

Л. П. Морозова, О. І. Штатко, М. Б. Луцюк,
І. В. Таран, В. С. Маланіч, В. В. Туров
ІНСТИТУТ ХІМІЇ ПОВЕРХНІ ІМЕНІ О. О. ЧУЙКА НАН УКРАЇНИ, КИЇВ

ВПЛИВ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ НА ГІДРАТАЦІЮ ЛІОФІЛІЗОВАНОЇ ТКАНИНИ ТОНКОЇ КИШКИ

Методами ¹H ЯМР-спектроскопії та термогравіметрії проведено вивчення стану води у ліофілізованій тканині тонкої кишки щурів та впливу на неї суспензії препарату "Силікс", яку вводили перорально. Досліджено, що внутрішньотканинна вода присутня переважно у слабоасоційованому стані. Після регідратації частка сильноасоційованої води зростає. Дія на кишечник силіксу проявляється зменшенням середнього радіуса внутрішньотканинних порожнин, заповнених водою. Запропоновано схему гідрації тканин, яка пояснює сукупність отриманих експериментальних результатів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ЯМР-спектроскопія, гідратні структури, кремнезем, слабо- та сильно-асоційована вода.

ВСТУП. Високодисперсні кремнеземи (ВДК), синтезовані в процесі гідролізу хлоридів силіцію у полум'ї водневого пальника, широко застосовують у медичній практиці в ролі структуруючого компонента готових лікарських форм, ефективного ентеросорбенту, здатного адсорбувати велику кількість білкових речовин і зв'язаних з ними токсинів, а також біологічно активного матеріалу, що впливає на біодоступність лікарських препаратів [1, 4–6]. Тривалі медико-біологічні дослідження показали відсутність у ВДК помітної токсичності та негативного впливу на тканини організму лабораторних тварин, у тому числі й на кишечник, після їх систематичного контакту з аморфним кремнеземом [4]. На сьогодні ряд кремнеземів (силікс, біле вугілля, полісорб) широко використовують у медичній практиці. Проте механізм їх біологічної активності повністю не з'ясовано.

Метою даної роботи було вивчити зміни гідратних властивостей ліофілізованої тканини тонкої кишки щурів після тривалого контакту з ВДК.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Основним методом дослідження було обрано низькотемпературну ¹H ЯМР-спектроскопію [2, 7, 10]. Використання цього методу дозволяє за температурними змінами інтенсивності сигналу води (депресії температури замерзання) визначати

© Л. П. Морозова, О. І. Штатко, М. Б. Луцюк, І. В. Таран, В. С. Маланіч, В. В. Туров, 2012.

розмір водних поліасоціатів (кластерів), локалізованих у нанорозмірних порожнинах біоматеріалу, а за величиною хімічного зсуву зв'язаної води розраховувати ступінь асоційованості води. При цьому враховується той факт, що неасоційована вода (газова фаза, розчин у слабополярному розчиннику) має хімічний зсув протонів $\delta_H \approx 1,5$ м.ч., а тетракоординувана вода у льоді – $\delta_H \approx 7$ м.ч.

Досліди проводили на 5 білих нелінійних щурах-самцях із середньою масою 350–380 г. Під час експерименту (5 діб) усі тварини отримували стандартний раціон віварію з водним режимом *ad libitum* та 12-годинним світловим режимом день/ніч [3]. Тваринам дослідної групи протягом усього часу виконання експерименту щоденно внутрішньошлунково вводили 5 % водну суспензію силіксу в дозі 500 мг/кг 1 раз на добу. Щурам контрольної групи 1 раз на добу інтрагастрально вводили відповідний об'єм води.

З досліду тварин виводили шляхом дислокації шийних хребців під легким ефірним наркозом. Усі роботи проводили відповідно до стандартних операційних процедур, згідно з правилами гуманного ставлення до експериментальних тварин, затвердженими комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова.

Після розтину стінки черевної порожнини виділяли тонку кишку, яку ретельно промивали охолодженим 1,15 % розчином KCl. Матеріа-

лом подальшого дослідження слугували відрізки кишки, які зважували, поміщали у стерильні контейнери і ліофілізували.

Перед фізико-хімічними вимірюваннями ліофілізовані відрізки кишки, що мали вигляд фрагментів масою до 100 мг, подрібнювали шляхом легкого розтирання в агатовій ступці до одержання однорідного порошку з розміром частинок близько 0,1 мм. Для приготування зразків 200–250 мг подрібненої тканини тонкої кишки поміщали в п'ятиміліметрову вимірювальну ампулу ЯМР і вимірювали спектри ЯМР у температурному інтервалі 200–280 К. У подальшому до зразка додавали 500 мкл дейтерохлороформу і повторювали вимірювання в середовищі органічного розчинника. Додаткові порції води вводили крізь органічну фазу. Після інтенсивного струшування зразок герметизували і зрівноважували при кімнатній температурі протягом тижня.

Спектри ЯМР одержували на ЯМР-спектрометрі високого розрішення (Varian "Mercury") з робочою частотою 400 МГц. Використовували 90° зондуєчий імпульс тривалістю 3 мкс. Температуру в датчику регулювали за допомогою термоприставки Bruker VT-1000 з точністю ± 1 град. Інтенсивність сигналів визначали шляхом вимірювання площі піків з використанням процедури розкладання сигналу на його складові при припущенні гауссовської форми сигналу й оптимізації його нульової лінії і фази з точністю, яка для добре розрішених сигналів була не меншою 5 %, а для сигналів, що перекриваються, – ± 10 %. Для запобігання переохолодженню води в досліджуваних об'єктах концентрацію незамерзаючої води вимірювали при нагріванні зразків, попередньо охолоджених до температури 210 К. Методику ЯМР-вимірювань і визначення термодинамічних характеристик та радіуса кластерів міжфазної води докладно описано в [2, 7, 10].

Для визначення геометричних розмірів кластерів адсорбованої води використовували рівняння Гіббса–Томсона, що зв'язує радіус сферичного або циліндричного водного кластера (R) з величиною депресії температури замерзання:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl} T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

де $T_m(R)$ – температура плавлення льоду, локалізованого в порах радіуса R; $T_{m,\infty}$ – температура плавлення об'ємного льоду; ρ – густина твердої фази; σ_{sl} – енергія взаємодії твердого тіла з рідиною; ΔH_f – об'ємна ентальпія плавлення. Це рівняння можна використовувати для обчислення розподілу пор за розмірами з температурної залежності вели-

чини C_{uw} , отриманої на основі методу ^1H ЯМР-спектроскопії з пошаровим виморожуванням води, для водних суспензій твердих тіл або гідратованих біологічних об'єктів, коли застосування інших методів аналізу пористої структури ускладнене [2, 7, 10]. На практиці рівняння (1) можна застосовувати у вигляді $\Delta T_m = (k/R)$, в якому константа k для багатьох гетерогенних систем, що містять воду, близька до 50 [2, 9].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Оскільки навіть після ліофілізації в біологічних тканинах залишається певна кількість води, для її визначення було використано метод термогравіметрії (рис. 1, а). На термогравіметричній кривій препарату кишкової тканини інтактною тварини (зразок Init.) фіксуються три основні ділянки швидкої втрати маси, розділені ділянками більш плавної зміни залежності $m(T)$. Перша з них, розташована в межах $50 < T < 170$ °C, стосується видалення фізично адсорбованої води. Відповідно до даних рисунка 1, а, її кількість складає близько 10 %. Ділянка в межах $280 < T < 400$ °C може бути віднесена на рахунок термічного руйнування біополімерів та їх осмолення, а остання ділянка ($400 < T < 670$ °C) – карбонізації продуктів термолізу та їх окиснення киснем повітря до вуглекислого газу. Практично ідентичну криву $m(T)$ (не наведено тут) було отримано і для тканини кишечника, що контактував із SiO_2 .

На рисунку 1, б показано зняті при різній температурі спектри ^1H ЯМР контрольного зразка Init. на повітрі. Спектр являє собою сильно розширений сигнал неправильної гауссовської форми, інтенсивність якого зменшується з зниженням температури відповідно до часткового замерзання зв'язаної води, а його хімічний зсув зміщується в ділянку слабких магнітних полів (більших величин хімічного зсуву). Відповідні залежності $C_{uw}(T)$ і $\delta_H(T)$ наведено на рисунку 1, в. При $T=280$ К величина δ_H не перевищує 2 м.ч., отже, згідно з [2, 7, 10], вона може кваліфікуватися як слабоасоційована (WAW). Як було показано в [2], якщо температура замерзання води перевищує 250 К, така вода є слабозв'язаною. Тоді до слабозв'язаної належить велика частина води, яка міститься у внутрішніх порожнинах кишкової тканини зразка Init., що контактує з повітряним середовищем (рис. 1, б).

Після замерзання WAW частина води, що залишилася в адсорбованому стані, має хімічний зсув, який відповідає сильноасоційованій воді (SAW). Його максимальна величина досягає 7,5 м.ч. (рис. 1, в). Отже, структура сітки

водневих зв'язків у такій воді наближається до структури гексагонального льоду [8].

Відповідно до рівняння (1), за депресією температури замерзання можна розрахувати розподіл за радіусами кластерів зв'язаної води, яка заповнює внутрішній простір між структурними елементами біополімерних або клітинних структур (рис. 1, г). Максимум розподілу відповідає кластерам води з радіусом $R \approx 4$ нм, хоча значна частина води (слабозв'язаної) входить до складу кластерів більшого розміру, аж до $R \approx 50$ нм.

Слід зазначити, що для біологічних об'єктів близькі за значеннями хімічні зсуви слабоасоційованої води можуть мати протони аліфатичних груп жирів, ліпідів і гідрофобних фрагментів деяких типів біополімерів. Однак при цьому величина їх хімічного зсуву не повинна залежати від температури. Хоча зазначені речовини у відчутній кількості й присутні в тканинах кишки, ймовірно, для використуваних твердих зразків їх сигнал занадто широкий (часи релаксації ядерних спінів малі) й не робить істотного внеску у вимірювану величину інтенсивності сигналу зв'язаної води.

Для зразка Init. заміна повітряного середовища на середовище слабополярного органічного розчинника – дейтерохлороформу призводить до істотної зміни вигляду спектрів ^1H ЯМР зв'язаної води (рис. 2, а). У спектрах стають помітними три сигнали сильноасоційованої води (SAW1–3), сигнал слабоасоційованої води і два сигнали (ASW1 і ASW2), які можуть бути віднесені не тільки до кластерів води (в яких кожна молекула бере участь в утворенні приблизно одного водневого зв'язку), але також і до окремих молекул води, адсорбованих на електрондонорних центрах, що входять до складу структурних елементів кишкової тканини.

Зі зниженням температури відбувається зменшення інтенсивності всіх сигналів зв'язаної води, причому максимальна зміна інтенсивності фіксується для сигналів WAW і SAW3. Під впливом середовища CDCl_3 температура замерзання WAW знижується, тобто частина міжфазної води стає сильнозв'язаною. Така трансформація свідчить про можливість участі слабополярного органічного середовища у формуванні структури кластерів води. Суттєве зменшення ширини сигналів міжфазної води в середовищі хлороформу може бути зумовлене двома основними факторами: зменшенням неоднорідного уширення, викликаного великою різницею у величинах магнітної сприйнятливості повітря і твердого зразка, та уповільненням під впливом рідкого середо-

вища молекулярного обміну між кластерами води, локалізованими в різних компартментах (порожнинах) усередині біоматеріалу. Для зразка тканини кишечника, що контактував з кремнеземом (зразок Af_{SiO_2} , рис. 2, б), у спектрах ^1H ЯМР спостерігаються тільки два сигнали – WAW і SAW3. Їх ширина значно більша, ніж для зразка Init.

Сукупність змін у спектрах ^1H ЯМР води, пов'язаної з тканинами кишки після їх ліофілізації (рис. 1, а і 2, а, б), можна пояснити на основі схеми (рис. 3).

Біоматеріал містить внутрішні порожнини різного розміру і форми, що позначені на рисунку 3, а S1–6, розмір яких може досягати десятків нм. Гідрофільно-ліпофільні властивості стінок пор у різних компартментах можуть різнитися, але на поверхні є значне число центрів, з якими молекули води можуть утворювати водневозв'язані комплекси, що є передумовою для формування в порах різного розміру кластерів сильноасоційованої води. Якщо води достатньо, то вона може заповнювати більшу частину об'єму пор, тоді розподіл за розмірами кластерів води відображає розподіл за розмірами внутрішніх порожнин. Завдяки динамічній рівновазі адсорбованої води і насиченої пари між компартментами S1–6 відбувається швидкий молекулярний обмін, що зумовлює наявність у повітряному середовищі тільки одного сигналу адсорбованої води, хімічний зсув якого визначається усередненим значенням хімічного зсуву всіх типів адсорбованої води. При заміні повітря на середовище слабополярного органічного розчинника (хлороформу) можливість молекулярного обміну через газове середовище усувається, і в спектрах можуть бути зареєстровані окремі сигнали, які відносять до різних типів компартментів (пор).

Оскільки поверхня внутрішніх порожнин (пор) утворена структурними елементами клітин, вони містять нерівності, розмір яких вимірюється десятими частками нм (рис. 3, б). Якщо поверхня гідрофобна, а внутрішній простір обмежений, то адсорбовані в таких порожнинах молекули води можуть взаємодіяти зі стінками лише за дисперсійним механізмом, не утворюючи водневозв'язаних комплексів, як з поверхнею, так і з іншими молекулами води (цьому перешкоджають просторові обмеження). Така вода в спектрах реєструється як слабоасоційована. Враховуючи співвідношення інтенсивностей сигналів WAW і SAW на рисунку 2, можна зробити висновок, що для вибраних зразків адсорбована вода є переважно слабоасоційованою.

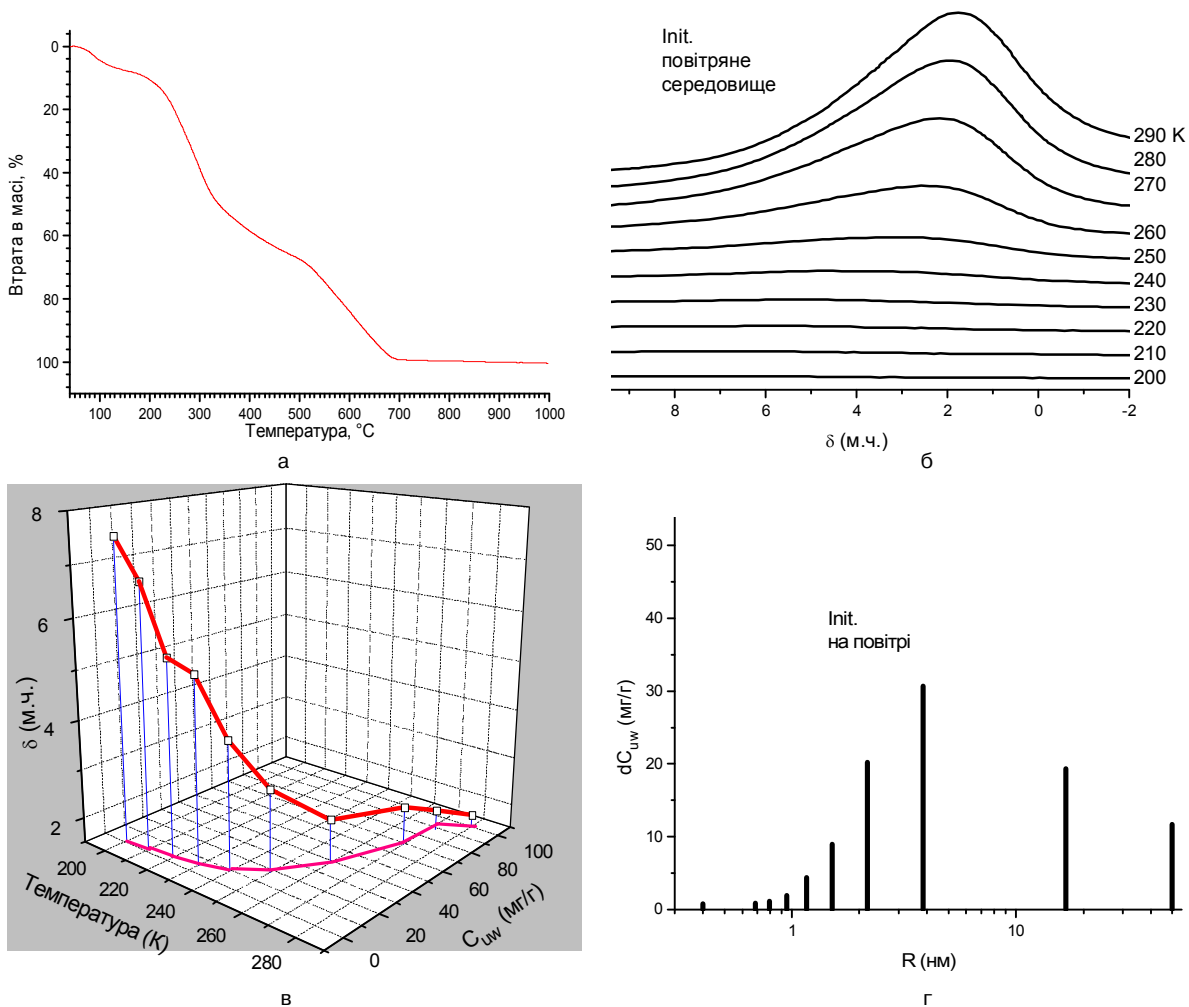


Рис. 1. Крива втрати маси (а); зняті при різній температурі спектри ^1H ЯМР зв'язаної води (б); залежності хімічного зсуву та концентрації незамерзаючої води від температури (в) і розподіл зв'язаної води за радіусами кластерів (г) для зразка Init. у повітряному середовищі.

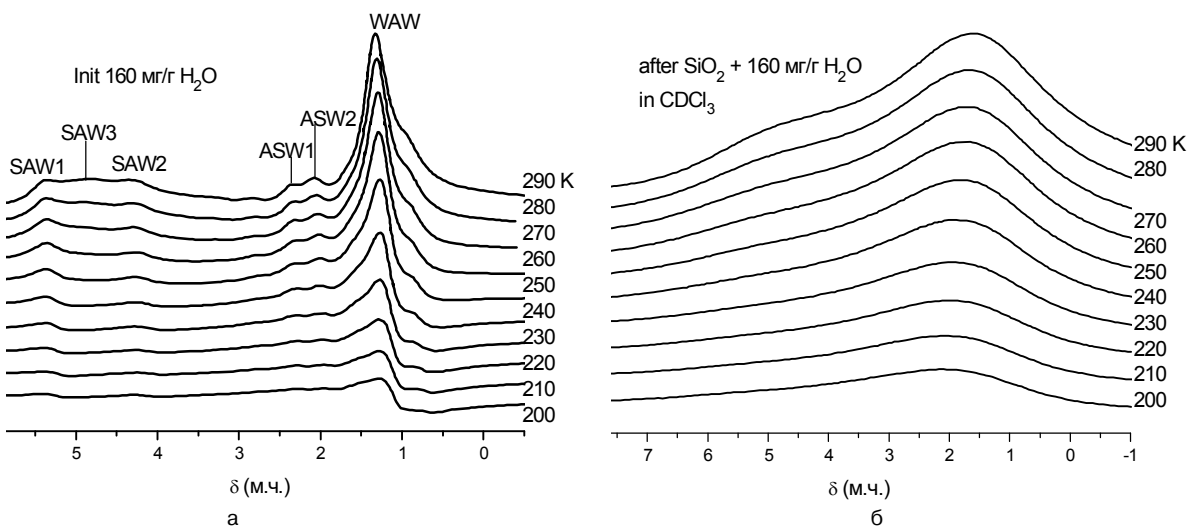


Рис. 2. Зняті при різній температурі спектри ^1H ЯМР води для зразка ліофілізованої тканини кишечника Init. (а) і після контакту із суспензією SiO_2 (б).

Відповідно до даних рисунка 2, більша частина WAW здатна замерзати зі зниженням температури. Це можливо тільки шляхом попе-

реднього утворення впорядкованої структури, подібної до структури гексагонального льоду. Ймовірно, його формування відбувається в

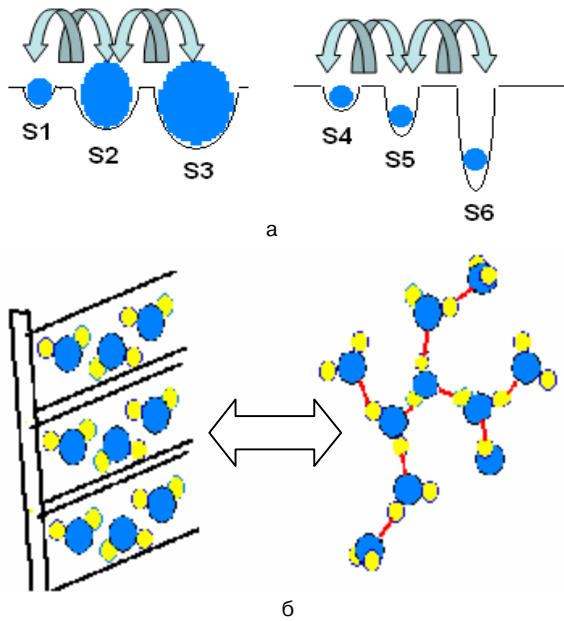


Рис. 3. Схема формування кластерів сильно- (а) і слабоасційованої (б) води в ліофілізованій тканині кишки.

нанорозмірних порах, розташованих безпосередньо біля поверхні, що адсорбує воду за гідрофобним механізмом (рис. 3, б), причому виграш енергії в результаті формування впорядкованої сітки водневих зв'язків кластера льоду компенсує енергію переміщення молекул води із субнанометрових порожнин, локалізованих на гідрофобних ділянках поверхні біоматеріалу.

На рисунку 4 наведено результати порівняльних досліджень гідратних властивостей зразків ліофілізованих тканин кишки Init. і Af_{SiO₂}. Вимірювали температурні залежності концентрації сильнозв'язаної води (рис. 4, а, б) і розраховані на їх основі за рівнянням (1) розподіли за радіусами кластерів SAW (рис. 4, в, г). Аналогічні розрахунки для WAW не проводили, оскільки, як зазначалося вище, замерзання слабоасційованої води може відбуватися зі зміною місця її локалізації і вони не відображають дійсної будови внутрішніх порожнин, що адсорбують WAW.

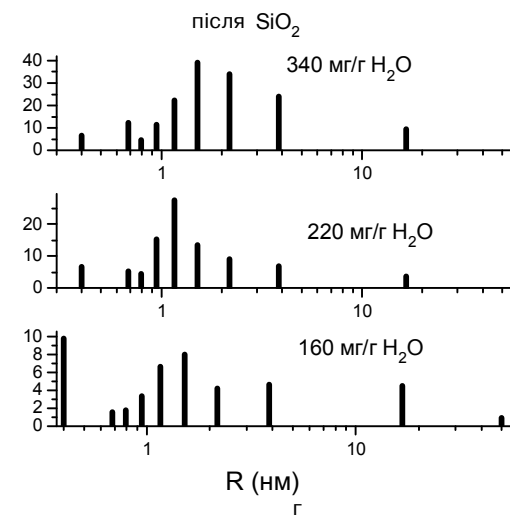
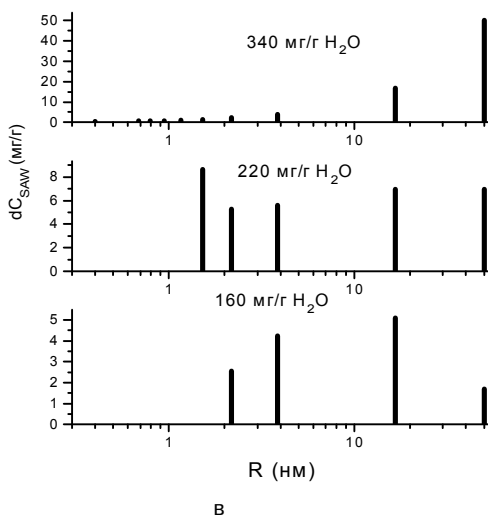
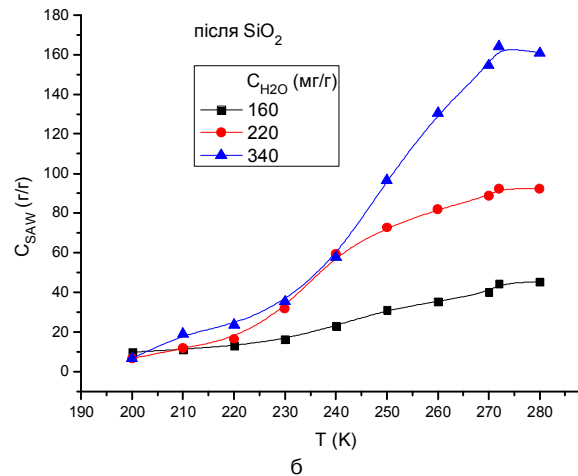
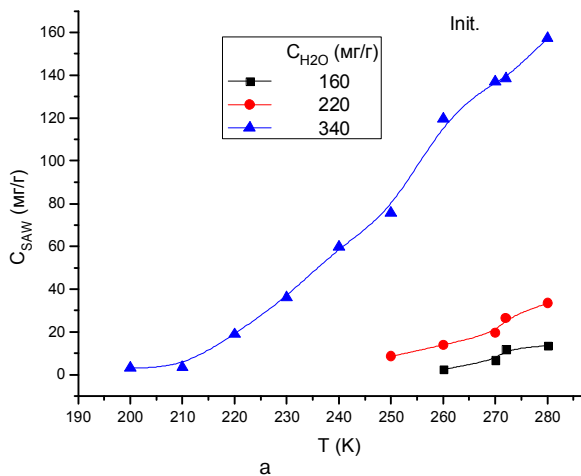


Рис. 4. Зміна з температурою концентрації сильнозв'язаної води SAW3 (а, б) і розподіли за радіусами кластерів SAW3 (в, г) для зразка ліофілізованої тканини кишечника Init. (а, в) і тканини, що контактувала із суспензією SiO₂ (б, г).

Відмінності в характері залежностей $C_{\text{SAW}}(T)$ (рис. 4, а, б) виявилися суттєвими. Так, якщо для зразка Init. при $C_{\text{H}_2\text{O}}=160$ і 220 мг/г сильноасоційована вода (SAW3) фіксується тільки при $T \geq 250$ К, то для зразка Af_{SiO₂} – у всьому доступному для вимірювання діапазоні температур. Ці відмінності зумовлені формуванням у тканинах різних систем кластерів сильноасоційованої води.

При $C_{\text{H}_2\text{O}}=160$ мг/г у зразку Init. г (рис. 4, в) спостерігаються кластери SAW з радіусами 11–50 нм. У зразку Af_{SiO₂} (рис. 4, г) максимум розподілу $dC_{\text{SAW}}(R)$ зміщується в бік зменшення значень R , причому значна частина кластерів має радіус $R < 0,5$ нм. Ця тенденція зберігається і при збільшенні вмісту води у зразку. При $C_{\text{H}_2\text{O}}=340$ мг/г у контрольному зразку більша частина води входить до складу кластерів з $R=50$ нм, тоді як у зразку Af_{SiO₂} середній розмір кластерів SAW становить 1–3 нм.

ВИСНОВКИ. Під впливом високодисперсного кремнезему середній розмір кластерів води в регідратованій після ліофілізації тканині кишки лабораторних тварин істотно зменшився. Оскільки отримані розподіли $dC_{\text{SAW}}(R)$ відображають реальні розподіли внутрішніх порожнин (пор), які містяться в біоматеріалі, можна стверджувати, що тканина кишки після впливу суспензії кремнезему стала більш однорідною. З іншого боку, в ній зменшилася кількість слабоасоційованої води, зв'язаної за механізмом гідрофобної гідратації. Це свідчить про зменшення доступних для адсорбованих молекул води гідрофобних порожнин субнанометрового розміру. Ймовірно, поверхня зразка тканини кишки Af_{SiO₂} стає більш гідрофільною, і у вузьких нанопорах формується більша кількість кластерів сильноасоційованої води. Можливо, ці зміни лежать в основі феномена процесів всмоктування і секреції в кишечнику *in vivo*, зазначеного в наших попередніх експериментах [4].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вильцанюк А. А. Энтеросорбция в комплексном лечении острых хирургических заболеваний органов брюшной полости / А. А. Вильцанюк, И. И. Геращенко. – Харьков, 2009. – 128 с.
2. Гунько В. М. Вода на межфазной границе / В. М. Гунько, В. В. Туров, П. П. Горбик. – К. : Наукова думка, 2009. – 694 с.
3. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – 3-е изд., перераб. и доп. – К. : Вища школа, 1983. – 383 с. (Гл. 9. Крысы. – С. 243–277.)
4. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / под ред. А. А. Чуйко. – К. : Наукова думка, 2003. – 375 с.
5. Наноматериалы и нанокompозиты в медицине, биологии, экологии / под ред. А. П. Шпака, В. Ф. Чехуна, составители П. П. Горбик, В. В. Пуров. – К. : Наукова думка, 2011. – 444 с.
6. Полимеры в фармации / под ред. А. И. Тенцовой, М. Т. Алюшина. – М. : Медицина, 1985. – 252 с.
7. Туров В. В. Кластеризованная вода и пути ее использования / В. В. Туров, В. М. Гунько. – К. : Наукова думка, 2011. – 313 с.
8. Kinney D. R. Water and the Silica Surface As Studied by Variable Temperature High Resolution ¹H NMR / D. R. Kinney, I. S. Chaung, G. E. Maciel // J. Am. Chem. Soc. – 1993. – **115**. – P. 6786–6794.
9. Petrov O. V. NMR cryoporometry: Principles, application and potential / O. V. Petrov, I. Furo // Progr. In NMR. – 2009. – **54**. – P. 97–122.
10. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic Interfaces / V. M. Gun'ko, V. V. Turov, Bogatyrev [et al.] // Adv. Colloid. Interf. Sci. – 2005. – **118**, № 1–3. – P. 125–172.

Л. П. Морозова, Е. И. Штатко, Н. Б. Луцок, И. В. Таран, В. С. Маланич, В. В. Туров
ИНСТИТУТ ХИМИИ ПОВЕРХНОСТИ ИМЕНИ А. А. ЧУЙКО НАН УКРАИНЫ, КИЕВ

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА НА ГИДРАТАЦИЮ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ТКАНИ ТОНКОЙ КИШКИ

Резюме

Методами ^1H ЯМР-спектроскопии и термогравиметрии проведено изучение состояния воды в лиофилизированной ткани тонкой кишки крыс и влияния на нее перорально вводимой суспензии препарата "Силикс". Обнаружено, что внутритканевая вода присутствует преимущественно в слабоассоциированном состоянии. После регидратации доля сильноассоциированной воды возрастает. Воздействие на кишечник силикса проявляется уменьшением среднего радиуса внутритканевых полостей, заполненных водой. Предложена схема гидратации тканей, объясняющая совокупность полученных экспериментальных результатов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ЯМР-спектроскопия, гидратные структуры, кремнезем, слабо- и сильноассоциированная вода.

L. P. Morozova, O. I. Shtatko, M. B. Lutsyuk, I. V. Taran, V. S. Malanitch, V. V. Turov
O. O. CHUIKO INSTITUTE OF SURFACE CHEMISTRY NAS OF UKRAINE, KYIV

EFFECT OF HIGHLY DISPERSED SILICA ON HYDRATION LIOPHILIZED TISSUE OF SMALL INTESTINE

Summary

By methods of ^1H NMR spectroscopy and thermogravimetry there was conducted the study of the water state in lyophilized rat intestinal tissue and the influence of preparation "Silics" suspension, which was administered orally. It was determined that interstitial water is present mainly in weakly associated condition. After rehydration the part of strongly associated water increased. Action of "Silics" on small intestine manifested as decrease of the average radius of interstitial cavities filled with water. It was proposed the scheme of tissue hydration, which explained a set of experimental results.

KEY WORDS: NMR spectroscopy, hydrated structures, silica, weakly and strongly associated water.

Отримано 21.11.11

Адреса для листування: Л. П. Морозова, вул. Писарева, 3, кв. 93, Вінниця, 21036, Україна.