

УДК 541.64 : 547.962

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА
С ПОЛИМЕРНЫМИ ГИДРОГЕЛЯМИ**

Попов Е. Н., Дегтерев И. А., Заиков Г. Е.

Исследована сорбция сывороточного альбумина быка двумя гидрофильными полимерами: полиакриламидным и полиметилметакриловым гелями. Для сравнения изучали адсорбцию альбумина на поверхности ПЭ. Показано, что в случае гидрогелей имеет место сорбция альбумина объемом геля. Величина сорбции зависит от химической природы и структуры геля. Из данных по проницаемости и кинетических данных рассчитан коэффициент диффузии альбумина в полиметилметакриловом геле, равный $(5-9) \cdot 10^{-11} \text{ см}^2/\text{с}$.

Полимерные гидрогели известны как перспективные материалы для получения антитромбогенных покрытий. Такие полимеры при контакте с водными растворами плазменных белков имеют размытую границу раздела фаз из-за большого содержания воды в матрице гидрогеля, что, по мнению ряда исследователей, должно приводить к уменьшению адсорбции белков и сохранению их нативной структуры [1].

При контакте водных растворов белков с насыщенными водой гидрогелями могут происходить два процесса: адсорбция белков на поверхности раздела фаз и диффузия белков в матрицу гидрогеля.

Важным вопросом является механизм сорбции плазменных белков гидрогелями, т. е. распределение молекул сорбата в полимерном сорбенте, которое может быть результатом поверхностной адсорбции и растворения в объеме геля (сорбции). В случае низкомолекулярных сорбатов были сделаны попытки разделения таких процессов [2]. При этом основным критерием служило подчинение того или иного участка изотермы сорбции уравнению БЭТ или уравнению Флори. Однако для системы гидрогель — вода — белок не известны уравнения адсорбции и растворения, что в настоящее время не позволяет строго разделить эти два процесса.

Настоящая работа посвящена исследованию закономерностей сорбции альбумина на двух гидрогелях.

В опытах использовали сывороточный альбумин быка, полученный в Московском институте эпидемиологии и микробиологии. Его чистота, определенная электрофоретически, составляла 98%. Были использованы пленки ПЭ (ГОСТ 10354-63), пленки полиметилметакрилового геля (ПММГ) с содержанием воды 80% и средней толщиной в набухшем состоянии $\sim 30 \text{ мкм}$ и пленки полиакриламидного геля (ПААГ), содержащего 60% воды, средней толщиной $\sim 100 \text{ мкм}$. Гидрогели синтезировали в Институте макромолекулярной химии АН ЧССР. Методы, обычно применяемые для определения количества белка, адсорбированного на гидрофобной поверхности (наиболее чувствительный из них — метод многократного нарушения полного внутреннего отражения), в случае исследования гидрогелей неприемлемы в силу методических причин: при сушке гели коробятся, что исключает возможность плотного контакта между пленкой гидрогеля и призмой; наличие в исследованных гидрогелях большого количества связей, поглощающих в области полос поглощения амид I и амид II белков. Поэтому нами был использован метод радиоактивных изотопов. Микроколичества альбумина, меченного по тирозиновым остаткам I^{131} , добавляли к раствору альбумина $\left(\frac{[A] - [I^{131}]}{[A]} < 0,01\% \right)$. Для определения

абсолютных весовых количеств сорбированного белка в каждом случае строили калибровочные кривые $I=f(c_v)$, где I – скорость счета раствора белка, c_v – концентрация белка в растворе, определенная спектрофотометрически. Адсорбцию проводили во всех случаях при pH 7,4, 37°, в 0,05 M фосфатном буфере и в специально изготовленных термостатируемых стеклянных ячейках при постоянном перемешивании. Рабочий объем ячеек составлял 30 см³. Чтобы избежать образования поверхности тройного контакта раствор белка – воздух – полимер ячейку с полимером до начала опыта заполняли буфером так, чтобы весь полимер был покрытым и чтобы остался свободный объем для требуемого количества раствора белка. Полимерную пленку, закрепленную на стеклянной трубке, подвешивали по оси ячейки. Раствор белка в буфере вводили снизу в заполненную буфером ячейку при перемешивании. По окончании опыта белковый раствор вытеснялся фиксированным объемом буфера (0,5–2 л). Радиометрические измерения проводили на приборе фирмы «Nuclear Chicago», спектрофотометрические – на спектрофотометре «Hitachi». Измерения проницаемости ПММГ для альбумина осуществляли в тех же экспериментальных условиях в термостатируемой ячейке, состоящей из двух камер, разделенных пленкой

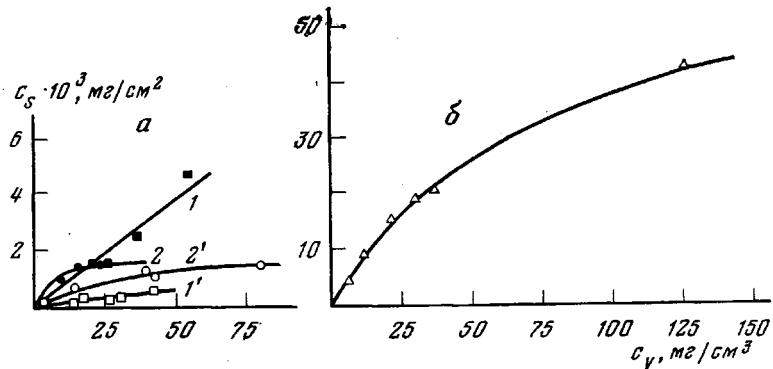


Рис. 1. Изотермы сорбции альбумина- I^{131} при 37° и pH 7,4 на ПММГ (1, 1') и ПЭ (2, 2') (а), а также на ПААГ (б); 1', 2' – после статической десорбции

исследуемого гидрогеля. В одной камере ячейки находился раствор альбумина постоянной концентрации в фосфатном буфере, в другой – чистый буфер. Проницаемость определяли по увеличению концентрации белка в чистом буфере (противораствор), измеряемой спектрофотометрически.

Изотермы адсорбции альбумина- I^{131} на трех полимерах, полученные при pH 7,4 и 37° из растворов белка в 0,05 M фосфатном буфере, представлены на рис. 1. Сорбцию проводили в течение 2 час, что соответствует времени насыщения поверхности для ПММГ (рис. 2) и ПЭ [3]. Кривые получены в координатах $I_s=f(I_v)$, где I_s и I_v – удельные скорости счета пленки и маточного раствора соответственно, и трансформированы в концентрационные координаты при помощи калибровочных кривых типа $I_v=f(c_v)$, где c_v – концентрация белка в маточном растворе. Как видно из рис. 1, ход кривых различен, и если для ПЭ мы имеем кривую с насыщением, то в случае гидрогелей величины c_s возрастают с ростом c_v вплоть до концентраций альбумина, соответствующих его содержанию в крови, и выше. Масса адсорбированного белка при его концентрации в маточном растворе 5% составляет $\sim 23 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-3}$ и $1,5 \cdot 10^{-3}$ mg/cm^2 для ПААГ, ПММГ и ПЭ соответственно. Если исходить из концепции монослойной адсорбции, то путем несложных расчетов можно оценить площадь, приходящуюся на одну молекулу альбумина ($M \approx 69\,000$). Мы получили $5 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-2}$ и $8 \cdot 10^{-2}$ Å^2 для ПААГ, ПММГ и ПЭ соответственно, что на несколько порядков ниже минимальной величины сечения нативной молекулы альбумина, равной $\sim 460 \text{ Å}^2$ [4]. Таким образом, речь могла бы идти только о полислоиной адсорбции. Однако такой важный фактор адсорбции, как наличие поверхности, т. е. границы раздела раствор – твердое тело, выражен в случае гидрофобного ПЭ и «смазан» для гидрогелей. В этом случае в силу высокого влагосодержания последних переход от объема раствора

к объему геля должен быть плавным. Поэтому для гидрогелей сорбция белка объемом представляется предпочтительнее, чем полислоистая адсорбция.

Из сопоставления рис. 2—4 можно сделать следующие заключения.

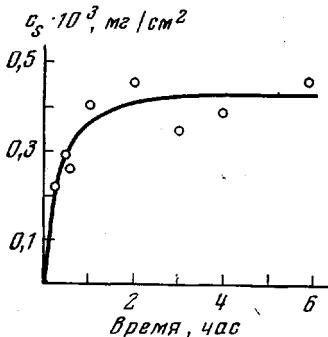


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика сорбции альбумина-I¹³¹ ПММГ при 37° и pH 7,4 (концентрация белка в маточном растворе 0,1%)

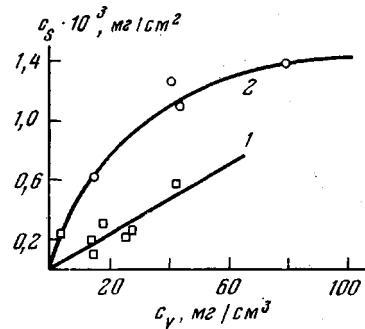


Рис. 3

Рис. 3. Изотермы сорбции альбумина-I¹³¹ при 37° и pH 7,4 после статической десорбции белка в чистый буфер

Время сорбции 2 час, время статической десорбции 24 час, объем буфера 20 см³; 1 — ПММГ, 2 — ПЭ

1. Масса белка, адсорбированного единицей поверхности (если предположить адсорбцию во всех трех случаях), уменьшается в ряду ПААГ > ПММГ > ПЭ. Таким образом, поверхность ПЭ — самая «слабая», а ПААГ — самая «сильная» (рис. 1).

2. В то же время десорбция в статических условиях (рис. 1, а и 3) приводит к резкому уменьшению сорбированного ПММГ альбумина (в ~8 раз), при этом меняется и отношение $c_s^{\text{ПММГ}}/c_s^{\text{ПЭ}}$ от ~1,2 до ~0,35 при $c_v=3\%$, тогда как количество белка, адсорбированного ПЭ, изменяется незначительно, что свидетельствует о «сильной» поверхности ПЭ и «слабой» поверхности ПММГ. (Противоречие между пунктами 1 и 2 устраняется, если считать, что ПЭ адсорбирует белок, тогда как ПММГ его сорбирует. Соответственно в первом случае речь идет о десорбции белка с поверхности, с которой он, вероятно, прочно связан, во втором — о десорбции из объема.)

3. На рис. 4 приведены изотермы сорбции ПААГ (кривая 1) и ПММГ (кривая 2), пересчитанные на единицу объема соответствующих гидрогелей. Как видно из сравнения рис. 1 и 4, отношение сорбированного альбумина $c_{\text{ПААГ}}/c_{\text{ПММГ}}$ при этом уменьшается от ~10 до ~2—2,5. Такое различие в величинах сорбции гидрогелей представляется более разумным и может быть связано с различиями как в их химическом составе, так и в структуре.

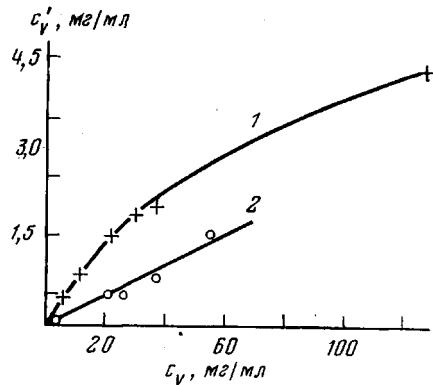


Рис. 4. Изотермы сорбции альбумина-I¹³¹ при 37° и pH 7,4 в пересчете на 1 см³ объема геля: 1 — ПААГ, 2 — ПММГ

Наконец, о том, что альбумин сорбируется объемом гидрогелей, свидетельствует обнаруженная нами проницаемость ПММГ для альбумина. Экспериментальные результаты представлены на рис. 5. По данным рисунка измерено время запаздывания $\tau=8$ час и по формуле $D=l^2/6\tau$ (где l — толщина набухшей пленки гидрогеля, равная 30 мкм, и D — коэффициент диффузии в $\text{см}^2/\text{с}$) мы оценили значение D альбумина для ПММГ,

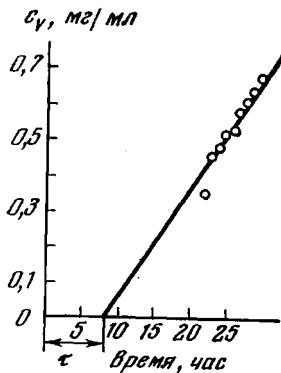


Рис. 5

Рис. 5. Проницаемость альбумина через ПММГ при 37° и pH 7,4 (концентрации белка в маточном растворе 10%); c_v — концентрация белка в противообъеме, τ — время «запаздывания»

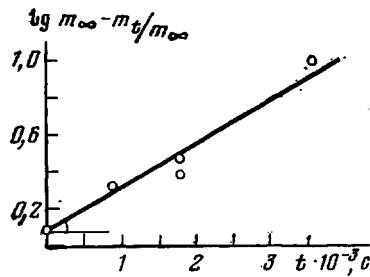


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость $m_{\infty} - m_t/m_{\infty} = f(t)$ по данным рис. 1

оказавшееся равным $(5,2 \pm 1) \cdot 10^{-11} \text{ см}^2/\text{с}$. По приближенному уравнению $m_t/m_{\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} e^{-\pi^2 D t / e^2}$, линеаризованному в координатах $\lg(m_{\infty} - m_t/m_{\infty}) = f(t)$ (рис. 6), и кинетическим данным (рис. 1) мы провели параллельный расчет коэффициента диффузии альбумина в тот же гель. Полученный результат ($D = (8,7 \pm 2) \cdot 10^{-11} \text{ см}^2/\text{с}$) удовлетворительно согласуется с величиной D , определенной из измерений проницаемости.

Институт химической
физики АН СССР

Поступила в редакцию
5 VII 1979

ЛИТЕРАТУРА

1. Полимеры в медицине, «Мир», 1969, стр. 29.
2. A. A. Тагер, M. B. Цилиногина, Д. А. Решетко, Высокомолек. соед., A17, 2566, 1975.
3. J. L. Brash, D. J. Lyman, J. Biomedic. Mater. Res., 3, 175, 1969.
4. Q. Samak, Albumin-polyethylene surface interaction, M. Engng. Thesis, Mc Master Univ., Canada, 1975.

INTERACTION OF SERUM ALBUMIN WITH POLYMER HYDROGELS

Popov K. N., Degterev I. A., Zaikov G. Ye.

Summary

The sorption of bull serum albumin by two hydrophilic polymers: polyacrylamide and polymethylmethacrylic gels has been studied and compared with the adsorption of albumin on the PE surface. For hydrogels the sorption of albumin by the volume of gels was shown. The value of sorption depended on the chemical nature and structure of a gel. From the permeability and kinetic data the coefficient of diffusion of albumin into polymethylmethacrylic gel was calculated being equal to $5 \cdot 10^{-11} \cdot 9 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{sec}$.