

# Биофункциональные наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема, белка и аминокислот

Н. П. Галаган, Н. Ю. Клименко, И. Л. Орел, Е. А. Новикова, В. В. Туров

Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины  
Ул. Генерала Наумова, 17, Киев, Украина, 03164

nklymenko@ukr.net

---

**Цель.** Исследование адсорбционных взаимодействий *N*-ацетил-*D*-глюкозамина (GlcNAc) и *N*-ацетилнейраминной кислоты (*N*-АНК) с высокодисперсным кремнеземом (ВДК), модифицированным белком бычьим сывороточным альбумином (БСА). **Методы.** Адсорбция, ИК-, <sup>1</sup>H ЯМР- и лазерно-доплеровская спектроскопия. **Результаты.** Разработаны условия получения бионаноконструкций (БНК) ВДК/GlcNAc; ВДК/БСА/GlcNAc и ВДК/БСА/*N*-АНК. **Выводы.** Двигательная способность деконсервированных гамет быка снижается в присутствии БНК после адсорбционного закрепления на его поверхности белка. На основе данных <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии установлено, что взаимодействие GlcNAc с белком сопровождается сильной дегидратацией его молекул.

**Ключевые слова:** высокодисперсный кремнезем, альбумин, углеводы, бионаноконструкты, сперма быка.

---

**Введение.** Высокодисперсный кремнезем (ВДК) является перспективным носителем для иммобилизации многих синтетических и природных соединений, что позволяет создавать на его основе биологически активные наноконструкты (БНК) для биотехнологии [1, 2]. Большая удельная поверхность ВДК ( $S_{уд} = 300 \text{ м}^2/\text{г}$ ) обусловлена малым размером (4–40 нм) его первичных частиц. Она определяет высокую адсорбционную способность ВДК при связывании многих веществ, в том числе и биомолекул. Центрами адсорбции на поверхности ВДК служат силанольные (Si–OH) группы. Именно гидроксильный покров обуславливает значительную гидрофильность поверхности ВДК и способность сорбировать полярные молекулы.

ВДК широко известен как вспомогательное вещество при изготовлении многих лекарственных

средств, поскольку установлена его биологическая безвредность [3]. Исследования Института химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины расширили представления о свойствах такого кремнезема. Доказано, что добавление ВДК к суспензии клеток (дрожжи, микроорганизмы, гаметы, эритроциты) в достаточно низких концентрациях способствует стимуляции их жизнеспособности [2, 4]. Иммобилизация же на его поверхности некоторых биомолекул (белки, углеводы, витамины и др.) позволила создать БНК, способные усиливать подобный эффект [4].

Эти результаты послужили основой для создания БНК, позволяющих оптимизировать криосреды в технологии длительного сохранения генофонда некоторых сельскохозяйственных животных. В таких БНК использованы разные углеводы (моно-, олиго- и аминокислота). Добавление их в среду с гаметами быков на стадии деконсервации существенно про-

лонгирует время выживания клеток [5]. Для сахарозы, лактозы, раффинозы, а также аминсахаров N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc) и галактозамина в этих исследованиях использован метод нековалентной иммобилизации, оказавшийся, тем не менее, неэффективным для закрепления на поверхности ВДК моносахаров и N-ацетилнейраминовой кислоты (N-АНК) [6]. Однако предварительная обработка поверхности ВДК бычьим сывороточным альбумином (БСА) позволила закрепить эти углеводы на поверхности ВДК и получить БНК на их основе [7].

Перспективным модификатором при создании БНК, обладающих высокой степенью сродства к олигосахаридным структурам рецепторов клеточной поверхности, может стать закрепленный на поверхности ВДК GlcNAc. Для этого необходимо изучить параметры его адсорбции и возможности повышения ее за счет предварительного модифицирования поверхности белком. Поэтому цель данной работы состояла в сравнении адсорбционной способности GlcNAc и N-АНК на поверхности композитного адсорбента ВДК/БСА, в изучении некоторых физико-химических свойств полученных БНК, а также в определении их биоактивности в криосреде по отношению к гаметам быка.

**Материалы и методы.** В работе использовали ВДК с гидроксилированной поверхностью (А-300) с  $S_{уд} = 285 \text{ м}^2/\text{г}$  (Украина), БСА («Fluka», Швейцария), N-АНК и GlcNAc («Sigma», США).

Адсорбцию GlcNAc и N-АНК на ВДК/БСА из водной фазы изучали в соответствии с [8]. Для GlcNAc адсорбентом служил исходный ВДК. Соотношение адсорбат:адсорбент – 1:10; исходные концентрации БСА – 1–14 мг/мл; GlcNAc – 0,2–1,6 мг/мл, N-АНК – 16–60 мкг/мл. Белок адсорбировали при pH 4,8. Время адсорбции для БСА и GlcNAc составляет 2 ч, для N-АНК – 1 ч. Осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин, высушивали ( $t = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) и механически измельчали для использования в дальнейших исследованиях. В надосадочной жидкости измеряли концентрацию веществ согласно методам: для белка – [9], для GlcNAc – [10], для N-АНК – [11], после чего рассчитывали величину адсорбции по формуле [2]:  $A = (C_{исх} - C_{равн}) V/m$ , где  $C_{исх}$  и  $C_{равн}$  – соответственно исходная и равновесная концентрации в

растворе, мг/мл;  $V$  – объем раствора, мл;  $m$  – масса адсорбента, г. Измерения проводили на спектрофотометре Lambda-35 («Perkin-Elmer», США) и фотоэлектроколориметре КФК-2. Эффективность адсорбционных взаимодействий биомолекул с адсорбентом оценивали по изотермам адсорбции. Расчеты величин предельной адсорбции  $A$  выполнены согласно [8].

БНК исследовали методом ИК-спектроскопии в области длины волны 4000–400  $\text{см}^{-1}$  на спектрофотометре Thermo Nicolet Nexus FTIR с применением приставки диффузного отражения «SMART Collector». Их образцы смешивали с предварительно подсушенным KBr («Riedel-de Haen», Франция, чда) в соотношении 1:19 (для белка) и 1:4 (для углеводов). При обработке спектров использовали программное обеспечение фирмы «Omnics».

Эффективность взаимодействия белка с поверхностью ВДК оценивали по интенсивности полос поглощения при длине волны 3750  $\text{см}^{-1}$ , характерной для силанольных групп, до и после адсорбции БСА [12].

Механизм взаимодействия белка с GlcNAc изучали с помощью  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии на образцах сывороточного альбумина человека (САЧ) (Киевский Центр переливания крови). Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР снимали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения Varian Mercury 400 с рабочей частотой 400 МГц и при 90  $^\circ\text{C}$ -зондирующем импульсе длительностью 2 мкс. Для предотвращения переохлаждения связанной воды спектры  $^1\text{H}$  ЯМР записывали при нагревании образцов, предварительно охлажденных до 200 К.

Температуру образцов регулировали, используя термоприставку Bruker VT-1000 с точностью  $\pm 1 \text{ K}$ . Интегральные интенсивности сигналов определяли с точностью  $\pm 10 \%$ . Характеристики связанной воды определены согласно [12–14]. Расчеты методом криопорометрии выполнены по методологии, описанной в [12, 14], с использованием соотношения Гиббса-Томсона для снижения температуры замерзания воды ( $T$ ) в цилиндрических порах радиуса  $R$  ( $T = k/R$ ).

Биологическую активность БНК определяли методом лазерно-доплеровской спектроскопии на приборной установке «Spectrolas Instruments. Model LDS MQE» (Украина) по параметрам движения

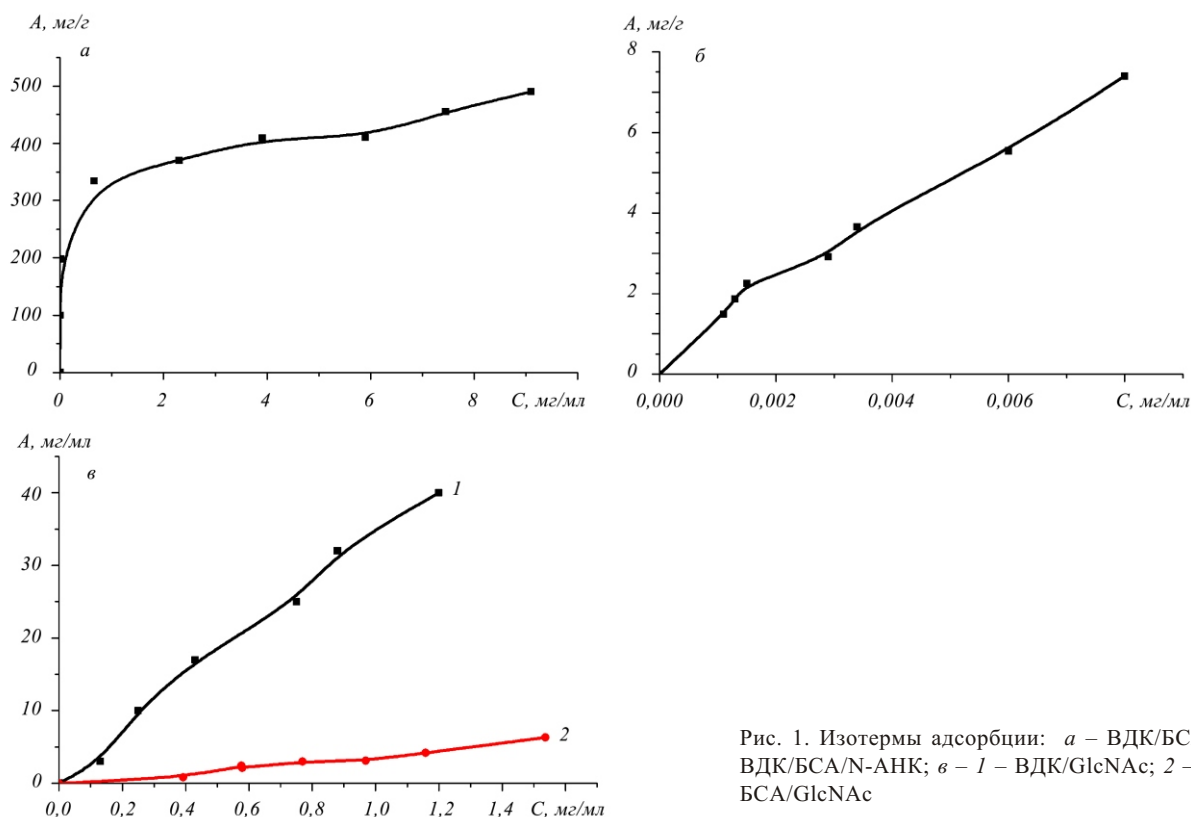


Рис. 1. Изотермы адсорбции: *a* – ВДК/БСА; *б* – ВДК/БСА/Н-АНК; *в* – 1 – ВДК/GlcNAc; 2 – ВДК/БСА/GlcNAc

репродуктивных клеток после деконсервации гранул криоконсервированной в лактозо-глицериново-желточной (ЛГЖ) среде бычьей спермы [15]. БНК в виде суспензий в 2,9 %-м растворе цитрата натрия добавляли в размороженную сперму. Диапазон исследуемых концентраций составил (0,002–0,6 %). Соотношение объемов спермы и суспензий БНК равно 1:3. Измерения проводили после инкубации спермы с БНК при  $t = 37$  С в течение 1 ч. Клетки освещали лазером He-Ne с длиной волны 632,8 нм в 1 мм-кюветах в течение 3 мин. Действие БНК на клетки оценивали по количеству движущихся клеток (%), частоте их вращения (Гц); скорости (мкм/с) и энергии движения (усл. ед.). Параметр «энергия движения» ( $N$ ) представляет собой затраты энергии на движение клеток в вязкой среде, рассчитываемой по формуле:  $N = V^2$ , где  $V$  – скорость движения клетки; – коэффициент, связанный с формой, размерами спермиев и свойствами среды [15]. Результаты получены с учетом падения движущей активности клеток со временем в сравнении с контрольной пробой, в которой отсутствует БНК. Параметры движения для контроля

принимали за 100 %. Биоактивность оценивали по отношению суммарных показателей в пробе к контролю за все время измерений.

**Результаты и обсуждение.** В соответствии с [2] адсорбция БСА на ВДК максимальна в его изоэлектрической точке – при pH 4,8. Изотерма имеет вид ленгмюровской кривой (рис. 1, *a*). Согласно классификации изотерм Джайлса [16], данная кривая принадлежит к L2-типу. Максимальная адсорбция ( $A$ ) составляет 410 мг/г, что свидетельствует о сильных взаимодействиях БСА и ВДК. Максимальная десорбция БСА с поверхности ВДК не превышает 11,3 %.

Предварительная иммобилизация БСА на поверхности ВДК способствует адсорбции N-АНК, изотерма которой представлена на рис. 1, *б*. Десорбция N-АНК с поверхности композита ВДК/БСА не превышает 0,015 %.

Сопоставление изотерм адсорбции, приведенных на рис. 1, *в*, свидетельствует о том, что GlcNAc на ВДК/БСА сорбируется в несколько раз хуже, чем на ВДК. Относительно высокая адсорбция GlcNAc на ВДК может быть связана с формирова-

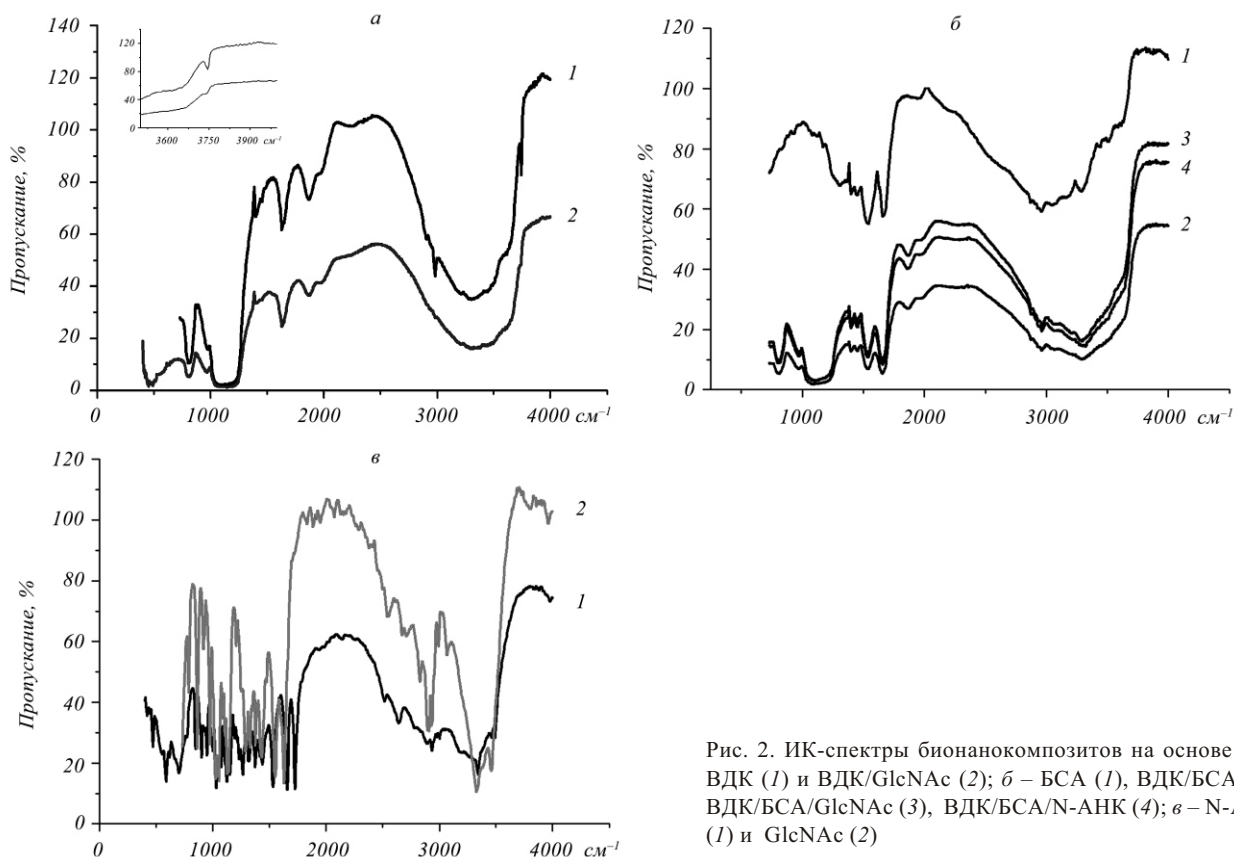


Рис. 2. ИК-спектры бионаноконкомпозитов на основе: *а* – ВДК (1) и ВДК/GlcNAc (2); *б* – БСА (1), ВДК/БСА (2), ВДК/БСА/GlcNAc (3), ВДК/БСА/N-АНК (4); *в* – N-АНК (1) и GlcNAc (2)

нием солеобразных аддуктов с перенесенным протоном.

В ИК-спектрах углеводов, взаимодействующих с ВДК или композитом ВДК/БСА, наблюдается уменьшение или полное исчезновение полосы поглощения свободных SiOH-групп ( $\nu = 3750 \text{ см}^{-1}$ , рис. 2), что подтверждает их связывание с функциональными группами адсорбированных молекул [2]. В БНК ВДК/БСА отмечено смещение полос поглощения Амид I–валентные колебания C=O и C–N (с  $1650$  до  $1657 \text{ см}^{-1}$ ) и Амид II–валентные C–N и деформационные колебания NH (с  $1550$  до  $1657 \text{ см}^{-1}$ ), являющиеся характеристическими в ИК-спектроскопии белков [17]. Это свидетельствует об образовании H-связи между NH-группами молекулы БСА и гидроксилами ВДК [18].

Существенное уменьшение интенсивности полосы поглощения при  $3750 \text{ см}^{-1}$  в случае формирования системы ВДК/GlcNAc (рис. 2, *а*) обусловлено участием SiOH-групп в водородных связях GlcNAc с ВДК. В то же время появляется широкая полоса поглощения в области  $2700\text{--}3600 \text{ см}^{-1}$ , вызванная

одновременным проявлением связей NH в аминогруппе ( $3350 \text{ см}^{-1}$ ), валентными колебаниями CH ( $2960, 3020, 3300 \text{ см}^{-1}$ ) и OH-групп ( $3550 \text{ см}^{-1}$ ) [18].

В ИК-спектрах композита ВДК/БСА/GlcNAc (рис. 2, *б*, спектр 3) наблюдается плечо при  $1630 \text{ см}^{-1}$ , соответствующее физически адсорбированной воде, а также появляется полоса поглощения в области  $1730 \text{ см}^{-1}$ , принадлежащей колебаниям C=O-группы аминсахара ( $1850\text{--}1550 \text{ см}^{-1}$ ) [19]. В ИК-спектрах присутствуют также пики при  $1545$  и  $1650 \text{ см}^{-1}$ , отвечающие деформационным колебаниям NH<sub>2</sub>-группы, и полоса поглощения при  $1520 \text{ см}^{-1}$ , принадлежащая деформационным колебаниям NH-группы.

ИК-спектр композита ВДК/БСА/N-АНК в основном сходен с таковым для GlcNAc. При этом отмечается исчезновение или уменьшение полос поглощения в области  $3500\text{--}3100 \text{ см}^{-1}$ , характерной для NH-связи в аминогруппе углеводов, полосы  $1730 \text{ см}^{-1}$ , а также целого ряда полос в области  $1241\text{--}1015 \text{ см}^{-1}$ , относящихся к частотам деформационных колебаний групп CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> и CH [20]. Сле-

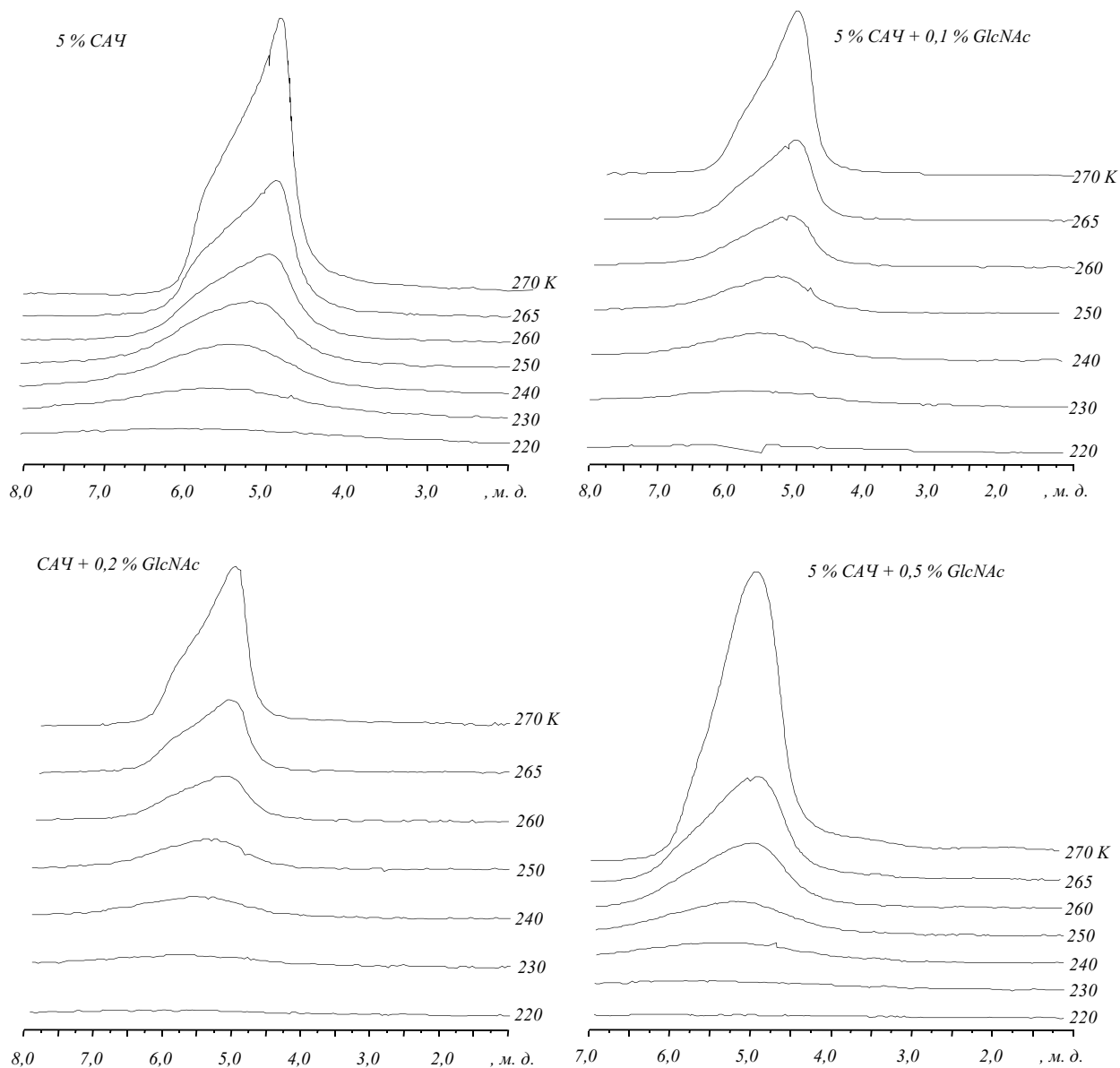


Рис. 3. Температурные изменения спектров  $^1\text{H}$  ЯМР воды в процессе размораживания 5 %-х водных растворов сывороточного альбумина человека (САЧ), содержащих 0 (а); 0,1 (б); 0,2 (в) и 0,5 % (г) GlcNAc соответственно

довательно, иммобилизация GlcNAc и N-АНК на поверхности композита ВДК/БСА проходит с участием гидроксильных, карбонильных и аминогрупп как белка, так и исследуемых углеводов.

Для выяснения причин слабой десорбции GlcNAc с поверхности композита ВДК/БСА изучено связывание GlcNAc с глобулами альбумина в растворах. На рис. 3 приведены спектры  $^1\text{H}$  ЯМР незамерзающей воды в 5 %-х растворах альбумина – исходном и содержащих добавки GlcNAc. Сигнал имеет неправильную форму и при его разложе-

нии на составляющие в предположении гауссовой формы линий поглощения может быть представлен двумя сигналами с химическими сдвигами  $\delta_{\text{H}} = 5$  и 5,7 м. д. Интенсивности этих сигналов относятся как 3:1.

Данные рис. 4 демонстрируют температурные зависимости концентрации незамерзающей воды, рассчитанные по температурным изменениям интенсивности сигнала воды, в результате сопоставления их с интенсивностью сигнала воды до замораживания (которая для 5 %-го раствора САЧ со-

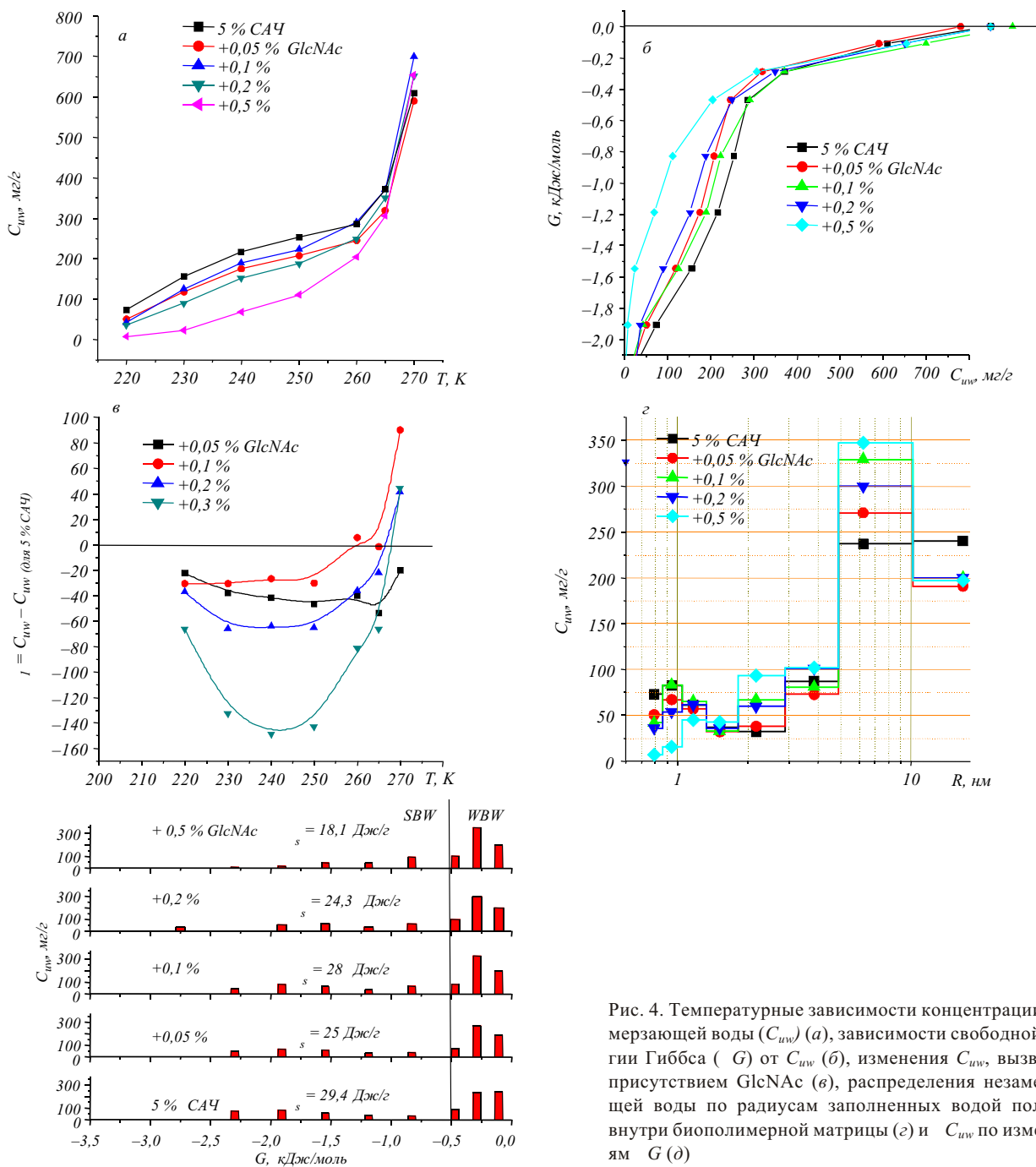


Рис. 4. Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды ( $C_{ув}$ ) (а), зависимости свободной энергии Гиббса ( $G$ ) от  $C_{ув}$  (б), изменения  $C_{ув}$ , вызванные присутствием GlcNAc (в), распределения незамерзающей воды по радиусам заполненных водой полостей внутри биополимерной матрицы (г) и  $C_{ув}$  по изменениям  $G$  (д)

ставляет 19 г/г); зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды; температурные зависимости изменения концентрации незамерзающей воды, обусловленные присутствием GlcNAc; распределения незамерзающей воды по радиусам наночапель сильноассоциированной воды и изменений  $C_{ув}$  в зависимости от величины  $G$ . При этом величины  $\mu_1$  рассчитыва-

ли, определяя разность  $C_{ув}$  при фиксированной температуре измерений. Радиусы наночапель незамерзающей воды находили по уравнению Гиббса-Томсона ( $R = T/k$ , где  $k = 50$  град нм [12]) для порций воды, замерзшей при изменении температуры в диапазоне от  $T_1$  до  $T_2$ .

Как следует из данных рис. 4, в, зависимости  $\mu_1(T)$  имеют сложный вид. При  $T = 270$  К величина

$\rho_1 > 0$ , т. е. присутствие GlcNAc увеличивает концентрацию незамерзающей воды в системе. Рост  $C_{uw}$  составляет 50–100 мг/г (до 15 % от  $C_{uw}^{max}$ ) при концентрациях  $C_{GlcNAc} = 0,05–0,5$  %. Одной из причин роста  $C_{uw}$  можно считать понижение температуры замерзания раствора, обусловленное уменьшением плотности насыщенных паров (закон Рауля). Однако учитывая, что  $C_{GlcNAc}$  не превышает  $1 \cdot 10^{-4}$  мг/л, температура замерзания раствора не может понизиться больше, чем на 0,1 град, т. е. эта причина не является основной. При  $T < 270$  К значение  $\rho_1 < 0$ , причем на зависимостях  $\rho_1(T)$  наблюдается широкий минимум при  $T = 240$  К. Максимальное уменьшение концентрации незамерзающей воды отмечено для образца, содержащего 0,05 % GlcNAc.

Полученные закономерности можно объяснить эффективным взаимодействием GlcNAc с молекулами альбумина. Поскольку белковые молекулы сильно гидратированы, молекулы органической добавки (в нашем случае GlcNAc) способны замещать часть гидратной воды. При этом следует ожидать такого уменьшения гидратированности, которое отвечает замещению объема гидратной воды, равного объему молекул органической добавки [12]. Как видно из данных рис. 4, в, максимальное уменьшение объема  $C_{uw}$  достигает 160 мг/г, что на порядок превышает этот объем. Следовательно, главной причиной наблюдаемых особенностей поведения зависимостей  $\rho_1(T)$  нужно считать изменение параметров взаимодействия в микрогелевых структурах белка, которые в соответствии с  $C_{GlcNAc}$  могут либо усиливаться (что приводит к уменьшению величины  $C_{uw}$ ), либо ослабляться.

Использование уравнения Гиббса-Томсона позволяет установить распределение по размерам кластеров воды или заполненных водой полостей (компарментов) в замороженных водных растворах альбумина и влияние на них молекул органической добавки (GlcNAc) (рис. 4, з). Можно выделить несколько типов компарментов (количество которых определяется числом точек на температурной зависимости  $C_{uw}(T)$ ) с радиусами в диапазоне 0,7–11 нм. В соответствии с данными рис. 4, б, к слабосвязанной воде (WBW) относится вода, сосредоточенная в кластерах с радиусами 6 и 11 нм. Переходная область обусловлена кластерами с ра-

диусами 2 и 4 нм; сильносвязанная вода (SBW) – кластерами с  $R < 2$  нм.

Как следует из рис. 4, з, добавки GlcNAc по-разному влияют на количество воды, сосредоточенной в кластерах разного размера. Объем SBW, локализованной в малых полостях, уменьшается, в то время как объем воды в полостях с радиусами 2 и 6 нм – существенно возрастает. Таким образом, имеют место две противоположные тенденции в изменении объемов водных структур, которые и определяют относительно слабую зависимость межфазной энергии в широком диапазоне концентраций добавок GlcNAc, что отличает его от простых сахаров (глюкозы и фруктозы) [12]. Вероятно, GlcNAc при взаимодействии с фрагментами белковых молекул блокирует центры их межмолекулярного связывания. Учитывая, что молекулы GlcNAc содержат электронодонорные атомы азота и кислорода, можно предположить его взаимодействие с белком преимущественно в кислотных центрах. Данные рис. 4, з, демонстрируют, что при  $T = 270$  К замерзает вода в полостях с радиусом 6 нм. Наиболее вероятно, что полости такого размера находятся в зазорах между близко расположенными молекулами альбумина (размер белковой глобулы не превышает 7 нм). Следовательно, в результате разрыва части связей белок–белок в микрогеле альбумина формируются кластеры именно такого размера. В БНК ВДК/БСА молекулами биополимера покрыта значительная часть поверхности кремнезема. Поэтому можно считать, что белковая фракция на поверхности кремнезема ведет себя аналогично микрогелевым структурам в растворе.

При исследовании параметров движения гамет деконсервированной спермы быка в присутствии БНК отмечена биологическая активность последних, что проявляется в увеличении изучаемых показателей для опытных проб по сравнению с контролем. При этом прослеживается отчетливая зависимость такого результата от БНК и его концентрации в среде с клетками. В этом отношении очень наглядным является такой параметр, как энергия движения, пропорциональная мощности движущейся клетки (что зависит от ее трения в вязкой среде) и скорости движения [15]. Для данного типа клеток увеличение подвижности свидетельствует о повышении жизнеспособности [2].

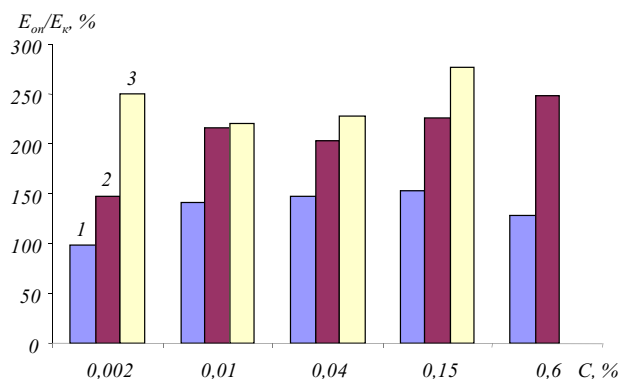


Рис. 5. Зависимость энергии движения деконсервированных гамет быков от концентрации БНК:  $E_{оп}$  – суммарная энергия для опытной пробы;  $E_{к}$  – то же для контроля (1 – ВДК/БСА/N-АНК; 2 – ВДК/БСА/GlcNAc; 3 – ВДК/GlcNAc)

На рис. 5 представлена гистограмма, позволяющая сравнить биоактивность полученных БНК по параметру суммарной энергии гамет, отнесенной к суммарной энергии клеток в контроле. Установлено, что в границах исследуемых концентраций (за исключением  $C_{ВДК/БСА/N-АНК} = 0,002$  %) наблюдается повышение энергии движения гамет по сравнению с контролем. Наибольшая активность характерна для композита ВДК/GlcNAc, наименьшая – для ВДК/БСА/N-АНК. Оптимальными концентрациями нанокompозита в криосреде оказались: для ВДК/GlcNAc и ВДК/БСА/N-АНК – 0,15 %, для ВДК/БСА/GlcNAc – 0,6 %.

Важно отметить, что оптимальные концентрации БНК, полученные на основе измерения энергии движения гамет, подтверждаются и другими параметрами – скоростью и частотой вращения клеток. Максимальное количество подвижных клеток зарегистрировано при относительно низких концентрациях БНК: для ВДК/БСА/N-АНК и ВДК/GlcNAc  $C_{оп} = 0,01$  %, для ВДК/БСА/GlcNAc – 0,15 %. Этот факт можно объяснить тем, что в суспензии гамет клетки находятся в разных физиологических состояниях [21], следовательно, их чувствительность по отношению к одной и той же концентрации БНК будет различной.

Из полученных результатов следует, что все созданные БНК способны повышать жизнеспособность гамет. Однако предварительная иммобилизация на поверхности ВДК белка несколько снижает подвижность гамет (вероятно, это обусловлено полным экранированием молекулами белка сила-

нольных групп), а также слишком прочное связывание GlcNAc и N-АНК с закрепленным на поверхности адсорбента БСА (что подтверждается результатами десорбции, ЯМР- и ИК-спектроскопии). Есть основание полагать, что действие БНК на клетки существенно зависит от характера связывания иммобилизованных биомолекул с поверхностью адсорбента. Возможно, преимущественная десорбция аминок углеводов с поверхности БНК вблизи рецепторной системы способствует более быстрому включению их в метаболизм клеток. Хотя возможны и другие механизмы, например, изменение под воздействием БНК свойств криосреды. Не следует исключать и того, что БНК с иммобилизованными углеводами могут избирательно взаимодействовать с определенными сайтами клеточной поверхности и, таким образом, влиять на активность ферментов, встроенных в мембрану.

**Выводы.** Установлено, что модифицирование поверхности ВДК белком БСА позволяет иммобилизовать на ней как GlcNAc, так и N-АНК. Полученные на их основе тройные БНК обладают достаточно высокой биологической активностью. Иммобилизованные на поверхности молекулы аминок углеводов обеспечивают активность БНК даже в том случае, когда поверхность ВДК полностью экранирована молекулами белка. Параметры адсорбции/десорбции исследуемых углеводов на ВДК, а также данные ИК-спектроскопии позволяют утверждать, что их иммобилизация на поверхности композита ВДК/БСА происходит за счет формирования водородосвязанных комплексов, в которых участвуют амино- и амидные группы как белка, так и углеводов. Показано, что взаимодействие аминоксахара с белком сопровождается значительной дегидратацией белковых структур, происходящей преимущественно вследствие уменьшения эффективности связей белок–белок. Установлено также, что БНК на основе ВДК, БСА, GlcNAc и N-АНК позволяют в границах определенных концентраций использовать их для оптимизации ЛГЖ-криосреды для стимуляции жизнеспособности деконсервированных бычьих гамет.

Гранулы криоконсервированной спермы быков любезно предоставлены Институтом разведения и генетики животных УААН.



Робота виконана при підтримці комплексної програми фундаментальних досліджень Національної академії наук України «Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології».

N. P. Galagan, N. Y. Klymenko, I. L. Orel, E. A. Novikova, V. V. Turov

Biofunctional nanomaterials based on ultra fine silica, protein and aminocarbohydrates

#### Summary

**Aim.** Investigation of adsorptive interactions of N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and N-acetylneuraminic acid (NANA) with ultra fine silica (UFS) modified by protein bovine serum albumin (BSA). **Methods.** Adsorption, IR-, <sup>1</sup>H NMR- and laser Doppler spectroscopy. **Results.** Conditions for obtaining bionanocomposites (BNC) UFS/GlcNAc, UFS/BSA/GlcNAc and UFS/BSA/NANA are developed. **Conclusions.** Impellent ability of deconserved bovine gametes decreased in the presence of BNC after adsorptive fastening of protein on UFS surface. The <sup>1</sup>H NMR spectroscopy data proved that interaction of GlcNAc with protein was accompanied by essential dehydration of protein molecules.

**Keywords:** ultra fine silica, albumin, carbohydrates, bionanocomposites, bovine sperm.

Н. П. Галаган, Н. Ю. Клименко, І. Л. Орел, О. А. Новікова, В. В. Туров

Біофункціональні наноматеріали на основі високодисперсного кремнезему, білка та аміновуглеводів

#### Резюме

**Мета.** Дослідження адсорбційних взаємодій N-ацетил-D-глюкозаміну (GlcNAc) та N-ацетилнейрамінової кислоти (N-АНК) з високодисперсним кремнеземом (ВДК), модифікованим білком бичачим сироватковим альбуміном (БСА). **Методи.** Адсорбція, ІЧ-, <sup>1</sup>H ЯМР- та лазерно-доплерівська спектроскопія. **Результати.** Розроблено умови отримання біонанокмпозитів (БНК): ВДК/GlcNAc; ВДК/БСА/GlcNAc та ВДК/БСА/N-АНК. **Висновки.** Здатність до руху деконсервованих гамет бика знижується за присутності БНК після адсорбційного закріплення на його поверхні білка. На основі даних <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії встановлено, що взаємодія GlcNAc з білком супроводжується сильною дегідратацією його молекул.

**Ключові слова:** високодисперсний кремнезем, альбумін, вуглеводи, біонанокмпозити, сперма бика.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chemistry of surface of silica* / Ed. A. A. Chuiko.–K.: Ukr. INTEI, 2001.–736 p.
2. *Medical chemistry and clinical application of dioxide of silicon* / Ed. A. A. Chuiko.–Kyiv: Naukova dumka, 2003.–415 p.
3. *Aljushin M. T., Astrahanova M. M. Aerosil and its application in a pharmaceutical practice* // *Pharmacy.*–1958.–17, N 6.–P. 73–77.
4. *Nedava V. E., Smirnova O. I., Zuravel M. P., Galagan N. P., Bogomaz V. I., Chuiko A. A., Sinelnik A. P., Mihnjuk V. P. About use of ultrafine silica in environments for freezing*

- sperm of rams // *Agricult. Biol. Ser. Biol. Anim.*–1992.–N 4.–P. 20–25.
5. *Vlasenko V. V., Galagan N. P., Kulik T. V., Pokrovskiy V. A. Studies on adsorption of carbohydrates on ultrafine silica surface by means of mass spectrometry and laser Doppler spectrometry* // VII Polish-Ukrainian Symp. on theoretical and experimental studies of interfacial phenomena and their technological applications.–Lublin, 2003.–P. 312–314.
6. *Kulik T. V., Paljanitsja B. B., Galagan N. P. Molecular self-organizing in systems nanodimensional particles-carbohydrates* // *Nanosystems, Nanomaterials, Nanotechnologies.*–2004.–1, N 2.–P. 681–690.
7. *Galagan N. P., Nastasienko N. S., Grytsenko I. V., Chmylev M. V., Vlasenko V. V. Research nanocomposites on the basis of ultrafine silica modified poliols and the bovine serum albumin* // *Nanosystems, Nanomaterials, Nanotechnologies.*–2004.–2, N 2.–P. 597–608.
8. *Mitrophanov P. P. Practical work on physical and colloid chemistry.*–M.: Medgiz, 1950.–183 p.
9. *Kochetov G. A. Practical guidance on enzymology.*–M.: Higher school, 1980.–P. 222–226.
10. *Varbanets L. D., Zdorovenko G. M., Knirel Yu. A. Methods of endotoxin investigations.*–Kyiv: Naukova dumka, 2006.–239 p.
11. *Methods of biochemical researches (lipid and a power exchange)* / Ed. M. I. Prohorovoj.–L.: Publ. Leningr. Univ., 1982.–272 p.
12. *Gun'ko V. M., Turov V. V., Gorbik P. P. Water at the interface.*–Kyiv: Naukova dumka, 2009.–694 p.
13. *Turov V. V., Leboda R. Application of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents* // *Adv. Coll. Interf. Sci.*–1999.–79, N 2–3.–P. 173–211.
14. *Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M., Zarko V. I., Leboda R., Goncharuk E. V., Novza A. A., Turov A. V., Chuiko A. A. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces* // *Adv. Coll. Interf. Sci.*–2005.–118, N 1–3.–P. 125–172.
15. *Galagan N. P., Vlasenko V. V., Nastasienko N. S., Chuiko O. O. Investigation of effect ultrafine silica and its composites with polyols on vital capacity of reproductive cells by the means of photon-correlation spectroscopy* // *Biophys. Bull. Khark. Univ.*–2005.–1 (15), N 665.–P. 94–98.
16. *Adsorption from solutions at the solid/liquid interface* / Eds G. D. Parfitt, C. H. Rochester.–M.: Mir, 1986.–488 p.
17. *Chirgadze Yu. N. Infrared spectra and structure of polypeptides and proteins.*–M.: Nauka, 1965.–134 p.
18. *Tarasevich Yu. I., Monahova L. I. Interaction of globular albumins with silica surface* // *Colloid. J.*–2002.–64, N 4.–P. 535–540.
19. *Kochetkov N. K., Bochkov A. F., Dmitriev B. A., Usov A. I., Chizhov O. S., Shibaev V. N. Chemistry of carbohydrates.*–M.: Chemistry, 1967.–672 p.
20. *Dudkin M. S. Introduction into chemistry of carbohydrates.*–Kyiv: Higher school, 1976.–176 p.
21. *Nemirovsky L. E., Solov'ev I. G., Lyamov S. V. Cell activation is a high-speed process* // *Reps of the RAS.*–1992.–326, N 1.–P. 184–188.

УДК 546.284.31 + 547.962.3 + 547.454 + 576.322  
Поступила в редакцію 03.11.09