

ИЗУЧЕНИЕ ПРИРОДЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОКРЕМНЕЗЕМА НА КЛЕТОЧНЫЕ ОБЪЕКТЫ

Т.В. Крупская, В.Н. Барвинченко, В.В. Туров

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова 17, 03164 Киев-164*

Проведено закрепление левомицетина на поверхности кремнезема методом импрегнации из спиртовых растворов. Методами ^1H ЯМР, ИК-, УФ-спектроскопии изучено молекулярные взаимодействия в системе левомицетин/вода/кремнезем. Показана зависимость строения слоев межфазной воды и их термодинамических характеристик от поверхностной концентрации левомицетина. Определено влияние межфазной границы клетка/кремнезем на формирование слоев связанной воды при низкой гидратированности системы. Исследовано влияние полученного нанокompозита и исходных веществ на клеточные тест-системы. Показано, что оптимальной является концентрация антибиотика в нанокompозите 0,4 – 0,6 ммоль/г, при которой происходит максимальное угнетение развития патогенных микроорганизмов. В качестве модели внутриклеточного пространства дегидратированных клеток использовали микропористый со-полимер стиролдивинилбензола, на котором методом ^1H ЯМР спектроскопии проведено измерение состояния межфазной воды и изучено влияние на нее ряда органических растворителей (ДМСО, CHCl_3 , CH_4). Обнаружен эффект структурной и энергетической неоднородности воды в порах полимера.

Введение

Известно, что частицы нанокремнезема при взаимодействии с микроорганизмами имеют высокую биологическую активность, которая проявляется в ингибирующем или стимулирующем влиянии на процессы клеточного метаболизма [1 – 4]. Установлено также, что взаимодействие кремнезема с мембранами эритроцитов приводит к их лизису, в то время как при взаимодействии с фагоцитарными клетками кремнезем оказывает на них активирующее влияние [1]. Изучение влияния кремнезема на репродуктивные клетки [5, 6], гепатоциты [7] и некоторые другие типы клеток показало, что в широком диапазоне концентраций кремнезема (0,02 – 0,1 % масс) он способен оказывать на клетки стимулирующее воздействие. Предполагается, что ингибирующее воздействие наночастиц может быть обусловлено двумя основными причинами – локальным изменением вязкости среды, а значит параметров диффузионных процессов, обеспечивающих клеточный метаболизм, и необратимыми адсорбционными взаимодействиями наночастиц с мембранными белками, которые входят в состав клеточных рецепторов [6]. Механизм стимулирующего влияния наночастиц на клетки микроорганизмов более сложен и недостаточно изучен. В частности, наночастицы могут адсорбировать широкий спектр токсических веществ со средней и высокой молекулярной массой. Кроме того, в работах последних лет [8 – 12] показано, что на границе нанокремнезема с гидрофобной средой могут формироваться слабоассоциированные формы воды, которая по сравнению с объемной водой одинаково проницаема как для полярных, так и неполярных органических молекул. Тем самым на межфазной границе клетка – частица создаются условия для ускорения процессов массопереноса. Имеются также сведения, что нанокремнеземы способны при определенных условиях повышать биологическую

активность ряда лекарственных препаратов [1, 6, 13, 14], что также может быть связано с уникальными свойствами межфазной воды [8, 9, 15 – 17].

Целью настоящей работы было изучение свойств и механизма биологической активности нанокompозита, созданного на основе нанокремнезема и модельного антибактериального препарата – левомицетина, а также проведение исследований структуры воды в зоне контакта клетка – частица и в ограниченном пространстве мезопористого полимерного материала, имитирующего внутриклеточное пространство.

Экспериментальная часть

Левомецетин был выбран в качестве антибактериального агента, так как он обладает широким спектром действия – эффективен в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий. Механизм высокой антимикробной активности левомицетина связан с нарушением синтеза белков в микроорганизмах [18, 19]. В присутствии левомицетина в клетках бактерий накапливается аминоацил-sPHK (антибиотик взаимодействует только с бактериальными рибосомами – 70S-субединицами). Эти данные указывают на то, что антибиотик блокирует одну из последующих реакций биосинтеза белка и замедляет включение в белки аминокислот. Необходимо отметить, что дезинтоксикационный эффект левомицетина связан только с его антибактериальным действием, а не с прямым действием на токсины [18]. Исследовалась субстанция левомицетина (D-(-)-трео-1-(p-нитрофенил)-2-дихлорацетиламинопропан-1,3-диола) макопейной чистоты производства фирмы “Vaishali Pharmacentials” (Китай). Энтеросорбент силикс – синтетический аморфный высокодисперсный кремнезем (аэросил марки А-300 с удельной поверхностью 300 м²/г производства Калушского экспериментального завода Института химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины). В качестве органических добавок, влияющих на структуру водных ассоциатов использовались органические растворители диметилсульфоксид (ДМСО), СНCl₃, химической квалификации «для ЯМР спектроскопии» и коммерчески доступный СН₄ с чистотой 99 %.

Адсорбционное закрепление левомицетина на поверхности высокодисперсного кремнезема проводили методом импрегнирования из спиртовых растворов. Для этого навеску левомицетина растворяли в 100 мл 96 %-го этилового спирта. Затем к 5 г ВДК прибавляли спиртовые растворы левомицетина и тщательно перемешивали, после чего выдерживали при комнатной температуре на протяжении 24 ч, потом удаляли спирт медленным нагреванием (333 К, 3 ч). В результате было получено 6 образцов нанокompозита левомицетин – кремнезем с содержанием органического вещества в диапазоне 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1 ммоль/г (образцы 1–6 соответственно). Для изучения высвобождения левомицетина в разные среды брали навеску образца 0,1 г с концентрацией антибиотика 1 ммоль/г, которую заливали 50 мл десорбирующего раствора (вода, физиологический раствор, раствор соляной кислоты с рН = 1,5; 96 %-ный этиловый спирт).

Биоактивность нанокompозита определяли путем биологического тестирования его влияния на развитие популяций микроорганизмов. При этом учитывалось, что взаимодействие между микроорганизмами и ВДК влияет на их развитие, изменяя скорость размножения, интенсивность прироста биомассы, размеры и морфологию клетки [2 – 4]. В качестве тестовых культур использовали хлебопекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, суспензии микроорганизмов кишечной палочки *Escherichia coli* (граммотрицательные, условно патогенные) и клетки золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* (грамположительные, патогенные). Для исследования гемолитических свойств полученного нанокompозита использовали суспензию эритроцитов, полученных из крови здоровых людей.

Для исследований структуры водных полиассоциатов в ограниченном пространстве был выбран коммерческий микропористый *co*-полимер стирол-дивинилбензола

(СДБ) LiChrolut (Merck), с удельной поверхностью $1512 \text{ м}^2/\text{г}$ и порами в диапазоне $R = 0,3...10 \text{ нм}$ с максимумом вблизи 1 нм [10]. Суммарный объем пор адсорбента составлял $0,818 \text{ см}^3/\text{г}$. Благодаря тому, что в состав молекулы полимера входит большое количество ароматических групп, его поверхность становится гидрофобной и содержит мало центров первичной адсорбции воды, с которой она взаимодействует преимущественно по дисперсионному механизму, аналогично тому, как это происходит в наноразмерных полостях, образованных внутренними структурными элементами клеток. В отличие от углеродных материалов форма пор в выбранном полимере ближе к цилиндрической [10].

Молекулярные взаимодействия в системе левомецетин/вода/кремнезем проводились путем комплексного спектроскопического исследования с применением методов ^1H ЯМР, ИК- и УФ -спектроскопии. Спектры электронного поглощения растворов и отражения твердых образцов кремнезема, импрегнированного левомецетином, измеряли на спектрофотометре Specord M-40 (Karl Zeiss, Германия). ИК-спектры высушенных при 333 К образцов кремнезема с адсорбционно закрепленным левомецетином регистрировали на однолучевом ИК Фурье спектрометре Thermo Nicolet Nexus FT-IR (Германия). Для этого приготовленные образцы смешивали со свежепрокаленным KBr при весовом соотношении компонент $1 : 5$. Спектры ^1H ЯМР снимали на ЯМР спектрометре высокого разрешения Bruker WP-100 SY (Германия) с рабочей частотой 100 МГц и максимальной полосой пропускания 50 кГц . Температура в датчике регулировалась термоприставкой Bruker VT-1000 с точностью $\pm 1 \text{ К}$. Интенсивность сигналов определяли с помощью электронного интегратора, точность которого составляла $\pm 10 \%$ при соотношении интенсивностей измеряемых сигналов $1 : 10$. Для предотвращения переохлаждения суспензий измерения концентрации незамерзающей воды (C_{uw}) проводили при нагревании суспензий, предварительно охлажденных до температуры 210 К .

Одним из основных методов, которые позволяют определять структуру воды внутри пористых материалов, является метод ^1H ЯМР спектроскопии [8, 20]. В этом случае главным характеристическим параметром является величина химического сдвига протонов в молекулах адсорбированной воды. Химический сдвиг воды определяется прочностью и средним числом водородных связей, в которых участвует каждая молекула воды [21]. Для пористых твердых тел с гидрофобной поверхностью можно считать, что число водородных связей между молекулами воды значительно превосходит их число с активными центрами поверхности и все изменения химического сдвига воды в порах обусловлены изменением структуры самой воды. Именно к таким веществам относится СДБ.

Характеристики межфазных слоев воды измеряли при помощи метода послойного вымораживания объемной и адсорбированной воды [22 – 24]. Сигнал молекул воды во льду (как и сигналы протонов в твердых составляющих образца) не вносил существенного вклада в ^1H ЯМР спектры из-за особенности методики исследования и короткого ($\sim 10^{-6} \text{ с}$) времени поперечной релаксации протонов в твердом состоянии. Для измерения химического сдвига использовался внешний стандарт – дейтерохлороформ, который помещали в зазор между внешней (5 мм) и внутренней (4 мм) ампулами.

Условием замерзания воды на межфазной границе твердых тел является равенство свободной энергии Гиббса межфазной воды и льда. Поскольку свободная энергия межфазной воды понижена адсорбционными взаимодействиями ($\Delta G = G - G_0 < 0$, где G_0 – свободная энергия льда при 273 К), она замерзает при $T < 273 \text{ К}$. Изменение свободной энергии Гиббса и понижение температуры замерзания ($273 - T$) связаны линейным соотношением [25]. Тогда площадь под кривой зависимости $\Delta G(C_{\text{uw}})$ определяет межфазную энергию (γ_s) – суммарную величину понижения свободной энергии Гиббса межфазной воды, обусловленную наличием границы раздела фаз [16]. В отличие

от межфазных энергий на границе раздела фаз твердое тело/пар или твердое тело/пар/жидкость [23] величина γ_s определяет межфазную энергию на границе раздела фаз твердое тело/жидкость. По зависимостям $\Delta G(C_{uw})$ могут быть рассчитаны параметры слоев сильно- и слабосвязанной воды – толщина слоя каждого типа воды (C_{uw}^s и C_{uw}^w для сильно- и слабосвязанной воды соответственно) и максимальные величины понижения свободной энергии этих слоев (ΔG_s и ΔG_w) [8, 24 – 26]. При этом под слабосвязанной водой понимают ту часть незамерзающей воды, для которой $\Delta G < 0,5$ кДж/моль.

Результаты и их обсуждение

Взаимодействие адсорбированного на поверхности SiO_2 левомицетина с подложкой изучали по изменениям ИК-спектральных характеристик поверхностных ОН-групп ВДК при варьировании поверхностной концентрации антибиотика (C_{LV}) в пределах 0,1 – 1 ммоль/г (рис. 1, а).

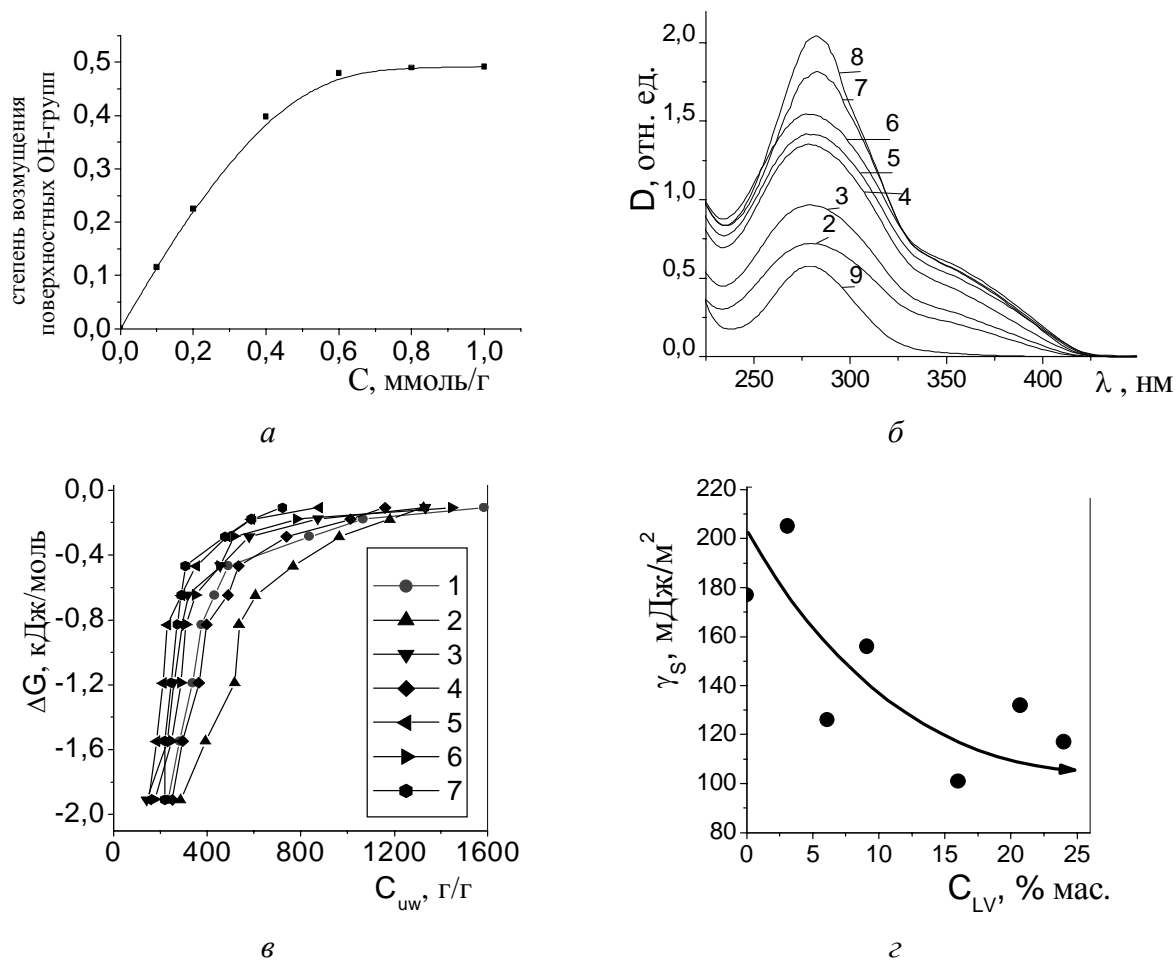


Рис. 1. Изменение степени возмущения поверхностных ОН-групп ВДК ($\nu = 3748 \text{ см}^{-1}$) в зависимости от количества левомицетина на поверхности SiO_2 (а); электронные спектры поглощения образцов левомицетина, адсорбированного на поверхности ВДК и чистого левомицетина: 2–7 – образцы 1–6, 8 – левомицетин, 9 – раствор левомицетина $C_{LV} = 1,25 \cdot 10^{-5}$ моль/л, (б); зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды: 1 – кремнезем (А-300); 2–7 – образцы 1–6 (в) и межфазной энергии от поверхностной концентрации левомицетина (г).

При увеличении концентрации антибиотика интенсивность полосы свободных гидроксильных групп ($\nu = 3748 \text{ см}^{-1}$) уменьшается, что обусловлено образованием водо-

родных связей между электронодонорными группами антибиотика и протонами гидроксильных групп кремнезема. Анализ УФ спектров поглощения водных и спиртовых (рис. 1, б) растворов антибиотика, а также спектров отражения порошков адсорбционно закрепленного и чистого левомицетина показывает, что максимум полосы совпадает с максимумом соответствующей полосы спектра молекулярной формы исходного левомицетина и его водного раствора. Это свидетельствует о сорбции левомицетина на поверхности ВДК в молекулярной форме [27, 28].

Состояние гидратной оболочки нанокompозита изучали по изменению интенсивности сигналов незамерзающей воды методом ^1H ЯМР спектроскопии. Спектры представляют собой одиночный сигнал, максимум которого имеет химический сдвиг 4,8 м.д., что совпадает с химическим сдвигом жидкой воды. С понижением температуры интенсивность сигнала уменьшается благодаря частичному замерзанию межфазной воды, а его ширина увеличивается, что обусловлено уменьшением молекулярной подвижности воды. Зависимости $\Delta G(C_{uw})$ и $\gamma_s(C_{LV})$ приведены на рис. 1, в, г. В соответствии с данными рис. 1, г межфазная энергия нанокompозита с ростом поверхностной концентрации модификатора уменьшается почти вдвое – от 200 до 110 мДж/м², что свидетельствует о существенном уменьшении гидрофильных свойств его поверхности.

Для определения гемолитической активности нанокompозитов по сравнению с исходным кремнеземом согласно методике [29] был проведен гемолиз эритроцитов как тест. По данным, представленным на рис. 2, для нанокompозитов наблюдается некоторое снижение гемолитической активности, пропорциональное поверхностной концентрации модификатора, что, возможно, связано с экранированием поверхности молекулами модификатора [27, 28] и уменьшением вероятности адсорбции мембранных белков на кремнеземной поверхности.

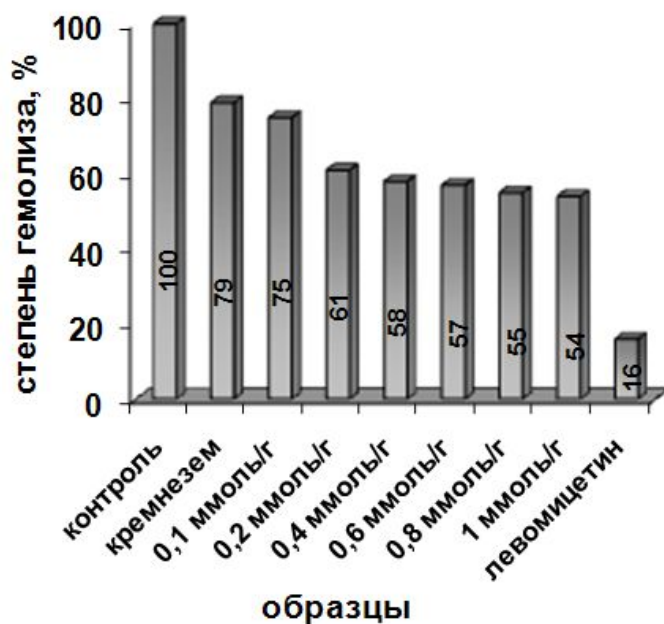


Рис. 2. Зависимость степени гемолиза эритроцитов от концентрации левомицетина, импрегнированного на поверхности кремнезема и исходных веществ.

На рис. 3 приведены результаты исследования влияния левомицетина на прирост биомассы в тест-культурах (*E.coli* и *St.aureus*), которых следует, что при внесении в питательную среду чистого антибиотика в концентрации, отвечающей количеству импрегнированного левомицетина, происходит уменьшение биомассы клеток *E.coli* в 4 раза, а импрегнированного на кремнеземе антибиотика – больше чем в 15 раз. Это свидетельствует о значительном увеличении антимикробной активности нанокompозита

по сравнению с чистым антибиотиком. Аналогичные измерения проводились для *St.aureus*. Полученные результаты показывают, что оптимальной является концентрация левомицетина в нанокompозите в диапазоне 0,4 – 0,6 ммоль/г, при которой происходит максимальное угнетение развития микроорганизмов (рис. 3). Концентрация клеток, которые выжили, для этих образцов (5, 6) составляет 1 – 3 % от контроля (100 %). Дальнейшее увеличение концентрации левомицетина в нанокompозите нецелесообразно, поскольку оно не приводит к уменьшению биомассы клеток [30].

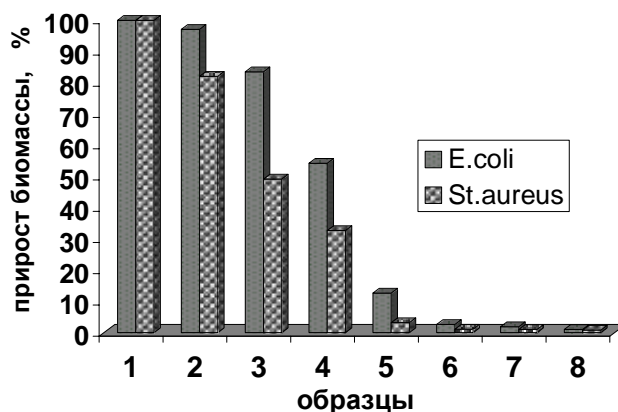


Рис. 3. Влияние импрегнированного левомицетина на прирост биомассы *E.coli* и *St.aureus*: 1 – контроль, 2 – кремнезем, 3 – 0,1, 4 – 0,2, 5 – 0,4, 6 – 0,6, 7 – 0,8, 8 – 1 ммоль/г импрегнированного левомицетина.

На рис. 4 показана динамика газовыделения (CO_2 , образующийся в результате брожения) для суспензии дрожжевых клеток в присутствии разных концентраций кремнезема, антибиотика и нанокompозита. Из рис. 4, б, в следует, что в присутствии ВДК процесс брожения дрожжей за единицу времени происходит более интенсивно (кривые 2 – 4), что свидетельствует о его стимулирующем влиянии на процессы жизнедеятельности клеточных суспензий, тогда как импрегнированный на поверхности кремнезема левомицетин значительно замедляет газовыделение (кривая 5), а чистый антибиотик его почти полностью блокирует (кривая 1). На начальной стадии брожения регистрировался активный процесс деления клеток (число клеток значительно увеличивалось), который происходил в условиях большого количества питательных веществ (глюкоза). Со временем растет количество продуктов метаболизма (этанол, углекислый газ) при одновременном уменьшении количества питательных веществ. Это приводит к замедлению процесса деления клеток и уменьшению газовыделения. Присутствие антибиотика значительно угнетает жизнедеятельность дрожжевых клеток и, соответственно, замедляет скорость образования углекислого газа. Введение в суспензию кремнезема на начальных стадиях брожения уменьшало количество выделенного CO_2 , однако со временем процесс брожения вновь активизировался и конечная масса образовавшегося газа в присутствии кремнезема была близка к той, которая наблюдалась в контрольном образце (рис. 4, а). Существенный рост газовыделения свидетельствует об активирующем влиянии кремнезема на процессы жизнедеятельности клеточных суспензий. Таким образом, было показано, что кремнезем в выбранном диапазоне концентраций твердой фазы (0,03 – 0,1 %) оказывает на суспензию *Sac.cerevisiae* скорее стимулирующее нежели угнетающее воздействие.

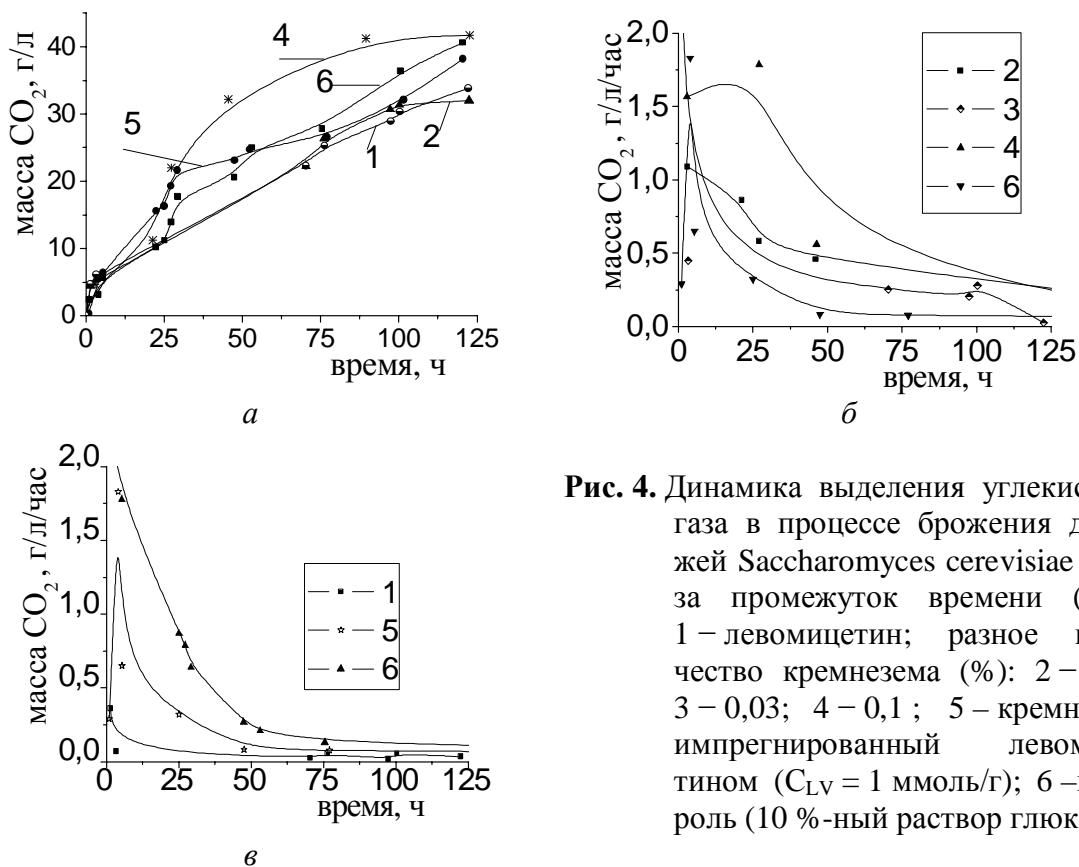


Рис. 4. Динамика выделения углекислого газа в процессе брожения дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (а) и за промежуток времени (б, в): 1 – левомицетин; разное количество кремнезема (%): 2 – 0,06; 3 – 0,03; 4 – 0,1; 5 – кремнезем, импрегнированный левомицетином ($C_{LV} = 1$ ммоль/г); 6 – контроль (10 %-ный раствор глюкозы)

Приведенный результат хорошо согласуется с данными, полученными другими исследователями, в соответствии с которыми существует широкий диапазон концентраций ВДК, в котором наночастицы кремнезема положительно влияют на процессы клеточного метаболизма [2 – 5]. Одним из факторов стимулирующего влияния кремнезема на клетки может быть локальное (на границе клетка – частица) ускорение диффузионных процессов, которые обеспечивают массоперенос между клеткой и внешней средой. Это ускорение может происходить благодаря формированию на границе межфазных слоев воды, проницаемость которых для веществ разной химической природы повышается в результате изменения структуры самой воды. Для проверки этого предположения нами исследовалась модельная система, представляющая собой частично дегидратированные суспензии дрожжевых клеток, высушенные без и в присутствии кремнезема, а также высушенная в аналогичных условиях суспензия чистого кремнезема. В этих экспериментах дегидратация необходима для увеличения в измеряемые ЯМР-спектральные характеристики воды, вклада от воды, непосредственно локализованной вблизи межфазных границ внутри клеток и в зоне контакта клетка – частица. Результаты измерений приведены на рис. 5. Измерения проводились в среде слабополярного органического растворителя дейтерохлороформа.

В соответствии с концепциями, изложенными в [31], по характеру взаимодействия между молекулами воды внутриклеточная или межфазная вода могут подразделяться на сильноассоциированную (каждая молекула берет участие более чем в одной водородной связи) и слабоассоциированную, а по изменению свободной энергии Гиббса (ΔG) – на сильносвязанную и слабосвязанную (величина $\Delta G < 0,5$ кДж/моль). Среднее координационное число воды определяется величиной химического сдвига ее протонов. Полагая в соответствии с [31], что протоны в неассоциированной воде имеют химический сдвиг в диапазоне 1 – 1,3 м.д., а тетракоординированной – 7 м.д. по экспери-

ментальному значению химического сдвига может быть оценено среднее число соседей, с которыми молекула воды образует водородно-связанные комплексы.

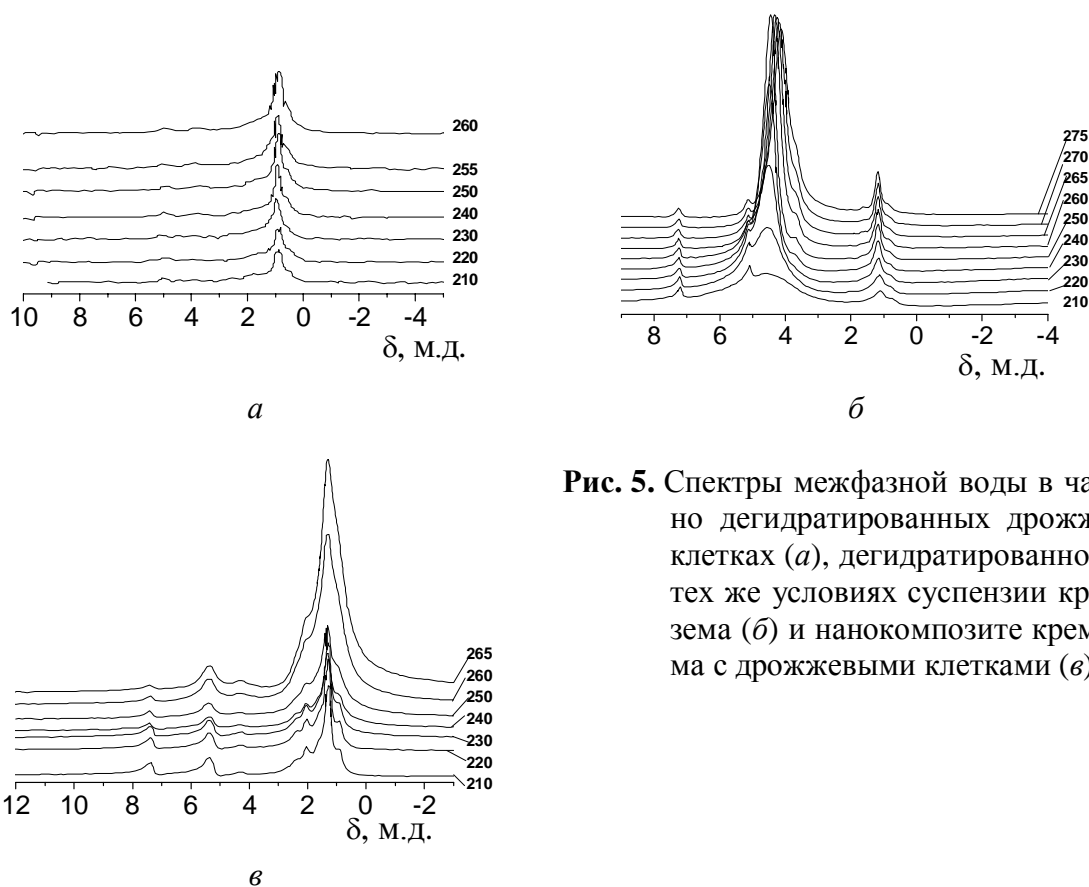


Рис. 5. Спектры межфазной воды в частично дегидратированных дрожжевых клетках (*а*), дегидратированной при тех же условиях суспензии кремнезема (*б*) и нанокompозите кремнезема с дрожжевыми клетками (*в*).

На рис. 5, *а* показаны температурные изменения ^1H ЯМР спектров воды в дрожжевых клетках, содержащих 17 % масс. остаточной воды. Вода проявляется в спектрах в виде сигнала с химическим сдвигом $\delta = 1,3$ м.д., что отвечает химическому сдвигу слабоассоциированной воды, практически не участвующей в образовании водородных связей [31]. Близкий химический сдвиг имеют и молекулы воды в дегидратированном до 20 % масс. остаточной воды композите клетка – кремнезем (рис. 5, *в*). В противоположность этому в порошке кремнезема, полученного в тех же условиях, что и композит, практически вся вода находится в сильноассоциированном состоянии (рис. 5, *б*). Следовательно, при включении кремнезема в клеточную суспензию значительная часть воды в зоне контакта частица – клетка из сильноассоциированного состояния, способна переходить в слабоассоциированное состояние, что может и определять его стимулирующую биологическую активность.

Поскольку внутриклеточное пространство в клетках (особенно частично дегидратированных) представляет собой совокупность заполненных водой наноразмерных пустот, ограниченных биополимерными стенками, методом ^1H ЯМР спектроскопии в условиях послойного вымораживания жидкой фазы, было исследовано влияние полимерных стенок на свойства водно-органических смесей в модельном нанопористом материале – *со*-полимере СДБ [10].

Спектр образца, смоченного водой (без формирования объемной фазы воды) представлен на рис. 6, *а*. В спектре регистрируются два сигнала с химическими сдвигами 4,5 и 5 м.д., следовательно, в порах СДБ вода находится в сильноассоциированном состоянии, аналогичном жидкой воде. Регистрация одновременно двух сигналов

сильноассоциированной связана с довольно широким распределением по радиусам пор (0,1 – 3 нм, см. [10]), в которых в зависимости от их размера возможно формирование полиассоциатов с разным средним числом молекул воды. Вероятно, сигнал в сильных магнитных полях обусловлен водой в порах относительно меньшего радиуса. Состояние воды несколько изменяется в случае частичного заполнения объема пор (на рис. 6, б заполнено примерно 25 % суммарного объема пор). При этом для адсорбированной воды наблюдается значительное увеличение химического сдвига с повышением температуры. При $T = 210\text{ К}$ величина δ достигает своего предельного значения (7 м.д.), характерного для льдоподобных структур [32], что свидетельствует о возможности существования высокой упорядоченности воды в порах СДБ. Следует отметить, что вода в порах СДБ является сильносвязанной, поскольку не замерзает во всем температурном интервале вплоть до 210 К [8], что отвечает понижению свободной энергии Гиббса (ΔG) воды в порах СДБ на 2 кДж/моль.

Введение в поры, кроме воды, полярных (ДМСО, рис. 6, в) или слабополярных (CHCl_3 , рис. 6, г) органических веществ в количестве, не превышающем свободный объем пор, слабо влияет на величину химического сдвига адсорбированной воды. Это дает основание считать, что водная и органическая фазы в порах существуют раздельно. Если для хлороформа, который слабо растворим в воде, это вполне естественно, то для неограниченно растворимого в воде ДМСО, можно было ожидать образование в порах СДБ гомогенного раствора, в котором химический сдвиг воды имеет промежуточное значение между химическим сдвигом воды растворенной в ДМСО ($\delta = 3$ м.д.) и жидкой водой ($\delta = 5$ м.д.). Ранее подобный эффект наблюдался нами для углеродных [11] и некоторых типов оксидных адсорбентов [12].

В случае, когда количество хлороформа, существенно превышает объем пор адсорбента, вода (оставаясь сильноассоциированной) переходит из сильносвязанного в слабосвязанное состояние (рис. 6, д) и замерзает вблизи 273 К. Это свидетельствует о том, что слабополярные молекулы хлороформа легко вытесняют воду из пор СДБ, заполняя весь объем пор. При этом в спектрах ^1H ЯМР, кроме сигнала сильноассоциированной воды ($\delta = 5$ м.д.), интенсивность которого быстро уменьшается с понижением температуры, наблюдается сигнал слабоассоциированной воды ($\delta = 1,3$ м.д.), интенсивность которого слабо зависит от температуры. Сложный вид спектра слабоассоциированной воды связан с разной величиной магнитной восприимчивости среды в порах разного диаметра [33].

При совместной адсорбции воды и метана спектр воды коренным образом меняется (рис. 6, е). Интенсивность сигнала сильноассоциированной воды уменьшается. Слабоассоциированная вода и метан имеют близкие химические сдвиги, что не позволяет точно рассчитать их количества, однако на основании приведенных спектров можно полагать, что количество сильноассоциированной воды составляет не более 25 % от первоначального. Адсорбция метана оказалась высокой – более 10 % масс.

Таким образом, в присутствии слабополярных молекул (хлороформа и метана) часть адсорбированной воды переходит в слабоассоциированное состояние, которое характеризуется химическим сдвигом 0 – 1,5 м.д., а при избытке хлороформа большая часть сильноассоциированной воды вытесняется из пор на внешнюю поверхность адсорбента. Сильный электронодонор ДМСО не только не разрушает структуру полиассоциатов межфазной воды, но и образует в порах такие ассоциаты, в которых химический сдвиг воды больше, чем химический сдвиг жидкой воды и приближается к химическому сдвигу тетракоординированной воды.

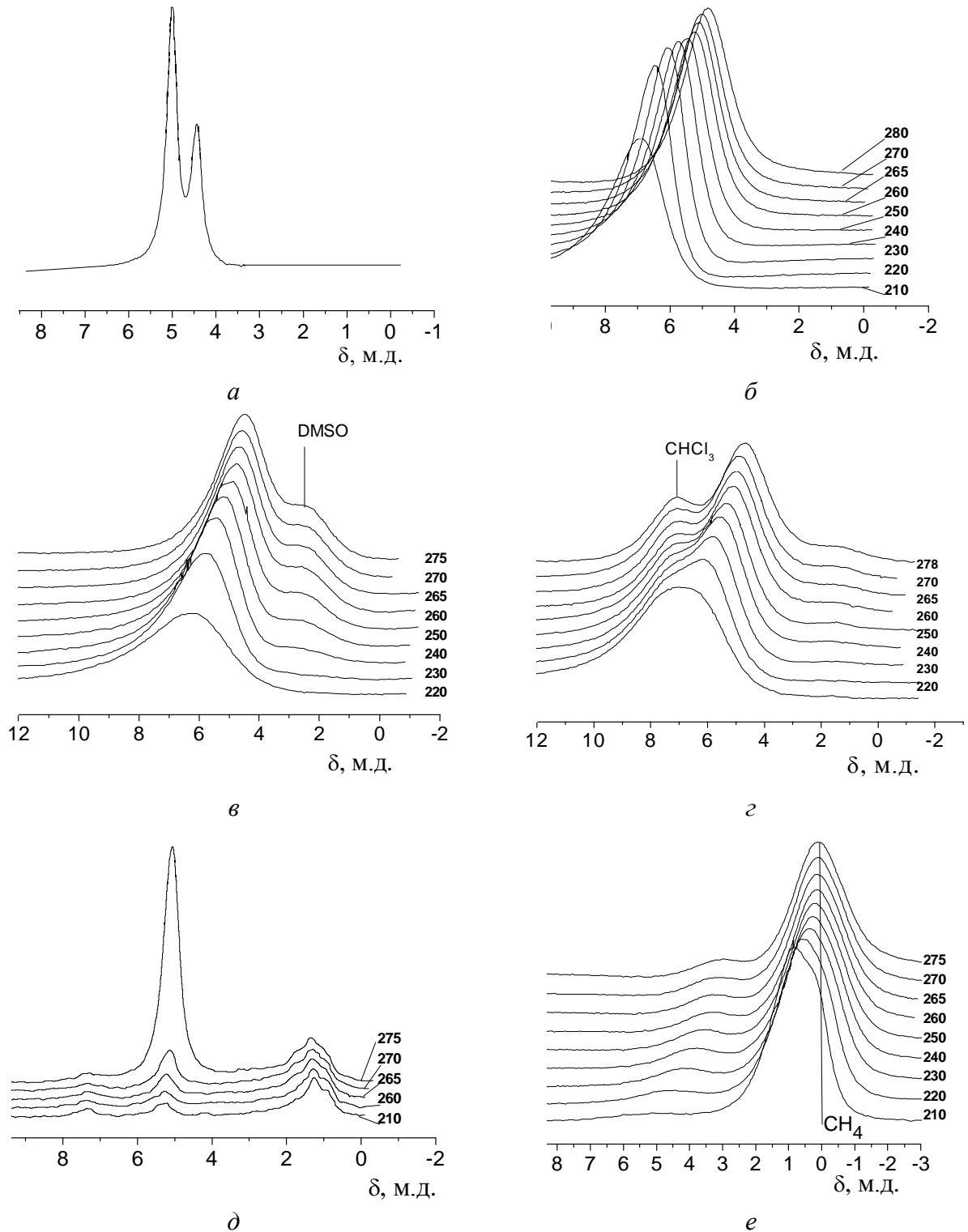


Рис. 6. Вода в порах со-полимера СДБ и влияние на нее органических растворителей:
a – в образце, смоченном водой; *б* – в порошке, содержащем 20 % масс. воды; *в* – 20 % масс. воды и 20 % масс. ДМСО- D_6 , из которых половина D_6 , а вторая половина H_6 ; *г* – 20 % масс. воды и 30 % масс. $CHCl_3$; *д* – в жидком $CDCl_3$; *е* – 15 % масс. воды и 10 % масс. CH_4 .

Выводы

Иммобилизация на поверхности нанокремнезема антибиотика – левомицетина может увеличивать его эффективность почти в четыре раза. Вероятно, основной причиной воздействия нанокремнезема на клеточные суспензии является формирование на границе клетка – частица слоя слабоассоциированной воды, которая активно участвует в процессах клеточного метаболизма. Модельные эксперименты показали, что большое количество слабоассоциированной воды присутствует в частично обезвоженных дрожжевых клетках и дрожжевых клетках, контактирующих с частицами нанокремнезема. Для полимерной системы, моделирующей внутриклеточное пространство или границы раздела фаз клетка – частица обнаружен эффект кластерообразования водно-органических систем в наноразмерном пространстве, образованном слабо гидрофильными стенками. При этом слабополярные вещества (хлороформ, метан) уменьшают взаимодействие воды с поверхностью и способствуют формированию кластерных структур, в которых вода находится в слабоассоциированном состоянии. Полярные вещества с водой могут образовывать кластеры разной стехиометрии, находящиеся в состоянии быстрого молекулярного обмена.

Литература

1. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А.А. Чуйко. – К.: Наук. думка, 2003. – 415 с.
2. Цимберг Е.А., Титова Л.В., Курдиш И.К. Влияние высокодисперсных материалов на рост дрожжей *Candida* // Микробиол. журн. – 1991. – Т. 53, № 4. – С. 55 – 58.
3. Курдиш И.К., Титова Л.В., Цимберг Е.А. Влияние аэросилов на рост *Azotobacter chroococcum* // Микробиол. журн. – 1993. – Т. 55, № 1. – С. 38 – 42.
4. Курдиш И.К., Цимберг Е.А., Бихтунов В.Л. Влияние дисперсных кремнеземов на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиол. журн. – 1991. – Т. 53, № 2. – С. 41 – 44.
5. Взаимодействие дисперсного кремнезема с поверхностью репродуктивной клетки и плазмой семенной жидкости быка / Н.П. Галаган, А.В. Исаров, В.И. Богомаз, А.А. Чуйко // Укр. биохим. журн. – 1988. – Т. 60, № 5. – С. 67 – 71.
6. Кремнеземы в медицине и биологии / Под ред. А.А. Чуйко. – Киев; Ставрополь, 1993. – 259 с.
7. Muraca M., Vilei M.T., Zanusso E. Encapsulation of hepatocytes by SiO_2 // *Transplant. Proc.* – 2000. – V. 32, № 8. – P. 2713 – 2714.
8. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, V.M. Bogatyrev, V.I. Zarko, R. Leboda, E.V. Goncharuk, A.A. Novza, A.V. Turov, A.A. Chuiko // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2005. – V. 118. – P. 125 – 172.
9. Weakly and strongly associated nonfreezable water bound in bones / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, V.I. Zarko, R. Leboda, M. Jablonski, M. Gorzelak, E. Jagiello-Wojtowicz // *Colloids and Surfaces.* – 2006. – V. 48. – P. 167 – 175.
10. Structural features of polymer adsorbent LiChrolut EN and interfacial behavior of water and water/organic mixtures / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, V.I. Zarko, Y.M. Nychiporuk, E.V. Goncharuk, E.M. Pakhlov, G.R. Yurchenko, T.V. Kulik, B.B. Palyanytsya, T.V. Borodavka, T.V. Krupskaya, R. Leboda, J. Skubiszewska-Zieba, V.D. Osovskii, Y.G. Ptushinskii, A.V. Turov // *J. Colloid Interface. Sci.* – 2008. – V. 323. – P. 6 – 17.
11. Structural characteristics of a carbon adsorbent and influence of organic solvents on interfacial water / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, J. Skubiszewska-Zieba, R. Leboda, M.D. Tsapko, D. Palijczuk // *Appl. Surf. Sci.* – 2003 – V. 214. – P. 178 – 189.
12. Influence of organic solvents on interfacial water at surfaces of silica gel and partially silylated fumed silica / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, M.D. Tsapko, V.M. Bogatyrev,

- J. Skubiszewska-Zięba, R. Leboda, J. Riczkowski // *Appl. Surf. Sci.* – 2004 – V. 229 – P. 197 – 213.
13. Мішина Л.Г., Геращенко І.І., Осолодченко Т.П. Вивчення адсорбційних і антимікробних властивостей очної суспензії на основі високодисперсного кремнезему // *Фармацевт. журн.* – 2005. – № 2. – С. 74 – 78.
 14. Слишик Н.Ф., Носач Л.В., Вороніна О.Є., Адсорбція антибіотиків тетрациклінового ряду на поверхні високодисперсного кремнезему // *Хімія, фізика та технологія поверхні.* – 2004. – Вип. 10. – С. 170 – 174.
 15. Слабоассоциированная вода в биологических объектах и на межфазной границе кремнеземов / В.М. Гунько, С.П. Туранская, О.В. Нечипор, Е.В. Юхименко, В.В. Туров, А.А. Чуйко // *Химия, физика и технология поверхности.* – 2006. – Вып. 11-12. – С. 397 – 430.
 16. Structural and adsorptive characteristics of fumed silicas in different media / V.M. Gun'ko, V.I. Zarko, V.V. Turov, E.F. Voronin, I.F. Mironyuk, A.A. Chuiko // *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications*, H.E. Bergna (Ed.), Taylor & Francis LLC, Salisbury. – 2005. – P. 499 – 530.
 17. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, V.M. Bogatyrev, V.I. Zarko, S.P. Gorbik, E.M. Pakhlov, R. Leboda, O.V. Shulga, A.A. Chuiko // *J. Colloid Interface Sci.* – 2005. – V. 283, № 2, – P. 329 – 343.
 18. *Химия антибиотиков* / Под ред. М.М. Шемякина. –М.: Изд-во АН СССР, 1961. – Т. 1. – 616 с.
 19. *Механизм действия антибиотиков* / Под ред. чл.-корр. АМН СССР Г.Ф. Гаузе – М.: Мир, 1969. – 720 с.
 20. Turov V.V., Leboda R. Application of ^1H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1999. – V. 79. – P. 173 – 211.
 21. Пиментал Дж., Мак-Клеллан О. Водородная связь. – М.: Мир, 1964. – 670 с.
 22. *Термодинамические свойства индивидуальных веществ* / Под ред. В.П. Глушкова. – Т. 2. – М.: Наука, 1978. – 495 с.
 23. Тарасевич Ю.И. Поверхностная энергия гидрофобных адсорбентов// *Теорет. и эксперим. химия.* – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 87 – 91.
 24. Туров В.В. Связанная вода и поверхностные силы в водных суспензиях высокодисперсных оксидов // В кн. *Химия поверхности кремнезема* /Под ред. А.А. Чуйко. – Киев: Изд. УкрИНТЭИ, 2001. – Т. 1. – С. 510 – 607.
 25. Turov V.V., Leboda R. ^1H NMR spectroscopy of adsorbed molecules and free surface energy of carbon adsorbets // *Phys. and Chem. of Carbons.*– 2000. – V. 27. – P. 67 – 124.
 26. Turov V.V., Barvinchenko V.N. Structurally ordered surface layers of water at the SiO_2 / ice interface of adsorbed molecules of protein hydrolysate on them // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 1997. – V. 8. – P. 125 – 132.
 27. Молекулярные взаимодействия в системе левомецетин – вода – кремнезем / Т.В. Крупская, В.Н. Барвинченко, В.А. Касперский, В.В. Туров // *Укр. хим. журн.* – 2007 – Т. 73. – № 7 – С. 20 – 26.
 28. Адсорбційне закріплення левоміцетину на поверхні високодисперсного кремнезему / Т.В. Крупська, В.М. Барвінченко, В.О. Касперський, В.В. Туров, О.О. Чуйко // *Фармацевт. журн.* – 2006. – № 2. – С. 59 – 64.
 29. Гацький О.О., Геращенко І.І., Луцок М.Б. Вивчення гемолітичних властивостей високодисперсного кремнезему та його форм in vitro // *Вісн. морфології.* – 2004. – № 10. – С. 257 – 260.

30. Дослідження процесів життєдіяльності та росту біомаси одноклітинних мікроорганізмів за наявності високодисперсного кремнезему і модифікованих кремнеземів / Т.В. Крупська, В.М. Барвинченко, М.А. Григор'єва, Т.С. Годосійчук, В.В. Туров // Фармацевт. журн. – 2008. – № 1. – С. 95 – 101.
31. Взаимодействие кремнезема с клеточной поверхностью дрожжей и состояние межфазной воды в зоне их контакта / Т.В. Крупская, В.М. Гунько, В.Н. Барвинченко, В.В. Туров, О.В. Шульга // Укр. хим. журн. – 2008 – Т. 74, № 2 – С. 84 – 91.
32. Chang I-S. Kinney D.R., Maciel G.E. Interior hydroxyl of the silica gel system as studied by ^{29}Si cp-mas nmr spectroscopy // J. Am Chem. Soc. – 1993. – V. 115. – P. 8695 – 8705.
33. Emsley J.W., Feenej J., Sutcliffe L.H. High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy // Oxford: Pergamon press, 1965. – P. 60 – 111.

A STUDY ON THE NATURE OF NANOSILICA EFFECT ON CELLULAR OBJECTS

T.V. Krupska, V.N. Barvinchenko, V.V. Turov

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
General Naumov Str. 17, 03164 Kyiv-164*

Immobilization of levomicetin onto silica surface has been carried out by the method of impregnation from alcohol solutions. Molecular interactions in the system of levomicetin/water/silica were studied by a complex of experimental methods (^1H NMR, IR, UV spectroscopy). The interface water layer structures and their thermodynamic parameters were found to depend on the levomicetin concentration. An effect was found of cell/silica interface on the formation of bound water layers in low hydration systems. The effect has been examined of the nanocomposites obtained and parent substances on cellular test systems. The optimum concentration of antibiotic in nanocomposite was shown to be within 0.4 to 0.6 mmol/g where pathogenic microorganisms are depressed to the maximum. The microporous co-polymer of styrenedivinylbenzene was used as a model of intracellular space of partly dehydrated cells for measuring the state of interface water and testing the influence of some organic molecules (DMSO, CHCl_3 , CH_4) by the method of ^1H NMR spectroscopy. The effect was recognized of structural and energetic heterogeneity of water in the pores of polymer.