

# ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том (A) XXII

## СОЕДИНЕНИЯ

1980

№ 9

УДК 541.64:543.422.27

### ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ПЛАЗМЕННЫХ БЕЛКОВ ПРИ АДСОРБЦИИ МЕТОДОМ ЭПР

*Зимина Л. А., Иорданский А. Л., Полищук А. Я.,  
Григорян Г. Л., Моисеев Ю. В., Заиков Г. Е.*

Рассмотрена адсорбция спин-меченого  $\gamma$ -глобулина на поверхности силикагеля и полизтилена. Обнаружено два типа адсорбции, каждый из которых характеризуется своим временем корреляции вращения радикала. В общем случае спектр нитроксильного радикала представляет суперпозицию двух индивидуальных спектров, обусловленных прочной иммобилизацией белка на поверхности и обратимой адсорбцией его на поверхности. Природа адсорбента влияет на соотношение между прочной и обратимо адсорбированными формами белка. Соотношение между этими формами может быть связано с тромбоэластичными свойствами поверхности.

Большой интерес исследователей к адсорбции глобулярных плазменных белков обусловлен важной ролью, которую они играют в процессе свертывания крови [1, 2]. В настоящее время общепринятой точкой зрения являются представления о том, что адсорбция плазменных белков на поверхности синтетических материалов, находящихся в контакте с кровью, является первичным актом тромбообразования [3, 4].

Адсорбция белков из водных растворов на поверхности твердых тел представляет собой сложный многостадийный процесс, в ряде случаев включающий изменения как во вторичной, так и в третичной структуре белковых глобул. Структуру белка при его контакте с поверхностью твердого тела исследуют следующими путями: а) сопоставлением изотерм адсорбция — десорбция или адсорбционных кинетических кривых [5]; б) расчетом геометрических размеров глобул, основанном на анализе адсорбционных кинетических кривых [6]; в) использованием данных по ферментативному катализу [7]. В последние годы появился ряд работ, где используют методы ИК- и УФ-дифференциальной спектроскопии [8, 9], флюоресцентной спектроскопии [10, 11].

Известно значительное число работ, посвященных изучению растворов плазменных белков, главным образом альбумина и глобулина, при помощи нитроксильных радикалов [12—15]. Однако сведения об исследовании спин-меченых белков, адсорбированных на поверхности раздела фаз, практически отсутствуют, за исключением работы [16]. В литературе имеется только несколько работ, посвященных адсорбции синтетических полимеров на границе жидкость — твердое тело, в которых предпринята попытка определить долю сегментов линейной цепи полимера, отходящих от поверхности в объем в виде петель [17, 18].

Целью настоящей работы является определение изменений структуры глобулярного белка ( $\gamma$ -глобулина) при адсорбции на твердой гидрофобной и гидрофильной поверхности.

Использовали четырежды перекристаллизованный белок плазмы человека —  $\gamma$ -глобулин (лиофилизованный препарат). Адсорбентом являлся силикагель СГ-3 с объемом пор 0,8 м<sup>3</sup>/г и мелкодисперсный полизтилен высокой плотности с удель-

ной поверхностью  $\sim 0,1 \text{ м}^2/\text{г}$ . В качестве метки применяли цианурхлоридный стабильный радикал, синтезированный в ИХФ АН СССР [19].

Спин-меченный белок получали прибавлением 0,1–0,2 мл спиртового раствора метки к 10 мл фосфатно-буферного раствора белка. Мольное соотношение белок : метка составляло 1 : 4. Реакцию проводили при перемешивании, pH 7,4 и температуре 25°. Затем раствор белка ставили на диализ против фосфатного буфера при 4°, несколько раз меняя буфер. После диализа раствор белка центрифугировали. Супернатант исследовали методом ЭПР. Спектры ЭПР получали на спектрометре «Вариан Е4» при комнатной температуре.

Адсорбция спин-меченого белка на силикагеле. Схема опыта была аналогична описанной выше, но к раствору белка определенной концентрации добавляли силикагель и перемешивали в течение 3 час. После завершения адсорбции суспензию центрифугировали и определяли концентрацию белка в супернатанте спектрофотометрически при 280 нм. Десорбцию белка проводили в тех же условиях: суспензионную смесь силикагеля с белком перемешивали в периодически заменяемых объемах буферного раствора.

Адсорбция спин-меченого белка на ПЭ высокой плотности. Адсорбцию проводили аналогичным образом, но вместо центрифугирования адсорбент и белковый раствор разделяли фильтрованием с помощью шприца.

Вопрос о том, достигается ли предельная концентрация адсорбированного белка на силикагеле и ПЭ при данной концентрации белка в растворе может быть решен путем изучения кинетических кривых адсорбции. На рис. 1 представлены типичные кривые адсорбции  $\gamma$ -глобулина на силикагеле (1), ПЭ (2). При 20° для обеих систем происходит заполнение поверхности за время  $\sim 1$  час.

На рис. 2 даны зависимости поверхностной концентрации исследуемого белка от его концентрации в растворе. Как видно из рисунка, начиная с объемной концентрации  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ г}/\text{см}^3$  и выше, поверхностная концентрация белка на силикагеле не зависит от его концентрации в растворе, т. е. достигается максимальная поверхностная концентрация белка  $c_\infty$ . Эти условия были использованы в дальнейших опытах при получении спектров ЭПР \*.

Спектры ЭПР для системы ПЭ –  $\gamma$ -глобулин снимали в интервале объемных концентраций белка 0,5–2%, когда была достигнута максимальная поверхностная концентрация белка на полимере.

Спектр ЭПР водного раствора  $\gamma$ -глобулина, меченного цианурхлоридным радикалом, представлен на рис. 3, а (спектр 1). Видно, что вращательная подвижность нитроксильного радикала по сравнению с вращательной подвижностью чистой метки заметно заторможена. Для количественной характеристики подвижности использовали время корреляции  $\tau_c$  нитроксильного радикала, рассчитанное по формуле (1), справедливой для области быстрых вращений радикала [20]

$$\tau_c = 6,65 \cdot 10^{-10} \Delta H (+1) \left[ \sqrt{\frac{I(+1)}{x(-1)}} - 1 \right], \quad (1)$$

где  $\Delta H$  и  $I$  – ширина и интенсивность соответствующих компонент спектра.

В результате адсорбции меченого белка на силикагеле характер спектра ЭПР нитроксильного радикала меняется рис. 3, а (спектр 2) за счет появления компоненты  $A$ , которая могла бы принадлежать спектру нитроксильного радикала меньшей подвижности (приблизительно на порядок). Аналогичный спектр наблюдается при адсорбции на ПЭ. В этом случае соотношение между интенсивностями компонент  $A$  и  $B$  изменяется по сравнению с адсорбцией на силикагеле, как это показано на рис. 3, б (спектр 1).

Одной из причин проявления сложного спектра спин-метки, ковалентно связанной с  $\gamma$ -глобулином, может являться уменьшение гидратации белковых глобул на поверхности твердого тела по сравнению с водным раствором. Несмотря на то что образцы адсорбированного  $\gamma$ -глобулина со-

\* Специальными опытами было показано, что наблюдается практическая сходимость величин адсорбции меченого и немеченого белков.

держали достаточное количество воды (например, силикагель находился в равновесии с водной фазой), частичная дегидратация могла бы осуществляться за счет тесного взаимодействия молекул белка друг с другом. Этому предположению противоречит тот факт, что понижение относительной влажности в измерительной ампуле до ~50% не приводит к изменению характера спектра, хотя и наблюдается небольшой рост  $\tau_c$  ( $6 \cdot 10^{-9}$  с).

Спектр ЭПР адсорбированного спин-меченого белка представляет собой суперпозицию двух спектров, каждый из которых характеризуется своими

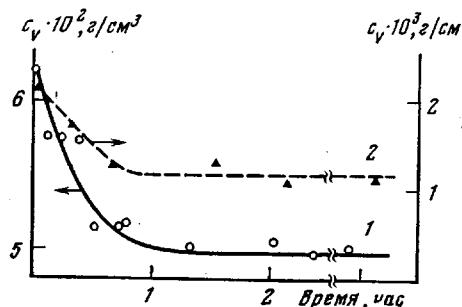


Рис. 1. Изменение объемной концентрации  $\gamma$ -глобулина при контакте с силикагелем (1) и ПЭ (2) от времени

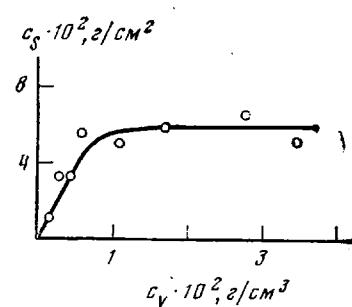
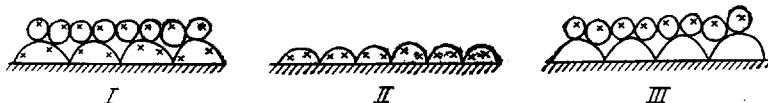


Рис. 2. Изменение поверхностной концентрации  $\gamma$ -глобулина на силикагеле от объемной концентрации

параметрами. Причиной возникновения спектра сложного вида может являться такая ситуация, когда один и тот же радикал-метка находится в различных микроокружениях. При переходе белка на поверхность силикагеля или ПЭ это различие может возникнуть за счет конформационных превращений макромолекулы. В работах [21, 22] было показано, что адсорбция плазменных белков на различных полимерах имеет сложный характер и включает образование как обратимого, так и необратимого (по отношению к буферу) адсорбционного слоя. Аналогичная картина наблюдается при адсорбции глобулина на силикагеле и ПЭ, т. е. на гидрофильной и гидрофобной поверхностях. Если адсорбированный белок подвергнуть трехкратной последовательной десорбции в буфере, то останется часть его, которая не удаляется в условиях эксперимента и, по-видимому, принадлежит к необратимо адсорбированному белку.

Можно предположить, что изменение структуры белковой глобулы, происходящее при взаимодействии с поверхностью, будет являться причиной роста  $\tau_c$  спин-метки.

Для проверки этого предположения нами были проведены опыты, в которых вначале проводили адсорбцию спин-меченого белка, а затем менее прочно адсорбированный белок удаляли. В спектре такого образца наблюдалась компонента А и не было Б (рис. 3, б, спектр 2). Если же на немеченный подвергнутый многократной промывке слой белка адсорбировать спин-меченный белок, то в этом случае в спектре ЭПР появляется компонента Б при отсутствии А. Схема подобного эксперимента представлена ниже.



где модель I соответствует спектру ЭПР рис. 3, а (спектр 2) и 3, б (спектр 1), модель II — спектру 2 на рис. 3, б, спектр для модели III аналогичен спектру 1 на рис. 3, а.

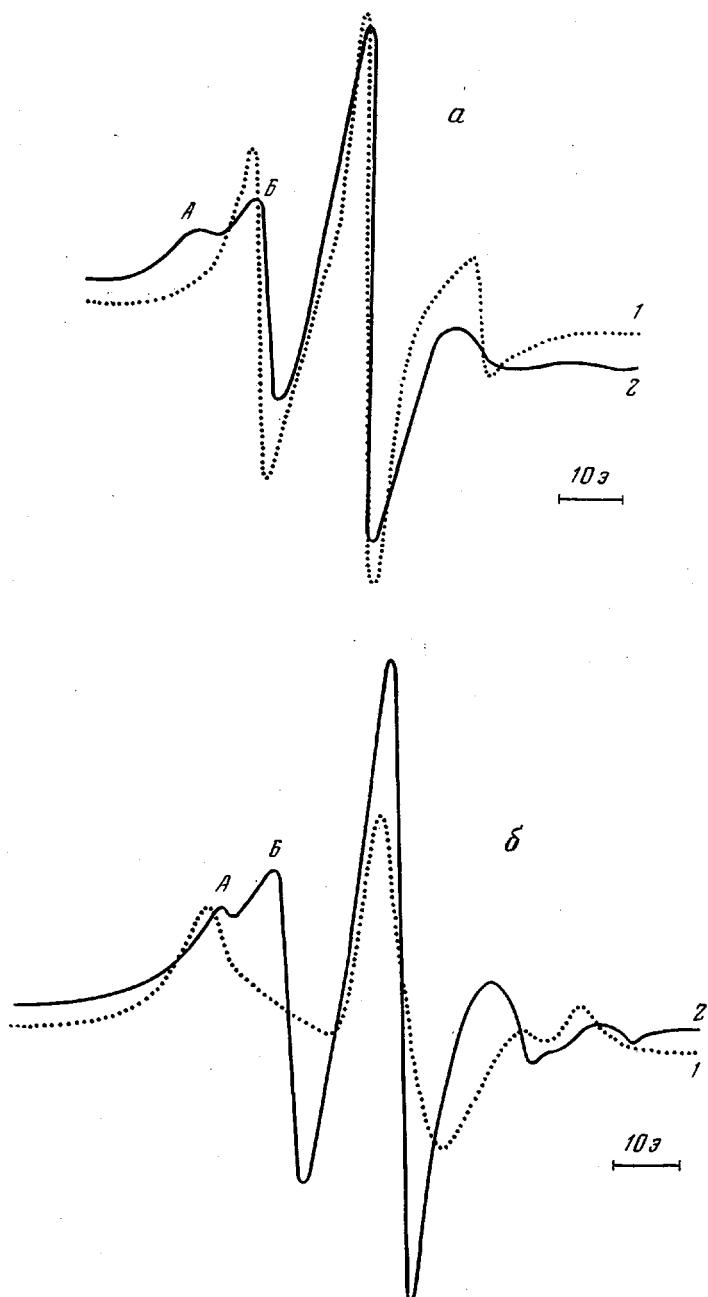


Рис. 3. ЭПР-спектры меченого  $\gamma$ -глобулина в водном растворе (1) и на поверхности силикагеля (2) (а), а также на поверхности мелкодисперсного ПЭ (б)

б: 1 — образец после адсорбции, 2 — этот же образец, но после «жесткой» десорбции

Графическое разделение спектра 2 на рис. 3, а с помощью атласа спектров [23] позволило рассчитать относительное содержание  $\alpha$  всех типов белка и время корреляции для спин-метки, связанной с каждой из этих типов (таблица).

Значения  $\tau_c$  для спин-меченого белка, последовательно нанесенного на силикагель и адсорбированного из раствора обычным способом, с удовлетворительной точностью совпадают.

В ряде работ было показано, что для адсорбированных на полимерах: плазменных белков обратимая адсорбция характеризуется преимущественным взаимодействием типа белок — белок, которое в данных условиях значительно слабее взаимодействия белок — поверхность [24, 25]. Структура обратимо сорбированного белка, экранированного от активных центров поверхности прочно сорбированными макромолекулами, несильно отличается от нативной структуры в растворе, о чем свидетельствует незначительное уменьшение  $\tau_c$  по сравнению с  $\tau_c$  в растворе.

Для глобул белка, непосредственно взаимодействующих с поверхностью, следует ожидать сильное энергетическое взаимодействие с послед-

#### Характеристики спин-меченого $\gamma$ -глобулина \*

Исследуемый объект	$\tau_c \cdot 10^3$ , с	$\alpha$
Раствор	4,3	—
Силикагель (пик B)	4,5	0,3
Силикагель ** (пик A)	20	0,7
Полиэтилен (пик B)	6,2	0,6
Полиэтилен (пик A)	25	0,4

\*  $\alpha$  — доля адсорбированного белка.

\*\* Рассчитан с помощью машинного анализа спектров [23].

ней, что вызывает перестройку структуры глобулы, изменение ее подвижности, в результате чего наблюдается уменьшение частоты вращения радикала. Таким образом, существование двух характеристических частот вращения спин-метки адсорбированного  $\gamma$ -глобулина обусловлено двумя типами посадки белка на поверхности. Различие микроокружения радикала, реализующееся в этом случае, является, по всей видимости, следствием изменения структуры белка на поверхности по сравнению с его структурой в водном растворе.

Природа (гидрофильность) поверхности адсорбента обуславливает различие в соотношениях между количествами необратимо и обратимо адсорбированного белка. Так, например, при переходе от гидрофильного силикагеля к более гидрофобному ПЭ доля прочно сорбированного белка уменьшается, а время корреляции, характеризующее этот тип адсорбции, возрастает.

Соотношение между двумя типами адсорбции на поверхности адсорбента, а также интенсивность взаимодействия с поверхностью в значительной степени могут характеризовать тромборезистентные свойства материала. В данном конкретном случае можно ожидать, что образование тромба на поверхности ПЭ будет протекать менее интенсивно, чем на поверхности силикагеля. Это утверждение основывается на предположении о том, что тромборезистентность материала обусловлена не только общим количеством адсорбированных белков и их селективностью, но также и долей белка, которая претерпевает структурные изменения. Корреляция между тромборезистентными свойствами данных материалов и ЭПР-спектральными характеристиками макромолекул адсорбированного белка на разных типах полимеров, по-видимому, явится дальнейшим шагом в понимании механизма тромбообразования на полимерных материалах.

Авторы выражают благодарность за предоставление спин-метки А. Б. Шапиро.

Институт химической физики  
АН СССР

Поступила в редакцию  
20 IX 1979

#### ЛИТЕРАТУРА

1. R. E. Baier, R. C. Dutton, J. Biomed. Mater. Res., 3, 191, 1969.
2. L. Vroman, A. L. Adams, M. Klings, Federat. Proc., 30, 1494, 1971.
3. R. C. Dutton, T. J. Webber, S. A. Johnson, R. E. Baier, J. Biomed. Mater. Res., 3, 13, 1969.

4. D. E. Scarborough, R. G. Mason, F. G. Dalldorf, K. M. Brinkhous, Lab. Investig., 20, 164, 1969.
5. Е. С. Чухрай, О. М. Полторак, Вестник МГУ, 1973, № 3, 271.
6. М. А. Борисова, Л. И. Некрасов, Н. И. Кобозев, А. В. Киселев, Ю. С. Никитин, Ж. физ. химии, 43, 529, 1969.
7. О. М. Полторак, Ж. физ. химии, 41, 2544, 1967.
8. М. В. Генкин, Р. М. Даэвидов, Д. Ш. Бурбаев, Л. А. Блюменфельд, Докл. АН СССР, 224, 620, 1975.
9. B. W. Morrissey, National Bureau of Standards, special publication, Washington, 1975, 415.
10. D. Gable, I. Z. Steinberg, E. Katschalski, Biochem., 10, 4661, 1971.
11. G. I. Loeb, N. J. Harrick, Anal. Chem., 45, 687, 1973.
12. Г. И. Лихтенштейн, Метод спиновых меток в молекулярной биологии, «Наука», 1974.
13. O. H. Griffith, H. McConnell, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 55, 8, 1966.
14. G. L. Grigorian, A. E. Kolmanson, E. G. Rosantzev, V. J. Suskina, Nature, 216, 927, 1967.
15. А. И. Кайсиянен, Р. С. Неулик, Г. И. Лихтенштейн, А. Ю. Мишарин, М. В. Волькенштейн, Молек. биол., 7, 760, 1973.
16. М. В. Генкин, Р. М. Даэвидов, О. В. Крылов, Биофизика, 23, 29, 1978.
17. K. K. Fox, I. D. Robb, R. Smith, J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 70, 1186, 1974.
18. I. D. Robb, R. Smith, Europ. Polymer. J., 10, 1005, 1974.
19. А. Б. Шапиро, Л. С. Богач, В. М. Чулаков, А. А. Кончакова, В. И. Сускина, Э. Г. Розанцев, Изв. АН СССР, серия химич., 1975, 2077.
20. А. Л. Бучаченко, А. Л. Коварский, А. М. Вассерман, Успехи химии и физики полимеров, под ред. Г. Л. Слонимского, «Химия», 1973, стр. 31.
21. W. J. Dillman, J. I. F. Miller, J. Colloid Interface Sci., 44, 221, 1973.
22. А. Л. Иорданский, Ю. В. Моисеев, Г. Е. Заиков, Тезисы докладов Всесоюзной конференции по медицинским полимерам, Ленинград, 1976.
23. Л. И. Анциферова, А. М. Иванова, А. М. Вассерман, В. А. Лившиц, Н. С. Наземцев, Атлас спектров ЭПР спиновых меток и зондов, «Наука», 1977.
24. О. М. Полторак, Е. С. Чухрай, Физико-химические основы ферментативного катализа, «Высшая школа», 1971, стр. 283.
25. О. М. Полторак, Е. С. Чухрай, Вестник МГУ, серия химич. 1970, № 11, 133.

---

### THE ESR-STUDY OF VARIATION OF PLASMA PROTEINS DURING ADSORPTION

*Zimtina L. A., Jordanskii A. L., Polishchuk A. Ya.,  
Grigoryan G. L., Moiseyev Yu. V., Zaikov G. Ye.*

#### Summary

The adsorption of spin-labelled  $\gamma$ -globuline on silicaged and polyethylene surfaces has been studied. Two types of adsorption were found, each of them is characterized by its own correlation time of radical rotation. In general case the spectrum of nitroxyl radical is a superposition of two individual spectra stipulated by a strong immobilization of protein on the surface and by reversible adsorption of it on the surface. The nature of adsorbent effects on the relation between the strongly and reversibly adsorbed types of proteins. A relation between these forms can be connected with tromboresistant properties of the surface.