

УДК 541(64+183.12)

## ПОЛИ-Н-ВИНИЛПИРРОЛИДОН КАК СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ПРОЦЕССАХ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ

*Валуев Л. И., Вакула А. Е., Платэ Н. А.*

Проведено сравнительное изучение комплексообразующей способности поливинилпирролидона и сывороточного альбумина по отношению к билирубину — токсичному продукту разрушения эритроцитов. Спектрофотометрическим методом оценена константа связывания билирубина с сывороточным альбумином, значение которой составляет  $(0,33 \pm 0,16) \cdot 10^7$  моль<sup>-1</sup>·л. Обнаружено, что для системы поливинилпирролидон — билирубин характерно наличие двух типов комплексов. При высоких соотношениях [поливинилпирролидон] : [билирубин] образуются комплексы, аналогичные комплексам билирубина с сывороточным альбумином, с константой связывания  $\sim 10^4$  моль<sup>-1</sup>·л. При более высоких концентрациях билирубина взаимодействие его с поливинилпирролидоном приобретает кооперативный характер, и константа связывания возрастает в 10–100 раз. В этих условиях молекулы билирубина располагаются на макромолекуле поливинилпирролидона в виде блоков, что приводит к разворачиванию полимерного клубка.

Синтетический водорастворимый раствор — поли-N-ванилпирролидон (ПВП) в настоящее время широко применяют в медицине в качестве плазмозаменителя дезинтоксикационного типа. В основе этого применения лежит уникальная среди других аналогичных полимеров способность ПВП образовывать прочные комплексы с широким кругом веществ, в том числе эндо- и экзогенными токсинами. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что в плане комплексообразующей способности ПВП — один из наиболее близких синтетических аналогов транспортного белка плазмы — сывороточного альбумина (СА) [1–10]. Это выражается как в характере связываемых соединений (красители [1–3], ароматические соединения [4, 5], лекарственные препараты [6, 7], анионные детергенты [8] и другие вещества [9–11]), так и в природе взаимодействия этих соединений с макромолекулой ПВП [3, 6]. Вместе с тем хотя взаимодействие большинства органических молекул с ПВП и СА имеет много общего (это прежде всего относится к гидрофобному характеру сил, обусловливающих взаимодействие), тот факт, что ПВП является синтетической макромолекулой с существенно большей по сравнению с СА конформационной подвижностью, безусловно, должен проявляться при таких взаимодействиях.

Цель настоящей работы — сравнительное изучение комплексообразующей способности ПВП и СА по отношению к билирубину (токсичному продукту разрушения эритроцитов) и выяснение особенностей взаимодействия синтетического полимера с этим соединением.

В работе использовали бычий СА фирмы «Merck» (ФРГ), билирубин фирмы «Ferak Berlin» (Западный Берлин), ПВП фирмы «Daichi Pure Chemicals Co» (Япония) с  $M=360\,000$  и препарат Болоховского химзавода с  $M=40\,000$ . УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре SP8-100 фирмы «Rue Unicam» (Англия). Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре «Hitachi» (Япония). Кинетику фотодеструкции билирубина в водном растворе (фосфатный буфер, pH 7,4) и в растворах, содержащих ПВП ( $M=40\,000$ ) или СА, измеряли, облучая соответствующие растворы УФ-светом (лампа ПРК-4) при комнатной температуре. Поскольку билирубин легко разлагается на свету и под действием кислорода воздуха, константы взаимодействия этого красителя с СА и ПВП определяли спектрофотометрическим методом; время регистрации спектра невелико и составляет 45–90 с.

Спектр поглощения билирубина в водном растворе, как известно [12], имеет максимум при 440 нм. При добавлении к раствору билирубина СА происходит увеличение интенсивности поглощения и смещение максимума в длинноволновую область до 462 нм (рис. 1). Поскольку смещение максимума поглощения обычно связывают с образованием комплекса [12], постоянный вид спектра при мольном соотношении [СА] : [БР] > 1 свидетельствует о том, что спектрофотометрический метод позволяет регистрировать образование комплекса состава 1 : 1, хотя известно, что молекула СА имеет несколько классов мест связывания малых молекул [13, 14].

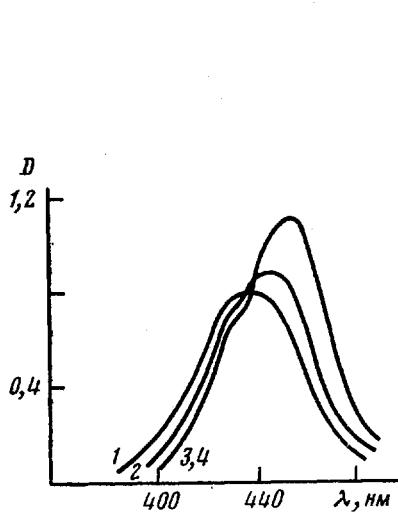


Рис. 1

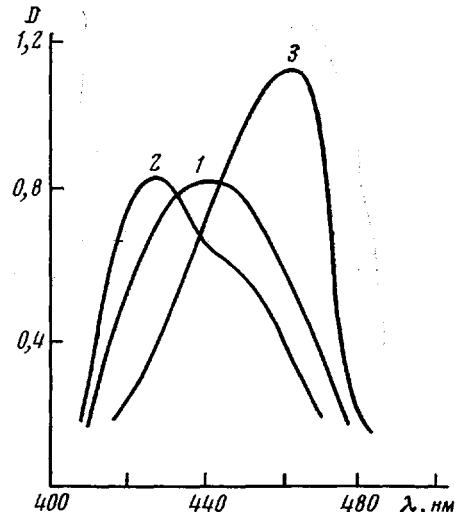


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения водных растворов. [Билирубин] = 17,3 мкмоль/л (1–4). [СА] = 10 (2), 17,3 (3) и 34,6 мкмоль/л (4)

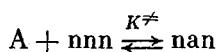
Рис. 2. Спектры поглощения водных растворов. [ПВП] : [билирубин] = 0 (1), 50 (2) и 1500 (3).  $M_{\text{ПВП}} = 360\,000$

Количественная обработка спектров с использованием детально описанного нами в работе [15] подхода к анализу плохо разрешенных спектров через минимизацию суммы квадратов отклонений экспериментально наблюдаемой оптической плотности от расчетной позволила оценить константу взаимодействия билирубина с СА, величина которой составила  $(0,33 \pm 0,16) \cdot 10^7$  л/моль при величине доверительной вероятности  $P = 0,95$ . Полученное значение хорошо согласуется с лит. данными [13, 16], что свидетельствует о корректности выбранной модели расчета.

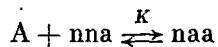
Характер изменения спектров билирубина при добавлении к его раствору ПВП отличается от описанных выше для системы СА – билирубин. Как видно из рис. 2, при низком содержании ПВП в растворе максимум поглощения смещается в сторону коротких волн до 425 нм без изменения интенсивности поглощения в максимуме. При последующем увеличении концентрации полимера наблюдается обратное смещение максимума до 464 нм и значительное увеличение интенсивности поглощения, т. е. спектр принимает вид, характерный для комплексов билирубина с СА. Последнее свидетельствует о том, что в этом случае молекулы билирубина оказываются, по-видимому, в сходном, как и в комплексах с СА, гидрофобном окружении. Резкое возрастание флуоресценции билирубина при этих концентрациях полимера подтверждает этот вывод (рис. 3).

При низких же соотношениях [ПВП] : [билирубин] (рис. 2, спектр 2) молекула билирубина, вероятно, располагается на цепи ПВП в виде блоков, в которых они взаимодействуют друг с другом, т. е. связывание билирубина ПВП в таких условиях должно носить кооперативный характер. Основанием для такого предположения служат наблюдавшиеся в работах [17, 18] сходные, немонотонные изменения спектров поглощения комплексов красителей с полианионами, приписываемые кооперативным взаи-

модействиям. Для таких систем Шварцем была разработана теория кооперативного связывания и описано ее применение к спектрофотометрическим исследованиям [19, 20]. В этой теории рассматриваются два характерных процесса: связывание лиганда изолированной макромолекулой



и связывание лиганда в непосредственной близости с уже связанным



Обе константы связаны между собой параметром кооперативности  $\sigma = K/K^*$ . Чем больше  $\sigma$ , тем сильнее выражен кооперативный характер взаимодействия.

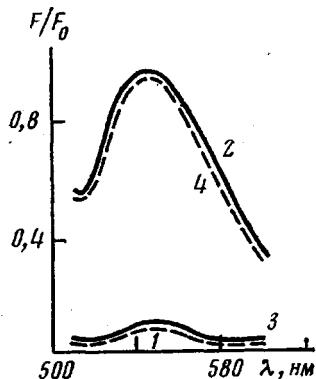


Рис. 3

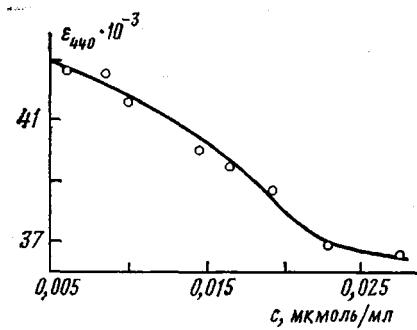


Рис. 4

Рис. 3. Спектры флуоресценции раствора билирубина (1) и растворов билирубина, содержащих СА (2) и ПВП (3, 4). [Билирубин] = 1,8 мкмоль/л, [СА] = 1,8 мкмоль/л, [ПВП] : [билирубин] = 50 (3) и 1500 (4)

Рис. 4. Зависимость коэффициента экстинкции растворов билирубина, содержащих ПВП, от концентрации билирубина при [ПВП] : [билирубин] = 15

Рассмотрим поведение системы ПВП – билирубин с позиций метода обработки спектральных данных, предложенного Шварцем [20]. В присутствии ПВП коэффициент экстинкции билирубина отличается от коэффициента экстинкции растворов одного билирубина.

На рис. 4 представлены экспериментальные значения коэффициента экстинкции  $\epsilon$  как функции концентрации билирубина при постоянном значении соотношения [ПВП] : [билирубин] = 15. С ростом концентрации билирубина (соотношение [ПВП] : [билирубин] постоянно) его доля, связанная с полимером, возрастает и соответственно  $\epsilon$  стремится к  $\epsilon'$ -коэффициенту экстинкции билирубина, «плотно» уложенного на цепи ПВП. Экстраполяция к нулевому значению величины  $1/[билирубин]$  дает значение коэффициента экстинкции красителя в комплексе с плотной упаковкой  $\epsilon' = 35\,500$  моль<sup>-1</sup> · л · см<sup>-1</sup> ( $\epsilon_0 = 46\,000$  моль<sup>-1</sup> · л · см<sup>-1</sup>). Зная эти величины, по уравнению  $\epsilon = \epsilon' + (\epsilon_0 - \epsilon')\gamma$  легко найти  $\gamma_0$  – долю несвязанного красителя для различных соотношений [ПВП] : [билирубин] при постоянной валовой концентрации билирубина. Полученная зависимость представлена на рис. 5. В соответствии с теорией экстраполяция начального участка кривой на ось [ПВП] : [билирубин] дает величину связывающего участка на молекуле ПВП ~20 звеньев. Вторая прямая, обозначенная на рисунке пунктиром и имеющая наклон вдвое меньший, пересекает кривую в точке  $\gamma_0'$ ; согласно теории,  $K = (\gamma_0' [билирубин])^{-1} = (7 \pm 3) \cdot 10^4$  моль<sup>-1</sup> · л. Параметр кооперативности лежит в интервале 10–100.

Поскольку теория Шварца была разработана для систем полианион – положительно заряженный краситель и не применялась для изучения

взаимодействия в системах, включающих незаряженные макромолекулы, полученные результаты были проверены с использованием других методов — спектрофотометрического титрования и аналитического ультрацентрифугирования.

Спектрофотометрическое титрование растворов ПВП билирубином в области значений [ПВП] : [билирубин] > 500 (все молекулы билирубина расположены по цепи изолированно друг от друга) позволяет определить величину  $K$ . При этом мы исходили из того, что оптическая плотность в максимуме поглощения складывается из поглощения свободного и связанного в комплекс билирубина, т. е.

$$D = \epsilon_{\text{связ}} c_{\text{связ}} + \epsilon_{\text{своб}} (c_0 - c_{\text{связ}}), \quad \text{откуда} \quad c_{\text{связ}} = \frac{D - \epsilon_{\text{своб}} c_0}{\epsilon_{\text{связ}} - \epsilon_{\text{своб}}}$$

Коэффициент экстинкции «чистого» комплекса  $\epsilon_{\text{связ}}$  определяется обратным титрованием раствора билирубина полимером и равен

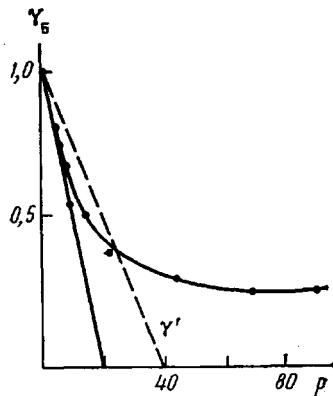


Рис. 5

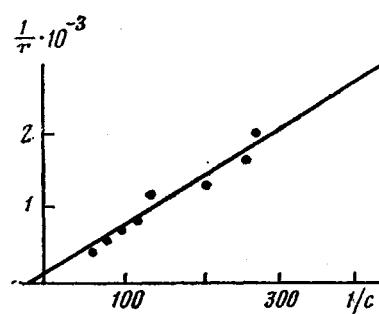


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость  $\gamma_5$  от отношения  $p=[\text{ПВП}]:[\text{билирубин}]$  для несвязанного билирубина (пояснения в тексте)

Рис. 6. Изотерма связывания билирубина ПВП в координатах Клотца.  $[\text{ПВП}]:[\text{билирубин}] = 800-1500$ ,  $r = [\text{билирубин}]_{\text{связ}} : [\text{билирубин}]_{\text{своб}}$ ,  $c = [\text{билирубин}]_{\text{своб}}$

63 500 моль<sup>-1</sup> · л · см<sup>-1</sup>. Полученные результаты представлены на рис. 6 в координатах Клотца [21]  $1/r$  от  $1/c$ , где  $r = [\text{билирубин}]_{\text{связ}} : [\text{билирубин}]_{\text{своб}}$  — число молей красителя, связанного с осново-молем ПВП,  $c = [\text{билирубин}]_{\text{своб}}$  — концентрация несвязанного красителя. Определенное этим методом значение  $K^*$  составило  $(3,6 \pm 2,4) \cdot 10^4$  моль<sup>-1</sup> · л.

Величины  $K$  и  $K^*$  можно оценить также независимо друг от друга методом аналитического ультрацентрифугирования с фотоэлектрической сканирующей абсорбционной оптической системой [22]. Использование этого метода для анализа взаимодействия малых молекул с макромолекулами основано на том, что малые молекулы, не связанные с полимером, не седimentируют в отличие от молекул, связанных с полимерной цепью. На рис. 7 приведены типичные седиментограммы. Видно, что при больших значениях соотношений [ПВП] : [билирубин] граница на седиментограмме имеет форму, характерную для нефракционированного полимера, и билирубин расположен, по-видимому, внутри полимерного клубка в гидрофобном окружении, не оказывая существенного влияния на конформацию макромолекулы. При малых значениях соотношения [ПВП] : [билирубин] граница имеет вид, характерный для седиментации асимметричных частиц, например, в форме палочки, т. е. действительно молекулы билирубина располагаются на макромолекуле ПВП достаточно плотно и взаимодействуют друг с другом, что и приводит к разворачиванию цепочки, поскольку в физиологических условиях молекула билирубина заряжена отрицательно. Полученные значения констант  $K$  и  $K^*$  составляют  $(2-60) \cdot 10^4$  и  $(5-13) \cdot 10^3$  моль<sup>-1</sup> · л соответственно.

Таким образом, видно, что значения констант, оцененные обоими методами, находятся в удовлетворительном согласии с результатами, полученными по теории Шварца, что подтверждает не только ее применимость к рассмотренной системе, но и вывод о кооперативном (хотя и не очень резко выраженном) характере протекающего в системе взаимодействия. Причиной наблюдаемого нами кооперативного эффекта, вероятно, является низкая растворимость билирубина в водных растворах и тенденция к агрегации его молекул даже при низких концентрациях билирубина [23]. Полимер служит, таким образом, как бы вторым компонентом растворителя, к которому билирубин обладает значительно большим сродством, чем к воде.

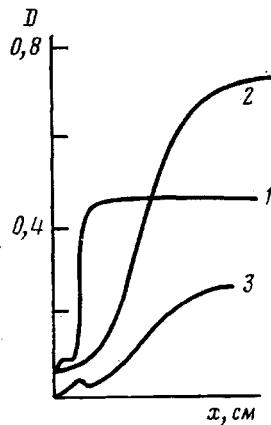


Рис. 7

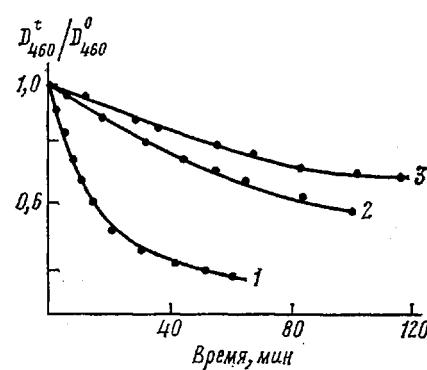


Рис. 8

Рис. 7. Седиментограммы комплексов ПВП с билирубином.  $M_{\text{ПВП}}=360\ 000$ ,  $20^\circ$ , число оборотов ротора 56 000,  $p=[\text{ПВП}]:[\text{билирубин}]=50$  (1), 800 (2), 5000 (3)

Рис. 8. Деструкция билирубина под действием УФ-излучения. Билирубин=9 мкмоль/л,  $[\text{СА}]=[\text{ПВП}]=45$  мкмоль/л.  $M_{\text{ПВП}}=40\ 000$ . 1 - билирубин, 2 - билирубин+ПВП, 3 - билирубин+СА

Присутствие ПВП, благодаря его высокой собственной растворимости, повышает растворимость билирубина и стабилизирует его растворы как в отношении их коллоидной устойчивости, так и по отношению к УФ-излучению (рис. 8). Из рис. 8 видно, что скорость разложения билирубина в присутствии ПВП лишь незначительно выше скорости его разложения в присутствии СА и существенно уступает таковой для свободного билирубина. Последнее подтверждает вывод о высоком сродстве билирубина к ПВП, поскольку известно, что окисляется и деградирует только билирубин, не связанный в комплекс [24].

Суммируя результаты сравнительного исследования связывающей способности СА и ПВП по отношению к билирубину, можно сделать вывод о том, что сродство последнего к ПВП хотя и меньше, чем к СА, но все же достаточно велико. Следовательно, ПВП не может конкурировать с СА за связывание билирубина в том случае, когда первое место сильного связывания на молекуле белка еще не занято. В то же время константы связывания ПВП билирубина сами по себе достаточно велики и сравнимы по величине с константами взаимодействия билирубина с местами связывания второго класса на молекуле СА ( $0,17 \cdot 10^4$  моль $^{-1}$ ·л) [13], и, следовательно, в этих условиях ПВП способен проявлять свои адсорбционные свойства, выступая в роли синтетического аналога СА.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Frank H. P., Barkin S. M., Eirich F. R. J. Phys. Chem., 1957, v. 61, p. 1375.
- Takagashi T., Kuroki N. J. Polymer Sci. Polymer Chem. Ed., 1973, v. 11, № 8, p. 1889.
- Klotz I. M., Shikama K. Arch. Biochem. Biophys., 1968, v. 123, p. 551.
- Сусь Т. А. Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1980. 20 с.
- Phares R. E. J. Pharm. Sci., 1968, v. 57, № 1, p. 53.

6. Ruedy J., Chernecki W. Canadian J. Physiol. Pharmacol., 1968, v. 46, p. 829.
7. Hosono T., Tsuchiya S., Matsumaru H. J. Pharm. Sci., 1980, v. 69, № 7, p. 824.
8. Fishman M. L., Eirich F. R. J. Phys. Chem., 1971, v. 75, № 20, p. 3135.
9. Сидельковская Ф. П. Химия N-винилпирролидона и его полимеров. М.: Наука, 1970.
10. Lety-Sistel C., Sebille B., Quivoron C. J. Polymer Sci. Polymer Symp., 1975, v. 52, p. 311.
11. Öster G., Immergut E. H. J. Amer. Chem. Soc., 1954, v. 76, № 5, p. 1393.
12. Бабко А. К. Физико-химический анализ комплексных соединений в растворах. Киев: Изд-во АН УССР, 1955, с. 104.
13. Шаповаленко Е. П., Колосов И. В. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 514.
14. Birkeitt D. J., Kapitulnik J. Clin. Chim. Acta, 1976, v. 71, № 1, p. 129.
15. Валуев Л. И., Вакула А. В., Волков А. В., Олоновский А. Н., Строганов Л. Б., Платэ Н. А. Докл. АН СССР, 1980, т. 254, № 1, с. 138.
16. Beaven G. H., d'Albis A., Gratzer W. B. Europ. J. Biochem., 1973, v. 33, № 3, p. 500.
17. Bradley D. F., Wolf M. K. Proc. Nat. Acad. Sci., 1959, v. 45, p. 944.
18. Armstrong R. W., Kurucsev R., Strauss U. P. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 10, p. 3174.
19. Schwarz G. Europ. J. Biochem., 1970, v. 12, p. 442.
20. Schwarz G., Klose S., Balthasar W. Europ. J. Biochem., 1970, v. 12, p. 454.
21. Klotz I. M., Walker F. M. J. Amer. Chem. Soc., 1948, v. 70, № 3, p. 943.
22. Steinberg I. Z., Schachman H. K. Biochemistry, 1966, v. 5, № 12, p. 3728.
23. Odell G. B. Pediatrics, 1970, v. 46, № 1, p. 16.
24. Jacobsen J. Federat. Europ. Biochem. Soc. Letters, 1969, v. 5, № 2, p. 112.

Московский государственный  
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию  
2.III.1983

### POLY-N-VINYLPYRROLIDONE AS A SYNTHETIC ANALOG OF SERUM ALBUMINE IN PROCESSES OF COMPLEX FORMATION

*Valuev L. I., Vakula A. V., Plate N. A.*

#### Summary

The complex-forming capacity of polyvinylpyrrolidone and serum albumine towards bilirubine, a toxic product of degradation of erythrocytes has been comparatively studied. The binding constant of bilirubine with serum albumine was evaluated by spectrophotometry method being equal to  $(0.33 \pm 0.16) \cdot 10^7 \text{ mol}^{-1}\text{l}$ . The existence of two types of complexes for polyvinylpyrrolidone – bilirubine system was found. At high [polyvinylpyrrolidone] : [bilirubine] ratios the complexes analogous to complexes of bilirubine with albumin are formed with binding constant  $\sim 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{l}$ . At higher concentrations of bilirubine its interaction with polyvinylpyrrolidone has a cooperative character, and the binding constant is increased in 10-100 times. In these conditions bilirubine molecules are seated on polyvinylpyrrolidone macromolecule as blocks, this results in unfolding of a polymer coil.