

Исследование и выбор оптимальных двухфазных водных полимерных систем для разделения белков плазмы крови. Павленко И.В., Сальникова Т.А., Михеева Л.М., Меотечкина Н.М. // Научное приборостроение. Приборы и средства автоматизации для научных исследований. Л.: Наука, 1987, с. 57-61.

Исследовано образование двухфазных водных систем на основе отечественных полимеров медицинского назначения: полиглюкина и поливинилпирролидона в растворителях различного солевого состава. Выбрана оптимальная ДВПС для исследования распределения белковых компонентов плазмы крови. Определены коэффициенты распределения двух белков плазмы крови: альбумина и γ -глобулина в выбранной ДВПС, а также коэффициенты распределения цельной донорской плазмы и модельной смеси плазмы. Показано независимое распределение альбумина и γ -глобулина в смеси в ДВПС на основе ПГ-ПВП. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения исследованной ДВПС для разделения альбуминовой и γ -глобулиновой фракций плазмы крови методом ПРХ. Лит. - 2 назв., ил. - 3.

И.В.Павленко, Т.А.Сальникова (НТО АН СССР), Л.М.Михеева, Н.М.Местечкина
(Ин-т элементоорганических соединений АН СССР)

ИССЛЕДОВАНИЕ И ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ДВУХФАЗНЫХ ВОДНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Многообразие задач современной биологии и биотехнологии вызывает развитие и исследование новых методов фракционирования биологически активных веществ.

Особый интерес представляют мягкие методы, не оказывающие разрушающего действия на лабильные биологические объекты. Предложенный Альбертсоном [1] метод распределения в двухфазных водных полимерных системах (ДВПС) является одним из наиболее мягких методов фракционирования и применим к широкому классу биологических объектов — от аминокислот до клеток.

В основе разделения с использованием ДВПС лежит неравномерное избирательное распределение веществ между двумя фазами, представляющими собой водные растворы полимеров. Количественной характеристикой распределения вещества в ДВПС является коэффициент распределения, который определяется как отношение концентраций вещества в верхней и нижней фазах и зависит от всей суммы поверхностных свойств молекулы или частицы. Последнее обстоятельство определяет высокую эффективность метода. Особенно ярко это проявляется при реализации многоступенчатых или непрерывных процессов с применением ДВПС, а именно противоточного распределения и противоточной распределительной хроматографии (ПРХ).

ПРХ с использованием ДВПС может служить экономичным и эффективным способом фракционирования и очистки лабильных биологических объектов в технологических процессах получения.

Значительный интерес представляет возможность применения ПРХ с использованием ДВПС для фракционирования белков плазмы крови, в частности, для разделения альбуминовой и глобулиновой фракций. В настоящее время фракционирование белков плазмы крови при промышленном получении препаратов осуществляется с помощью последовательного осаждения этиловым спиртом при пониженной температуре. Необходимость

проведения процесса при низких температурах создает большие трудности при организации производства. Кроме того, осаждение спиртом вызывает агрегацию белков.

Предпосылки использования ДВПС для фракционирования плазмы содержатся еще в работах Альбертоона [1], изучавшего распределение белков в системах на основе декстрана и полиэтиленгликоля (ПЭГ) и показавшего, что ДВПС оказывает стабилизирующее действие на белковые растворы.

Другой предпосылкой является способ фракционирования белков плазмы с использованием ПЭГ в качестве осаждающего агента. Фракционирование в этом случае ведется при положительной температуре, а опасность агрегации существенно уменьшается. Однако ПЭГ, благодаря высокой поверхностной активности, индуцирует специфические белковые взаимодействия. Найти приемлемый в производственных условиях путь удаления ПЭГ из белковых препаратов не удалось [2].

В связи с этим возникла задача создания ДВПС на основе таких полимеров, которые можно было бы не отделять от белкового препарата.

Разработка и исследование такой системы при условии ее достаточной эффективности позволит использовать ПРХ в технологических процессах получения препаратов крови.

В настоящей работе описаны разработанные и примененные к задаче разделения альбуминовой и глобулиновой фракций плазмы крови двухфазные полимерные системы на основе отечественных полимеров: поливинилпирролидона (ПВП) медицинского низкомолекулярного, молекулярная масса 12 тыс. и полигликина (ПГ), молекулярная масса 70 тыс. Эти полимеры используются в медицинской практике как кровезаменители и кровезагустители.

Для создания ДВПС сначала приготавливались исходные концентрированные растворы полимеров в дистиллированной воде. Приготавливались исходные концентрации ПВП - 50 % и ПГ - 40 %, а также концентрированные растворы солей: 0,04 М фосфатный буфер на 0,6 М NaCl, pH 7,4 и 0,44 М фосфатный буфер, pH 7,4. Концентрации исходных полимеров в воде определялись после высушивания пробы раствора полимера лиофильно и доведения до постоянного веса над P₂O₅. Концентрированные растворы полимеров и солей и вода смешивались в количествах, необходимых для создания ДВПС с заданным полимерным и ионным составом. Для ускорения расслаивания ДВПС пробирки с системами центрифугировали в течение 15 мин. при 4000 об/мин. Затем с помощью шприца производился отбор верхней и нижней фаз каждой системы для анализа.

Исследование ДВПС начиналось с построения бинальной кривой, отделяющей область концентраций гомогенного раствора двух полимеров от области концентраций расслаивающихся ДВПС. Каждую исходную ДВПС разрушали до образования гомогенной смеси, проводя поэтапные изоионные разведения и каждый раз фиксируя вес системы. Учитывая исходные концентрации полимеров в системе, а также исходный и конечный вес системы, рассчитывали конечные концентрации полимеров в системе или в растворе. Полученные таким образом результаты наносили на график (рис.1), по осям которого откладывали концентрации используемых полимеров.

Фазовые диаграммы ДВПС строились по результатам измерений состава фаз. Составы фаз исследованных систем определялись двумя способами. Определением суммарной концентрации двух полимеров по 1) сухому весу, 2) показателю преломления и концентрации ПГ по удельному оптическому вращению.

Измерения удельного оптического вращения проводились с помощью поляриметра "POLAMATS", а измерения показателя преломления - на рефрактометре "RL-2".

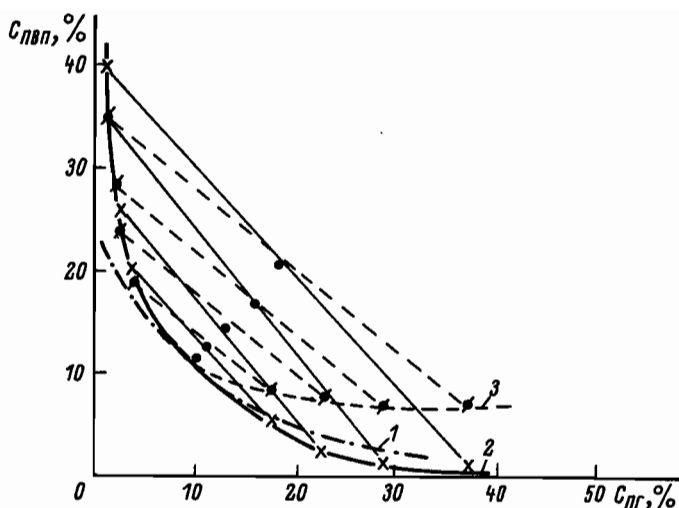


Рис.1. Фазовые диаграммы ДВПС на основе ПГ-ПВП-воды:
 1 - по иононному разбавлению; 2 - по показателю преломления и удельному оптическому вращению; 3 - по сухому весу и удельному оптическому вращению;
 • - последовательные разведения исходной системы.

Для построения фазовых диаграмм проводился анализ состава фаз ряда последовательных иононных разведений исходной системы. Результаты построения диаграмм изображены на рис.1. Из этих данных видно, что наилучшее совпадение бинаодальных кривых имеет место при использовании расчета состава фаз по иононному разбавлению и определения состава фаз по измерению показателя преломления и удельного оптического вращения.

В качестве растворителей для ДВПС были опробованы дистиллированная вода, 0,01 М фосфатный буфер на 0,15 М NaCl, pH 7,4 и 0,11 М фосфатный буфер, pH 7,4. Для опытов по распределению белков была выбрана система на основе 0,11 М фосфатного буфера, pH 7,4, так как в данном растворителе требуются меньшие концентрации полимеров для создания ДВПС и белки в этих условиях имеют большую стабильность в растворе. Для изучения распределения белков плазмы крови была выбрана система следующего состава: 10 % ПГ, 14 % ПВП в 0,11 М фосфатном буфере, pH 7,4 с соотношением объемов верхней и нижней фаз: $V_{\text{в}}/V_{\text{н}}=1,06$.

Было исследовано распределение в выбранной ДВПС альбумина бычьего сывороточного, γ -глобулина бычьего сывороточного и цельной донорской плазмы.

Коэффициент распределения белков определялся следующим образом. Последовательные разведения исходного концентрированного раствора белка вносились в составе буфера или воды в ДВПС индивидуально, системы расолаживались и определялись концентрации белка в верхней и нижней фазах каждой системы. Определение концентрации белка в ДВПС проводилось с помощью образования комплекса белка с реактивом Кумасси G-250 и фотометрирования на длине волны $\lambda = 595$ нм. Для каждого белка строилась зависимость оптической плотности верхней фазы системы ($O_{\text{Д.В}}$) от оптической плотности нижней фазы системы ($O_{\text{Д.Н}}$) и проводилась линеаризация этой зависимости (по методу наименьших квадратов) в ряду последовательно уменьшающихся концентраций образца в системе. Удовлетворительной линейная аппроксимация считается при коэффициенте корреляции $r = 0,98$. Следует отметить, что это условие выпол-

нялось для всех зависимостей, измеренных в настоящей работе. Коэффициент распределения белка в системе определялся из тангенса угла наклона прямой зависимости $O.D._B$ ($O.D._H$) с учетом предварительных разведений верхней (m_B) и нижней (m_H) фаз.

В системе 10 % ПГ, 14 % ПВП в 0,11 М фосфатном буфере, pH 7,4 были определены коэффициенты распределения двух основных компонентов плазмы крови: альбумина и γ -глобулина (см. рис.2.). Из данных рис.2 видно, что эти два белка имеют су-

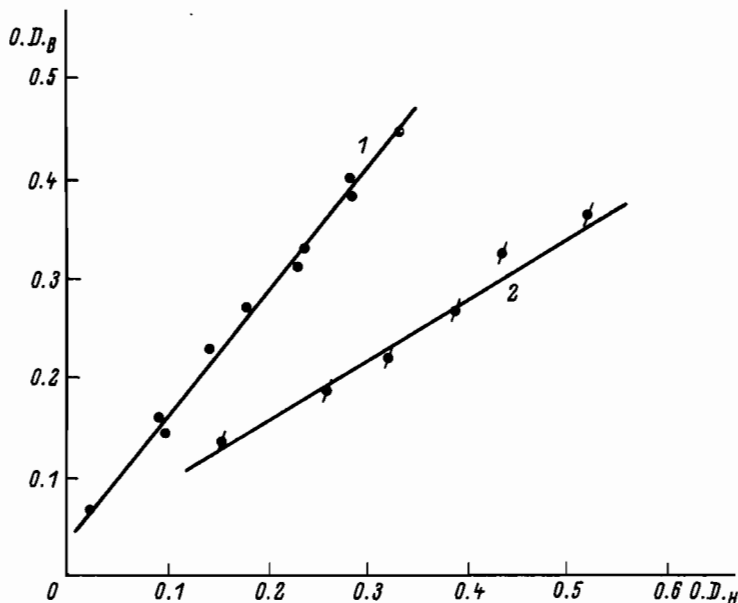


Рис.2. Распределение альбумина (1) и γ -глобулина (2) в ДПС: 10 % ПГ; 14 % ПВП; 0,11 М фосфатный буфер, pH 7,4
 $(m_B/m_H)_{\text{альб.}} = 0,4$ $K_{\text{альб.}} = (0,25 \pm 0,02)$
 $(m_B/m_H)_{\text{глоб.}} = 2,0$ $K_{\text{глоб.}} = (2,48 \pm 0,08)$.

щественно различные коэффициенты распределения. Глобулин достаточно выражено распределяется в верхнюю, ПВП-содержащую фазу ($K_2 = 2,48 \pm 0,08$), а альбумин в основном распределяется в нижнюю, ПГ-содержащую фазу ($K_1 = 0,25 \pm 0,02$), что позволяет использовать предлагаемую ДПС для разделения этих двух белков при условии их независимого распределения в смеси.

С целью проверки независимого распределения двух белковых фракций плазмы было исследовано распределение в данной ДПС модельной смеси альбумина и γ -глобулина с соотношением концентраций, близким к природному, а именно $C_{\text{альб.}}/C_{\text{глоб.}} = 5$. Результаты распределения модельной смеси отображены на рис.3.

Одновременно в предположении независимого распределения двух белков в ДПС был рассчитан суммарный коэффициент распределения модельной смеси двух белков $K_{\Sigma \text{ теор.}}$ по формуле

$$K_{\Sigma \text{ теор.}} = \frac{\alpha \lambda K_1 + K_2}{\alpha \lambda + 1},$$

где

$$\alpha = \frac{C_{01}}{C_{02}}; \quad \lambda = \frac{K_2 + 1}{K_1 + 1};$$

K_1 и K_2 - коэффициенты распределения в ДВПС альбумина и γ -глобулина соответственно; C_{O1} и C_{O2} - концентрации введенных в систему альбумина и γ -глобулина соответственно.

В нашем случае для $\alpha = 5$; $K_1 = 0,25 \pm 0,02$; $K_2 = 2,48 \pm 0,08$ теоретически рассчитанный $K_{\Sigma \text{ теор.}} = 0,399$.

Из данных на рис.3 можно видеть, что значение экспериментально определенного

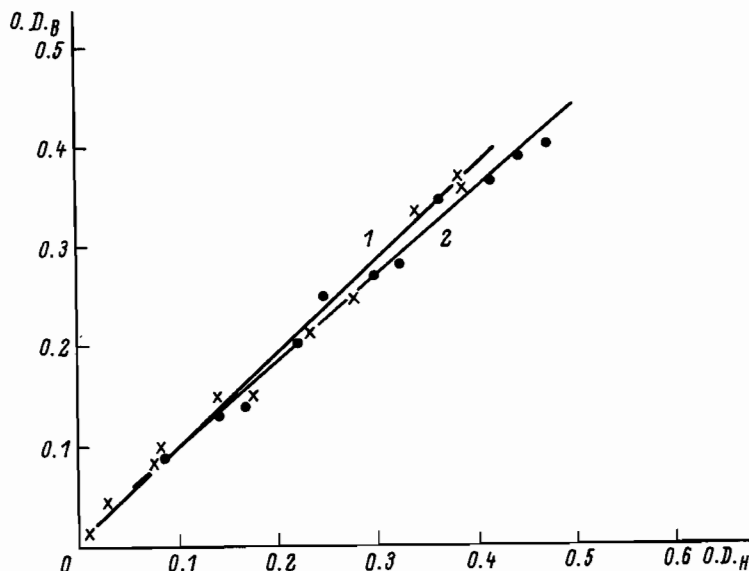


Рис.3. Распределение цельной донорской плазмы (1) и модельной смеси (2) в исследованной ДВПС, состав системы см.рис.2.

$(m_B/m_H)_{\text{пл.}} = 1/3$ $K_{\text{пл.}} = (0,46 \pm 0,02)$
 $(m_B/m_H)_{\text{мод.}} = 0,5$ $K_{\text{мод.}} = (0,41 \pm 0,02)$.

коэффициента распределения модельной смеси $K_{\Sigma \text{ эксп.}} = (0,41 \pm 0,02)$ хорошо согласуется с теоретическим расчетом, следовательно, независимо распределение двух белков плазмы крови в исследованной ДВПС подтверждается. Также был определен коэффициент распределения цельной донорской плазмы, $K_{\text{пл.}} = 0,46 \pm 0,02$ (рис.3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Альбертсон П. А. Разделение клеточных частиц и макромолекул. М.: Мир, 1974.
2. Мерзлов В. П., Русанов В. М., Скобелев Л. И. К вопросу о применении полиэтиленгликоля при фракционировании плазмы крови человека // "Лечебные препараты белков плазмы". М., 1981.