

## МЕДИКО-БІОЛОГІЧНІ ПРОБЛЕМИ ПОВЕРХНІ

УДК 541.183.6 : 547.962.3

### **СТАБІЛЬНІСТЬ СУСПЕНЗІЙ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ У ПРИСУТНОСТІ БІЛКІВ**

**І.В. Михайлова**

*Інститут хімії поверхні Національної академії наук України  
вул. Ген. Наумова 17, 03680 Київ-164  
e-mail: minna\_@mail.ru*

*Досліджено закономірності коагуляції суспензій високодисперсного кремнезему в присутності яєчного альбуміну, бичачого сироваткового альбуміну, гемоглобіну людини і желатини. Встановлено, що величина адсорбції не є єдиним фактором, що обумовлює швидкість коагуляції суспензій. Конформаційні зміни адсорбованих молекул, очевидно, вносять свій внесок у механізм коагуляції, особливо при невисоких рН.*

*The regularities of coagulation of high disperse silica suspensions in the presence of ovalbumin, bovine serum albumin, human hemoglobin and gelatin have been studied. It is shown that an adsorption value is not the only factor determining a rate of the suspension coagulation. The conformational changes of adsorbed molecules apparently make a contribution to the coagulation mechanism, especially at low pH.*

#### **Вступ**

Колоїдно-хімічні властивості багатокомпонентних систем на основі високодисперсного кремнезему активно досліджуються [1-3]. Інтерес до природи взаємодії макромолекул з поверхнею кремнезему обумовлений низкою обставин. Механізм адсорбції поліелектролітів, включаючи білки, на межі розділу рідина-тверда поверхня - одне з найбільш складних питань у теорії адсорбції з розчинів. Одержані дані широко використовуються в біомедицині, фармацевтичній технології й інших галузях. Предметом дослідження низки праць [4-7] є механізм адсорбції білків на дисперсних оксидах кремнію, заліза, алюмінію; питання агрегативної стійкості систем дисперсна фаза-білок при цьому не зачіпаються.

З огляду на інтерес до розробки лікарських суспензій на основі високодисперсного кремнезему, важливим є одержання інформації про властивості таких суспензій при контакті з біомолекулами, що містяться в розчині, зокрема білками. Метою роботи є дослідження закономірностей коагуляції суспензій високодисперсного кремнезему в присутності ряду водорозчинних білків.

#### **Матеріали і методи**

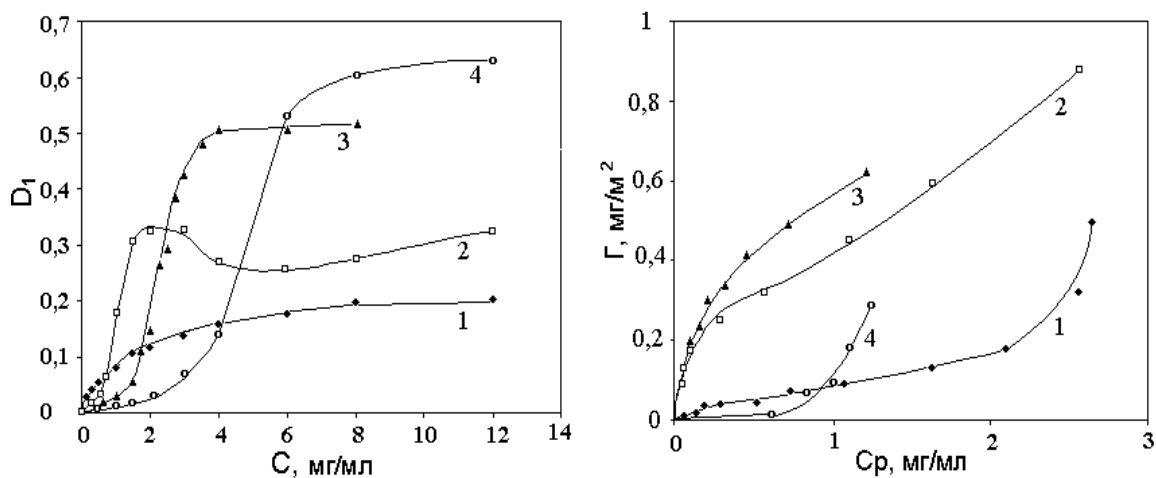
Використовували водну дисперсію SiO<sub>2</sub> з концентрацією дисперсної фази 3,6% [8]. Середній діаметр стабільних агрегатів частинок не перевищує 100 нм. Агрегативні процеси в суспензії кремнезему досліджували в присутності яєчного альбуміну, бичачого сироваткового альбуміну, отриманого двома методами - висолюванням (БСА-1) і спиртовим осадженням (БСА-2), гемоглобіну людини і желатини в широкому діапазоні

концентрацій білків при різних рН. Швидкість коагуляції визначали за приростом оптичної густини суспензії ( $\Delta D_1$ ) за хвилину після введення білка відносно оптичної густини вихідної суспензії при 540 нм, відповідно до загальноприйнятої методики [8]. Визначення концентрації білків у рівноважному розчині проводили фотоколориметричним методом з біуретовим реактивом або мікрометодом з реактивом Бенедикта [9]. Величину адсорбції розраховували як результат поділу різниці вихідної і рівноважної концентрацій на масу дисперсної фази. За результатами вимірів будували ізотерми адсорбції.

## Результати і їхнє обговорення

На рис. 1 і 2 представлені залежності швидкості коагуляції  $\Delta D_1$  від концентрації білків при різних рН, а також ізотерми адсорбції білків. Як видно з представлених результатів, швидкість коагуляції при різних рН із зростанням концентрації білка збільшується. Виняток складає рН 2: криві коагуляції проходять через максимум (крім яєчного альбуміну). Для всіх зазначених білків при малих концентраціях швидкість коагуляції при рН 2 і 3,5 вища, ніж при більш високих значеннях рН.

У присутності яєчного альбуміну, ( $pH_{\text{ІЕТ}} 4,6$ ) при малих концентраціях його в розчині (до 0,7 мг/мл) суспензія найменш стабільна при рН 2 (рис. 1), коли поверхня кремнезему незаряджена. Крім флокулюючої дії білка, коагуляція при цьому може бути пов'язана також з незначним зарядом частинок кремнезему, ізоелектрична точка якого відповідає рН 2. Далі з ростом концентрації білка до 6 мг/мл, швидкість коагуляції досягає сталої величини, тому що подальша адсорбція позитивно зарядженого білка ( $pH < 4,6$ ) на незарядженій поверхні є електростатично обмеженою.



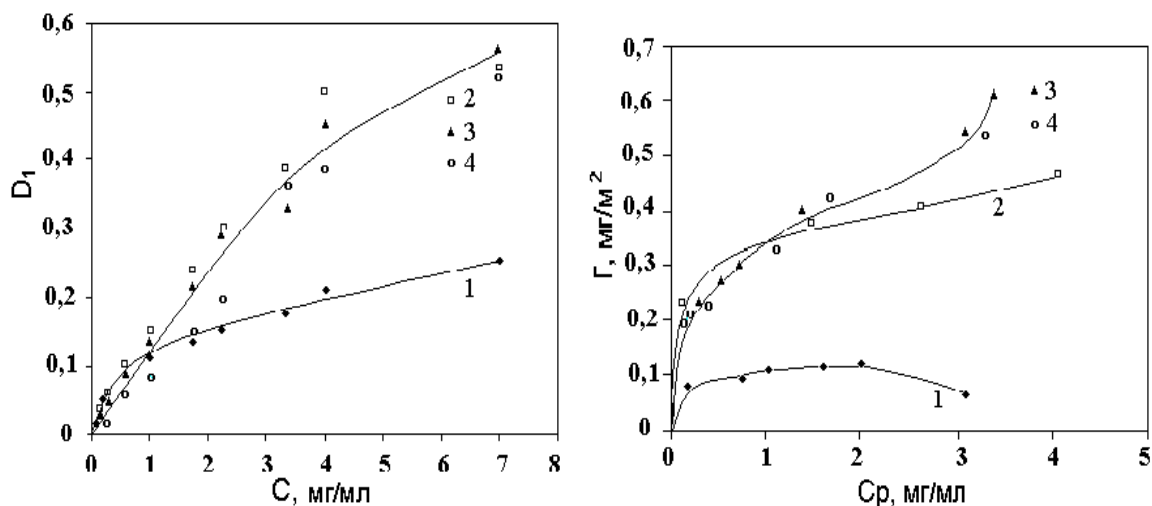
**Рис. 1.** Залежність швидкості коагуляції суспензії  $\Delta D_1$  від концентрації яєчного альбуміну: 1 - рН 2; 2 - рН 3,5; 3 - рН 4,6; 4 - рН 6,5.

**Рис. 2.** Ізотерми адсорбції яєчного альбуміну: 1 - рН 2; 2 - рН 3,5; 3 - рН 4,6; 4 - рН 6,5.

При рН 3,5 і невисоких концентраціях білка в розчині (від 0,7 до 2,6 мг/мл) швидкість коагуляції суспензії максимальна. У цьому випадку поверхня і білок заряджені протилежно, що забезпечує більш високу величину адсорбції (рис. 2). При рН 4,6 швидкість коагуляції з ростом концентрації яєчного альбуміну наростає повільніше, через більш слабку взаємодію з поверхнею. Крім того, білок у ізоелектричній точці адсорбується нерозгорнутими глобулами, що при малих заповненнях поверхні забезпечує відносно невисоку швидкість коагуляції (рис. 1).

При рН 6,5 суспензія через зростання негативного заряду поверхні найбільш стабільна при малих концентраціях білка і втрачає стабільність при концентраціях, більших за 4 мг/мл (відповідає рівноважній концентрації 1,25 мг/мл, рис. 2), коли, можливо, заряд поверхні вже нейтралізований, і спостерігається різке збільшення адсорбції. Отже, взаємодія яєчного альбуміну з поверхнею кремнезему обумовлена електростатичним фактором.

Переважно електростатична природа взаємодії яєчного альбуміну з кремнеземом підтверджується даними з коагуляції в присутності електроліту (0,9% NaCl): для всіх значень рН, крім рН 2, криві швидкості коагуляції і ізотерми адсорбції практично збігаються (рис. 3, 4).

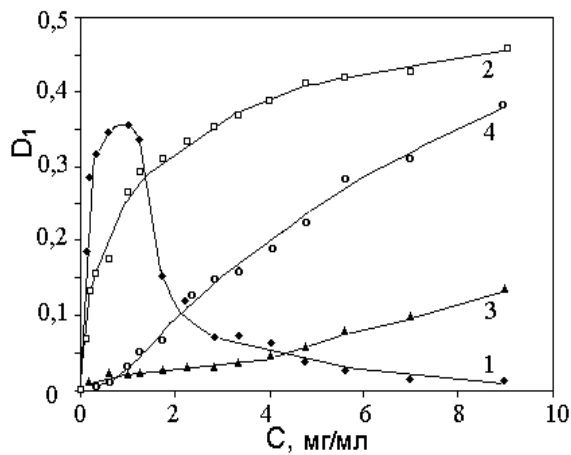


**Рис. 3.** Залежність швидкості коагуляції суспензії  $\Delta D_1$  від концентрації яєчного альбуміну у присутності 0,15 М NaCl: 1 - рН 2; 2 – рН 3,5; 3 – рН 4,6; 4 - рН 6,5.

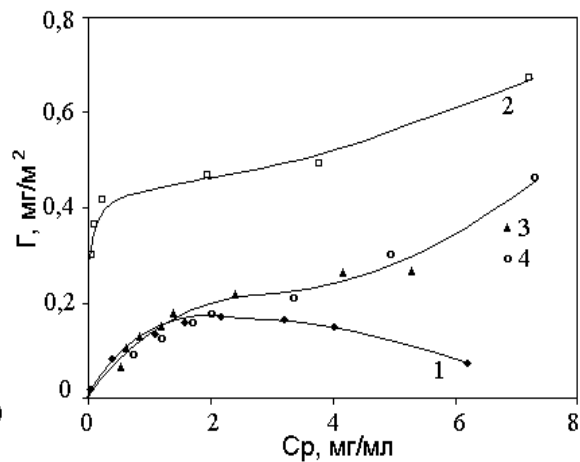
**Рис. 4.** Ізотерми адсорбції яєчного альбуміну у присутності 0,15 М NaCl: 1 - рН 2; 2 - рН 3,5; 3 – рН 4,6; 4 - рН 6,5.

Для БСА-1 ( $pH_{\text{ІЕТ}}$  4,8), суспензія найменш стабільна також при невисоких значеннях рН (2 і 3,5) і невеликій концентрації білка в розчині (рис. 5). Однак, на відміну від яєчного альбуміну при рН 6,5, швидкість коагуляції з концентрацією зростає помітно швидше, ніж при рН 4,8, тоді як ізотерми адсорбції БСА-1 при цих значеннях рН практично збігаються (рис. 6). Це узгоджується з даними [10] про те, що БСА адсорбується на гідрофільних поверхнях навіть при високих рН, коли і білок, і поверхня заряджені негативно, тому що рушійною силою адсорбції в цьому випадку є зменшення упорядкованості структури білка. Висока швидкість коагуляції при рН 6,5 у порівнянні з  $pH_{\text{ІЕТ}}$  може свідчити про те, що негативно заряджений БСА-1 при рН 6,5 адсорбується в розгорнутому стані. При цьому приріст швидкості коагуляції відносно  $pH_{\text{ІЕТ}}$  при рН 6,5 трохи менший, ніж при рН 3,5. Відомо, що при віддаленні від  $pH_{\text{ІЕТ}}$  через відштовхування однойменно заряджених залишків амінокислот молекули білка здобувають розгорнуту конформацію, відповідно, розміри молекули збільшуються [11]. При цьому швидкість адсорбції розгорнутого білка зменшується у більшому ступені при високих значеннях рН [6, 7], отже, збільшення швидкості коагуляції за рахунок розгорнення білка при високих рН відбувається в меншому ступені. Крім того, порівняння величини адсорбції при рН 4,8 і 6,5 може означати, що взаємодія БСА-1 з поверхнею має менш виражений

електростатичний характер, ніж у випадку яєчного альбуміну. Така поведінка БСА, а саме висока конформаційна мінливість його молекул, дозволяє визначити його як більш "м'який" білок, ніж яєчний альбумін.

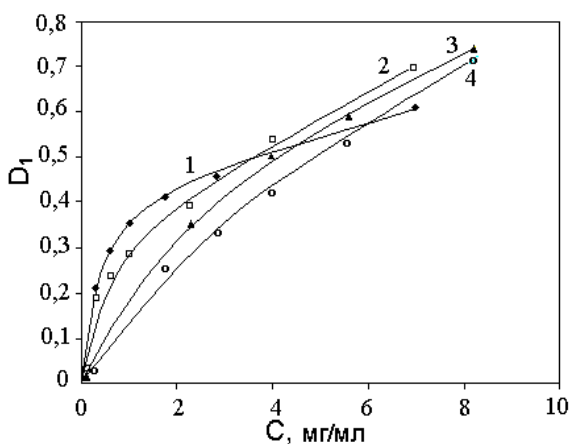


**Рис. 5.** Залежність швидкості коагуляції суспензії  $\Delta D_1$  від концентрації БСА-1: 1 - рН 2; 2 - рН 3,5; 3 - рН 4,8; 4 - рН 6,5.

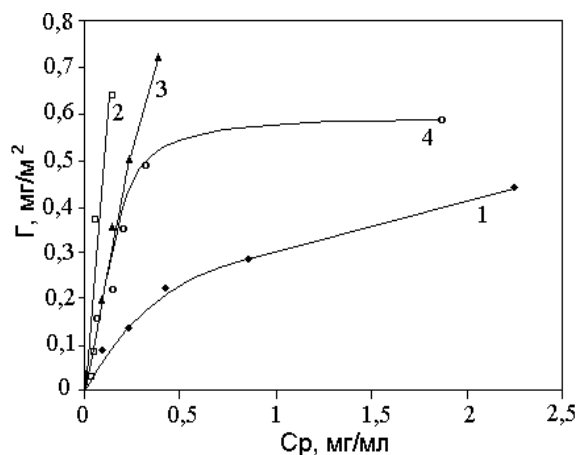


**Рис. 6.** Ізотерми адсорбції БСА-1: 1 - рН 2; 2 - рН 3,5; 3 - рН 4,8; 4 - рН 6,5.

S-подібний вигляд ізотерм адсорбції, що спостерігався нами в деяких випадках, автори роботи [6] пояснюють упорядкуванням білка на поверхні в результаті взаємодії віддалених від поверхні сегментів із вже адсорбованими, в результаті чого величина адсорбції зростає, а конформація молекул стає близькою до нативної. Інші автори [5] з'єднують ізотерми адсорбції пов'язують із самоасоціацією білка, вважаючи, що самоасоціація діє як ефект збільшення молекулярної маси білка. Крім того, перегини на ізотермі можуть відповідати за переорієнтацію адсорбованих молекул з горизонтального положення у вертикальне [12]. Відокремити ці ефекти одне від одного важко [5], однак, наявність їх підтверджується S-подібним характером ізотерм адсорбції.



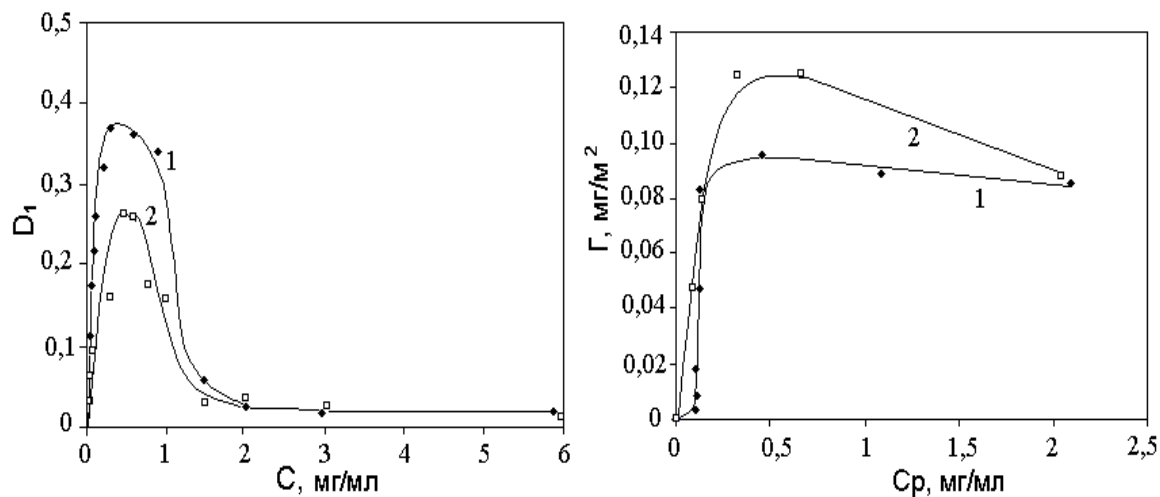
**Рис. 7.** Залежність швидкості коагуляції суспензії  $\Delta D_1$  від концентрації БСА-1 у присутності 0,15 М NaCl: 1 - рН 2; 2 - рН 3,5; 3 - рН 4,8; 4 - рН 6,5.



**Рис. 8.** Ізотерми адсорбції БСА-1 у присутності 0,15 М NaCl: 1 - рН 2; 2 - рН 3,5; 3 - рН 4,8; 4 - рН 6,5.

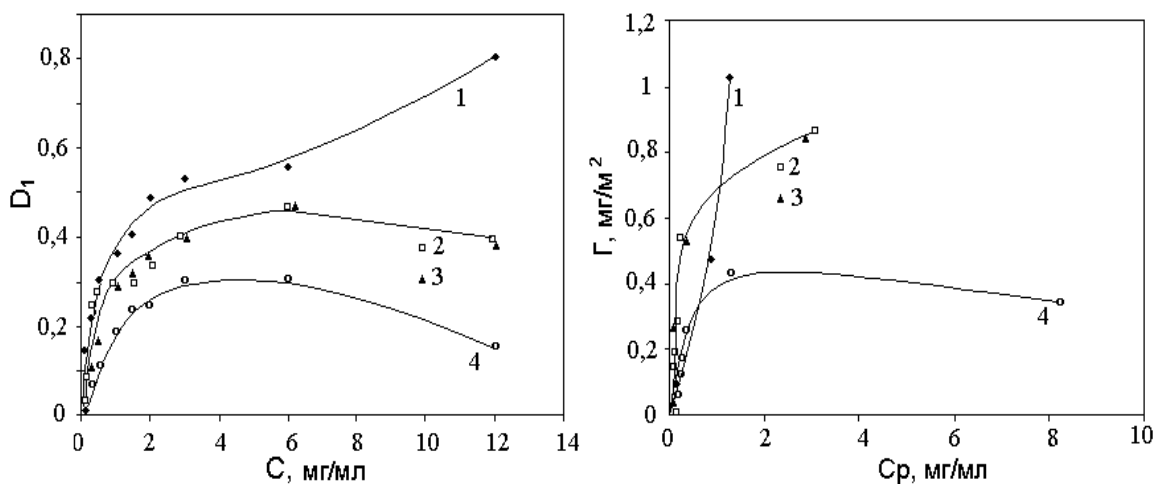
У присутності електроліту (рис. 7, 8) швидкість коагуляції трохи зменшується з ростом рН, що підтверджує менш виражений електростатичний характер взаємодії БСА-1 з поверхнею кремнезему в порівнянні з яєчним альбуміном.

Помітно іншою виявилася картина коагуляції для БСА-2, отриманого методом спиртового осадження. При низьких рН (2 і 3,5) суспензія також найменш стабільна, причому швидкість коагуляції проходить через максимум, і при концентрації, більшій за 1 мг/мл, суспензія стабілізується (рис. 9, 10). При рН 4,8 і 6,5 суспензія в присутності БСА-2 не коагулює: білок не адсорбується на негативно зарядженій поверхні, коли він незаряджений чи заряджений негативно.



**Рис. 9.** Залежність швидкості коагуляції суспензії  $\Delta D_1$  від концентрації БСА-2: 1 - рН 2; 2 – рН 3,5.

**Рис. 10.** Ізотерми адсорбції БСА-2: 1 - рН 2; 2 – рН 3,5.

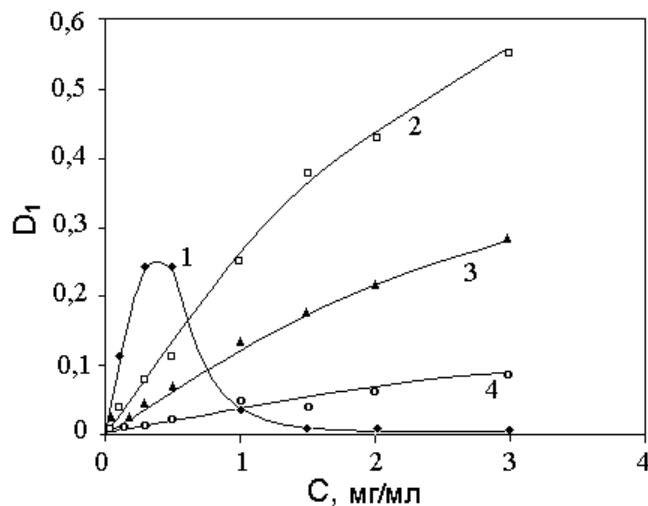


**Рис. 11.** Залежність швидкості коагуляції суспензії  $\Delta D_1$  від концентрації БСА-2 у присутності 0,15 М NaCl: 1 - рН 2; 2 – рН 3,5; 3 – рН 4,8; 4 - рН 6,5.

**Рис. 12.** Ізотерми адсорбції БСА-2 у присутності 0,15 М NaCl: 1 - рН 2; 2 – рН 3,5; 3 - рН 4,8; 4 - рН 6,5.

У присутності електроліту при рН 4,8 і 6,5 суспензія починає коагулювати, при цьому швидкість коагуляції досить висока (рис. 11) і відповідає величині адсорбції (рис. 12). Як видно з рисунка, для БСА-2 залежність швидкості коагуляції від рН у присутності електроліту виражена більш помітно, ніж для БСА-1 (рис. 7), що вказує на ще менш виражений електростатичний характер взаємодії БСА-2 з поверхнею кремнезему і дозволяє вважати його більш м'яким білком у порівнянні з БСА-1. Причини, що обумовлюють різну коагулюючу дію БСА-1 і БСА-2, виявити досить складно, тому що для "м'яких" білків важко відокремити ефекти, що мають відношення до структурної стабільності, від ефектів, що стосуються різних взаємодій [5]. Розходження в поведінці препаратів БСА-1 і БСА-2 можна пов'язати з особливостями їх структури, обумовленими різними методами їхнього виділення [13, 14].

Картина коагуляції суспензії кремнезему в присутності гемоглобіну є найбільш типовою: швидкість коагуляції суспензій зменшується з ростом рН (рис. 13), крім рН 2 (швидкість коагуляції проходить через максимум), що відповідає зростанню стабільності суспензій по мірі зростання рН і вказує на переважно електростатичний характер взаємодії гемоглобіну з кремнеземом.

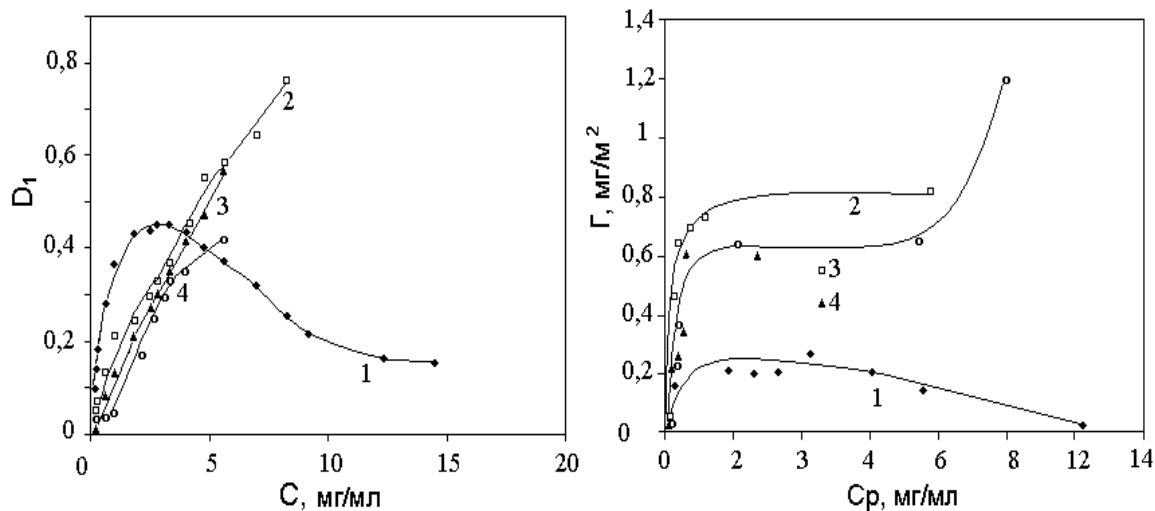


**Рис. 13.** Залежність швидкості коагуляції суспензії  $\Delta D_1$  від концентрації гемоглобіну: 1 - рН 2; 2 - рН 3,5; 3 - рН 6,8; 4 - рН 9,0.

Для желатини ( $pH_{\text{ІЕТ}} 4,8$ ) швидкість коагуляції суспензії з ростом концентрації білка в розчині монотонно зростає, також крім рН 2 (рис. 14). Желатина є продуктом гідролізу колагена і не має нативної конформації як такої, тому її адсорбційна і коагулююча дія не виявляє помітної залежності від рН. З іншого боку, відомо [15], що адсорбція желатини відбувається головним чином за рахунок утворення водневих зв'язків з активними групами поверхні, і із зростанням рН число таких зв'язків зменшується. Як видно з рис. 14 і 15 при рН 3,5, 4,8 і 6,5 як величина адсорбції, так і швидкість коагуляції трохи зменшуються з ростом рН. Як і для інших розглянутих білків, при малих концентраціях желатини в розчині (до 3 мг/мл) суспензія найменш стабільна при рН 2. При цьому величина адсорбції в кілька разів менша, ніж при всіх інших обраних значеннях рН (рис. 15), що також спостерігається для БСА-1.

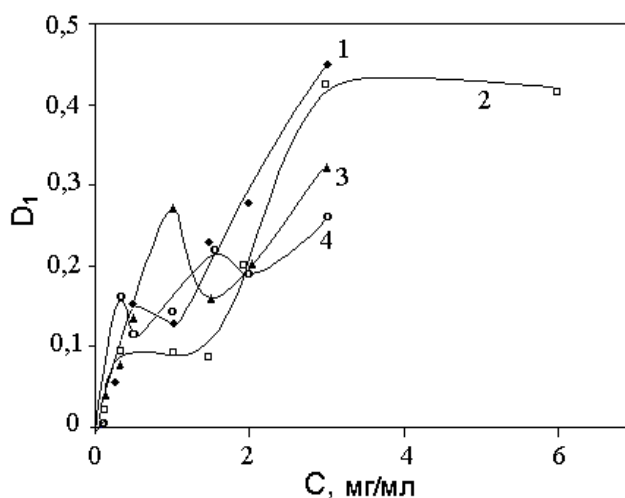
У присутності електроліту в інтервалі концентрацій желатини до 2 мг/мл при всіх рН спостерігаються ділянки часткової стабілізації суспензій (рис. 16). Можливо, що утворені спочатку містки між частинками розриваються при збільшенні вмісту білка в

розчині і більш рівномірному його розподілі на поверхні, після чого швидкість коагуляції знову зростає.



**Рис. 14.** Залежність швидкості коагуляції суспензії  $\Delta D_1$  від концентрації желатини: 1 - рН 2; 2 – рН 3,5; 3 – рН 4,8; 4 - рН 6,5.

**Рис. 15.** Ізотерми адсорбції желатини: 1 - рН 2; 2 – рН 3,5; 3 – рН 4,8; 4 - рН 6,5.



**Рис. 16.** Залежність швидкості коагуляції суспензії  $\Delta D_1$  від концентрації желатини у присутності 0,15 М NaCl: 1 - рН 2; 2 – рН 3,5; 3 – рН 4,8; 4 - рН 6,5.

Таким чином, незважаючи на розходження в коагулюючій дії розглянутих білків, картина коагуляції суспензій високодисперсного кремнезему в присутності білків у цілому описується в рамках електростатичного механізму і відображує збільшення агрегативної стійкості суспензій із зростанням рН. Так, при рН 2, коли частинки кремнезему не заряджені чи заряджені слабо, достатньо невеликих кількостей білка, щоб викликати коагуляцію суспензії. При більш високих значеннях рН для нейтралізації заряду часточок і коагуляції потрібна більша кількість білка. Для “м’яких” білків швидкість коагуляції може визначатися не лише величиною адсорбції, але й конформаційним станом адсорбованого білка.

## Література

1. Gun'ko V.M., Turov V.V., Zarko V.I., Dudnik V.V., Tischenko V.A., Voronin E.F., Kazakova O.A., Silchenko S.S., and Chuiko A.A. Features of aqueous suspensions of fumed silica and interaction with proteins// *J. Colloid Interface Sci.* - 1997. - V.192. - P.166-178.
2. Gun'ko V.M., Vlasova N.N., Golovkova L.P., Stukalina N.G., Gerashchenko I.I., Zarko V.I., Tischenko V.A., Goncharuk E.V., and Chuiko A.A. Interaction of proteins and substituted aromatic drugs with highly disperse oxides in aqueous suspensions// *Colloids and Surfaces. A.* - 2000. - V.167, N3. - P.229-243.
3. Воронін Є.П., Пахлов Є.М., Власова Н.М., Сільченко С.С., Головкова Л.П., Чуйко О.О. Дослідження стабільності адсорбційних властивостей водних суспензій високодисперсного кремнезему по відношенню до альбуміну// *Фарм. журнал.* - 1999. - №4. - С.61-64.
4. Malmsten M. Ellipsometry studies of protein layers adsorbed at hydrophobic surfaces// *J. Colloid Interface Sci.* - 1994. - V.166. - P.333-342.
5. Malmsten M. Feature article. Formation of adsorbed protein layers// *J. Colloid Interface Sci.* - 1998. - V.207. - P.186-199.
6. Sarkar D. and Chatteraj D.K. Activation parameters for kinetics of protein adsorption at silica-water interface// *J. Colloid Interface Sci.* - 1993. - V.157. - P.219-226.
7. Kondo A. and Fukuda H. Effect of adsorption conditions on kinetics of protein adsorption and conformational changes at ultrafine silica particles// *J. Colloid Interface Sci.* - 1998. - V.198. - P.34-41.
8. Михайлова И.В., Геращенко И.И. Стабильность и адсорбционные свойства суспензий высокодисперсного кремнезема в присутствии катионных ПАВ// *Коллоид. журн.* - 2002. - Т.64, №5. - С.645-650.
9. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник/ Под ред. В.В. Меншикова - М.: Медицина. - 1987. - 368 с.
10. Giacomelli C.E. and Norde W. The adsorption-desorption cycle. Reversibility of the BSA-silica system// *J. Colloid Interface Sci.* - 2001. - V.233. - P.234-240.
11. Луйк А.И., Набока Ю.Н., Могилевич С.М., Гуца Т.О., Мищенко Н.И. Влияние изменений рН и фармакологических модуляторов аденилатциклазной системы на конформацию сывороточного альбумина человека// *Биополимеры и клетка.* - 1999. - Т.15, №1. - С.18-22.
12. Norde W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface// *Adv. Colloid Interface Sci.* - 1986. - V.25. - P.267-340.
13. Соркина Д.А. Гетерогенность сывороточного альбумина// *Вопр. мед. химии.* - 1991. - Т.37, №2. - С.14-17.
14. Геращенко И.И., Штатко Е.И., Богомаз В.И. Изучение обратимости процесса адсорбции белка на дисперсном кремнеземе// *Коллоид. журн.* - 1992. - Т.54. - С.226-229.
15. Айлер Р. Химия кремнезема. Т. 1, 2. - М.: Мир. - 1982. - 1127 с.