

**СООТНОШЕНИЕ ОБРАТИМОГО И НЕОБРАТИМОГО АДСОРБИОННЫХ
БЕЛКОВЫХ СЛОЕВ НА ПОВЕРХНОСТИ СЕГМЕНТИРОВАННОГО
ПОЛИЭФИРУРЕТАНА**

**Полищук А. Я., Владимиров Л. В., Иорданский А. Л., Заиков Г. Е.,
Фортунатов О. Г., Трезвова А. В., Ильяков Е. В.**

Методом ИК-фурье-спектроскопии МНПВО исследована адсорбция сывороточного альбумина человека на поверхности полиэфируретана в зависимости от содержания мягкого сегмента в полимере. Показано, что конформационный набор адсорбированных белковых макромолекул отличается от конформационного набора сухой и растворенной форм белка. Изучена кинетика десорбции обратимого слоя альбумина с поверхности полиэфируретана. Рассчитанные с использованием диффузионно-кинетической модели физико-химические параметры систем полимер – белок позволяют оценить тромборезистентные свойства исследованных материалов.

Изучение адсорбции белков на нефизиологической поверхности привлекает внимание исследователей в связи с проблемой целенаправленного поиска тромборезистентных синтетических материалов. Известно, что адсорбция плазменных белков – первичный акт тромбообразования на полимерной поверхности, находящейся в контакте с кровью [1]. Однако связь между адсорбционным и последующими процессами, по-прежнему, остается неясной. Трудно ответить, например, на вопрос, почему взаимодействие белков с поверхностью естественного сосуда не сопровождается адгезией и морфологическими изменениями тромбоцитов, тогда как подобные эффекты наблюдаются в присутствии нефизиологической поверхности полимера.

Нам представляется наиболее убедительной версия, согласно которой активация тромбоцитов на протеинированной поверхности стимулируется конформационными изменениями и денатурацией части белка, адсорбированного на поверхности [2, 3]. Причем можно считать, что чем большая доля конформационно неизмененного белка, тем лучшими тромборезистентными свойствами будет обладать данный полимерный материал. Поэтому весьма важное значение приобретает информация об изменении состава и структуры белкового слоя в процессе его накопления на полимерной поверхности.

Ранее было показано [2–5], что механизм адсорбции представляет собой сложный многостадийный процесс, включающий диффузию белковых глобул к полимерной поверхности и последующие стадии формирования конформационно измененного и нативного белковых слоев. Для установления корреляции между кинетическими параметрами адсорбции и тромборезистентными свойствами полимера целесообразно исследовать материалы, хорошо зарекомендовавшие себя в медицинской практике. К таким материалам, широко используемым при изготовлении аппаратов типа «искусственное сердце», относятся сегментированные полиэфируретаны [6].

Основная цель настоящей работы – разработка надежного метода регистрации белка, адсорбированного на поверхности сегментированного полиэфируретана, позволяющего определять соотношение обратимого и необратимого белковых слоев в любой момент времени.

Для регистрации поверхностной концентрации адсорбированного белка часто применяют метод ИК-спектроскопии МНПВО. Однако предварительное исследование спектров МНПВО показало, что в случае рассматриваемых систем наиболее характеристические и интенсивные в спектре белка полосы Амид-I и Амид-II замаскированы поглощением полиуретановой матрицы. Устранить эту трудность оказалось возможным благодаря использованию МНПВО в сочетании с техникой разностной ИК-фурье-спектроскопии (ИК-ФС), позволяющей в результате цифрового вычитания спектра полимерной подложки надежно выделить значительно менее интенсивный спектр адсорбированного белка. Ранее методом ИК-ФС-МНПВО были исследованы спектры белков, адсорбированных на поверхности кварца [7], герmania и ПВХ [8, 9].

В настоящей работе исследовали образцы полиэфируретанов, синтезированные на основе сополимера полифурита с оксипропиленом, дифенилметандиизоцианата и этилендиамина, которые содержали 27 (образец А) и 44% (образец Б) жестких уретанмочевинных сегментов. Физико-химические свойства и поверхностная струк-

Физико-химические свойства и поверхностная структура образцов сегментированного полиэфируретана

Образец	σ_p , МПа	ε_p , %	E , МПа	$\frac{D_{1110}}{D_{770}}$	$\frac{D_{1640}}{D_{770}}$
А	43	700	11	8,6	1,6
Б	60	500	45	5,6	2,6

тура образцов представлены в таблице. Поверхностную структуру образцов оценивали с помощью метода ИК-МНПВО по величине отношения оптических плотностей полосы поглощения 1110 см^{-1} , характеризующей относительную концентрацию эфирных групп мягкого сегмента на поверхности, и полосы 1640 см^{-1} , характеризующей относительную концентрацию мочевинных групп жесткого сегмента, к оптической

O

||

плотности внутреннего стандарта – полосы 770 см^{-1} , относящейся к группе $-\text{C}-\text{O}-$.

В работе использовали сывороточный альбумин человека фирмы «Reanal» (Венгрия). Содержание белка в пересчете на сухое вещество 95%.

ИК-спектры чистых и протеинированных образцов полиэфиуретана (СПУ), сухого и растворенного белка (буфер – Тираад-3, pH 7,40) регистрировали на ИК-фурье-спектрометре FTS-15C, DIGILAB при разрешении 2 и 4 см^{-1} . Удовлетворительное соотношение сигнал : шум достигалось большим числом сканирований. Для измерения спектров МНПВО использовали приставку с двумя параллельными зеркалами и кристаллы из KRS-5 с углами 45 и 60° . С целью устранения спектральных искажений спектры МНПВО получали при углах падения излучения $\theta \geq 60^\circ$, значительно превышающих критический ($\theta_{kp} \approx 42^\circ$). Все спектры получены при комнатной температуре.

Кинетические эксперименты проводили по методике, предложенной в работах [3, 10].

Спектр ИК-ФС-МНПВО альбумина, адсорбированного из буферного раствора на поверхности СПУ, показан на рис. 1 (кривая 1) и рис. 2 (кривая 1). Этот спектр получен вычитанием спектрального вклада СПУ (рис. 1, кривая 2) из суммарного спектра системы СПУ – адсорбированный альбумин (рис. 1, кривая 3). Для сравнения на рис. 2 представлены спектры порошка альбумина на кристалле из KRS-5 (кривая 2) и альбумина, растворенного в буфере (кривая 3). Как видно из рис. 2, относительные интенсивности и форма контуров наиболее интенсивных полос спектров адсорбированной, чистой и растворенной форм белка в основном совпадают.

В то же время по сравнению со спектром порошка альбумина частоты полос амид-I и амид-II в спектре белка, адсорбированного на поверхности СПУ, сдвигаются в сторону низких частот: $1640 \rightarrow 1636$ (амид-I) и $1535 \rightarrow 1526 \text{ см}^{-1}$ (амид-II). Известно [11], что для белков, имеющих α -спиральную конформацию цепей (например, для альбумина [12]), к возрастанию низкочастотного сдвига этих полос может приводить изменение конформационной структуры от α -спирали к статистическому клубку и слоевой β -структуре. Отметим и другие возможные причины сдвига полос амид-I и амид-II – различие в показателях преломления белка (в порошке и слое адсорбированных макромолекул), а также появление дополнительной границы раздела белок – СПУ.

С другой стороны, при сравнительном анализе спектров ИК-ФС-МНПВО буферного раствора альбумина и порошка альбумина (рис. 2, кривые 3 и 2) установлен высокочастотный сдвиг полос амид-I и амид-II в спектре раствора белка, составляющий соответственно 1 и 8 см^{-1} . Аналогичная тенденция в поведении этих же полос была отмечена ранее в работе [13], где методом ИК-ФС показано, что при переходе глобулярных белков из твердого состояния в водный раствор частота амид-I сохраняется практически неизменной, а полоса амид-II претерпевает высокочастотный сдвиг $\Delta\nu = 6-8 \text{ см}^{-1}$. Этот результат объясняет тем, что влияние слабых конформационных изменений в системе на положение полосы амид-II, относящейся преимущественно к колебаниям групп NH_2 , значительно меньше воздействия, оказываемого на нее увеличением концентрации и прочности водородных связей в молекулах растворенного белка. Полоса амид-I относится в основном к валентным колебаниям групп $\text{C}=\text{O}$ и слабо реагирует на изменения вторичной структуры белковых макромолекул.

На основании вышеизложенного мы считаем, что сдвиг в низкочастотную область полосы поглощения амид-I адсорбированного альбумина обусловлен прежде всего оптическими эффектами, связанными с применением метода МНПВО. Разность в смещении полос амид-I и амид-II указывает на изменение конформационного набора адсорбированных молекул белка по сравнению с нативным лиофилизованным препаратором.

Регистрация спектра белка, адсорбированного на СПУ в различные моменты времени, позволяет получить кинетические кривые накопления и удаления макромолекул с поверхности материала и, следовательно, дать количественные характеристики адсорбционного процесса. Мы исследовали кинетические кривые десорбции альбумина (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют, во-первых, о существовании прочно адсорбированного белкового слоя, величина которого характеризуется пределом кинетической кривой десорбции; во-вторых, существует обратимо адсорбированный слой альбумина, удаляемый с поверхности при замещении окружающего белкового раствора на буферный раствор. Кроме того, различное содержание мягкого сегмента в полиэфиуретане влияет на предельные значения кинетических кривых, а также на скорость десорбции.

Количественные характеристики десорбционных кривых были рассчитаны с помощью предложенной ранее диффузионно-кинетической модели [3–5, 10], согласно которой десорбционный процесс включает в себя две последовательно-параллельные стадии – собственно десорбцию белка с поверхности и диффузионный перенос макромолекул через слой толщиной δ в чистый растворитель. Если ни одна из этих стадий не является лимитирующей (диффузионно-кинетическая область), то при врем-

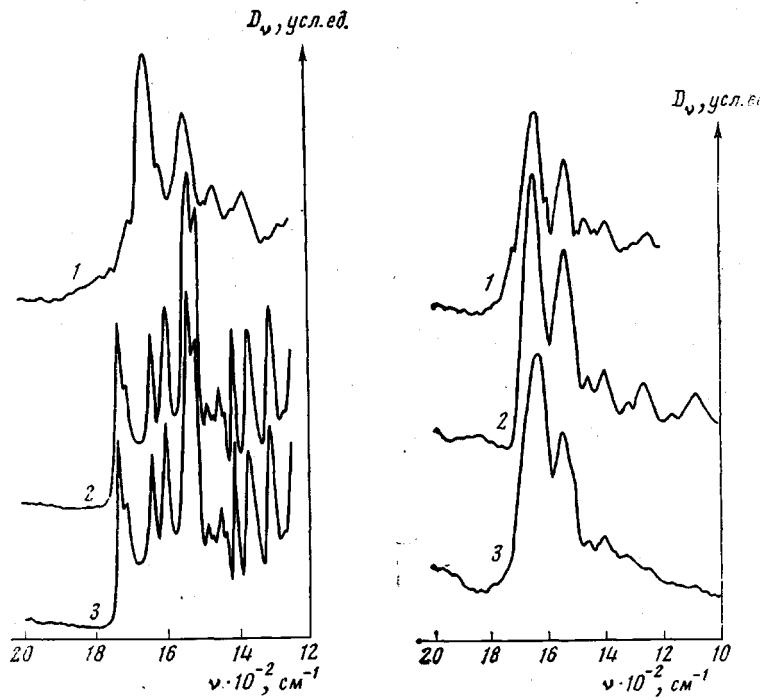


Рис. 1

Рис. 1. Спектры ИК-ФС-МНПВО системы СПУ – сывороточный альбумин: 1 – разностный спектр альбумина (разность спектров $(3-2) \cdot 25$); 2 – спектр полиэфируретановой матрицы; 3 – суммарный спектр системы СПУ – альбумин (D_v – оптическая плотность)

Рис. 2

Рис. 2. Спектры ИК-ФС-МНПВО сывороточного альбумина человека: 1 – разностный спектр альбумина, адсорбированного на поверхности СПУ; 2 – спектр альбумина, нанесенного на кристалл из KRS-5; 3 – разностный спектр альбумина, растворенного в буфере Тираде (спектр раствора – спектр растворителя)

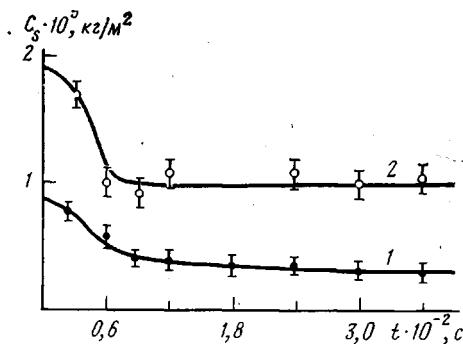


Рис. 3. Кинетические кривые десорбции альбумина с поверхности СПУ:
1 – образец А; 2 – образец Б

менах $t > \delta^2/D$ десорбционная кривая приближенно описывается уравнением

$$C_{s2} = \frac{k_{21}C_V^0 N C_{s1}^\infty}{k_{21}C_V^0 + k_{22}} \exp\left(-\frac{k_{22}k_D}{k_{22} + k_D} t\right), \quad (1)$$

где C_{s2} – концентрация обратимого слоя в момент времени t ; C_V^0 – концентрация белка в растворе перед началом десорбционного эксперимента; C_{s1}^∞ – концентрация прочно сорбированного белкового слоя; k_{21} – константа скорости адсорбции обратимого слоя; k_{22} – константа скорости десорбции обратимого слоя; N – среднее число активных центров обратимой адсорбции, приходящееся на одну молекулу, претерпевшую конформационные изменения; $k_D = 2D/\delta^2$ (D – коэффициент диффузии белка в растворе).

Из кинетических кривых, представленных на рис. 3, уравнением (1) может быть

описана кривая, соответствующая 27%-ному содержанию жесткого сегмента в молекуле полимера. Графическое решение данного уравнения в полулогарифмических координатах $(\ln \frac{C_{S2}}{C_{S1}^\infty} - t)$ в соответствии с процедурой, описанной в работе [10], позволяет найти константу скорости десорбции обратимого слоя $k_{22} = 0,32 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ и определить отношение концентраций обратимо и необратимо связанных белка в начальный момент времени $\frac{C_{S2}(0)}{C_{S1}^\infty} = 2$. Этому отношению соответствуют параметры системы альбумин – СПУ-А, приведенные ниже.

N	2	3	4	5
$k_{21}, \text{ см}^3/\text{г}\cdot\text{с}$	400	70	40	13

Наилучшее совпадение экспериментальной и расчетной кривой наблюдается при $N=3$; $k_{21}=70 \text{ см}^3/\text{г}\cdot\text{с}$, однако, 20%-ная случайная ошибка в определении C_{S2} не позволяет исключить и другие варианты констант, представленные выше.

При увеличении содержания жесткого сегмента полизифиуретана скорость десорбции возрастает, и процесс перехода обратимого белкового слоя в раствор смещается в диффузционную область. Кинетическая кривая адсорбции в этом случае хорошо описывается следующим набором параметров: $N=3$; $k_{21}=40 \text{ см}^3/\text{г}\cdot\text{с}$; $k_{22}=0,3 \text{ с}^{-1}$.

В целом проведенный анализ десорбционных кинетических кривых показывает, что при возрастании доли мягкого сегмента в химической структуре СПУ уменьшается общее количество необратимо адсорбированного белка, а реакция образования обратимого слоя сдвигается в сторону адсорбции. Причем наиболее вероятно, что число центров обратимого связывания не зависит от соотношения жестких и мягких сегментов в полимере.

Рассмотрим теперь полученные результаты применительно к проблеме поиска тромборезистентных материалов. Известно, что увеличение доли мягкого сегмента на поверхности полизифиуретанов улучшает гемосовместимые свойства изделий этого класса [14]. Одним из объяснений такого факта может служить полученный нами уменьшение количества альбумина, претерпевшего на поверхности конформационные изменения при относительном возрастании эфирного фрагмента в полимере. Найденная корреляция представляется особенно важной, поскольку альбумин – основной компонент в совокупности белков, адсорбирующихся из плазмы на поверхности СПУ [15, 16].

Кроме того, ухудшение тромборезистентных свойств полимера совпадает со смещением равновесия в реакции образования обратимого слоя в сторону десорбции. Это совпадение указывает на положительную роль, которую играет с точки зрения гемосовместимости дезактивация центров обратимой адсорбции, образующихся на молекуле, претерпевшей конформационные изменения.

Таким образом, изучение десорбции альбумина с поверхности СПУ показало, что выбранный метод ИК-ФС-МНПВО и использование диффузионно-кинетической модели позволяют установить корреляцию между адсорбционными и тромборезистентными свойствами неоднородной полизифиуретановой поверхности. Развитие предложенного направления может быть связано с изучением адсорбции других белков плазмы на амидосодержащих полимерах, механизма конкурентной адсорбции и прогнозированием гемосовместимых свойств синтетических материалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полимеры в медицине/Под ред. Платэ Н. А. М.: Мир, 1969. 240 с.
2. Иорданский А. Л., Заиков Г. Е. Высокомолек. соед. А, 1983, т. 22, № 3, с. 451.
3. Полищук А. Я. Автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. хим. наук. М.: ИХФ АН СССР, 1984, 24 с.
4. Полищук А. Я., Иорданский А. Л., Заиков Г. Е. Хим. физика, 1982, т. 1, № 9, с. 1268.
5. Jordanski A. L., Polischuk A. Ja., Zaikov G. E. J. Macromolec. Sci., Rev. Macromol. Chem. Phys., 1983, v. 23, № 1, p. 33.
6. Полимеры медицинского назначения/Под ред. Сэндо Манабу. М.: Медицина, 1981. 248 с.
7. Gendreau R. M. Appl. Spectroscopy, 1982, v. 36, № 1, p. 47.
8. Gendreau R. M., Winters S., Leininger R. I., Fink D., Hassler C. R., Jacobsen R. J. Appl. Spectroscopy, 1981, v. 35, № 3, p. 535.
9. Gendreau R. M., Jacobsen R. J. J. Biomed. Mater. Res., 1979, v. 13, № 6, p. 893.
10. Полищук А. Я., Иорданский А. Л., Заиков Г. Е. Высокомолек. соед. А, 1984, т. 26, № 5, с. 1068.
11. Koenig J. L., Tabb D. L. In: Analytical applications of FT-IR to molecular and biological systems. Ed. by During J. R., N. Y.: Proc. Nat. Advances Studied Institute, 1980, p. 241.
12. Soderquist M. E., Walton A. G. J. Colloid Int. Sci., 1980, v. 75, № 2, p. 386.
13. Coleman M. M., Painter P. C. J. Macromolec. Sci., Rev. Macromolec. Chem. Phys., 1977–78, v. 16, № 2, p. 197.

14. Lelash M. D., Lambrecht L. K., Young B. R., Cooper S. L. J. Biomed. Mater. Res., 1983, v. 17, № 1, p. 1.
15. Kochwa S., Litwak R. S., Rosenfield R. E., Leonard E. F. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1977, v. 283, № 1, p. 37.
16. Lemm M., Unger V. In: Advances in Biomaterials,/Ed. by Wiley J. N. Y., 1980, v. 1, p. 504.

Институт химической физики
АН СССР

Поступила в редакцию
3.VIII.1984

RATIO OF REVERSIBLE AND IRREVERSIBLE PROTEIN ADSORPTIONAL LAYERS ON THE SURFACE OF SEGMENTED POLYESTERURETHANE

*Polishchuk A. Ya., Vladimirov L. V., Jordanskii A. L.,
Zaikov G. Ye., Fortunatov O. G., Trezvova A. V.,
Il'yakov Ye. V.*

Summary

The adsorption of human serum albumin on the surface of polyesterurethane has been studied as a function of content of the soft segment in the polymer by ATR Fourier IR-spectroscopy. The conformational set of adsorbed protein macromolecules is shown to differ from the conformational set of dry and soluted forms of protein. The kinetics of desorption of the reversible layer of albumin from the surface has been studied. The physico-chemical parameters of the polymer – protein systems calculated with the aid of the diffusion-kinetic model permit to evaluate the thrombo-resistant properties of materials under study.

УДК 541(64+183.2):539.199

ОРИЕНТАЦИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ НА ПОВЕРХНОСТИ РАЗДЕЛА ПОЛИМЕРА С НАПОЛНИТЕЛЯМИ

*Саркисян В. А., Асратян М. Г., Мхитарян А. А., Карапетян К. Х.,
Дадиванян А. Е.*

Предложен метод определения фактора ориентационной упорядоченности и толщины ориентированного слоя на поверхности раздела полимера с другой фазой по исследованию радиальной зависимости двойного лучепреломления, возникающего на поверхности раздела полимера со сферическими или цилиндрическими частицами наполнителя.

В граничных слоях стеклообразных полимеров на плоской поверхности раздела с другими фазами возникает спонтанное двойное лучепреломление [1–6], величина которого пропорциональна оптической анизотропии макромолекулы. Толщина ориентированного слоя и степень ориентации макромолекул в нем определяются из исследования полимерных пленок различной толщины [6]. Ориентация полимера наблюдается также относительно поверхности наполнителя [7].

Не останавливаясь на механизме образования ориентированного слоя, рассмотренном в ряде работ [8–16], покажем, что толщину ориентированного слоя и степень ориентации макромолекул можно определить изучая зависимость спонтанного двойного лучепреломления (ДЛП) от расстояния между данной точкой и центром сферической или цилиндрической поверхности.

Разность двух главных показателей преломления Δn образца для лучей, поляризованных соответственно по осям ox и oy , связана с разностью средних поляризуместей макромолекулы для тех же направлений ($\bar{a}_{xx} - \bar{a}_{yy}$) соотношением [17]

$$\Delta n = \frac{2\pi N}{n} \left(\frac{n^2 + 2}{3} \right)^2 (\bar{a}_{xx} - \bar{a}_{yy}),$$

где N – число молекул в единице объема, n – средний показатель преломления образца.

Для того чтобы найти поляризумость макромолекулы в лабораторной системе координат xyz , выразим ее в системе $x_1y_1z_1$, связанной с цилиндрической или сферической поверхностью. Обозначим главные поляризумости макромолекулы с аксиально симметричным эллипсоидом поляризумости в собственной системе координат через α_1 и α_2 . Тогда для компонент тензора поляризумости в системе коор-