

УДК 541(645183.12)

© 1990 г. Р. Н. Мишаева, Н. П. Кузнецова, О. А. Писарев,  
Г. В. Самсонов

## ОСОБЕННОСТИ ИОНИЗАЦИИ КАРБОКСИМЕТИЛ-СЕФАДЕКСА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СВЯЗЫВАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА

Проведено потенциометрическое титрование микродисперсии карбоксиметил-сефадекса К-50 и исследовано изменение набухания в процессе ионизации. Обнаружен некооперативный конформационный переход в цепях спиртого декстрана, аналогичный переходу при ионизации растворимых полисахаридов. Взаимодействие гемоглобина с К-50 обусловлено структурными особенностями сефадекса.

Использование сетчатых полизелектролитов в качестве сорбентов для выделения биополимеров, а также носителей для иммобилизации белков и ферментов с целью получения новых физиологически активных систем выдвигает задачу исследования структуры полимерного носителя и характера его взаимодействия с белками.

Данная работа посвящена исследованию ионизации карбоксильных групп карбоксиметил-сефадекса (КМ-сефадекса) марки К-50, а также изучению проявления электрохимических особенностей при взаимодействии с белками на примере гемоглобина (ГБ).

КМ-сефадекс К-50 является сетчатым карбоксилированным декстраном, в котором каждое мономерное звено несет функциональную группу. Использовали микродисперсную форму КМ-сефадекса, которую получали механическим измельчением образца с последующей отмыкой и фракционированием. Применение КМ-сефадекса в тонкодисперсной форме с размером частиц  $<1$  мкм позволило провести его непосредственное потенциометрическое титрование.

Определение дифференциальных теплот взаимодействия ГБ со спирты КМ-декстраном проводили в микрокалориметре ДАК 1-1 при  $30^\circ$  [1]. Для исключения эффектов, связанных с набуханием спиртого декстрана, образец предварительно увлажняли и нейтрализовали до необходимой степени ионизации добавлением рассчитанного количества щелочи.

КМ-сефадекс К-50 — сильнонабухающий гель с явно выраженной зависимостью набухания от степени ионизации  $\alpha$  (рис. 1). Относительный коэффициент набухания  $K_w$ , определяемый отношением коэффициента набухания при данной степени ионизации к коэффициенту набухания при  $\alpha=0$ , возрастает при увеличении степени ионизации и при  $\alpha=0,7$  достигает предельного значения. Увеличение набухания может свидетельствовать об изменении взаимного расположения цепей в сетчатой структуре в результате ионизации карбоксильных групп, возможно, сопровождающейся нарушением контактов между цепями. При этом изменение дифференциальной величины относительного коэффициента набухания  $dK_w/d\alpha$ , как видно из рис. 1, наибольшее при низких степенях ионизации ( $\alpha \sim 0,05$ ) и снижается при возрастании  $\alpha$ .

Важную информацию о структурных изменениях сетчатых полизелектролитов в процессе ионизации можно получить из хода кривых потенциометрического титрования [2, 3]. В работе [4] методом потенциометрического титрования растворимого полисахарида — полигалактуроновой кислоты было показано, что в диапазоне степеней ионизации 0,3—0,8  $pK_a$  практически не меняется, в случае альгиновой кислоты [5] величина  $pK_a$  также остается постоянной в широком диапазоне степеней ионизации (рис. 2). Такое поведение при ионизации растворимых кислых полисаха-

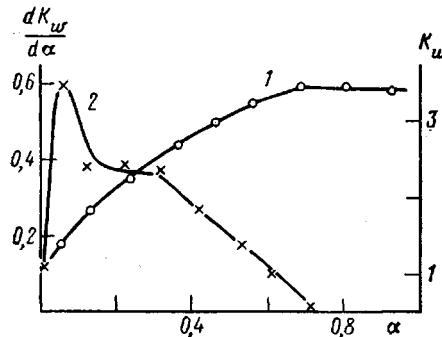


Рис. 1

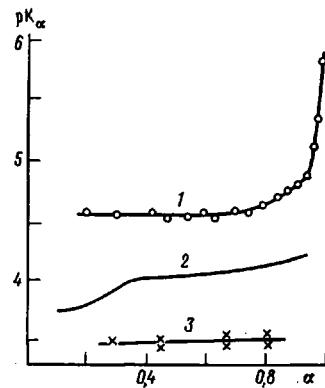


Рис. 2

Рис. 1. Интегральная (1) и дифференциальная (2) кривые набухания КМ-сепадекса в процессе ионизации

Рис. 2. Данные потенциометрического титрования микродисперсии КМ-сепадекса (1), полигалактуроновой (2) [4] и альгиновой кислот (3) [5]

ридов авторы объясняют проявлением в широкой области pH некооперативного конформационного изменения цепей, сопровождающегося разрывом водородных связей. Ионизация КМ-сепадекса К-50 практически не изучена. Данные по титрованию микродисперсии КМ-сепадекса представлены на рис. 2. Результаты титрования выражали в форме зависимости  $pK_\alpha$  от  $\alpha$ , где  $pK_\alpha = pH + \lg \frac{1-\alpha}{\alpha}$ ;  $pK_\alpha = -\lg K_\alpha$ , а  $K_\alpha$  — константа ионизации

карбоксильных групп при данной степени ионизации. Как видно из рис. 2, в широком диапазоне степеней ионизации  $pK_\alpha$  не изменяется, как и у растворимых полисахаридов. Поэтому по аналогии можно полагать, что характер кривых титрования дисперсии спицкого КМ-декстрана в диапазоне значений  $\alpha=0,1-0,8$  также обусловлен конформационными изменениями в цепях спицкого КМ-декстрана, после завершения которых резко возрастает  $pK_\alpha$ .

Можно предположить, что в спицком КМ-декстрани, как и в других полисахаридах, имеет место сильное взаимодействие между цепями, обусловленное водородными связями и, возможно, гидрофобными взаимодействиями между пиранозными звеньями. В растворимых карбоксилированных полисахаридах возможно существование надмолекулярных образований в результате взаимодействия цепей [6]. Надмолекулярные образования в КМ-сепадексе, зафиксированные спицками, могут создавать структурированные области, обусловливая неоднородность сетчатой структуры. Представление данных потенциометрического титрования в координатах уравнения Гендерсона — Гассельбаха (рис. 3) позволяет обнаружить карбоксильные группы по крайней мере двух типов, различающихся электротехнически. Это карбоксильные группы, ионизующиеся до  $\alpha \sim 0,7$ , ионизация которых вызывает увеличение набухания сетчатой структуры, и характеризующиеся постоянным значением величины  $pK_\alpha = 4,6$ . Выше  $\alpha = 0,7$  титруются карбоксильные группы, ионизация которых не сопровождается изменением набухания, достигающего при этих степенях ионизации максимального значения. Величины  $pK_\alpha$  при этом увеличиваются, что может свидетельствовать об ионизации труднодоступных карбоксильных групп, вероятно, относящихся к плотно спицким областям декстрана.

Ранее было показано, что структурные особенности карбоксильных сетчатых полизелектролитов отражаются на характере связывания с белками, в частности, в качестве реагента удобно использовать ГБ ( $M=6,5 \cdot 10^4$ ,  $pI=6,8$  [7, 8]). Максимальное связывание ГБ имеет место, когда достигается максимальная доступность функциональных групп. На рис. 4 представлено изменение относительного количества связанного ГБ от степени

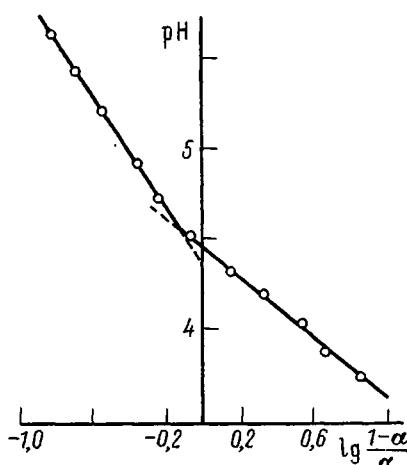


Рис. 3

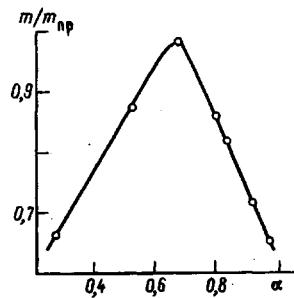


Рис. 4

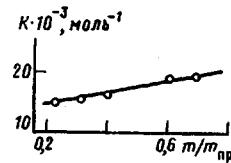


Рис. 5

Рис. 3. Результаты потенциометрического титрования микродисперсии КМ-сепадекса в координатах уравнения Гендерсона - Гассельбаха

Рис. 4. Связывание ГБ микродисперсией КМ-сепадекса в зависимости от степени ионизации карбоксильных групп

Рис. 5. Изменение константы связывания ГБ с КМ-сепадексом ( $\alpha=0,7$ ) от степени заполнения белком

ионизации карбоксильных групп микродисперсии спиртого КМ-декстрина. Повышение степени ионизации карбоксильных групп спиртого декстрина до  $\alpha \approx 0,7$  сопровождается увеличением количества связанного белка. При этом максимальное поглощение ГБ достигается по завершении конформационных перестроек в цепях ( $\alpha \approx 0,7$ ) спиртого декстрина.

Избирательное связывание белка с КМ-сепадексом измеряется эффективной концентрационной константой связывания  $K$ , которая может быть определена на основании уравнения Лэнгмюра, описывающего зависимость количества поглощенного КМ-сепадексом гемоглобина  $m$  от равновесной концентрации белка в растворе  $C_p$

$$K = \frac{m}{C_p(m_{np} - m)},$$

где  $m_{np}$  — предельное насыщение белком, получаемое из графика зависимости методом двойных обратных величин  $\left(\frac{1}{m} - \frac{1}{C_p}\right)$ . Процесс связывания ГБ с КМ-сепадексом происходит избирательно, о чем свидетельствуют высокие значения констант связывания, которые несколько возрастают по мере заполнения КМ-сепадекса белком, что может объясняться ассоциацией сорбированных на матрице белковых макромолекул (рис. 5).

Термодинамический анализ связывания ГБ с микродисперсией КМ-сепадекса проводили при различных степенях ионизации, относящихся как к некооперативному конформационному переходу в цепях спиртого декстрина ( $\alpha=0,3$  и  $0,7$ ), так и при дальнейшей ионизации карбоксильных групп ( $\alpha=0,9$ ). Величины энталпийной составляющей  $\Delta H$  изменения термодинамического потенциала Гиббса были оценены методом дифференциальной микрокалориметрии. Через концентрационную константу связывания рассчитывали изменение термодинамического потенциала Гиббса

$$\Delta G = -RT \ln K$$

Результаты термодинамического анализа взаимодействия ГБ с микродисперсией КМ-сепадекса представлены ниже.

$\alpha_{\text{КМ-сепадекса}}$	0,3	0,7	0,9
$\Delta G^\circ$ , кДж/моль	—	-24	-26
$\Delta H^\circ$ , кДж/моль	+37	+34	-46
$T\Delta S^\circ$ , кДж/моль	—	+58	-20

Процесс связывания ГБ микродисперсией спиртого декстрана, когда в структуре сохраняются межцепные контакты, характеризуется положительным изменением энталпии, т. е. управляет термодинамически выгодным изменением энтропии. Возрастание энтропии, как мы полагаем, может быть связано с конформационными изменениями в цепях, а именно с нарушением их упорядоченного расположения в сетчатом КМ-декстрате при связывании ГБ. При больших степенях ионизации спиртого КМ-декстриана ( $\alpha=0,9$ ) изменяется характер взаимодействия с ГБ, процесс становится выгодным энергетически. Аналогичное энталпийное «управление» избирательностью связывания ГБ микродисперсией сетчатого КМ-декстриана ( $\Delta H=-51,6$  кДж/моль) имеет место и при  $\alpha=0,7$ , но при очень низкой степени заполнения ГБ (7% от максимального количества). Можно полагать, что макромолекулы белка при определяющем энталпийном факторе в рассмотренных случаях взаимодействуют с КМ-сепадексом без деформации структуры цепей.

Таким образом, структурная организация КМ-сепадекса, проявляющаяся в процессе ионизации, находит свое отражение и в характере взаимодействия с ГБ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Писарев О. А., Шатаева Л. К., Самсонов Г. В. // Изв. АН СССР, Сер. хим. 1980, № 1. С. 34.
2. Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Гудкин Л. Р., Кузнецова Н. Н., Муравьева Т. Д., Папукова К. П., Рожецкая К. М., Самсонов Г. В. // Высокомолек. соед. А. 1978. Т. 20. № 3. С. 629.
3. Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Кузнецова Н. Н., Рожецкая К. М., Самсонов Г. В. // Высокомолек. соед. Б. 1980. Т. 22. № 11. С. 874.
4. Cesaro A., Ciano A., Delben F., Manzini G., Paoletti S. // Biopolymers. 1982. V. 21. № 2. P. 431.
5. Marinsky J. A., Lin F.-G., Chung K.-S. // J. Phys. Chem. 1983. V. 87. № 16. P. 3139.
6. Kremmer T., Boross L. // Gelchromatography. Theory, Methodology, Applications. Budapest, 1979. 299 p.
7. Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Гудкин Л. Р., Самсонов Г. В. // Высокомолек. соед. Б. 1983. Т. 25. № 10. С. 750.
8. Мишаева Р. Н., Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В., Гудкин Л. Р., Папукова К. П., Рожецкая К. М. // Высокомолек. соед. А. 1988. Т. 30. № 8. С. 1707.

Институт высокомолекулярных  
соединений АН СССР

Поступила в редакцию  
17.03.89

R. N. Mishaeva, N. P. Kuznetsova, O. A. Pisarev, G. V. Samsonov

#### FEATURES OF IONIZATION OF CARBOXYMETHYL SEPHADEX AND THEIR INFLUENCE ON HAEMOGLOBIN BINDING

#### Summary

Potentiometric titration of carboxymethyl sephadex K-50 microdispersion has been performed and the change of swelling in the course of ionization has been studied. The noncooperative conformational transition in chains of crosslinked dextrane analogous to the transition in the course of ionization of soluble polysaccharides is observed. Interaction of haemoglobin with K-50 is a result of structural features of sephadex.