

УДК 544.723, 543.544

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ВОДЫ НА АДсорбЦИЮ КОМПОНЕНТОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ СИЛИКАГЕЛЕМ

Л.Н. Галль¹, М.Я. Малахова², Е.Ю. Меленевская^{3},
Н.Г. Подосенова¹, Л.В. Шаронова⁴*

¹ Учреждение Российской Академии наук Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

² Медицинская Академия постдипломного образования, Санкт-Петербург

³ Учреждение Российской Академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, В.О. Большой пр. 31, 199004 Санкт-Петербург;
тел.: (812)323-5963; факс: (812)328-68-69; эл. почта: melen@hq.macro.ru

⁴ Учреждение Российской Академии наук Физико-Технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН. Санкт-Петербург

В работе изучаются свойства силикагеля как адсорбента для плазмосорбции. Проведены исследования влияния режимов предварительной обработки силикагелей и продолжительности контакта с силикагелем на плазмосорбцию компонентов плазмы крови человека, таких как белки, триглицериды, холестерин (липопротеинов низкой и высокой плотности). Полученные результаты могут быть использованы для варьирования адсорбционной ёмкости силикагелей в процессе подготовки адсорбента к лечебным процедурам. Для объяснения экспериментальных концентрационных и кинетических (временных) закономерностей плазмосорбции компонентов плазмы крови использована модель заряжения поверхности зерен силикагеля при гидратации.

Ключевые слова: адсорбция, десорбция, силикагель, гидратация, плазма крови, холестерин.

ВВЕДЕНИЕ. Известно [1], что высокодисперсные аморфные кремнезёмы (в том числе силикагели) обладают комплексом свойств, которые позволяют использовать их в биотехнологии, медицине, фармации. Возможность легкого регулирования пористости и химического состава силикатов и силикагелей открывают широкие перспективы направленного синтеза высокеемких, селективных к липидам и холестерину сорбентов [2, 3].

Клиницистов привлекает сочетание в силикагелях комплекса полезных свойств, таких как химическая чистота, гидрофильность, адсорбционная ёмкость, отсутствие токсичности, низкая стоимость, возможность применения при многих заболеваниях, т.е. многоцелевое назначение. Силикагель разрешен к клиническому применению в качестве наполнителя в лекарственных формах и имеет перспективы использования в качестве энтеросорбента и матрицы для создания лекарств пролонгирующего действия. В связи с этим целесообразны и перспективны дальнейшие фундаментальные и прикладные работы в этом направлении.

Существуют различные способы модифицирования свойств силикагеля. Например, были получены иммуносорбенты с ковалентной фиксацией антител или антигенов на силикагелях [4], которые имеют ряд преимуществ по сравнению с другими матрицами, применяемыми для синтеза иммуносорбентов: дешевизна, доступность, хорошие перфузные характеристики.

* - адресат для переписки

Однако иммуносорбция до последнего времени остается в основном областью экспериментального поиска. Расширение её клинического применения ограничивается высокой стоимостью изготовления, стерилизации, регенерации и невозможности длительного хранения сорбентов.

Нами было выявлено [5, 6], что дешевым и высокоэффективным способом модифицирования силикагеля является введение молекул фуллерена. Получаемый продукт представлял собой высокоэффективный нетоксичный адсорбент для выведения атерогенных липопротеинов из плазмы крови [5]. Однако остался не выясненным вопрос о влиянии термической обработки адсорбента перед его использованием в процессе плазмосорбции и, в частности, о влиянии воды на адсорбционные свойства. Этот вопрос может быть ключевым для применения, что обусловлено, прежде всего, тем, что сама плазма крови содержит воду, а кроме того, любой адсорбент перед применением проходит стерилизацию, которая может быть выполнена с включением воды и прогревом в специальных установках. В то же время было установлено [7-9], что процессы адсорбции и гетерогенного катализа на поверхности силикагелей должны существенно зависеть от режимов предварительной температурной обработки силикагеля, т.е. от степени и характера гидратации его поверхности. Нагревание силикагеля в водной среде влияет на его адсорбционную емкость по отношению к средномолекулярным пептидам (предварительно выделенным из плазмы крови и введенными в физиологический раствор) [10]. При этом, рост адсорбционной емкости при гидратации обусловлен протеканием реакции кислотно-основного типа, приводящей к необратимому разрушению пептидов. Подобные результаты были получены при использовании алюмосиликатов [11]. Температура обработки геля и концентрация сульфата алюминия в реакционной смеси влияют на сродство алюмосиликата к липопротеинам [11]. Так, повышение температуры сушки геля от 150 до 600°C приводят к уменьшению ёмкости по холестерину от 0,013 до 0,005 ммоль/г. Авторы исследования полагают, что определяющую роль при сорбции липопротеинных частиц играют степень гидроксирования активных центров и поверхностная концентрация атомов алюминия.

В данной работе продолжены исследования влияния режима термической подготовки силикагеля на плазмосорбцию. Рассматривается адсорбция высокомолекулярных компонентов плазмы крови - белков, триглицеридов, общего холестерина (ХС), а также холестерина липопротеинов низкой и высокой плотности (ЛПНП и ЛПВП соответственно).

МЕТОДИКА. В работе использован аморфный силикагель МСА, диаметр пор 2500Å, удельная поверхность 20 м²/г, общий объем пор 0,89 мл/г. Термическую подготовку силикагеля проводили в соответствии со следующими схемами: гидратированный силикагель получен прогревом исходного, хранившегося на воздухе силикагеля при 100°C в воде в течение 10 ч; дегидратированный силикагель получен прогревом силикагеля при 650°C в вакууме в течение 10 ч.

Определение адсорбционных свойств силикагелей проводили в статических условиях с использованием стеклянных пробирок вместимостью 10 мл, в которые к 100 мг сухого силикагеля добавляли 3 мл плазмы крови. Содержимое перемешивали в течение 5, 10 или 30 мин. После этого растворы центрифугировали (центрифуга "Eppendorf" 5804 (Германия) со скоростью до 12000 g в течение 5 мин), отбирали плазму крови над адсорбентом для определения остаточных концентраций компонентов в плазме. Все эксперименты проводились на свежей плазме крови. Плазма получена в Федеральном центре сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова на станции переливания крови с информированного согласия здоровых доноров. Исследования липидного обмена и общий белок определяли на автоматическом биохимическом анализаторе "Хитачи-902" (Япония) с использованием реагентов и контрольных материалов фирмы "Рош диагностика" (Швейцария).

Удаление низкомолекулярных компонентов (НМК) из плазмы крови осуществляли путём её диализа в мешках “Sigma” в соотношении 1:100 против 0.15 M NaCl в течение 12 час.

Статистическая обработка данных проводилась в пакетах STATISTICA 6.0. (StatSoft Inc.) и Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corp.). Данные приведены в виде средних \pm стандартная ошибка. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,1. При $p < 0,1$ различия считались статистически достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Влияние параметров термической обработки силикагеля на состав плазмы крови после адсорбции приведены в таблицах 1-4, где сопоставлено содержание основных компонентов в исходной плазме крови, т.е. до адсорбции, и после её контакта с образцами трёх адсорбентов: исходного силикагеля, хранившегося в течение длительного времени в комнатных условиях, гидратированного и дегидратированного. Продолжительность контакта плазмы крови с силикагелем составляла 10 мин, соотношение объемов силикагеля и плазмы крови было 1:3.

Из таблицы 1 видно, что относительные изменения концентрации белков малы при использовании в качестве адсорбента любого из трёх образцов силикагелей. Можно считать, что концентрация постоянна в пределах погрешности её определения, т.е. адсорбция белков отсутствует, какой бы термической обработке ни был подвергнут силикагель. Видно, что гидратация силикагеля приводит к заметному уменьшению концентрации триглицеридов, а дегидратация сохраняет концентрацию этого компонента неизменной.

Таблица 1. Состав плазмы крови до и после адсорбции силикагелями в зависимости от параметров их термообработки.

Компоненты плазмы крови	Исходная плазма крови до адсорбции	Плазма крови после адсорбции на силикагелях в течение 10 мин		
		Исходный силикагель	Гидратированный силикагель 100°C/10 ч	Дегидратированный силикагель 650°C/10 ч
Белок, г/л	63 \pm 3	58 \pm 2,9	60 \pm 3	63 \pm 3
p	0,048	0,05	0,05	0,048
Триглицериды, мМ	1,22 \pm 0,12	1,15 \pm 0,12	0,85 \pm 0,08	1,22 \pm 0,12
p	0,098	0,104	0,094	0,098
Общий ХС, мМ	3,85 \pm 0,19	3,15 \pm 0,15	2,3 \pm 0,1	3,46 \pm 0,17
p	0,049	0,048	0,043	0,049
ХС ЛПНП, мМ	2,36 \pm 0,12	1,88 \pm 0,09	1,36 \pm 0,07	2,12 \pm 0,1
p	0,051	0,048	0,051	0,047
ХС ЛПВП, мМ	1,0 \pm 0,05	0,75 \pm 0,04	0,45 \pm 0,2	0,90 \pm 0,045
p	0,05	0,053	0,044	0,05

Примечание: во всех опытах число измерений n = 3.

Адсорбция на гидратированном силикагеле приводит к существенному уменьшению общего холестерина (на 40-50% по массе), причем за счёт удаления как холестерина ЛПНП так и ЛПВП. Уменьшение содержания холестерина при использовании дегидратированного силикагеля оказалась незначительным.

СИЛИКАГЕЛЬ И СОРБЦИЯ КОМПОНЕНТОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

В таблице 2 приведены данные по изменению состава плазмы крови при контакте ее с дегидратированным силикагелем в зависимости от условий хранения его после дегидратации. Видно, что изменение состава плазмы крови при контакте с силикагелем, выдержанным после дегидратации в течение суток в комнатных условиях, приближается к наблюдаемому при адсорбции на исходном силикагеле. Этот результат подтверждает роль молекул воды в адсорбции компонентов плазмы крови, в первую очередь, холестеринсодержащих: обезвоженный силикагель захватывает молекулы воды из атмосферы и адсорбционная ёмкость адсорбента возрастает [7-9]. Влияние времени адсорбции (продолжительности контакта плазмы крови с адсорбентом) на состав плазмы крови рассмотрено в таблице 3.

Таблица 2. Состав плазмы крови до и после адсорбции исходным силикагелем и дегидратированным в зависимости от времени его хранения.

Компоненты плазмы крови	Исходная плазма крови до адсорбции	Плазма крови после адсорбции		
		Исходный силикагель	Дегидратированный силикагель	
			через 0 ч после дегидратации	через 24 ч после дегидратации
Белок, г/л	63±3	58±2,9	63±3	60±3
p	0,048	0,05	0,048	0,05
Триглицериды, мМ	1,22±0,12	1,15±0,12	1,22±0,12	1,15±0,12
p	0,098	0,104	0,098	0,104
Общий ХС, мМ	3,85±0,19	3,15±0,15	3,46±0,2	3,18±0,16
p	0,049	0,048	0,057	0,05
ХС ЛПНП, мМ	2,36±0,12	1,88±0,09	2,12±0,1	1,9±0,1
p	0,051	0,048	0,047	0,052
ХС ЛПВП, мМ	1,0±0,05	0,75±0,04	0,90±0,04	0,75±0,04
p	0,05	0,053	0,044	0,053

Таблица 3. Состав плазмы крови до и после адсорбции разными силикагелями в зависимости от времени адсорбционного контакта (10, 30 мин).

Компоненты плазмы крови	Исходная плазма	Плазма после адсорбции на силикагелях					
		Исходный		Дегидратированный		Гидратированный	
		10 мин	30 мин	10 мин	30 мин	10 мин	30 мин
Белок, г/л	63±3	58±2,9	58±2,9	63±3	47±2,3	60±3	20±1
p	0,048	0,05	0,05	0,048	0,049	0,05	0,05
Триглицериды, мМ	1,22±0,12	1,15±0,12	1,04±0,1	1,22±0,12	0,48±0,05	0,85±0,08	0,65±0,06
p	0,098	0,104	0,096	0,098	0,104	0,094	0,092
Общий ХС, мМ	3,85±0,19	3,15±0,15	2,30±0,1	3,46±0,17	1,70±0,08	2,30±0,1	1,35±0,07
p	0,049	0,048	0,043	0,049	0,047	0,043	0,052
ХС ЛПНП, мМ	2,36±0,12	1,88±0,09	1,65±0,08	2,12±0,1	0,94±0,05	1,36±0,05	0,70±0,03
p	0,051	0,048	0,048	0,047	0,053	0,037	0,043
ХС ЛПВП, мМ	1,0±0,05	0,75±0,04	0,60±0,03	0,9±0,045	0,4±0,2	0,45±0,02	0,30±0,015
p	0,05	0,053	0,05	0,05	0,05	0,044	0,05

Видно, что изменения состава плазмы крови возрастают с увеличением времени контакта с 10 до 30 мин. При этом происходит резкое снижение концентраций всех компонентов плазмы крови, включая белки и триглицериды. Наблюдаемые закономерности характерны для адсорбции на всех трёх силикагелях (исходном, гидратированном и дегидратированном) и являются свидетельством нестационарности процесса адсорбции в условиях проводимого эксперимента. Предполагаемой причиной наблюдаемой нестационарности являются свободные радикалы. Справедливость этого подтвердили результаты адсорбции плазмы крови, из которой была удалена диализом мочевая кислота, входящая в состав уходящих низкомолекулярных компонентов, в основном солей. Согласно [11], экстракция мочевой кислоты изменяет содержание антиоксидантов, при этом состав плазмы крови по основным компонентам, как видно из таблицы 4, изменяется незначительно. Результаты адсорбции компонентов плазмы крови приведены в таблице 4.

Таблица 4. Состав плазмы крови до и после адсорбции разными силикагелями при наличии и отсутствии в плазме мочевой кислоты.

Компоненты плазмы крови	До удаления мочевой кислоты			После удаления мочевой кислоты		
	Плазма до адсорбции (исходная)	Плазма после адсорбции на силикагелях		Плазма до адсорбции (исходная)	Плазма после адсорбции на силикагелях	
		ГС	ДС		ГС	ДС
Белок, г/л	63±3	39,7±2	47,25±2,35	64±3,2	30,7±1,5	43,5±2,2
p	0,048	0,05	0,05	0,05	0,049	0,051
Триглицериды, мм	1,18±0,12	0,65±0,06	0,88±0,08	1,46±0,15	0,54±0,05	0,73±0,07
p	0,101	0,092	0,091	0,103	0,093	0,096
Общий ХС, мм	3,84±0,2	1,34±0,07	1,62±0,08	3,6±0,18	0,58±0,03	0,36±0,018
p	0,052	0,052	0,049	0,05	0,051	0,05
ХС ЛПНП, мм	2,4±0,12	1,16±0,06	1,25±0,06	2,24±0,11	0,24±0,01	0,220±0,011
p	0,05	0,052	0,048	0,049	0,042	0,05
ХС ЛПВП, мм	1,15±0,06	0,345±0,017	0,4±0,02	0,98±0,05	0,15±0,008	0,100±0,005
p	0,052	0,049	0,05	0,051	0,053	0,05

Примечание. ГС - гидратированный силикагель, ДС - дегидратированный силикагель.

Видно, что удаление мочевой кислоты существенно активизирует адсорбцию всех компонентов плазмы крови, что подтверждает предположение о присутствии свободных радикалов в системе и их роли в процессе адсорбции компонентов плазмы крови на силикагеле. Основным источником свободных радикалов является заряженная поверхность адсорбента, которая способна катализировать процесс химического взаимодействия с адсорбированными на ней компонентами плазмы крови. Это взаимодействие, как было ранее нами показано в [10] с использованием метода масс-спектрометрии, приводит к разрушению молекул средней массы и образованию молекул меньшей молекулярной массы. Можно предполагать аналогичные закономерности при адсорбции молекул белка, триглицеридов, холестерина и липопротеинов. Таким образом, координационно-связанные с кремнием молекулы воды, вводимые в силикагель при его гидратации, в процессе его хранения в атмосферных условиях и даже

СИЛИКАГЕЛЬ И СОРБЦИЯ КОМПОНЕНТОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

в процессе его контакта с плазмой крови, ответственны за образование заряженных центров, которые являются активными центрами адсорбции, причём не только физической адсорбции, но и хемосорбции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Проведенные исследования выявили существенное влияние на адсорбцию компонентов плазмы крови параметров термообработки, условий хранения силикагеля, времени адсорбции. По результатам исследований можно сделать следующие выводы:

- гидратация увеличивает адсорбционную емкость силикагеля по отношению к холестеринсодержащим компонентам плазмы крови, и тем в большей степени, чем больше время экспозиции;

- при проведении адсорбции с использованием дегидратированного силикагеля немедленно после завершения дегидратации наблюдается уменьшение адсорбционной ёмкости силикагеля ко всем компонентам плазмы крови;

- увеличение адсорбционной емкости силикагелей по отношению ко всем компонентам плазмы крови в процессе адсорбции указывает на его нестационарность, обусловленную образованием новых реакционных центров в процессе адсорбции.

Знание закономерностей изменения адсорбционных характеристик по отношению к разным компонентам плазмы крови в зависимости от условий термической обработки адсорбента на основе силикагеля имеет большое практическое значение: во-первых, вода является неизбежным сопутствующим компонентом в процессах плазмосорбции и ее влияние необходимо учитывать; во-вторых, результаты могут быть использованы для целенаправленного изменения адсорбционных свойств силикагеля, предназначенного для удаления атерогенных липопротеинов низкой плотности.

Результаты проведенного исследования позволяют предложить режим плазмосорбции: процесс следует осуществлять не в циркулирующем режиме, как обычно принято, а в режиме каскадов колонок с использованием нескольких идентичных или различных колонок. Плазма крови переходит последовательно из одной колонки в другую, а не циркулирует в одной единственной колонке в течение всего времени плазмосорбции. Эти колонки могут быть упакованы одним и тем же или различными адсорбентами. Это не имеет значения, главное, такая методика позволит уменьшить роль воды в адсорбции компонентов плазмы крови.

Авторы выражают благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований (08-03-00499) за финансовую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чуйко А.А., Горлов Ю.И. (1993) в: Кремнеземы в медицине и биологии, Киев-Ставрополь, АН Украины, 89-91.
2. Сергиенко В.И., Горчаков В.Д., Мартынов А.К. (1990) Современное состояние и перспективы развития гемо и энтеросорбентов: Вып. 1, с. 9-11, Химико-фармацевтическое производство: Информ.-М.: ВНИИСЭНТИ Минмедпрома СССР,
3. Горчаков В.Д., Сергиенко В.И., Владимиров В.Г. (1989) Селективные гемосорбенты. М: Медицина. с. 16-43.
4. Лопаткин Н.А., Лопухин Ю.М. (1989) в: Эфферентные методы в медицине. М.: Медицина.
5. Седов В.М., Подосенова Н.Г., Андожская Ю.С., Кузнецов А.С. (1997) Журн. физич. химии, 71(8), 1459-1465; (1996) Эфферентная терапия, 2(2), 29-35.
6. Седов В.М., Подосенова Н.Г., Андожская Ю.С., Андожская И.В., Кузнецов А.С. (1998) Авторское свидетельство №96116479, Сорбент для удаления атерогенных липопротеинов низкой плотности из плазмы крови и способ его получения (заявка №96116479, патент № 311854).

7. Голованова Г.Ф., Квливидзе В.И., Киселев В.Ф. (1977) в кн.: Связанная вода в дисперсных системах., вып. 4, 178-209, М. Изд-во Московского университета МГУ.
8. Киселев В.Ф., Козлов С.Н., Зотеев А.В. (1999) Основы физики поверхности твердого тела. М. Изд-во Московского университета, Физический факультет МГУ. 284 с.
9. Соболев В.А., Чуйко А.А., Тертых В.А., Мащенко В.М. (1974) в кн.: Связанная вода в дисперсных системах, вып. 3, 62-72, М. Изд-во Московского университета МГУ.
10. Меленевская Е.Ю., Новиков А.В., Подосенова Н.Г., Шаронова Л.В. (2008) Адсорбционные и хроматографические процессы, 8(4), 677-685.
11. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. (1999) Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. СПб., Питер, с. 75-90.

Поступила: 23. 06. 2009.

EFFECT OF WATER ON SILICA GEL ADSORPTION WITH RESPECT TO HUMAN BLOOD PLASMA COMPONENTS

L.N. Gal¹, M.Ya. Malachova², E.Yu. Melenevskaya³, N.G. Podosenova¹, L.V. Sharonova⁴

¹Institute for Analytic Instrumentation, RAS, St. Petersburg, Russia

²Medical Academy of postgraduate education, St. Petersburg, Russia

³Institute of Macromolecular Compounds, RAS, V.O. Bolshoy pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia;

tel.: (812)323-5963; fax: (812)328-68-69; e-mail: melen@hq.macro.ru

⁴Ioffe Physico-Technical Institute, RAS, St. Petersburg, Russia

In this work, the study of properties of silica gel as an adsorbent for plasmadsorption has been performed. Investigations have been realized of the effect of silica gel preliminary treatment conditions and a period of plasma with silica gel contact on plasmadsorption characteristics of human blood plasma components, such as protein, triglycerides, cholesterol (high-density and low-density one). The results obtained can be used for variation of silica gel adsorption properties, *in situ* at the adsorbent preparation process. For explanation of the experimental concentration and kinetic (temporal) characteristics of plasmadsorption, the model of silica gel grains charging at the hydration was used.

Key words: adsorption, desorption, silica gel, hydration, human blood plasma components, cholesterol.