

УДК 541.183:532

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕИОННОГО ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА (ТВИН-80) С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Г.П. Ямпольская, Н.М. Задымова, Б.Н. Тарасевич, А.А. Еленский

(кафедра коллоидной химии; e-mail: yampolskaya@colloid.chem.msu.ru)

Охарактеризовано фазовое поведение смеси неионного ПАВ Твин-80 и бычьего сывороточного альбумина (БСА) при широком варьировании соотношений компонентов в водном растворе. Высказано предположение, что в зависимости от соотношений компонентов в системе возникают по крайней мере два типа комплексов: гидрофилизированный и гидрофобный, склонный к коагуляции и выпадению в осадок. Показано, что вторичная структура молекул БСА практически не изменяется при комплексобразовании с Твин-80 при широком варьировании соотношений компонентов.

Введение

Исследование взаимодействия поверхностно-активных веществ (ПАВ) с белками представляет интерес для коллоидной и биологической химии, а также для современных технологий (при производстве пищевых и косметических продуктов, моющих средств с ферментами). Особое значение имеет характеристика взаимодействий ПАВ-белок для бурно развивающегося фармацевтического производства, в частности при разработке наноносителей лекарственных средств пролонгированного действия и с регулируемой доставкой.

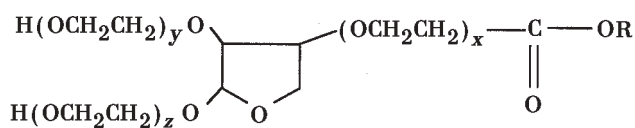
Одним из направлений коллоидной химии является разработка механизмов стабилизации дисперсных систем смесями ПАВ и белков. Индивидуальные компоненты при определенных условиях оказываются эффективными стабилизаторами дисперсий. Однако в практически важных системах белки всегда присутствуют в смеси с ПАВ. Считается, что из-за несовместимости механизмов стабилизации каждым из компонентов устойчивость большинства дисперсных систем в присутствии смеси белок-ПАВ резко снижается. Эта проблема в настоящее время далека от разрешения, поскольку основные принципы взаимодействия ПАВ с белками мало изучены.

В большей степени это касается обладающих нетоксичностью неионогенных поверхностно-активных веществ (НПАВ), использование которых в комплексе с белками представляет интерес для медицины, биотехнологии и фармакологии. Ионогенные ПАВ, образуя комплекс с белками, вызывают денатурацию последних [1], что часто нежелательно. Результаты исследования взаимодействия НПАВ с белками пер-

спективны для разработки новых методов экстракции и очистки белков [2–4], кристаллизации трудно кристаллизующихся белков [5] и создания новых лекарственных форм.

Работа посвящена исследованию комплексообразования НПАВ (Твин-80) с бычьим сывороточным альбумином (БСА).

Твин-80 – полиоксиэтилен(20)сорбитан моноолеат (М.м. 1308 Да; 20 оксиэтиленовых групп; ГЛБ 15,0) относится к классу биоразлагаемых и малотоксичных ПАВ (рис. 1). Это вещество уже нашло применение в фармацевтической и пищевой промышленности, оно также перспективно для получения микроэмульсий, пригодных для селективного извлечения белков [2], для получения наносфер заданного размера, которые можно использовать в качестве носителей лекарственных средств [6]. Твин-80 может выполнять роль протектанта нативной структуры в процессах глубокого замораживания и размораживания белков [7]. БСА (М.м. 67000 Да) – основной компонент плазмы крови, обладающий свойством к гидрофобным соединениям. Имеются отдельные пуб-



$x + y + z = 20$; R – остаток кислоты C17 с одной двойной связью

Рис. 1. Молекула Твин-80 (ККМ = $1,5 \cdot 10^{-4}$ М, число агрегации молекул в мицелле $N = 34$, ГЛБ = 15, $R_h = 4$ нм)

ликации о взаимодействии сывороточного альбумина с низкомолекулярными или высокомолекулярными НПВВ. В работе [8] было показано, что БСА связывает пять молекул пентаэтиленгликоль моно-*n*-додецилового эфира ($C_{12}E_5$) и сильно снижает его точку помутнения. В работе [9] показано образование растворимого комплекса сывороточного альбумина человека (САЧ) с полиэтиленгликолями (ПЭГ), обладающими разными молекулярными массами ($1,3 \cdot 10^4$ – $43 \cdot 10^4$ Да). Размер частиц комплекса зависит от ионной силы раствора и молекулярной массы ПЭГ, но не зависит от соотношения концентраций ПЭГ/САЧ.

В задачу исследования входила оценка фазового поведения смеси Твин-80–БСА в водных растворах, определение размеров частиц комплексов в водной фазе, оценка пенообразующей способности смеси и определение возможного влияния Твин-80 на вторичную структуру молекул БСА. Все исследования проводили при широком варьировании $\nu = [\text{Твин-80}]/[\text{БСА}]$ – соотношения молярных концентраций компонентов ($\nu = 10^{-3}$ –600).

Материалы и методы

В работе использовали Твин-80 (*Ferak*, Франция; ККМ = $1,5 \cdot 10^{-4}$ М [10]); БСА (*Sigma*, США; фракция V, минимальное содержание белка 96%). Концентрацию растворов белка определяли спектрофотометрически по оптической плотности при длине волны $\lambda = 280$ нм

$$C = A_{280} / E_{1 \text{ см}}^{1\%} \cdot l, \quad (1)$$

где A_{280} – оптическая плотность раствора, $E_{1 \text{ см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения, C – концентрация раствора, %, l – толщина кюветы (см) (для БСА $E_{1 \text{ см}}^{1\%} = 6,67$).

Фазовое поведение оценивали визуально, а также по оптической плотности смесей в воде при таких значениях длины волны (380–450 нм), при которых отсутствует поглощение компонентов смеси. Средний гидродинамический радиус (R_h) частиц комплексов определяли методом квазиупругого рассеяния света с помощью 72-канального коррелометра “*Фотокорр-М*”. Анализ автокорреляционной функции флуктуации интенсивности рассеяния проводили методом кумулянтов [11] и регуляризации [12]. Значения R_h вычисляли по уравнению Стокса–Эйнштейна $R_h = kT / 6\pi\eta D_0$, где η – вязкость растворителя, T – температура, D_0 – коэффициент диффузии рассеивающих частиц, k – постоянная Больцмана.

Вторичную структуру БСА и комплексов БСА с Твин-80 оценивали методом ИК-спектроскопии с

Фурье-преобразованием (ИКФП). ИК-спектры регистрировали на спектрометре с преобразованием Фурье “*Nicolet IR-200*” (разрешение $2\text{--}4 \text{ см}^{-1}$, количество сканов 64) методом спектроскопии внутреннего отражения (НПВО), оптический элемент ZnSe, угол падения света 45° .

Для расчета содержания вторичных структур в молекуле БСА использовали полосу амид I. Методические основы использования ИКФП для изучения вторичной структуры белков развиваются с 1986 г. [13], и в последние годы он все чаще используется для этой цели. Метод имеет определенные преимущества по сравнению с рентгеноструктурным анализом (РСА) и ЯМР-спектроскопией, позволяющими получать детальную структурную информацию. С помощью ИК-спектроскопии можно получить “обзорную” (обобщенную) картину структурной организации белка, но при условиях, как правило, недоступных в случае вышеупомянутых методов.

Пенообразование смесями ПАВ с белком исследовали методами Барча и барботированием воздуха через растворы в специально сконструированной ячейке. В этом случае пену получали продуванием воздуха через раствор белка или смеси компонентов, помещенных на стеклянный фильтр с размером пор 5–50 мкм.

Результаты и их обсуждение

На рис. 2 представлены результаты исследования, позволяющие охарактеризовать фазовое поведение смеси БСА–Твин-80 в водном растворе при разных соотношениях компонентов. Вертикальные пунктирные линии (результат визуального наблюдения) позволяют выделить 3 области: I – прозрачные системы ($\nu \leq 10$); II – мутные системы ($10 \leq \nu \leq 100$); III – расслаивающиеся системы с выпадением осадка. Эти данные подтверждены зависимостью (I) оптической плотности (A) от ν . На рис. 2 в качестве примера приведены значения оптической плотности при длине волны 400 нм (A_{400}). Зависимость (2) отражает изменение гидродинамического радиуса R_h частиц комплекса в водной фазе с ростом ν . Точки на оси ординат, отвечающие значению $\nu = 0$, представляют результаты измерений гидродинамического радиуса белка (2) и мицелл Твин-80 (3). Радиус мицелл составляет 4 нм, эффективный гидродинамический радиус БСА – 5 нм, что хорошо согласуется с молекулярными размерами белка. Молекулы белка можно представить призмой, в основании которой находится равносторонний треугольник со сторонами 8 нм, высота призмы 3 нм [14].

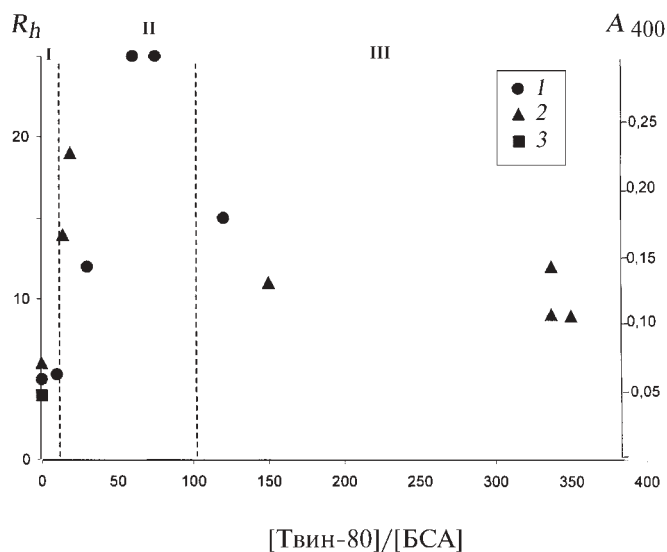
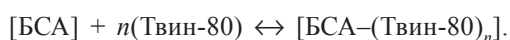


Рис. 2. Фазовая диаграмма водных растворов смесей БСА и Твин-80 при разных значениях v , области: I – $v < 10$, II – $10 < v < 100$, III – $v > 100$

В литературе не обнаружено данных о фазовом поведении смеси НПВ с белками. Представляет интерес сопоставить полученные результаты с литературными данными о фазовом поведении смесей глобулярных белков с ионогенными ПАВ [1]. При взаимодействии положительно заряженных макромолекул белков с анионными ПАВ за счет электростатических взаимодействий возникает нерастворимый комплекс. При увеличении значения v часто наблюдается гелеобразование, например, для смесей лизоцима с октодециловыми анионами [1]. При значительном увеличении v происходит растворение осадка. Области II и III (рис. 2) аналогичны фазовому поведению смесей белков с ионогенными ПАВ (образование нерастворимого комплекса). Ни гелеобразования, ни растворения осадка в изученном интервале v для системы Твин-80–БСА не наблюдалось. В области II (рис. 2) возникает гидрофобизованный комплекс НПВ–белок с признаками коагуляции частиц комплекса. Об этом свидетельствует нарастание мутности (оптической плотности) растворов и увеличение гидродинамического радиуса частиц, присутствующих в водной фазе. При дальнейшем увеличении v (область III) можно думать, что либо образуется комплекс другого состава, предельно гидрофобный, либо при постоянстве состава увеличивается концентрация комплекса:



При значительном увеличении содержания Твин-80 в системе равновесие сдвигается в сторону образования комплекса.

В результате быстрой коагуляции происходит выпадение осадка. Оптическая плотность надосадочной водной фазы уменьшается. Гидродинамические радиусы частиц комплекса в надосадочной жидкости уменьшаются до значений, характерных для перехода системы из области I в область II (12–14 нм). Можно предположить, что при очень малых значениях v (область I на рис. 2) комплекс образуется за счет небольшого числа гидрофобных взаимодействий. На одну молекулу БСА в комплексе может приходиться n молекул Твин-80, где $1 \leq n < 10$. При малых значениях v , по-видимому, в равновесии с комплексом находятся свободные молекулы БСА. Комплекс более гидрофилен, чем молекулы БСА, и частицы остаются растворимыми в воде. По мере возрастания v (до 10) большее число молекул Твин-80 связывается с молекулой БСА, но уже по другому механизму – за счет взаимодействия полиоксиэтиленовых групп Твина-80 с гидрофильными участками на поверхности БСА. Механизм взаимодействия полиоксиэтиленовых групп полиэтиленгликолей с САЧ предложен в работе [8]. В результате взаимодействия возникает гидрофобный комплекс Твин-80–БСА. Частицы проявляют склонность к межчастичной ассоциации (коагуляции), вследствие чего при $v > 10$ гидродинамический радиус растет. При $v > 100$ индивидуальные частицы комплекса в водной фазе находятся в равновесии с осадком (коагуляционно-пептизационное равновесие). Полученные результаты позволяют предложить упрощенную схему комплексообразования в системе Твин-80–БСА (рис. 3, а, б). Значение $v = 10$ для системы Твин-80–БСА является критериальным для изменения механизма взаимодействия. Это вытекает не только из оценок фазового поведения (рис. 2), но и из дополнительных опытов по пенообразованию. При $v = 10$ методом Барча обнаружен синергетический эффект. Концентрации белка и Твин-80 (C_p и C_{Tw}) в индивидуальных растворах компонентов были подобраны так, чтобы образовывались малоустойчивые пены. Время жизни пен в этих случаях не превышало 100 с. В смесях компонентов при сохранении концентрации (C_p и C_{Tw}) каждого из них время жизни пен составляло 2 ч. Эти данные были использованы для получения барботажных пен в ячейке при следующих значениях C_p и C_{Tw} : 1) 10^{-5} и 10^{-4} М; 2) 10^{-4} и 10^{-3} М (в обоих случаях $v = 10$). Полученные пены резко отличались от пен, стабилизированных белками. По продолжительности существования их можно было отнести к устойчивым пенам, но наблюдение показало, что они остаются сферическими, а в определенный момент

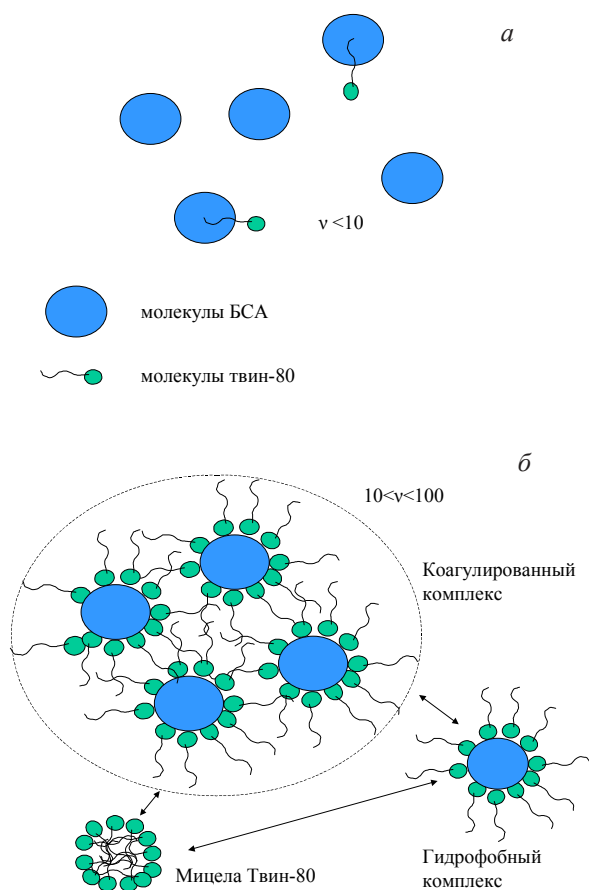


Рис. 3. Взаимодействие Твин-80 с молекулами БСА при: а – $v < 10$; б – $10 < v < 100$

времени происходит спонтанное катастрофическое разрушение. Таким образом, синергетический эф-

фект не был обнаружен при масштабировании системы. Это может быть связано с тем, что синергетический эффект соответствует некоторому значению $v \approx 10$ (не точно $v = 10$). Нахождение точного значения v возможно при исследовании индивидуальных пенных пленок при стабилизации смесями компонентов в узком интервале v , что предполагается сделать в дальнейшем.

Влияние Твин-80 на вторичную структуру БСА в комплексе изучали методом ИКФП при значениях v от 10^{-1} до 250. Более подробно систему исследовали при $v = 10$. Проанализированы контуры полосы амид I для водных растворов смесей компонентов, содержащих 10^{-2} М Твин-80 и 10^{-3} М БСА, а также растворов БСА без добавок Твин-80. Содержание α -спиралей в молекуле БСА в указанной смеси составляло около 50%, β -структур – 41%, тогда как для БСА в водном растворе соответствующие значения составляют 56 и 35% соответственно. Таким образом, взаимодействие БСА с Твин-80 в водном растворе не приводит к существенному перераспределению долей упорядоченных вторичных структур в молекуле БСА. Заметим, что в литературе распространена точка зрения о незначительном влиянии НПАВ (в отличие от ионных ПАВ) на структуру белков, что делает неионогенные ПАВ перспективными для различного рода практических целей. Сделанный вывод справедлив и для более широкой области изменения v (от 10^{-1} до 250), что подтверждается представленными на рис. 4 ИК-спектрами водных растворов смесей при: $v < 100$ (область I и II на рис. 2) (рис. 4, а); $v > 100$ (область III на рис. 2) (рис. 4, б). Интенсивность и ширина полос в

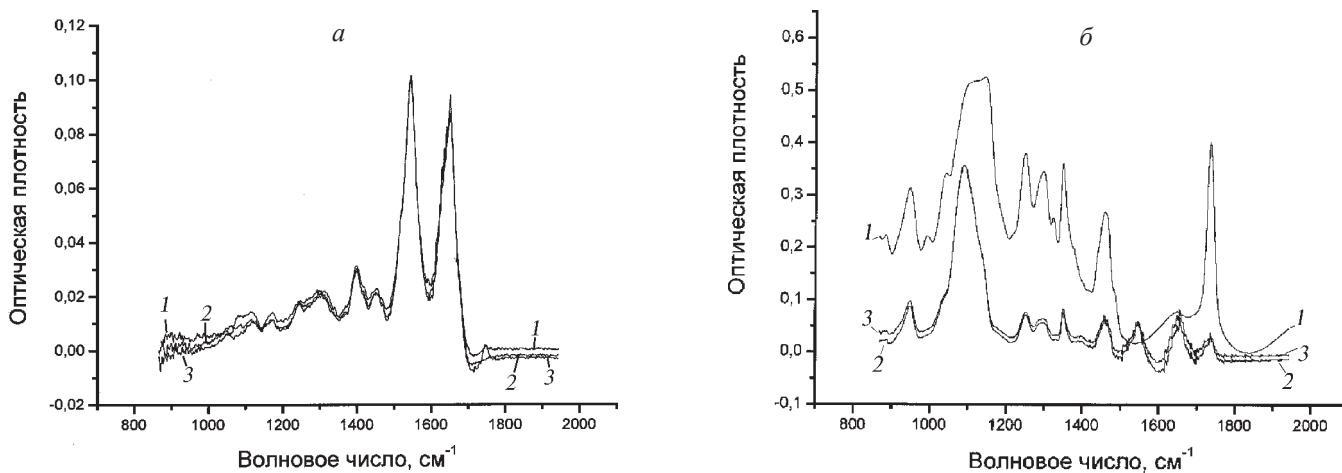


Рис. 4. Спектры поглощения комплексов БСА–Твин-80 при: а – значениях v , равных 0,1; 1 и 20; б – $v > 100$

области амид I и амид II практически не зависят от ν . При 1747 см^{-1} появляется отвечающий валентным колебаниям СО-групп пик свободного, не связанного в комплексе Твин-80. Можно сравнить спектр чистого Твин-80 со спектром осадка и надосадочной жидкости (соответственно верхняя и нижние кривые на рис 4, б). Появление этого пика при $\nu = 0,1$ свидетельствует о том, что в этих условиях комплекс не образуется (рис. 4, а), тогда как при $\nu = 1$ практически весь Твин-80 связан в комплексе с БСА.

Таким образом, охарактеризовано фазовое поведение смеси Твин-80–БСА при широком варьировании соотношений компонентов в водном растворе. Высказано предположение, что в зависимости от соотношений компонентов в системе возникает по крайней мере два типа комплексов: гидрофилизированный и гидрофобный, склонный к коагуляции и выпадению в осадок. Показано, что вторичная структура молекул БСА практически не изменяется при комплексообразовании с Твин-80 при широком изменении соотношений компонентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 04-03-32633

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Holmbery K., Jonson B., Kronbery B., Lindman B. Surfactants and polymers in aqueous solution. J. Wiley & Sons, LTD, 2003.
2. Shion A., Harada M., Takahashi H., Adachi M. // Langmuir. 1997. **13**. № 4. P. 609.
3. Vasudevan M. and Wiencek J.M.// J. Colloid Interface Sci. 1997. **186**. № 1. P. 185.
4. Ashrafizaden S.N., Khoshkbarchi M.K.// Separation Sci. and Technology. 1998. **33**. № 16. P. 2579.
5. Littrell K., Urban V., Tiede D., Thiyagarajan P.// J. Appl. Cryst. 2000. **33**. № 1. P. 577.
6. Heydeurich A.V., Westmeier R., Rederson N., Poulsen H.S., Kristensen H.G.// International J. of Pharmaceutics. 2003. **254**. № 1. P. 83.
7. Hillgren A., Lindgren J., Alden M.// International J. of Pharmaceutics. 2002. **237**. № 1–2. P. 57.
8. Waslgren M., Kedström J., Arnebrant T. // J. Dispersion Sci. and Technology. 1997. **18**. P. 449.
9. Azegami S., Tsuobi A., Yzumi T., Hiruta M., Dubin P.L., Wang B., Kokukuta E. // Langmuir. 1999. **15**. № 4. P. 940.
10. Потешнова М.В., Задьмова Н.М., Руделев Д.С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2004. **45**. № 1. С. 64.
11. Koppel D.E.// J. Chem. Phys. 1972. **57**. № 11. P. 4814.
12. Byler D.M., Susi H. // Biopolymers. 1986. **25**. P. 469.
13. Asanov A. N., DeLucas L. J., Oldham P. B. // J. Colloid Interface Sci. 1997. **191**. P. 222.

Поступила в редакцию 02.08.04

AN INVESTIGATION OF INTERACTIONS BETWEEN NON-IONIC SURFACTANT (TWEEN-80) AND SERUM ALBUMIN BY OPTICAL METHODS

G.P. Yampol'skaya, N.M. Zadymova, B.N. Tarasevich, A.A. Elenskii

(Division of Colloid Chemistry)

Phase behavior of Tween-80 and bovine serum albumin (BSA) mixtures in aqueous solutions was characterized under wide variation of the component ratio. It was proposed the complex formation in such systems of two types in dependence on the component ratio: hydrophilic and hydrophobic. The latter one tends to coagulate and precipitate. The BSA secondary structure was shown does not change practically when a complex with Tween-80 forms under wide variation of the component ratio.