

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ЯВЛЕНИЙ

УДК 546.284-31:576.314

МЕМБРАНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА НАНОРАЗМЕРНОГО КРЕМНЕЗЕМА

И.И.Герашенко

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

Рассмотрен физико-химический аспект взаимодействия наноразмерного кремнезема и его модифицированных форм с поверхностью клеток.

Введение

Уникальность свойств наноразмерного аморфного кремнезема (нано-SiO₂), получаемого пирогенным путем, методом золь-гель технологии или иными способами, обусловлена нанодисперсностью частиц в сочетании с химической активностью поверхности. Ряд свойств нано-SiO₂, таких как высокая белоксорбирующая активность, гидрофильность, способность связывать микроорганизмы, нашли применение в биологии и медицине. Нано-SiO₂ используют для депротенизации жидкостей, иммуносорбции, обеззараживания воды, в виде лекарственного препарата «Силикс» – для лечения гнойных ран и острых кишечных инфекций, а также для других целей [1].

Очевидно, значительная часть биологического действия нано-SiO₂, будь то мембранолизис эритроцитов (гемолиз) или агглютинация кишечной палочки, проявляется при непосредственном контакте с клеточными мембранами. Мембранотропные свойства нано-SiO₂, понимаемые здесь в широком смысле как средство к поверхностным структурам клетки, интересны по ряду причин. В теоретическом плане их изучение раскрывает на микроуровне механизм взаимодействия живого организма с минеральными микро- и наночастицами, широко представленными в окружающей среде. Для медиков сведения о мембраноповреждающем действии дисперсных кремнезёмов, в первую очередь их кристаллических форм, важны в свете изучения проблемы силикоза и других заболеваний легких. По результатам лабораторного гемолиз-теста можно предварительно оценить биосовместимость дисперсных кремнезёмов.

В настоящей экспериментально-обзорной статье приводятся результаты изучения взаимодействия нано-SiO₂ с поверхностью различных клеток (эритроцитов, лимфоцитов, энтероцитов, тучных клеток и патогенных микроорганизмов) *in vitro* и обсуждение этих результатов с позиции химии поверхности кремнезема. В обзоре рассмотрена физико-химическая составляющая данного взаимодействия и не затрагивается литература, посвященная биологическим эффектам, сопровождающим адсорбцию нано-SiO₂ на поверхности клетки (влияние на рост и размножение микроорганизмов, апоптоз альвеолярных макрофагов, апоптоз и некроз изолированных гепатоцитов крысы и др.).

1. Взаимодействие немодифицированного наноразмерного кремнезема с биологическими мембранами.

Известно, что мембрана эукариотических клеток представляет собой эластичную оболочку, состоящую из трех слоев полифункциональных структур: надмембранного матрикса, собственно мембраны и цитоплазматической мембраны. Общая толщина трех слоев не превышает 10 нм. Собственно мембрана представляет собой регулярную

структуру в виде двойного фосфолипидного слоя с включенными в него на разную глубину белками. Оболочка клеток-прокариотов (бактерий) состоит из цитоплазматической мембраны, клеточной стенки и капсулы [2–5]. Жизнеспособность клетки в значительной мере зависит от величины отрицательного электрического потенциала ее поверхности, который в основном определяется карбоксильными группами сиаловых кислот, входящих в состав надмембранного матрикса [6,7], а также зависит от количества адсорбированных на клеточной поверхности молекул и ионов [8]. В снижение отрицательного заряда вносят вклад положительно заряженные четвертичные аммониевые группы мембранных фосфолипидов – лецитина и сфингомиелина. Очевидно, для адсорбционного взаимодействия клетки с заряженными наночастицами кремнезема величина ее поверхностного заряда будет иметь существенное значение.

Приступая к обзору имеющихся данных, необходимо уточнить, что речь идет об адсорбции частиц нано-SiO₂ на клеточной поверхности, а не наоборот. Так, средний диаметр эритроцитов составляет 7,5 мкм, размеры большинства патогенных бактерий заключены в диапазоне 0,2–10 мкм (стафилококк 0,5 – 1,5 мкм; кишечная палочка – до 2 мкм), в то время как размеры частиц кремнезема, которые обычно присутствуют в его водных дисперсиях, на несколько порядков меньше.

Наиболее изученным и удобным объектом для исследования свойств клеточных мембран является эритроцит. По данным [9] мембрана эритроцита человека содержит около 50 % белков, 43 % липидов и 7 % углеводов. Основными белками эритроцитарной мембраны являются:

- спектрин – высокомолекулярный фибриллярный белок, расположенный на внутренней стороне мембраны; отдельные полипептиды его цепи имеют молекулярную массу 215000–240000.
- актин с молекулярной массой 43000; считается, что спектриновые и актиновые компоненты связаны меж собой, образуя сетку, которая выстилает мембрану изнутри и способствует поддержанию формы эритроцита;
- белок системы транспорта анионов с молекулярной массой 88000 (по другим данным – 95000) – интегральный белок, содержащий 7–9 % углеводов;
- гликофорин – интегральный белок, проникающий внутрь клетки и взаимодействующий с актин-спектриновой сеткой; этот гликопротеид содержит большинство сиаловых кислот эритроцитов человека; общее содержание углеводов в молекуле гликофорина достигает 60 %.

Кроме перечисленных белков, обнаружено большое количество мембранных ферментов, содержание которых в мембране невелико. Наиболее значимыми являются ацетилхолинэстераза (0,2–0,3 % от всего мембранного белка) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Такой важный фермент, как Na⁺,K⁺-АТФаза, представлен в клетке всего несколькими сотнями молекул. Липиды мембраны эритроцита человека представлены тремя классами. Нейтральные липиды (до 30 % масс. от всех липидов) включают глицериды, холестерин и эфиры холестерина. Гликолипиды составляют около 10 % мембранных липидов. Класс фосфолипидов (около 60 %) представлен такими компонентами, как: фосфатидилхолин (28,3% от суммы фосфолипидов), фосфатидилэтаноламин (26,7 %), сфингомиелин (25,8 %), фосфатидилсерин (12,7 %), фосфатидная кислота и фосфатидилинозитол. Липиды распределены в бислое несимметрично: 70% фосфатидилхолина (лецитина), 80 % сфингомиелина и до 30 % фосфатидилэтаноламина расположены во внешней половине бислоя; почти весь фосфатидилсерин локализован во внутренней половине мембраны. Холестерин между монослоями распределен приблизительно равномерно. С мембраной связан состоящий

из углеводсодержащих компонентов надмембранный матрикс, терминальной частью которого являются олигосахаридные цепи и остатки сиаловых кислот [4,9].

В одной из первых работ, посвященных гемолитическому действию нано-SiO₂, изучена зависимость мембраноповреждающего действия частиц кремнезема от их размера [10]. К 2 % взвеси отмытых эритроцитов человека прибавляли монодисперсии аморфного кремнезема различной концентрации, содержащие частицы следующих размеров: 3; 4; 5; 5,5; 7 и 30 нм. Смеси инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, после чего определяли степень гемолиза – отношение количества высвободившегося гемоглобина к общему количеству гемоглобина в эритроцитах. Для всех дисперсий зафиксирован рост степени гемолиза с увеличением концентрации кремнезема. Установлено, что наибольшей гемолитической активностью обладает дисперсия с частицами 30 нм. Частицы размером 4 нм вызывают гемолиз не более 10 %, а частицы наименьшего размера – 3 нм – совсем не вызывают гемолиза. Отмечено протекторное действие частиц наименьшего размера: если перед прибавлением дисперсии с частицами 30 нм эритроциты предварительно обработать дисперсией, содержащей частицы размером 3 нм, то гемолиз не наблюдается. Протекторное действие мелких частиц сохраняется, если после их прибавления эритроциты отмыть солевым раствором, что указывает на необратимый характер адсорбции частиц на мембране. Гемолиза нет, если любую из дисперсий предварительно обработать плазмой – очевидно при этом происходит блокировка активных центров поверхности кремнезема белками плазмы. Установлено также, что частицы с размером 4 – 7 нм вызывают агглютинацию эритроцитов, которая наблюдается только в определенном диапазоне разведений суспензии эритроцитов. Свежеполученная дисперсия нано-SiO₂ обладает меньшим гемолитическим действием, чем эта же дисперсия спустя некоторое время, что можно объяснить самопроизвольным укрупнением частиц кремнезема.

На основании этих результатов предлагается двухстадийный механизм взаимодействия нано-SiO₂ с мембраной эритроцитов: на первой стадии происходит быстрая адсорбция частиц кремнезема клеточной поверхностью, главным образом за счет электростатического взаимодействия, с последующим упрочнением возникших контактов водородными связями и ван-дер-ваальсовым притяжением; на второй стадии происходит денатурация мембранных белков, степень которой зависит от соотношения размеров частиц кремнезема и белковых молекул. Частицы размером менее 3–5 нм не обладают поверхностью, достаточной для разворачивания на ней крупных белковых молекул, и поэтому не вызывают гемолиза. Площадь контакта с мембраной крупных частиц, а также агломератов мелких частиц, достаточна для разворачивания молекул белка, что приводит к агглютинации и гемолизу [10].

Более поздние теории мембранолизиса рассматриваются в работе Фубини [11]. Согласно одной из них индуцируемый кремнеземом гемолиз может быть обусловлен способностью силанольных групп образовывать водородную связь с компонентами мембраны. Поверхность кремнезема, модифицированная полимером-акцептором протонов N-оксидом поливинилпиридина, такую способность утрачивает [12]. Согласно другой теории гемолитическая активность кварца является следствием отрицательного заряда ионизированных силанольных групп. Поверхность SiO₂, обработанная сильной кислотой Льюиса, например AlCl₃, перестает взаимодействовать с мембранами эритроцитов [13]. Предложена теория гемолиза, в которой основная роль отводится процессу пероксидного окисления мембранных липидов под действием гидроксильных радикалов и пероксида водорода, индуцируемых поверхностью кремнезема [14–16]. Каталаза, разлагающая пероксид водорода, снижает степень гемолиза [17].

Зависимость динамики гемолиза *in vitro* от размера частиц и концентрации нано-SiO₂ изучена в работе [18]. Для этого были приготовлены 0,001; 0,005 и 0,01 % суспензии

нано-SiO₂ и путем центрифугирования проведено фракционирование 0,005 % суспензии. Обнаружено, что 0,01 % суспензия, а также фракция с крупными частицами, обладают повышенной гемолитической активностью. Наиболее интенсивный гемолиз происходит в первые минуты контакта эритроцитов с нано-SiO₂, со временем гемолитический эффект уменьшается и после 90 мин практически прекращается (рис. 1). Наблюдаемое экспоненциальное уменьшение гемолитической активности во времени может быть объяснено насыщением поверхности частиц компонентами лизированных клеток. Не исключено, что более мелкие частицы, сорбированные на мембранах, повышают резистентность клеток к гемолизу. Механизм этого явления может заключаться в блокировании адсорбционных центров мембраны мелкими частицами кремнезема, что предотвращает присоединение крупных частиц.

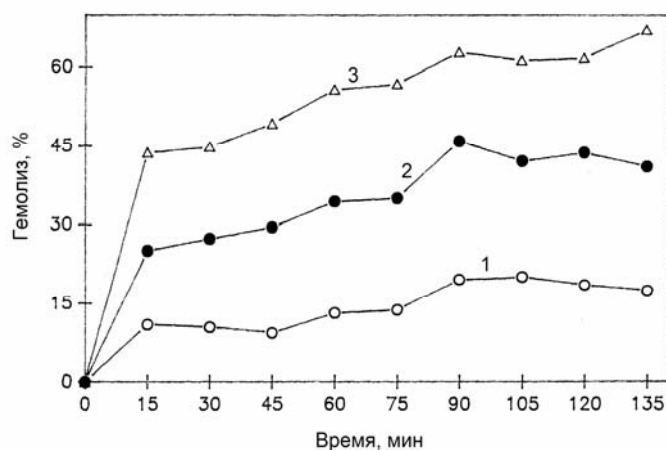


Рис. 1. Динамика гемолиза *in vitro* в присутствии: 1 – 0,001 % суспензии нано-SiO₂; 2 – 0,005 % нано-SiO₂; 3 – 0,01 % нано-SiO₂ [18].

Для исследования взаимодействия нано-SiO₂ с эритроцитами неоднократно применялся метод лазерной проточной цитофлуориметрии [18–23]. Исследование проводили с помощью цитофлуориметра "FACStar Plus" (Becton Dickinson), аргоновый лазер, $\lambda=488$ нм. В работе [21] показано, что после контакта эритроцитов с суспензией нано-SiO₂ наблюдается быстрый, (в течение 1–2 мин), рост интенсивности прямого светорассеяния, что можно объяснить переходом клеток предположительно в сфероидную форму. Далее происходит постепенное уменьшение популяции клеток с большим светорассеивающим сигналом в результате гемолиза (рис.2). Очевидно, деформированные после адсорбции нано-SiO₂ эритроциты легче подвержены гемолизу, чем нативные дискоциты. Деформация эритроцитарных мембран в результате адсорбции нано-SiO₂ подтверждается данными, приведенными в работе [24].

В работе [22] суспензию, содержащую 10⁶ отмытых эритроцитов здорового донора, смешивали с 1 мл 0,01 % дисперсии нано-SiO₂, состоящей из стандартных частиц размером 7 нм (Sigma Chem. Co, St Louise, MO). Регистрацию интенсивностей прямого и бокового светорассеяния проводили через 1; 5; 10; 20; 40 и 60 мин после начала взаимодействия. Установлено, что уже в течение первых минут в суспензии появляется популяция клеток с большим светорассеивающим сигналом, что автор объясняет трансформацией формы эритроцита из дискоидной в сфероидную. В дальнейшем, с течением времени происходит постепенное увеличение прямого и уменьшение бокового светорассеяния. Цитограммы для суспензий с временами инкубации более 10 мин отражают возрастающую гетерогенность клеток по форме и размерам. Параллельно изучены закономерности гемолиза при постоянной концентрации нано-SiO₂ (0,01 %) и возрастающих количествах эритроцитов в инкубируемых смесях. Установлено, что абсолютное количество лизированных клеток находится в прямой, а относительное

количество (степень гемолиза) – в обратной зависимости от концентрации клеток в суспензии. На этом основании высказано предположение, что лизис эритроцитов происходит избирательно, в зависимости от плотности отрицательного заряда на клеточной поверхности, которая, в свою очередь, обусловлена "архитектурой" надмембранного матрикса. Так, преимущественно будут разрушаться старые эритроциты, имеющие в структуре мембраны более низкое, по сравнению с молодыми клетками, количество отрицательно заряженных остатков сиаловых кислот.

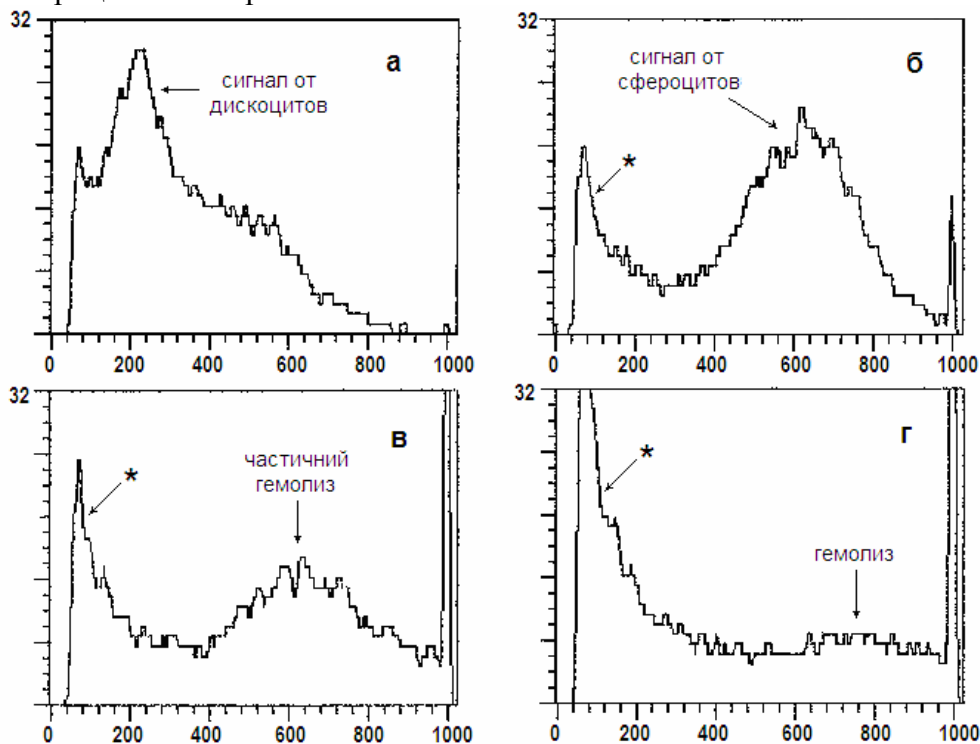


Рис. 2. Гистограммы интенсивностей прямого светорассеяния эритроцитов после контакта с nano-SiO_2 : а – исходные эритроциты; б – через 1–2 мин после контакта; в – через 5 мин; г – через 20 мин. (*) – накопление ассоциатов наночастиц SiO_2 с фрагментами клеток. По оси абсцисс – интенсивность (усл.ед.), по оси ординат – количество сигналов [21].

Следовательно, возможно осуществление типирования эритроцитов по величине поверхностного заряда, что может быть использовано для изучения процесса их старения [25]. Данные по гемолизу при постоянной концентрации nano-SiO_2 и возрастающих количествах эритроцитов [22] согласуются с результатами по гемолизу, проведенному в присутствии различных концентраций nano-SiO_2 [18]. В обоих случаях степень гемолиза линейно возрастает с увеличением отношения суммарной поверхности частиц кремнезема к суммарной поверхности эритроцитов в системе S_p/S_c .

Морфологические и функциональные изменения в мембранах эритроцитов, вызванные взаимодействием с наночастицами SiO_2 , были изучены методами сканирующей электронной микроскопии и диэлектрической спектроскопии, параллельно выполняли гемолиз-тест [26]. Суспензии с возрастающей концентрацией nano-SiO_2 от 0,06 до 0,51 мг/мл приводили в контакт с суспензией эритроцитов в изотоническом буфере, после чего в динамике, через 10, 25 и 60 мин, наблюдали за изменением формы клеток. Установлено, что мембраны эритроцитов, вступивших в контакт с сорбентом, деформируются, на них появляются характерные выпячивания и выросты (внешняя схожесть с формой эритроцитов, помещенных в гипертонический раствор – *Авт.*). Вместе с тем, в суспензии с максимальным временем инкубации – 60 мин – встречаются

одинокые эритроциты, сохранившие нативную дискоидную форму. На этом основании сделан вывод, что эритроциты и частички кремнезема вступают во взаимодействие случайным образом. Характерно, что средний объем деформированных эритроцитов существенно не изменялся. Определение плотности мембранных белков показало, что она существенно снижена у эритроцитов, обработанных нано-SiO₂, который посредством силанольных групп связывает и извлекает мембранные белки из липидного бислоя. Изучение мембранной проводимости выявило, что данный показатель также значительно снижается в результате взаимодействия эритроцитов с поверхностью кремнезема. Это подтверждает предположение об экстракции или денатурации под влиянием нано-SiO₂ интегральных мембранных протеинов, ответственных за транспорт ионов через мембрану. Как показывают данные гемолиз-теста, степень гемолиза линейно возрастает с увеличением показателя S_s/S_c в системе, что хорошо согласуется с результатами [18, 22]. По мнению авторов [26] показатель S_s/S_c является наиболее объективным, так как он не зависит от абсолютного значения объемной доли, занимаемой эритроцитами. Обнаружена также корреляция между ионной проводимостью мембран и степенью гемолиза эритроцитов. Эта корреляция указывает на то, что основным звеном в механизме адсорбции частиц кремнезема на мембране эритроцитов является денатурация интегральных мембранных белков вследствие электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными центрами кремнеземной поверхности. Установлено, что степень выраженности всех перечисленных изменений в морфологии и функциях мембран коррелирует как с увеличением времени инкубации, так и с ростом концентрации кремнезема в суспензии [26].

Изучали взаимодействие частиц коллоидного кремнезема с мембранами эритроцитов человека, нативными и обработанными ферментом нейраминидазой для удаления сиаловых кислот [27]. Частицы для исследования были взяты такого размера, чтобы, адсорбируясь, они не нарушали целостность клеток. Топографию поверхности мембраны исследовали методом трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии, количество частиц кремнезема, приходящихся на один эритроцит, оценивали по данным рентгеноспектрального микроанализа, определяли также электрофоретическую подвижность клеток. Обнаружено, что поверхность клеток, вступивших в контакт с коллоидным кремнеземом, становится шероховатой, а сами эритроциты в основном сохраняют нативную форму. Установлено также, что адсорбция кремнезема практически не влияет на электрофоретическую подвижность эритроцитов. После удаления с мембраны отрицательно заряженных остатков сиаловых кислот клетки полностью утрачивают способность к движению в электрическом поле. Адсорбция отрицательно заряженных частичек кремнезема на обработанных ферментом клетках приводит к частичному восстановлению их электрофоретической подвижности. Оценка количества кремнезема, адсорбированного одним эритроцитом, дает величину порядка $4,5 \cdot 10^{-13}$ г SiO₂ на одну клетку. Принимая среднюю величину поверхности эритроцита 145 мкм^2 , плотность SiO₂ – $1,0 \text{ г/см}^3$ и средний диаметр частиц – 5 нм , рассчитали количество частиц, приходящихся на один эритроцит, – $6,7 \cdot 10^6$ частиц, плотно размещенных на поверхности клетки.

Для определения минимальной гемолитической концентрации кремнезема отмытые эритроциты здорового донора инкубировали с последовательно разведенными 1: 2 суспензиями нано-SiO₂, начиная с концентрации 0,0015% [28]. Степень гемолиза определяли фотокolorиметрически по количеству высвободившегося гемоглобина. Как оказалось, заметный гемолиз (свыше 15 %) наблюдается при концентрации нано-SiO₂ 0,0002% и выше. Данное значение было использовано для приблизительного расчета степени заполнения поверхности эритроцита частичками кремнезема, при котором начинается гемолиз. При расчете принимали средний радиус частичек нано-SiO₂–

аэросила А-300 – 5 нм, а среднюю площадь поверхности эритроцита – $150 \cdot 10^6$ нм². Как оказалось, заметный гемолиз начинается, когда количество частиц, приходящихся на одну клетку, составляет около 1 млн, что хорошо согласуется с данными [27]. При этом частицы нано-SiO₂ покрывают не более половины поверхности эритроцита. Реально степень заполнения, вызывающая гемолиз, очевидно будет меньшей, поскольку не все частички адсорбируются на клетке [28].

Данные о взаимодействии нано-SiO₂ с рецепторным аппаратом клеточной мембраны получены в результате изучения влияния сорбента на розеткообразование лимфоцитов [29]. Установлено, что сорбент связывает значительное количество Т-лимфоцитов: при концентрации нано-SiO₂ 6 мг/мл их количество, по сравнению с контролем, уменьшалось почти вдвое. Количество В-лимфоцитов также уменьшалось, но в меньшей степени. Адсорбируясь на Т-лимфоцитах, нано-SiO₂, по-видимому, блокирует специфические рецепторы, так как значительно уменьшается количество Т-лимфоцитов, образующих розетки с четырьмя и более эритроцитами. В контроле Т-лимфоцитов, образующих розетки с тремя эритроцитами, было $9,6 \pm 2,2$ %, с четырьмя и более – $39,8 \pm 5,2$ %. В опыте эти показатели составляли соответственно $11,2 \pm 2,4$ и $14,4 \pm 4,3$ % ($p < 0,05$). На образование розеток В-лимфоцитами нано-SiO₂ практически не влиял.

Взаимодействие нано-SiO₂ с эпителиальными клетками кишечника изучали в рамках фармаколога-токсикологического исследования препарата «Силикс» [30,31]. Установлено, что после продолжительного введения силикса в дозах 330 и 1000 мг/кг у отдельных крыс наблюдаются определенные морфологические изменения в эпителии тонкого кишечника, в то время как введение силикса в терапевтической дозе 100 мг/кг существенно не изменяет рельеф слизистой. С тропностью гидрофильного силикса к эпителиоцитам кишечника можно связать следующие эффекты: 1) слизистая оболочка кишечника является барьером для проникновения наночастичек сорбента во внутреннюю среду организма; 2) силикс блокирует рецепторы слизистой, ответственные за адгезию микроорганизмов и связывание токсинов (один из механизмов антидиарейного действия); 3) адсорбционная модификация слизистой способствует ускоренному всасыванию препаратов, введенных вместе с силиксом [21].

На основании обобщения литературных и собственных данных механизм адсорбционного взаимодействия нано-SiO₂ с мембранами животных клеток можно описать с учетом представлений о мозаичности поверхностного заряда клетки. В основе взаимодействия лежит, по-видимому, электростатическое притяжение между отрицательно заряженной поверхностью частиц кремнезема и несущими положительный заряд тетраметиламмониевыми группами в составе мембранных фосфолипидов, а именно, лецитина и сфингомиелина [32] (рис.3). Адсорбцию снижают отрицательно заряженные остатки сиаловой кислоты в составе мембранных гликопротеидов [33]. После фиксации частицы на мембране происходит взаимодействие диссоциированной силанольной группы с протонированными аминогруппами боковых цепей мембранных белков или образуются водородные связи между силанольными группами и вторичными амидными группами белков [12, 34].

В то время как мелкие частицы блокируют адсорбционные центры на поверхности клетки, более крупные сорбируют мембранные белки и фосфолипиды, нарушая целостность мембраны. По отношению к эритроцитам суспензия нано-SiO₂ обладает выраженным мембраноповреждающим действием, что следует учитывать при разработке лекарственных форм нано-SiO₂, предназначенных для парентерального введения.

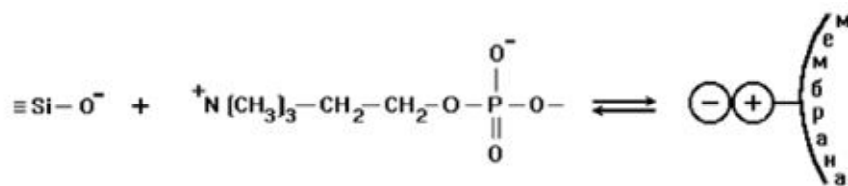


Рис. 3. Возможный механизм прикрепления частиц нанокремнезема на клеточной поверхности по данным [8, 32, 34]. Электростатическое притяжение между диссоциированной силанольной группой и остатком холина в составе интегрированного в мембрану лецитина.

2. Влияние модификации поверхности наноразмерного кремнезема на его мембранотропные свойства.

В данном разделе затронуты следующие виды модификации поверхности нано-SiO₂: 1) модификация как следствие термической обработки; 2) адсорбционная модификация – белком, полимерами; 3) химическая модификация (функционализация).

Изучена гемолитическая активность нано-SiO₂, прогретого на воздухе при температурах 200; 600 и 900 °С в течение разного времени от 25 до 180 мин. Параллельно методом лазерной проточной цитометрии изучали светорассеивающие свойства эритроцитов человека, приведенных в контакт с данными образцами нано-SiO₂ [20]. Установлено, что максимальным гемолитическим действием обладают образцы, прокаленные при 600 °С (рис. 4). Зависимость светорассеивающих свойств эритроцитов от режима термообработки нано-SiO₂ имеет сложный характер, тем не менее на цитограммах двух образцов, прокаленных при 600 °С, обнаруживается наибольшее количество сигналов слабой интенсивности, очевидно, от остатков лизированных клеток. После прокаливания при 900 °С гемолитическая активность нано-SiO₂ несколько снижается, что можно объяснить уменьшением концентрации поверхностных силанольных групп.

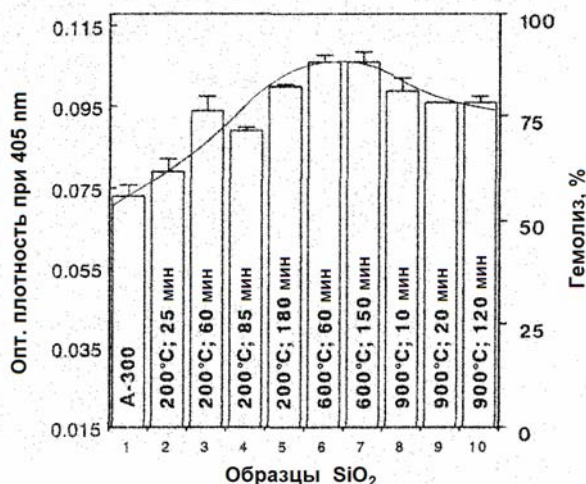


Рис. 4. Гемолитическое действие образцов нано-SiO₂ после разных режимов термообработки. Взвесь эритроцитов человека инкубировали с 0,01 % суспензией нано-SiO₂ в течение 90 мин (рисунок из статьи [20]).

Приведенные выше данные согласуются с результатами изучения белоксорбирующей способности нано-SiO₂, прогретого в вакууме при 700 и 1000 °С [35]. Как видно из табл. 1, образцы, термовакуумированные при 700 °С, обладают наибольшей белоксорбирующей способностью по сравнению с исходным и прогретым при более высокой температуре сорбентом. Это подтверждает вывод о том, что взаимодействие

кремнезема с мембранными протеинами является важной составляющей механизма мембранолиза.

Структура поверхности кристаллического и аморфного пирогенного кремнезема, прокаленных при разных температурах вплоть до 1095°C, была изучена методом ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием. Параллельно испытывали гемолитическую активность полученных образцов [36].

Таблица 1. Предельная сорбция белка на термовакуумированном нано-SiO₂ [35]

Образцы нано-SiO ₂ (аэросила А-300)	Предельная сорбция белка, мг/г	
	Бычий сывороточный альбумин	Яичный альбумин
Исходный	710 ± 20	480 ± 70
после 700 ± 50°C	800 ± 30	610 ± 60
после 1000 ± 50°C	550 ± 20	370 ± 20

Установлено, что для непрокаленных материалов удельная поверхность аморфного и кристаллического кремнезема различаются почти в 40 раз, а интенсивность полосы силанольной группы при 3745 см⁻¹ на порядок больше у аморфного кремнезема, чем у кристаллического. Подобное различие обнаружено при изучении гемолитической активности обоих материалов, оказавшейся выше для аморфного кремнезема. Интенсивность полосы силанольной группы возрастала при прокаливании обоих материалов, достигая максимального значения для образцов, прокаленных при 500°C, с последующим резким падением для материалов, прокаленных при температуре около 1100°C. Данные по гемолитической активности прокаленных образцов повторяли закономерности изменения интенсивности полосы силанольной группы. Полученные результаты подтверждают решающую роль поверхностных силанольных групп нано-SiO₂ в реализации его гемолитических свойств.

В экспериментах с эритроцитами было изучено влияние адсорбционной модификации белком на гемолитическую активность кремнезема [28]. Перед проведением гемолиза 0,01 % суспензию нано-SiO₂ предварительно инкубировали в течение 30 мин с различными количествами альбумина человеческой сыворотки, добиваясь модифицирования поверхности частиц слоем белка молекулярной толщины. При этом, как видно из табл. 2, пороговая концентрация альбумина, ниже которой гемолиз не происходит, находится в интервале 0,0025 – 0,005 %. Если бы целостность мембран эритроцитов нарушалась только за счет механического повреждения частичками кремнезема, то присутствие белка не влияло бы на гемолиз. Таким образом, гемолиз обусловлен физико-химическим взаимодействием нано-SiO₂ с мембранами эритроцитов, поскольку при достижении определенной концентрации белка, при которой блокированными оказываются все активные центры поверхности кремнезема, гемолиз прекращается.

Таблица 2. Динамика гемолиза в присутствии разных количеств белка [28].

Концентрация альбумина, %	Степень гемолиза, %, через		
	10 мин	30 мин	60 мин
0 (контроль)	57	85	88
0,0025	6,5	16	47
0,005	0	0	0,3
0,01	0	0	0

Изучено взаимодействие эритроцитов здорового донора с поверхностью нано-SiO₂, которая была модифицирована адсорбционной иммобилизацией поливинилпирролидона

(ПВП), поливинилового спирта (ПВС) и полиэтиленгликоля (ПЭГ) [37]. Адсорбция осуществлялась главным образом за счет водородных связей между поверхностными силанольными группами nano-SiO_2 и OH-группами или донорными атомами кислорода полимера. Величины максимальной адсорбции, или емкость монослоя, при этом составили для ПВП 175 мг/г, для ПВС – 150 мг/г, а для ПЭГ – 125 мг/г. Зависимость гемолитической активности от количества адсорбированного полимера носит скачкообразный характер. Так, при содержании ПВП в количестве 20 мг/г, что составляет лишь 11 % от монослоя, гемолитическая активность уменьшается с 56 % до 4 %, причем дальнейшее увеличение содержания полимера практически не влияет на степень гемолиза, которая остается на уровне контроля. Для ПВС резкое уменьшение гемолиза наблюдается после 50 мг/г. Для ПЭГ зависимость имеет более плавный характер, снижение степени гемолиза до контрольных значений наблюдается при концентрациях полимера 100 мг/г и выше. Обнаруженные закономерности могут быть обусловлены блокированием силанольных групп первичных частичек nano-SiO_2 , ответственных за гемолитические свойства. Показано, что белоксорбирующие свойства образцов, модифицированных полиэтиленоксидом-400 (аналог ПЭГ), снижались по мере увеличения содержания полимера, однако оставались на достаточно высоком уровне, не менее 200 мг/г [38]. Таким образом, модифицирование поверхности nano-SiO_2 водорастворимыми полимерами позволяет повысить его биосовместимость при сохранении высокой белоксорбирующей способности.

В работе [39] изучали влияние на гемолитические свойства nano-SiO_2 модифицирования хитозаном. Как и в предыдущем случае, обнаружено снижение, гемолитической активности, хотя и более плавное. При модифицировании поверхности хитозаном на 70 % и выше от емкости монослоя удается достичь снижения гемолитической активности на порядок по сравнению с исходным препаратом. В данном случае блокирование силанольных групп поверхности nano-SiO_2 происходит за счет образования адсорбционных комплексов с аминогруппами пиранозных циклов хитозана $\text{RNH}_3^+ \text{OSi} \equiv$. Также вероятно образование водородных связей между гидроксильными группами пиранозных циклов хитозана и силанольными группами поверхности кремнезема. Следует отметить, что растворы самого хитозана обладают гемолитической активностью, которая резко уменьшается после адсорбции. Таким образом, наблюдается обоюдная нейтрализация гемолитических свойств за счет взаимодействия между силанольными группами поверхности кремнезема и активными центрами хитозана.

Изучена гемолитическая активность немодифицированного кремнезема и кремнезема, химически модифицированного оксидом алюминия, по отношению к эритроцитам овцы и лошади [33]. Использовали гидрозоли аморфного кремнезема Ludox HS и модифицированного алюминатом кремнезема Ludox AM со сферическими частицами диаметром 13–14 нм. Отношение Al/Si на поверхности модифицированного кремнезема составляло 4 %. Обнаружена низкая устойчивость эритроцитов овцы к действию обоих видов кремнезема, что можно объяснить малым содержанием мембранных сиаловых кислот, противодействующих адсорбции отрицательно заряженных частиц кремнезема. Устойчивость эритроцитов лошади к гемолизу существенно выше, причем алюмокремнезем обладает меньшей гемолитической активностью, чем немодифицированный кремнезем. После удаления с помощью нейраминидазы остатков сиаловых кислот с поверхности эритроцитов лошади их устойчивость к гемолизу резко снижается, приближаясь к устойчивости эритроцитов овцы, а разница в гемолитической активности обоих видов кремнезема нивелируется. Таким образом, подтвержден электростатический механизм связывания частиц кремнезема с клеточной мембраной и установлена противодействующая роль сиаловых кислот в реализации данного механизма. О существенном изменении свойств nano-SiO_2 ,

в том числе снижении гемолитической активности, в результате модифицирования незначительными количествами оксида алюминия сообщается также в работах [40,41].

В табл. 3 представлены результаты изучения гемолитической активности пирогенного кремнезема, модифицированного разными количествами оксида алюминия. Образцы были получены совместным высокотемпературным гидролизом хлоридов кремния и алюминия (образцы предоставлены к.х.н. Зарко В.И.).

Таблица 3. Гемолиз в присутствии пирогенных алюмокремнеземов различного состава и данные по адсорбции белка.

Al ₂ O ₃ (% масс.) в объеме SiO ₂	Al-O (% ат.) на поверхности SiO ₂	Удельная поверхность, м ² /г	Степень гемолиза через 1 ч, %	Адсорбция желатина, мг/г
0 (100% SiO ₂)	0	300	100	360
1	7	207	71	340
3	28	188	60	283
8	29	308	81	321
23	12	353	49	380
30	2	239	55	261
75	35	118	13	207
100	39	125	0	100

Как показали данные оже-электронной спектроскопии, у этих образцов состав поверхности частиц отличался от объемного состава, определенного химическим путем. Значительно варьировала удельная поверхность сорбентов, определенная по низкотемпературной десорбции азота. Что касается фазового состава поверхности, то на основании совокупных результатов изучения ИК-, ЯМР-спектров и ζ-потенциалов установлено, что в образцах с содержанием Al₂O₃ более 20 % масс. этот оксид формирует отдельную фазу в виде поверхностных кластеров [42, 43]. Несмотря на сложность описания поведения таких частиц, в целом наблюдается тенденция: к снижению степени гемолиза с увеличением содержания фазы оксида алюминия в структуре частиц. В этом же направлении при нейтральном pH среды заряд частиц постепенно меняется с отрицательного (у SiO₂) на положительный (у Al₂O₃). Полученные данные подтверждают ключевую роль в механизме гемолиза электростатического притяжения между положительно заряженными группами тетраметиламмония в эритроцитарной мембране и отрицательно заряженной поверхностью кремнезема. Показатель адсорбции белка находится в прямой зависимости от удельной поверхности сорбента и меньше связан со степенью гемолиза (табл. 3).

В работе [28] изучены закономерности гемолиза в присутствии γ-аминоэтоксид-аэросила (-SiO-R-NH₂), карбоксиаэросила (-SiO-R-COOH) и метилкремниевой кислоты – аэросила, частично гидрофобизованного СН₃-группами, в сравнении с немодифицированным нано-SiO₂ (гидроксид-аэросилом). К эритроцитам здоровых доноров прибавляли 0,01 % дисперсных кремнеземов, после чего регистрировали динамику гемолиза. Как было обнаружено, карбоксиаэросил и гидрофобизованный кремнезем не вызывают гемолиза, в то время как в присутствии немодифицированного нано-SiO₂ гемолиз составляет в динамике от 70 до 100 %. В присутствии аминоаэросила гемолиз составил около 30 %, что можно пояснить частичным гидролизом этой субстанции с образованием гидроксид-аэросила, который в конечном счете вызывает гемолиз.

Нами изучены гемолитические и белоксорбирующие свойства нано-SiO₂, поверхность которого модифицирована метильными группами путем взаимодействия с

диметилдихлорсиланом и триметилхлорсиланом (образцы предоставлены к.х.н. Куземой П.А.). Образцы имели степень замещения ОН-групп на СН₃-группы от 0,27 до 0,43 и смачивались водой. Как было установлено (табл. 4), в каждой паре образцов, обработанных одним модификатором, гемолитическая активность убывает с увеличением гидрофобности поверхности. Все образцы, в том числе обладающие малой гемолитической способностью, примерно одинаково хорошо адсорбировали белок.

Таблица 4. Гемолитические и белоксорбирующие свойства частично гидрофобизованного нано-SiO₂.

Тип кремнезема	Степень замещения ОН-групп на СН ₃ - группы	Степень гемоллиза, %	Адсорбция желатина, мг/г
Немодифицированный (аэросил А-300)	0	83	320
Модифицирован диметилдихлорсиланом	0,27	60	308
	0,38	30	276
Модифицирован триметилхлорсиланом	0,36	64	311
	0,43	16	315

Изучено влияние кремнезёмов, поверхность которых химически модифицирована различными группами, на поведение тучных клеток, обладающих высокой чувствительностью к влиянию чужеродных веществ и быстрой ответной реакцией [44]. Взвесь тучных клеток экссудата брюшной полости крыс инкубировали с 2 % суспензиями кремнезёмов в течение 30 мин, после чего подсчитывали число клеток в фазе активации и количество погибших клеток. Оказалось, что немодифицированный нано-SiO₂ вызывал наибольший уровень активации клеток, которая характеризуется деформацией мембраны, образованием на ней гранул и проникновением их в клетку, выбросом ядра через наиболее перегруженные участки мембраны. Вместе с тем, количество погибших клеток после контакта с немодифицированным кремнезёмом составило всего 23 %, в то время как гидрофильный алюмокремнезём вызывал необратимое разрушение мембран и гибель 62 % клеток. Высокий процент гибели клеток наблюдался в случае фосфорсодержащих кремнезёмов. Гидрофобный кремнезём, модифицированный метильными группами, практически не оказывал воздействия на клетки. Таким образом, проведенное цитологическое исследование показало, что тучные клетки чувствительны к действию гидрофильных дисперсных кремнезёмов.

Приведенные литературные данные и результаты собственных наблюдений свидетельствуют о существенном влиянии модифицирования поверхности наноразмерного кремнезёма на его мембранотропные свойства. Можно считать доказанным, что нано-SiO₂, гидрофобизованный метильными группами, обладает меньшим мембраноповреждающим действием по сравнению с немодифицированным кремнезёмом, сохраняя при этом высокую белоксорбирующую способность. Полученные данные в целом согласуются с представлением об электростатической природе взаимодействия SiO₂–биомембрана.

3. Взаимодействие наноразмерного кремнезёма с патогенной микрофлорой. Агглютинация микроорганизмов.

Одним из проявлений мембранотропных свойств нано-SiO₂ является адсорбция частиц кремнезёма на поверхности одноклеточных микроорганизмов, приводящая в конечном итоге к их агглютинации с образованием хлопьевидных конгломератов.

Изучено взаимодействие нано-SiO₂ с музейными и клиническими штаммами кишечной палочки, золотистого стафилококка, вульгарного протей, синегнойной палочки

[45, 46]. Перечисленные микроорганизмы относятся к одноклеточным прокариотам, структура поверхности которых представлена, в частности, сложным набором рецепторов в основном гликопротеидной природы. Суточные культуры бактерий вводили в контакт с сорбентом, фильтровали, и фильтрат высевали на питательные среды. Установлено, что нано-SiO₂ в концентрации 0,33–1,33% связывает 99–100% микроорганизмов (до 3·10⁹ микробных тел на 1 г сорбента), независимо от их вида. Высоким сродством нано-SiO₂ к микроорганизмам, накапливающимся в кишечнике в процессе колонизации, можно отчасти объяснить механизм антидиарейного действия силикса [46, 47].

С использованием феномена агглютинации изучены некоторые количественные характеристики взаимодействия микробных клеток и частиц кремнезема [46]. Взвесь нано-SiO₂ на изотоническом растворе NaCl в разных соотношениях смешивали со взвесью кишечной палочки. Через 2–3 мин смесь микроскопировали при увеличении 8 х 40, отмечая наличие или отсутствие агглютинатов – скоплений микробных тел, фиксированных на студнеобразных хлопьях нано-SiO₂ (табл. 5).

Таблица 5. Агглютинация кишечных палочек взвесью нано-SiO₂ по данным [46].

Количество микроорганизмов в 1 мл	Концентрация нано-SiO ₂ , мг/мл					
	2	1	0,5	01	0,01	0,001
10 ⁹	+++	+++	+++	+	–	–
10 ⁸	+++	+++	+++	++	–	–
10 ⁷	+++	+++	+++	++	+	–
10 ⁶	++	++	++	+	+	+

Примечание: наличие агглютинации и степень ее выраженности обозначена "+"

Было подсчитано, что агглютинация наступает, если на 1 микробную клетку приходится не менее 6,6·10⁵ частиц нано-SiO₂. Бактериологические исследования свидетельствуют о прочном связывании микроорганизмов сорбентом: после фильтрования через бумажный фильтр смеси сорбента с микробами в фильтрате не обнаруживаются кишечные палочки, хотя этот фильтр пропускает нано-SiO₂ и микроорганизмы по отдельности. При фильтровании смеси, где количество кремнезема недостаточно для агглютинации, в фильтрате обнаруживаются микроорганизмы. По поводу механизма агглютинирующего действия сорбента предполагается, что структурами, ответственными за взаимодействие нано-SiO₂ с микробной клеткой, являются белки-адгезины фимбрий (пилей).

Дополнительные сведения получены при изучении взаимодействия нано-SiO₂ с микроорганизмами, обработанными модифицирующими агентами – трипсином (гидролизует белки наружной поверхности клетки), лизоцимом (расщепляет пептидогликаны микробной стенки), тритоном X-100 (солюбилизирует мембранные белки и фосфолипиды) и ЭДТА (связывает двухвалентные катионы, способствуя экстракции белков, вызывает дисконплектацию полисахаридного слоя) [46]. Было обнаружено, что после обработки кишечных палочек данными модификаторами их связывание сорбентом уменьшается до 60,2; 55,7; 46,0 и 37,7%, соответственно (без обработки связывание близко к 100 %). Полученные данные подтверждают ключевую роль мембранных белков в механизме связывания нано-SiO₂ с клеточной поверхностью: мембранотропная активность нано-SiO₂ снижается после обработки клеток веществами, которые нарушают структуру мембран и приводят к потере мембранных белков. Также установлено, что обработка микроорганизмов названными веществами приводит к их повышенной гибели при последующем контакте с нано-SiO₂.

Сравнение адсорбции патогенной микрофлоры нано-SiO₂ (силиксом) и энтеросгелем проведено в работе [21]. Установлено, что силикс адсорбирует культуры *P. vulgaris* и *C.*

albicans в пределах 98–99 %, способность связывать *E.coli* оказалась несколько меньшей. Энтеросгель адсорбирует только *S. aureus* и *C. albicans*, при этом показатели адсорбции были довольно низкими, от 6 до 19 %. Взаимодействие силикса с микробными клетками авторы объясняют сродством к гликопротеидным структурам и фосфолипидам мембран, а также к расположенным на поверхности клеток рецепторам, ферментам и другим структурам белковой природы. Разницу в адсорбции микроорганизмов можно пояснить различиями в физико-химических свойствах поверхности бактерий, таких как значение изоэлектрической точки, плотность поверхностного заряда, содержание белка в протеингликановом компоненте и др.

Изучение взаимодействия нано-SiO₂ с раневой микрофлорой показало, что он одинаково интенсивно связывает как грам-положительный стафилококк, так и грам-отрицательную синегнойную палочку [48–50]. Методом растровой электронной микроскопии (электронный микроскоп JES-100S с растровой приставкой ASID-S) показано, что частицы кремнезема в большом количестве адсорбируются на поверхности микробов с образованием конгломератов (рис. 5).

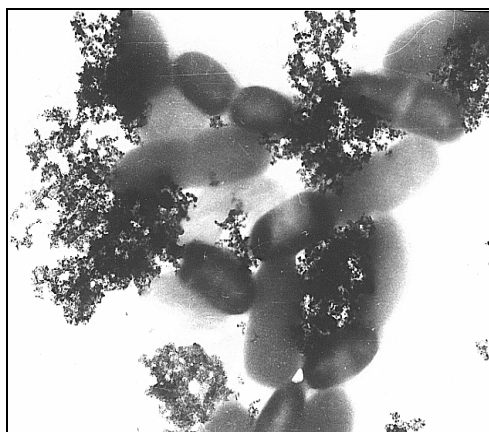


Рис. 5. Агглютинация синегнойных палочек в суспензии нанокремнезема (электронная микрофотография, увеличение 20000). Фото из работы [51].

Установлено, что кремнезем непосредственно не оказывает разрушающего действия на большинство полимеров, входящих в состав цитоплазматической мембраны микробов и не приводит к их лизису. Предполагается, что нано-SiO₂, концентрируясь на поверхности микробной клетки, вызывает нарушение ее функций, в частности нейтрализует адгезивные свойства за счет денатурации мембранных белков и блокирования факторов адгезии [50].

4. Количественное описание взаимодействия наноразмерного кремнезема с биомембранами.

В рассмотренных работах, посвященных механизму взаимодействия реакционных центров поверхности кремнезема с биомембранами, не приводится количественное описание данного взаимодействия. Нами сделана попытка разработать количественную теорию для частного случая – гемолитического воздействия нано-SiO₂ на эритроциты человека в условиях *in vitro* [52].

Отправной точкой для построения теории послужило следующее наблюдение: зависимость степени гемолита от концентрации нано-SiO₂, приведенная, например, в работе [33], и адсорбция белка на поверхности кремнезема [53, 54] описываются одинаковой кривой, отвечающей изотерме Ленгмюровского типа. Иными словами, адсорбция частиц нано-SiO₂ на эритроцитах, приводящая к гемолиту, и адсорбция белков на поверхности нано-SiO₂ подчиняются одинаковым концентрационным закономерностям. Как известно, изотерма Ленгмюра является графическим выражением

закона действующих масс и описывает процесс насыщения [55]. Существуют и другие, биологически значимые процессы, основанные на законе действующих масс, например: 1) образование фермент-субстратного комплекса, подчиняющееся уравнению Михаэлиса–Ментен, и 2) взаимодействие лекарственного вещества (ЛВ) с рецепторами клеточной мембраны, которое описывается уравнениями классической теории действия лекарств Кларка–Аренса [55,56]. Очевидно, последняя модель является более подходящей для количественного описания процесса кремнеземиндуцированного гемолиза. Это обусловлено, во-первых, аналогией между молекулами ЛВ и наночастицами SiO_2 , играющими роль “эффекторов” (в терминах теории Кларка–Аренса). Во-вторых, оба процесса включают две по сути одинаковые стадии: 1) адсорбцию молекул ЛВ или наночастиц SiO_2 на рецепторах или реакционных центрах мембраны и 2) ответ клетки в виде фармакологического эффекта или гемолиза.

Итак, адсорбция нано- SiO_2 на мембране отвечает равновесию:



где P – незанятые центры адсорбции (рецепторы) на мембране; $P * \text{SiO}_2$ – комплексы “рецептор–частица нано- SiO_2 ”.

Соответствующая константа равновесия имеет вид:

$$K = \frac{[P * \text{SiO}_2]}{[P][\text{SiO}_2]}. \quad (2)$$

Для константы диссоциации $K_{-1} = 1/K$ имеем:

$$K_{-1} = \frac{\{P_0 - [P * \text{SiO}_2]\} [\text{SiO}_2]}{[P * \text{SiO}_2]}, \quad (3)$$

где P_0 – общее количество центров адсорбции (занятых и свободных) на мембране. Из предыдущего уравнения следует:

$$[P * \text{SiO}_2] = \frac{P_0 [\text{SiO}_2]}{K_{-1} + [\text{SiO}_2]}. \quad (4)$$

Согласно теории Кларка–Аренса величина фармакологического эффекта прямо пропорциональна концентрации комплексов $E = \alpha [P * \text{ЛВ}]$, где коэффициентом пропорциональности α служит константа внутренней активности. В случае гемолиза это выглядит следующим образом:

$$D = \alpha [P * \text{SiO}_2], \quad (5)$$

где D – оптическая плотность в определенной полосе поглощения свободного гемоглобина, которую используют в качестве меры гемолиза.

Иными словами, для того, чтобы нано- SiO_2 вызвал гемолиз, недостаточно только адсорбции на рецепторах, а необходимо, чтобы взаимодействие с рецепторами было эффективным («гемолитическим»). Если $\alpha=0$, то независимо от количества адсорбированного нано- SiO_2 гемолиз отсутствует (взаимодействие с резистентными эритроцитами), если $\alpha=1$, то каждая адсорбированная частица SiO_2 приводит к гемолизу (взаимодействие со «старыми» эритроцитами).

Исходя из уравнения (4), для степени гемолиза $D/D_{\text{max}} = \gamma$ (обычно выражают в процентах) можно записать:

$$\gamma = \frac{[P * \text{SiO}_2]}{P_0} = \frac{[\text{SiO}_2]}{K_{-1} + [\text{SiO}_2]} \quad (6)$$

или

$$\gamma = \frac{K[\text{SiO}_2]}{1 + K[\text{SiO}_2]}. \quad (7)$$

Из уравнения (6) следует, что K_{-1} равняется равновесной концентрации $[SiO_2]$, при которой регистрируется 50% гемолиз. Уравнение (7) является аналогом уравнения Ленгмюра, из которого можно оценить изменение свободной энергии процесса:

$$\Delta G = -RT \ln \left(\frac{\gamma}{[SiO_2](1-\gamma)} \right). \quad (8)$$

Приведенные уравнения описывают гемолиз эритроцитов, представленных одной популяцией. В реальной крови пул эритроцитов состоит из нескольких популяций («юные», «взрослые», «старые», патологически измененные клетки и др.), для каждой из которых $nano-SiO_2$ характеризуется своей величиной константы внутренней активности. Если для упрощения принять, что между популяциями существуют четкие границы, то вклад i -популяции в общий гемолиз можно записать так:

$$D_i = \gamma \alpha_i \frac{m_i}{m} P_o, \quad (9)$$

где m_i – количество клеток в i -популяции; m – общее число эритроцитов в пуле.

Суммарный гемолиз будет описываться выражением:

$$D = \frac{\gamma P_o}{m} \sum_{i=1}^n \alpha_i m_i. \quad (10)$$

Уравнение (10) получено для модели, в которой P_o одинаково для всех разновидностей эритроцитов, то есть резистентность клеток к гемолизу определяется только внутренними свойствами мембраны, а не количеством рецепторов, которое может быть неодинаковым для разных популяций:

$$D = \frac{\gamma}{m} \sum_{i=1}^n \alpha_i m_i R_{o,i}. \quad (11)$$

Обобщающее уравнение (11) учитывает ответ всего пула эритроцитов на мембраноповреждающее действие $nano-SiO_2$. Приведенные уравнения можно рассматривать как теоретическую основу для разработки методики типирования эритроцитов с помощью стандартной суспензии $nano-SiO_2$.

Выводы

Наноразмерный аморфный кремнезем обладает выраженными мембранотропными свойствами, проявлением которых, в частности, является лизис эритроцитов *in vitro*, видоизменение мембран эпителиоцитов кишечника, активация мембран лимфоцитов и тучных клеток и агглютинация микроорганизмов. В основе мембранотропной активности лежит физико-химическое взаимодействие по типу электростатического притяжения и образования водородной связи между силанольными группами поверхности кремнезема и активными центрами мембранных фосфолипидов и белков. Адсорбция на кремнеземной поверхности белка и полимеров, а также модификация метильными группами, приводят к существенному снижению гемолитической активности. Представлено количественное описание адсорбционного взаимодействия нанокремнезема с поверхностью эритроцитов, основанное на законе действующих масс.

Литература

1. Кремнеземы в медицине и биологии / Под ред. А.А.Чуйко. – Киев–Ставрополь, 1993. – 259 с.
2. Ясуо Кагава. Биомембраны. – М.: Высш. школа, 1985. – 303 с.
3. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985. – 208 с.
4. Molecular biology of the cell/ Alberts B., Bray D., Lewis J. et al., – N. Y. – L., Garland Pub., 1989. – 1219 p.

5. Геннис Р. Биологические мембраны: молекулярная структура и функции.– М.: Мир, 1997.– 624 с.
6. Mehrishi J.N. Molecular aspects of the mammalian cell surface // *Progr. Biophys. Mol. Biol.* – 1972.– V.25.– P.1–70.
7. Cook G.M.W., Heard D.H., Seaman G.V.F. Sialic acids and the electrokinetic charge of the human erythrocyte // *Nature.*– 1961.– V.191.– P.44–47.
8. Биофизика / Под ред. Б.Н. Тарусова, О.Р. Кольс– М.: Медицина, 1968.– 446 с.
9. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран.– Минск: Наука и техника, 1981. – 216 с.
10. Harley J.D., Margolis J. Hemolytic activity of colloidal silica// *Nature.*– 1961.– V.189.– P.1010–1011.
11. Fubini B. Health Effects of Silica // In: *The Surface Properties of Silicas*/ Ed. Andre P.Legrand, Chichester–New York–Toronto: J. Wiley&Sons,, 1998. – P.415–464.
12. Nash T., Allison A.C., Harington J.S. Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity// *Nature.*– 1966.– V.210.– P.259–261.
13. Langer A.M., Nolan R.P. Physicochemical properties of quartz controlling biological activity // In: *Silica, Silicosis and Cancer* / Eds. D.F.Goldsmith, D.M.Winn, C.M.Shy. – N. Y., Praeger Publ., 1986.– P.125.
14. Gabor S, Anca Z, Zugravu E., In vitro action of quartz on alveolar macrophage lipid peroxides // *Arch. Environ. Health.* –1975.– V. 30, №10.– P. 499–501.
15. Gabor S, Anca Z. Effect of asbestos on lipid peroxidation in the red cells// *Br. J. Ind. Med.*– 1975.– V.32, №1.– P.39–41.
16. Dalal N.S., Shi X.L., Vallyathan V. Role of free radicals in the mechanisms of hemolysis and lipid peroxidation by silica: comparative ESR and cytotoxicity studies// *J. Toxicol. Environ. Health.*– 1990.– V.29, №3.– P.307–316.
17. Razzaboni B.L., Bolsaitis P. Evidence of an oxidative mechanism for the hemolytic activity of silica particles // *Environ. Health. Perspect.*– 1990.– V.87.– P.337–341.
18. Adsorption of aerosil on erythrocyte surface by flow cytometry measurements/ B.I.Gerashchenko, I.I.Gerashchenko, V.I.Bogomaz, C.G.Pantazis // *Cytometry.* – 1994. – V.15.– P.80–83.
19. Gerashchenko B.I., Gerashchenko I.I., Bogomaz V.I. Flow cytometric criteria for assessment of silica–cell adsorptive interaction // *Cytometry.*– 1996.– V.23.– P.174.
20. Probing the silica surfaces by red blood cells / B.I.Gerashchenko, V.M.Gun'ko, I.I.Gerashchenko et al.// *Cytometry.*– 2002. –V. 49.– P.56–61.
21. Геращенко І.І., Гунько В.М., Ніцак О.В. Порівняння мембранотропних властивостей силіксу й ентеросгелю // *Мед. хімія.* – 2009.– Т.11.– № 1.– С.25–29.
22. Gerashchenko B.I. Short note: Heterogeneous response of red blood cells to colloidal silica as a criterion for study of their membrane alterations: flow cytometric approach // *Med. Hypotheses.*– 1998.– V.51.– P. 355–357.
23. Gerashchenko I.I., Gerashchenko B.I., Gorchev V.F. Silica – red cell adsorptive interaction by light scattering measurements // *Internat. Symp. Analyt. Cytometry, 2006, Program and Abst.* – P.174.
24. Lindqvist I., Nillson O., Ronquist G. Ultrastructural changes of erythrocyte membranes isolated with colloidal silica solution (Iudox) // *Ups. J. Med. Sci.*– 1974.– V.79.– P.1–6.
25. Gerashchenko B.I., Gerashchenko I.I., Pantazis C.G. Possible selective elimination of red blood cells under the influence of colloidal silica // *Medical Hypotheses.*– 1996.– V.47. – P.69–70.
26. Morphological and functional alterations of human erythrocytes induced by SiO₂ particles: an electron microscopy and dielectric study/ M.Diociaiuti, F.Bordi, L.Gataleta et al.// *Environ. Research Section.*– 1999. –V. A 80.– P.197–207.

27. Cantrell A.C., Ellis P. Reaction of colloidal silica with membranes of intact mammalian cells // *Chem.-Biol. Interactions.*– 1983.– V.44.– P.169–183.
28. Гацький О.О., Геращенко І.І., Луцюк М.Б. Вивчення гемолітичних властивостей високодисперсного кремнезему та його модифікованих форм *in vitro* // *Вісн. морфології.*– 2004.– Т.10, №2.– С.257–260.
29. Сандер С.В. Аплікаційне застосування полісорбу в комплексному лікуванні гнійних ран: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Київ, 1993.– 24 с.
30. Пискун Р.П., Однорогов Ю.В. Морфологическая характеристика внутренних органов крыс, получавших полисорб // В кн.: *Кремнеземы в медицине и биологии/ Под ред. А.А.Чуйко.*– Киев–Ставрополь, 1993.– С.112– 115.
31. Пентюк А.А., Луцюк Н.Б. Токсикологические исследования силикса// В кн.: *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния.* – К., Наук. думка, 2003. – С.180–202.
32. Depasse J., Warlus J. Relation between the toxicity of silica and its affinity for tetraalkylammonium groups // *J. Colloid Interface Sci.*– 1976.– V.56, № 3.– P.618–621.
33. Depasse J. Influence of the sialic acid content of membranes on their sensitivity to silica and aluminate-modified silica // *Environ. Res. earch.*– 1978.– V.16.– P.88–91.
34. Проблеми токсичності кристалічних та аморфних форм кремнезему. Механізми взаємодії частинок кремнезему з клітиною/ О.О. Пентюк, О.О. Чуйко, І.М. Трахтенберг и др.// *Совр. проблемы токсикологии.*– 2004.– № 3.– С. 4–16.
35. Сравнительное изучение сорбционной способности кремнеземсодержащих фаз различной природы по отношению к белку / И.И.Геращенко, Е.В.Тертышная, Н.Б.Луцюк, В.И.Богомаз // *Укр. хим. журн.*– 1992. – Т.58, №. 6. – С.460–462.
36. Surface and bulk infrared modes of crystalline and amorphous silica particles: a study of the relation of surface structure to cytotoxicity of respirable silica/ R.S.Pandurangi, M.S.Seehra, V.L.Razzaboni, P.Bolsaitis // *Environ. Health Perspect.* – 1990.– V.86.– P.327–336.
37. Дослідження взаємодії еритроцитів з поверхнею ентросорбенту «Силікс», модифікованою водорозчинними полімерами / Л.С.Андрійко, О.Л.Габчак, В.І.Зарко та ін. // *Фармацевт. журн.*– 2007.– № 1.– С.83–87.
38. Ніцак О.В., Геращенко І.І., Чекман І.С. Адсорбційні властивості суспензії нанодисперсного кремнезему // *Мед. хімія.*– 2009.– Т.11, № 1.– С.25–29.
39. Вивчення *in vitro* гемолітичних властивостей високодисперсного кремнезему, модифікованого хітозаном / Т.В.Бородавка, Т.В.Кулик, О.О.Гацький та ін. // *Фармацевт. журн.*– 2008.– № 3.– С.94–98.
40. Iler R.K. The effect of surface aluminosilicate ions on the properties of colloidal silica // *J. Colloid Interface Sci.*– 1976.– V.55.– P.25–34.
41. Stalder K., Stöber W. Hemolytic activity of suspensions of different silica modifications and inert dusts // *Nature.* – 1965.– V.207.– P.874–875.
42. Study of surface properties of fumed alumina/silica materials/ V.I.Zarko, V.M. Gun'ko, E. Chibowski et al. // *Colloids and Surfaces. A* – 1997.– V.127.– P.11–18.
43. Highly dispersed X/SiO₂ and C/X/SiO₂ (X = Alumina, Titania, Alumina/Titania) in the gas and liquid media/ V.M. Gun'ko, V.I.Zarko, R.Leboda et al. // *J. Colloid Interface Sci.*– 2000.– V.230.– P.396–409.
44. Богатырев В.М., Рогова М.О., Галаган Н.П. Цитологические исследования влияния высокодисперсных кремнеземов с модифицированной поверхностью на тучные клетки // *Кремнеземы в медицине и биологии / Под ред. А.А.Чуйко.*– Киев–Ставрополь, 1993.– С.240–247.
45. Палий Г.К., Чеснокова А.А. Исследование взаимодействия микроорганизмов с дисперсным кремнеземом // *Там же.*– С.206–212.

46. Штатъко О.І. Експериментальне обґрунтування використання полісорбу як засобу лікування гострих кишкових інфекцій та вірусних гепатитів: Автореф. дис...канд. мед. наук. – Київ, 1993. – 23 с.
47. Штатъко Е.И., Мороз Л.В., Андрейчин М.А. Комплексная терапия инфекционных заболеваний// Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния/ Под ред. А.А.Чуйко.– К.: Наукова думка, 2003. – С.203–255.
48. Эффективность применения силикса в хирургической практике/ О.И.Бондарчук, П.Л.Загниборода, С.В.Сандер, А.А.Чуйко// Там же. – С.298–321.
49. Патент 2021819 RU, А 61 К 47/00, 47/02. Способ лечения раны/ О.И.Бондарчук, Т.А.Кадошук, С.В.Сандер и др. // Заявл.12.02.91., Опубл. 30.10.94., Бюл. № 20.
50. Бондарчук О.И. Механизмы антисептического действия полисорба // Материалы. 2 Укр. научн. конф. с международ. участием "Актуальные проблемы клинической фармакологии". – Винница, 1998.– С. 228–229.
51. Мембранотропные свойства силикса / И.И. Геращенко, Е.И. Штатъко, О.И. Бондарчук, Н.А. Чуйко // Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. – К.: Наук. думка, 2003. – С.168–179.
52. Геращенко І.І., Гунько В.М., Гацький О.О. Кількісний опис взаємодії нанорозмірного кремнезему з еритроцитами// Мед. хімія.–2007.–Т.9.–№ 2.–С.99–102.
53. Геращенко И.И., Штатъко Е.И., Богомаз В.И. Изучение обратимости процесса адсорбции белка на дисперсном кремнеземе//Коллоид. журн.–1992.–Т.54.–С.226–229.
54. Влияние технологических особенностей производства высокодисперсного кремнезема на его белоксорбирующую способность / Е.В.Тертышная, И.И.Геращенко, Н.Б.Луцюк и др. // Укр. хим. журн.– 1996. – Т.62.– № 12. – С.87–90.
55. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ.– Волгоград: Изд-во «Семь ветров», 1999.– 640 с.
56. Чекман И.С. Биохимическая фармакодинамика.– К.: Здоров'я, 1991.– 200 с.

MEMBRANOTROPIC PROPERTIES OF NANO-SIZED SILICA

I.I.Gerashchenko

*Chuiiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine
General Naumov street 17, 03164, Kyiv-164*

The physicochemical aspect of interaction of nanosilica and its modified forms with the cell surface is considered.

МЕМБРАНОТРОПНІ ВЛАСТИВОСТІ НАНОРОЗМІРНОГО КРЕМНЕЗЕМУ

І.І. Геращенко

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова 17, 03164, Київ-164*

Розглянуто фізико-хімічний аспект взаємодії нанорозмірного кремнезему та його модифікованих форм з поверхнею клітин.