

## АДСОРБЦИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА НА ПОЛИЭТИЛЕНЕ

Цепалова Н. А., Брында Э., Хоуска М.,  
Калал Я., Заиков Г. Е.

При контакте чужеродных материалов, в частности полимеров, с кровью происходит взаимодействие этих материалов с компонентами крови, сопровождающееся сорбцией на них в первую очередь белков крови, что является первой стадией сложного процесса тромбообразования [1, 2]. Однако механизм процесса адсорбции на материалах с различными поверхностными свойствами еще мало изучен [3]. Данная работа посвящена количественному исследованию адсорбции белков на полимерной поверхности в модельной системе человеческий сывороточный альбумин — ПЭ.

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) производства ЧССР с гомогенностью 98% (по электрофорезу) использовали без дальнейшей очистки. ПЭ низкой плотности (ПЭНП) (плотность 0,919 г/см<sup>3</sup>) не имел на поверхности окисленных групп и загрязнений, обнаруживаемых с помощью метода многократного нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО) в ИК-области и электронной спектроскопии для химического анализа. Гладкие пленки ПЭ толщиной 60 мкм были промыты выдергиванием в толуоле, ацетоне и воде.

Адсорбцию проводили в статических и динамических условиях в специальных ячейках, позволяющих избежать тройного контакта белковый раствор — воздух — полимер.

Адсорбция в статических условиях. Ячейку, в которую помещали две пленки ПЭ, промывали водой, затем заполняли буфером и после терmostатирования буфер замещали на раствор белка. Объем ячейки 8,2 см<sup>3</sup>. Отношение поверхности к объему 4,9 см<sup>-1</sup>. После определенного времени раствора белка замещали буфером, ячейку промывали буфером до тех пор, пока на полимерной пленке не достигалась постоянная концентрация адсорбированного белка.

Адсорбция в динамических условиях. Раствор белка определенной концентрации прокачивали через адсорбционные ячейки со скоростью 6–115 мл/мин. При проведении адсорбции при низких концентрациях (ниже 50·10<sup>-6</sup> г) в ячейке поддерживали постоянную концентрацию белка за счет прокачивания каждый раз свежего раствора белка определенной концентрации.

Величину адсорбции измеряли методом МНПВО в ИК-области на спектрофотометре фирмы «Perkin — Elmer-577» с двулучевой отражательной приставкой модели 12. Приставка имела 50 отражений. Использовали призму из KRS. Ранее нами была описана методика определения количества адсорбированного белка по спектрам МНПВО [4]. В настоящей работе мы улучшили методику калибровки. Калибровку проводили с известным количеством белка на поверхности ПЭ. Для ЧСА калибровку проводили также независимо с ЧСА, меченным флюoresцентной меткой по методике [5]. Для исключения ошибки от качества прижатия пленки с адсорбированным белком к призме брали отношение оптических плотностей в области поглощения белка при  $\lambda=1655$  см<sup>-1</sup> к поглощению ПЭ при  $\lambda=1380$  см<sup>-1</sup> ( $D=D_{1655}/D_{1380}$ ). При калибровке отношение  $D$  к  $C_s$  для ЧСА оказалось равным 1,30. Для определения экспериментального значения адсорбированного белка на поверхности определяли отношение поглощения при  $D=1655$  см<sup>-1</sup> к  $D=1380$  см<sup>-1</sup> и делили на коэффициент калибровки 1,30 для ЧСА.

В настоящей работе рассматривали необратимую адсорбцию альбумина на ПЭ. Под необратимой адсорбцией мы понимаем то количество белка, которое не может десорбироваться в чистый буфер, из которого проводилась адсорбция. Этот прочный белковый слой не удаляется также при интенсивном промывании водой, его можно удалить только детергентом. Наличие необратимого белкового слоя на поверхности ПЭ подтверждалось нами с помощью адсорбции ЧСА, меченного I<sup>131</sup>.

На рис. 1 приведена зависимость количества необратимого адсорбированного ЧСА на ПЭ от концентрации ЧСА в растворе в статических и динамических условиях. Кривая 1 показывает, что величина<sup>1</sup> необратимой

<sup>1</sup> Это значение соответствует значению величины адсорбции, полученной другими авторами [6, 7], хотя не установлено, что эти величины представляют непосредственно необратимую компоненту адсорбции.

адсорбции в статических условиях достигает  $0,15 \pm 0,05$  мкг/см<sup>2</sup> из раствора концентрации  $(10000-200) \cdot 10^{-6}$  г и уменьшается при концентрации ниже  $200 \cdot 10^{-6}$  г. Абсолютная ошибка составляет  $\pm 0,05$  мкг/см<sup>2</sup>. Кривая 2 соответствует адсорбции в динамических условиях при низких скоростях потока 6 мл/мин. Кривые 1 и 2 получены при проведении адсорбции в теч-

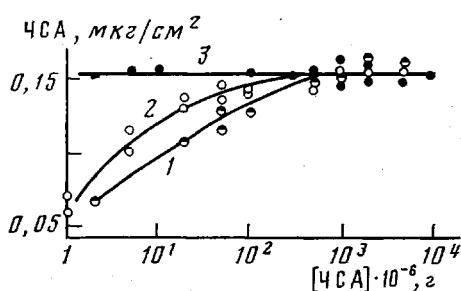


Рис. 1

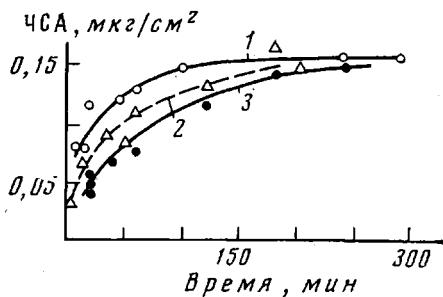


Рис. 2

Рис. 1. Необратимая адсорбция ЧСА на ПЭ в статических (1) и динамических (2) условиях (6 мл/мин, 1 ч), а также в условиях насыщения (3) в зависимости от концентрации ЧСА в растворе (1/150 м. фосфатный буфер; pH 7,4; 37°)

Рис. 2. Необратимая адсорбция ЧСА на ПЭ при скоростях потока 6 (1, 3) и 115 мл/мин (2) и концентрациях ЧСА 10 (1) и  $2 \cdot 10^{-6}$  г (2, 3) в зависимости от времени (1/150 м. фосфатный буфер; pH 7,4; 37°)

чение 1 ч. Но если при низких концентрациях ( $10 \cdot 10^{-6}$  г) адсорбцию проводили в течение длительного времени, предельная величина адсорбции приближалась к своему постоянному значению 0,15 мкг/см<sup>2</sup> независимо от концентрации белка в растворе (кривая 3). Отсюда видно, что полученная зависимость величины адсорбции от концентрации белка в растворе (кривые 1, 2) не является отражением процесса равновесия между адсорбированным белком и белком в растворе, а отражает только диффузионный эффект альбумина к адсорбционным местам, так как при увеличении времени адсорбции необратимая адсорбция достигает своей предельной величины независимо от концентрации ЧСА в растворе. Таким образом, предельная величина адсорбции ЧСА на ПЭ определяется только эффективным числом активных центров на поверхности полимера независимо от концентрации белка в растворе.

Влияние скорости потока на кинетику адсорбции проявляется при низких концентрациях белка (рис. 2). Так, при концентрации белка в растворе  $2 \cdot 10^{-6}$  г (кривые 2 и 3) видно небольшое влияние скорости потока, которое проявляется только до определенной скорости (80 мл/мин); дальнейшее же увеличение скорости не оказывает влияния на кинетику адсорбции. С другой стороны, при более высокой концентрации ( $10 \cdot 10^{-6}$  г) и скорости потока 6 мл/мин (кривая 1) быстрее достигается предельная величина адсорбции. Все эти эффекты, однако, не оказывают влияния на предельную величину адсорбции, а влияют только на время достижения этой величины. Следовательно, адсорбция, как и в предыдущем случае (рис. 1), определяется, по-видимому, только числом активных центров на поверхности полимера.

С увеличением температуры достижение предельной величины адсорбции ( $\sim 0,15$  мкг/см<sup>2</sup>) происходит значительно быстрее (рис. 3). Однако эта величина, т. е. предельная величина адсорбции, не зависит от температуры. Так, при 4, 12, 37 и 50° величина необратимой адсорбции составляла 0,14; 0,15; 0,15 и 0,16 мкг/см<sup>2</sup> из 1/15 м. фосфатного буфера, при pH 7,4 и концентрации ЧСА в растворе  $1000 \cdot 10^{-6}$  г при времени адсорб-

ции 1 ч. Увеличение ионной силы при добавлении NaCl также не ведет к увеличению предельной величины адсорбции. Так, при ионной силе раствора 0,007; 0,2; 1,0 и 4,0 величина необратимой адсорбции была 0,15; 0,16; 0,14 и 0,15 мкг/см<sup>2</sup> в 1/15 м. фосфатном буфере при pH 7,4 (37°), концентрации ЧСА в растворе  $1000 \cdot 10^{-6}$  г и времени адсорбции 1 ч. Влияние pH на предельную величину необратимой адсорбции незначительно вблизи физиологического значения pH (рис. 4); наблюдается только не-

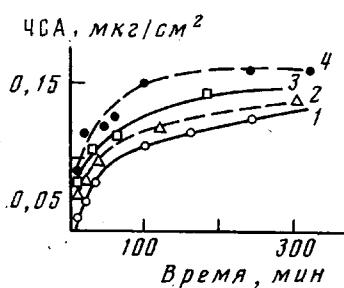


Рис. 3

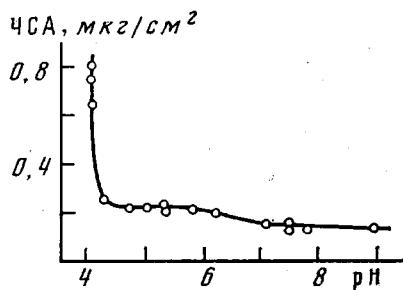


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость величины необратимо адсорбированного ЧСА на ПЭ при температурах 4 (1), 12 (2), 21 (3) и 37° (4) (1/150 м. фосфатный буфер; pH 7,4; динамические условия 6 мл/мин; [ЧСА] =  $10 \cdot 10^{-6}$  г)

Рис. 4. Зависимость количества необратимо адсорбированного ЧСА на ПЭ от pH раствора. Время адсорбции 1 ч; Britton-Robinson buffer; ионная сила 0,015; концентрация [ЧСА] =  $1000 \cdot 10^{-6}$  г; 37°; статические условия

большой подъем от pH 7 до 5. В области, близкой к изоэлектрической точке (pH 4,9), еще нет существенных изменений. При pH 4,1 наблюдается резкий подъем. Это, вероятно, связано с реакцией изомеризации ЧСА и переходом в новую форму, так называемую Fast Isomeric Form F. Большое количество ЧСА, адсорбированного при pH 4, десорбируется обратно в буфер при повышении pH (рис. 5), но даже при продолжительной десорбции величина адсорбции остается выше, чем типичная предельная величина адсорбции для нормальной изомерной формы N. Так как величина, которую мы здесь получаем (рис. 5), находится еще в пределах мономерного слоя [8], можно предположить, что адсорбция при низких pH приводит к более высокой степени заполнения поверхности полимера. В ацетатном буфере величина адсорбции не изменяется значительно до pH 3,5, но, как показано на рис. 6, ЧСА, адсорбированный при pH 4, очень чувствителен к ионной силе буфера в противоположность ЧСА, адсорбированному при более высоких pH. Это, по-видимому, отражает чувствительность N-F-переходов к типу ионов.

Таким образом, в физиологической области pH предельная величина необратимой адсорбции не зависит от ионной силы и температуры и, что особенно важно, не зависит от концентрации ЧСА в растворе, т. е. нет равновесной изотермы адсорбции.

Ранее в сильно разбавленных белковых растворах наблюдали концентрационную зависимость адсорбции на гидрофобных полимерах и интерпретировали ее как равновесную изотерму адсорбции. Однако это, по-видимому, дискуссионный вопрос, так как равновесная изотерма адсорбции может быть получена только в том случае, когда концентрация адсорбированного белка определяется в условиях истинного равновесия, т. е. когда адсорбированные молекулы белка обмениваются с молекулами белка из раствора. Методом меченых атомов и другими методами нами было показано, что такого обмена в данных системах не наблюдается.

С другой стороны, в сильно разбавленных ( $\sim (0,2-1) \cdot 10^{-3}\%$ ) растворах, как это видно из рис. 1, 2 и 4, мы наблюдали зависимость как от концентрации, так и от времени. Эта зависимость исчезала в более концентрированных растворах.

Все эти данные не противоречат друг другу, и их можно объяснить следующим образом: уменьшение величины необратимо адсорбированного белка, наблюдаемое различными авторами, по-видимому, происходит вследствие кинетического эффекта, т. е. в результате слабой диффузии к адсорбционным центрам при низких концентрациях. Однако их нельзя назвать равновесными изотермами адсорбции.

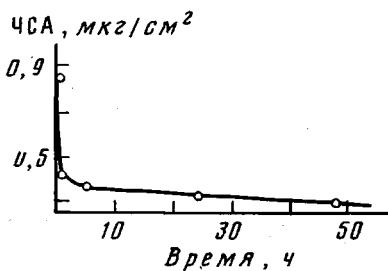


Рис. 5

Рис. 5. Десорбция ЧСА, адсорбированного при pH 4 в 1/150 м., фосфатный буфер (pH 7,4; 25°; статические условия)

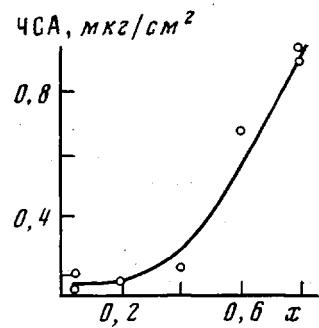


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость количества ЧСА, необратимо адсорбированного на ПЭ при pH 4 в течение 1 ч, от ионной силы буфера  $x$  при концентрации  $[ЧСА] = 1000 \cdot 10^{-6}$  г (37°)

В этих исследованиях проблема состоит в том, что трудно найти метод, который подходил бы для оценки истинного равновесия и одновременно применялся бы для образцов с маленькой поверхностью адсорбции.

При трактовке экспериментальных данных в такого рода исследованиях всегда следует учитывать объем раствора в рабочей ячейке и площадь полимерной пленки. Так, при очень низких концентрациях белка в растворе и небольшом объеме раствора по отношению к величине поверхности адсорбция на поверхность может привести к снижению объемной концентрации белка и в предельном случае к полному исчерпанию белка из раствора. Все эти эффекты могут дать мнимую изотерму адсорбции. Из сказанного следует, что, по-видимому, количество необратимо адсорбированного белка определяется только величиной активной поверхности, а не равновесием в окружающем растворе. Отсутствие зависимости необратимо адсорбированного белкового слоя от ионной силы раствора и слабая зависимость от температуры свидетельствуют о достаточно сильном взаимодействии между адсорбированным белком и гидрофобной поверхностью полимера.

Из величины необратимой адсорбции нетрудно подсчитать количество адсорбционных слоев. Из расчета следует, что адсорбция монослояна и неоднородна по величине (электронно-микроскопические данные). Последний эффект может быть обусловлен как физической, так и химической неоднородностью полимера.

Итак, при образовании необратимого белкового слоя на поверхности гидрофобных полимеров наблюдаемая адсорбция монослояна и неоднородна по величине. Не наблюдается также равновесная изотерма адсорбции, т. е. в отсутствие кинетических ограничений молекулы белка переходят на поверхность полимера с образованием предельного адсорбционного слоя, если их количество в растворе достаточно.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Brash J. L., Lyman D. J. J. Biomed. Mater. Res., 1969, v. 3, № 2, p. 175.
2. Vroman L., Leonard E. F. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1977, v. 283, № 1, p. 15.
3. Севостьянов В. И., Волков А. В., Родин О. Н., Балуев Л. И., Платэ Н. А. Докл. АН СССР, 1981, т. 260, № 2, с. 383.
4. Mouseev Ю. В., Боровкова Н. К., Цепалова Н. А. Высокомолек. соед. Б, 1977, т. 19, № 1, с. 3.
5. Brynda E., Drobniak J., Vacik J., Kalal J. J. Biomed. Mater. Res., 1978, v. 12, № 1, p. 55.
6. Brash J. L., Davidson V. J. Trombosis Res., 1976, v. 9, № 2, p. 249.
7. Brash J. L., Uniyal S. J. Polymer Sci. Polymer Symp., 1977, № 66, p. 377.
8. Oncley J. L., Scatchard G., Broun A. J. Phys. Colloid. Chem., 1947, v. 51, № 1, p. 134.

Институт химической физики  
АН СССР

Поступила в редакцию  
13.IX.1983

УДК 541.64 : 542.943

## ПРОЦЕСС ОКИСЛЕНИЯ ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА

Варбанская Р. А.

В предыдущих сообщениях [1, 2] было показано, что ингибиторы снижают скорость дегидрохлорирования при окислении ПВХ. Это доказывает участие радикалов в процессе образования HCl. Представляло интерес количественно охарактеризовать радикальные процессы при окислении ПВХ для выяснения механизма термоокислительной деструкции полимера.

Исследовали окисление ПВХ при давлении 20 кПа O<sub>2</sub> и 200° в замкнутой системе (ампулах) и в циркуляционной установке, а также ингибиранное окисление в присутствии ингибитора In фенольного типа – пентаэритритового эфира 4-окси, 3,5-ди-тет-бутилфенилпропионовой кислоты (фенозана 22). Хлористый водород анализировали методом pH-метрии, углеводороды – с помощью газожидкостной хроматографии на ЦВЕТ-134 с ионизационно-пламенным детектором и колонкой длиной 1 м, заполненной полисорбом.

Воду определяли на катарометре при температуре колонки 135°. Кинетику поглощения кислорода исследовали на манометрической установке, причем выделяющийся хлористый водород и другие продукты реакции поглощались стеаратом бария, силикагелем и щелочью.

Исследовали блочный полимер М-64 без особой очистки. Методика введения ингибитора в полимер описана ранее [2].

Кинетика поглощения O<sub>2</sub> полимером представлена на рис. 1. Графическим дифференцированием кривой поглощения кислорода получена скорость процесса окисления ПВХ (рис. 2). Видно, что реакция протекает с самоускорением: скорость поглощения O<sub>2</sub> возрастает в ходе окисления, достигая максимальной величины, и затем постепенно снижается. Для того чтобы разобраться в механизме радикальных процессов при термоокислительной деструкции, мы изучили окисление ПВХ в присутствии In. Выход продуктов окисления при 200°C представлен на рис. 1 и 3. Как следует из рисунков, введение ингибитора снижает выход продуктов окисления HCl, бензола и этилена. Торможение образования продуктов окисления доказывает радикальную природу процесса.

При ингибиранном окислении образуется также изобутилен. Он не является продуктом термоокислительной деструкции ПВХ, а образуется в результате превращения феноксильных радикалов ингибитора, содер-