

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 541(64+183)

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВЕЛИЧИНЫ
АДСОРБЦИИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И ФИБРИНОГЕНА
ЧЕЛОВЕКА НА ГИДРОФИЛЬНЫХ И ГИДРОФОБНЫХ
ПОВЕРХНОСТЯХ**

Цепалова Н. А., Брында Э., Штол М., Заиков Г. Е.

Количественно определена величина адсорбции сывороточного альбумина и фибриногена человека на плоских поверхностях методом УФ-спектроскопии. Обсуждены возможности применения этого метода для гидрофобных и гидрофильных поверхностей. Представлены значения равновесной адсорбции для альбумина на ПЭ, углероде, поли-(2-гидроксиэтилметакрилате) и целлофане.

В настоящее время значительное внимание уделяют исследованию адсорбции плазменных белков на искусственных поверхностях как модели начальной стадии взаимодействия крови с чужеродными поверхностями [1, 2]. При этом обычно используют методы регистрации радиоактивной или флуоресцентной меток, введенных в белок, или метод многократного нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО) в ИК-спектроскопии. Однако использование меченых белков может привести к искажению результатов вследствие нестабильности связи между белком и меткой [3]. Во многих случаях метод МНПВО также не дает хороших результатов из-за трудностей калибровки.

В работах [4–6, 7] адсорбцию проводили в белковом растворе, который затем заменяли буферным, и адсорбированный белок регистрировали непосредственно на поверхности полимера. При проведении процесса адсорбции таким способом, по-видимому, можно надежно регистрировать только величину необратимой адсорбции.

Метод, предложенный в данной работе, основан на регистрации изменения концентрации белка в объеме с помощью УФ-спектроскопии при адсорбции из тонких белковых слоев растворов на гладкие полимерные гидрофильные и гидрофобные поверхности. Этот метод дает возможность определить количество всего белка, адсорбированного как обратимо, так и необратимо. Преимущество этого метода перед методами, основанными на использовании различных меток, состоит в том, что адсорбция происходит из растворов белков, не измененных меткой.

В работе использовали человеческий фибриноген (ЧФГ) (производства ЧССР) со свертываемостью 90% [8] при периоде инкубации 24 ч при 25°; свертываемость и время свертывания оставались неизменными, деградацию цепей не наблюдали. Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) (производства ЧССР) имел гомогенность выше 98% (по электрофорезу). Пленки из ПЭ (плотность 0,919 г/см³) перед использованием выдерживали в толуоле, затем промывали ацетоном, этанолом и водой. Углеродистые поверхности готовили вакуумным напылением на стеклянные пластины. Поли-(2-гидроксиэтилметакрилат) (ПГЭМА) получали полимеризацией 10%-ного раствора мономера в этанольно-водной смеси (3:2). Поверхности из ПГЭМА получали путем равномерного насыщения 5%-ного раствора полимера в метилцеллозольве на одну поверхность ПЭ-пленки, предварительно выдержанной в бихромате калия в течение 3 ч. Полученные пленки промывали в дистиллированной воде в течение 12 дней, меняя воду каждый день. Все процедуры по получению пленок проводили в беспылевых условиях. Сухие пленки ПГЭМА имели толщину 5 мк. Однородность покрытия поверхности полиэтилена ПГЭМА контролировали методом МНПВО в ИК-области. Пленки целлофана толщиной 30 мк кипятили в дистиллированной воде в течение 10 дней, меняя воду каждый день.

Эксперименты по адсорбции проводили таким образом, чтобы исключить возможность попадания воздушных пузырьков вблизи поверхности раздела белковый раствор – полимер. Таким образом, измеряемая величина адсорбции не искажалась за счет вклада денатурируемых белков при поверхности раздела воздух – белковый раствор. Спектры снимали на спектрофотометре «Perkin – Elmer» и «Hitachi 430».

Адсорбция на гидрофобных материалах. Полиэтилен. В ПЭ-пакет размером 10×20 см вводили 3 мл раствора Рингера. Раствор распределяли таким образом, чтобы пакет заполнился полностью, после чего добавляли 1 мл белкового раствора.

Количество раствора Рингера и раствора белка определяли взвешиванием с точностью до 10^{-6} г.

Адсорбцию проводили в течение 60 мин при постоянном перемешивании, затем снимали УФ-спектры белкового раствора после адсорбции против референтного раствора белка. Растворы готовили таким образом, чтобы их концентрация соответствовала концентрации раствора белка в пакете перед началом адсорбции. Различие концентрации раствора в пакетах (при проведении параллельных опытов) и в референтном растворе, возникающее из-за неточности приготовления, было скорректировано с помощью введения коррекционного множителя.

Концентрацию адсорбированного белка определяли по разнице поглощения при 280 нм белкового раствора после адсорбции и референтного раствора, используя уравнения

$$C_s = \frac{V}{A} (-\Delta C_v^{\text{УФ}} + \Delta C_v^{\text{K}}) \quad (1)$$

$$\Delta C_v^{\text{УФ}} = \frac{\Delta D/l}{K_a^{280}}, \quad \Delta C_v^{\text{K}} = \frac{D_p^{280}}{l K_a^{280}} \left(\frac{\frac{R_p}{P_p} + 1}{\frac{R_a}{P_a} + 1} - 1 \right), \quad (2)$$

где C_s – концентрация адсорбированного белка $\text{г}\cdot\text{см}^{-2}$; V – объем адсорбируемого раствора в пакете, см^3 ; A – величина внутренней поверхности мешка, см^2 ; $\Delta C_v^{\text{УФ}}$ – разница между концентрацией белка в адсорбируемом и референтном растворах, $\text{г}\cdot\text{см}^{-3}$; ΔC_v^{K} – коррекционный множитель; ΔD – разница оптических плотностей растворов; K_a^{280} – коэффициент экстинкции адсорбируемого раствора белка при 280 нм, $\text{г}^{-1}\cdot\text{см}^2$; l – длина оптического пути, см ; R_p и P_p – вес раствора Рингера и раствора белка, добавленного в референтный раствор, г ; R_a и P_a – вес раствора Рингера и раствора белка, введенного в пакет, г ; D_p^{280} – оптическая плотность при 280 нм референтного раствора, см^{-1} .

Адсорбция на углеродистых поверхностях. Стеклянную пластинку, покрытую углеродом, помещали в ПЭ-пакет. Опыты по адсорбции выполняли, как описано выше. Величину адсорбции за счет ПЭ-пакета измеряли одновременно в независимом эксперименте и вычитали из общей величины.

Адсорбция на гидрофильных гелях. Гидрофильные гели ПГЭМА и целлофана предварительно выдерживали в воде до полного набухания. Они были непроницаемы для молекул ЧСА и ЧФГ. Поверхностную концентрацию белков, адсорбированных на этих гелях, рассчитывали по уравнениям

$$a = -\Delta C_v^{\text{УФ}} + \Delta C_v^{\text{K}} + S \quad (3)$$

$$a = C_s \frac{A}{V}, \quad S = C_v \frac{\Delta V}{V - \Delta V}, \quad (4)$$

где a – уменьшение концентрации раствора белка в адсорбируемой среде в результате адсорбции на поверхность; S – увеличение концентрации белка в адсорбируемом растворе вследствие дополнительного набухания геля за счет воды адсорбированного раствора; $\Delta C_v^{\text{УФ}}$ и ΔC_v^{K} можно рассчитать по уравнениям (2); C_v – концентрация белка в адсорбируемом растворе, $\text{г}\cdot\text{см}^{-3}$, ΔV – объем воды, поглощенной гелем при набухании, см^3 .

Уравнения (3) и (4) могут быть использованы для расчета концентрации адсорбированного белка при выполнении одного из следующих условий: опыты по адсорбции проводят таким образом, чтобы член S , ответственный за набухание, был намного меньше, чем член a , ответственный за адсорбцию (в этом случае членом S уравнения (3) можно пренебречь); величина члена S определяется из независимого эксперимента. Величина ошибки должна быть меньше по сравнению с величиной члена a . На отношение a/S может влиять выбор толщины образца и концентрация белкового раствора C_v . Член a возрастает с увеличением поверхности геля, член S возрастает с увеличением объема геля; т. е. отношение a/S возрастает с уменьшением толщины образца.

Концентрационная зависимость члена a определяется изотермой адсорбции $C_s = -C_s(C_v)$. Вблизи плато изотермы член S с увеличением C_v растет намного быстрее, чем член a .

ПГЭМА. В случае этого полимера толщина геля была 5 ммк. Когда сухой образец ПГЭМА помещали в 0,1%-ный раствор ЧФГ, член S приобретал значение, близкое к значению члена a . Значение члена S может быть минимально при использовании образцов ПГЭМА, предварительно набухших в воде. Поэтому ПЭ-пленки, покрытые с одной стороны ПГЭМА, предварительно выдерживали в растворе Рингера в течение 24 ч. Затем пленки вынимали из раствора, удаляли капельки жидкости и из них делали пакеты для адсорбции. Внутреннюю поверхность пакета, покрытую пленкой ПГЭМА, выдерживали в парах воды в течение 12 ч. В пакетах, подготовленных таким образом, проводили адсорбцию так же, как для ПЭ. Концентрацию белка, адсорбированного на поверхности, рассчитывали по уравнению (3), в котором член S был незначителен (при взвешивании образцов ПГЭМА, набухших предвари-

тельно и непосредственно в белковом растворе, было показано, что разница в набухании настолько мала, что величина члена S не превышала 10% от величины члена a .

Целлофан. В случае целлофана толщина пленок составляла 30 мкм. Оказалось, что, если сухие целлофановые пленки помещали в 0,1%-ный раствор ЧФГ, величина члена S была в несколько раз больше, чем величина члена a .

Методика, описанная для адсорбции белков на предварительно набухшем ПГЭМА, не дает надежных результатов в случае целлофана, так как манипуляции с предварительно набухшим целлофаном вызывают большие изменения в величине набухания. Поэтому адсорбцию проводили на сухих целлофановых пленках и величину члена S определяли следующим образом.

Сухие целлофановые пленки взвешивали и помещали в ПЭ-пакеты. Раствор ЧСА вводили в пакет и оставляли на 4 ч при периодическом перемешивании. Затем снимали УФ-спектры против исходного раствора ЧСА. Величину адсорбции на ПЭ определяли в параллельных экспериментах и вычитали из общей величины адсорбции. Низкий коэффициент экстинкции ЧСА дает возможность использовать высокие концентрации этого белка. При этом член S намного больше члена a (если предположить, что адсорбция ЧСА на целлофане достигает той же величины, что и адсорбция на ПЭ, то член a в 1%-ном растворе ЧСА может составить только 2,5% от члена S). Член S рассчитывали из этих экспериментов по уравнению (3), в котором член a сравнительно мал. С использованием серии опытов и уравнения (4) была рассчитана степень набухания в $\text{g}^{-1}\cdot\text{см}^3$ по уравнению

$$b = \frac{\Delta V}{m}, \quad (5)$$

где ΔV – объем воды в набухшем геле, см^3 ; m – вес сухого геля, г.

Степень набухания, определенная для целлофана, составила $0,97 \pm 0,023 \text{ g}^{-1}\cdot\text{см}^3$. Величина b , рассчитанная из опытов с различной концентрацией ЧСА, не зависела от концентрации белка в пределах 0,3–1% ЧСА. Это подтверждает допущение, что член a в этих экспериментах незначителен.

Адсорбцию ЧФГ проводили параллельно с опытами по набуханию.

Исходные образцы сухого целлофана в обоих случаях содержали одинаковое количество влаги из воздуха. В ПЭ-пакеты, содержащие целлофановые пленки размером $9,5 \times 17 \text{ см}$, вводили 6 мл раствора Рингера и через 3 ч добавляли 2 мл раствора ЧФГ. Последующие процедуры были такие же, как и в опытах по адсорбции на ПЭ. Величину адсорбции на ПЭ при этом вычитали, а адсорбцию ЧФГ на целлофане рассчитывали из уравнений (3)–(5), принимая степень набухания $b = 0,97 \text{ g}^{-1}\cdot\text{см}^3$.

Из табл. 1 видно, что ошибка в определении члена S меньше по сравнению с величиной члена a . На всех исследуемых материалах адсорбцию проводили с интервалами времени 30, 60 и 120 мин, причем во всех этих измерениях величина адсорбции, была одинакова, т. е. ее можно было рассматривать как равновесное предельное значение адсорбции. Опыты в растворе Рингера проводили при pH 7,2 и 23°. Коэффициенты экстинкции K_0^{280} были для ЧФГ и ЧСА соответственно $1,506 \cdot 10^3$ и $5,8 \cdot 10^2 \text{ g}^{-1}\cdot\text{см}^2$.

На рисунке приведены предельные равновесные величины адсорбции ЧФГ и ЧСА на ПЭ. ММ использованного фибриногена составила 340 000 [9]. Из результатов электронной микроскопии известно, что гидратированные молекулы ЧФГ имеют цилиндрическое строение с закругленными концами длиной 45 и диаметром 9 нм [10].

Если такие молекулы расположить в мономолекулярный слой в положении side-on, можно рассчитать, что количество адсорбированного ЧФГ должно быть

Таблица 1

Значения величин a и S в уравнении (3) для целлофана толщиной 30 мкм при двух различных концентрациях ЧФГ в растворе

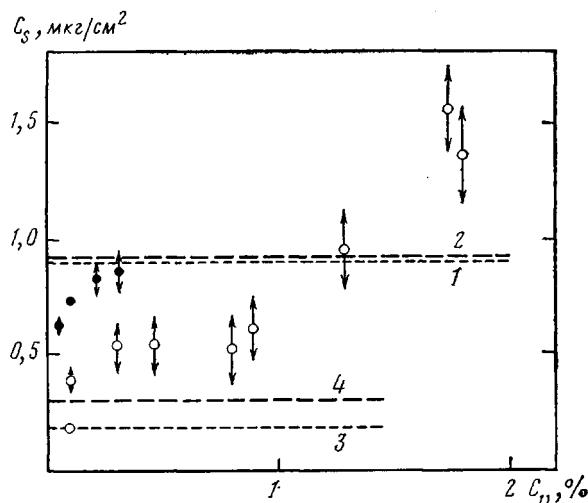
$C, \%$	$a \cdot 10^{-5}, \text{ г}/\text{см}^3$	$S \cdot 10^{-5}, \text{ г}/\text{см}^3$	$C, \%$	$a \cdot 10^{-5}, \text{ г}/\text{см}^3$	$S \cdot 10^{-5}, \text{ г}/\text{см}^3$
0,100	$1,5 \pm 0,56$	$7,1 \pm 0,25$	9,038	$1,3 \pm 0,33$	$2,6 \pm 0,1$

Таблица 2

Величина адсорбции ЧФГ и адгезии тромбоцитов на гидрофобных и гидрофильных поверхностях при 23°

(0,1%-ный раствор ЧФГ в растворе Рингера, pH 7,2)

Материал поверхности	Адсорбция, $\text{мкг}/\text{см}^2$	Адгезия тромбоцитов, $\text{ед}/20\,000 \text{ мкм}^2$	Материал поверхности	Адсорбция, $\text{мкг}/\text{см}^2$	Адгезия тромбоцитов, $\text{ед}/20\,000 \text{ мкм}^2$
ПЭ	$0,73 \pm 0,01$	5 ± 1	ПГЭМА	$0,23 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,1$
Углерод	$0,77 \pm 0,07$	–	Целлофан	$0,40 \pm 0,14$	–



Адсорбция ЧФГ и ЧСА на ПЭ (раствор Рингера, pH 7, 2, 23°). C_s – концентрация адсорбированного белка; C_v – концентрация белка в растворе; 1 и 2 – теоретические значения концентраций адсорбированных белков ЧФГ и ЧСА соответственно при адсорбции макромолекул на поверхности в положении end-on; 3 и 4 – те же значения при адсорбции макромолекул в положении side-on (темные кружки – ЧФГ, светлые – ЧСА)

0,18 мкг/см². Экспериментально найденное значение величины адсорбции ЧФГ (рисунок) показало, что количество адсорбированного ЧФГ близко к тому, которое требовалось бы при адсорбции молекул ЧФГ на поверхности в положении end-on. Однако эти результаты могут дать только приблизительную оценку упаковки адсорбированных молекул из-за возможных конформационных изменений вследствие взаимодействия с поверхностью или межмолекулярного взаимодействия молекул белка.

Если принять молекулярную массу ЧСА 69 000 [9], длину молекулы 14 и диаметр 4 нм [11], можно рассчитать, что при мономолекулярной адсорбции в положении end-on на поверхности должно адсорбироваться 0,82 мкг·см⁻² белка. Как видно из рисунка, величина адсорбции ЧСА при объемных концентрациях выше 1% больше этой величины. Отсюда следует, что равновесно адсорбированный ЧСА в этих пределах объемных концентраций может содержать несколько адсорбционных слоев при возможном изменении конформации белка при адсорбции.

В табл. 2 приведены значения равновесной адсорбции ЧФГ на гидрофобных (ПЭ и уголь) и гидрофильных (ПГЭМА и целиофан) поверхностях и величина адгезии тромбоцитов на поверхности этих же материалов. Из таблицы видно, что гидрофильные полимеры отличаются от гидрофобных тем, что адсорбируют меньший объем белка и проявляют меньшую склонность к адгезии тромбоцитов. Эти результаты согласуются с существующими представлениями о большей гемосовместимости гидрофильных поверхностей, в частности ПГЭМА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vroman L., Leonard E. F. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1977, p. 156.
2. Cooper S. L., Peppas N. A. Biomaterials: Interfacial Phenomena and Applications. N. Y.: Marcell Decker, 1982, p. 199.
3. Brynda E., Drobnik J., Vacik J., Kalal J. J. Biomed. Mater. Res., 1978, v. 12, № 1, p. 55.
4. Brynda E., Houska M., Pokorna Z., Cepalova N. A., Moiseev Yu. V., Kalal J. J. Biomed. Engng., 1978, v. 2, № 1, p. 411.
5. Brunda E., Houska M., Cepalova N. A., Kalal J. Ann. Biomed. Engng., 1980, v. 8, № 1, p. 245.
6. Мусеев Ю. В., Боровкова Н. К., Цепалова Н. А. Высокомолек. соед. Б, 1977, т. 19, № 1, с. 3.
7. Kim S. M., Lee R. G., Adamson C., Lyman D. J. In: Symposium on Biomedical Applications of Polymers. N. Y. Marcell Decker, 1973, v. 33, p. 2.
8. Blombäck B., Blombäck M. Acta Chem. Scand., 1956, v. 10, p. 147.
9. Handbook of Biochemistry Selected Data for Molecular Biology / Ed. by Sober H. A. N. Y.: The Chem. Rubber Co., 1970.
10. Bachman L., Schmitt-Fumian W. W., Hammel R., Lederer M. Makromolek. Chem., 1975, v. 176, p. 2603.
11. McClure R. J., Craven B. M. J. Molec. Biol., 1974, v. 83, p. 551.

**HOD OF QUANTITATIVE EVALUATION OF ADSORPTION
OF HUMAN SERUM ALBUMINE AND FIBRINOGEN ON HYDROPHILIC
AND HYDROPHOBIC SURFACES**

Tsepalova N. A., Brynda E., Shtol M., Zaikov G. Ye.

Summary

The value of adsorption of human serum albumine and fibrinogen on plane surfaces has been quantitatively determined by UV-spectroscopy method. The possibilities of application of this method to hydrophobic and hydrophilic surfaces are discussed. The values of equilibrium adsorption of albumine on PE, carbon, poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and cellophane are presented.

УДК 541.64:539.2:532.72

**ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ СИНТЕТИЧЕСКОГО цис-1,4-ПОЛИИЗОПРЕНА
И НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА НА ДИФФУЗИЮ ТВЕРДЫХ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ**

Соколова Л. В., Шершнев В. А.

Исследование структуры СКИ и НК, проведенное с помощью молекулярных зондов (серы и дифенилгуанидины) диффузионно-сорбционным методом в области 30–110°, показало, что для этих эластомеров характерен ряд высокотемпературных структурных переходов. Наличие переходов подтверждено методом ИК-спектроскопии. Отмечено заметное различие в структуре матрицы СКИ и НК.

Синтетический СКИ отличается от НК не только по способности к кристаллизации (скорости процесса и $T_{\text{пл}}$ кристаллической фазы), но и по характеру влияния на эту способность изменения структурных параметров. Известно, что при растяжении кристаллизация НК ускоряется в значительно большей степени, чем СКИ. Соответственно резиновые смеси на основе НК обладают более высокой когезионной прочностью. Полагают, что основными причинами этого является более высокая ММ, регулярная структура макромолекулярных цепей и наличие в НК некаучуковых компонентов (белков, аминокислот, смолы в количестве ≤3%) [1].

В настоящей работе проведено сравнительное изучение диффузионных параметров СКИ и НК в широкой температурной области (30–110°).

В работе использовали СКИ марки «Карифлекс JR-305» с $M_w=2,3 \cdot 10^6$ и НК («светлый креп»), предварительно очищенные осаждением из растворов в толуоле метиловым спиртом. В качестве молекулярного зонда полимерной матрицы использовали серу в интервале 30–80°, дифенилгуанидин (ДФГ) в интервале 45–110°, предварительно очищенные двукратной перекристаллизацией из растворов в соответствующих растворителях. Скорость растворения низкомолекулярных веществ в

**Параметры диффузии и растворимости твердых низкомолекулярных
веществ в полиизопренах**

Полимер	Пенетрант	T°	E_p	E_d	H_p	$D \cdot 10^7, \text{ см}^2/\text{с}$	$c_0 \cdot 10^2, \text{ г}/\text{см}^3$
			кДж/моль				
СКИ	Сера	35	76,0	59,3	18,5	0,24	1,19
		50	70,0	34,4	41,6	0,656	1,65
		60	70,0	34,4	41,6	0,81	2,56
		80	42,4	2,5	—	2,76	3,0
НК	Сера	35	75,8	67,9	4,4	0,35	0,94
		50	38,3	26,0	16,8	0,93	1,16
		60	60,6	42,0	14,8	2,1	1,29
		80	76,6	65,9	14,0	7,3	1,29
СКИ	ДФГ	50	50,7	16,5	34,6	0,74	0,31
		70	63,3	59,7	7,4	2,0	0,39
		95	74,2	47,0	22,1	10,8	0,37
НК	ДФГ	50	39,0	10,7	23,8	0,5	0,41
		70	63,0	58,9	12,4	1,87	0,53
		95	100,0	75,4	22,1	—	0,37

Примечание. H_p — теплота растворения.