

УДК 541.64:539.2

ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА НА СТРУКТУРУ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ

Синани В. А., Валуев Л. И., Чупов В. В., Платэ Н. А.

Изучено влияние сывороточного альбумина и его ненасыщенных производных на структуру полиакриламидных гидрогелей. Показано, что введение в исходную смесь мономеров ненасыщенных производных сывороточного альбумина приводит к резкому возрастанию степени набухания гелей, снижению модуля упругости набухших гидрогелей и увеличению ММ дешей между узлами сетки. В качестве основной причины наблюдаемых эффектов обсуждается образование блок-сополимеров с химически связанными между собой, но плохо совместимыми блоками сывороточного альбумина и частично спицового полиакриламида.

В последнее время биологически активные гидрогели на основе синтетических полимеров широко применяют в качестве катализаторов различных биохимических процессов, биоспецифических сорбентов, модификаторов поверхности полимерных материалов [1–3]. Основная задача, решаемая при создании таких систем, заключается в разработке мягких способов ковалентного связывания биологически активных соединений, в основном белковой природы, с матрицей полимерного гидрогеля, при которых функциональная активность белков в процессе их иммобилизации не претерпевает существенных изменений. С точки зрения решения этой задачи наиболее перспективен разработанный в середине 70-х годов метод синтеза биологически активных гидрогелей путем предварительной активации белков введением в их состав двойных связей с последующей сополимеризацией ненасыщенного производного белка с гидрофильным мономером и спиивающим агентом [4–6]. Функциональная активность иммобилизованных таким образом белков в большинстве случаев находится на уровне их активности в нативном состоянии, а устойчивость иммобилизованных белков к действию денатурирующих агентов существенно повышается вследствие многоточечного связывания белка с полимерной матрицей (обычно ненасыщенные производные белка содержат несколько двойных связей, способных участвовать в реакции сополимеризации) [6–8]. Поскольку ковалентная иммобилизация белков в этом случае происходит одновременно с процессом формирования полимерной матрицы, неизменность функциональной активности белков связывают с не совсем понятной «комплémentарностью» между макромолекулой белка и ее полимерным микроокружением [9].

Естественно, что ответ на вопрос о природе такой «комплémentарности», имеющий принципиальное значение с точки зрения выяснения механизма функционирования биологически активных гидрогелей, может быть получен только при детальном изучении структурных особенностей гидрогелей, полученных в присутствии ненасыщенных производных белков. Последнее и является целью настоящей работы. В качестве исходного белка в работе использовали сывороточный альбумин человека (СА), в качестве гидрофильного мономера — акриламид, а в качестве спиивающего агента — N,N'-метиленбисакриламид (БИС).

В работе использовали СА с $M=69\,000$, акриламид и БИС фирмы «Reanal» (Венгрия). Ненасыщенное производное СА (НПСА) получили ацилированием СА хлорангидридом акриловой кислоты по методике [10]. Низкомолекулярные продукты отделяли от НПСА гель-фильтрацией на колонке (2,5×36 см) с Сефадексом G-25.

Среднее содержание двойных связей в молекуле НПСА, определенное титрованием оставшихся после ацилирования аминогрупп белка триинитробензольсульфокислотой, составляло 4–5. Гидрогели синтезировали в воде или 0,05 м. фосфатном буфере (рН 7,4), используя в качестве инициатора систему персульфат аммония – N,N,N',N'-тетраметиэтилендиамин. Все используемые вещества очищали по общепринятым методикам.

Степень набухания гидрогелей рассчитывали по формуле $S_r = (M_1/M_2) - 1$, где M_1 и M_2 – массы равновесно набухшего и высущенного гидрогелей соответственно. Коэффициент диффузии веществ в объеме гидрогеля измеряли по методике [11] при 25°. Концентрацию диффундирующего вещества определяли с помощью лазерного рефрактометра ЛР-1 (СССР).

Ультрацентрифугирование проводили в 0,03 м. NaCl на ультрацентрифуге «Весктан-Е» (США). Электронно-микроскопические исследования проводили на сканирующем электронном микроскопе фирмы «Jeol» (Япония); лиофильно высушенные образцы препаратировали по стандартной методике [12].

Механические свойства гидрогелей изучали на приборе «Instron» (ФРГ). Из зависимости напряжения σ от $(\lambda - \lambda^{-2})$ (λ – отношение деформаций) по формуле $\sigma = G(\lambda - \lambda^{-2})$ определяли модуль упругости G и затем, согласно работе [13], рассчитывали ММ между узлами сетки геля (M_c).

СА, меченный флуоресцентной меткой, получали по методике [14] реакцией СА с флуоресценцизиотиоцианатом («Sigma», США) или родамин-В-изотиоцианатом («Serva», ФРГ) в бикарбонатном буфере (рН 8,0) при мольном отношении СА : крацитель = 1 : 2. Меченный белок отделяли от непрореагированного красителя гель-фильтрации на Сефадексе G-50. Спектры флуоресценции регистрировали на приборе MPF-4 «Nitachi» (Япония). Длина волны возбуждения для обоих красителей составляла 480 нм, длина волн эмиссии для флуоресцина и родамина составляла 518 и 578 нм соответственно.

Молекулярную массу полиакриламида (ПАА) определяли методом светорассеяния на приборе «Chromatix KMX-6» (США) в 0,05 м. NaCl.

Содержание иммобилизованного белка в гидрогеле определяли из результатов аминокислотного анализа гидролизата, полученного гидролизом гидрогелей с иммобилизованным белком 6 м. HCl при 110° в течение 24 ч. Гидролизат анализировали на приборе «Liquimat» (ФРГ).

Гидролиз иммобилизованного СА в гидрогеле проводили при 36° в бикарбонатном буфере (рН 7,4) под действием трипсина.

Одним из основных параметров, характеризующих структуру гидрогелей, является равновесная степень набухания гидрогелей в воде. На рис. 1 приведена типичная зависимость степени набухания ПАА-гидрогелей от состава исходной полимеризующейся смеси, хорошо совпадающая с литературными данными [15]. Как и следовало ожидать из уравнения Флори – Ренера, связывающего равновесное набухание с концентрацией узлов сетки, с увеличением концентрации сшивавшего агента (увеличением концентрации узлов сетки) равновесная степень набухания уменьшается. К аналогичному эффекту приводит и увеличение суммарной концентрации мономеров (акриламид + БИС). Последнее в значительной степени связано с тем, что при низкой суммарной концентра-

Таблица 1

Результаты механических испытаний набухших гидрогелей

Состав исходного водного раствора, вес. %				$G \cdot 10^{-3}, \text{Н/м}^2$ (±17%)	$M_c \cdot 10^{-3},$ г/моль (±20%)
акриламид	БИС	НПСА	сумма мономеров		
9,5	0,5	0	10	13	19
9,0	1,0	0	10	9	26
8,0	2,0	0	10	6	44
28,5	1,5	0	30	230	2,9
27,0	3,0	0	30	430	1,7
24,0	6,0	0	30	540	1,4
7,13	0,5	2,37	10	13	16
6,2	0,5	3,3	10	12	14
4,75	0,5	4,75	10	4,6	31
2,37	0,5	7,13	10	1,8	67
6,75	1,0	2,25	10	8	26
5,85	1,0	3,15	10	5	32
4,5	1,0	4,5	10	4	38
4,0	2,0	4,0	10	5	40
2,0	2,0	6,0	10	1,8	93

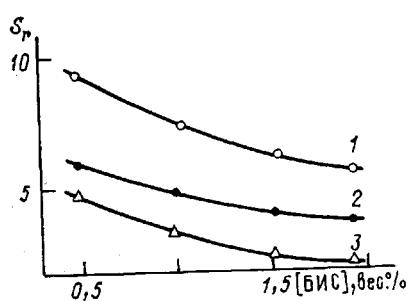


Рис. 1

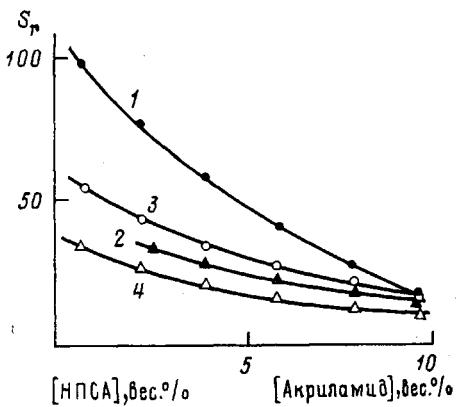


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость равновесной степени набухания S_r (г H_2O /г сополимера) от концентрации сшивющего агента. Состав исходного водного раствора: [акриламид]+[БИС]=10 (1), [акриламид]+[БИС]=20 (2), [акриламид]+[БИС]=30 вес.% (3)

Рис. 2. Зависимость от состава исходной смеси степени набухания S_r гидрогелей, полученных полимеризацией водного раствора следующего состава: [НПСА]+[акриламид]=10, [БИС]=0,5 (1); [СА]+[акриламид]=10, [БИС]=0,5 (2); [НПСА]+[акриламид]=10, [БИС]=1,0 (3), [НПСА]+[акриламид]=10, [БИС]=2,0 вес.% (4)

ции мономеров часть сшивющего агента используется не на сшивание макромолекул между собой, а на внутримолекулярное сшивание. Об этом свидетельствует уменьшение модуля упругости набухшего гидрогеля и возрастание M_c с увеличением концентрации сшивющего агента при [акриламид]+[БИС]=10 вес.% (табл. 1). Аналогичный вывод был сделан в работе [16] на основании изучения проницаемости ПАА-гидрогелей в области концентраций [акриламид]+[БИС]=4–16 вес.%. При более полном расходовании БИС на межмолекулярное сшивание наблюдается обратный эффект при концентрации [акриламид]+[БИС]=30 вес.%.

В соответствии с этими результатами введение в полимеризующуюся систему нативного, неацилированного СА, т. е. замена части акриламида на неполимеризующееся соединение при сохранении концентрации сшивющего агента приводит к повышению равновесной степени набухания гидрогелей (рис. 2, кривая 2). Исходя из этой зависимости, можно было ожидать, что при введении в полимеризующуюся систему НПСА степень набухания получаемых гидрогелей будет иметь промежуточное значение между степенью набухания чистых ПАА-гидрогелей и гидрогелей, полученных в присутствии нативного СА. Действительно, замена части акриламида на равное по массе количество НПСА или нативного СА для исходной системы практически не приводит к какому-либо эффекту, поскольку концентрация двойных связей в ней определяется в основном концентрацией акриламида и БИС (молекулярная масса НПСА на три порядка выше ММ акриламида). Учитывая то обстоятельство, что используемое НПСА содержит в макромолекуле 4–5 двойных связей, т. е. может одновременно выполнять и роль сшивющего агента, можно ожидать даже некоторого снижения степени набухания по сравнению с S_r гидрогелей, синтезированных в присутствии того же количества нативного СА.

Наблюдаемый характер изменения степени набухания при использовании НПСА существенно отличается от ожидаемого: с увеличением концентрации НПСА степень набухания гидрогелей сильно увеличивается, достигая значений до 100 г воды на 1 г сухого вещества (рис. 2, кривые 1, 3, 4). Соответствующим образом изменяются и другие равновесноупругие свойства гидрогелей; при высоких концентрациях НПСА молекулярная масса цепей между узлами сетки увеличивается, а модуль упругости уменьшается (табл. 1).

Из электронно-микроскопических исследований лиофилизованных

образцов следует, что альбуминсодержащие гидрогели по сравнению с ПАА-гидрогелями имеют более однородные по размеру макропоры, сами макропоры гораздо четче оформлены, а разделяющие их стенки тоньше. Так, если исходный ПАА-гидрогель характеризуется средним размером макропор 4,6 мкм при среднеквадратичном отклонении 2,9 мкм, то аналогичные гидрогели, содержащие 0,3 вес.% химически связанного НПСА, имеют средний размер макропор 5,8 мкм при среднеквадратичном отклонении 1,0 мкм.

Очевидно, что определяющая роль в проявлении этих эффектов принадлежит изменению химической природы полимерной матрицы за счет ковалентного связывания макромолекул белка с ПАА.

Поскольку в нашем случае макромолекула НПСА содержит более одной двойной связи, то в процессе сополимеризации с акриламидом она должна участвовать в реакции сшивания, что также может вносить некоторый вклад в изменение структуры гидрогеля при замене акриламида на равное по массе количество НПСА. С целью изучения возможности протекания реакции сшивания с участием НПСА была изучена набухаемость гидрогелей, синтезированных в присутствии НПСА и подвергнутых обработке трипсином. Этот протеолитический фермент гидролизует полипептидную цепь связанного альбумина до низкомолекулярных осколков, которые легко удаляются из гидрогеля промыванием. В результате такой процедуры происходит резкое увеличение степени набухания гидрогелей, которое не компенсируется уменьшением количества сухого вещества в единице объема гидрогеля при удалении из него альбумина (табл. 2). Последнее однозначно указывает на участие НПСА в сшивании поликарбамидных цепей.

Как уже указывалось, данный метод синтеза биологически активных гидрогелей обеспечивает неизменность функциональной активности белков в процессе их иммобилизации, в основном при низком (порядка десятых долей процента) содержании белка в гидрогеле. Последнее автоматически подразумевает доступность макромолекул белка для соответствующих субстратов, т. е. проницаемость гидрогелей для этих субстратов, а также отсутствие псевдоденатурирующего действия цепей синтетического полимера, которое может заключаться в том, что макромолекулы полимера, формируясь вокруг глобулы белка, образуют своеобразный «кокон» с потенциально активным, но недоступным для субстрата белковым ядром.

Проницаемость гидрогелей оценивали путем измерения коэффициента диффузии D(+) глюкозы в объеме гидрогелей. Результаты измерений приведены в табл. 3. Видно, что, действительно, полимерная матрица не создает сколько-нибудь существенных диффузационных ограничений, а повышение набухаемости гидрогелей при введении в исходную смесь НПСА приводит к увеличению проницаемости гидрогелей.

С целью изучения возможности взаимодействия СА с ПАА проведено исследование поведения растворов ПАА, СА и их смеси при ультрацентрифугировании. Наиболее типичные седиментограммы приведены на рис. 3. Видно, что седиментация СА и ПАА из смешанного раствора происходит так же, как и из растворов индивидуальных веществ, т. е. взаимодействие макромолекул ПАА с глобулами белка в водном растворе не происходит.

Таким образом, исходя из полученных данных и учитывая, что первой стадией реакции получения гидрогелей является образование растворимых, частично внутримолекулярно спищих сополимеров гидрофильного мономера и сивающего агента [17], можно предположить, что при сополимеризации акриламида с НПСА в присутствии сивающего агента сначала образуются водорастворимые сополимеры этих мономеров, состоящие из двух не взаимодействующих между собой блоков: блока макромолекул СА и блока частично спищего сополимера акриламида с БИС. Если это так, то при дальнейшем структурировании системы макромолекулы более гидрофильного белка должны (по аналогии с микрорасслаиванием привитых или блок-сополимеров [18]) выталкиваться на поверхность макропор, стенки которых состоят из спищего ПАА. Это в свою

Таблица 2

Параметры гидрогелей до и после обработки трипсином

Состав исходного водного раствора, вес. %			Концентрация иммобилизованного СА, г/г сухого геля	Степень набухания г воды/г сухого геля	
акриламид	БИС	НПСА		до обработки	после обработки
10	0,5	0	0	10,8	11,2
9,0	0,5	1,0	0,091	14,5	18,0
8,0	0,5	2,0	0,166	18,3	45,3
7,0	0,5	3,0	0,204	22,2	55,5
6,0	0,5	4,0	0,285	28,3	67,2
5,0	0,5	5,0	0,332	39,7	100
4,0	0,5	6,0	0,384	45,3	162
3,0	0,5	7,0	0,473	50,0	189
2,0	0,5	8,0	0,547	65,0	195
1,0	0,5	9,0	0,642	80	350

Таблица 3

Коэффициенты диффузии $D (+)$ глюкозы в объеме ПАА-гидрогелей

Состав исходного водного раствора, вес. %			$S_r \pm 6\%$	$D * 10^{10}, \text{ м}^2/\text{с}$ ($\pm 5\%$)
акриламид	БИС	НПСА		
20,0	1,0	0	5,35	1,6
20,0	1,0	2,5	6,51	2,1
20,0	1,0	5,0	7,03	3,5

* Коэффициент диффузии глюкозы в воде равен $7,1 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$.

очередь должно приводить к уменьшению толщины этих стенок (образование толстых стенок препятствуют глобулы не совместимого с ПАА альбумина), т. е. увеличению степени набухания гидрогелей, а также способствовать сохранению функциональной активности макромолекул белка, фиксированных на доступной для субстрата поверхности макропор. Все это хорошо согласуется с экспериментальными результатами.

Эффекту микрорасслаивания в немалой степени благоприятствует способность макромолекул СА к ассоциации между собой. Оценку этой способности проводили методом флуоресцентной спектроскопии с использованием СА, содержащего в качестве флуоресцентной метки флуоресцеин (ФСА) или родамин-В (РСА). Зависимость интенсивности флуоресценции растворов индивидуальных белков и их смесей от концентрации меченых белков приведена на рис. 4 и 5. Видно, что при суммарной концентрации белков в растворе $\sim 0,1$ вес. % интенсивность флуоресценции смесей белков близка к соответствующей интенсивности индивидуального белка, т. е. обе метки, одна из которых является донором (флуоресцеин), а другая — акцептором (родамин-В), не взаимодействуют друг с другом. При дальнейшем увеличении концентрации белков интенсивность флуоресценции ФСА в смеси с РСА уменьшается за счет передачи энергии на акцептор, а интенсивность флуоресценции РСА соответственно увеличивается. В рамках существующих представлений это явление однозначно свидетельствует о том, что в растворе возникают ассоциаты, в которых среднее расстояние между глобулами белка ($\sim 50-80 \text{ \AA}$ [19]) значительно меньше среднего расстояния, рассчитанного в предположении равномерного распределения макромолекул СА в растворе ($\sim 500 \text{ \AA}$ для концентрации белка 0,1 вес. %).

Гипотеза о микрорасслаивании компонентов гидрогеля позволяет понять обнаруженное в работах [6, 7] уменьшение функциональной активности иммобилизованного белка при увеличении его концентрации в гид-

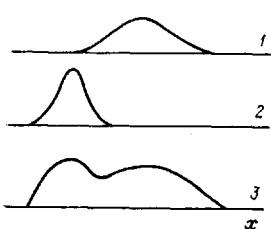


Рис. 3

Рис. 3. Седиментограммы CA (1), ПАА ($M=430\ 000$) (2) и их смеси (3). $\omega = 56\ 000 \text{ мин}^{-1}$, 0,03 м. NaCl

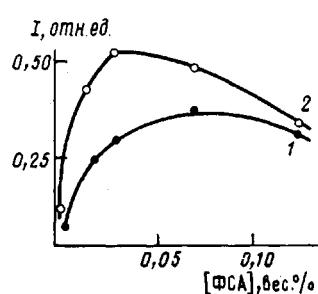


Рис. 4

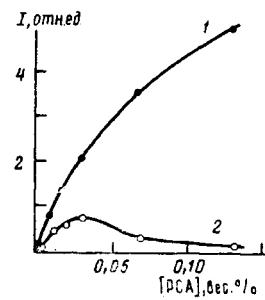


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции (1) ФСА при $\lambda=518$ нм от концентраций ФСА в индивидуальном растворе (1) и в растворе ФСА+PCA (весовое соотношение ФСА : PCA=1 : 10) (2) pH 7,4; 0,05 м. фосфатный буфер

Рис. 5. Зависимость интенсивности флуоресценции PCA при $\lambda=578$ нм от концентрации PCA в индивидуальном растворе (1), в растворе PCA+ФСА (весовое соотношение PCA : ФСА=10 : 1) (2) pH 7,4; 0,05 м. фосфатный буфер

рогеле; возникающие при этом белок-белковые взаимодействия приводят к снижению доступности части макромолекул белка или их активных центров для молекул субстрата. Аналогичный эффект наблюдали в работе [9] при изучении адсорбционной иммобилизации ферментов на поверхности нерастворимого носителя: более плотное заполнение поверхности приводит к снижению катализической активности иммобилизованного фермента.

Таким образом, процесс получения биологически активных гидрогелей сополимеризацией гидрофильных мономеров с ненасыщенными производными белка протекает с характерным для привитой или блок-сополимеризации образованием микрогетерогенного сополимера, содержащего микрообласти, обогащенные одним из компонентов. Именно наличие плохо совместимых, но химически связанных между собой блоков ПАА и СА является причиной повышения набухаемости таких гидрогелей, а также обуславливает неизменность функциональной активности белка при его ковалентной иммобилизации и уменьшение этой активности при повышении концентрации иммобилизованного белка.

ЛИТЕРАТУРА

- Платэ Н. А., Валуев Л. И., Чупов В. В. // Высокомолек. соед. А. 1985. Т. 27. № 10. С. 2019.
- Иммобилизованные ферменты/Под ред. Березина И. В., Мартинека К. М., Антонова В. К. М., 1976. С. 152.
- Введение в прикладную энзимологию/Под ред. Березина И. В., Мартинека К. М. М., 1982. С. 75.
- Валуев Л. И., Аль-Нури М. А., Баранова Н. А., Егоров Н. С., Платэ Н. А. А. с. 545648 СССР // Б. И. 1977. № 5. С. 315.
- Jaworek D., Botsch H., Maier J. // Methods in Enzymology. Immobilized Enzymes. V. 44. N. Y., 1976. P. 195.
- Платэ Н. А., Валуев Л. И., Егоров Н. С., Аль-Нури М. А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1982. Т. 13. № 5. С. 673.
- Валуева Т. А., Маклакова И. А., Валуев Л. И., Мосолов В. В., Платэ Н. А. // Вопросы мед. химии. 1985. Т. 31. № 4. С. 34.
- Moshaev V. V., Sikshnis V. A., Torchilin V. P., Martinek K. // Biotechnol. Bioeng. 1983. V. 25. № 9. Р. 1937.
- Martinek K., Berezin I. V. // J. Solid Phase Biochem. 1977. V. 2. № 4. P. 343.
- Платэ Н. А., Валуев Л. И., Вакула А. В., Лыс Я. И., Федосеев В. М. // Прикл. биохим. и микробиол. 1982. Т. 18. № 1. С. 81.
- Brown W., Johnsen R. M. // Polymer. 1981. V. 22. № 2. Р. 185.
- Платэ Н. А., Вакула А. В., Валуев Л. И., Волков А. В. // Высокомолек. соед. Б. 1981. Т. 23. № 3. С. 190.
- Fasina A. B., Stepto R. F. T. // Makromolek. Chem. 1981. B. 182. № 2. S. 2479.

14. Методы вирусологии и молекулярной биологии/Под ред. Хайбла К., Зальцмана Н. Р. М., 1972. С. 257.
15. White M. Z., Dorion G. H. // J. Polymer Sci. 1961. V. 55. № 6. P. 731.
16. Weis N., Van Vliet T., Silberger A. // J. Polymer Sci. Polymer Phys. Ed. 1981. V. 19. № 10. P. 1505.
17. Polymer yearbook 3 // Ed. by Pethrick R. A. L., 1986. P. 244.
18. Каргин В. А., Плагэ Н. А., Шибаев В. П. // Высокомолек. соед. 1960. Т. 2. № 1. С. 166.
19. Faiklough R. H., Cantor C. R. // Methods in Enzymology. V. 19. N. Y., 1979. P. 347.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
6.V.1987

Институт нефтехимического синтеза
им. А. В. Топчиева АН СССР

SERUM ALBUMINE EFFECT ON THE STRUCTURE OF POLYACRYLAMIDE HYDROGELS

Sinani V. A., Valuev L. I., Chupov V. V., Platé N. A.

Summary

The effect of serum albumine and its unsaturated derivatives on the structure of polyacrylamide hydrogels has been studied. Introducing of unsaturated derivatives of serum albumine into the initial monomers mixture results in the sharp increase of the degree of gels swelling, decrease of the modulus of elasticity of swelled hydrogels and increase of MM of chains between crosslinks of a network. The main reason of observed effects is assumed to be a formation of block copolymers containing the chemically bound, but poorly compatible blocks of serum albumine and partially cross-linked polyacrylamide.