

II

ADSORPCIJA ALBUMINA IZ LJUDSKOG KRVNOG SERUMA NA TALOGE KALCIJ HIDROKSIAPATITA

V. Hlady i H. Füredi-Milhofer
Institut „Ruđer Bošković“, Zagreb

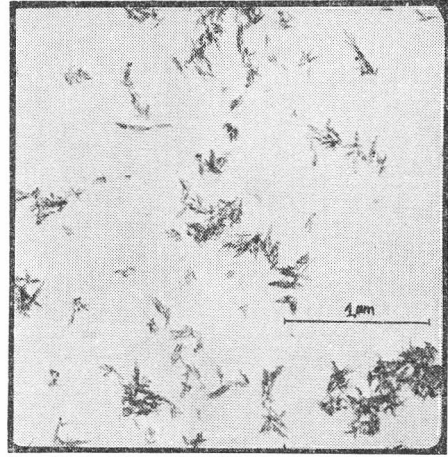
sažetak

Adsorpcija albumina iz ljudskog krvnog seruma na taloge kalcij hidroksiapatita praćena je radiometrijski u širokom pH području od 6.5 do 11.5. Količina adsorbiranog proteina se smanjuje s porastom pH tekućeg medija i uvjetovana je nabojem površine hidroksiapatita i molekule albumina kojeg one manifestiraju ovisno o pH i ionskoj jakosti tekućeg medija. Dobivene adsorpcione izoterme nisu Langmuir-tipa, nego pokazuju diskontinuitete stepenaste prirode.

Kalcij hidroksiapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ /CaHA/ je prototip osnovnog anorganskog dijela kostiju i zubi. Biološki apatiti kao što su koštani mineral i zubni enamel su u stalnom kontaktu s tjelesnim tekućinama. Albumin iz ljudskog krvnog seruma /HSA/ je odabran kao model biopolimera u ispitivanju interakcija proteina i hidroksiapatita.

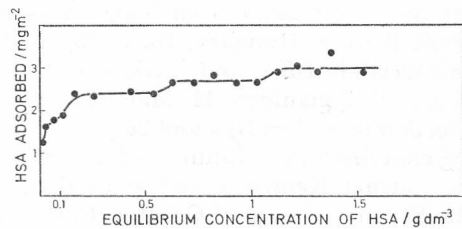
Stehiometrijski CaHA je priređen titracijom koncentrirane otopine H_3PO_4 ili KH_2PO_4 u zasićenu otopinu $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Talog je karakteriziran kemijskom analizom: Ca = 36.3 tež. %, P = 16.3 tež. %, $\text{CO}_3 = 1.2$ tež. %, $\text{Ca}/\text{P}_{\text{kor. CO}_3} = 1.67$.

Tečući medij upotrebljen u eksperimentima adsorpcije i desorpcije bio je 0.01 molarna otopina kalij nitrata zasićena s obzirom na CaHA kod raznih pH. Te otopine (L-otopine) priređene su uravnotežavanjem uz CaHA tokom 60 dana, sa sličnim omjerom kruto/tekuće 1:5 kao kod eksperimenata adsorpcije. Specifična površina CaHA određena BET metodom iznosila je ovisno o pH od 58.2 do 67.0 m^2g^{-1} (pH od 11.5 do 7.0).



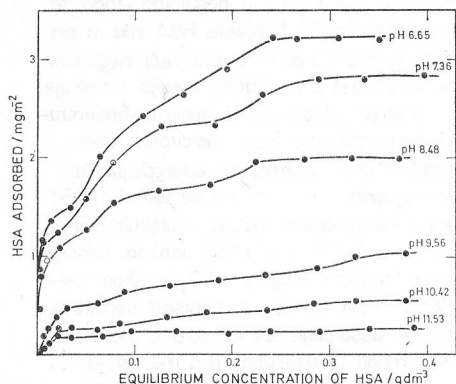
slika 1. kristali CaHA

Morfologija CaHA ustanovljena je transmissionim elektronskim mikroskopom Philips EM-300 G. Kristali su prosječnih dimenzija 18 nm x 18 nm x 86 nm, slični apatitu u zubnoj caklini. Eksperimenti adsorpcije izvedeni su na slijedeći način: alikvot suspenzije CaHA i odvagana količina HSA odvojeno su smješteni u L-otopine nekog pH. Nakon 60 minuta smještane su



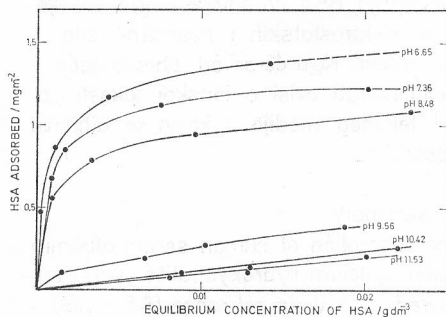
slika 2. adsorpciona izoterma HSA na talogu CaHA kod pH 7.95, KNO_3 0.01 mol dm^{-3} , 25°C, vrijeme uravnotežavanja 4 sata

zajedno i uravnotežavane 4 sata na 25°C. Uzorak je tada centrifugiran, dekantiran, a kruta faza oprana tri puta s L-otopinom. Količina HSA određena je u supernatantu i na talogu radiometrijskim mjerenjem s ^{131}I -HSA.



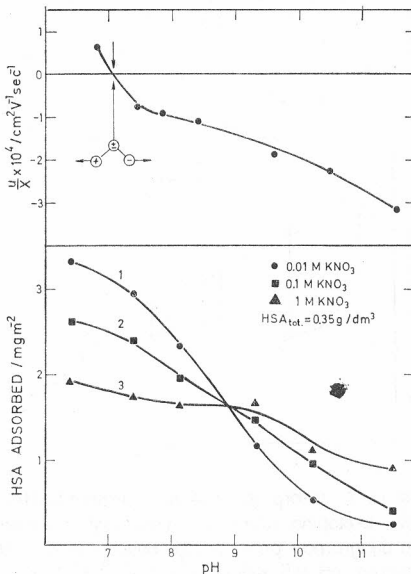
slika 3. adsorpcione izoterme HSA na talozima CaHA kod raznih pH, 25°C, KNO₃ 0.01 mol dm⁻³, vrijeme uravnotežavanja 4 sata

Adsorbirani protein je hidroliziran i talog otopljen u HCl. Totalni Ca je određen pomoću EDTA i iz toga je izračunata količina taloga i njegova ukupna površina

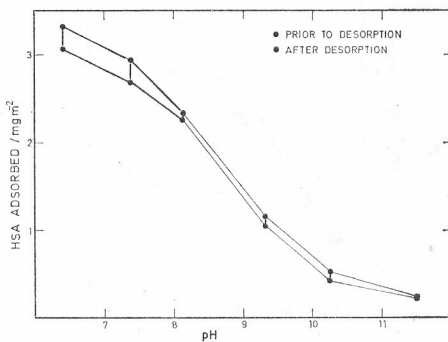


slika 4. početni dijelovi adsorpcionih izotermi HSA na talozima CaHA kod raznih pH, KNO₃ 0.01 mol dm⁻³, 25°C, vrijeme uravnotežavanja 4 sata

Adsorpcione izoterme su stepenaste prirode i pokazuju ovisnost o pH i na platou i kod početnih nagiba gdje je mogućnost lateralnih interakcija među adsorbiranim molekulama proteina minimalna.

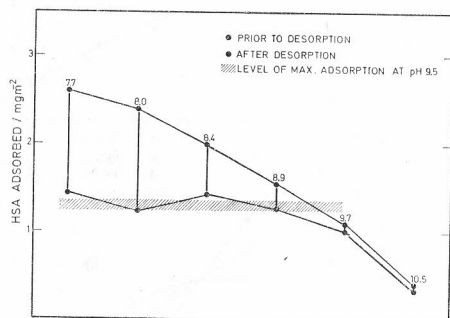


slika 5. elektroforetske pokretljivosti CaHA (gornji dio) i adsorpcija HSA na talogu CaHA (donji dio) u ovisnosti o pH, 25°C, vrijeme uravnotežavanja 4 sata



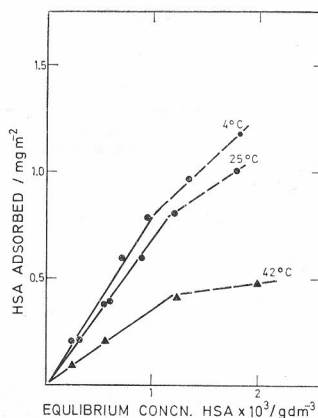
slika 6. adsorpcija HSA na talozima CaHA u ovisnosti o pH prije i poslije desorpcije s L-otopinama istih pH kao kod adsorpcije, KNO₃ 0.01 mol dm⁻³, 25°C, vrijeme desorpcije 18 sati

Ireverzibilnost prema razrjeđenju nađena je prilikom dodavanja istih L-otopina na taloge s adsorbiranim HSA (adsorpcija na platou).



slika 7. adsorpcija HSA na talozima CaHA iz L-otopina raznih pH vrijednosti (označeno u dijagramu) prije i poslije desorpcije s L-otopinom pH 9.5, KNO_3 0.01 mol dm^{-3} , 25°C , vrijeme desorpcije 18 sati

Desorpcija je moguća s otopinama višeg pH sve do nivoa maksimalne adsorpcije iz otopina tog pH.



slika 8. početni nagibi adsorpcionih izoterma HSA na talozima CaHA kod raznih temperatura, KNO_3 mol dm^{-3} , pH 7.36, vrijeme uravnotežavanja 18 sati

Utjecaj temperature na početne nagibe adsorpcionih izoterma indicira negativnu toplinu adsorpcije.

Površina CaHA je prema rezultatima mjerenja elektroforetskih pokretljivosti pozitivno nabijena ispod pH 7, a negativno iznad te vrijednosti (sl. 5). Molekula HSA ima u pH području od 6.5 do 11.5 sve veći negativni naboj. Porast pH tekućeg medija uzrokuje smanjenje adsorpcije u cijelom koncentracijskom području HSA indicirajući tako elektrostatski utjecaj na adsorpciju. Taj utjecaj slabi porastom ionske jakosti (sl. 5) zbog kompenzacije naboja molekule HSA i površine CaHA s K^+ i NO_3^- ionima. Adsorpcija iz 1 mol dm^{-3} otopine KNO_3 je skoro neovisna o pH i može se pripisati nepolarnim silama adsorpcije. Za elipsoidnu molekulu HSA mogu se izračunati dva monosloja: za „polegnute“ molekule kod adsorpcije od $2.1 \text{ mg HSA m}^{-2}$ i za „uspravne“ molekule kod $7.3 \text{ mg HSA m}^{-2}$. Kod adsorpcije HSA na CaHA je vjerovatnija „polegnuta“ orijentacija HSA kod maksimalne adsorpcije od 3 mg HSA m^{-2} . Adsorpcione izoterme nisu Langmuir-tipa, nego pokazuju stepenasti oblik. Moguće objašnjenje je razmotavanje molekule adsorbiranog proteina t.j. razlika u konformaciji HSA u otopini i na površini CaHA.

Rezultati eksperimenata ukazuju da je adsorpcija HSA na taloge CaHA posljedica elektrostatskih i nepolarnih sila adsorpcije. Koja će se od tih sila jače manifestirati ovisi o ionskoj jakosti i o pH tekućeg medija iz kojeg se albumin adsorbira.

summary

The adsorption of human serum albumin upon calcium hydroxyapatite was followed in a wide pH range (6.5 - 11.5). The amount of adsorbed protein decreased with increasing pH of liquid medium and the adsorption was a function of hydroxyapatite surface charge and of albumin molecule charge, which both depended of pH and ionic strength. The adsorption isotherms were not Langmuir-type but showed distinct steps.