекловидного тела воды, а не гиалуроновой кислоты. Это согласуется с теорией адсорбции из растворов, в соответствии с которой при больших концентрациях растворенного вещества преобладает адсорбция растворителя и это подтверждается результатами ^1H ЯМР-исследований, полученными нами ранее [3], согласно которым в гидрогеле стекловидного тела практически вся вода является связанной с полимерной матрицей, а на долю свободной воды (растворителя) приходится всего около 1%. При этом в стекловидном теле ассоциированность воды (среднее количество протонов, образующих водородную связь, на 1 молекулу воды) составляет 1.25, в то время

как для объемной воды этот показатель равен 1.85.

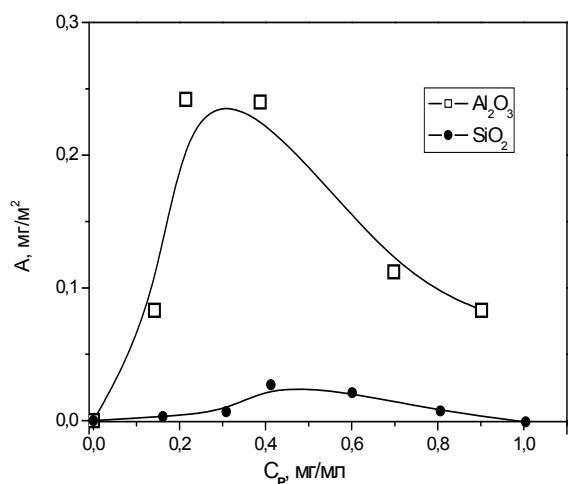


Рис. 2. Кривые адсорбции гиалуроновой кислоты на SiO_2 и Al_2O_3

Отсутствие адсорбции гиалуроновой кислоты из нативного (неразведенного) стекловидного тела свидетельствует о том, что в данном гидрогеле нет прочной связи между его основными компонентами – гиалуроновой кислотой и белком (коллагеном). Если предположить обратное, то белок, сорбируясь на поверхности кремнезема, “потянул бы за собой” гиалуроновую кислоту. Полученный результат можно рассматривать как экспериментальное подтверждение того, что гиалуроновая кислота является единственным представителем гликозаминогликанов, линейная молекула которого не имеет ковалентно связанных боковых ответвлений в виде полипептидных цепей [4, 16].

Сорбция хондроитинсульфата как и в случае с белком и гиалуроновой кислотой подтверждает ведущую роль электростатических сил в механизме взаимодействия с поверхностью. Макромолекула хондроитинсульфата, благодаря полностью диссоциированным сульфатным группам, обладает отрицательным зарядом и в нейтральном растворе не взаимодействует с одноименно заряженной поверхностью кремнезема. Оксид алюминия, наоборот, демонстрирует неплохую адсорбцию данного биополимера, причем адсорбционная кривая приближается по форме к S-типу (полимолекулярная адсорбция) (рис. 3).

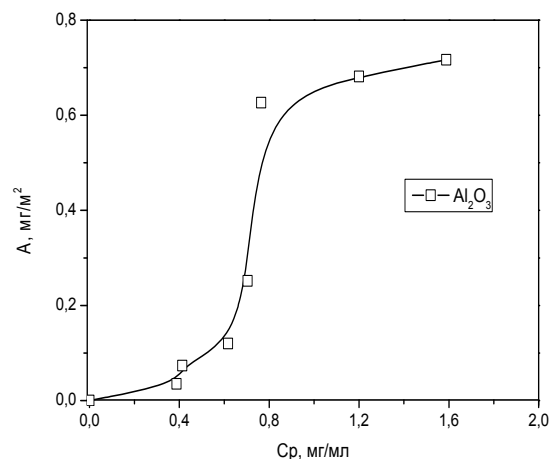


Рис. 3. Адсорбция хондроитинсульфата на Al_2O_3

ИК-спектроскопическое исследование.

ИК-спектр (рис. 4) стекловидного тела содержит следующие характеристические полосы: $3600\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ относится к колебаниям O–H в молекулах воды и карбоксильных группах, связанных водородными связями, и аминогруппам в полисахаридах; 1630 см^{-1} соответствует C=O амидной группы (амид I) полосы вблизи $1590\text{--}1510\text{ см}^{-1}$ характерны для антисимметричных колебаний карбоксильных групп и связи N–H в N-ацетилглюкозамине; поглощение в области $1125\text{--}1040\text{ см}^{-1}$ относится к колебаниям пиранозного цикла; 1030 см^{-1} соответствует колебаниям эфирной связи; присутствуют также слабоинтенсивные валентные колебания групп–CH при 2928 см^{-1} . Данный спектр подтверждает, что основными органическими компонентами стекловидного тела являются гиалуроновая кислота и коллаген [17].

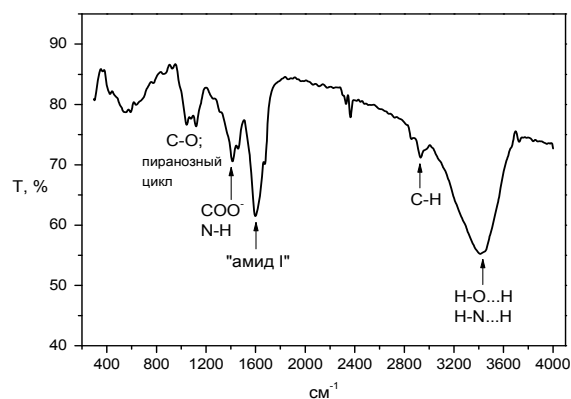


Рис. 4. ИК-спектр стекловидного тела

В спектре исходного кремнезема (рис. 5) присутствует широкая полоса в области

3450 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям адсорбированных молекул воды, и слабоинтенсивный пик 1630 см^{-1} , который можно отнести к деформационным колебаниям молекулярной воды. Присутствуют также характерные полосы поглощения SiO_2 : широкая интенсивная полоса при 1100 см^{-1} соответствует антисимметричным колебаниям связи $\nu_{\text{as}}(\text{Si}-\text{O})$ в кремнекислородном тетраэдре; полоса 980 см^{-1} относится к колебаниям связи $\nu(\text{Si}-\text{O})$ в группе $\text{Si}-\text{OH}$; полоса 808 см^{-1} отвечает за симметричные колебания $\nu_s(\text{Si}-\text{O})$ тетраэдра SiO_4 , а полоса 470 см^{-1} относится к деформационным колебаниям связи $\text{Si}-\text{O}$ [18].

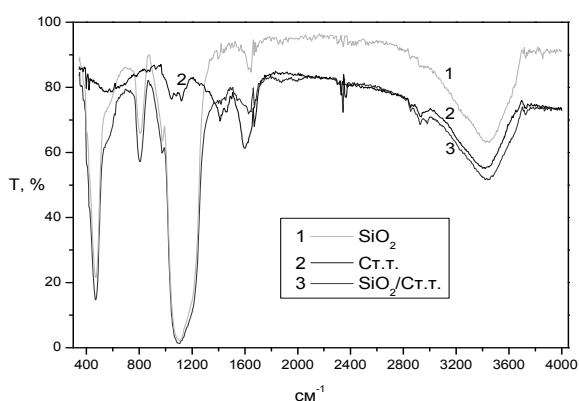


Рис. 5. ИК-спектры исходного кремнезема и композитов $\text{SiO}_2/\text{стекл. тело}$

В ИК-спектре исходного оксида алюминия (рис. 6) активны полосы 3460 см^{-1} , 1628 см^{-1} и интенсивные полосы в районе 580–820 см^{-1} , относящиеся к валентным колебаниям связи $\nu(\text{Al}-\text{O})$ [19].

В ИК-спектрах образцов SiO_2 и Al_2O_3 , полученных после адсорбции компонентов стекловидного тела (рис. 5, 6), наблюдается рост интенсивности в области 3600–3100 см^{-1} , что соответствует колебаниям групп OH связанных водородной связью воды и гидроксидов поверхности. По сравнению с исходными кремнеземом и оксидом алюминия происходит увеличение интенсивности полосы с максимумом в области 1600 см^{-1} , которая относится к полосе амид I, частично перекрывающейся деформационными колебаниями воды. Появление у композитов полосы амид I определяет, по-видимому, возможность адсорбционного взаимодействия компонентов стекловидного тела с поверхностью SiO_2 и Al_2O_3 .

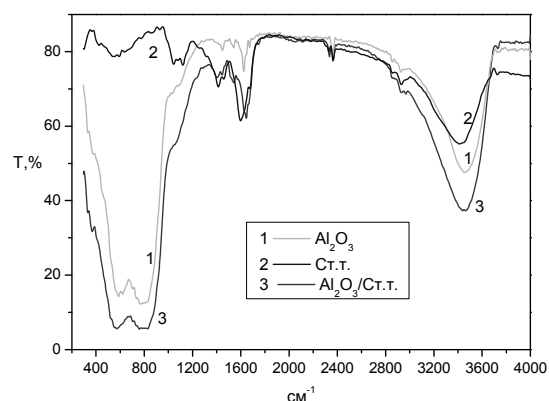


Рис. 6. ИК-спектры исходного оксида алюминия и композита $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{стекл. тело}$

ИК-спектр исходного хондроитинсульфата (рис. 7) характеризуется следующими полосами поглощения: 3600–3100 см^{-1} относится к слабосвязанным группам OH воды, которые перекрывают полосы валентных колебаний OH и групп NH хондроитинсульфата; 2936 см^{-1} соответствует валентным колебаниям групп $-\text{CH}_2-$; 1650 см^{-1} – полоса амид I; 1552 см^{-1} – полоса амид II (деформационные колебания амидной группы); полосы 1244 и 1056 см^{-1} соответствуют асимметричным и симметричным колебаниям группы OSO_3 [20].

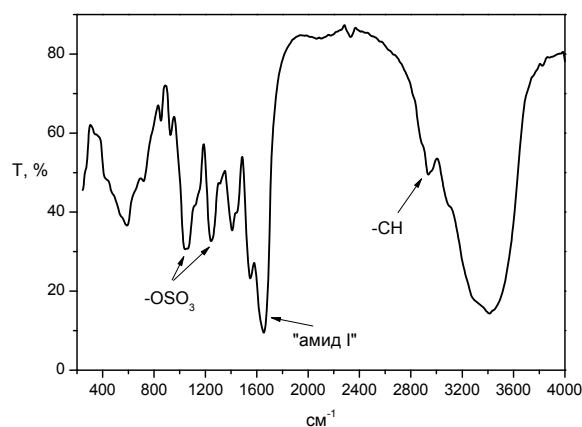


Рис. 7. ИК-спектр хондроитинсульфата

Приведенные спектры SiO_2 и осадка, полученного после центрифугирования смеси кремнезема с хондроитинсульфатом (рис. 8), идентичны, что подтверждает данные об отсутствии взаимодействия между ними.

Спектр оксида алюминия, обработанного раствором хондроитинсульфата, нельзя назвать совпадающим со спектром исходного сорбента (рис. 9). Так, появление полосы 2928 см^{-1} , характерной для валентных колебаний групп CH ,

може бути доказательством адсорбції хондроитинсульфата на поверхності.

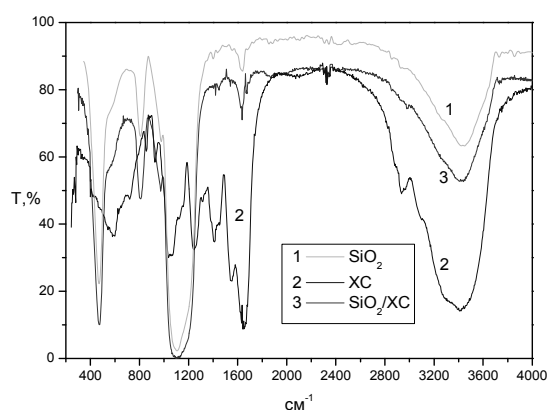


Рис. 8. ИК-спектры исходного SiO₂, хондроитинсульфата и продукта их взаимодействия

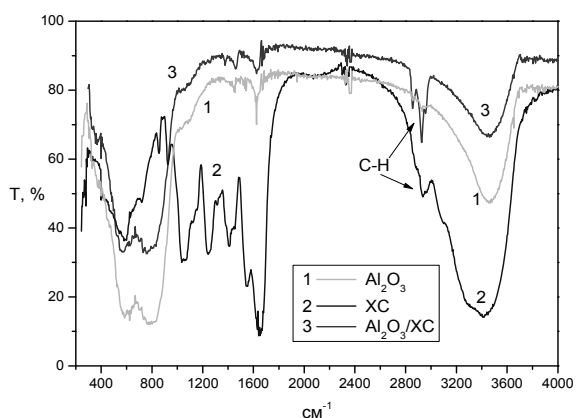


Рис. 9. ИК-спектры исходного Al₂O₃, хондроитинсульфата и композита Al₂O₃/XC

При сравнении полученных спектров композитов и исходных сорбентов (рис. 5–9) видны лишь незначительные изменения, что может свидетельствовать о слабом адсорбционном взаимодействии (особенно для кремнезема) между молекулами изученных биополимеров и поверхностью сорбентов.

ВЫВОДЫ

Изотерма адсорбции белка стекловидного тела на SiO₂ относится к L-типу, а на Al₂O₃ – к C-типу. Гиалуроновая кислота стекловидного тела сорбируется на поверхности оксидов кремния и алюминия при pH < 7, а с ростом pH наблюдается уменьшение адсорбции вследствие нарастания отталкивания между молекулами биополимера и одноименно заряженной поверхностью сорбента. Хондроитинсульфат не взаимодействует с поверхностью кремнезема, сорбируясь, однако, на оксиде алюминия, что подтверждает электростатическую природу взаимодействия. Появление в ИК-спектрах кремнезема и оксида алюминия полосы амид I определяет возможность адсорбционной иммобилизации гиалуроновой кислоты на поверхности данных сорбентов. Полученные результаты могут быть использованы при изучении молекулярных механизмов биологического действия наноразмерных оксидов, в частности, кремний- и алюминийсодержащих энтеросорбентов.

Взаємодія нанорозмірних оксидів кремнію і алюмінію з компонентами біогідрогелю

Маркіна А.І., Геращенко І.І., Пахлов Є.М.

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

Шляхом вимірювання величини адсорбції та методом ІЧ-спектроскопії вивчено взаємодію нанорозмірних оксидів кремнію й алюмінію з гіалуроновою кислотою і білком склоподібного тіла, а також з хондроитинсульфатом, як основними компонентами біогідрогелю. Встановлено більшу високую адсорбцію даних біополімерів на оксиді алюмінію порівняно з кремнеземом, з чого зроблено висновок про провідну роль електростатичного притягання в механізмі адсорбційної взаємодії.

Interaction of nanosized SiO₂ and Al₂O₃ with components of biohydrogel

Markina A.I., Gerashchenko I.I., Pakhlov E.M.

Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, alyonamarkina1987@mail.ru

Interaction of nanosized SiO₂ and Al₂O₃ with hyaluronic acid and protein of the vitreous humor, and also with chondroitinsulfate, as the basic components of biohydrogel has been studied by the adsorption measurements and IR-spectroscopy. Higher values of adsorption of these biopolymers on the Al₂O₃ as compared to the silica surface confirms the leading role of electrostatic attraction in the adsorption mechanism.

Keywords: Nanosized SiO₂ and Al₂O₃, vitreous humor, hyaluronic acid, protein, chondroitinsulfate, biohydrogel, adsorption measurements, IR-spectroscopy, electrostatic attraction

ЛИТЕРАТУРА

1. Железная Л.А. Структура и функции гликопротеинов слизи (муцинов) // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 1998. – № 1. – С. 30–37.
2. Душійко А.А., Великий М.М., Артеменко М.А. Вплив вітаміну А на обмін кислих мукополісахаридів секреторних тканин залозистого та м'язового шлунків курчат // Укр. біохім. журн. – 1969. – Т. 41, № 1. – С. 31–35.
3. 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.
4. Sebag J. Macromolecular structure of the corpus viterus // Prog. Polym. Sci. – 1998. – V. 23. – P. 415–446.
5. Lieleg O. Biological hydrogels as selective diffusion barriers // Trends in Cell Biol. – 2011. – V. 21, N 9. – P. 543–551.
6. Schiller S. Connective and supporting tissues: mucopolysaccharides of connective tissues // Annu. Rev. Physiol. – 1966. – V. 28. – P. 137–158.
7. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А.А. Чуйко. – Киев: Наукова думка, 2003. – 416 с.
8. Gun'ko V.M., Zarko V.I., Turov V.V. et. al. Regularities in the behaviour of nanooxides in different media affected by surface structure and morphology of particles // Nanomaterials and Supramolecular Structures. – 2010. – P. 93–115.
9. Николаев В.Г., Картель Н.Т., Посохова Е.А. и др. Доклиническое изучение энтеросорбентов. Методические рекомендации. – Государственный экспертный центр МЗ Украины. – Киев, 2010. – 56 с.
10. Государственная фармакопея СССР. – Вып. 2. – 11-е изд. – Москва: Медицина, 1989. – 400 с.
11. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. – Москва: Медицина, 1987. – 368 с.
12. Парфум Г., Рочестер К. Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел. – Москва: Мир, 1986. – 488 с.
13. Wallace D.G. The relative contribution of electrostatic interactions to stabilization of collagen fibrils // Biopolymers. – 1990. – V. 29. – P. 1015–1026.
14. Rosenblatt J., Devereux B., Wallace D.G. Dynamic rheological studies of hydrophobic interactions in injectable collagen biomaterials // J. Appl. Polym. Sci. – 1993. – V. 50. – P. 953–963.
15. Tomaszewska-Gras J., Konieczny P. A DSC study on the effect of marination on the stability of skin collagen from chicken wings // Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. – 2010. – V. 9, N 4. – P. 413–423.

16. *Sebag J.* Molecular biology of pharmacologic vitreolysis // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* – 2005. – V. 103. – P. 473–494.
17. *Calderon L., Collin E., Velasco-Bayon D. et al.* Type II collagen-hyaluronan hydrogel – a step towards a scaffold for intervertebral disc tissue engineering // *European Cells and Materials.* – 2010. – V. 20. – P. 134–148.
18. *Чуйко А.А., Горлов Ю.И.* Химия поверхности кремнезёма: строение поверхности, активные центры, механизмы сорбции. – Киев: Наукова думка, 1992. – 248 с.
19. *Чукин Г.Д.* Строение оксида алюминия и катализаторов гидрообессеривания. Механизмы реакций. – Москва: ООО “Принта”, 2010. – 288 с.
20. *Баграташвили Н.В., Игнатьева Н.Ю., Лунин В.В., Свиридов А.П., Харламов А.Н.* Исследование системы хондроитин-сульфат–вода методом ИК-фурье-спектроскопии // *Вестн. Моск. ун-та, сер. 2. Химия.* – 2001. – Т. 42, № 6. – С. 373–375.

Поступила 25.02.2013, принята 13.09.2013