

УДК 541.64:547.39

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ СОПОЛИМЕРОВ АКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И АКРИЛАМИДА С ЦИТОХРОМОМ С<sup>1</sup>

© 2001 г. В. Б. Скобелева, А. В. Зинченко, В. Б. Рогачева, А. Б. Зезин, В. А. Кабанов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Химический факультет  
119899 Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 06.06.2000 г.  
Принята в печать 25.07.2000 г.

Изучено взаимодействие гидрогелей сополимеров акриловой кислоты и акриламида с белком цитохромом С в бессолевых водных средах. Установлено, что введение в сополимер значительного количества звеньев акриламида (вплоть до 94 мол. %) не приводит к уменьшению эффективности связывания цитохрома С противоположно заряженным гидрогелем и не влияет на количество заряженных акрилатных групп сетки, приходящихся на одну молекулу белка в поликомплексе. При содержании акрилатных звеньев сетки от 14 до 20 мол. % обнаружен переход от крайне неравномерного к равномерному распределению цитохрома С в продуктах его незавершенных реакций с сополимерными гидрогелями. Характер транспорта белка в фазе геля и его распределение в частично превращенных в поликомплекс образцах определяется степенью контракции сетки в процессе взаимодействия с противоположно заряженным белком.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что гидрогели слабо сшитых полиэлектролитов способны поглощать из водных растворов противоположно заряженные полионы [1, 2], в том числе белковые глобулы [3–5], с образованием интерполиэлектролитных комплексов (ИПК).

Исследование механизма таких процессов, а также свойств и поведения ИПК в различных условиях представляет значительный интерес в плане моделирования направленного активного транспорта биополимеров в биологических средах. Не менее важно, что синтезированные таким путем ИПК сами по себе представляют новый класс композиционных материалов, чувствительных к небольшим изменениям состояния окружающей среды. Последнее открывает возможности их использования в хемотронике, а также для капсулирования и управляемого выделения в окружающую среду различных веществ (в том числе лекарств и других биологически активных соединений).

Естественно ожидать, что состав сополимеров, в частности, содержание в них заряженных функциональных групп, может существенно влиять как на взаимодействие соответствующих гидрогелей с водорастворимыми полиэлектролитами, так и на свойства образующихся ИПК. Предлагаемая статья посвящена изучению этой проблемы на примере гидрогелей сополимеров акриловой кислоты (АК) и акриламида различного состава, взаимодействующих с глобулярным белком – цитохромом С.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гидрогели слабо сшитых сополимеров АК и акриламида синтезировали радикальной сополимеризацией мономеров в 10%-ном водном растворе с добавлением N,N'-метиленбисакриламида (МБАА) в качестве сшивателя (1% по отношению к массе сомономеров). Содержание АК в мономерной смеси  $X_0$  варьировали в широких пределах (табл. 1). Инициатором служила редокс-система персульфат калия – метабисульфит натрия (по 0.25% от массы сомономеров). Реакцию проводили в запаянных ампулах, содержащих 10 мл реакционной смеси, в отсутствие воздуха при 40°C в течение 1 суток. При этом достигалась близкая к 100% степень превращения по АК. Та-

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 99-03-33392).

E-mail: vika@genebee.msu.su (Скобелева Виктория Борисовна).

**Таблица 1.** Характеристики полученных гелей

$X_0$ , мол. %	$X$ , мол. %	$H$	$c_k \times 10^3$ , моль/л
5	6	180	4.6
10	14	220	8.5
15	20	310	8.5
20	27	340	10.3
25	32	380	10.7
40	45	590	9.4
50	52	620	10.1
60	62	640	11.3
80	83	680	13.5
100	100	800	13.3

Примечание.  $H$  – равновесная набухаемость,  $c_k$  – мольная концентрация карбоксилатных групп.

ким же путем для сравнения синтезировали гель полиакриловой кислоты.

Полученные гели отмывали водой от остаточных мономеров и небольшого количества зольной фракции и полностью нейтрализовали добавлением NaOH в количестве, эквивалентном числу молей АК, введенной в реакцию. Состав нейтрализованных гелей определяли путем элементного анализа на углерод и азот в сухих образцах. При расчетах полагали, что весь МБАА, содержащийся в реакционной смеси, вошел в состав сополимеров. В этом предположении на 200 мономерных звеньев в среднем приходится одна ковалентная сшивка, что значительно ниже, чем в обычных ионообменных сорбентах. Макроскопически однородное распределение сшивок в объеме гидрогелей экспериментально подтверждается одинаковым содержанием воды в произвольно выбранных элементах объема каждого из полученных полимеризатов.

Содержание акрилата натрия в сополимерах  $X$ , вычисленное из данных элементного анализа, представлено в табл. 1. Видно, что при невысоком содержании АК сополимеры несколько обогащены ею по сравнению с начальной реакционной смесью.

Известно, что константы сополимеризации АК и акриламида ( $r_1$  и  $r_2$ ) зависят от pH реакционной среды. Так, при изменении pH в интервале

2.17–3.77 величины  $r_1$  и  $r_2$  меняются соответственно от 1.73 и 0.48 до 0.56 и 0.56 [6]. Это значит, что в выбранных нами условиях синтеза (интервал pH 2.2–2.7) сегменты сетки на микроуровне характеризуются некоторой композиционной неоднородностью. Однако поскольку сополимеризация в наших системах равномерно проходила во всем реакционном объеме, полученные гидрогели на макроскопическом уровне композиционно однородны. Косвенным экспериментальным подтверждением этого обстоятельства также может служить одинаковое содержание воды в различных элементах объема равновесно набухших образцов.

В табл. 1 представлены равновесные степени набухания H нейтрализованных гелей, вычисленные по формуле  $H = (m_H - m_C)/m_C$ , где  $m_H$  и  $m_C$  – соответственно массы набухшего и сухого образцов. Каждое из приведенных значений H – результат усреднения данных не менее 10 измерений. Разброс измеренных величин не превышал 10–15%.

Содержание звеньев акрилата натрия в сополимерах дополнительно контролировали методом потенциометрического титрования. Гели, отмытые водой от непрореагировавших мономеров, нейтрализовали раствором NaOH, содержащим избыток щелочи (примерно двукратный по отношению к количеству АК в исходной смеси мономеров). Равновесно набухший в воде образец геля выдерживали в щелочном растворе в течение 2 суток до установления нового равновесия. Степень набухания геля возрастила в результате нейтрализации, однако и в конечном состоянии его объем оставался по крайней мере в 20 раз меньше объема жидкой фазы. Нейтрализованный образец извлекали из раствора, в котором затем титрованием 0.01 N раствором HCl определяли количество остаточной щелочи. Содержание акрилата натрия в образце вычисляли по разности между количествами добавленной и остаточной щелочи в растворе, пренебрегая свободной щелочью, остающейся в объеме геля. Связанная с этим ошибка при учете донановского исключения не превышала 0.25%, т.е. заведомо не выходила за пределы точности экспериментальных измерений. Полученные таким образом значения X практически совпадали с вычисленными по данным элементного анализа (табл. 1).

В работе использовали цитохром С сердца лошади фирмы "Sigma" (США) с  $M = 12400$ , изоэлектрическая точка pH 10.3 [7].

Для изучения сорбции цитохрома С использовали нейтрализованные равновесно набухшие образцы гидрогелей кубической формы с массой от

0.3 до 1 г. Образец погружали в бессолевой водный раствор белка известной концентрации ( $10^{-5}$ – $2 \times 10^{-4}$  моль/л). Соотношение объемов геля и раствора белка составляло 1:10. Концентрацию цитохрома С в растворах определяли по величине оптической плотности при длине волны  $\lambda = 409$  нм, используя коэффициент поглощения  $\epsilon = 110\,000$  л/(моль см). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре марки "Hitachi-150-20" (Япония).

Данные сорбционных измерений представляли в координатах  $F - \lg c_6$ , где  $c_6$  – концентрация молекул белка в окружающем растворе, устанавливающаяся по истечении двух недель,  $F$  – отношение количества сорбированного белка к его количеству, соответствующему насыщению геля в данных условиях.

Распределение цитохрома С в гелях, частично превращенных в ИПК, регистрировали фотомет-

ическим методом с помощью микрофотометра МФ-4 (СССР). Препараторы для фотометрирования готовили следующим образом. Из образца нейтрализованного равновесно набухшего геля вырезали кубик с длиной ребра 1.0–1.2 см (масса 1.0–1.7 г), который затем погружали в нейтральный бессолевой водный раствор цитохрома С. Концентрацию белка выбирали так, чтобы после установления сорбционного равновесия величина  $F$  составила ~0.2. Образцы гелей, частично превращенные в ИПК, сохраняли кубическую форму и были окрашены в красный цвет сорбированным цитохромом С. Из центральной части такого кубика вырезали пластинку толщиной около 2 мм (схема I), которую помещали на столик микрофотометра под покровное стекло. В качестве иммерсионной среды использовали воду. Фотометрирование проводили вдоль поверхности среза по линии 0–A, параллельной грани исходного образца и проходящей через его центр – точку C (схема I).

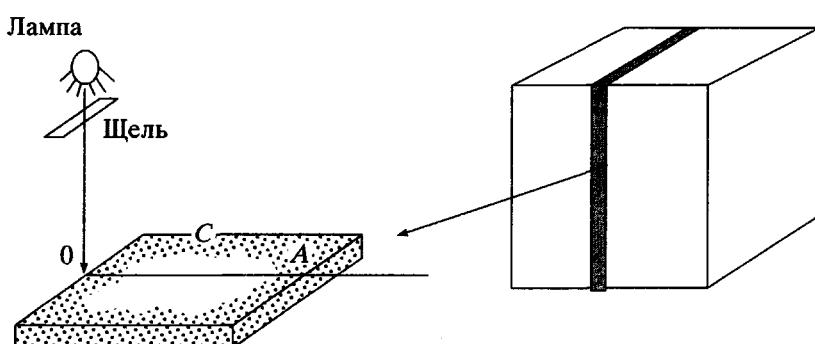


Схема I

Препарат освещали лучом белого света от лампы накаливания, пропущенным через щелевую диафрагму ( $0.5 \times 10$  мм). Оптическую плотность определяли как  $D = \lg(I_0/I)$ , где  $I_0$  и  $I$  соответственно интенсивности света, прошедшего через воду и образец.

Потенциометрическое титрование и измерение pH растворов проводили на pH метре РНМ 83 AUTOCAL фирмы "Radiometer" (Дания) с использованием стеклянного электрода.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все полученные гели слабо сшитых сополимеров акрилата натрия и акриламида, как и гомополимерные гели полиакрилата натрия, эффектив-

но сорбируют цитохром С из нейтральных водных растворов с образованием ИПК. Сорбция сопровождается макроскопическим изменением состояния геля. Уже через несколько минут после погружения геля (состояние а на схеме II) в раствор белка на поверхности образца образуется тонкая красная пленка ИПК, которая затем постепенно утолщается. Одновременно уменьшается объем образца (состояния б и в). При достаточном количестве белка в окружающем растворе весь исходный гель в конечном счете превращается в непрозрачный слабо набухший продукт реакции, окрашенный в красный цвет (состояние г). Относительное уменьшение объема образца при сорбции тем больше, чем выше степень набухания исходного геля.

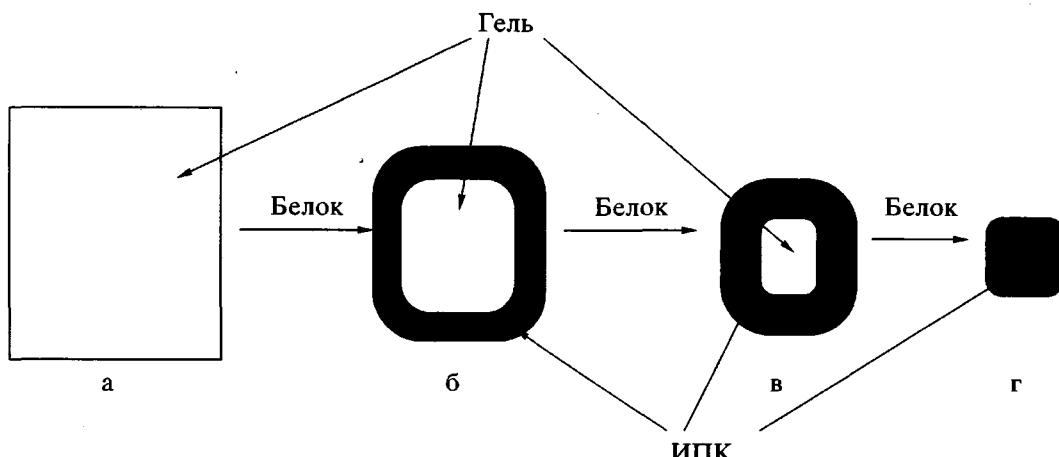


Схема II

Как и в случае полиакрилата натрия [4], сорбция цитохрома С сополимерными гелями происходит только в том интервале рН, в котором белковые глобулы заряжены положительно ( $\text{pH} < \text{pI}$ , где  $\text{pI} 10.3$  – изоэлектрическая точка цитохрома С). При  $\text{pH} 11.5$  заметной убыли белка из окружающего раствора не наблюдается. В то же время цитохром С количественно выделяется в окружающий раствор, если образец ИПК, полученный в

нейтральной среде, поместить в водный раствор  $\text{NaOH}$  с  $\text{pH} 11.5$ .

Из описанных выше наблюдений следует, что сорбция белка фактически представляет собой интерполиэлектролитную реакцию. Эта реакция состоит в образовании солевых связей между отрицательно заряженными карбоксилатными группами сетки гидрогеля и положительно заряженными аминогруппами, находящимися на поверхности белковых глобул.

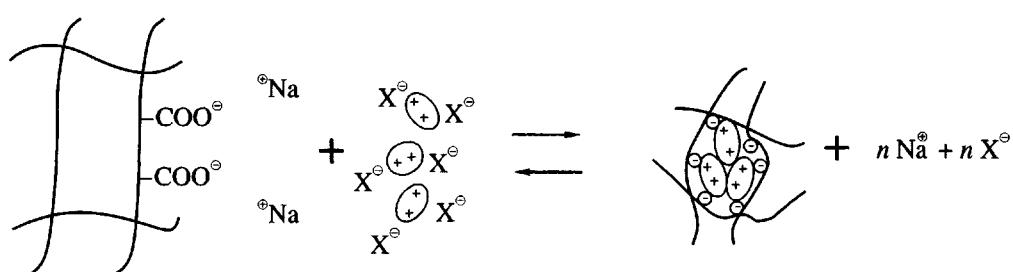


Схема III

На схеме для простоты обозначены только отрицательно заряженные группы сетки и избыточные положительные заряды белка, нейтрализованные низкомолекулярными противоионами  $X^-$ . В действительности часть положительно заряженных групп белковой молекулы может быть включена в цвиттер-ионные пары.

Таким образом, введенная выше величина  $F$  фактически представляет собой степень завершенности интерполиэлектролитной реакции.

На рис. 1 приведены данные по сорбции цитохрома С из нейтральных бессолевых водных растворов. Сплошной линией изображена изотерма

сорбции белка гелем поликарбоната натрия, а точки относятся к его сорбции сополимерными гелями с разным содержанием звеньев акрилата натрия. Видно, что с некоторым разбросом эти точки группируются вокруг приведенной кривой. Для всех изученных гелей равновесные концентрации белка в окружающем растворе весьма малы ( $< 5 \times 10^{-6}$  моль/л). Иными словами, даже при значительном уменьшении доли отрицательно заряженных групп в сетке средство гелей к противоположно заряженным белковым глобулам остается достаточно высоким.

*Свойства и характеристики ИПК,  
образующихся по завершении  
интерполиэлектролитной реакции*

При постоянной подпитке белком из окружающего раствора гидрогели полностью превращаются в ИПК в результате завершения интерполиэлектролитной реакции III, т.е. переходят из состояния а в состояние г (схема II). В этом состоянии независимо от предыстории образца связанные молекулы белка всегда в среднем равномерно распределены в объеме геля.

В табл. 2 представлены данные по составу ИПК, полученных по завершении реакции между цитохромом С и сополимерными гелями различного состава. Для сравнения здесь также приведены данные для комплекса сетчатый поликарбонат натрия – цитохром С. Параметр  $\phi$  в табл. 2 определен как отношение числа молей ионизированных карбоксильных групп сетки  $n_-$  к количеству молей белка  $N_6$ , включенного в ИПК. Иными словами,  $\phi$  есть число отрицательно заряженных групп сетки, приходящихся на одну глобулу цитохрома С. Величину  $N_6$  определяли спектрофотометрически по убыли концентрации цитохрома С в окружающем растворе. Величину  $n_-$  вычисляли по формуле

$$n_- = 0.01 X m_H / ((H + 1) M_{3B}), \quad (1)$$

где  $M_{3B}$  – средняя молекулярная масса звена сополимера. Из приведенных данных следует, что в ИПК, полученных в нейтральных бессолевых средах, на одну молекулу белка в среднем приходится 7–10 звеньев акрилата натрия независимо от состава исходного сополимера. Это число близко к величине положительного заряда глобулы цитохрома С [8] в условиях эксперимента.

Близость значений  $\phi$  для ИПК, образованных сетками с различным содержанием звеньев акрилата натрия, как и сохранение высокого сродства гелей к белку при значительном уменьшении в них доли отрицательно заряженных групп – факты нетривиальные. Их можно понять, приняв во внимание сильную зависимость степени набухания гелей от их состава, что видно из данных табл. 1. В этой же таблице приведены мольные концентрации карбоксилатных групп  $C_k$  в равновесно набухших гелях до взаимодействия с цитохромом С

$$C_k = n_- / V_0 = 0.01 X \rho / ((H + 1) M_{3B}), \quad (2)$$

где  $V_0$  и  $\rho$  – соответственно объем и плотность равновесно набухшего геля (учитывая высокую степень набухания гелей, величину  $\rho$  полагали равной 1 г/мл).

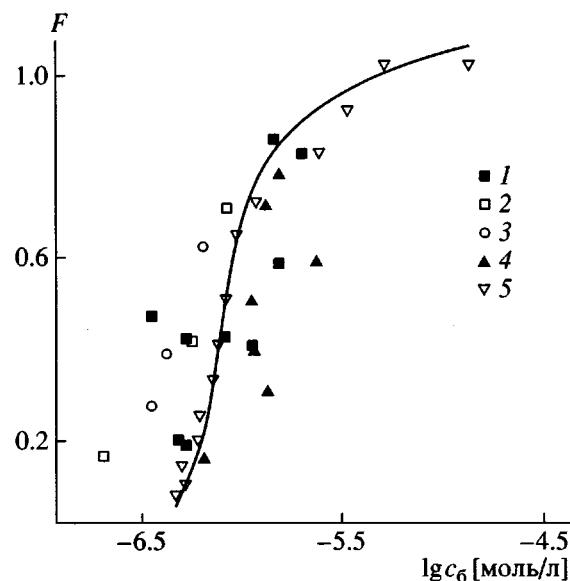


Рис. 1. Изотермы сорбции цитохрома С для сополимерных гелей (1–4) и геля поликарбоната натрия (5). Содержание звеньев акрилата натрия 6 (1), 14 (2), 20 (3) и 27 мол. % (4).  $T = 20^\circ\text{C}$ , pH 8.

Переход от гидрогеля поликарбоната натрия к гидрогелю с наименьшим содержанием (6 мол. %) звеньев акрилата натрия сопровождается снижением равновесной степени набухания на ~1 порядок. Существенно, что значение  $C_k$  при этом сни-

Таблица 2. Характеристики состава интерполиэлектролитных комплексов

X, мол. %	$\phi$	Емкость по белку*, ммоль/г
6	7.1	0.12
14	7.9	0.24
20	7.9	0.33
27	7.4	0.48
32	7	0.58
45	9	0.61
52	6.8	0.92
62	7.3	0.99
83	7.7	1.20
100 [3, 5]	10	1.07

\* В расчете на сухой сополимер.

Таблица 3. Характеристики набухания ИПК и контракции гелей при комплексообразовании ( $T = 20^\circ\text{C}$ , pH 7)

$X, \text{моль. \%}$	$H_{\text{ИПК}}$	$m_0/m_{\text{ИПК}}$	$V_0/V$
6	12	5.6	6.1
14	8.5	5.9	5.9
20	5	7.5	10.2
27	3	—	13.3
32	5	8.4	8.7
45	4	—	12.4
52	3	12.9	14.5
62	3	12.9	13.1
83	3	9.9	11.2
100 [3]	—	23.5	—

жается не более, чем в 3 раза. Это объясняется параллельным изменением величин  $X$  и  $H$ , входящих в формулу (2). Иными словами, уменьшение содержания заряженных групп в полизелектролитной сетке частично компенсируется уменьшением ее набухания, т.е. увеличением объемной плотности зарядов. Кроме того, уменьшение набухания ведет к сокращению среднего расстояния между узлами сетки. Естественно, что контурная длина гибких участков цепей между ковалентными сшивками при этом не изменяется, а, следовательно, расширяется конформационный набор

каждого такого участка. Последнее обстоятельство облегчает конформационную подстройку, необходимую для образования солевых связей между сеткой и белком. В результате все исследованные гели несмотря на различие в содержании отрицательно заряженных групп эффективно связывают положительно заряженные белковые глобулы и образуют ИПК, характеризующиеся близкими значениями  $\phi$ . Разумеется, однако, что максимальная сорбционная емкость гелей по белку, рассчитанная на сухой сополимер, снижается при уменьшении мольной доли звеньев акрилата натрия (табл. 2).

Из данных табл. 3 следует, что степень набухания ИПК  $H_{\text{ИПК}}$  увеличивается при снижении мольного содержания звеньев акрилата натрия в сетчатом сополимере. Это отражает существенный вклад в набухание гидрофильных акриламидных звеньев, доля которых возрастает с уменьшением  $X$ . Опираясь на данные по равновесному набуханию, мы рассчитали удельные объемы  $V_0$  и  $V$  для исходных гелей и для продуктов их полного превращения в ИПК:

$$V_0 = m_c(H + 1)/\rho_0, \quad (3)$$

$$V = m_c(H_{\text{ИПК}} + 1)/\rho_{\text{ИПК}}(0.01XM_6/(M_{3B}\phi) + 1), \quad (4)$$

где  $M_6$  – молекулярная масса цитохрома С, равная 12400,  $\rho_0$  и  $\rho_{\text{ИПК}}$  – плотности исходного геля и ИПК при равновесном набухании, которые принимали равными единице. На рис. 2 представлены зависимости  $V_0$  и  $V$  от состава сополимера  $X$ . Видно, что при снижении содержания звеньев акрилата натрия в сополимере величины  $V_0$  и  $V$  сближаются. Это приводит к уменьшению их отношения  $V_0/V$ , характеризующего контракцию сетки в результате ее реакции с белком.

Значения  $V_0/V$  суммированы в табл. 3, из которой видно, что степень контракции сополимерных гидрогелей при их превращении в ИПК снижается по мере уменьшения содержания заряженных звеньев в сополимере. В табл. 3 приведены также экспериментально определенные отношения масс равновесно набухших исходных гелей и ИПК,  $m_0/m_{\text{ИПК}}$ . Очевидно, что это отношение при  $\rho_0 = \rho_{\text{ИПК}} = 1 \text{ г/мл}$  есть не что иное, как степень контракции  $V_0/V$ . В самом деле, величины  $V_0/V$  и  $m_0/m_{\text{ИПК}}$  находятся в хорошем соответствии друг с другом.

Из данных табл. 3 следует, что поглощение цитохрома С гидрогелями, содержащими 20 моль. % и более звеньев акрилата натрия, сопровождается значительным уменьшением объема сорбента (на порядок и более). При поглощении цитохро-

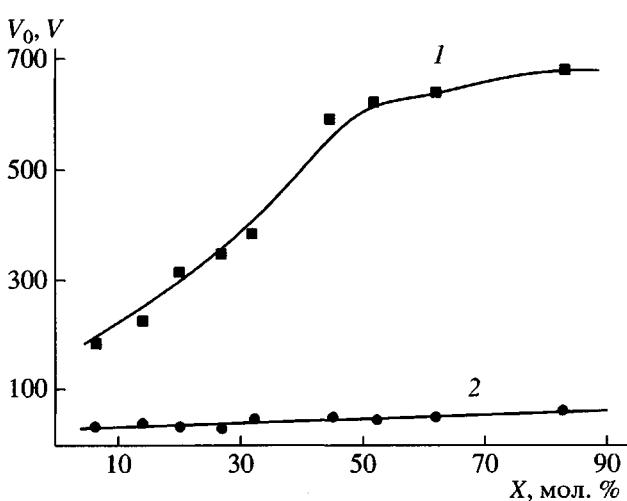


Рис. 2. Зависимость  $V_0$  (1) и  $V$  (2) от состава сополимера  $X$ .

ма С гидрогелями с низким содержанием звеньев акрилата натрия ( $\leq 14$  мол. %) степень контракции оказывается существенно меньше (около 6).

*Распределение цитохрома С в гидрогелях, частично превращенных в ИПК*

Сорбция белка из разбавленного водного раствора и его перенос в фазе гидрогеля происходит за счет свободной энергии интерполиэлектролитной реакции III, происходящей на поверхности раздела раствор – ИПК. Иными словами, перемещение границы ИПК – исходный гель с периферии образца к его центру (схема II), по существу, представляет собой активный транспорт белка, сопровождающийся контракцией набухшей сетки (локализованный коллапс). Перенос происходит путем многократно повторяющихся “элементарных” актов, в которых фрагменты сетки обменивают заряженные белковые глобулы на эквивалентное по заряду число низкомолекулярных противоионов. Каждый акт обмена на границе раздела ИПК – исходный гель приводит к рождению вакансии в фазе ИПК. Вакансии движутся в направлении, противоположном движению фронта ИПК и, достигая поверхности раздела ИПК – раствор, связывают белковые глобулы, поступающие из раствора. Механизм таких процессов подробно рассмотрен в работах [2, 9] применительно к взаимодействию слабо спицтых полиелектролитных сеток с противоположно заряженными линейными полиелектролитами.

Процесс превращения гидрогеля в ИПК можно остановить на промежуточной стадии (б или в на схеме II), прекратив подпитку образца белком из окружающего раствора. Получающийся при этом образец представляет собой двухфазную систему с резко выраженной межфазной границей. Внешняя фаза (ИПК) содержит весь сорбированный белок, электростатически связанный со слабо набухшей сеткой. Внутренняя фаза не содержит белка и представляет собой сильно набухший исходный гидрогель. Иначе говоря, образец, частично превращенный в ИПК, имеет предельно неравномерное распределение сорбированного белка по объему. Вопрос о стабильности (термодинамической или кинетической) такого состояния и о факторах, способных приводить к его эволюции во времени, имеет принципиальное значение для понимания природы описанных ранее [1–5, 9] явлений локализованного коллапса полиелектролитных сеток, а также для практического использования гидрогелей, частично превращенных в ИПК.

В работах [3, 4] мы показали, что характер распределения цитохрома С, сорбируемого гид-

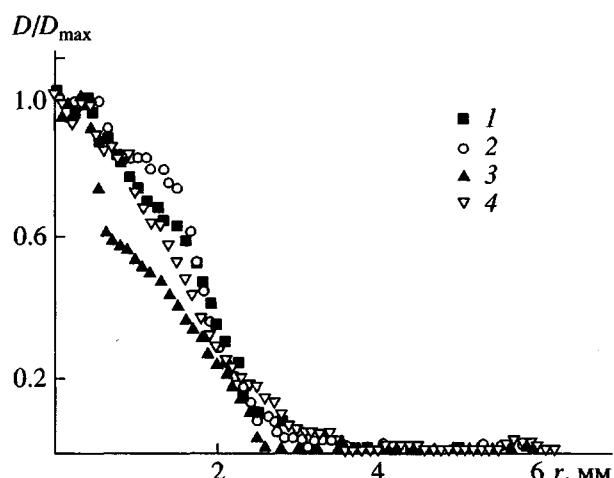


Рис. 3. Кривые фотометрирования срезов для продуктов незавершенных реакций между гелем и цитохромом С при времени выдерживания 2 (1, 3) и 6 недель (2, 4). 1, 2 – сополимерный гель с  $X = 20$  мол. %; 3, 4 – гель полиакрилата натрия.  $T = 20^\circ\text{C}$ , pH 8.

рогелем полиакрилата натрия, частично превращенным в ИПК, кардинально меняется при введении в систему сравнительно небольших количеств низкомолекулярных солей (при концентрации соли  $C \geq 0.02$  моль/л в случае NaCl [3] или  $C \geq 0.08$  моль/л для  $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$  [4]). Если сорбция цитохрома С прервана в отсутствие солей, то слабо набухший внешний слой, в котором сосредоточен весь поглощенный сеткой белок, неограниченно долгое время существует с внутренней зоной сильно набухшего свободного геля. В отличие от этого в системах, содержащих низкомолекулярную соль, изначально неравномерное распределение белка в образце эволюционирует во времени. В конечном счете система приходит в состояние, при котором белок равномерно распределен во всем объеме образца. Одновременно выравнивается и степень контракции геля по объему.

Известно, что в присутствии низкомолекулярных солей снижается равновесная степень набухания полиелектролитных гелей из-за частично-го экранирования зарядов сетки. К таким же последствиям ведет уменьшение содержания ионогенных звеньев в спицтых сополимерах акрилата натрия и акриламида. В этой связи представляло интерес изучить влияние содержания ионогенных групп в сетке на характер распределения цитохрома С, которое устанавливается в гелях, частично превращенных в ИПК.

На рис. 3 приведены фотометрические кривые, характеризующие распределение цитохрома С в гелях, частично превращенных в ИПК, при раз-

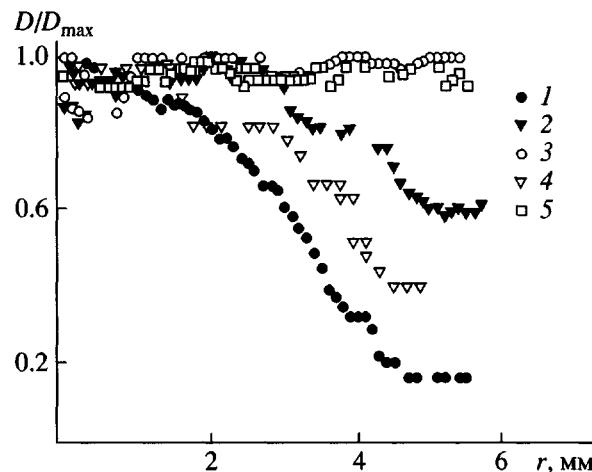


Рис. 4. Кривые фотометрирования срезов для продуктов незавершенных реакций между сополимерными гелями и цитохромом С при времени выдерживания 2 (1, 4), 6 (2, 5) и 8 недель (3).  $X = 14$  (1–3) и 6 мол. % (4, 5).

личных временах выдерживания образцов в растворе. Они представляют собой зависимости относительной оптической плотности  $D/D_{\max}$  от координаты  $r$ , отсчитываемой от края препарата по направлению к его центру вдоль линии 0–C (схема I). Концевые точки на приведенных кривых соответствуют центру фотометрируемой пластины (т.е. центру образца).

Исходные равновесно набухшие в воде гели полностью прозрачны, слой ИПК слабо опалесцирует. Поскольку в регистрируемую оптическую плотность наряду с характеристическим поглощением цитохрома С вносит вклад рассеяние света слоем ИПК, мы не могли преобразовать фотометрические кривые непосредственно в кривые распределения белка по образцу. Поэтому оптическую плотность для каждого образца нормировали к ее максимальному значению  $D_{\max}$ . Вместе с тем, кривые 1 и 3 на рис. 3 ясно отражают неравномерное распределение белка в исследуемых образцах. Такое распределение характерно для всех исследованных гелей непосредственно после приостановки реакции образования ИПК. Важно отметить, однако, что при увеличении времени выдерживания частично превращенных в ИПК гелей, содержащих 20 мол. % и более акрилата натрия фотометрические кривые не претерпевают существенных изменений (ср. кривые 1, 3 и 2, 4).

Гидрогели с меньшим содержанием акрилатных звеньев (14 и 6 мол. %), частично превращенные в ИПК, ведут себя совершенно иначе. Из рис. 4 следует, что в образцах, выдержанных в равнове-

сии с окружающим раствором в течение 2 недель, происходит значительное размывание границы между внешним слоем ИПК и внутренней зоной исходного гидрогеля. Это отражается в уменьшении крутизны фотометрических кривых и в возрастании  $D/D_{\max}$  вблизи центра образцов. При дальнейшем увеличении времени выдерживания белок равномерно распределяется по всему объему гелей (кривые 3 и 5 на рис. 4).

Переход от стабильно неравномерного к выравнивающемуся во времени распределению цитохрома С, который наблюдается при уменьшении содержания заряженных звеньев в сетке, происходит в той же области составов (между 14 и 20 мол. % звеньев акрилата натрия), что и значительное снижение равновесного набухания гидрогелей (табл. 1). В этой же области наблюдается увеличение набухания соответствующих ИПК (табл. 3). Оба фактора приводят к уменьшению степени контракции сетки в результате ее реакции с белком.

Интересно отметить также, что равновесные степени контракции  $m_0/m_{\text{ипк}}$ , при которых наблюдается описанный выше переход для частично превращенных сополимерных гелей в воде и гидрогеля полиакрилата натрия в водно-солевых средах, хорошо согласуются.

Таким образом, гидрогели сополимеров акрилата натрия и акриламида способны поглощать цитохром С в той области pH, где белковые глобулы несут положительный заряд. В весьма широком интервале составов сополимера миграция белка в набухшей полизелектролитной сетке (активный транспорт) происходит только при затрате свободной энергии интерполизелектролитной реакции образования ИПК и прекращается, если эта реакция прервана. Однако, при высоком содержании звеньев акриламида (нейтральных гидрофильных) наряду с активным транспортом разрешенной оказывается также и "пассивная" диффузия белка в направлении градиента его концентрации. Этот процесс продолжается и после остановки интерполизелектролитной реакции. Переход к смешанному режиму диффузии происходит при сближении степеней равновесного набухания исходного гидрогеля и образующегося ИПК.

Возможность перехода между режимом фронтально распространяющейся гетерогенной реакции и смешанным режимом, в котором разрешена пассивная диффузия белка в геле, открывает новые перспективы для управления структурой композитов, образующихся при сорбции белков полизелектролитными сетками.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рогачева В.Б., Превыш В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1988. Т. 30. № 10. С. 2120.
2. Zezin A.B., Rogacheva V. B., Kabanov V. A. // Macromol. Symp. 1997. V. 126. P.123.
3. Скобелева В.Б., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1996. Т. 347. № 2. С. 207.
4. Скобелева В.Б., Ковригин Д.И., Рогачева В.Б., Зезин А.Б. // Вестн. МГУ. Сер. 2, Химия. 1998. Т. 39. № 3. С. 201.
5. Карабанова В.Б., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1995. Т. 37. № 11. С. 1138.
6. Cabaness W.R., Yen-Chin Lin, Parkanyi C. // J. Polym. Sci. A-1. 1971. V. 9. № 8. P. 2155.
7. Lemberg R., Barrett J. The Cytochromes. London; New York: Acad. Press, 1973. P. 122.
8. Shaw R.W., Hartzell Ch.R. // Biochemistry. 1976. V. 15. № 9. P. 1909.
9. Kabanov V. A., Zezin A.B., Rogacheva V. B., Prevish V. A. // Makromol. Chem. 1989. B. V. 190. № 11. P. 2211.

## Interaction of Hydrogels of Acrylic Acid–Acrylamide Copolymers with Cytochrome C

**V. B. Skobeleva, A. V. Zinchenko, V. B. Rogacheva, A. B. Zezin, and V. A. Kabanov**

*Department of Chemistry, Moscow State University,  
Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia*

**Abstract**—The interaction of hydrogels of acrylic acid–acrylamide copolymers with a cytochrome C protein in salt-free aqueous media was studied. It was shown that the incorporation of a significant amount of acrylamide units (up to 94 mol %) into a copolymer does not decrease the efficiency of cytochrome C sorption by an oppositely charged hydrogel and does not affect the number of charged acrylate groups in a network per protein molecule in a polycomplex. When the content of acrylate units in a network ranges from 14 to 20 mol %, an extremely nonuniform distribution of cytochrome C in the products of its incomplete reactions with the copolymer hydrogels changes to the uniform one. The character of protein transport in the gel phase and its distribution in the samples partially converted into polycomplex are controlled by the extent of network contraction resulting from its interaction with the oppositely charged protein.