

КОМПОЗИТНІ СИСТЕМИ МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ, СТВОРЕНІ НА ОСНОВІ ГІДРОФОБНОГО КРЕМНЕЗЕМУ

В.В. Туров¹, П.П. Горбик¹, Т.В. Крупська¹, С.П. Туранська¹,
В.Ф. Чехун², Н.Ю. Лук'янова²

¹Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна,

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології Національної
академії наук України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна
E-mail: v_turov@ukr.net

На основі метилкремнезему та білкових молекул – лектину і желатину розроблено композитні системи з певною цитотоксичною (АМІ/лектин) та адсорбційною (АМІ/желатин) активністю. Для обох типів композитів досліджено механізми зв'язування води з поверхнею та способи переведення гідрофобних матеріалів у водне середовище. Вивчено стан міжфазної води в повітряному, органічному та кислотному середовищах. Встановлено, що наявність в композитах гідрофобної складової стабілізує поверхневу воду в слабо асоційованому стані, коли значна частина молекул води не утворює водневих зв'язків. Рідке гідрофобне середовище підсилює цей ефект, а додана в нього сильна кислота (трифтороцтова) сприяє переходу води в сильноасоційований стан. Показано, що перерозподіл води в міжчастинкових проміжках АМІ з іммобілізованими на їх поверхні білковими молекулами змінюється під впливом механічних навантажень. Механоактивовані зразки характеризуються можливістю проникнення води в проміжки між первинними частинками метилкремнезему. Показано, що іммобілізація лектину на поверхні АМІ супроводжується збільшенням міжфазної енергії γ_s від 4,1 до 5,2 Дж/г. Це відбувається за рахунок збільшення концентрації сильнозв'язаної води. Якщо проаналізувати зміни в розподілах за радіусами R кластерів адсорбованої води, можна констатувати, що в воді, адсорбованій нативними молекулами лектину, присутні два основних максимуми при $R = 1$ та 3 нм. В іммобілізованому стані максимум при $R = 1$ нм присутні в обох типах води (різної впорядкованості), проте другий максимум спостерігається лише для більш впорядкованих асоціатів.

Ключові слова: лектин, композитна система, метилкремнезем, ¹H ЯМР спектроскопія, желатин, сильноасоційована та слабоасоційована вода, кластери води

Цитотоксичний лектин з протипухлинною активністю

Лектини – речовини білкової природи, які здатні специфічно зв'язувати вуглеводні компоненти на мембранах клітин (в т.ч. і пухлинних). Джерелом виділення лектинів можуть бути практично всі живі організми: рослини, тварини, мікроорганізми. Серед бактерій, в якості продуцентів лектинів, на особливу увагу заслуговують представники роду *Bacillus*, які здатні накопичувати позаклітинні лектини в середовищі росту, що значно спрощує технологічний процес їх одержання.

Відомі бактерійні лектини з протипухлинною активністю одержані з культуральної рідини штаму *B. subtilis* 316М, *B. polymyxa* 102 КДУ, *B. subtilis* В-7014 [1]. Однак дані

лектини не можуть забезпечити необхідний рівень протипухлинної та цитотоксичної активності, яка в значній мірі залежить від штаму-продуцента.

Найбільш близьким аналогом до цитотоксичного лектину з протипухлинною активністю, що заявляється, є позаклітинний сіалоспецифічний лектин сапрофітних бактерій *B. subtilis B-7025*. Він характеризується тим, що це глікопротеїн з молекулярною масою 19-26 кДа з високою гемаглютинуючою активністю та ступенем спорідненості до обох типів сіалових та уронових кислот, а також до фруктозо-1,6-дифосфату. Термостабільний, стійкий до дії рН в діапазоні 4,8–9,1. Належить до помірно й малотоксичних речовин з протипухлинною активністю по відношенню до злоякісних пухлин різного гістогенезу (лімфосаркома Пліса, саркома-45, карцинома Уокера, саркома 180, аденокарцинома молочної залози), з гальмуванням росту пухлини від 9 до 57,8%. Його отримують з культуральної рідини штаму-продуцента *B. subtilis B-7025* за методом Блайя і Дайера [2]. Виділяють ліпофільні речовини, які знаходяться в хлороформовому шарі, потім водно-метанольну фракцію концентрують під вакуумом і знесолюють гельфільтрацією, активні фракції збирають і висушують у вакуумі до сухої речовини. Однак цей бактерійний лектин не має максимального ступеню очищення від речовин з ферментативною активністю.

Відомо, що ефективність синтезу біологічно активних речовин, їх склад та властивості суттєво відрізняються у представників різних штамів [3], в тому числі, що належать до одного виду мікроорганізмів. Тому було поставлено задачу розширення арсеналу біологічно активних протипухлинних речовин бактеріального походження, які не викликають лізису пухлинних клітин (тобто не містять ферментів) та менш токсичні до інтактних (нормальних) клітин організму. Вона була вирішена за рахунок отримання цитотоксичного лектину з високою протипухлинною активністю, виділений з культуральної рідини штаму *B. subtilis IMB B-7724* (задепонованого у колекції Інституту мікробіології та вірусології (ІМВ) ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером *Bacillus subtilis IMB B-7724*, Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізму від 12.03.2018) [4]. Даний лектин має досить високу цитотоксичну активність до клітин пухлин різного гістогенезу.

Завдяки цьому лектину розшириться арсенал біологічно активних речовин з цитотоксичною і протипухлинною активністю. Цей лектин аглютинуює і девіталізує пухлинні клітини, а також аглютинуює еритроцити миші і кроля. Про його належність до класу лектинів свідчать аглютинуюча активність по відношенню до еритроцитів, а також висока специфічність до певних вуглеводів.

При визначенні ступеню спорідненості до вуглеводів встановлено, що найвищу спорідненість лектини бацил виявляли до муцину підщелепної залози бика, що містить найбільшу кількість двох типів сіалових кислот (N-ацетілнейрамінової та N-гліколілнейрамінової), D-глюкуронової кислоти та фруктозо-1,6-дифосфату.

Цитотоксичний позаклітинний лектин виділений у вигляді аморфного порошку бурого кольору, який добре розчиняється у воді, буферних розчинах (забуференому фізіологічному розчині, Трис-HCl), лугах та деяких органічних розчинниках (етанол, ацетон) (табл. 1). Лектин дає позитивні кольорові реакції з амідочорним 10Б і кумасі діамантовим синім (які свідчать про присутність в зразку білків); негативні – з суданом чорним В (ліпопротеїди), шиф-йодною кислотою (мукополісахаріди), толуїдиновим синім (мукополісахаріди, нуклеопроїтеїди), дифеніламіном (ДНК) та метиленовим синім (РНК).

Він добре зберігається при 0-5 °С без втрати цитотоксичної активності на протязі 1-1,5 років, має високу термостабільність – прогрівання протягом 1 години в діапазоні температур від 20 до 90 °С не приводить до зниження гемаглютинуючої та цитотоксичної активності по відношенню до пухлинних клітин (табл. 2).

Таблиця 1. Загальна характеристика позаклітинного лектину

№	Показник	Величина
1.	Зовнішній вигляд	порошок коричневого кольору
2.	Вміст основної речовини в %, не менше	93,0
3.	Вміст білку, %	86,0
4.	Вміст вуглеводів, %	7,0
5.	Наявність гемаглютинуючої активності, титр ⁻¹ РГА	1024–2048
6.	Специфічність до сіалових кислот, мМ	0,1-0,4

Таблиця 2. Термостабільність лектину *B. subtilis* IMB B-7724

Температура, °С	Показники біологічної активності	
	гемаглютинуюча, титр ⁻¹ РГА	цитотоксична, %
непрогрітий	1024	97,6±0,2
20	1024	97,4±0,3
30	1024	97,6±0,4
40	1024	97,5±0,1
50	1024	97,5±0,1
60	1024	96,9±0,1
70	1024	96,8±0,3
80	1024	95,8±0,3
90	1024	95,9±0,1

Зміни рН середовища в діапазоні від 6,0 до 8,0 також суттєво не впливають на активність досліджуваної речовини, максимальну гемаглютинуючу активність спостерігають при значеннях рН 7,5–8,0. Результати дослідження гострої токсичності *in vivo* та імунотоксичності *in vitro* дозволяють віднести досліджуваний лектин до малотоксичних речовин.

Результати електрофоретичного дослідження показали, що отримана речовина однорідна, має молекулярну масу 18,0–20,0 кДа. За хімічним складом ізольовані лектини є глікопротеїнами, які містять у своєму складі 86,0% білка та 7,0% вуглеводів.

Максимум поглинання в УФ спектрі – 280 нм, максимальні частоти поглинання в ІЧ спектрі (КВч): 616, 1067, 1386, 1530, 1650, 2957, 3409 см⁻¹, що є типовим для білків і поліпептидів.

Амінокислотний склад лектину: лейцин (15%), тірозин (12%), фенілаланін (11%), ізолейцин (9%), аланін (8%), валін (8%), метіонін (7%), серин (7%), аргінін (6%), треонін (4%), глютамінова кислота (4%), лізин (3%), гліцин (2%), аспарагінова кислота (2%), гістидин (2%). Серед виявлених амінокислот до нейтральних належать 60,6%, до ароматичних – 22,5%, до основних – 11,0%, до кислих – 5,9%.

Елементний склад: С- 34,00%; Н - 7,04%; N - 16,61%; О - 42,35%.

Гемаглютинуюча активність лектину в концентрації 1 мг/мл коливається в межах 1024–2048 титр⁻¹ РГА. Лектин проявляє *in vitro* цитотоксичну активність по відношенню до пухлинних клітин різного гістогенезу (саркома 37, аденокарцинома Ерліха, меланома В-16, карцинома легені Льюїс, клітини ліній L1210, HL60, K562). Ця властивість лектину, що заявляється, може використовуватися при активній специфічній імунотерапії в онкології.

Характеристику цитотоксичного лектину з протипухлинною активністю доповнюють приклад способу одержання лектину та таблиці 1-5.

B. subtilis IMB B-7724 культивують глибинним методом при 37 °С, культуральну рідину центрифугують для відокремлення біомаси від рідини (при 6000 об/хв., протягом 30хв.). Одержаний центрифугат вносять в скляну ємність і розчиняють в ньому сульфат амонію (472 г на 1 л центрифугату, 70 % насичення). Рідину із сульфатом амонію витримують при температурі +4 °С протягом 20 годин, центрифугують при 5000 об/хв. протягом 30 хв.

Надосадову рідину видаляють, проводять діаліз одержаного осаду проти дистильованої води. Осад вносять у діалізний мішок, опускають в скляну ємність на 3–4 л. Діаліз проводять при температурі +4 °С протягом 24–30 годин. По закінченні діалізу розчин лектину пастеризують (+70 °С) протягом 30 хв. З пастеризату видаляють термолабільні білки шляхом центрифугування при 5000 об/хв. протягом 20-30 хв.

Пастеризат стерилізують через бактеріальний фільтр з розміром пор 0,2-0,45 мк. Стерильний лектин ліофільно висушують (від -32 до +24 °С). Вихід лектину з 1 л культуральної рідини становить 60,0 – 80,0 мг.

На відміну від інших способів одержання мікробіальних лектинів, для отримання лектину B-7724 не були використані шкідливі та токсичні хімічні речовини (хлороформ, метанол, бутиловий спирт, тощо). Тобто використаний спосіб є більш доступним та екологічно нешкідливим і дозволяє одержати препарат з високим ступенем очищення [5].

Проведені дані порівняльних досліджень біологічної активності цього лектину та лектину-прототипу наведено в таблиці 3. Одержаний лектин володіє значно більшою ніж лектин-прототип спорідненістю до сіалових кислот: N-ацетилнейрамінової (0,3 проти 1,9 мМ) та N-гліколілнейрамінової (0,3 проти 7,5 мМ).

Таблиця 3. Вуглеводна специфічність позаклітинних бактеріальних лектинів

Вуглеводи	Мінімальні інгібуючі РГА концентрації вуглеводів, мМ	
	Прототип	Що заявляється
N-ацетилнейрамінова кислота	1,9	0,3
N-гліколілнейрамінова кислота	7,5	0,3
Д-глюкуронова кислота	7,5	0,9
Фруктозо-1,6-дифосфат	0,05	18,7

Позаклітинний бактеріальний лектин добре зберігається при -20 °С, не втрачаючи цитотоксичну активність (див. табл. 4).

Таблиця 4. Стабільність при зберіганні лектину *B. subtilis* IMB B-7724 (ІЦ, %)

Концентрація мг/мл	Час зберігання				
	безпосередньо після отримання	3 міс	6 міс	9 міс	12 міс
2	92,3±0,8	91,9±3,7	90,6±1,2	90,1±0,9	88,6±0,9
1,5	90,6±1,1	90,6±1,1	89,0±1,0	88,8±1,8	88,0±1,0
1,0	89,2±0,1	88,9±3,0	87,1±0,9	85,9±2,4	85,1±0,9
0,5	88,8±1,0	76,8±1,1	074,9±3,6	73,9±3,6	72,8±1,1
0,1	0	0	0	0	0

Результати визначення стабільності кожні 3 місяці протягом року показали, що отримана активна речовина не втрачала своєї цитотоксичності по відношенню до клітин експериментальної пухлинної лінії при зберіганні при -20 °С.

В наших дослідженнях культуральна рідина *B. subtilis* IMB B-7724 виявляла цитотоксичну і цитолітичну активність. Остання обумовлена здатністю бактерій роду *Bacillus* продукувати не тільки лектиноподібні речовини, але і сполуки з ферментативною активністю (протеолітичною, фібринолітичною) [6, 7]. Виділений з культуральної рідини лектин мав лише гемаглютинуючу і цитотоксичну активність, не викликаючи лізис пухлинних клітин (табл. 5). Тобто його очищення від домішок-ферментів було більш якісним порівняно з лектином-прототипом, який володів крім цитотоксичної ще й ферментативною активністю.

Таблиця 5. Динаміка показників біологічної активності лектину *B. subtilis* IMB B-7724

Доба росту	Показники біологічної активності		
	гемаглютинуюча, титр ⁻¹ РГА	цитотоксична, %	цитолітична, %
1	1024	48,7±0,5	2,5±0,6
2	1024	73,4±2,1	2,7±0,4
3	2048	85,0±1,9	4,1±1,5
4	2048	95,0±2,0	4,2±0,1
5	1024	87,3±3,2	3,3±0,8
6	1024	69,5±0,5	2,5±1,0

За результатами досліджень динаміка накопичення лектину в культуральній рідині *B. subtilis* IMB B-7724 аналогічна описаній раніше для *B. subtilis* B-7025 [8]. Однак, кількість синтезованого лектину була значно більшою для штаму *B. subtilis* IMB B-7724 (60–80 мг/л) порівняно з *B. subtilis* B-7025 (10–13 мг/л), що свідчить про перспективність використання *B. subtilis* IMB B-7724 в якості продуцента позаклітинного бактеріального лектину.

Таким чином, одержаний позаклітинний лектин *B. subtilis* IMB B-7724 має високий ступінь очищення, високу спорідненість до сіалових кислот та володіє значною цитотоксичною активністю по відношенню до пухлинних клітин. Досліджені його фізико-хімічні властивості, вивчена його біологічна активність. З точки зору біотехнологічного виробництва, процес отримання позаклітинного бактеріального лектину досить простий і можливий для стандартизації.

Виявлені властивості одержаного лектину свідчать про можливість та перспективність його використання в арсеналі протипухлинних лікарських речовин.

Гідратація бактеріального лектину *Bacillus subtilis* IMB B-7724 в нативному та іммобілізованому на поверхні гідрофобного кремнезему станах

Лектини відносяться до білків або глікопротеїнів, які здатні специфічно зв'язувати вуглеводні на поверхні деяких типів клітин [9-11]. Завдяки цьому в ряді випадків спостерігається аглютинація клітин. Крім того, лектини можуть проявляти мітогенну активність (сприяти процесу ділення) по відношенню до клітин крові [12]. Первинно лектини було виділено з насіння рослин (квасоля, канавалія), що дало можливість досконало вивчати їх властивості. Зокрема було встановлено, що конконовалін може специфічно зв'язуватись з певними групами цукрів, а це забезпечує йому можливість взаємодіяти з рецепторною системою багатьох типів клітин. Залежно від властивостей і розподілу в тканинах, лектини можуть відігравати важливу фізіологічну роль. Характерна властивість лектинів чітко розпізнавати інші молекули надає актуальності у його дослідженнях, що включають очищення, структурний аналіз та біотехнологічне застосування в різних галузях, таких як молекулярна та клітинна біологія.

Значним кроком в розширенні області застосування лектинів стала розробка методів синтезу мікробіальних лектинів. Виявилось, що цей тип лектинів може

виконувати роль антитіл з високою антираковою активністю [13]. В роботах [14-16] описано способи синтезу лектину за допомогою аеробної культури *Bacillus subtilis* В-7025, який є токсичним по відношенню до ракових клітин. При цьому використовувався ряд живильних середовищ, таких як середовище Гаузе, бульйон Хоттінгера з рядом коригуючих додатків, таких як леофілізований автолізат рідких пивних дріжджів та ряду мінеральних солей.

В даний час активно розробляється напрямок створення нового покоління антиракових препаратів на основі складних композитних систем; їх основою слугують наночастинки магнетиту, які за допомогою зовнішнього магнітного поля можуть бути скеровані в зону розвитку пухлини. На зовнішній поверхні магнетиту створюється багаточарове покриття, що забезпечує контрольовану доставку до зони ураження активних речовин, таких як антиракові антибіотики, моноклональні антитіла, лектини, цисплатин та інші [17-20]. Зокрема в роботі [20] вивчено процеси адсорбційної іммобілізації цитотоксичного бактеріального лектину *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 на поверхні магнетиту та карбонвмісного нанокompозиту $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{C}$ за кімнатної температури. Встановлено, що адсорбційна ємність лектину на поверхні магнетиту становить 25.3 мг/г, а нанокompозиту (НК) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{C}$ – 36.3 мг/г (за вихідних концентрацій лектину 0.06–0.4 мг/мл). Ступінь вилучення лектину R (%) складав 12–38 % для магнетиту і 46–67 % для НК $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{C}$. Вивчено залежність адсорбційної ємності від часу витримки у розчині лектину. Встановлено, що нанобіокompозит на основі магнітних рідин і бактеріального лектину виявляє синергічний цитотоксичний ефект на клітини лінії *MCF-7*, що спричиняє загибель до 40 % клітин. Значення ІС 50 для нанобіокompозиту та лектину для клітин складали відповідно 100 та 126 мкг/мл. Перспективним способом використання лектинів як цитотоксичних агентів, можуть стати й інші композитні системи, в яких у зовнішній оболонці магнітокерованих наночастинок використовують інертний адсорбційний шар (наприклад, кремнеземний), здатний до не жорсткого закріплення молекул лектину, що слабо впливає на конформаційну упорядкованість білкової молекули, а отже зберігає її здатність до вибіркової взаємодії з рецепторами ракових клітин.

Відомо, що більшість білкових молекул при їх адсорбції з водних розчинів необоротно сорбується на поверхні кремнеземних адсорбентів; це здійснюється за рахунок багаточислової адсорбції полімерних ланцюгів, що істотно змінюють в процесі адсорбції свою конформацію у відповідності з мінімізацією вільної енергії системи біополімер-поверхня [21-23]. Причому це стосується як гідрофільних, так і гідрофобізованих кремнеземів. Для зменшення впливу поверхні на зв'язування білкових молекул лектину було обрано гідрофобний кремнезем, а закріплення лектину на поверхні здійснювалось за допомогою «сухої» іммобілізації, під час якої безводні суміші порошків лектину та метилкремнезему піддавались механохімічному перемішуванню.

Мета роботи – вивчення методами ^1H ЯМР особливостей взаємодії поверхні бактеріального лектину *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 в нативному стані та в різних модельних умовах з молекулами води; створення композитної системи на основі дослідженого лектину, в якій білкова молекула зазнає мінімального впливу з боку поверхні носія, оскільки білкові молекули здатні зв'язувати значну кількість води, локалізованої в проміжках між полімерними ланцюгами.

Експериментальна частина

Матеріали. В якості метилкремнезему використовували гідрофобний кремнезем марки АМ-1-175 (м.Калуш, Україна), який одержано при хімічному модифікуванні поверхні вихідного нанокремнезему А-200 диметилдихлорсиланом. В результаті реакцій

утворюються пари диметилсилільних груп, зшиті силоксановими містками $=\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{-O-Si}(\text{CH}_3)_2-$. Питома поверхня по БЕТ дослідженого зразка АМ-1 за даними адсорбції азоту становила $S_{\text{БЕТ}} = 175 \text{ м}^2/\text{г}$, а сумарний об'єм пор $V_p = 0.8 \text{ см}^3/\text{г}$.

Бактеріальний лектин *Bacillus subtilis* IMB B-7724 синтезовано та досліджено фізико-хімічні та цитотоксичні властивості в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України [24]. Встановлено, що лектин є глікопротеїном (білок – 86,0%, вуглеводи – 7,0%) з молекулярною масою 18–20 кДа. Елементний склад: вуглець – 34,00%, водень – 7,04%, азот – 16,61%, кисень – 42,35%. В амінокислотному складі превалюють лейцин та ароматичні амінокислоти (тирозин і фенілаланін). Найвищу спорідненість лектин *Bacillus subtilis* IMB B-7724 виявляв до N-ацетилнейрамінової та N-гліколілнейрамінової кислот (мінімальні інгібуючі концентрації вуглеводів – 0,3 мМ). Лектин має високу термостабільність, стійкий до зміни рН середовища, стабільний при зберіганні протягом тривалого часу [24].

Цитотоксичні властивості лектину *Bacillus subtilis* IMB B-7724 у складі магніточутливих наноконкомпозитів і магнітних рідин вивчали в [20].

Для приготування композитного матеріалу з метилкремнеземом чотири вагових частини MeSiO_2 змішували з однією частиною сухого лектину. Суміш ретельно перемішували шляхом перетирання до утворення щільного матеріалу, насипна густина якого складала близько $200 \text{ мг}/\text{см}^3$. Гідратацію композитної системи АМ1/Лектин здійснювали двома способами: в першому, наважку 200 мг композиту поміщали в 5 мм скляну ампулу ЯМР, після чого на стінку ампули додавали 20 мг дистильованої води, витримували протягом 2 годин, після чого перемішували шляхом інтенсивного струшування з наступною витримкою протягом години, що забезпечувало рівномірний розподіл води по об'єму зразка; в другому – воду додавали до сухого композиту і додатково його перетирали протягом 10 хв. Вважали, що перший спосіб забезпечує рівноважний розподіл води по поверхні метилкремнезему з іммобілізованим лектином. В другому способі була можлива перебудова частинок композиту з проникненням води в міжчастинковий простір, сформований гідрофобними частинками метилкремнезему.

¹H ЯМР-спектроскопія. Спектри ЯМР вимірювали за допомогою ЯМР-спектрометра з високою роздільною здатністю (Varian "Mercury") з робочою частотою 400 МГц. Використовували вісім 60° зондуєчих імпульсів, тривалістю 1 мкс при ширині смуги 20 кГц. Температура в датчику регулювалася з точністю ± 1 град. Інтенсивності сигналів визначалися шляхом вимірювання площі піків з використанням процедури розкладання сигналу на його складові в припущенні гаусівської форми сигналу і оптимізації нульової лінії та фази з точністю, $\pm 10\%$. Для запобігання переохолодженню води в досліджуваних об'єктах, вимірювання концентрації незамерзаючої води проводили при нагріванні зразків, попередньо охолоджених до температури 210 К. Температурні залежності інтенсивності сигналів ЯМР проводили в автоматизованому циклі, коли час витримання зразка при постійній температурі становив 9 хв, а час вимірювання 1 хв. ЯМР-вимірювання проводили в повітряному середовищі.

Оскільки концентрація води в зразках відома, за інтенсивностями сигналу води (I) можуть бути розраховані значення концентрації незамерзаючої води (C_{uw}) при будь-якій температурі: $C_{uw} = I_T/I_{T>273} \cdot h$ (мг/г). Процес замерзання (танення) міжфазної води, локалізованої в твердій пористій матриці, проходить відповідно до змін вільної енергії Гіббса, зумовлених впливом поверхні [25]. Вони тим менше, чим далі від поверхні знаходиться досліджуваний шар води. При $T = 273 \text{ К}$ замерзає вода, властивості якої не відрізняються від об'ємних, а по мірі зниження температури (без урахування ефекту

переохолодження) замерзають шари води, все ближче розташовані до поверхні, причому для міжфазної води справедливе співвідношення:

$$\Delta G_{\text{ice}} = -0,036(273,15 - T), \quad (1)$$

де числовий коефіцієнт представляє собою параметр, пов'язаний з температурним коефіцієнтом зміни вільної енергії Гіббса для льоду. Тоді, відповідно до методики, детально описаної в [26-29], можуть бути розраховані кількості сильно- і слабозв'язаної води (SBW і WBW, відповідно), а також термодинамічні характеристики цих шарів.

Якщо в колоїдній системі загальний вміст води істотно перевершує сумарний об'єм пор (міжчастинкових проміжків), то частина води може знаходитися у вільному стані, коли її молекули не відчувають збурюючого впливу з боку поверхні частинок. Точно визначити кількість «об'ємної» води складно, тому будемо вважати об'ємною ту частину води, яка відповідає $h > 1.5$ г/г.

Міжфазна енергія твердих тіл або біополімерів визначалася як модуль сумарного зниження вільної енергії сорбованої води, обумовленого наявністю внутрішньої границі розділу фаз вода-полімер за формулою:

$$\gamma_s = -K \int_0^{C_{uw}^{\max}} \Delta G(C_{uw}) dC_{uw}, \quad (2)$$

де $C_{uw}^{\max} = 1.5$ г/г.

Для визначення геометричних розмірів обмежених твердою поверхнею нанорозмірних агрегатів рідини може бути використано рівняння Гіббса-Томсона [30, 31], що зв'язує радіус сферичних або циліндричних пор (R) з величиною депресії температури замерзання:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R} \quad (3)$$

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, а ΔH_f – об'ємна ентальпія плавлення.

Величину (ΔG), а також міжфазної енергії (γ_s), розраховано відповідно до рівнянь (1, 2). Сильнозв'язаною вважали ту частину міжфазної води, для якої зниження вільної енергії Гіббса $\Delta G < 0.5$ кДж/моль.

Результати та обговорення

На рис. 1-4 наведено виміряні при різних температурах спектри ^1H ЯМР гідратованого лектину (рис. 1), лектину, іммобілізованого в сухому стані на поверхні метилкремнезему методом механохімічної активації (рис. 2) і додатково активованого спільно з водою (рис. 3) та, для порівняння, активованого з водою зразка метилкремнезему АМ-1 (рис. 4). Зразки містили рівну кількість адсорбованої води ($h = 0.1$ г/г). Співвідношення мас метилкремнезему (АМ-1-175) та лектину складало 4/1.

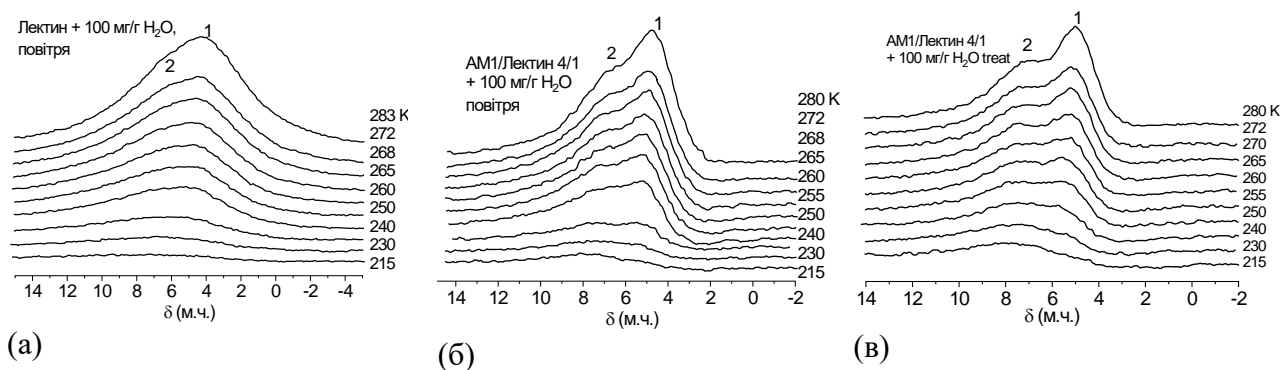


Рис. 1. Виміряні при різних температурах спектри ^1H ЯМР води, адсорбованої на поверхні: нативного лектину (а), лектину, іммобілізованого на поверхні метилкремнезему у випадку гідратації без навантажень (б) та з навантаженнями (в) в повітряному середовищі

В спектрі гідратованого лектину спостерігається два сигнали води, інтенсивність яких зменшується зі зниженням температури у зв'язку із вимерзанням певних кількостей води. Хімічні зсуви сигналів складають $\delta_H = 4.5$ та 7 м.ч. для основного та бічного сигналів, відповідно. Наявність двох сигналів (1 та 2) свідчить про існування принаймні двох типів адсорбованої води, які характеризуються різною упорядкованістю сітки водневих зв'язків. Оскільки при збільшенні упорядкованості молекул води, її хімічний зсув збільшується (сигнал зміщується в напрямку слабких магнітних полів) слід віднести сигнал 2 до кластерів води, з упорядкованою структурою, аналогічній структурі гексагонального льоду. В той же час, сигнал 1 має хімічний зсув, близький до хімічного зсуву рідкої води, в якій кожна молекула води бере участь у формуванні 2-3 водневих зв'язків [26-29].

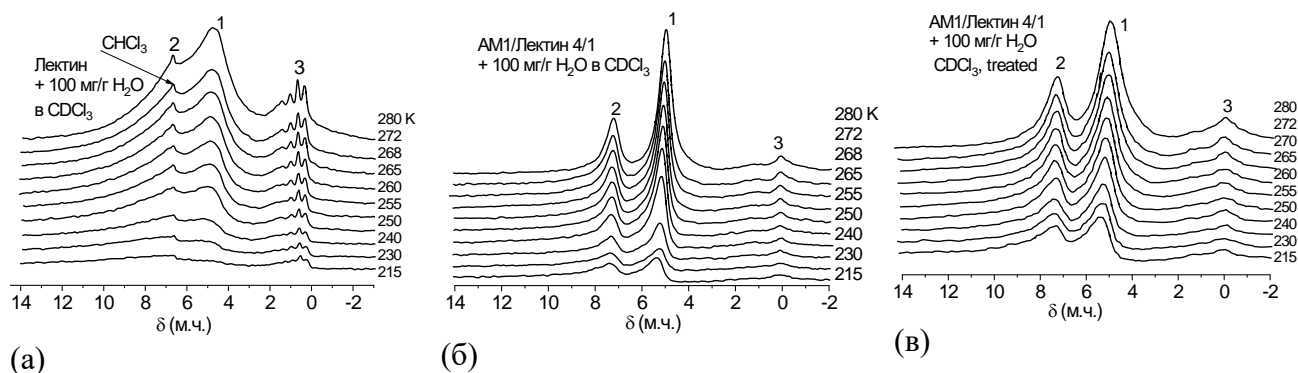


Рис. 2. Виміряні при різних температурах спектри ^1H ЯМР води, адсорбованої на поверхні: нативного лектину (а); лектину, іммобілізованого на поверхні метилкремнезему у випадку гідратації без навантажень (б) та з навантаженнями (в) в середовищі CDCl_3

При адсорбції лектину, іммобілізованого на поверхні метилкремнезему в спектрах також спостерігаються сигнали 1 та 2, проте співвідношення їх інтенсивностей змінюється по відношенню до одержаного в чистому лектині. Додаткове активування композиту з водою (рис. 3) призводить до відносного збільшення інтенсивності сигналу 2 та його зміщенню в область слабких полів (більших значень хімічного зсуву). Це свідчить про можливий вплив поверхні на конформацію білкових молекул та конформації полімерних ланцюгів. Таким чином, з одного боку можна вважати, що використаний нами

спосіб іммобілізації білкових молекул на поверхні в певній мірі забезпечує збереження конформаційної стабільності молекул лектину, а з другого – показано, що послідовність механічних навантажень в процесі формування композитної системи може змінювати наповненість водою міжчастинкових порожнин метилкремнезему з іммобілізованим на його поверхні лектином.

Середовище слабо полярного органічного розчинника (хлороформу) може істотно змінювати структуру кластерів адсорбованої води. Так, якщо кластери межують з гідрофобною поверхнею метилкремнезему або гідрофобними ділянками полімерних ланцюгів білкової молекули, енергетично більш вигідним може бути заміщення води хлороформом. З іншого боку, як було показано в [26-29] на границі з твердими тілами різної природи можливе формування неупорядкованих водневими зв'язками прошарків води, аналогічних концентрованому розчину води в хлороформі, який стабілізовано поверхневими взаємодіями.

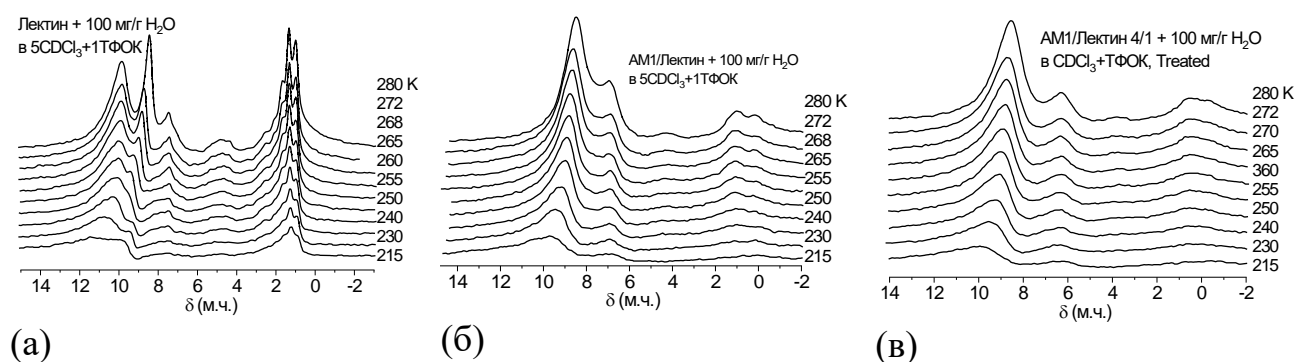


Рис. 3. Виміряні при різних температурах спектри ^1H ЯМР води, адсорбованої на поверхні: нативного лектину (а); лектину, іммобілізованого на поверхні метилкремнезему у випадку гідратації без навантажень (б) та з навантаженнями (в) в середовищі $\text{CDCl}_3 + \text{ТФОК}$

Як впливає з даних рис. 1-2, в повітряному та органічному середовищах в спектрах з'являються сигнали в області $\delta_{\text{H}} = 0 - 2$ м.ч., що відповідають слабоасоційованим формам міжфазної води (сигнал 3). Співвідношення між інтенсивностями сигналів 1 та 2 дещо змінюється. У випадку лектину, іммобілізованого на поверхні метилкремнезему, дещо більшою стає інтенсивність сигналу 1, обумовленого високопорядкованою формою води. Якщо композитна система в процесі її формування піддається механо-хімічному активуванню з водою, в повітряному середовищі відстань між сигналами 1 та 2 збільшується за рахунок зміщення сигналу 2 в бік більших значень хімічного зсуву (рис. 2, в). Середовище CDCl_3 стабілізує слабоасоційовані форми води, завдяки чому інтенсивність сигналу 3 зростає (порівн. рис 1 та рис. 2).

В [32-35] було показано, що додавання до системи сильної кислоти може приводити до диференціації кластерів води за їх здатністю розчиняти кислоту. На відміну від об'ємної води, вода в кластеризованому стані значно гірше розчиняє полярні речовини, в тому числі і кислоти. Це пов'язано із значною перебудовою водного кластеру при потраплянні в нього молекул, що змінюють будову сітки водневих зв'язків. Дійсно, при додаванні дейтерованої трифтороцтової кислоти (ТФОК) в спектрах з'являються кілька сигналів, що розташовані в діапазоні $12 - 0$ м.ч. (рис. 3). При цьому сигнали із великими значеннями хімічного зсуву відповідають кластерам (або доменам) з високою концентрацією кислоти. Сигнал з $\delta_{\text{H}} = 5$ м.ч. і менше – воді, що зовсім не розчиняє кислоту. Слід звернути увагу на те, що в присутності сильної кислоти значно збільшилися

інтенсивності сигналів неупорядкованої води. Для нативного білку ці сигнали стають основними, навіть більшими за сигнали розчинів вода-кислота.

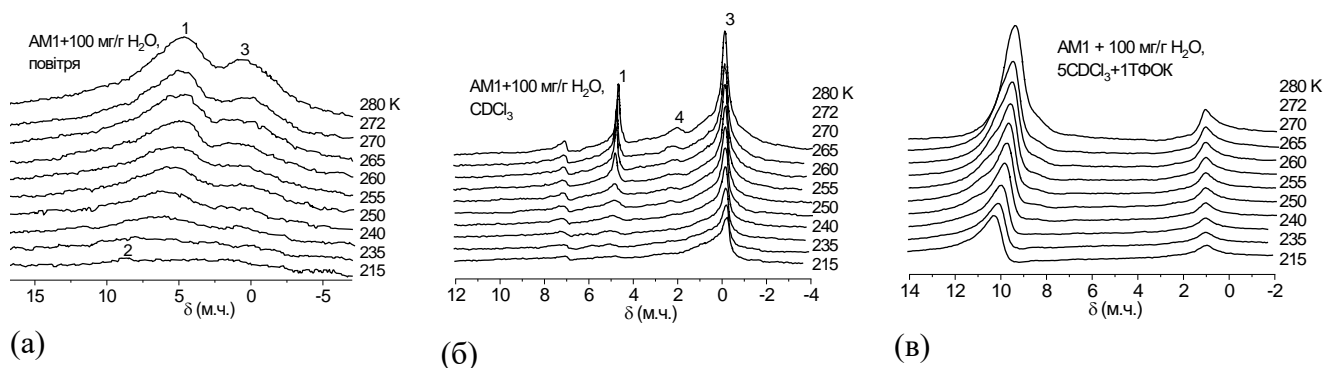


Рис. 4. Виміряні при різних температурах спектри ^1H ЯМР води, адсорбованої на поверхні метилкремнезему AM-1: на повітрі (а); в середовищі CDCl_3 (б) та в середовищі $5\text{CDCl}_3+1\text{TFOK}$ (в).

Метилкремнезем відноситься до гідрофобних матеріалів, тобто не змочується водою та адсорбує з повітря лише невелику кількість води [36-40]. Проте, шляхом використання механічних навантажень (активування з водою) на його поверхню може бути перенесено значну кількість води, що знаходиться в кластеризованому нанорозмірному стані [41-44]. Тобто при механічному перетиранні гідрофобного порошка з водою міліметрові краплинки не зв'язані з поверхнею води поступово дрібняться на мікронні, а далі нанорозмірні кластери, що знаходяться в міжчастинкових зазорах і взаємодіють з поверхнею за допомогою ван-дер-ваальсових зв'язків.

На рис. 4, а наведено зняті при різних температурах спектри ^1H ЯМР води для зразка метилкремнезему AM-1, механоактивованого з 0.1 г/г H_2O . В спектрах спостерігаються два сигнали (сигнали 1 та 3), що відносяться до сильно- та слабоасоційованої води, відповідно. Тобто, під впливом механічних навантажень вода переходить в нанорозмірний кластеризований стан чи формує на гідрофобній поверхні слабо впорядковані структури, в яких майже не формує водневозв'язаних комплексів з іншими молекулами.

Рідке гідрофобне середовище (CDCl_3) стабілізує слабо впорядковані форми води (рис. 4, б). При цьому можливо як утворення ван-дер-ваальсових зв'язків молекул води з поверхнею, так і формування концентрованого розчину вода-хлороформ, стабілізованого поверхнею [26-28]. Крім основних сигналів, віднесених до сильно- та слабозв'язаної води (сигнали 1 та 3) в спектрах спостерігається сигнал при $\delta_H = 2$ м.ч., який також можна віднести до слабоасоційованих форм води, а також сигнал з $\delta_H = 7$ м.ч., який може бути обумовлений непродейтерованим хлороформом, або водою, структура якої близька до структури гексагонального льоду [26,28].

При додаванні трифтороцтової кислоти (рис. 4, в) більша частина слабоасоційованих форм води утворює водневозв'язані комплекси з молекулами кислоти, що спостерігаються в області $\delta_H = 8-11$ м.ч.

На рис. 5-7 наведено розраховані на основі зміни інтенсивності сигналів води температурні залежності концентрації незамерзаючої води, залежності зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води та розподіли за радіусами кластерів адсорбованої води, розраховані у відповідності з рівнянням (1-3) для нативного лектину, та лектину, іммобілізованого на поверхні метилкремнезему при співвідношенні мас 4/1 і гідратованості $h = 0.1$ г/г. Характеристики шарів води, адсорбованої в зразках, що

відповідають різним сигналам, які реєструються в спектрах показано в табл. 1. При цьому сигнал 3 відповідав слабоасоційованій воді, яка не бере участі в формуванні водевозв'язаних комплексів з іншими молекулами, а сигнали 1 та 2 – менш та більш впорядкованим кластерам адсорбованої води.

Визначались кількість сильно та слабозв'язаної води (C_{uw}^S та C_{uw}^W , відповідно), які розраховувались на основі залежностей $\Delta G(C_{uw})$, при цьому вважали, якщо для води зміна вільної енергії Гіббса, обумовлена адсорбційними взаємодіями $\Delta G < -0.5$ кДж/моль, то вода є сильнозв'язаною [26-29]; величину міжфазної енергії вода-поверхня (білок або композит) – γ_s , що характеризує сумарне зниження вільної енергії води, обумовлене наявністю границі розділу фаз; максимальне зниження вільної енергії Гіббса в шарі сильнозв'язаної води – ΔG^S , характеризує максимальний вплив поверхні на межуючу з нею воду. Для кожної групи сигналів, які відносяться до однієї системи, в табл. 1 наведені сумарні значення міжфазної енергії ($\Sigma\gamma_s$), що відносяться до всієї води, незалежно від її типу.

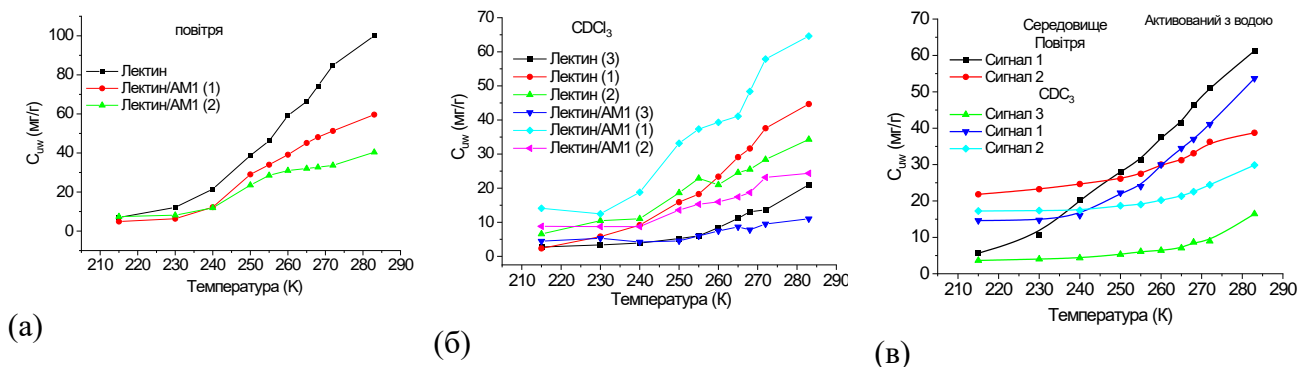


Рис. 5. Температурні залежності концентрації незамерзаючої води нативного лектину, та лектину, іммобілізованого на поверхні AM1, що містили 100 мг/г адсорбованої води в повітряному (а) та $CDCl_3$ (б) середовищах, а також активованого з водою композиту в різних середовищах

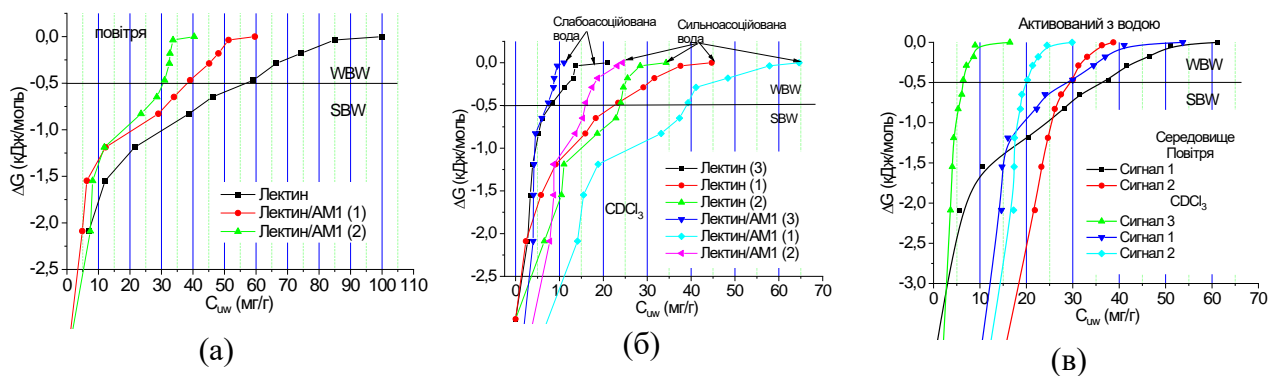


Рис. 6. Залежності зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води нативного лектину, та лектину, іммобілізованого на поверхні метилкремнезему, що містив 100 мг/г адсорбованої води в повітряному (а) та $CDCl_3$ (б, в) середовищах

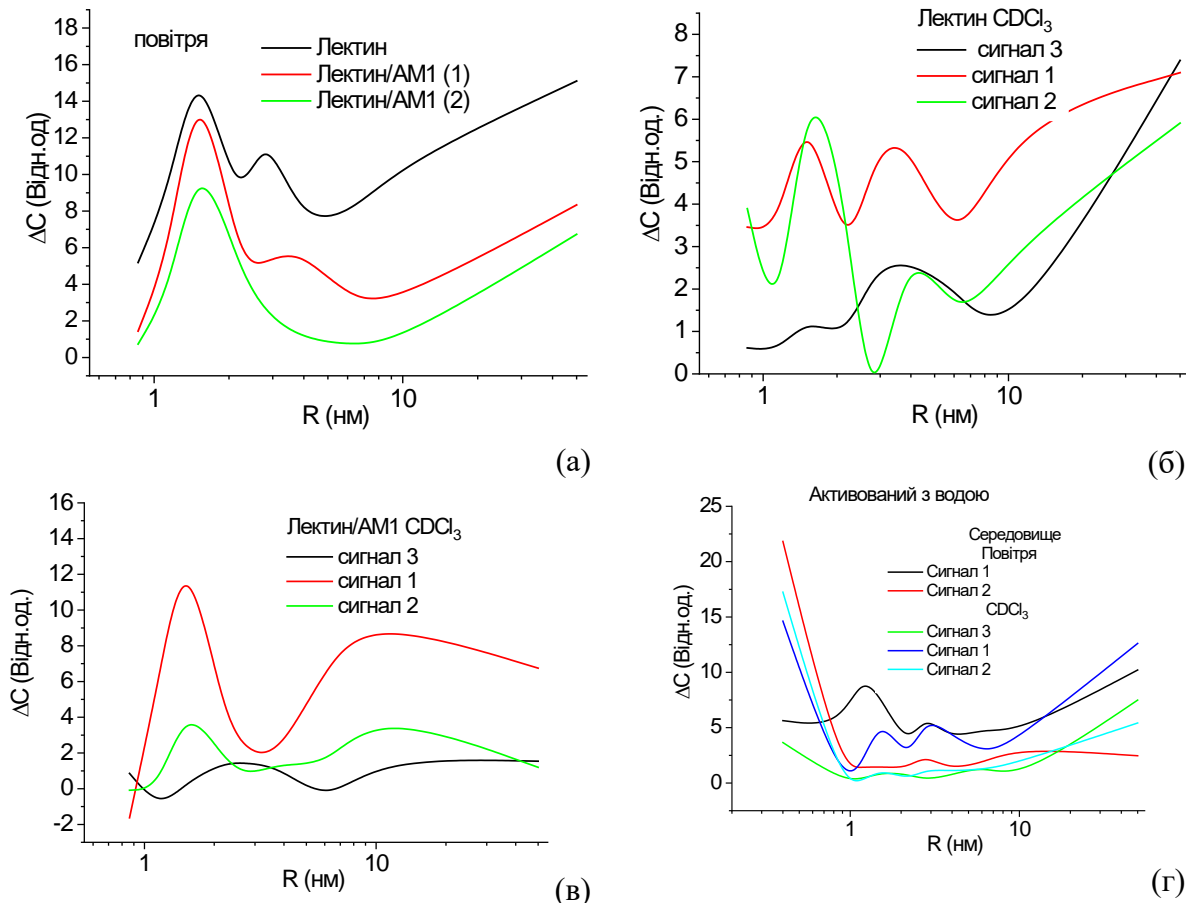


Рис. 7. Розподіли за радіусами кластерів адсорбованої води нативного лектину, та лектину, іммобілізованого на поверхні метилкремнезему, що містили 100 мг/г адсорбованої води в повітряному (а) та $CDCl_3$ (б,в) середовищах

Як видно з наведених результатів, іммобілізація лектину на поверхні AM1 супроводжується збільшенням γ_s від 4.1 до 5.2 Дж/г. Це відбувається за рахунок збільшення концентрації сильнозв'язаної води (табл. 6). Якщо проаналізувати зміни у розподілах за радіусами кластерів адсорбованої води (рис. 6, а), можна констатувати, що у воді, адсорбованій нативними молекулами лектину, присутні два основних максимуми при $R = 1$ та 3 нм. В іммобілізованому без механічних навантажень стані максимум при $R = 1$ нм присутні в обох типах води (різної впорядкованості), проте другий максимум спостерігається лише для більш впорядкованих асоціатів (сигнал 1). Активування зразка з водою приводить до значного збільшення вкладу від кластерів води з розмірами $R < 1$ нм.

Середовище хлороформу дещо зменшує енергію зв'язування води з молекулами нативного лектину (від 4.3 до 4.1 Дж/г), проте у випадку іммобілізованого лектину в середовищі $CDCl_3$ величина $\Sigma\gamma_s$ збільшується від 5.2 до 7.4 Дж/г. Тобто слабополярне середовище сприяє підвищенню взаємодії води з границями розділу фаз, що проявляється у відносному збільшенні кількості кластерів води меншого розміру (рис. 6). Слід звернути увагу, що слабоасоційовані форми води (сигнал 3) також представлені кількома типами кластерів, які мають радіус в діапазоні $R = 1-10$ нм, причому їх розподіл за розмірами значно змінюється при іммобілізації лектину на поверхні метилкремнезему (порівняння рис. 6, б та в). Ймовірно, слабоасоційовані форми води утворюються як в порожнинах, між молекулярними ланцюгами білкових молекул, так і на поверхні AM1, вільній від білку. Для сигналів 1 та 2 (сильноасоційована вода) механічні навантаження привели до утворення малих кластерів води.

Таблиця 6. Характеристики міжфазної води в нативному гідратованому лектині та лектині, іммобілізованому на поверхні метилкремнезему

Зразок	Середовище	Сигнал	C_{uw}^S , мг/г	C_{uw}^W , мг/г	ΔG^S , кДж/моль	γ_s , Дж/г
Нативний лектин	повітря		55	45	-3.5	4.3
	CDCl ₃	3	8	14	-3.5	0.8
		1	23	22	-3.0	1.7
		2	23	12	-3.0	2.0
					Σ 4.1	
Лектин/АМ1	повітря	1	38	22	-3.5	2.8
		2	31	9	-3.5	2.5
						Σ 5.2
	CDCl ₃	3	7	5	-5.0	0.9
		1	38	22	-5.0	4.4
		2	17	8	-5.0	2.1
					Σ 7.4	
Лектин/АМ1 активований з водою	повітря	1	37	26	-4.0	3.1
		2	29	9	-8.0	6.7
						Σ 9.8
	CDCl ₃	3	6	11	-6.0	1.0
		1	30	23	-8.0	4.9
		2	20	11	-8.0	5.0
					Σ 10.9	
АМ1 активований з водою	повітря	3	22	18	-3.0	2.0
		1+2	36	19	-2.5	3.1
						Σ 5.1
	CDCl ₃	3	51	18	-6.0	9.1
		1	6	6	-1.5	0.44
		4	8	8	-1.5	0.57
					Σ 10.3	

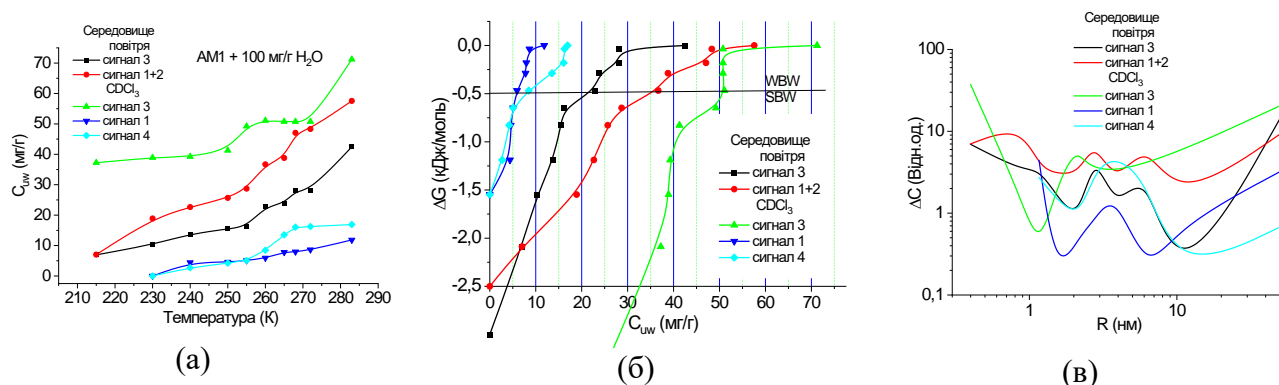


Рис. 8. Температурні залежності концентрації незамерзаючої води (а), залежності зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води (б) та розподіли за радіусами кластерів адсорбованої води для метилкремнезему АМ-1, активованого з водою (в)

Температурні залежності концентрації незамерзаючої води (а), залежності зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води та розподіли за радіусами

кластерів адсорбованої води для метил кремнезему АМ-1, активованого з водою в умовах, близьких до умов активації композитних систем наведено на рис. 7. Характеристики адсорбованої води містяться в табл. 6. Порівняння характеристик адсорбованої води в метилкремнеземі та у композиті лектин-метилкремнезем, що був активований з водою, дає основи для твердження, що значна частина води в композиті під впливом механічних навантажень локалізується в зазорах між частинками кремнезему. Сумарні значення міжфазної енергії та форма спектрів ЯМР адсорбованої води для обох систем близькі. Можна вважати, що в процесі формування композиту, великі молекули лектину та його агрегатів переважно розташовуються у відносно великих міжчастинкових зазорах і не проникають в проміжки між первинними частинками навіть під дією механічних навантажень. В той же час вода з частинками метилкремнезему формує гетерогенну систему, в якій невеликі кластери або окремі молекули можуть проникати в зазори між первинними частинками. Обмежений простір даних зазорів не дозволяє формуватись кластерам сильноасоційованої води і вона залишається у вигляді окремих молекул або кластерів, в яких майже відсутні водневі зв'язки. Проте при заморожуванні зменшення інтенсивності сигналу слабоасоційованої води свідчить про можливість формування льоду, який, імовірно, знаходиться у вигляді аморфізованої води.

Композитний адсорбент на основі метилкремнезему і желатину та способи його одержання і взаємодія з водою

Кремнеземні адсорбенти широко використовуються в якості ентеросорбентів [21, 22,45,46], носіїв лікарських препаратів [47], супутніх речовин у фармакології [48,49] та компонентів композитних систем медичного призначення [50-53]. Їх висока адсорбційна активність обумовлена не лише питомою поверхнею, але й присутністю на ній великої кількості гідроксильних груп, які є впливовими центрами первинної адсорбції води та багатьох типів полярних органічних сполук [54-56]. В результаті в міжчастинкових зазорах і на поверхні частинок кремнезему формується товста плівка сильнозв'язаної води, яка перешкоджає адсорбції на поверхні молекул середньої молекулярної маси, таких як цукор, амінокислоти, отруйні речовини та деякі природні токсини [27]. Зменшити зв'язування води з поверхнею можна шляхом часткової або повної гідрофобізації поверхні кремнезему [57-59]. Однак при цьому виникає проблема переведення гідрофобних адсорбентів у водне середовище. Раніше, для невеликих кількостей адсорбентів (до 20 г), вона була вирішена шляхом використання процедури гідроущільнення під впливом механічного навантаження [61-63]. Масштабування цієї технології виявилось не надто ефективним і потребує великих механічних зусиль.

Метою даного дослідження був пошук такого со-адсорбата, який, адсорбуючись на гідрофобній поверхні, полегшує процес змочування гідрофобних частинок водою, а потрапляючи в організм як ентеросорбент, легко руйнується ферментами шлунково-кишкового тракту, звільняючи його поверхню для адсорбції на ній токсичних речовин. Одним з перспективних матеріалів є харчовий желатин, який представляє собою продукт денатурації колагену. Він складається з суміші лінійних поліпептидів з різною молекулярною масою і є фібрилярним білком сполучної тканини тварин. Здебільшого утворюють його амінокислоти такі як гліцин- 21%, пролін + гідроксипролін - 24%, аланін 9%, аргінін - 8%, аспарагінова кислота - 6%, вміст кожної з інших 10 амінокислот, що входять до складу желатину не перевищує 4% [64]. Желатин зареєстрований як харчова добавка E441.

Зв'язування води з поверхнею високодисперсних оксидів було вивчено з використанням методу низькотемпературної ^1H ЯМР-спектроскопії [26-29], при цьому величина хімічного зсуву міжфазної води визначає середнє число водневих зв'язків, в яких

бере участь кожна молекула води, а температурна залежність концентрації незамерзаючої води – розподіл за радіусами кластерів адсорбованої води (R) і величину міжфазної енергії (γ_s), яка дорівнює сумарному зниженню вільної енергії системи вода/адсорбент, обумовлене наявністю межі розділу фаз. В композитних системах, що різняться складом, середовищем або концентрацією компонентів, зростання величини γ_s характеризує збільшення зв'язування води, а зменшення γ_s - зниження енергії зв'язування.

Для експериментів використовували фармакопейний желатин, що містить 4 мас.% залишкової води і метилкремнезем АМ-1 (Калуш, Україна). Композитні системи готували двома способами. У першому способі, наважку желатину подрібнювали у фарфоровій ступці до формування дрібнодисперсного порошку. Потім його змішували з рівною за масою кількістю метилкремнезему. Отриману суміш перетирали в сухому вигляді протягом 10-15 хв. При цьому вона ущільнювалася і формувалася композит з насипною густиною $C_d = 350$ мг/см³. До композиту додавали 30 мас.% води (428 мг/г), додатково перетирали в ступці протягом 2 хв. Врівноважували водою 24 г при 280 К. У другому способі готували 2 % гель желатину. Для цього до 100 мг сухого желатину додавали 5 мл дистильованої води при температурі 360 К. Розчин перемішували протягом 3 хв до зникнення опалесценції. Після чого його охолоджували до 280 К протягом 2 г. В результаті формувалася твердий гель, який змішували з наважкою АМ-1 і перетирали в ступці протягом 10 хв. При цьому утворювалася рідка однорідна суспензія. Її витримували 2 години при $T = 280$ К, в результаті чого вона перетворювалася в твердий гель, який потім сушили при $T = 293$ К і відносній вологості 20 % протягом 24 годин. Після такої сушки композит містив 4 мас.% залишкової води (рис. 8, а). Підвищення вмісту води в композиті до 428 (рис. 8, б) або 1 г/г здійснювали шляхом додавання дистильованої води (без перетирання) і витримання зразка при 285 К протягом 2 годин.

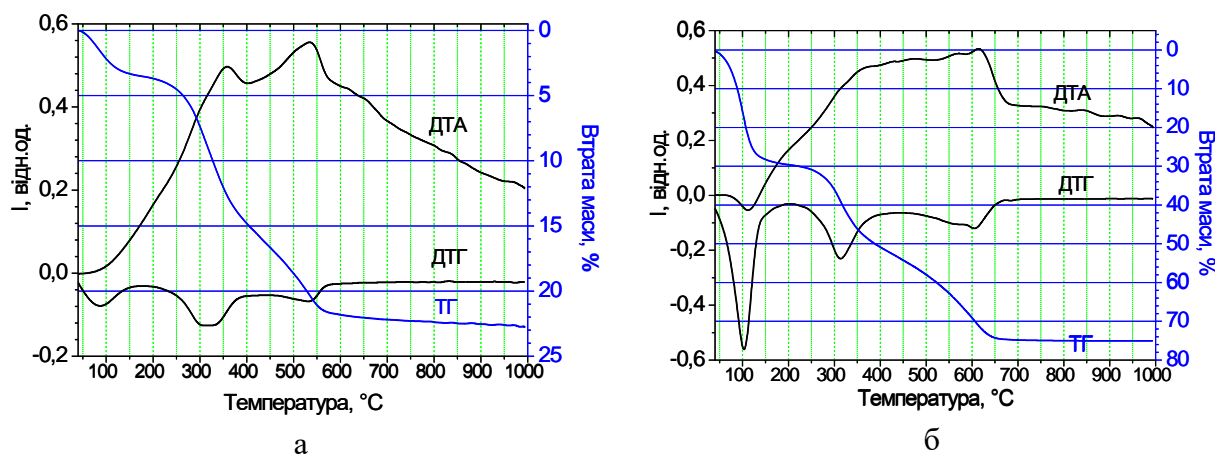


Рис. 9. Термогравіметричні дослідження композиту желатин/АМ-1 = 1/5, що містить 4 мас.% (а) або 30 мас.% (б) води

СЕМ мікрофотографії вихідного метилкремнезему наведено на рис. 9. Порошок складається з агломератів, розмір яких від 1 до 15 мкм (рис. 9, а). На поверхні добре помітна мезопориста структура (рис. 9, б), яка обумовлена ефективними взаємодіями між первинними частинками. В результаті насипна густина АМ1 невелика і складає близько 50 мг/см³.

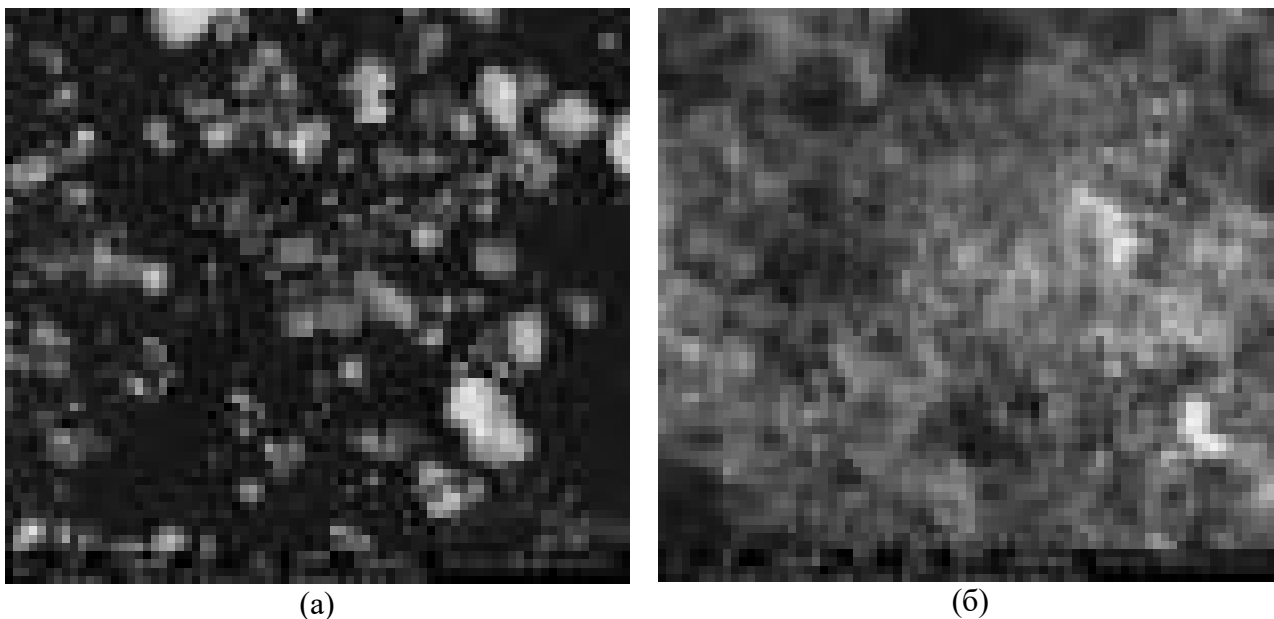


Рис. 10. СЕМ мікрофотографії вихідного (неущільненого) метилкремнезему АМ1

Зняті при різних температурах спектри ^1H ЯМР води в гелі желатину та композитних системах желатин/АМ1 наведено на рис. 10, 11. У разі, коли кількість води в желатині становить 30 мас.% (428 мг/г), вона спостерігається у вигляді одиночного сигналу (рис. 10, а), хімічний зсув якого збільшується від $\delta_H = 5$ м.ч. при $T = 283$ К до $\delta_H = 8$ м.ч. при $T = 210$ К. Відповідно до класифікації наведеної в [26], така вода є сильноасоційованою (SAW), оскільки кожна молекула бере участь у формуванні кількох водневих зв'язків. Зі зниженням температури інтенсивність сигналу води зменшується за рахунок її часткового замерзання. Заміна повітряного середовища на середовище дейтерохлороформу тягне за собою зменшення ширини сигналу SAW, обумовленого зменшенням розширення сигналу, пов'язаного з неоднорідністю зразка і появою в області $\delta_H = 1$ м.ч. слабо інтенсивного сигналу слабоасоційованої води (WAW), яка практично не приймає участі в утворенні водневих зв'язків. Поява в гетерогенній системі слабоасоційованої води обумовлена стабілізацією поверхнею розчину вода-хлороформ [26-29].

У висушеному композиті 5/1 АМ-1/желатин (4 мас.% залишкової води) сигнал слабоасоційованої води спостерігається і в повітряному середовищі (рис. 10, в). Отже, його частково гідрофобна поверхня здатна надавати воді неупорядкований (хаотропний) вплив [65-67]. У гідрофобному середовищі (CDCl_3) спостерігається декілька сигналів слабоасоційованої води (рис. 10, г), а хімічний зсув сигналу сильноасоційованої води зменшується до $\delta_H = 4$ м.ч. Фіксується також зростання інтенсивності сигналу WAW за рахунок зменшення інтенсивності сигналу SAW. Додавання до середовища хлороформу дейтеротрифтороцтової кислоти (ТФОК) частково усуває даний ефект (рис. 3, д). Сигнал WAW зменшується (але не зникає), а в спектрах з'являються кілька сигналів води з різною асоційованістю. Сигнал 1 – в найбільш слабкому полі ($\delta_H = 12$ м.ч.) відповідає концентрованому розчину вода-кислота [32, 33], сигнал 2 – більш розбавленому розчину кислоти, а сигнали 3 і 4 – кластерам води, які не розчиняють ТФОК.

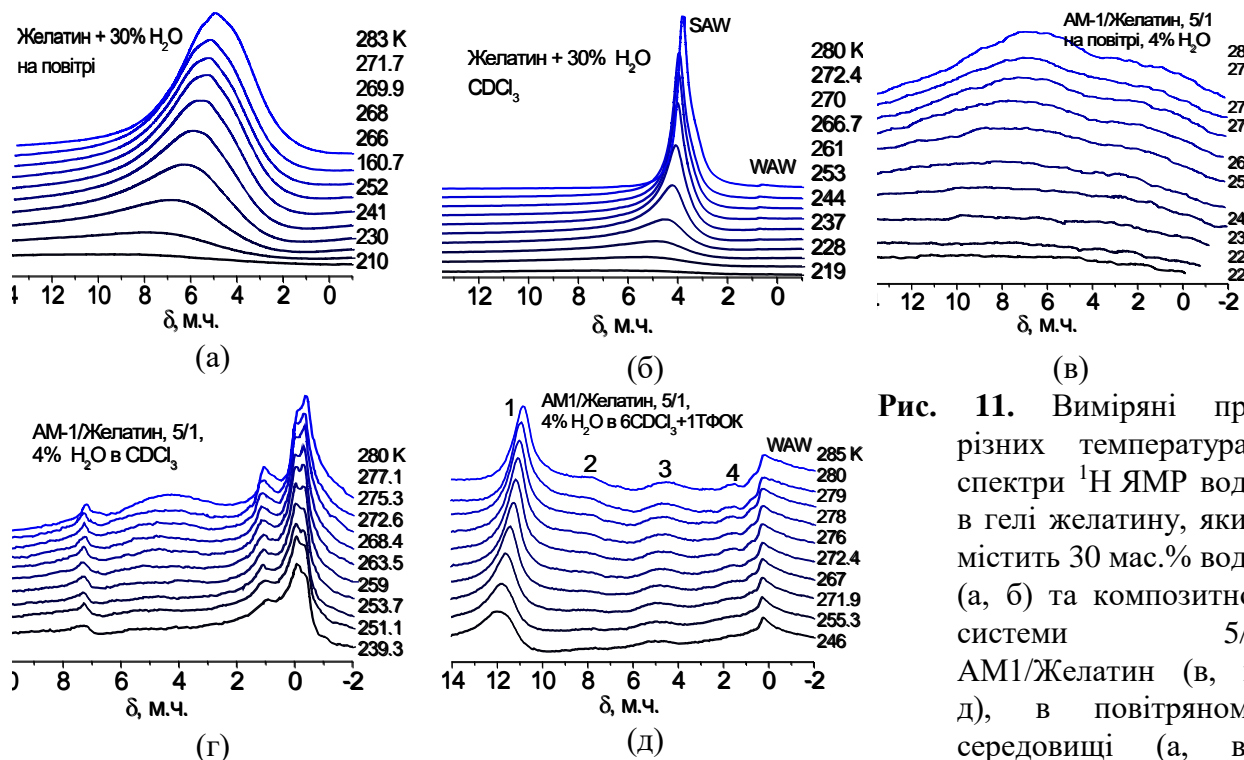


Рис. 11. Виміряні при різних температурах спектри ^1H ЯМР води в гелі желатину, який містить 30 мас.% води (а, б) та композитної системи 5/1 АМ1/Желатин (в, г), в повітряному середовищі (а, в), середовищі CDCl_3 (б, г) та $\text{CDCl}_3 + \text{ТФОК}$ (д)

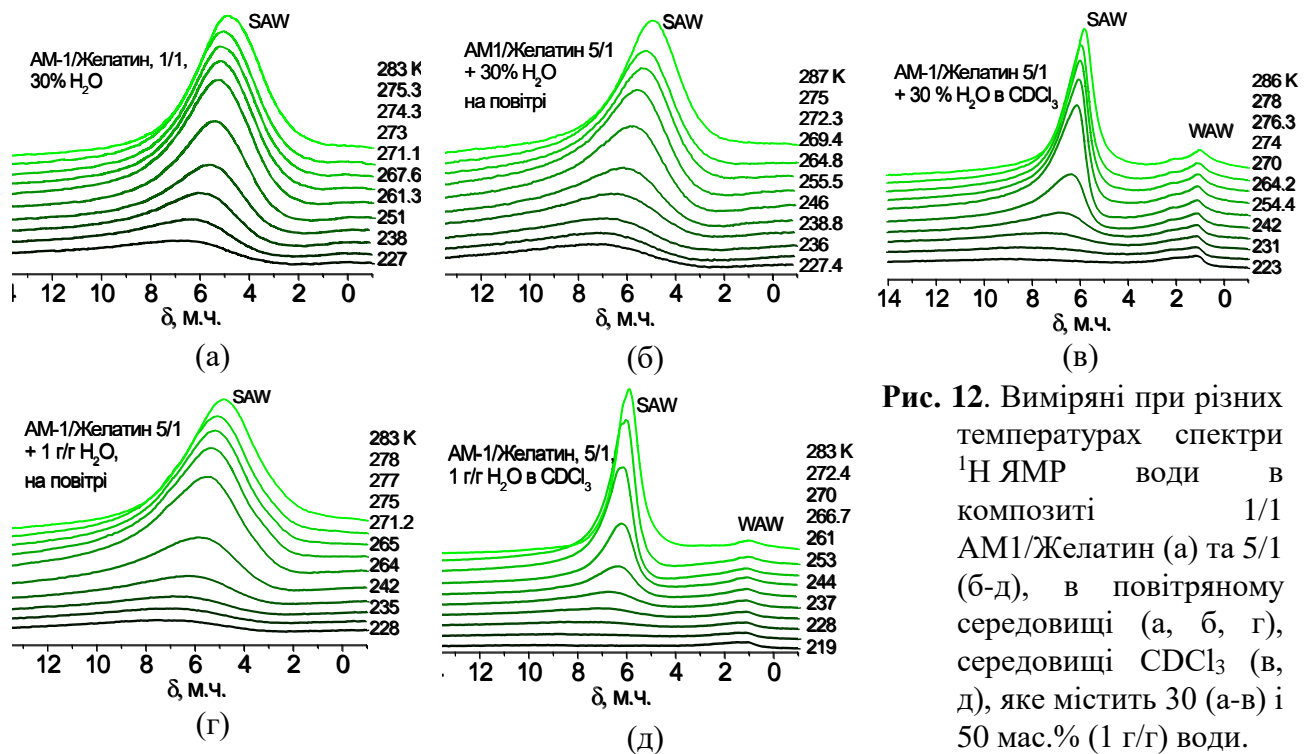


Рис. 12. Виміряні при різних температурах спектри ^1H ЯМР води в композиті 1/1 АМ1/Желатин (а) та 5/1 (б-д), в повітряному середовищі (а, б, г), середовищі CDCl_3 (в, д), яке містить 30 (а-в) і 50 мас.% (1 г/г) води.

Раніше подібні результати були отримані на зразках гідратованого кремнезему А-300 в середовищі CDCl_3 , яке містило добавки соляної або фосфорної кислот [32, 33]. Результати показують, що для води, адсорбованої в міжчасткових зазорах наноструктурованих кремнеземів, формується система кластерів води, в яких термодинамічно не вигідно формування розчинів сильних кислот. Для води, адсорбованої

в композитних системах АМ1/желатин = 1/1 (рис. 11, а) і 5/1 (рис. 11 б-д) характерна наявність в спектрах 1Н ЯМР сигналу тільки сильноасоційованої води в разі проведення вимірювань на повітрі (рис. 11, а, б, г) і сигналів SAW і WAW в середовищі CDCl_3 (в, д).

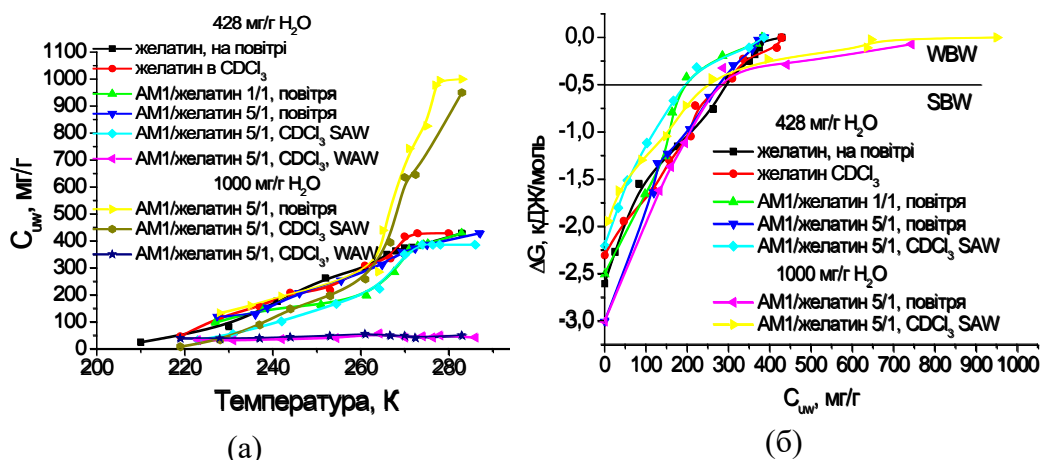


Рис. 13. Залежності зміни концентрації незамерзаючої води від температури (а) та побудовані на їх основі залежності зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води (б)

Таблиця 7. Характеристики шарів незамерзаючої води в желатиновому гелі та композитній системі АМ-1/желатин з різною гідратованістю

	Середовище	h , мг/г	C_{uw}^S , мг/г	C_{uw}^W , мг/г	ΔG^S кДж/моль	γ_s , Дж/г
желатин	Повітря	428	290	138	-2.6	23.6
	CDCl_3	428	280	148	-2.3	23.7
АМ1/желатин= 1/1	Повітря	428	200	228	-2.5	19.6
АМ1/желатин = 5/1	Повітря	428	275	153	-3.0	25.3
	CDCl_3	428	200	228	-2.2	15.5
	Повітря	1000	280	720	-3.0	31.0
	CDCl_3	1000	250	750	-2.0	20.1
АМ-1	Повітря	540	80	460	-2.0	9.6
		1000	110	890	-2.0	14.0

На рис. 12 представлені залежності вимірювання концентрації незамерзаючої води від температури (а) і побудовані на їх основі, відповідно до формули (1), залежності зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води $\Delta G(C_{uw})$ (б), а в табл. 1 – характеристики шарів зв'язаної води у вивчених системах. У таблиці також наведені дані по гідратованому порошку метилкремнезему АМ-1, взяті з роботи [37]. При цьому вимірювалися концентрації сильно- і слабозв'язаної води (C_{uw}^S і C_{uw}^W , відповідно), максимальне зниження вільної енергії в шарі сильнозв'язаної води, яке вимірювалося шляхом екстраполяції залежності $\Delta G(T)(C_{uw})$ до осі ординат (ΔG), а також величину міжфазної енергії, розраховану відповідно до формули (2). Сильнозв'язаною вважали ту частину міжфазної води, для якої зниження вільної енергії Гіббса $\Delta G < 0.5$ кДж/моль [24-26]. Розподіл за радіусами кластерів адсорбованої води розраховували відповідно до формули (3) (рис. 13).

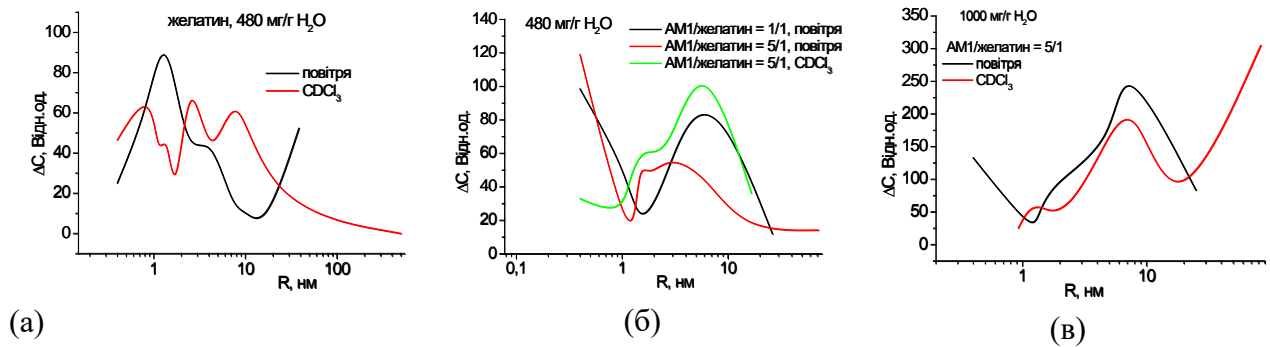


Рис. 14. Розподіл за радіусами кластерів адсорбованої води в гідратованих желатині (а) та композитах АМ1/желатин (б, в)

З даних табл. 7 випливає, що енергія зв'язування води гідратованим желатином практично не змінюється при заміні повітряного середовища середовищем CCl_3 (міжфазна енергія однакова). Можливо, вода міцно зв'язана з желатином і для дифузії хлороформу до молекул полімеру необхідна реорганізація як гідратної оболонки, так і перебудова полімерних ланцюгів. Однак зв'язана вода реагує на присутність хлороформу зміною розподілу за радіусами кластерів адсорбованої води (рис. 13, а). У повітряному середовищі головний максимум розподілу знаходиться при $R = 1$ нм, в той час як в середовищі хлороформу фіксуються максимуми при $R = 0,8, 3$ і 10 нм. Для композитної системи АМ1/Желатин = 5/1 введення в міжчастинкові зазори хлороформу приводить до суттєвого зменшення величини γ_s (при $h = 428$ мг/г від 25,5 до 15,5 Дж/г, а при $h = 1000$ мг/г від 31 до 50,5 Дж/г). Тобто, в композиті молекули хлороформу частково витісняють воду, що межує з поверхнею. Цей процес супроводжується зменшенням кількості сильнозв'язаної і зростанням кількості слабозв'язаної води (табл. 1). На кривих розподілу за радіусами кластерів води цей процес проявляється у вигляді зменшення кількості води, що входить до складу малих кластерів ($h = 428$ мг/г, рис. 13, б) або зростання кількості води у великих кластерах ($h = 1000$ мг/г, рис. 13, в). Якщо порівнювати зв'язування води у вихідних матеріалах при рівному вмісті води, можна зробити висновок, що додавання п'яти частин АМ1 до однієї частини желатину (введення АМ1 в желатиновий гель) приводить до зростання, а не зменшення енергії зв'язування води. Ймовірно, це пояснюється значною перебудовою системи полімер/кремнезем. Для композиту, отриманого шляхом попереднього перетирання сухої суміші інгредієнтів (АМ1/Желатин = 1/1) цей ефект не спостерігається, а величина γ_s має проміжне значення між гідратованим кремнеземом АМ1 і желатином (табл. 7). У даному випадку на мікрорівні можуть існувати розділені фази гідратованого полімеру і гідратованого АМ1.

Висновки

Методом ^1H ЯМР спектроскопії вивчено особливості взаємодії поверхні бактеріального лектину *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 в нативному стані та в різних модельних умовах з молекулами води. Створено нову композитну систему на основі дослідженого лектину, в якій білкова молекула зазнає мінімального впливу з боку поверхні носія, оскільки білкові молекули здатні зв'язувати значну кількість води, локалізованої в проміжках між полімерними ланцюгами. Розроблено спосіб «сухої» іммобілізації мікробіального лектину на поверхні гідрофобного кремнезему.

Показано, що іммобілізація лектину на поверхні метилкремнезему супроводжується збільшенням міжфазної енергії γ_s від 4.1 до 5.2 Дж/г. Це відбувається за рахунок збільшення концентрації сильнозв'язаної води. На основі аналізу змін в розподілах за радіусами R кластерів адсорбованої води, можна констатувати, що у воді,

адсорбованій нативними молекулами лектину, присутні два основні максимуми при $R = 1$ та 3 нм. В іммобілізованому стані максимум при $R = 1$ нм присутній в обох типах води (різної впорядкованості), проте другий максимум спостерігається лише для більш впорядкованих асоціатів.

Середовище хлороформу дещо зменшує енергію зв'язування води з молекулами нативного лектину (від 4.3 до 4.1 Дж/г), проте у випадку іммобілізованого лектину в середовищі CDCl_3 величина $\Sigma\gamma_s$ збільшується від 5.2 до 7.4 Дж/г. Тобто, слабополярне середовище сприяє підвищенню взаємодії води з границями розділу фаз, що проявляється у відносному збільшенні кількості кластерів води меншого розміру. Слід звернути увагу, що слабоасоційовані форми води також представлені кількома типами кластерів, які мають радіус в діапазоні $R = 1-10$ нм, причому їх розподіл за розмірами значно змінюється при іммобілізації лектину на поверхні метилкремнезему. Ймовірно, слабоасоційовані форми води утворюються як в порожнинах, між молекулярними ланцюгами білкових молекул, так і на поверхні AM1 , вільній від білку.

Досліджено композитні системи желатин/метилкремнезем, одержані різними способами. Виявлено, що вода в композиті присутня у вигляді кластерів радіусом 0,5-15 нм і знаходиться в сильноасоційованому стані при вимірюванні в повітряному середовищі. При додаванні рідкого гідрофобного середовища вода переходить в слабоасоційований стан. Зв'язана вода реагує на присутність хлороформу зміною розподілу за радіусами кластерів адсорбованої води. Показано, що для композитної системи желатин/метилкремнезем (5/1) введення до міжчастинкового зазору хлороформу приводить до суттєвого зменшення міжфазної енергії, що свідчить про часткове витіснення води гідрофобним розчинником на межі з поверхнею. Для композиту, виготовленого на основі сухих порошоків, міжфазна енергія має проміжне значення між енергіями вихідних речовин, при однаковій гідратованості.

На основі гелю желатину і гідрофобного метилкремнезему може бути створений однорідний гелеподібний композит, який після висушування насичується водою при їх прямому контакті. Вода в композиті AM1 /желатин існує у вигляді кластерів з радіусом 0.5-15 нм і знаходиться в сильноасоційованому або слабоасоційованому станах. Останній стабілізується при контакті з рідким гідрофобним середовищем. Введення в гель желатину п'яти частин гідрофобного кремнезему не зменшує, а збільшує зв'язування води (міжфазна енергія зростає на 20 %). У той же час для композитів, виготовлених на основі сухих порошоків такого ефекту не спостерігається і його міжфазна енергія має проміжне значення між міжфазними енергіями метилкремнезему і желатину, що містять однакову кількість води.

Показано, що композитна система AM1 /желатин може слугувати ефективним адсорбентом для видалення з водних розчинів молекул середньої молекулярної маси.

Робота виконана за підтримки Національного фонду досліджень України, проект 2020.02/0057; цільової програми фундаментальних досліджень НАН України «Перспективні фундаментальні дослідження та інноваційні розробки наноматеріалів і нанотехнологій для потреб промисловості, охорони здоров'я та сільського господарства» на 2020-2024 роки, проект 56/21-Н; та цільової програми наукових досліджень НАН України «Нові функціональні речовини і матеріали хімічного виробництва», проект 19-21.

Література

1. Podgorsky V.S., Kovalenko E.A., Karpova I.S., Sashchuk E.V., Get'man E.I. Extracellular lectins of saprophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus* (review). // Applied Biochem. Microbiol. – 2014. – V.50, N 3. P. 256–263.
2. Bligh K.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipids extraction and purification. // Canad J. Biochem Physiol. – 1959. – V.37, N 8. – P. 911–917.
3. Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Pospelova V.V., Shenderov B.A. Lactobacilli and Bifidobacteria lectins as possible signal molecules regulating intra- and inter-population bacteria–bacteria and host–bacteria relationships. Part I. Methods of bacterial lectin isolation, physico-chemical characterization and some biological activity investigation. // Microbial Ecology in Health and Disease. – 2006. – V.18. P. 55–60.
4. Пат. UA 131824. Штам бактерій *bacillus subtilis* imb b-7724 – продуцент цитотоксичних речовин з протипухлинною дією. / Чехун В.Ф., Діденко Г.В., Черемшенко Н.Л., Куць О.О., Базась В.М., Воєйкова І.М., Федосова Н.І., Караман О.М. Опубл. – 2019.
5. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Гетьман Е.И., Потєбня Г.П., Танасиенко О.А. Лектиновая активность противоопухолевых веществ, синтезируемых *Bacillus subtilis* B-7025 // Мікробіол. журн. – 2002. – Т. 64, № 5. – С. 10–17.
6. Vanitha N., Rajan S., Murugesan A.G. Optimization and production of alkaline protease enzyme from *Bacillus subtilis* 168 isolated from food industry waste. // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2014. – V.3, N 6. – P. 36–44.
7. Contesini F.J., Melo R.R., Sato H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. // Crit. Rev. Biotechnol. – 2018. – V. 38, N 3. – P. 321–34.
8. Potєbnya G.P., Tanasienko O.A., Lisovenko G.S., Savtsova Z.D. Use of cytotoxic lectins of bacterial origin in immunotherapy of experimental tumors. // In: Structure and biological activity of bacterial biopolymers. / edited by V.K. Pozur. – K: Vyd-polygr Center "Kyiv University", 2003. – P. 235–304.
9. Santos F.S., da Silva M.D.C., Napoleão T.H., Paiva P.M.G., Correia M.T.S., Coelho L.C.B.B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. // Current Topics in Peptide & Protein Research. – 2014. – V. 15. – P. 41–62.
10. Santos A.F.S., Napoleão T.H., Bezerra R.F., E. Carvalho V.M.M., Correia M.T.S., Paiva P.M.G., Coelho L.C.B.B. Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources // In book: Advances in Medicine and Biology. – 2013. – P.33–60.
11. Bayer H., Ey N., Wattenberg A., Voss C., Berger M.R. Purification and characterization of riproximin from *Ximenia americana* fruit kernels. // Protein Expres. Purif. – 2012. – V. 82. – P. 97–105.
12. Foijer F., Wolthuis R.M.F., Doodeman V., Medema R.H., te Riele H. Mitogen requirement for cell cycle progression in the absence of pocket protein activity. // Cancer Cell. – 2005. – V. 8. – P. 455–46.
13. Coulibaly F.S., Youan Bi-B.C. Current status of lectin-based cancer diagnosis and therapy. // AIMS Mol Sci. – 2017. – V. 4, N 1. – P. 1–27.
14. Подгорский В.С., Коваленко Э.А. Лектиновая активность противоопухолевых веществ, синтезируемых *Bacillus subtilis* B-7025. // Микробиология. – 2002. – V.64, N 5. – P. 10–16.
15. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Карпова И.С., Сацук Е.В., Гетьман Е.И. Внеклеточные лектины сапрофитных штаммов бактерий рода *bacillus* (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – V. 50. N 3. – P. 256–263.

16. Подгорский В.С., Иутинская Г.А., Пирог Т.П. Интенсификация технологий микробного синтеза. – Киев: Наук. думка. – 2010.
17. Горбик П.П., Дубровин И.В., Петрановская А.Л., Турелик М.П., Сторожук Л.П., Мищенко В.Н., Абрамов Н.В., Туранская С.П., Махно С.Н., Пилипчук Е.В., Чехун В.Ф., Лукьянова Н.Ю., Шпак А.П., Кордубан А.М. Магнитоуправляемый транспорт лекарственных препаратов: современное состояние разработки и перспективы. // збірник «Поверхня». – 2010. – Т. 2, № 17. – С. 287–297.
18. Горбик П.П., Петрановская А.Л., Турелик М.П., Абрамов Н.В., Туранская С.П., Пилипчук Е.В., Чехун В.Ф., Лукьянова Н.Ю., Шпак А.П., Кордубан А.М. Проблема направленного транспорта лекарственных препаратов: состояние и перспективы // Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2011. –Т. 2, № 4. – С.433–441.
19. Petranovska A.L., Abramov M.V., Opanashchuk N.M., Turanska S.P., Gorbyk P.P., Kusyak N.V., Kusyak A.P., Lukyanova N.Yu., Chekhun V.F. Magnetically sensitive nanocomposites and magnetic liquids based on magnetite, gemcitabine, and antibody HER2. // Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2019. – Т. 10, № 4. – С. 419–431.
20. Петрановська А.Л., Кусяк А.Р., Корнійчук Н.М., Туранська С.П., Горбик П.П., Лук'янова Н.Ю., Чехун В.Ф. Протипухлинні векторні системи на основі біоактивного лектину *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724. // Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2021. – Т. 12, № 3. – С. 190–200.
21. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А.А. Чуйко. – Киев: Наукова думка, 2003. – 415 с.
22. Туров В.В., Геращенко И.И., Крупская Т.В., Суворова Л.П. (під ред. М.Т. Картеля) Нанохимия в решении проблем эндо- и экзоекологии. – Ставрополь: Зебра. 2017. – 515 с.
23. Colloidal Silica: Fundamentals and Applications. // edited by H.E. Bergna, Taylor & Francis LLC, Salisbury, 2005. – 944 с.
24. Федосова Н.І., Черемшенико Н.Л., Гетьман К.І., Симчич Т.В., Чумак А.В., Шляховенко В.О., Воєйкова І.М., Діденко Г.В. Фізико-хімічні та цитотоксичні властивості позаклітинного лектину *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724. // Мікробіологічний журнал. – 2021. – Т. 83, № 1: – С. 39–48.
doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.01.039>
25. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / Под ред. В.П. Глушко. – Москва: Наука, 1978. – 495 с.
26. Туров В.В., Гунько В.М. Кластеризованная вода и пути ее использования. – Киев: Наукова думка, 2011. – 316 с.
27. Гунько В.М., Туров В.В., Горбик П.П. Вода на межфазной границе. – Киев: Наукова думка, 2009. – 694 с.
28. Gun'ko V.M., Turov V.V. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena. – New York: Taylor & Francis, 2013. – 1040 p.
29. Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M., Zarko V.I., Leboda R., Goncharuk E.V., Novza A.A., Turov A.V., Chuiko A.A. Unusual Properties of Water at Hydrophilic/Hydrophobic Interfaces // Adv. Colloid Interface Sci. – 2005 – V. 118. – P. 125–172.
30. Aksnes D.W., Forl K., Kimtys L. Pore size distribution in mesoporous materials as studied by ¹H NMR. // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2001. – V. 3. – P. 3203–3207.
31. Petrov O. V., Furó I. NMR cryoporometry: Principles, applications and potential. // Progr. NMR Spectroscopy. – 2009. – V.54. – P. 97–122.
32. Turov V.V., Gun'ko V.M., Turova A.A., Morozova L.P., Voronin E.F. Interfacial behavior of concentrated HCl solution and water clustered at a surface of nanosilica in weakly

- polar solvents media. // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* – 2011a. – V. 390. P. 48–55.
33. *Gun'ko V.M., Morozova L.P., Turova A.A., Turov A.V., Gaishun V.E., Bogatyrev V.M., Turov V.* Hydrated phosphorus oxyacids alone and adsorbed on nanosilica // *J. Colloid and Interface Science.* – 2012. – V.368. – P.263–272.
34. *Туров В.В., Чехун В.Ф., Гунько В.М., Барвинченко В.М., Чехун С.В., Туров А.В.* Влияние органических растворителей и доксорубицина на кластеризацию воды, связанной ДНК // *Хімія, фізика і технологія поверхні.* – 2010. – Т.1, № 4. – С. 465 – 472.
35. *Gun'ko V.M., Turov V.V., Turov A.V.* Hydrogen peroxide–water mixture bound to nanostructured silica // *Chemical Physics Letters.* – 2012. – V. 531. – P. 132–137.
36. *Israelachvili J.N., Pashley R.M.* Measurement of the hydrophobic interaction between two hydrophobic surfaces in aqueous electrolyte solutions. // *J. Colloid Interface Sci.* – 1984. – V. 98, N 2. – P. 500–514.
37. *Derjaguin B.V., Rabinovich Y.I., Churaev N.V.* Measurement of forces of molecular attraction of crossed fibers as a function of width of air gap. // *Nature (Lond.).* – 1977. – V. 265, N 5594. – P. 520–521.
38. *Gun'ko V.M., Pakhlov E.M., Goncharuk O.V., Andriyko L.S., Marynin A.I., Ukrainets A.I., Charmas B., Skubiszewska-Zięba J., Blitz J.P.* Influence of hydrophobization of fumed oxides on interactions with polar and nonpolar adsorbates. // *Appl. Surf. Sci.* – 2017. – V. 423. – P. 855–868.
39. *Turov V.V., Gun'ko V.M., Pakhlov E.M., Krupskaya T.V., Tsapko M.D., Charmas B., Kartel M.T.* Influence of hydrophobic nanosilica and hydrophobic medium on water bound in hydrophilic components of complex systems. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* – 2018. – V. 552, N5. – P. 39-47. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.05.017>.
40. *Gun'ko V.M., Turov V.V., Pakhlov E.M., Krupskaya T.V., Charmas B.* Effect of water content on the characteristics of hydro-compacted nanosilica. // *Appl. Surf. Sci.* – 2018. – V. 459. – P. 171–178.
41. *Krupskaya T.V., Turov V.V., Barvinchenko V.N., Filatova K.O., Suvorova L.A., Iraci G., Kartel M.T.* Influence of the “wetting-drying” compaction on the adsorption characteristics of nanosilica A-300 // *Ads. Sci. & Technol.* – 2018. – V. 36, I. 1–2. – P. 300–310. doi: <https://doi.org/10.1177/0263617417691768>.
42. *Gun'ko V.M., Turov V.V., Pakhlov E.M., Krupskaya T.V., Borysenko M.V., Kartel M.T., Charmas B.* Water interactions with hydrophobic versus hydrophilic nanosilica. // *Langmuir.* – 2018 – V.34, N 40. – P. 12145–12153. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03110>.
43. *Пат. UA 138023 U* Спосіб переведення в водне середовище суміші гідрофільного та гідрофобного кремнеземів шляхом використання високих механічних навантажень / Крупська Т.В., Туров В.В., Гунько В.М., Картель М.Т. – Опубл. 2019.
44. *Пат. UA 138129 U* Спосіб переведення гідрофобного кремнезему в водне середовище шляхом використання високих механічних навантажень / Крупська Т.В., Туров В.В., Картель М.Т. – Опубл. 2019.
45. *Горбик П.П., Туров В.В.* Наноматериалы и наноконпозиты в медицине, биологии, экологии. /Под ред. А.П. Шпака, В.Ф. Чехуна. – Киев: Наукова думка, 2011. – 444 с.
46. *Герашенко И.И.* Энтеросорбенты: лекарственные средства и диетические добавки. – Киев: НАН Украины, 2014. – 248 с.
47. *Nikolaev V., Mikhalovsky S., Gurina N.* Modern enterosorbents and mechanisms of the iraction. // *EfferentnayaTherapiya.* – 2005. – V. 4. – P. 3–17.

48. European Pharmacopoeia . Strasbourg, Council of Europe, 2005.
49. *Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П.* Фармакогнозия. – Москва: Медицина. – 2002.
50. *Gun'ko V.M, Turov V.V, Krupskaya T.V., Tsapko M.D.* Inter actions of human serum albumin with doxorubicin in different media // *Chemical Physics*. – 2017. – V. 483, N 484. – P. 26–34.
51. Туров В.В., Крупская Т.В., Головань А.П., Андрийко Л.С., Цапко М.Д., Островская Г.В., Калмыкова О.А., Картель Н.Т. Влияние кремнезема на гидратированность цветов *Hibiscus sabdariffa* в нейтральной и кислой средах // *Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии*, зб. наук. праць. – 2016. – Т 14, вип. 4 – С. 643–660.
52. *Krupskaya T.V., Golovan A.P., Andriyko L.S., Lupascu T., Ostrovska G.V., Turov V.V.* Composite systems for medical applications based on methylsilicon and biologically active substances // *New Materials, Compounds and Applications*. – 2018. – V. 2, N3. – P. 231–242.
53. *Туров В.В., Крупская Т.В., Головань А.П., Картель Н.Т.* Композитные системы на основе измельченных цветов *Calendula officinalis* и нанокремнезема А-300. // *Доповіди НАН України*. – 2017. – № 4. – С. 76–83.
54. *The Chemistry of Silica*. // Ralph K. Iler, John Wiley and Sons. – New York, 1979. – 866 p.
55. Basic characteristics of Aerosil. Technical Bulletin Pigments. N 11. Hanau: Degussa AG, 1997. – 80 p.
56. *The surface properties of silicas*. // edited by A.P. Legrand. – New York: Wiley, 1998. – 470 p.
57. *Turov V.V., Gun'ko V.M., Krupskaya T.V., Kartel M.T.* Influence of solid and liquid hydrophobic compounds on characteristics of water located in an adsorption layer of a hydrophilic component of the system // *Хімія, фізика та технологія поверхні*. – 2018. – Т. 9, № 4. – С.341–352.
58. *Khajeh M., Laurent S., Dastafkan K.* Nanoadsorbents: classification, preparation, and applications (with emphasis on aqueous media). // *Chem. Rev.* – 2013. – V. 113. – P. 7728–7768, <http://doi.org/10.1021/cr400086v>.
59. *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications*. // edited by H.E Bergna, W.O. Roberts – CRC Press, BocaRaton, 2006 – 944 p.
60. *Gun'ko V.M., Turov V.V., Pakhlov E.V., Krupskaya T.V., Borysenko M.V., Kartel M.T., Charnas B.* Water interaction with hydrophobic versus hydrophilic nanosilica // *Langmuir*. – 2018. – V. 34, N 40. – P. 12145–12153. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03110>
61. *Gun'ko V.M., Turov V.V., Pakhlov E.V., Krupskaya T.V., Charnas B.* Effect of water content on the characteristics of Hydro-compacted nanosilica. // *Applied Surface Sci.* – 2018. – V.459. – P. 171–178.
62. *Пат. UA 105151 U* Спосіб ущільнення нанокремнезема / Крупська Т.В., Туров В.В., Барвінченко В.М, Філатова К.О., Суворова Л.А., Картель М.Т. – Опубл. 2016.
63. *Нельсон Д., Кокс М.* Основы биохимии Ленинджера. / Пер. с англ. В 3 т. – Москва: Лаборатория знаний. 1985.
64. *Moelbert S., Normand B., De Los Rios P.* Kosmotropes and Chaotropes: Modelling Preferential Exclusion, Binding and Aggregate Stability // *Biophysical Chemistry*. – 2004. – V. 112. – P.45–57.
65. *Wiggins P.M.* High and Low density Intracellular Water // *Coll. Mol. Biol.* – 2001. – V. 47.– P. 735–744.

66. *Chaplin M.* Water Structuring at Colloidal Surfaces // Surface Chemistry In. Surface Chemistry in Biomedical and environmental Science. Ed. J. Blitza and V. Gun'ko, NATO Security Through Science Series, Springer. – 2006. – P. 1–10.
67. *Turov V.V., Gun'ko V.M., Krupskaya T.V., Borysenko M.V., Kartel M.T.* Interfacial behavior of polar and nonpolar frozen/unfrozen liquid sinter acting with hydrophilic and hydrophobic nanosilica alone and in blends // Journal of Colloid and Interface Science. – 2020. – V. 588. – P. 70–83 DOI: 10.1016/j.jcis.2020.12.065

REFERENS

1. Podgorsky V.S., Kovalenko E.A., Karpova I.S., Sashchuk E.V., Get'man E.I. Extracellular lectins of saprophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus* (review). *Applied Biochem. Microbiol.*, 2014. **50** (3), 256.
2. Bligh K.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipids extraction and purification. *Canad J Biochem Physiol*, 1959. **37** (8), 911.
3. Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Pospelova V.V., Shenderov B.A. Lactobacilli and bifidobacteria lectins as possible signal molecules regulating intra- and inter-population bacteria–bacteria and host–bacteria relationships. Part I. Methods of bacterial lectin isolation, physico-chemical characterization and some biological activity investigation. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2006. **18**, 55.
4. Patent UA 131824 UA Chekhun V.F., Didenko G.V., Cheremshenko N.L., et al. Strain of bacteria *Bacillus subtilis* IMB B-7724 – producer of cytotoxic substances with antitumor activity. 2019. [in Ukrainian].
5. Podgorsky V.S., Kovalenko E.A., Getman E.I., Potebnya G.P., Tanasienko O.A. Lectin activity of antitumor substances synthesized by *Bacillus subtilis* B-7025]. *Mikrobiol. Z.* 2002. **64**(5): 10. [in Russian].
6. Vanitha N., Rajan S., Murugesan A.G. Optimization and production of alkaline protease enzyme from *Bacillus subtilis* 168 isolated from food industry waste. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2014. **3**(6), 36.
7. Contesini F.J., Melo R.R., Sato H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2018. **38**(3). 321.
8. Potebnya G.P., Tanasienko O.A., Lisovenko G.S., Savtsova Z.D. Use of cytotoxic lectins of bacterial origin in immunotherapy of experimental tumors. In: Structure and biological activity of bacterial biopolymers. Ed. VK Pozur. (Kiev: Vyd-polygr Center "Kyiv University", 2003. 235).
9. Santos F.S., da Silva M.D.C., Napoleão T.H., Paiva P.M.G., Correia M.T.S., Coelho L.C.B.B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications *Current Topics in Peptide & Protein Research*. 2014. **15**, 41.
10. Santos A.F.S., Napoleão T.H., Bezerra R.F.E. Carvalho V.M.M., Correia M.T.S., Paiva P.M.G., Coelho L.C.B.B. *Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources In book: Advances in Medicine and Biology*. 2013. 33
11. Bayer H., Ey N., Wattenberg A., Voss C., Berger M.R. Purification and characterization of ripoximmin from *Ximenia americana* fruit kernels. *Protein Expres. Purif.*, 2012. **82**, 97.
12. Fojijer F., Wolthuis R.M.F., Doodeman V., Medema R.H., te Riele H. Mitogen requirement for cell cycle progression in the absence of pocket protein activity. *Cancer Cell*, 2005. **8**, 455.
13. Coulibaly F.S., Youan Bi-B.C. Current status of lectin-based cancer diagnosis and therapy. *AIMS Mol Sci* 2017. **4** (1), 1.

14. Podgorskiy V.S., Kovalenko E.A. Lectin activity of antitumor substances synthesized by *Bacillus subtilis B-7025*. *Microbiology*, 2002. **64** (5), 10. [in Russian].
15. Podgorskiy V.S., Kovalenko E.A., Karpova I.S., Sashchuk E.V., Getman E.I. Extracellular lectins of saprophytic strains of bacteria of the genus bacillus (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2014. **50** (3), 256. [in Russian].
16. Podgorskiy V.S., Iutinskaya G.A., Pie T.P. *Intensification of microbial synthesis technologies*. (Kiev Naukova Dumka, 2010). [in Russian].
17. Gorbyk P.P., Dubrovin I.V., Petranovska A.L., Turelyk M.P. Magnetocarried delivery of drugs: contemporary state of development and prospects. *Surface*, 2010. **2**(17), 287. [in Russian].
18. Gorbyk P.P., Petranovska A.L., Turelyk M.P., Abramov N.V., Turanska S.P., Pylypchuk Ye.V., Chekhun V.F., Lukyanova N.Yu., Shpak A.P., Korduban A.M. Problem of targeted delivery of drugs: state and prospects. *Him. Fiz. Tehnol. Poverhni*, 2011. **2**(4), 433. [in Russian].
19. Petranovska A.L., Abramov M.V., Opanashchuk N.M., Turanska S.P., Gorbyk P.P., Kussyak N.V., Kussyak A.P., Lukyanova N.Yu., Chekhun V.F. Magnetically sensitive nanocomposites and magnetic liquids based on magnetite, gemcitabine, and antibody HER2. *Him. Fiz. Tehnol. Poverhni*. 2019. **10**(4), 419.
20. Petranovska A.L., Kussyak A.R., Korniychuk N.M., Turanskaya S.P., Gorbyk P.P., Lukyanova N.Yu., Chekhun V.F. Antitumor vector systems based on bioactive lectin *Bacillus subtilis IIB B-7724*. *Chemistry, Physics and Surface Technology*. 2021. **12**(3): 190. [in Ukrainian].
21. Medical chemistry and clinical application of silicon dioxide. (Ed. A.A. Chuiko). (Kiev: Naukova Dumka, 2003). [in Russian].
22. Turov V.V., Gerashchenko I.I., Krupskaya T.V., Suvorova L.P. *Nanochemistry in solving problems of endo- and exoecology*. (M.T. Kartel ed.) (Stavropol: Zebra, 2017). [in Russian].
23. Bergna H.E. (Ed) *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications*. (Taylor & Francis LLC, Salisbury, 2005).
24. Fedosova N.I., Cheremshenko N.L., Hetman K.I., Simchich T.V., Chumak A.V., Shlyakhovenko V.O., Voeykova I.M., Didenko G.V. Physicochemical and cytotoxic properties of extracellular lectin *Bacillus subtilis IMV B-7724*. *Mikrobiol. Z.* 2021. **83**(1): 39. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.01.039>
25. Thermodynamic properties of individual substances. (Moscow: Nauka, 1978). [in Russian].
26. Turov V.V., Gun'ko V.M. *Clustered water and ways of its application*. (Kiev: Naukova dumka, 2011). [in Russian].
27. Gun'ko V.M., Turov V.V., Gorbik P.P. *Water at interface*. (Kiev: Naukova dumka. 2009). [in Russian].
28. Gun'ko V.M., Turov V.V. *Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena*. (New York: Taylor & Francis, 2013).
29. Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M. et al. Unusual Properties of Water at Hydrophilic/Hydrophobic Interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2005. **118**: 125.
30. Aksnes D.W., Forl K., Kimtys L., Pore size distribution in mesoporous materials as studied by ¹H NMR, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2001. **3**: 3203.
31. Petrov O.V., Furó I. NMR cryoporometry: Principles, applications and potential. *Progr. NMR Spectroscopy*. 2009. **54**: 97.

32. Turov V.V., Gun'ko V.M., Turova A.A., Morozova L., Voronin E.F. Interfacial behavior of concentrated HCl solution and water clustered at a surface of nanosilica in weakly polar solvents media, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2011a. **390**: 48.
33. Gun'ko V.M., Morozova L.P., Turova A.A., Turov A.V., Gaishun V.E., Bogatyrev V.M., Turov V.V. Hydrated phosphorus oxyacids alone and adsorbed on nanosilica. *J. Colloid and Interface Science*. 2012. **368**: 263.
34. Turov V.V., Chekhun V.F., Gunko V.M., Barvinchenko V.M., Chekhun S.V., Turov A.V. Influence of organic solvents and doxorubicin on clustering of water bound DNA. *Chemistry, Physics and Surface Technology*. 2010. **1**(4): 465. [in Russian].
35. Gun'ko V.M., Turov V.V., Turov A.V. Hydrogen peroxide–water mixture bound to nanostructured silica. *Chemical Physics Letters*. 2012. **531**: 132.
36. Israelachvili J.N., Pashley R.M. Measurement of the hydrophobic interaction between two hydrophobic surfaces in aqueous electrolyte solutions. *J. Colloid Interface Sci*. 1984. **98**(2): 500.
37. Derjaguin, B.V., Rabinovich, Y.I., Churaev, N.V. Measurement of forces of molecular attraction of crossed fibers as a function of width of air gap. *Nature (Lond.)* 1977. **265** (5594): 520.
38. Gun'ko V.M., Pakhlov E.M., Goncharuk O.V., Andriyko L.S., Marynin A.I., Ukrainets A.I., Charnas B., Skubiszewska-Zięba J., Blitz J.P. Influence of hydrophobization of fumed oxides on interactions with polar and nonpolar adsorbates, *Appl. Surf. Sci*. 2017. **423**: 855.
39. Turov V.V., Gun'ko V.M., Pakhlov E.M., Krupska T.V., Tsapko M.D., Charnas B., Kartel M.T. Influence of hydrophobic nanosilica and hydrophobic medium on water bound in hydrophilic components of complex systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2018. **552**(5): 39. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.05.017>.
40. Gun'ko V.M., Turov V.V., Pakhlov E.M., Krupska T.V., Charnas B. Effect of water content on the characteristics of hydro-compacted nanosilica. *Appl. Surf. Sci*. 2018. **459**: 171.
41. Krupskaya T.V., Turov V.V., Barvinchenko V.M., Filatova K.O., Suvorova L.A., Gianluca Iraci, Kartel M.T. Influence of the “wetting-drying” compaction on the adsorptive characteristics of nanosilica A-300. *Ads. Sci. & Technol*. 2018. **36**(1-2): 300. <https://doi.org/10.1177/0263617417691768>
42. Gun'ko V.M., Turov V.V., Pakhlov E.M., Krupska T.V., Borysenko M.V., Kartel M.T., Charnas B., Water interactions with hydrophobic versus hydrophilic nanosilica. *Langmuir*. 2018. **34**(40): 12145. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03110>.
43. *Patent UA 138023*. Krupska T.V., Turov V.V., Gun'ko V.M., Kartel M.T. Method of transferring a mixture of hydrophilic and hydrophobic silica into an aqueous medium by using high mechanical loads. 2019. [in Ukrainian].
44. *Patent UA 138129*. Krupska T.V., Turov V.V., Kartel M.T. Method of converting hydrophobic silica into an aqueous medium by using high mechanical loads. 2019 [in Ukrainian].
45. Gorbik P.P., Turov V.V. *Nanomaterials and nanocomposites in medicine, biology, ecology* / Ed. A.P. Shpaka, V.F. Chekhun. (Kiev: Naukova Dumka, 2011). [in Russian].
46. Gerashchenko I.I. *Enterosorbents: medicines and dietary supplements*. (Kiev: NAS of Ukraine. 2014).
47. Nikolaev V., Mikhalovsky S., Gurina N. Modern enterosorbents and mechanisms of the iraction. *Efferentnaya Terapiya*. 2005. **4**:3.
48. European Pharmacopoeia. (Strasbourg, CouncilofEurope, 2005).

49. Muraveva D.A., Samylina I.A., Yakovlev G.P. *Pharmacognosy*. (Moscow: Medicine, 2002). [in Russian].
50. Gun'ko V.M, Turov V.V, Krupskaya T.V., Tsapko M.D. Inter actions of human serum albumin with doxorubicin in different media. *Chemical Physics*. 2017. **483-484**: 26.
51. Turov V.V., Krupskaya T.V., Golovan A.P., Andriyko L.S., Tsapko M.D., Ostrovskaya G.V., Kalmykova O.A., Kartel N.T. The effect of silica on the hydration of Hibiscus sabdariffa flowers in neutral and acidic media. *Nanosystems, nanomaterials, nanotechnology*. 2016. **14**(4): 643. [in Russian].
52. Krupskaya T.V., Golovan A.P., Andriyko L.S., Lupascu T., Ostrovskaya G.V., Turov V.V. Composite systems for medical applications based on methylsilicon and biologically active substances. *New Materials, Compounds and Applications*. 2018. **2**(3): 231.
53. Turov V.V., Krupskaya T.V., Golovan A.P., Kartel M.T. Composites Systems on the Base of Shredded Flowers of Calendula officinalis and Nanosilica A-300. *Reports of NAN of Ukraine*. 2017. **4**: 76. [in Russian].
54. Iler R.K. *The Chemistry of Silica*. (New York: John Wiley and Sons, 1979)
55. *Basic characteristics of Aerosil*. (Technical Bulletin Pigments. N 11. Hanau: Degussa AG, 1997).
56. Legrand A.P. *The surface properties of silicas*. (New York: Wiley, 1998).
57. Turov V.V., Gun'ko V.M., Krupskaya T.V., Kartel M.T. Influence of solid and liquid hydrophobic compounds on characteristics of water located in an adsorption layer of a hydrophilic component of the system. *Chemistry, Physics and Surface Technology*. 2018. **9**(4): 341.
58. Khajeh M., Laurent S., Dastafkan K. Nanoadsorbents: classification, preparation, and applications (with emphasis on aqueous media). *Chem. Rev.* 2013. **113**: 7728. <http://doi.org/10.1021/cr400086v>.
59. *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications*. (edited by H.E. Bergna, W.O. Roberts. CRC Press, Boca Raton, 2006).
60. Gun'ko V.M., Turov V.V., Pakhlov E.V., Krupskaya T.V., Borysenko M.V., Kartel M.T., Charnas B. Water interaction with hydrophobic versus hydrophilic nanosilica. *Langmuir*. 2018. **34**(40):12145
61. Gun'ko V.M., Turov V.V., Pakhlov E.V., Krupskaya T.V., Charnas B. Effect of water content on the characteristics of Hydro-compacted nanosilica. *Applied Surface Sci.* 2018. **459**: 171.
62. *Patent UA 105151*. Krupskaya T.V., Turov V.V., Barvinchenko V.M., Filatova K.O., Suvorova L.A., Kartel M.T. The method of compaction of nanosilicon. 2016. [in Ukrainian].
63. Nelson D., Cox M. *Fundamentals of Lehninger's Biochemistry*. (Moscow: Laboratory of Knowledge. 1985). [in Russian].
64. Moelbert S., Normand B., De Los Rios P. Kosmotropes and Chaotropes: Modelling Preferential Exclusion, Binding and Aggregate Stability. *Biophysical Chemistry*. 2004. **112**: 45.
65. Wiggins P.M. High and Low density Intracellular Water. *Coll. Mol. Biol.* 2001. **47**: 735.
66. Chaplin M. *Water Structuring at Colloidal Surfaces*. (Surface Chemistry In. Surface Chemistry in Biomedical and environmental Science. Ed. J. Blitz and V. Gun'ko, NATO Security Through Science Series, Springer. 2006: 1).
67. Turov V.V., Gun'ko V.M, Krupskaya T.V., Borysenko M.V., Kartel M.T. Inter facial behavior of polar and nonpolar frozen/unfrozen liquid sinter acting with hydrophilic and hydrophobic nanosilica alone and in blends. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2020. **588**: 70. DOI: [10.1016/j.jcis.2020.12.065](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.12.065)

COMPOSITE SYSTEMS FOR MEDICAL PURPOSES, CREATED ON THE BASIS OF HYDROPHOBIC SILICA

V.V. Turov¹, P.P. Gorbyk¹, T.V. Krupska¹, S.P. Turanska¹,
V.F. Chekhun², N.Yu. Luk'yanova²

¹O. O. Chuiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine,
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine,

²R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, 45 Vasylkivska Str., Kyiv, 03022, Ukraine

E-mail: v_turov@ukr.net

Composite systems with certain cytotoxic (AMI/lectin) and adsorption (AMI/gelatin) activity have been developed on the basis of methyl silica and protein molecules – lectin and gelatin. For both types of composites, mechanisms of water binding to the surface and methods of transferring of hydrophobic materials into the aquatic environment have been investigated. The state of interfacial water in air, organic and acid media was studied. It has been found that the presence of a hydrophobic component in composites stabilizes of surface water in a weakly associated state, when a significant part of water molecules does not form hydrogen bonds. Liquid hydrophobic medium enhances this effect, and the strong acid (trifluoroacetic), added to it, promotes the transition of water to a strongly associated state. It has been shown that the redistribution of water in the interparticle intervals of AMI with protein molecules immobilized on their surface changes under the influence of mechanical loads. Mechanoactivated samples are characterized by the possibility of water penetration into the spaces between the primary particles of methyl silica. It has been shown that immobilization of lectin on the surface of AMI is accompanied by an increase in the interfacial energy γ_s from 4.1 to 5.2 J/g. This is due to an increase in the concentration of strongly bound water. If we analyze the changes in the distributions of radii R of the clusters of adsorbed water, we can state that in the water adsorbed by native lectin molecules, there are two main maxima at $R = 1$ and 3 nm. In the immobilized state, the maximum at $R = 1$ nm is present in both types of water (of different order), but the second maximum is observed only for more ordered associates.

Keywords : *lectin, composite system, methyl silica, ¹H NMR spectroscopy, gelatin, strongly associated and weakly associated water, water clusters*