МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК 577.346

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ГИДРАТАЦИИ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ГЕТЕРОГЕННЫХ ДИСПЕРСНЫХ СИСТЕМАХ

¹А.В. Адельянов, ¹О.А. Горобченко, ¹О.Т. Николов, ¹С.В. Гаташ, ²Е.М. Мамотюк, ³В.Н. Иващенко

¹Кафедра биологической и медицинской физики, Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, Харьков 61077, Украина;
²Институт медицинской радиологии АМНУ им. С.П. Григорьева, ул. Пушкинская 82, Харьков 61024, Украина;

³Научно-производственное предприятие "SINTA" Ltd., ул. Гвардейской Армии 143, Кулиничи, Харьков 62404, Украина;

e-mail: <u>adel_vil@mail.ru</u>
Поступила в редакцию 7 июня 2010 г.
Принята 20 июня 2010 г.

Представлен метод расчета величины гидратации в многокомпонентных гетерогенных дисперсных системах. На примере трехкомпонентной дисперсной системы, представляющей собой водный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), содержащий ультрадисперсные наноалмазы, проведен расчет гидратации по определенным экспериментально значениям проницаемости Значения комплексной диэлектрической образцов. диэлектрической проницаемости водных растворов БСА (1 масс. %) в присутствие наноалмазов (0-3,15 масс. %) определяли методом СВЧ-диэлектрометрии на частоте 9,2 ГГц. По формулам Дебая рассчитывали значения статической диэлектрической проницаемости образцов, которые и использовали для расчёта степени гидратации. Показано уменьшение значения статической диэлектрической проницаемости системы с увеличением концентрации наноалмазов. Обнаружено увеличение гидратации при добавлении наноалмазов к растворам белка вплоть до концентрации 1,8 масс. %, что можно объяснить высокой способностью наноалмазов связывать воду. Установлено уменьшение гидратации при дальнейшем увеличении концентрации наноалмазов, что может быть обусловлено образованием агрегатов частиц.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: СВЧ-диэлектрометрия, гидратация, наноалмазы, БСА.

МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ МІРИ ГІДРАТАЦІЇ В БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ ГЕТЕРОГЕННИХ ДИСПЕРСНИХ СИСТЕМАХ

¹О.В. Адельянов, ¹О.О. Горобченко, ¹О.Т. Ніколов, ¹С.В. Гаташ, ²Є.М. Мамотюк, ³В.М. Іващенко ¹Кафедра біологічної і медичної фізики, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи 4, Харків 61077, Україна; ²Інстітут медичної радіології АМНУ імені С.П. Григор'єва, вул. Пушкінська 82,

61024 Харків, Україна; ³Науково-виробниче підприємство "SINTA" Ltd., вул. Гвардійської Армії 143, Куліничі, 62404 Харків, Україна

Приведено метод розрахунку гідратації в багатокомпонентних гетерогенних дисперсних системах. На прикладі трикомпонентної дисперсної системи, що є водним розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА), що містить ультрадисперсні наноалмази, проведено розрахунок гідратації по визначеним експериментально значенням діелектричної проникності зразків. Значення комплексної діелектричної проникності водних розчинів БСА (1 мас. %) в присутності наноалмазів (0-3,15 мас. %) визначали методом НВЧ-діелектрометрії на частоті 9,2 ГГц. По формулам Дебаю розраховували значення статичної діелектричної проникності зразків, які і використовували для розрахунку гідратації. Показано зменшення значеннь статичної діелектричної проникності системи із збільшенням концентрації наноалмазів. Виявлено збільшення гідратації при додаванні наноалмазів до розчинів білка до концентрації 1,8 мас. %, що можна пояснити високою здатністю наноалмазів зв'язувати воду. Встановлено зменшення гідратації при подальшому збільшенні концентрації наноалмазів, що може бути обумовлено утворенням агрегатів частинок. КЛЮЧОВІ СЛОВА: НВЧ-діелектрометрія, гідратація, наноалмази, БСА.

© Адельянов А.В., Горобченко О.А., Николов О.Т., Гаташ С.В., Мамотюк Е.М., Иващенко В.Н., 2010

METHOD OF DEFINITION OF DEGREE OF HYDRATION IN MULTICOMPONENT HETEROGENEOUS DISPERSE SYSTEMS

¹A.V. Adeljanov, ¹O.A. Gorobchenko, ¹O.T. Nikolov, ¹C.V. Gatash, ²Ye.M. Mamotjuk, ³V.N. Ivashenko

¹Department of biological and medical physics, V.N. Karazin Kharkov national university, 4 Svogody Sq., 61077 Kharkov, Ukraine;

²S.P. Grigorjev Institute of medical radiology AMSU, 82 Pushkinskaja Str., 61024 Kharkov, Ukraine; ³Scientific Production Enterprise "SINTA" Ltd., 143 Gvardeiskoj Armii Str., Kulinichi,

62404 Kharkov, Ukraine; e-mail: adel vil@mail.ru

The method of calculation of the hydration in multicomponent heterogeneous disperse systems is presented. On an example to the three-component disperse system representing the aqueous solution of bovine serum albumin (BSA), containing ultradisperse nanodiamonds, the calculation of hydration on the experimental values of dielectric permittivity of the samples was carried out. The values of complex permittivity of the aqueous solutions of BSA (1 wt. %) in presence of nanodiamonds (0-3,15 wt. %) were measured by the method of microwave dielectrometry on the frequency of 9.2 GHz. Using the Debye equations the values of static permittivity of the samples which used for the calculation of hydration were determined. The hydration increases at the adding of nanodiamonds to the protein solution up to the concentration of 1.8 wt. %. It can be explained by the strong ability of nanodiamonds to bind water. Hydration decreases at the further increasing in the concentration of nanodiamonds that can be caused by the aggregation of particles.

KEYWORDS: microwave dielectrometry, hydration, nanodiamonds, BSA.

В настоящее время многочисленные исследования показывают, что вода играет основополагающую роль в биологических процессах, являясь одновременно средой для протекания биохимических реакций и непосредственным участником этих реакций [1]. В частности вода является не только неотъемлемым окружением белковых макромолекул, но и необходимым условием для их функциональной активности. Вода оказывает как стабилизирующее воздействие на структуру белков, так и разрыхляющее – с одной стороны гидрофобные взаимодействия стабилизируют структуру глобулярных белков, с другой же конкуренция между молекулами воды за водородные связи между СО- и NH-группами полипептидной цепи приводит к разрыхлению их структуры [2]. Внутри макромолекул белков обнаруживают до десятков молекул воды [2]. В сильно разбавленных растворах различные методы оценки дают порядка 0,3-0,5 г/г для степени гидратации белков [4-6]. На функциональную активность белков могут влиять и наночастицы, которые адсорбируют на своей поверхности белки [7, 8].

Наноалмазы детонационного синтеза (НА) [9] обладают уникальными физикохимическими свойствами: высокоразвитая поверхность частиц (270-280 м²/г), большое количество заряженных групп (карбоксильные, карбонильные, гидроксильные, эфирные), углеродных фрагментов и микропримесей металлов [10,11]. В литературе имеются противоречивые данные о токсичности наноалмазов и возможности их применения в биологии и медицине. Так в работах [12-14] показано, что внутримышечные и подкожные инъекции из стерильных золей наноалмазов не оказывают деструктивного воздействия на клетки в местах локализации, а при внутривенном введении не отмечается изменений в характере сердечной деятельности и состоянии внутренних органов исследованных животных. Имеются данные о противораковой активности и противолучевом воздействии наноалмазов [15, 16]. С другой стороны отмечается деструктивное воздействие наноалмазов на клетки [17].

В связи с вышесказанным представляется актуальным исследование взаимодействия наноалмазов с биологическими макромолекулами. Особенно важно изучение гидратации в таких сложных системах, что особенно актуально в связи с известной способностью наноалмазов оказывать большое влияние на состояние воды в суспензиях [18]. Целью данной работы было определение количества гидратной воды в водных растворах БСА в присутствие наноалмазов. Расчёт гидратации включений в водных растворах на основании измерения диэлектрической проницаемости возможен

различными методами [19, 20]. Однако данные методы применимы только для двухкомпонентных систем, таких, например, как вода-белок. Поэтому целью данной работы было также получение выражений для расчета гидратации в многокомпонентных системах.

ТЕОРИЯ

Известно, что степень гидратации макромолекул можно вычислять исходя из соотношения для эффективной диэлектрической проницаемости гетерогенных дисперсных систем [21], которое легко обобщается на случай произвольного числа компонент [3]:

$$\varepsilon_{\scriptscriptstyle CM} = \varepsilon_0 + \delta f_1(\varepsilon_1 - \varepsilon_0), \tag{1}$$

где f_I — фактор формы частиц-включений, ε_0 , ε_I — диэлектрическая проницаемость воды и диэлектрическая проницаемость частиц-включений, соответственно, δ — объёмная доля частиц-включений.

Предполагая об аддитивности вклада в диэлектрическую проницаемость дисперсной системы объемной доли молекул связанной и свободной воды и диспергированных частиц для объёмной доли включений можно записать [19]:

$$\delta = \delta_1 + \delta_2 = \frac{C\omega}{100} + \frac{C\nu}{100},\tag{2}$$

где ω – удельный объём связанной воды, C – концентрация растворенных частиц, v – удельный объём растворенных частиц. Тогда выражение (1) может быть приведено к виду [19]:

$$\varepsilon_{CM} = \varepsilon_0 + \delta_1 f_1(\varepsilon_{\infty} - \varepsilon_0) + \delta_2 f_1(\varepsilon_{\infty} - \varepsilon_0), \tag{3}$$

где ε_{∞} , $\varepsilon_{\infty 1}$ – высокочастотные диэлектрические проницаемости воды и растворенных частиц, соответственно. Определив экспериментально диэлектрическую проницаемость гетерогенной дисперсной системы $\varepsilon_{c_{M}}$, из соотношения (3) находят объем связанной воды ω , приходящийся на 1 г растворенного вещества [19]. Умножая ω на плотность связанной воды, можно получить степень гидратации в граммах воды на грамм растворённого вещества.

Выражение (3) может быть обобщено для случая, когда гетерогенная дисперсная система является многокомпонентной.

Тогда выражение для диэлектрической проницаемости смеси будет иметь вид:

$$\mathcal{E}_{\text{CM}} = \mathcal{E}_0 + \mathcal{S}_1 f_1(\mathcal{E}_{\infty} - \mathcal{E}_0) + \sum_{i=1}^k \mathcal{S}_i^{i} f_1(\mathcal{E}_{\infty i} - \mathcal{E}_0), \tag{4}$$

где ε_{∞} , $\varepsilon_{\infty 1}$ – высокочастотные диэлектрические проницаемости воды и і-го компонента, соответственно, $\delta_{l}{}'$, $\delta_{i}{}''$ – объёмные доли связанной воды и і-го компонента, соответственно.

Объёмная концентрация включений равна:

$$\delta = \delta_{1}^{'} + \sum_{i=1}^{k} \delta_{i}^{"} = \frac{\sum_{i=1}^{k} C_{i} \omega}{100} + \frac{\sum_{i=1}^{k} C_{i} \nu_{i}}{100}$$
(5)

где v_i — удельный объём і-го компонента.

Подставляя (5) в (4), для диэлектрической проницаемости смеси получаем выражение:

$$\varepsilon_{\text{\tiny CM}} = \varepsilon_0 + \sum_{i=1}^k \frac{C_i}{100} \omega f_1(\varepsilon_{\infty} - \varepsilon_0) + \sum_{i=1}^k \frac{C_i v_i}{100} f_1(\varepsilon_{\infty i} - \varepsilon_0)$$
(6)

Преобразовывая данное уравнение таким образом, чтобы выразить из него ω , получаем окончательно:

$$\omega = \frac{100(\varepsilon_{CM} - \varepsilon_0) - \sum_{i=1}^{n} f_i C_i \nu_i (\varepsilon_{\infty i} - \varepsilon_0)}{\sum_{i=1}^{n} f_i C_i (\varepsilon_{\infty} - \varepsilon_0)}$$
(7).

Частным случаем данной формулы является выражение для трёхкомпонентной смеси, в нашем случае представляющей собой водный раствор белка с наноалмазами:

$$\omega = \frac{100(\varepsilon_{C_{M}} - \varepsilon_{0}) - f_{1}C_{B}V_{B}(\varepsilon_{\infty B} - \varepsilon_{0}) - f_{1}C_{H}V_{H}(\varepsilon_{\infty H} - \varepsilon_{0})}{f_{1}(\varepsilon_{\infty} - \varepsilon_{0})(C_{B} + C_{H})}$$
(8)

где $C_{\it E}$, $C_{\it H}$ — концентрации белка и наноалмазов, соответственно; $v_{\it E}$, $v_{\it H}$. — удельные объёмы белка и наночастиц, соответственно; $\varepsilon_{\it \infty}$, $\varepsilon_{\it \infty E}$, $\varepsilon_{\it \infty E}$ — высокочастотные диэлектрические проницаемости воды, белка и наноалмазов, соответственно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали суспензию ультрадисперсных наноалмазов с исходной концентрацией частиц 3,5 масс. % производства НПП "SINTA" Ltd., Харьков. Концентрация БСА (препарат фирмы "Диа М", США) в водных растворах составляла 1 масс. %, а концентрация наноалмазов варьировалась в диапазоне 0-3,15 масс. %. Методом СВЧ-диэлектрометрии [22] были получены значения комплексной диэлектрической проницаемости растворов БСА в присутствие наноалмазов на частоте 9,2 ГГц. Измерения проводились при комнатной температуре. На основании формул Дебая и приведенных выше расчетов были получены значения статической диэлектрической проницаемости ε_s , эквивалентной диэлектрической проницаемости смеси ε_{cm} , и гидратации включений в исследуемых системах. Погрешность определения гидратации составляла около 50 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 приведены экспериментальные значения статической диэлектрической проницаемости ε_s растворов БСА концентрации 1 масс. % в присутствие наноалмазов концентраций 0-3,15 масс. %, теоретически рассчитанные по формуле (1) значения ε_s системы вода-наноалмазы при тех же концентрациях (без белка) и теоретически рассчитанные по формуле (1), обобщенной для случая трехкомпонентных систем, значения ε_s системы вода-БСА-наноалмазы тех же концентраций. Как видно из рисунка, с увеличением концентрации наноалмазов происходит уменьшение ε_s водных растворов БСА в присутствие наноалмазов. Изменения в значении статической диэлектрической проницаемости являются следствием изменений в количестве свободной воды в системе, как за счет присутствия растворённых веществ, так и за счет связывания ими воды. Значение ε_s наноалмазов

существенно ниже, чем воды, и составляет 1,7-2,7 отн. ед. [23]. Поэтому увеличение концентрации наночастиц в системе вода-ноалмазы приводит к уменьшению значения ε_s . Добавление в систему БСА в концентрации 1 масс. % приводит к уменьшению значений ε_s растворов для всех концентраций наноалмазов, поскольку ε_s белка также существенно меньше, чем у воды (2,5 отн. ед.). Отличие теоретически рассчитанных значений ε_s водных растворов БСА в присутствие наноалмазов от экспериментально измеренных можно объяснить тем, что при теоретических расчётах мы не учитывали взаимодействия БСА с наноалмазами, а также взаимодействия воды с молекулами включений (гидратация). Наноалмазы обладают большим количеством заряженных групп на поверхности, вследствие чего эффективно связывают воду [18], однако при достаточно большой их концентрации могут образовывать агрегаты, т.е. в этом случае будет происходить уменьшение количества связываемой ими воды. Вероятно, этим обусловлено замедление уменьшения статической диэлектрической проницаемости в диапазоне концентраций 2,2-3,15 масс. %.

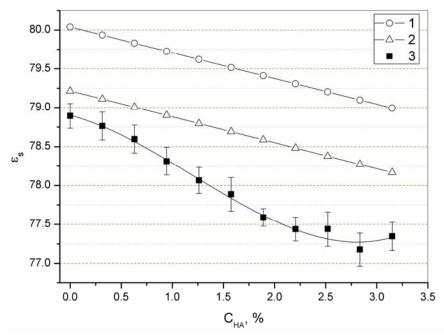


Рисунок 1. 1 — теоретические значения статической диэлектрической проницаемости системы водананоалмазы; теоретические значения статической диэлектрической проницаемости водных растворов БСА концентрации 1 масс. % в присутствие наноалмазов концентраций до 3,15 масс. %; 3 — экспериментальные значения статической диэлектрической проницаемости водных растворов БСА концентрации 1 масс. % в присутствие наноалмазов концентраций до 3,15 масс. %.

Также были рассчитаны значения частоты диэлектрической релаксации молекул воды в растворах БСА в присутствие наноалмазов (f_d) . Существенных отличий в значении f_d для образцов с различной концентрацией наноалмазов не наблюдается. Поэтому можно говорить о том, что не происходит существенных изменений в подвижности свободной воды в системе при изменении концентрации наноалмазов.

По формуле (8) для определения гидратации в трехкомпонентных системах были рассчитаны значения гидратации включений в водных растворах БСА в присутствие наноалмазов. На рисунке 2 приведены значения гидратации ω включений в исследуемых системах. Для перерасчета объема связанной воды в количество связанной воды в граммах считали плотность связанной воды равной 1 г/см³.

Полученные значения гидратации включений в исследуемых системах были аппроксимированы полиномом 3 степени, поскольку для него получается минимальное

среднеквадратичное отклонение. На рис. 2 помимо линии аппроксимации приведены также 95 % доверительные линии для нее. Исследуя аппроксимирующую кривую, приходим к выводу, что при концентрациях наноалмазов вплоть до 1 масс. % не наблюдаются изменения в гидратации включений. Возможно, это обусловлено тем, что концентрация наноалмазов мала, а взаимодействие их с белком не оказывает существенного влияния на количество связываемой ими воды. При дальнейшем увеличении концентрации наноалмазов вплоть до 1,8 масс. % наблюдается тенденция к увеличению гидратации, что можно объяснить высокой способностью наноалмазов связывать воду.

При увеличении концентрации наноалмазов от 1,8 до 3,15 масс. % происходит уменьшение гидратации включений от 0,3 до 0,18 г/г. Как было отмечено, наноалмазы могут взаимодействовать с белками посредством образования S-S мостиков, координационных связей, ионных, гидрофобных, ковалентных взаимодействий, а также их различных комбинаций [24]. Кроме того при достаточной концентрации наноалмазов они могут образовывать агрегаты. Возможно, именно конкурентный характер взаимодействия наноалмазов и воды с БСА, а также образование агрегатов наноалмазов обуславливают уменьшение гидратации включений в исследуемых системах.

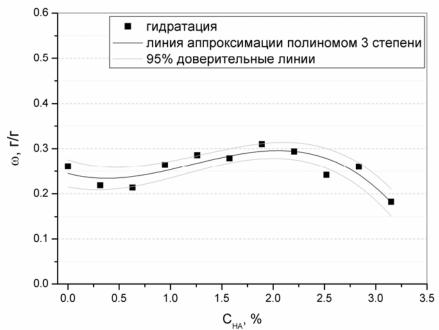


Рисунок 2. Значения гидратации ω включений в водных растворах БСА концентрации 1 масс. % в присутствие наноалмазов концентраций 0-3,15 масс. %.

выводы

Рассмотрен метод расчета величины гидратации многокомпонентных гетерогенных дисперсных системах на основании формул для эффективной диэлектрической проницаемости многокомпонентных матричных систем. По данному экспериментально определенные методу, используя значения диэлектрической проницаемости водных растворов БСА в присутствие наноалмазов, были рассчитаны величины гидратации включений в данных системах. Рассчитаны значения частоты диэлектрической релаксации молекул воды в исследуемых системах.

Теоретически рассчитаны значения статической диэлектрической проницаемости для систем вода-наноалмазы концентраций 0-3,15 масс. % и вода-БСА-наноалмазы. Показан линейный характер уменьшения статической диэлектрической проницаемости

при увеличении концентрации наноалмазов. Показано уменьшение значения статической диэлектрической проницаемости ε_s водных растворов БСА в присутствие наноалмазов с увеличением концентрации наноалмазов, обусловленное увеличением концентрации наноалмазов в системе и переходом свободной воды в связанное состояние. Обнаружена тенденция к увеличению гидратации включений в растворах БСА, содержащих наноалмазы, в диапазоне концентраций наноалмазов 1-1,8 масс. %. Установлено уменьшение степени гидратации включений в исследуемых системах с увеличением концентрации наноалмазов в диапазоне 1,8-3,15%, что может быть связано с агрегацией наноалмазов в данном диапазоне концентраций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Якубке X.-Д., Ешкайт. X. Аминокислоты. Пептиды. Белки. / X. Якубке, X. Ешкайт. M.: Мир, 1985. 246 с.
- 2. Аксенов С.И. Вода и её роль в регуляции биологических процессов. / С. Аксенов. Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2004. 212 с.
- 3. Степин Л.Д. Исследование диэлектрических свойств дисперсных систем: автореф. дисс. на соиск. уч. степени канд. физ.-мат. наук: спец. 01.04.03 "Радиофизика" / Л.Д. Степин. Харьков, 1965. 12 с
- 4. Мревлишвили Г.М. Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул. / Г.М. Мревлишвили. Тбилиси : Мецниереба, 1984. 189 с.
- 5. В.А. Кашпур, В.Я. Малеев, Т.Ю. Щеголева // Молекул. Биология. 1976. T.10. С. 568-575.
- 6. I.D. Kuntz, W. Kauzmann // Adv. Protein Chem. 1974. Vol. 28. P. 259-345.
- 7. В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // Доклады РАН. 2000. Т. 373. С. 251.
- 8. А.П. Пузырь, В.С. Бондарь, П.И. Белобров, А.А. Букаемский // Доклады РАН. 2000. Т. 373. C.408.
- 9. А.М. Ставер, Н.В. Губарева, А.И. Лямкин, Е.А. Петров // Физика горения и взрыва 1984. Т. 20, № 3. С. 100.
- 10. Г.А. Чиганова // Коллоид. Журн. 1994. Т. 56, № 2. С. 266.
- 11. Г.А. Чиганова, С.А. Чиганов // Неорганические материалы 1999. Т. 35, № 5. С. 581.
- 12. A.P. Puzyr A.V. Baron, K.V. Purtov, [etc.] // Diamond and Related Materials. 2007. V. 16. P. 2124-2128.
- 13. А.П. Пузырь, В.С. Бондарь, З.Ю. Селимханова и [др.] // Сибирское медицинское обозрение. 2004. $T.4.-C.\ 19-23.$
- 14. А.П. Пузырь, Е.В. Бортников, Н.Н. Скобелев, и [др.] // Сибирское медицинское обозрение. 2005. T. 1. C. 20-24.
- 15. A.M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, [et. al.] // J. Phys. Chem. B. −2007. − Vol. 111, № 1. − P. 2−7.
- Е.М. Мамотюк, В.А. Гусакова, Н.Е. Узленкова и [др.] // Український радіологічний журнал. 2009.
 № 17. С. 65-71.
- 17. А.П. Пузырь, Д.А. Нешумаев // Биофизика 2005. Т. 50, N 1. С. 101-106.
- 18. Чиганова Г.А. Разработка методов, способов и технологии направленного изменения свойств ультрадисперсных порошков, синтезированных детонационными методами: автореф. дисс. на соиск. уч. степени доктора техн. наук: спец. 05.16.06 "Порошковая металлургия и композиционные материалы" / Г.А. Чиганова. Красноярск, 2006. 41 с.
- 19. T.J. Buchanan, J.H. Haggis, J.B. Hasted, B.J. Robinson // Proc. Roy. Soc. − 1952. − № 213. − P. 379-391.
- 20. Grant E.H., Sheppard R.J., South G.P., Dielectric behavior of biological molecules in solution / Grant E.H., Sheppard R.J., South G.P. Oxford: Clarendon Press, 1978. 237 p.
- 21. J.A. Reynolds // Proceedings Physical Society. 1957. V. 370, 769 p.
- 22. О.Т. Николов, Т.А. Жилякова // Журнал физической химии. 1991. Т.65, №5. С. 1417-1420.
- 23. A.L. Vereshchagin, V.F. Komarov, V.M. Mastikhin, et al. // Proceedings of the Vth All-Union Meeting on Detonation. 1991. V. 1, 99 p.
- 24. В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // Физика твердого тела. 2004. Т. 46, №4. С. 698-704.