

## ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

УДК 541.1

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЛАБОСШИТОГО ПОЛИАМИНА С БЫЧЬИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

В.Б. Скобелева, А.В. Зинченко, В.Б. Рогачева, А.Б. Зезин

(кафедра высокомолекулярных соединений)

**Изучено взаимодействие сетчатого бромида поли-N,N-диметил-N-этиламиноэтилметакрилата с бычьим сывороточным альбумином. Установлено, что слабосшитый полиаминный гель способен сорбировать БСА при рН выше ИЭТ белка с образованием в фазе геля интерполимерного комплекса, в котором белковые частицы связаны с участками сетчатого полиамина солевыми связями. Показано, что состав комплекса определяется рН и ионной силой среды и не зависит от соотношения компонентов в реакционной смеси. Изучена стабильность образующихся комплексов в водно-солевых средах. Сорбция белка противоположно заряженным гелем осуществляется как фронтально распространяющаяся гетерогенная реакция, приводящая к макроскопическому фазовому разделению в продуктах незавершенных реакций.**

В последнее десятилетие особое внимание исследователей привлекают интерполимерные реакции (ИПР) с участием полиэлектролитов (ПЭ) и белков. В первую очередь это связано с тем, что комплексы белков с синтетическими ПЭ представляют собой удобные модели для изучения комплексов белков с природными полиионами, а также являются перспективными носителями биологически активных веществ с точки зрения применения их в биотехнологии и медицине. При этом особый интерес представляет взаимодействие белков с сетчатыми полиэлектролитами (СПЭ). Процессы переноса белков в химически комплементарных гелях могут служить моделью активированного транспорта природных полиэлектролитов в биологических средах, они также могут быть использованы для дизайна различных функциональных полиэлектролитных систем медико-биологического назначения.

В предыдущих работах [1, 2] мы изучили взаимодействие сшитого полиакрилата натрия (СПАНа) с лизоцимом, цитохромом *c* и протамином (белками небольшой молекулярной массы) и показали, что движущей силой сорбции белков полиакрилатной сеткой является кооперативная ИПР между компонентами с образованием в фазе геля интерполимерного комплекса (ИПК) СПЭ-белок, стабилизированного солевыми связями. При этом состав образующегося

ИПК в существенной степени зависит от рН, химической природы и концентрации низкомолекулярных ионов и не зависит от соотношения компонентов в реакционной смеси.

В данной статье изложены результаты исследований взаимодействия положительно заряженной высоконабухшей гомогенной сетки с противоположно заряженным белком, которые могут рассматриваться как продолжение и развитие нового и перспективного направления в области кооперативных ИПР. Мы изучили взаимодействие сшитого этилированного полидиметиламиноэтилметакрилата (СПДМАЭМ·EtBr) с бычьим сывороточным альбумином (БСА) – глобулярным белком более высокой молекулярной массы, чем лизоцим и цитохром *c*.

#### Экспериментальная часть

Сшитый бромид поли-N,N-диметил-N-этиламиноэтилметакрилата (СПДМАЭМ·EtBr) синтезировали по аналогии с методикой получения полиакриламидных гелей [3]. ДМАЭМ·EtBr получали реакцией алкилирования мономера ДМАЭМ бромистым этилом [4]. К пятикратному избытку мономера при перемешивании и охлаждении (смесью льда с солью) добавляли постепенно бромистый этил (EtBr). Алкилированный ДМАЭМ образуется в виде белого осадка. Кристаллы ДМАЭМ·EtBr промывали несколько раз эфиром и су-

шили в вакууме. Гель СПДМАЭМ·EtBr синтезировали по следующей методике. Водный раствор, содержащий 20 мас.% ДМАЭМ·EtBr, эквимольное количество HCl, 1.0 мол.% от ДМАЭМ·EtBr бифункционального сшивателя, N,N'-метилден-бис-акриламида, 0.5 мас.% от ДМАЭМ·EtBr персульфата аммония, продували аргоном в течение 15 мин, затем добавляли 0.5 мас.% от ДМАЭМ·EtBr метабисульфита натрия, продували аргоном в течение 10 мин и запаивали в ампулы. Полимеризацию проводили в течение суток при  $T = 40^\circ$ . По окончании полимеризации гель СПДМАЭМ·EtBr отмывали водой до установления постоянной величины набухаемости.

Набухаемость гелей и продуктов завершённых ИПР определяли весовым методом и характеризовали величиной набухаемости:

$$H = (m_1 - m_2) / m_2,$$

где  $m_1$  – масса набухшего образца,

$m_2$  – масса сухого образца.

Набухаемость геля СПДМАЭМ·EtBr (рН = 7) составляла 600.

В работе использовали БСА фирмы *Sigma* (США) молекулярной массы  $M = 69000$ . БСА содержит 143 свободных отрицательно заряженных карбоксильных групп (аспаргиновой и глутаминовой кислот) и 101 положительно заряженных аминогрупп, 60 из которых первичные аминогруппы лизина, 23 – аминогруппы аргинина и 18 – гистидина [5]. Такое соотношение отрицательно и положительно заряженных ионогенных групп определяет значение ИЭТ БСА, равное 4.9 [6]. Глобула БСА имеет размеры порядка  $150 \times 40 - 45 \text{ \AA}$  [5].

Изучение взаимодействия БСА с СПДМАЭМ·EtBr проводили в водных растворах в интервале рН 6–9, при этом концентрация растворов белка составляла 1–4 мг/мл, масса образцов гелей составляла 0.1–1.5 г. Измерение рН растворов производили на рНметре РНМ 83 AUTOCAL фирмы «Radiometer» (Дания). Концентрацию БСА определяли по величине поглощения растворов при  $\lambda = 282 \text{ нм}$  (коэффициент экстинкции  $E = 36000 \text{ л/(моль·см)}$ ). Здесь и далее представлены данные в расчете на моль молекул белка. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре «Hitachi-150-20» (Япония).

### Результаты и обсуждение

Образцы равновесно набухшего геля СПДМАЭМ·EtBr при погружении в нейтральные бессолевые растворы БСА эффективно сорбируют бе-

лок. Уже через несколько минут на поверхности прозрачного геля образуется тонкая матовая пленка ИПК, которая с течением времени утолщается. Образец геля при этом уменьшается в объеме и при достаточном количестве белка в окружающем растворе в конечном счете превращается в компактный, непрозрачный продукт реакции – ИПК, набухаемость которого на два порядка ниже набухаемости исходного геля ( $H_{\text{СПДМАЭМ·EtBr}} = 600, H_{\text{ИПК}} = 6$ ).

Время, в течение которого происходит полное превращение кубического образца геля массой 0.7 г в ИПК с БСА, составляет около 10 сут. Это время значительно (на порядок и более) превышает время, необходимое для превращения геля СПА на той же степени сшивания в ИПК с такими глобулярными белками, как цитохром *c* и лизоцим [1]. Низкая скорость сорбции БСА по сравнению с этими белками объясняется тем, что при сорбции глобулярных белков противоположно заряженными сетками роль кинетической единицы играет целая глобула белка, а молекулярная масса БСА приблизительно в 5 раз выше молекулярной массы цитохрома *c* и лизоцима. Как и для изученных ранее систем СПЭ – белок [1, 2], взаимодействие БСА с СПДМАЭМ·EtBr наблюдается в таком интервале рН, в котором белковые молекулы и сетка противоположно заряжены (рН > ИЭТ). Действительно, при погружении образцов СПДМАЭМ·EtBr в растворы БСА при рН < 4.5 < ИЭТ не наблюдается заметной убыли белка в окружающем геле растворе. Более того, ИПК СПДМАЭМ·EtBr – БСА, полученный в нейтральной среде и помещенный затем в водный раствор HCl при рН < 4.5, разрушается в течение нескольких часов, о чем свидетельствует выделение в окружающий раствор практически всего белка, включенного в ИПК. Это означает, что сорбция белка происходит в результате ИПР, сопровождающейся образованием солевых связей между отрицательно заряженными карбоксилатными группами, экспонированными на поверхности белковых глобул, и положительно заряженными аминогруппами сетки. Эта ИПР представлена на схеме I.

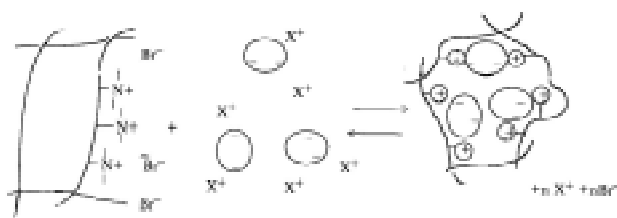


Схема I

Для простоты показаны только доминирующие отрицательные заряды белка и их противоионы, хотя, в действительности, значительная часть отрицательно заряженных групп белковой молекулы может быть включена в цвиттер-ионные пары.

Если количество белка в растворе, окружающем гель, недостаточно для полного превращения образца геля в ИПК, поглощение белка из раствора протекает практически до полного исчерпания последнего, иными словами, равновесие ИПР (схема I) нацело сдвинуто вправо.

Максимальное количество сорбирующегося белка, или состав ИПК, определяли как

$$\phi_{\text{ИПК}} = (N_{\text{СПДМАЭМ} \cdot \text{EtBr}} / N_{\text{Б}}),$$

где  $N_{\text{СПДМАЭМ} \cdot \text{EtBr}}$  и  $N_{\text{Б}}$  – количество звеньев сетки и молекул белка в образце ИПК соответственно. Значения  $N_{\text{СПДМАЭМ} \cdot \text{EtBr}}$  определяли весовым методом, зная величину набухаемости геля. Значения  $N_{\text{Б}}$  определяли по убыли концентрации белка в окружающем растворе или весовым методом по разнице масс сухого исходного СПДМАЭМ·EtBr и продукта его реакции с БСА, высушенного до постоянной массы.

Полученный нами состав ИПК СПДМАЭМ·EtBr – БСА соответствовал  $\phi_{\text{ИПК}} \approx 55\text{--}60$ . Другими словами, предельная емкость полиаминного геля по БСА составляет порядка 6–7 г белка на 1 г сухого геля. Следует отметить, что практически такая же величина  $\phi_{\text{ИПК}} = 55$  была получена ранее [7] при изучении составов нерастворимых ИПК, образующихся между линейным поли-N-этил-4-винилпиридиний бромидом (ЛПЭВП) и БСА. Существенно, что состав ИПК, образованных сетчатым полиамином, не зависит от исходного соотношения компонентов в реакционной смеси. Полученные значения  $\phi_{\text{ИПК}}$  остаются неизменными в широком интервале изменения составов реакционных смесей  $\phi_{\text{см}} = (N_{\text{СПДМАЭМ} \cdot \text{EtBr}} / N_{\text{Б}})_{\text{см}} = 20\text{--}55$ . Иными словами, введение избыточных количеств белка в реакционную систему не приводит к его дополнительной сорбции сеткой. Это свойство является общим для широкого круга ИПК, в том числе для ИПК, образованных сетчатыми и линейными полиэлектролитами [8], противоположно заряженными сетчатыми полиэлектролитами и ионногенными ПАВ [9], и наконец, противоположно заряженными сетчатыми полиэлектролитами и белками [1]. В то же время известно, что при взаимодействии линейных полиэлектролитов с белками в водных растворах, содержащих значительный избыток белка, возможно

образование водорастворимых нестехиометричных ИПК (НИПК), обогащенных белком. Так, в системе ЛПЭВП – БСА состав такого НИПК отвечает соотношению отрицательно заряженных групп БСА и положительно заряженных аминокрупп полимера, равному 2.3 [10]. В таком НИПК на одну глобулу БСА в среднем приходится 45 звеньев ЛПЭВП.

В литературе описаны водорастворимые НИПК, включающие избыток заряженных звеньев линейного полиэлектролита. В частности, в работе [11] описаны водорастворимые НИПК, образованные ЛПЭВП и БСА, в которых на одну глобулу белка приходится 330 звеньев поликатиона. В работе [1] при составе смеси  $\phi_{\text{см}} = (N_{\text{ЛПАНа}} / N_{\text{Б}})_{\text{см}} > 160$  мы обнаружили водорастворимые НИПК ЛПАНа-лизоцим, в которых на одну глобулу лизоцима приходится 160 и более звеньев полианиона. Совершенно иначе ведут себя системы белок – сетчатый полиэлектролит. Здесь даже при значительном дефиците молекул белка по отношению к общему числу звеньев в исходной сетке в объеме геля происходит макроскопическое фазовое разделение, т.е. образование слабонабухшего наружного слоя ИПК определенного состава ( $\phi_{\text{ИПК}}$ ), сосуществующего с сильно набухшим исходным гелем, который практически не содержит белка. На схеме II изображены образцы гетерофазного геля, получающиеся при различных составах реакционной смеси  $\phi_{\text{см}}^1 < \phi_{\text{см}}^2 < \phi_{\text{см}}^3$ .

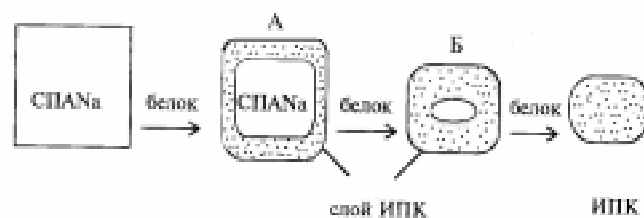


Схема II

Такое макроскопически неравномерное распределение белка в образце геля, по-видимому, отвечает термодинамическому равновесию сосуществующих фаз, поскольку длительное выдерживание гетерогенных образцов А и Б в воде не приводит ни к смешению, ни к размыванию межфазной границы. В то же время добавление в окружающую среду новых порций белка сопровождается увеличением толщины наружного слоя ИПК и соответственно уменьшением массы внутренней области.

Явление макроскопического диспропорционирования характерно для всех изученных реакций заряженных сеток с противоположно заряженными полиионами различной химической природы: полиэлектролитами [8], ионогенными мицеллообразующими ПАВ [9] и белками [1,2].

Интересно, что состав ИПК СПДМАЭМ·EtBr–БСА ( $\phi_{\text{ИПК}}$ ) совпадает с величиной  $\phi^* = |n_+ - n_-|$ , представляющей собой абсолютную величину разности между числом положительно заряженных ( $n_+$ ) и отрицательно заряженных ( $n_-$ ) групп в молекуле белка, которая определяется их аминокислотным составом. Так, если учесть, что в молекуле БСА в нейтральных средах группы гистидина еще не заряжены [12], то  $\phi^* = 60$ , что практически совпадает с  $\phi_{\text{ИПК}}$ . Очевидно, однако, что  $\phi_{\text{ИПК}}$  *a priori* нельзя отождествить с количеством солевых связей  $q$ , образованных единичной молекулой белка со звеньями заряженной сетки. Эти величины были определены при измерении количества низкомолекулярных противоионов, выделившихся в результате взаимодействия карбоксилатных групп белка и протонированных аминогрупп сетки для НИПК ЛПЭВПБ–БСА [11]. Было показано, что только около половины ( $55 \pm 10$ ) отрицательно заряженных групп БСА, определяемых из аминокислотного состава, участвуют в образовании солевых связей с линейным полиэлектролитом. Можно думать, что величина  $q$  существенно не изменится при замене в системе линейного полиамина на слабосшитый полиамин. Отметим, что в изученных ранее системах СПАНа–цитохром *c* и лизоцим количество солевых связей  $q$  в образующихся ИПК также практически совпадало с суммарным зарядом на глобулах белка [1].

Интерполимерные комплексы, стабилизированные системой межцепных солевых связей, разрушаются под действием экранирующих низкомолекулярных солей. Исследования стабильности ИПК СПДМАЭМ·EtBr–БСА при различных концентрациях NaCl показали, что ИПК устойчив вплоть до

$C_{\text{NaCl}} \approx 0.2N$  (равновесные концентрации БСА не превышают  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л). При  $C_{\text{NaCl}} > 0.2N$  происходит интенсивное выделение белка из ИПК в раствор, свидетельствующее о диссоциации ИПК, и при достижении  $C_{\text{NaCl}} \approx 0.3N$  практически весь БСА обнаруживается в растворе, окружающем гель. Полученная величина разрушающей  $C_{\text{NaCl}}$  близка к аналогичной величине для ИПК, образованных линейным полиамином и БСА [13].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карабанова В.Б., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. 1995. **37**. С. 1861.
2. Скобелева В.Б., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // ДАН. 1996. **347**. С. 207.
3. Ilavsky M. // Polimer. 1981. **22**. P. 1687.
4. Асонова Т.А., Разводовский Е.Ф., Зезин А.Б. // Хим.-фарм. жур. 1973. **7**. №8. С. 3.
5. Тристрем Г. / Белки. Т.1. М., 1956. С. 244. *Tristram G.R. / Proteins. / Ed. H. Neurath, K. Bailey. V.1. N.Y., 1953. P. 244.*
6. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии. Т. 1. М., 1981. С. 125. *White A., Handler Ph., Smit E. Principles of biochemistry. V. 1. 1978. P. 125.*
7. Зайцев В.С., Изумрудов В.А., Зезин А.Б. // Высокомолек. соед. 1992. **34**. С. 138.
8. Рогачева В.Б., Превыши В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1988. **30**. С. 2120.
9. Хандурина Ю.В., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1994. **36**. С. 229.
10. Зайцев В.С., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // ДАН СССР. 1992. **322**. С. 318.
11. Изумрудов В.А., Касаикин В.А., Ермакова Л.Н., Мустафаев М.И., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1981. **23**. С. 1365.
12. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. Т. 1. М., 1984. С. 51. *Cantor Ch.R., Schimmel P.R. Biophysical chemistry. V. 1. 1980. P. 51.*
13. Зайцев В.С., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // ДАН СССР. 1992. **323**. №5. С. 890.