

УДК 541.124+577.112.3+661.183.2

Особенности сорбции аминокислот и их метаболитов углеродными сорбентами медицинского назначения

Е. В. Исаева, И. А. Фарбун, В. А. Трихлеб

Институт сорбции и проблем эндоэкологии НАН Украины
ул. Генерала Наумова, 13, Киев 03164, Украина. E-mail: isaeva7@ukr.net

Проведено сравнительное изучение сорбционной емкости и кинетики сорбции аминокислот (триптофана, аргинина) и их метаболитов (индола, креатинина) углеродными сорбентами медицинского назначения, отличающимися пористой структурой. Показано, что увеличение доли микропор приводит к росту сорбционной способности и скорости сорбции в отношении всех изученных веществ.

Ключевые слова: углеродные сорбенты медицинского назначения, пористая структура, микропоры, кинетика сорбции, сорбция аминокислот и уремиических токсинов.

Хронические заболевания почек (ХЗП) являются дорогостоящими в лечении и все более распространенными болезнями, при которых в организме человека происходит накопление ароматических аминокислот, их метаболитов и уремиических токсинов с цитотоксическим, воспалительным и фиброзным действием [1].

Для детоксикации организма человека при ХЗП используют пероральный сферический углеродсодержащий адсорбент AST-120 (KREMEZIN[®], «Chemical», Токио, Япония), который был одобрен для клинического применения в Японии в 1991 г. [2], а позже — в Корее, на Тайване и Филиппинах. Основанием для доказательства роли AST-120 в отсрочке начала диализа у пациентов с ХЗП стали результаты исследований, показавшие, что этот эффект связан с уменьшением содержания индоксил сульфата (ИС) в сыворотке крови уремиических больных.

Несмотря на более чем 30-летний период в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, проведенных в Японии, Корее, США и других странах, обсуждение влияния AST-120 на лечение ХЗП и сопровождающих его заболеваний продолжается [3]. Так, в работе [4] показано, что применение AST-120 снижает уровень ИС в организме пациентов с почечной недостаточностью, а его использование на ранней стадии открытой диабетической нефропатии замедляет прогрессирование почечной дисфункции [5]. Однако в работе [6] установлено, что применение AST-120 при прогрессировании ХЗП не показало никакого отли-

чия между обычным терапевтическим лечением с применения адсорбента и без него. Эффективность лечения контролировалась по увеличению уровня креатинина в сыворотке крови до 6,0 мг/дл. При дальнейшем повышении уровня креатинина требуется назначение процедуры диализа, операции трансплантации почки или наступает смерть пациента.

Многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое изучение дозы AST-120 у пациентов с умеренной и тяжелой степенью ХЗП также не показало преимущества в добавлении KREMEZIN[®] к стандартной терапии [7]. В качестве плацебо в этой работе использовали порошок древесного угля, отвечающий требованиям Фармакопеи США. Микрофотографии показывают, что размер частиц древесного угля на порядок меньше, чем у AST-120, и составляет ≤ 50 мкм. Поэтому исследованные сорбенты применяли в форме капсул.

В работе [8] пациенты получали в день по 6 г AST-120 (три разделенных дозы в виде порошка), а в контрольной группе — только стандартное лечение. Уровни ИС в сыворотке крови и моче, а также β_2 -микроглобулин контролировали в течение всего периода исследования. Показано, что эти показатели уменьшились во время лечения. Однако не было существенной разницы в изменении содержания уремиических токсинов у пациентов с ХЗП в присутствии AST-120 и в контрольной группе.

Поскольку сведения о преимуществах лечения пациентов с ХЗП адсорбентом KREMEZIN[®] противо-

Таблица 1

Характеристики используемых адсорбентов и адсорбатов

Уголь	$S_{уд.общ}(БЭТ),$ м ² /г	$S_{уд.общ}(DFT),$ м ² /г	$S_{уд.микро}(DFT),$ м ² /г	$V_{общ}(БЭТ),$ см ³ /г	$V_{общ}(DFT),$ см ³ /г	$V_{микро}(DFT),$ см ³ /г	Микропоры, %	$R_{микро}(DFT),$ нм
КАРБОН TM	1730	1802	1409	0,92	0,83	0,47	56,6	0,6
AST-120	1569	1417	869,3	0,77	0,72	0,33	45,8	0,7

Адсорбат	М.в.	$S, \text{нм}^2$	$PSA, \text{нм}^2$	$PSA/S, \%$	$V, \text{нм}^3$	O	$R_S, \text{нм}$	$R_V, \text{нм}$
Креатинин	113	13,530	4,804	35,50	11,049	1,22	0,328	0,298
Индол	117	14,705	1,202	8,17	13,180	1,17	0,342	0,316
Аргинин	174	19,654	10,412	52,97	17,157	1,32	0,395	0,344
Триптофан	204	22,633	6,858	30,30	20,650	1,34	0,424	0,366

Примечание. Данные, полученные с использованием компьютерной программы Spartan 14; S — поверхность молекулы адсорбата, нм²; PSA — поверхность полярных групп в молекуле адсорбата, нм²; PSA/S — доля поверхности полярных групп в общей площади молекулы адсорбата, %; V — объем молекулы адсорбата, нм³.

речивы, необходимы дополнительные исследования его структурных, адсорбционных и кинетических свойств по сравнению с другими типами активированного угля, полученными в форме порошка и обладающими свойствами, сравнимыми с AST-120.

Поэтому цель настоящей работы — изучение адсорбции аргинина, индола, креатинина и триптофана из физиологических растворов с помощью препарата KREMEZIN[®] и активированного угля КАРБОНTM, синтезированного в ИСПЭ НАНУ [9] и используемого в качестве гемосорбента для очистки крови вне организма человека [10].

Экспериментальная часть

Для изучения сорбции аминокислот (триптофана, аргинина) и их метаболитов (индола, креатинина) выбран уголь КАРБОНTM (объемная плотность 0,35 г/см³, частицы размером 0,2—0,4 мм неправильной формы), полученный из коммерческого кокосового угля AquaCarb 607 C («Chemviron Carbon», Бельгия) методом высокотемпературного паровоздушного активирования [9], а также сферический углеродный адсорбент AST-120 (Kremezin[®], серия 142K04, $d = 0,2—0,4$ мм). В качестве адсорбатов применяли аминокислоты и метаболиты квалификации «ч. д. а.» (Китай).

Пористую структуру углеродных материалов изучали методом низкотемпературной (77 К) адсорбции азота с помощью газового анализатора поверхности «NOVA 2200» («Quantachrome», США). Удельную поверхность ($S_{уд}$, м²/г), объем пор (V , см³/г),

радиус пор (r , нм) и распределение объемов пор по размерам ($dV/d \lg r$) рассчитывали методами БЭТ и теории функционала плотности (DFT) из данных десорбционных изотерм по программе AsiQ версии 3.0.

Геометрические дескрипторы (S , нм²; PSA , нм²; V , нм³ и овальность) всех соединений оптимизированы с помощью теории DFT с использованием методов EDF2 и 6-31G* в качестве базового набора в программе Spartan 14 версии 1.1.4.

Овальность молекулы (O), которая является отклонением от сферической формы, когда ее значение равно единице, вычисляли по формуле

$$O = \frac{S}{4\pi \left(\frac{3V}{4\pi}\right)^{2/3}}, \quad (1)$$

где S — поверхность молекулы адсорбата, нм²; V — объем молекулы адсорбата, нм³.

Радиусы, соответствующие поверхности (R_S) и объему (R_V) исследованных молекул, определяли путем решения уравнения (1) с использованием данных табл. 1.

Поглощающую способность материалов изучали методом адсорбции аминокислот и их метаболитов из физиологических растворов, концентрации веществ составляли до 35 ммоль/л. Сорбционные эксперименты проводили в статических условиях при перемешивании в течение 4 ч 0,1 г образца сорбента,

высушенного при температуре 378—383 К, с 25 мл растворов адсорбатов. Концентрации триптофана, аргинина, индола и креатинина определяли на спектрофотометре UV-2450 («Shimadzu», Япония) в кварцевых кюветках ($l = 10$ мм) при $\lambda = 279, 202, 269$ и 233 нм соответственно. Сорбционную емкость (A , ммоль/г) рассчитывали по формуле

$$A = \frac{(C_{\text{исх}} - C_{\text{равн}})V}{1000m}, \quad (2)$$

где $C_{\text{исх}}$ и $C_{\text{равн}}$ — концентрации адсорбата в исходном и равновесном растворах, ммоль/л; V — объем раствора, мл; m — масса сорбента, г.

Кинетику адсорбции изучали методом ограниченного объема из физиологических растворов при концентрации адсорбатов 200 мкмоль/л. Навеска сорбента составляла 0,1 г, объем раствора 25 мл. Отбор проб для анализа проводили через 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 240 и 360 мин после начала контакта фаз. Данные обрабатывали по уравнениям, учитывающим влияние внешней, внутренней диффузии (модель Морриса — Вебера) и стадий химической реакции (модели псевдопервого порядка Лагергрена, псевдвторого порядка Хо и Маккея, модель Еловича) [11, 12]. Расчеты проводили с помощью компьютерной программы Excel.

Результаты и обсуждение

Исследования пористой структуры углеродных материалов доказывают, что изотермы адсорбции/десорбции азота углей КАРБОНTM и AST-120 принадлежат к I типу классификации IUPAC [13] (рис. 1, а). Отсутствие петли гистерезиса свидетельствует о микропористой структуре угля AST-120. Резкое увеличение количества поглощенного азота при низком относительном давлении и присутствие на изотерме петли гистерезиса при среднем и высоком давлении указывает на то, что адсорбент КАРБОНTM является микро-мезопористым материалом.

Доказано [14], что свободное сечение поры после адсорбции молекул должно составлять меньше двух вандерваальсовых диаметров молекул органических адсорбатов и одной молекулы воды. Поэтому для адсорбции небольших молекул (к которым принадлежат аминокислоты и многие уремиические токсины) необходимо, чтобы радиус пор в углеродном адсорбенте составлял ≤ 1 нм.

Анализ параметров пористой структуры образцов подтверждает, что основной вклад в адсорбцию небольших молекул вносят микропоры (табл. 1). Из кривых дифференциального распределения объемов пор по размерам видно, что в адсорбенте КАРБОНTM

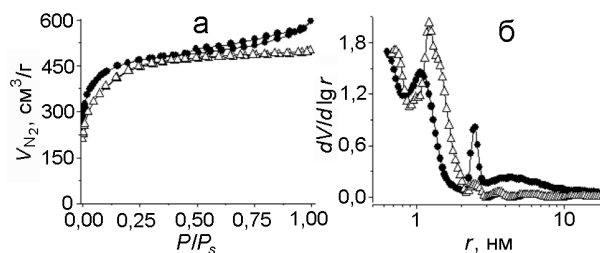


Рис. 1. Изотермы адсорбции/десорбции азота (а) и дифференциальные кривые распределения объемов пор по размерам (метод DFT) (б) на образцах углей КАРБОНTM (●) и AST-120 (Δ).

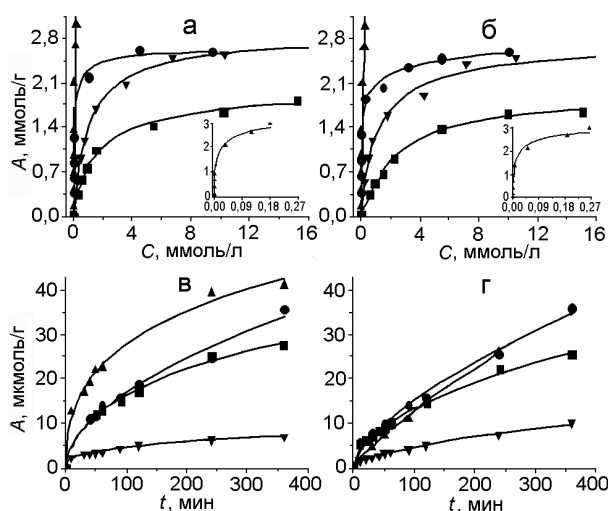


Рис. 2. Изотермы адсорбции (а, б) и кинетические кривые (в, г) биологически активных веществ: индол (▲), триптофан (●), креатинин (▼) и аргинин (■) на углеродных адсорбентах КАРБОНTM (а, в) и КРЕМЕЗИН[®] (б, г). Исходные концентрации (ммоль/л): триптофан 19,6; аргинин 23,0; креатинин 35,3; индол 12,3; pH растворов 7,2—7,4.

присутствуют мезопоры с размерами 1—1,5 и 2—3 нм, а в образце AST-120 — 1—2 нм (рис. 1, б).

Выбор объектов данного исследования связан с тем, что индол является метаболитом ароматической аминокислоты триптофана и предшественником опасного уремиического токсина ИС, который связан с белками и не выводится за время диализа [1]. Креатинин — индикатор функции почек, метаболит алифатической аминокислоты аргинина и представитель низкомолекулярных водорастворимых токсинов, которые выводятся диализом [1].

Важные характеристики использованных адсорбатов приведены в табл. 1. Видно, что молекулярные размеры аминокислот и уремиических токсинов близки, чем объясняются их сорбционные свойства.

Таблица 2

Константы использованных кинетических моделей

Параметр	Сорбент	Креатинин	Индол	Триптофан	Аргинин
Модель псевдопервого порядка Лагергрена					
$k_1 \cdot 10^{-3}, \text{мин}^{-1}$	КАРБОН TM	9,4	4,5	11,9	9,8
	KREMEZIN [®]	7,8	4,8	5,0	5,1
R^2	КАРБОН TM	0,967	0,941	0,931	0,982
	KREMEZIN [®]	0,979	0,983	0,919	0,985
Модель псевдвторого порядка Хо и Маккея					
$k_2 \cdot 10^5, \text{г}/(\text{мкмоль} \cdot \text{мин})$	КАРБОН TM	44,6	23,1	45,8	299,7
	KREMEZIN [®]	45,1	21,5	22,8	92,8
R^2	КАРБОН TM	0,977	0,903	0,967	0,983
	KREMEZIN [®]	0,932	0,792	0,383	0,883
Упрощенная модель Еловича					
$\alpha, \text{г}/(\text{мкмоль} \cdot \text{мин})$	КАРБОН TM	0,7	0,6	2,3	0,4
	KREMEZIN [®]	0,8	0,8	0,4	0,2
$\beta, \text{г}/\text{мкмоль}$	КАРБОН TM	0,129	0,097	0,117	0,722
	KREMEZIN [®]	0,169	0,126	0,104	0,447
R^2	КАРБОН TM	0,955	0,913	0,907	0,923
	KREMEZIN [®]	0,883	0,799	0,818	0,854

Поглощение всех исследованных адсорбатов углеродным адсорбентом КАРБОНTM выше, чем KREMEZIN[®] (рис. 2, а, б). Из изотерм адсорбции видно, что максимальная сорбция индола на обоих адсорбентах достигается при $C < 0,3$ ммоль/л.

Изучение кинетики адсорбции биологически активных веществ образцами КАРБОНTM и KREMEZIN[®] показало, что наибольшую скорость адсорбции для обоих адсорбентов имеет индол, а наименьшую — аргинин (рис. 2, в, г), что можно объяснить низким содержанием полярных групп у индола и высоким их содержанием у аргинина. Для угля КАРБОНTM характерна более быстрая кинетика сорбции, чем для KREMEZIN[®] (насыщение сорбента через 2 ч составляет не менее 53 и 43 % от максимального соответственно).

Проведен анализ кинетических данных в координатах $-\ln(1 - F) = f(t)$ и $F = f(t^{1/2})$. Линейность зависимости $-\ln(1 - F)$ от t с коэффициентом детерминации $R^2 > 0,95$ указывает на внешнедиффузионный механизм или химическую кинетику, а линейность F от $t^{1/2}$ — на внутридиффузионное лимитирование процесса адсорбции [15]. Получена линейная зависимость $-\ln(1 - F)$ от t для адсорбции аргинина ($R^2 = 0,982$) и креатинина ($R^2 = 0,967$) на

угле КАРБОНTM, а также для креатинина ($R^2 = 0,979$), аргинина ($R^2 = 0,985$) и индола ($R^2 = 0,983$) на препарате KREMEZIN[®]. Зависимости F от $t^{1/2}$ являются линейными с $R^2 > 0,95$ для всех адсорбатов на всех сорбентах, что свидетельствует о влиянии на сорбционный процесс и внутренней диффузии. Таким образом, полученные результаты подтверждают смешанно-диффузионный механизм кинетики процесса адсорбции, что не позволяет однозначно определить лимитирующую стадию.

Для сорбции изученных веществ углеродными сорбентами по диффузионным моделям рассчитаны константы скорости внешней и внутренней диффузии. Константы скорости внешней диффузии изменяются в ряду индол < креатинин < аргинин < триптофан для угля КАРБОНTM и индол < триптофан < аргинин < креатинин для KREMEZIN[®], что соответствует уменьшению сродства при взаимодействии типа адсорбент — адсорбат. Константы скорости внешней диффузии для угля КАРБОНTM в основном выше, чем для KREMEZIN[®]. Константы скорости внутренней диффузии для всех адсорбатов на всех сорбентах имеют близкие значения.

Константы и коэффициенты детерминации кинетических моделей адсорбции исследуемых веществ

на углеродных сорбентах представлены в табл. 2. С наиболее высокой точностью процесс адсорбции креатинина, аргинина и триптофана на угле КАРБОН™ описывается моделью псевдвторого порядка; индола на КАРБОН™ и всех адсорбатов на KREMEZIN® — моделью псевдопервого порядка. Следовательно, на скорость сорбционного процесса лимитирующее влияние оказывает как внешняя и внутренняя диффузия, так и скорость химической стадии адсорбции.

Таким образом, данные, полученные в настоящей работе на примере адсорбции из физиологических растворов двух уремиических метаболитов (индол и креатинин) и двух аминокислот (триптофан и аргинин), показывают, что структурные и сорбционно-кинетические свойства активированного угля КАРБОН™ сравнимы с аналогичными свойствами японского препарата KREMEZIN®. Учитывая это, а также доступность сырья и простоту метода получения, активированный уголь КАРБОН™ может быть перспективным пероральным углеродным адсорбентом при лечении пациентов с ХЗП для задержки начала диализа и улучшения качества их жизни. Можно предположить также, что КАРБОН™ может стать заменой препарата KREMEZIN®.

Авторы выражают благодарность научному сотруднику ИСПЭ НАНУ Цыбе Н. Н. за проведение измерений методом низкотемпературной адсорбции азота.

Литература

1. Vanholder R., De Smet R., Glorieux G. et al. // *Kidney Int.* — 2003. — **63**, N 5. — P. 1934—1943.

2. Koide K., Sano M., Takeda F. et al. // *Biomater. Artif. Cells and Immobil. Biotechnol.* — 1991. — **19**, N 1. — P. 147—166.

3. Yamaguchi S., Inada C., Tamura M. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* — 2013. — **714**, N 1—3. — P. 325—331.

4. Schulman G., Agarwal R., Acharya M. et al. // *Amer. J. Kidney Dis.* — 2006. — **47**, N 4. — P. 565—577.

5. Konishi K., Nakano S., Tsuda S. et al. // *Diabetes Res. and Clin. Pract.* — 2008. — **81**, N 3. — P. 310—315.

6. Akizawa T., Asano Y., Morita S. et al. // *Amer. J. Kidney Dis.* — 2009. — **54**, N 3. — P. 459—467.

7. Schulman G., Berl T., Beck G. J. et al. // *J. Amer. Soc. Nephrol.* — 2015. — **26**, N 7. — P. 1732—1746.

8. Cha R. H., Kang S. W., Park C. W. et al. // *Clin. J. Amer. Soc. Nephrol.* — 2016. — **11**, N 4. — P. 559—567.

9. Пат. 109548 Україна, А 61 К 33/44, С 01 В 31/08, В 01 J 20/20, В 01 J 20/30. Спосіб одержання мікро-, мезопоруватого адсорбенту / В. А. Трихліб, В. В. Стрелко. — Опубл. 25.08.2016.

10. Казаков Ф. И., Курковский В. В. // *Мед. журн.* — 2014. — № 1. — С. 65—68.

11. Ho Y. S., Ng J. C. Y., McKay G. // *Separat. Purific. Methods.* — 2000. — **29**, N 2. — P. 189—232.

12. Qiu H., Lv L., Pan B. et al. // *J. Zhejiang Univ. — Sci. A.* — 2009. — **10**, N 5. — P. 716—724.

13. Sing K. S. W., Everett D. H., Haul R. A. W. et al. // *Pure and Appl. Chem.* — 1985. — **57**, N 4. — P. 603—619.

14. Когановский А. М., Левченко Т. М., Кириченко В. А. Адсорбция растворенных веществ. — К. : Наук. думка, 1977.

15. Самсонов Г. В., Тростянская Е. Б., Елькин Г. Э. Ионный обмен. Сорбция органических веществ. — Л. : Наука, 1969.

Поступила в редакцию 25 сентября 2018 г.

В окончательном варианте 24 октября 2018 г.

Особливості сорбції амінокислот і їх метаболітів вуглецевими сорбентами медичного призначення

Є. В. Ісаєва, І. А. Фарбун, В. А. Трихліб

Інститут сорбції та проблем ендоекології НАН України
вул. Генерала Наумова, 13, Київ 03164, Україна. E-mail: isaeva7@ukr.net

Проведено порівняльне вивчення сорбційної ємності і кінетики сорбції амінокислот (триптофану, аргініну) і їх метаболітів (індолу, креатиніну) вуглецевими сорбентами медичного призначення, що відрізняються пористою структурою. Показано, що збільшення частки мікропор призводить до зростання сорбційної здатності і швидкості сорбції стосовно всіх вивчених речовин.

Ключові слова: вуглецеві сорбенти медичного призначення, пориста структура, мікропори, кінетика сорбції, сорбція амінокислот і уремічних токсинів.

Peculiarities of Sorption of Amino Acids and Their Metabolites by Medical Carbon Sorbents

Y. V. Isaieva, I. A. Farbun, V. A. Trykhlіb

Institute for Sorption and Problems of Endoecology, National Academy of Sciences of Ukraine
Generala Naumova St., 13, Kyiv 03164, Ukraine. E-mail: isaeva7@ukr.net

A comparative study of the sorption capacity and kinetics of the sorption of amino acids (tryptophan, arginine) and their metabolites (indole, creatinine) with carbon sorbents for medical purposes, differing in porous structure, was conducted. It is shown that an increase in the proportion of micropores leads to an increase in the sorption capacity and sorption rate with respect to all the studied substances.

Key words: medical carbon sorbents, porous structure, micropores, sorption kinetics, sorption of amino acids and uremic toxins.