

I. I. Геращенко, А. І. Маркіна, В. Ф. Горчев
ІНСТИТУТ ХІМІЇ ПОВЕРХНІ ІМЕНІ О. О. ЧУЙКА НАН УКРАЇНИ, КИЇВ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О. В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ, КИЇВ

ДОСЛІДЖЕННЯ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОЇ СТРУКТУРИ ПРЕПАРАТУ “СКЛОПОДІБНЕ ТІЛО” МЕТОДАМИ ІНФРАЧЕРВОНОЇ ТА ЛАЗЕРНОЇ КОРЕЛЯЦІЙНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

За даними хімічного та ІЧ-спектроскопічного методів аналізу, основними органічними компонентами склоподібного тіла є гіалуронан та колаген, загальний вміст яких складає близько 0,15 мас.%. На ЛКС-гістограмах склоподібного тіла спостерігається декілька фракцій розміром 30–900 нм і понад 10 мкм, які належать до набряклих ланцюгів гіалуронану і волокон колагену відповідно. Здатність гіалуронану структурувати воду є головним чинником стабільності біогідрогелю склоподібного тіла.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: склоподібне тіло, біогідрогель, гіалуронан (гіалуронова кислота), колаген, ІЧ-спектр, лазерна кореляційна спектроскопія.

ВСТУП. Одним з найбільш відомих і доступних на українському ринку препаратів з групи біогенних стимуляторів є “Склоподібне тіло”. Згідно з анотацією, препарат прискорює процеси регенерації, чинить неспецифічну стимулювальну, розм’якшувальну та розсмоктувальну дії. Для розуміння механізму дії склоподібного тіла, який досі вивчено недостатньо, необхідно поглиблене дослідження його молекулярної структури і біохімії.

Склоподібне тіло є біологічним гідрогелем, основна маса якого припадає на воду – 99 % і солі – 0,9 % [2, 11]. Решту 0,1 % ділять між собою білкова і полісахаридна складові, які представлені фібрилами високогідратованого колагену (II, V/XI та IX типів) і зарядженими ланцюгами гіалуронової кислоти відповідно.

Гіалуронову кислоту вперше виділили в 1934 р. К. Мейер і Дж. Палмер із склоподібного тіла великої рогатої худоби [8]. У 1986 р. Ендрю Балаш для позначення різних форм гіалуронової кислоти, присутніх в організмі, наприклад її солей, запропонував термін “гіалуронан”, який відповідає Міжнародній номенклатурі полісахаридів. Гіалуронан є полімером, що складається з дисахаридних ланок D-глюкуронової кислоти і D-N-ацетилглюкозаміну, © I. I. Геращенко, А. І. Маркіна, В. Ф. Горчев, 2013.

з’єднаних між собою β -1,4- та β -1,3-глікозидними зв’язками. Вторинна структура гіалуронану – лінійна, лівозакручена потрійна спіраль із середньою довжиною дисахариду близько 1 нм. У склоподібному тілі гіалуронан присутній у вигляді натрієвої солі з молекулярною масою близько $4 \cdot 10^6$ Да [4, 6, 12].

Колагенові фібрили склоподібного тіла на 75 % складаються з колагену II типу з діаметром волокон від 7 до 28 нм [12]. Згідно з даними [2, 8, 12], склоподібне тіло повністю розріджується під дією колагенази і лише згущується (зморщується) під впливом гіалуронідази. З огляду на це, можна припустити, що сітка колагенових фібрил відповідає за механічні властивості склоподібного тіла, тоді як гіалуронан відіграє пасивну роль, заповнюючи простір між фібрилами і перешкоджаючи їх агрегації (рис. 1). Досі немає узгодженої точки зору про характер зв’язку між цими полімерами. Компер і Лоран запропонували електростатичний механізм взаємодії між негативно зарядженими гіалуронаном і позитивно зарядженими ділянками колагену. Згідно з іншою версією, взаємодія між гіалуронаном і колагеном відбувається з участю молекул мінорних білків та глікозаміногліканів склоподібного тіла [5, 12]. Понад 90 % гіалуронової кислоти легко

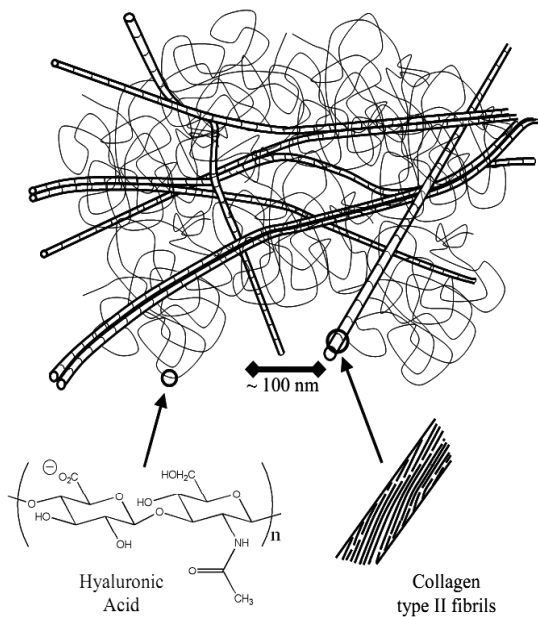


Рис. 1. Структура матриці склоподібного тіла згідно з [9].

відділяється від колагену при центрифугуванні, що вказує на відсутність між ними ковалентних зв'язків.

Основними функціями склоподібного тіла є заломлення світла, що потрапляє на сітківку, та забезпечення тургору тканин [11]. Крім цього, біогідрогель може слугувати селективним дифузійним бар'єром, який контролює обмін молекул між різними відділами ока: в експерименті виявлено здатність склоподібного тіла затримувати одні й вільно пропускати інші молекули барвників малих розмірів [7].

Метою даної роботи було одержати додаткові знання про макромолекулярну структуру склоподібного тіла за допомогою методів інфрачервоної (ІЧ) та лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС). Розуміння принципів взаємовідношення між основними компонентами склоподібного тіла може бути в нагоді під час пошуку нових сфер застосування цього препарату. Повідомляється, наприклад, про розробку синтетичних гідрогелів оптимальних складу і структури для використання в терапії захворювань міжхребцевих дисків [13]. Схожість складу і властивостей гідрогелів організму дає можливість використовувати їх як експериментальні моделі один одного. Ми, зокрема, пропонуємо склоподібне тіло як модель мукозного гідрогелю, що покриває епітелій гастроінтестинального тракту, для дослідження механізмів взаємодії з ним нанорозмірних ентросорбентів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліджували препарат "Склоподібне тіло" в ампулах по 2 мл

виробництва ЗАТ "Біофарма" (м. Київ), здобутий з очей великої рогатої худоби.

Вміст у препараті гіалуронану визначали карбазольним методом за Діше, колагену – фармакопейним методом Бенедикта, води і солей – за сухим залишком після висушування при 105 °С; рН склоподібного тіла вимірювали за допомогою універсального іономера ЭВ-74.

ІЧ-спектр сухого залишку препарату одержували на спектрофотометрі Specord M80 (Carl Zeiss, Jena, Germany) методом дисків з KBr у режимі пропускання в діапазоні частот 300–4000 см⁻¹.

Розмірні характеристики молекулярних агрегатів склоподібного тіла вивчали методом ЛКС. Даний метод дозволяє отримати інформацію про всі динамічні процеси в дисперсних системах, у тому числі про розподіл нанорозмірних частинок за їх рухливістю, що безпосередньо пов'язано з їх розмірами. Незабаром після запровадження методу ЛКС (синоніми – Photon Correlation Spectroscopy, PCS; Dynamic Light Scattering, DLS) у 1964 р. [10] його почали застосовувати для вивчення біооб'єктів. Спробу дослідження склоподібного тіла методом ЛКС з експериментальною і діагностичною метою описано в роботі [12].

Метод оснований на аналізі часової автокореляційної функції інтенсивності розсіяного випромінення. Частинки в рідкому середовищі, завдяки броуновському руху, викликають флуктуації інтенсивності розсіяного світла, причому рухливіші частинки характеризуються коротшим часом флуктуації. Вимірюючи інтенсивність сигналів флуктуації, цифровий корелятор обчислює автокореляційну функцію, яка для випромінення, розсіяного на частинках однакового розміру, експоненціально затухає з часом. За швидкістю затухання визначають коефіцієнт самодифузії частинок:

$$D = \Gamma / q^2, \quad (1)$$

де Γ – константа затухання; q – вектор розсіяного світла.

Потім за формулою Стокса–Ейнштейна обчислюють гідродинамічний радіус частинок:

$$R = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (2)$$

де k – константа Больцмана; T – температура, К; η – в'язкість середовища; D – коефіцієнт дифузії. Як видно з формули (2), рухливіші частинки з більшим коефіцієнтом дифузії мають менший гідродинамічний радіус. Якщо середовище містить частинки різного розміру, то за допомогою математичних алгоритмів можна розрахувати гістограму розподілу час-

тинок за розміром, що є кінцевим представленням результатів вимірювань.

Вимірювання виконували на приладі Zeta-sizer-3 (Malvern Instruments, UK), оснащеному гелій-неоновим лазером, при довжині хвилі 633 нм. Досліджували два зразки склоподібного тіла: вихідний гідрогель і після розведення водою 1:1. Вимірювання проводили в трьох повтореннях через кожні 10 хв. Результати розраховували у вигляді моно- і полімодального наблизень за допомогою програми "Contin". Мономодальне наблизення дозволяє отримати середній розмір всіх присутніх у препараті частинок, тоді як полімодальне показує середній розмір і кількість частинок кожного типу (фракцій) в полідисперсній суспензії.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати визначення основних компонентів склоподібного тіла (табл.) узгоджуються з літературними даними [2]. Сухий залишок, який становить 1,15 мас.%, складається переважно з мінеральних солей (хлоридів), що забезпечують загальний електролітний баланс і осмотичний тиск у склоподібному тілі. Лужна реакція, рН 8,9, підтверджує, що гіалуронан в склоподібному тілі присутній у вигляді натрієвої солі.

Таблиця – **Результати аналізу препарату "Склоподібне тіло"**

Компонент	Вміст, мас.%
Вода	~99
Сухий залишок	1,15
Колаген	0,11
іалуронан	0,05–0,08
рН	8,9

ІЧ-спектр (рис. 2) склоподібного тіла містить такі характеристичні смуги: 3600–3100 cm^{-1} належить до коливань O–H у молекулах води і карбоксильних групах, з'єднаних водневими зв'язками, й аміногруп у полісахаридах; 1650 cm^{-1} відповідає групі амід I (C=O амідної

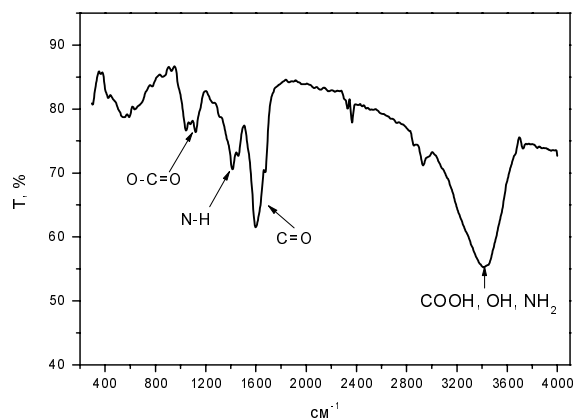


Рис. 2. ІЧ-спектр препарату "Склоподібне тіло".

групи); смуги поблизу 1590–1510 cm^{-1} характерні для антисиметричних коливань карбоксильних груп і N–H-зв'язку; поглинання в ділянці 1125–1040 cm^{-1} відносять до коливань піранозного циклу; 1030 cm^{-1} відповідає коливанням ефірного зв'язку. Даний спектр свідчить про те, що основними органічними компонентами склоподібного тіла є гіалуронан і колаген [13].

У ході випробувань методом ЛКС встановлено, що гідрогель склоподібного тіла є стабільним і однорідним, містить декілька фракцій (рис. 3). Перша фракція – це малі частинки розміром близько 30 нм, чисельно вони переважають, хоча масова частка складає всього 4,5 %. Друга фракція містить частинки близько 900 нм, їх число менше 0,1 %, а масова частка становить 7,5 %. Частинки першої і другої фракцій, очевидно, є молекулами гіалуронану. В препараті наявні також великі агрегати розміром близько 10 мкм – волокна колагену, число яких менше 0,1 %, а масова частка складає 88 %. Таке відображення на ЛКС-гістограмах можна пояснити тим, що склоподібне тіло за властивостями подібне до колоїдного розчину: отже, великі жорсткі фібрили колагену в такому

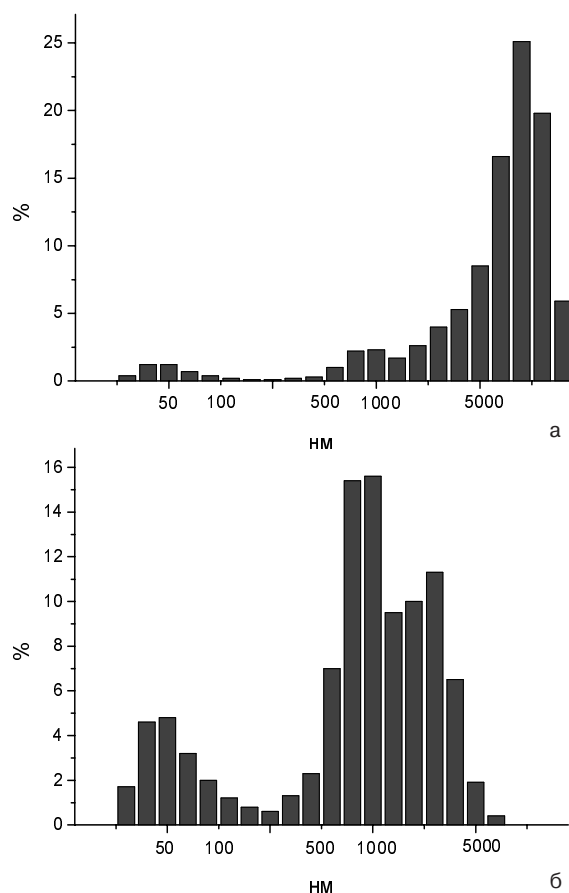


Рис. 3. Розподіл компонентів склоподібного тіла за розмірами: а – вихідний зразок; б – після розведення водою 1:1.

розчині рухаються повільніше і мають менший коефіцієнт дифузії, ніж гнучкіші молекули гіалуронану [12]. При розведенні склоподібного тіла водою (рис. 3) спостерігається збільшення маси малих і середніх частинок, відповідно до 17 і 47 %, за рахунок зменшення маси великих частинок, розміри частинок при цьому трохи зменшуються. Раніше методом ^1H ЯМР-спектроскопії ми показали [1], що в гідрогелі склоподібного тіла практично вся вода зв'язана з полімерною матрицею, тоді як на частку вільної води припадає лише близько 1 %. Отже, збільшення маси малих і середніх частинок можна пояснити здатністю гіалуронану структурувати воду. Саме ця властивість гіалуронану вважається головним чинником стабільності біогідрогелю.

ВИСНОВКИ. Основними органічними компонентами склоподібного тіла є гіалуронан та колаген, загальний вміст яких складає близько 0,15 мас.%. На ЛКС-гістограмах склоподібного тіла відзначають декілька фракцій розміром 30–900 нм і понад 10 мкм, які належать, відповідно, до набряклих ланцюгів гіалуронану і волокон колагену. Отже, склоподібне тіло за складом і структурою подібне до інших гідрогелів організму, тому його можна використовувати як модель слизистих секретів у дослідженнях *in vitro*.

Автори вдячні канд. хім. наук Є. М. Пахлову за допомогу під час проведення ІЧ-спектроскопічних досліджень та участь в обговоренні отриманих результатів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Геращенко І. І. Структура зв'язаної води в склоподібному тілі за даними ^1H -ЯМР-спектроскопії / І. І. Геращенко, А. І. Маркіна, В. В. Туров // Мед. хімія. – 2011. – **13**, № 2. – С. 102–106.
2. Bishop P. N. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel / P. N. Bishop // Progress in Retinal and Eye Research. – 2000. – **19**, № 3. – P. 323–344.
3. Collagen fibril organisation in mammalian vitreous by freeze etch/rotary shadowing electron microscopy / K. J. Bos, D. F. Holmes, R. S. Meadows [et al.] // Micron. – 2001. – **32**, № 3. – P. 301–306.
4. Cowman M. K. Experimental approaches to hyaluronan structure/ M. K. Cowman, S. Matsuoka // Carbohydrate Research. – 2005. – **340**. – P. 791–809.
5. Hellman U. About Hyaluronan in the Hypertrophic Heart / U. Hellman. – Media Umee, Sweden, 2010. – 55 p.
6. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review/ J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar // Veterinarni Medicina. – 2008. – **53**, № 8. – P. 397–411.
7. Lieleg O. Biological hydrogels as selective diffusion barriers / O. Lieleg, K. Ribbeck // Trends in Cell Biology. – 2011. – **21**, № 9. – P. 543–551.
8. Meyer K. The polysaccharide of the vitreous humor/ K. Meyer, J.W. Palmer // J. Biol. Chem. – 1934. – **107**. – P. 629–634.
9. Nickerson C.S. Engineering the mechanical properties of ocular tissues/ C.S. Nickerson. Thesis... Doctor of Philosophy. – California, 2006. – 184 p.
10. Pecora R. Dynamic light scattering: application of photon correlation spectroscopy / R. Pecora, editor. – New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – 436 p.
11. Rheology of the vitreous gel: Effects of macromolecule organization on the viscoelastic properties / P. Sharif-Kashani, J. P. Hubschman, D. Sassoon, H. P. Kavehpour // J. Biomechanics. – 2011. – **44**. – P. 419–423.
12. Sebag J. Molecular Biology of Pharmacologic Vitreolysis/ J. Sebag // Trans. Am. Ophthalmol. Soc. – 2005. – **103**. – P. 473–494.
13. Type II Collagen-hyaluronan hydrogel – a step towards a scaffold for Intervertebral Disc Tissue Engineering / L. Calderon, E. Collin, D. Velasco-Bayon [et al.] // European Cells and Materials. – 2010. – **20**. – P. 134–148.

И. И. Геращенко, А. И. Маркина, В. Ф. Горчев
ИНСТИТУТ ХИМИИ ПОВЕРХНОСТИ ИМЕНИ А. А. ЧУЙКО НАН УКРАИНЫ, КИЕВ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ А. В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ, КИЕВ

ИССЛЕДОВАНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ ПРЕПАРАТА “СТЕКЛОВИДНОЕ ТЕЛО” МЕТОДАМИ ИНФРАКРАСНОЙ- И ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Резюме

По данным химического и ИК-спектроскопического методов анализа, основными органическими компонентами стекловидного тела являются гиалуронан и коллаген, общее содержание которых составляет около 0,15 мас.%. На ЛКС-гистограммах стекловидного тела наблюдается несколько фракций размером 30–900 нм и более 10 мкм, которые относятся к набухшим цепям гиалуронана и волокнам коллагена соответственно. Способность гиалуронана структурировать воду является главным фактором стабильности биогидрогеля стекловидного тела.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стекловидное тело, биогидрогель, гиалуронан (гиалуроновая кислота), коллаген, лазерная корреляционная спектроскопия.

I. I. Herashchenko, A. I. Markina, V. F. Horchev
O. O. CHUIKO INSTITUTE OF SURFACE CHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE, KYIV
O. V. PALLADIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE, KYIV

STUDY OF MACROMOLECULAR STRUCTURE OF VITREOUS HUMOR BY IR- AND LASER CORRELATION SPECTROSCOPY METHODS

Summary

As shown by the chemical analysis and IR-spectroscopy measurements, the main organic components of the vitreous humor are the hyaluronan and collagen, general contents of which is about 0,15 mass %. On the LCS histograms of vitreous humor there are a few fractions by the size of 30–900 nm and more than 10 mm, which behave to the dropsical chains of hyaluronan and fibres of collagen, accordingly. An ability of hyaluronan to put in order the water is considered as the basic factor of stability of the humor hydrogel.

KEY WORDS: vitreous humor, biohydrogel, hyaluronan (hyaluronic acid), collagen, Laser correlation spectroscopy, IR-spectrum.

Отримано 19.12.12

Адреса для листування: І. І. Геращенко, вул. Драгоманова, 5, кв. 223, Київ, 02068, Україна, e-mail: igorgera@mail.ru.