

УДК 541.64:547.962.3

**МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ АДСОРБЦИИ АЛЬБУМИНА
НА ПОВЕРХНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ**

Ю. В. Моисеев, Н. К. Боровкова, Н. А. Цепалова

При создании антитромбогенных материалов большое значение имеет исследование взаимодействия плазменных белков крови с поверхностью этих материалов. В ряде работ [1—3] было показано, что на поверхности чужеродного материала при контакте с кровью быстро адсорбируются белки, образуя прочную пленку. Предполагается, что состав и конфигурация образующейся белковой пленки оказывает влияние на взаимодействие имплантируемого материала с кровью.

При изучении адсорбции белков из растворов на твердых поверхностях использовались различные методы. В работе [4] количество адсорбированных белков на силикагеле определяли по уменьшению концентрации белков в исходном растворе. При исследовании адсорбции белков на поверхности синтетических полимеров этот метод дает значительную ошибку из-за малого количества адсорбированного белка. В ряде работ процесс адсорбции белков на полимерах изучали с помощью радиоактивных изотопов: I^{125} [5], H^3 [6], P^{32} [7]. Однако до настоящего времени остается невыясненным, какой эффект оказывает введение изотопов на количество адсорбированного белка. В работе [1] был использован метод многократно нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО) в ИК-области для определения поверхностной концентрации плазменных белков на ряде синтетических полимеров. Применение этого метода для изучения адсорбции белков, по мнению авторов, дает удовлетворительные результаты.

Целью настоящей работы является выяснение закономерностей адсорбции альбумина на поверхности различных синтетических полимеров с помощью метода МНПВО в ИК-области.

В работе использовали четырежды перекристаллизованный альбумин, полученный в Московском институте эпидемиологии и микробиологии. Определение гомогенности белка проводили методом электрофореза в 5%-ном акриламидном геле. Адсорбцию альбумина определяли на следующих полимерных пленках: ПВХ, ПЭ и фторопластах различных марок.

Для исследования адсорбции белка на полимерах в статических условиях была разработана методика и сконструирована специальная ячейка. Как известно [8, 9], на поверхности раздела раствора белка с воздухом или с не смешивающимися с раствором белка растворителями образуется тонкий слой, концентрация белка в котором намного выше концентрации белка в растворе. Перенесение этого слоя на поверхность полимера при удалении пленки из белкового раствора приводит к искажению экспериментальных данных. В нашей ячейке этот нежелательный эффект удалось устранить следующим образом. Пленку полимера погружали в буферный раствор и затем добавляли определенное количество концентрированного раствора белка до установления во всем объеме заданной концентрации. После окончания эксперимента белковый раствор вытесняли буферным раствором, который вводили в ячейку. Опытным путем было установлено, что введение 2 л буферного раствора является достаточным количеством для понижения концентрации белка в ячейке до значений $<0,001\%$, при которых используемым методом адсорбция белка не была обнаружена.

Опыты проводили при 37°. После эксперимента полимерные пленки вынимали из буферного раствора и высушивали при 37° в течение 24 час.

ИК-спектры альбумина, адсорбированного на поверхности, получали на спектрофотометре ИКС-22А с помощью приставки МНПВО. В приставке использовали германьевую призму, имевшую в сечении форму параллелограмма с углом 30° и числом отражений 10. Конструкция приставки позволяла прижимать к призме исследуемые пленки с двух сторон.

На рис. 1 приведен типичный спектр альбумина, адсорбированного на ПВХ (время экспозиции пленки в белковом растворе — 1 час, концентрация альбумина — 1,2%). Из спектра отчетливо видны полосы поглощения белка амид I ($\lambda=1650 \text{ cm}^{-1}$) и амид II ($\lambda=1530 \text{ cm}^{-1}$).

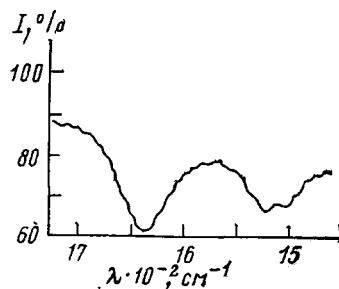


Рис. 1

Рис. 1. Многократно отраженный ИК-спектр альбумина, адсорбированного на ПВХ

Рис. 2. Кинетические кривые процесса адсорбции альбумина ($c=3,5\%$) на пленках ПВХ (1) и ПЭ (2)

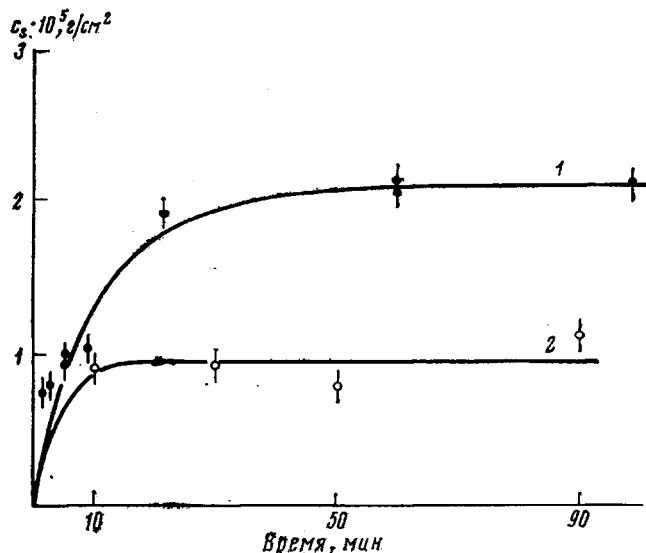


Рис. 2

В данной работе поверхностную концентрацию белка определяли из ИК-спектров двумя методами.

I. По интенсивности полос поглощения белка, адсорбированного на поверхности полимера, используя формулу закона Ламберта — Беера — Бугера; при этом поверхностная концентрация белка была равна

$$c_s = D / \varepsilon Z,$$

где D и ε — соответственно оптическая плотность и коэффициент поглощения полос белка амид I и амид II, Z — число отражений. При расчете величины ε было сделано следующее предположение: коэффициент поглощения какой-либо полосы белка в адсорбированном слое равен коэффици-

енту поглощения соответствующей полосы белка в твердом растворе КВг. Найденные значения ϵ для полос поглощения амид I и амид II соответственно равны: $1,2 \times 10^3 \text{ см}^2/\text{г}$ и $0,5 \times 10^3 \text{ см}^2/\text{г}$.

II. По уменьшению интенсивности полос поглощения самого синтетического полимера после адсорбции белка. Поверхностную концентрацию белка в этом случае определяли по формуле

$$c_s = \rho \cdot l_0 \left(1 - \frac{D_{\alpha}}{D_{\alpha}^0} \right),$$

где D_{α}^0 и D_{α} – соответственно оптические плотности поглощения исходного полимера и полимера с адсорбированным белком в области, где наблю-

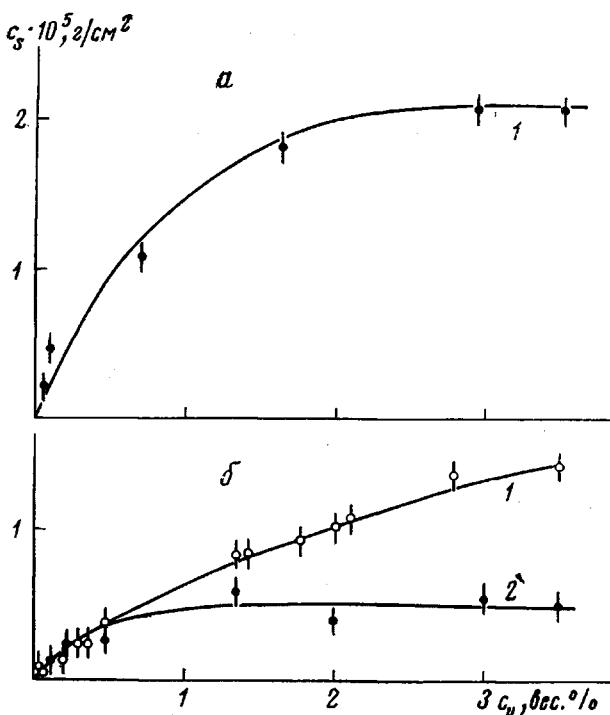


Рис. 3. Зависимость количества адсорбированного альбумина на ПВХ (а) и ПЭ (б) от концентрации альбумина в растворе: 1 – данные настоящей работы; 2 – данные, полученные по методу Лаймана

дается заметное поглощение белка: ρ – плотность белка в адсорбированном слое; l_0 – глубина проникновения ИК-лучей в исходную полимерную пленку, которую рассчитывали по формуле [10]

$$l_0 = \frac{\lambda_1}{2\pi (\sin^2 \theta - n_{21}^{-2})^{1/2}},$$

где $\lambda_1 = \lambda n_1$, λ – длина волны падающего света, n_1 – показатель преломления герmania, n_2 – показатель преломления среды (полимерной пленки), n_{21} – относительный показатель преломления $n_{21} = n_2/n_1$, θ – угол призмы. Показатели преломления исследованных полимеров лежат в пределах 1,4–1,5. Для расчетов была взята величина 1,45. При расчете c_s по этому методу принимается, что значения показателя преломления для полимерной пленки и белка близки, а также плотность белка в адсорбированном слое равна плотности в нативном состоянии.

Значения c_s , рассчитанные по методу II, имеют удовлетворительное совпадение со значениями, рассчитанными по методу I.

На рис. 2 приведены кинетические кривые процесса адсорбции альбумина при концентрации 3,5 %. Видно, что поверхностная концентрация остается постоянной практически после 30 мин. экспозиции пленки в белковом растворе для ПВХ и 10 мин.— для ПЭ. Поэтому все эксперименты по определению изотерм адсорбции проводили при времени экспозиции не менее 1 часа.

На рис. 3, а, б приведены изотермы адсорбции альбумина на ПВХ и ПЭ. Видно, что величина c_s увеличивается с ростом концентрации альбумина в растворе. Значительный разброс экспериментальных данных для ПЭ, по-видимому, обусловлен структурной неоднородностью этого полимера.

В работе [1] было показано, что при адсорбции альбумина на ПЭ величина c_s практически не изменяется, начиная с концентрации альбумина в растворе 0,01 %. Данные, полученные нами по методике, описанной в работе [1], показали, что при этих концентрациях плато не наблюдается, предельная концентрация адсорбции достигается только при концентрациях альбумина в растворе, превышающих 0,5 %. При малых концентрациях данные, полученные по нашей методике и по методике, указанной в работе [1], совпадают; при концентрациях альбумина в растворе больше, чем 0,5 %, наблюдается расхождение результатов. По-видимому, этот эффект можно объяснить тем, что авторы работы [1] использовали очень интенсивную промывку пленок после адсорбции, вследствие чего произошло удаление части белка с поверхности исследуемых полимеров.

Адсорбция альбумина на ряде фторопластов была значительно ниже, поэтому в таблице приведены значения c_s только для концентраций альбумина в растворе, равной 3,5 %.

Средние значения поверхностной концентрации альбумина, адсорбированного на полимерах при 37° из раствора с концентрацией 3,5 % альбумина по массе

Полимер	$c_s \cdot 10^5$, $\text{г}/\text{см}^2$ *
ПВХ	2,1
ПЭ	1,4
Фторопласт Ф-4	0,5
Фторопласт Ф-26	1,2
Фторопласт (электрет)	0,6

* Значения c_s приведены с точностью $\pm 0,1 \cdot 10^{-5}$ $\text{г}/\text{см}^2$.

На основании данных, полученных в нашей работе, можно заключить, что разработанная методика позволяет исследовать как кинетику, так и термодинамику процесса адсорбции белка на поверхности синтетических полимеров.

Институт химической
физики АН СССР

Поступила в редакцию
28 IV 1975

ЛИТЕРАТУРА

1. I. L. Brash, D. I. Lyman, J. Biomed. Mat. Res., 3, 175, 1969.
2. R. E. Baier, R. C. Dutton, J. Biomed. Mat. Res., 3, 191, 1969.
3. D. E. Scarborough, R. G. Mason, K. M. Brinkhaus, Lab. Invest., 20, 120, 1970.
4. B. W. Morrissey, N. R. Stromberg, Symposium on Biomedical. Applications of Polymers, 33, 2, 1973.
5. S. M. Kim, R. G. Lee, C. Adamson, D. I. Lyman, Symposium on Biomedical. Applications of Polymers, 33, 2, 1973.
6. T. Zigler, M. Miller, J. Biomed. Mat. Res., 4, 259, 1970.
7. Falb and Grode, Fed. Proc., 30, 5, 1971.
8. K. S. Birdi, J. Colloid. and Inter. Sci., 43, 542, 1973.
9. A. E. Alexander, Trans. Faraday Soc., 35, 1200, 1939.
10. N. I. Harrick, Internal Reflection Spectroscopy, N. Y., 1967.