

СОВМЕСТНАЯ АДСОРБЦИЯ АЛЬБУМИНА И γ -ГЛОБУЛИНА НА ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНА

*Попов К. Н., Боровкова Н. К., Дегтерев И. А.,
Цепалова Н. А., Заиков Г. Е.*

Взаимодействие плазменных белков крови с инородной поверхностью, особенно с полимерами, привлекает внимание исследователей в связи с проблемой создания искусственных органов. Процесс адсорбции плазменных белков, приводящий к образованию белкового слоя на полимерной поверхности, был обнаружен и исследован в конце 60-х г. в работах Байера, Лаймана и др. [1–3]. Был сделан ряд попыток найти корреляционные зависимости между различными свойствами поверхности и скоростью адсорбции белков и форменных элементов крови [2, 3]. Однако до настоящего времени природа и механизм процессов, приводящих к образованию тромба на полимерной поверхности, не выяснены, как и не вполне ясна роль белковой подложки в процессе тромбообразования.

Лишь в последние годы появились работы, авторы которых ставят своей целью исследование адсорбции белков из модельных смесей и нативной плазмы [4, 5]. Между тем вопрос о конкурентной адсорбции плазменных белков, видимо, имеет существенное значение для понимания механизмов взаимодействия нативной крови с инородной поверхностью.

Цель нашей работы – изучение конкурентной адсорбции альбумина и γ -глобулина человека из модельной смеси этих белков на поверхности полиэтилена.

Методика адсорбционного эксперимента описана в работах [6, 7]. Количества адсорбированных белков на поверхности полимера определялись тремя методами.

1. Спектроскопически, методом многократного нарушенного полного внутреннего отражения в ИК-области. Для количественных расчетов ИК-спектров была сделана градуировка с использованием в качестве стандарта образцов ПЭ с высаженным на них из раствора заданным количеством белка.

2. Электрофоретически. Для удаления адсорбированных белков с поверхности полимерной пленки мы использовали метод, предложенный Лайми для диссоциации белков на субединицы. Пленку с адсорбированным белком площадью в 6 см^2 кипятили в 0,3 мл диссоциирующего буфера в течение 5 мин. Метод электрофореза быстрых применен для исследования адсорбции такого типа.

3. Радиометрически, с использованием альбумина, меченного I^{131} .

Адсорбцию проводили из фосфатного буфера с pH 7,4, ионной силой 0,01, при температуре 37°. После окончания процесса адсорбции пленки извлекали из адсорбционных ячеек и промывали дистиллированной водой, как описано Лайманом с сотр. [4]. Белковый слой, остающийся на пленке после такой обработки, практически не десорбируется в буферный раствор, что было проверено специальным экспериментом. В описанных условиях проводили адсорбцию альбумина- I^{131} на полиэтилене. После окончания процесса пленку извлекали из ячейки и промывали дистиллированной водой. Затем пленку снова погружали в ячейку с чистым буферным раствором и выдерживали 2–3 час в указанных условиях. Аналогичный десорбционный эксперимент был поставлен и против раствора γ -глобулина в том же буфере. Попытки обнаружить радиометрически переход альбумина- I^{131} с поверхности полимера в чистый буфер или в раствор γ -глобулина успеха не имели. Исходя из этого результата, нами был сделан вывод о том, что после обработки пленки по Лайману на ней остается не обратимо адсорбированный слой белка, не десорбирующийся и не обменяющийся с раствором.

В случае, когда концентрация альбумина в растворе была много ниже концентрации γ -глобулина (~1%), мы использовали альбумин, меченный I^{131} . В этих экспериментах концентрацию обоих адсорбированных белков определяли непосредственно на поверхности. Поверхностную концентрацию альбумина- I^{131} определяли, как в работе [6], а концентрацию γ -глобулина – спектрофотометрически, методом многократного нарушенного полного внутреннего отражения в инфракрасной области, как описано в работе [7].

Результаты экспериментов по совместной адсорбции человеческого альбумина и γ -глобулина из фосфатного буфера при pH 7,4 и 37° на полиэтиленовой пленке приведены в таблице. Пересчет весовых концентраций в

Совместная адсорбция альбумина и γ -глобулина на ПЭ (37°, pH 7,4)

Концентрации, молекул/см ²				$w_A \cdot c_A^s + w_\Gamma c_\Gamma^s$	$\epsilon = \frac{c_A^v}{c_A^v + c_\Gamma^v}$
$c_A^v \cdot 10^{-15}$	$c_\Gamma^v \cdot 10^{-15}$	$c_A^s \cdot 10^{-12}$	$c_\Gamma^s \cdot 10^{-12}$		
0,11	11,8	0,12	10,4	0,87	0,009
0,19	15,9	0,16	12,3	1,03	0,012
0,21	18,5	0,24	14,0	1,17	0,011
0,27	19,8	0,21	14,3	1,19	0,013
0,30	9,1	0,14	9,4	0,79	0,032
0,51	16,5	0,20	12,3	1,03	0,030
1,31	8,8	0,36	9,0	0,76	0,130
2,08	14,0	0,52	10,4	1,04	0,130
15,50	24,3	1,27	15,8	1,35	0,390
15,50	24,3	1,67	15,6	1,35	0,390
21,80	21,0	3,56	15,0	1,36	0,510
21,80	21,0	2,94	15,2	1,36	0,510
34,10	15,5	2,94	15,2	1,36	0,690
34,10	15,5	4,75	14,5	1,36	0,690
83,00	11,4	12,00	2,3	0,59	0,880
138,00	48,6	16,00	5,8	1,01	0,740
138,00	45,4	13,00	5,6	0,89	0,750
138,00	48,6	19,00	6,6	1,17	0,740
166,00	22,7	24,00	6,3	1,31	0,880
332,00	39,9	20,00	5,2	1,09	0,890
332,00	20,0	22,00	5,6	1,19	0,940
332,00	32,4	18,00	5,8	1,07	0,910
332,00	45,4	18,00	5,4	1,04	0,880

молекулярные осуществляли, исходя из молекулярных масс 69 000 и 185 000 для альбумина и γ -глобулина соответственно. Как указано в экспериментальной части, все табличные данные относятся к необратимо адсорбированному слою. Из таблицы следует, что сумма по массам адсорбированных белков приблизительно постоянна во всем исследованном интервале концентраций и что сумма молекулярных концентраций адсорбированных белков увеличивается более чем вдвое при переходе от смесей с низким относительным содержанием альбумина к приблизительно эквимольным смесям. Отсюда следует, что «постстройка» необратимо адсорбируемого слоя осуществляется преимущественно альбумином. Следует отметить, что, поскольку для индивидуальных белков предельная величина адсорбции близка к величине, полученной нами для смеси, вероятно, этот параметр (т. е. толщина слоя) не зависит или слабо зависит от природы рассматриваемых белков.

Зависимость относительной концентрации альбумина на поверхности от объемной концентрации представлена на рис. 1. Здесь индексы s и v относятся к концентрации белков на поверхности и в объеме соответственно.

Нами была предпринята попытка получить эмпирическое уравнение, описывающее адсорбцию смеси двух белков. Как видно из рис. 2, экспериментальные данные удовлетворительно описываются прямой линией в координатах уравнения

$$\lg c_A^s = f(c_A^v / \Sigma c^v), \quad (1)$$

где $\Sigma c^v = c_A^v + c_\Gamma^v$, c_A и c_Γ — концентрации альбумина и γ -глобулина соответственно.

Нетрудно видеть, что уравнение прямой, изображенной на рис. 2, имеет вид

$$y = ax + b \quad (2)$$

Из анализа данных таблицы следует наличие материального баланса иммобилизованных на полимерной поверхности белков, что может быть записано в виде

$$w_{\Gamma}c_{\Gamma}^s + w_A c_A^s = 1, \quad (3)$$

где w_{Γ} и w_A — коэффициенты пропорциональности для адсорбированных белков. Исходя из уравнений (1) и (3) нами было получено эмпирическое уравнение, описывающее экспериментальную кривую рис. 2

$$\lg c_A^s = \lg (c_A^s)_0 + \varepsilon \{ \lg (c_A^s)_\infty - \lg (c_A^s)_0 \}, \quad (4)$$

где ε — соотношение объемных концентраций белков $\varepsilon = c_A^v / (c_A^v + c_{\Gamma}^v)$; c_A^s — текущая поверхностная концентрация альбумина, соответствующая насыщению поверхности при адсорбции из раствора с высокой концентрацией чистого альбумина;

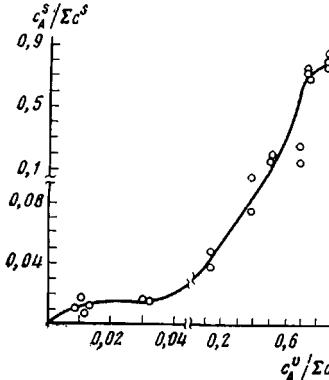


Рис. 1. Зависимость относительной концентрации альбумина на поверхности от объемной концентрации

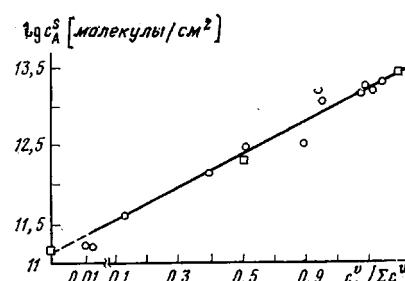


Рис. 2. Зависимость $\lg c_A^s = f(c_A^v / \Sigma c^v)$ по данным рис. 1 (c_A^s , молекул/см²)

$(c_A^s)_0$ — поверхностная концентрация альбумина, соответствующая плато на рис. 1 при малых значениях ε .

Поскольку величины $(c_A^s)_\infty$ и $(c_A^s)_0$ — константы, то, как нетрудно видеть, уравнение (4) есть уравнение прямой линии типа (2), удовлетворительно описывающее экспериментальные данные, представленные в полулогарифмических координатах на рис. 2. Потенцирование уравнения (4) позволяет получить эмпирическое уравнение, описывающее совместную адсорбцию альбумина и γ -глобулина из смеси на поверхности ПЭ в описанных экспериментальных условиях

$$c_A^s = [(c_A^s)_0]^{1-\varepsilon} \cdot [(c_A^s)_\infty]^{\varepsilon} \quad (5)$$

Константы уравнений (3) и (5) были рассчитаны по нашим экспериментальным данным и оказались равными: $w_A = 0,33 \cdot 10^{-13}$ см²/молекул, $w_{\Gamma} = 0,83 \cdot 10^{-13}$ см²/молекул; $(c_A^s)_0 \approx 0,18 \cdot 10^{12}$ молекул/см²; $(c_A^s)_\infty \approx 20 \cdot 10^{12}$ молекул/см².

Из изложенного экспериментального материала можно сделать следующие выводы.

Адсорбция смеси альбумина и γ -глобулина на ПЭ может быть описана степенным уравнением вида

$$c_A^s = [(c_A^s)_0]^{1-\varepsilon} \cdot [(c_A^s)_\infty]^{\varepsilon}$$

Адсорбция смеси этих двух белков является полислойным процессом.

Образование макрослоя подчиняется конкурентному механизму, причем доминирующим белком является альбумин [$(c_A^s)_\infty / (c_{\Gamma}^s)_\infty \sim 3$].

При высоких объемных концентрациях белков адсорбционная кривая рис. 1 «запределяется», что, вероятно, связано с экранированием потенциала поверхности ПЭ белковым слоем.

Институт химической
физики АН СССР

Поступила в редакцию
5 VII 1979

ЛИТЕРАТУРА

1. J. L. Brash, D. J. Layman, J. Biomed. Math. Res., 3, 175, 1969.
2. R. E. Baier, R. C. Dutton, J. Biomed. Mat. Res., 3, 191, 1969.
3. M. Costello, P. Stanezewski, P. Vreisman, T. Lucas, S. Srinivasan, P. N. Sawyer, Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, 22, 161, 1976.
4. J. L. Brash, S. Unijal, Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, 22, 161, 1976.
5. S. M. Kim, R. C. Lee, C. Adamson, D. J. Layman, Symposium on Biomedical Applications of Polymers, 33, 2, 1973.
6. К. Н. Попов, И. А. Дегтерев, Г. И. Заиков, Высокомолек. соед., А22, № 7, 1980.
7. Ю. В. Мусеев, Н. К. Боровкова, Н. А. Маркова, Высокомолек. соед., Б19, 3, 1977.

УДК 541.64:542.954

РЕГУЛИРОВАНИЕ СВОЙСТВ ЭПОКСИДНЫХ ПОЛИМЕРОВ

Кочетов Д. П.

Большой практический интерес представляет получение эластичных материалов на основе широко распространенного класса олигомеров, содержащих эпоксидные группы. Находят применение эпоксидные композиции, которые в качестве отвердителя содержат олигодиены с концевыми карбоксильными группами [1]. Недавно нами были получены композиции, в которых отвердителем эпоксидных смол служили олигодиендиgidразиды. Эти композиции обладали в отверженном состоянии хорошим комплексом физико-механических характеристик [2]. Однако в каждом конкретном случае к получаемому полимеру предъявляются свои, определенные требования, поэтому возникает необходимость в регулировании свойств получаемых полимеров целенаправленным синтезом. Для подобных композиций нередко требуется повышение эластичности.

Деформируемость трехмерных полимеров определяется в основном плотностью узлов спшивки [3]. Добиться ее понижения можно различными путями: увеличением молекулярной массы применяемых олигомеров, изменением соотношения реагентов или введением удлинителей цепи. Увеличить молекулярную массу олигомеров можно только до некоторого предела, так как при этом резко возрастает вязкость [4] и композиция может стать непригодной для переработки. При изменении соотношения реагентов происходит не только уменьшение плотности узлов спшивки, но и возрастает содержание золь-фракции [5], что значительно ухудшает свойства получаемых полимеров, так как при этом увеличивается остаточная деформация и появляются такие нежелательные явления, как липкость. Принципиальных различий в зависимостях, описывающих полимеры в первом и втором случае, нет; для композиций на основе олигодиендиgidразидов и эпоксидных смол соответствующие уравнения были получены нами ранее [6, 7].

В настоящей работе рассмотрен третий случай — формирование трехмерных полимеров на основе диэпоксидов и олигодиендиgidразидов или подобных систем, когда один из реагентов имеет парные зависимые группы, в присутствии удлинителей цепи. Как известно [5], введение в полимеризующуюся систему удлинителей цепи приводит не только к изменению свойств конечного продукта, но и изменяет положение гель-точки, что также необходимо учитывать при их использовании.

Для расчета положения гель-точки, плотности узлов спшивки и содержания золь-фракции применили вероятностный метод [8, 9]. Особенности