

Адсорбция свободного гемоглобина электрохимически модифицированными активированными углями. Сообщение 1. Водные растворы

М. Ш. Хубутия,^a А. Ю. Цивадзе,^b Г. Р. Гараева,^{a@} В. Н. Андреев,^b М. М. Гольдин^a

^aНИИ СП им. Н.В. Склифосовского, 129010 Москва, Россия

^bИФХЭ им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071 Москва, Россия

@E-mail: garaevagu@gmail.com

Исследована адсорбция свободного гемоглобина (Hb) из водных растворов на активированных углях (АУ), модифицированных ионами Cu^{2+} , а также полипирролом (ПП), содержащим анион I в качестве допанта. Обнаружена зависимость адсорбционной активности модифицированных углей от природы модифицирующего агента и АУ.

Ключевые слова: Гемоглобин, модифицирование, активированный уголь, полипиррол, электрополимеризация.

Adsorption of Free Hemoglobin by Electrochemically Modified Activated Carbons. Part 1. Aqueous Solutions

Mogeli Sh. Khubutiya,^a Aslan Yu. Tsivadze,^b Guzel R. Garaeva,^{a@}
Vladimir N. Andreev,^b and Mark M. Goldin^a

^aN.V. Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine, 129010 Moscow, Russia

^bA.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS, 119071 Moscow, Russia

@Corresponding author E-mail: garaevagu@gmail.com

Acute loss of blood is one of main factors for severity of injury. Patients with acute loss of blood need full-grown compensation for mass loss of blood. But mentioned full-grown compensation by infusion of plasma-substituting solutions is insufficient because infusion of natural components of blood is necessary. However it is well known that more then one liter volume of hemotransfusion can lead to transfusion complications. Therefore the reinfusion (the return of patient's blood from his peritoneal cavity to vascular circulatory system) possesses certain of advantages. At the same time the reinfusion of blood leads to mechanic destructions of part of erythrocytes. That "technological" defect of the reinfusion leads to the pollution of plasma selected from blood of patient by free hemoglobin. Because free hemoglobin is a toxicant for organism the development of plasma purification is actual problem now. It was proposed that activated carbons (AC) could be used as potential object for plasma purification because proteins adsorbs on AC. It was proposed too that ligands immobilized on the surface of AC can increase the kinetics of free hemoglobin adsorption. Thus it was decided to develop the method for adding of activated carbon the selectivity with respect to free hemoglobin by combination of electrochemical and affine methods. Investigation of free hemoglobin adsorption from aqueous solutions on initial unmodified activated carbons VSK-A and SKT-6A was first step of present research. It was founded that kinetics of adsorption of free hemoglobin on mentioned carbons is negligible. Then ions I as a «soft» ligand were immobilized on surface of carbons in order to increase the kinetics of adsorption because the «soft» ligand can form the complex compounds with ion Fe^{2+} of hemoglobin. In addition ion Cu^{2+} can form the complex with proteins of hemoglobin, therefore ion Cu^{2+} was immobilized on carbon surface too. It was obtained that a modification of the surface of SKT-6A by ion I as a dopant of electroconductive polymer polypyrrole (PPy) had lead to significant increasing in adsorption activity towards free hemoglobin. PPy covers

less than 1% of AC surface area, however the effect of PPy/I was much more as compared with ion I immobilized on the surface of carbon SKT-6A. The immobilization of Cu²⁺-ions on surface of the same activated carbon SKT-6A had lead to more significant increasing of adsorption kinetics of free hemoglobin: the rate of adsorption increased in sixteen times as compared with unmodified AC and in 4.7 times as compared with modified carbon [SKT-6A/PPy/I]. The modification of AC VSK-A by Cu²⁺-ions had lead to much more effect: the rate of adsorption of free hemoglobin increased in 47 times as compared with initial unmodified VSK-A and in 11.5 times as compared with adsorption rate on modified carbon [VSK-A/PPy/I]. Thus, methods of electrochemical modification of activated carbons by electropolymerization of PPy with ions I as dopants and by electrochemical adsorption of Cu²⁺ ions under potentials more positive than + 380 mV were developed. It was obtained that a modification of activated carbons by «soft» ions and ligands lead to increase the rate of free hemoglobin adsorption significantly as compared with unmodified activated carbons. A covering of less than 1 % of activated carbon surface by PPy with I ion as a dopant lead to significant increasing of adsorption activity of modified carbon towards free hemoglobin. It was obtained that modified carbon [SKT-6A/Cu²⁺] and [VSK-A/Cu²⁺] are most effective sorbents for free hemoglobin in aqueous solutions. The rate of adsorption for free hemoglobin on modified carbon [AC/Cu²⁺] is more than [AC/PPy/I] at few times. It is important that adsorption activity of synthesized modified carbons depend on nature of modifying agent and nature of activated carbon. The investigation of free hemoglobin adsorption from aqueous solutions demonstrated the effectiveness of activated carbons modified by «soft» ions and ligands. It is necessary to investigate the behavior of mentioned modified carbons for development of method of plasma purification from free hemoglobin suitable for medical clinic conditions. The data obtained in aqueous solutions allow us to select modified carbons [SKT-6A/Cu²⁺] and [SKT-6A/PPy/I] as most perspective materials to realize the method of plasma purification from free hemoglobin.

Keywords: Hemoglobin, modification, activated carbon, polypyrrole, electropolymerization.

Введение

При травмах различной этиологии острая кровопотеря - один из основных факторов, определяющих тяжесть состояния пострадавшего.^[1] В таких случаях быстрое восстановление объема циркулирующей крови является первоочередной задачей в комплексе лечебных мероприятий. Для полноценной компенсации массивной кровопотери инфузии плазмозамещающих растворов недостаточно, необходимо введение и естественных компонентов самой крови. С этой целью обычно используют плазму доноров. Но переливание донорской крови, по сути, является аллотрансплантацией, то есть трансплантацией, при которой донором трансплантата является генетически и иммунологически другой человеческий организм. Известно, однако, что проведение аллотрансплантации в объемах, превышающих 1 л плазмы, сопряжено с высоким риском трансфузионных осложнений.

Реинфузия, или возврат в кровеносное русло собственной крови пациента (так называемой аутокрови), излившейся в серозные полости при повреждениях внутренних органов, имеет ряд бесспорных преимуществ перед переливанием чужеродной плазмы. Однако, одним из «технологических» недостатков метода реинфузии является механическое разрушение части эритроцитов и загрязнение отобранной плазмы свободным гемоглобином, который, как известно, является токсичным для организма.^[2-4] Таким образом, создание метода очистки плазмы аутокрови от свободного гемоглобина является весьма актуальной проблемой.

Для решения этой проблемы рассмотрим состав молекулы гемоглобина. Известно, что он состоит из небелковой части (гем) и белковой части (глобин). Известно также, что белки адсорбируются на

активированных углях (АУ), поэтому было предположено, что угли можно использовать в качестве потенциального сорбента.

Кроме того, было предположено, что использование лигандов, иммобилизованных на угле, также поможет увеличить кинетику адсорбции свободного гемоглобина.

Таким образом, было решено разработать метод синтеза сорбентов из промышленных марок активированных углей (СКТ-6А и ВСК-А), селективных по отношению к свободному гемоглобину, с помощью сопряжения электрохимических и аффинных методов.

Методика исследований

Электрополимеризация пиррола на поверхности активированных углей проводилась в потенциостатическом режиме, использован потенциостат IPC Pro MF (ООО НТФ «Вольта»). Синтез полипиррола (ПП) проводили в установке, представленной на Рисунке 1. Установка погружалась в электролит состава: 0,10 моль/л KI и 0,10 моль/л пиррол (разбавленный электролит) или 0,10 моль/л KI и 0,36 моль/л пиррол (концентрированный электролит). Электрополимеризация пиррола проводилась при потенциале 800 мВ в течение 1 часа, измерения потенциала производились относительно насыщенного хлорсеребряного электрода сравнения. Значение потенциала выбиралось в соответствии с литературными данными.^[5,6] В качестве вспомогательного электрода использовался листовой термически расширенный графит (ТРГ). После проведения электрополимеризации модифицированные образцы углей хранились в фосфатном буферном растворе при pH = 7,40.

Приближенный расчет доли поверхности активированного угля, занятой полипирролом, проводился по аналогии с^[7] по приближенной формуле (5) со следующими допущениями: 1) принимали расположение цепочки полимера на поверхности, исходя из расположения молекул пиррола в цепочке полимера

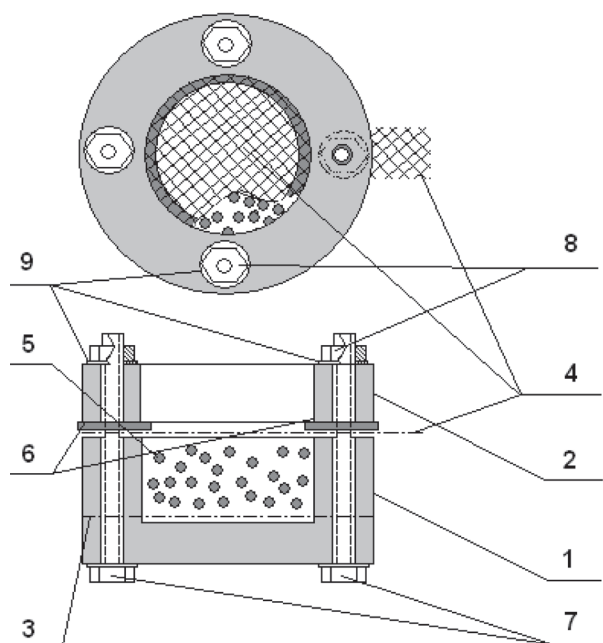


Рисунок 1. Установка для электрополимеризации пиррола на поверхности активированного угля: 1 – корпус, 2 – прижимная крышка, 3,4 – сетка-токоподвод из нержавеющей стали, 5 – гранулы угля в цилиндрической камере, 6 – резиновая прокладка, 7 – тефлоновые болты, 8 – тефлоновые гайки, 9 – тефлоновые шайбы.

в плоской проекции относительно поверхности угля, когда площадь, занимаемая молекулой пиррола максимальна; 2) расположение цепочки полимера на поверхности угля также рассматривали в виде плоской проекции; 3) молекула пиррола рассматривалась в виде правильного пятиугольника с длиной стороны $L = 0,14$ нм.

Учитывая сделанные допущения, подчеркнем, что целью приведенных ниже расчетов являлась оценки влияния степени заполнения полипиррола на механизм адсорбции гемоглобина, то есть расчеты ориентированы на измерение порядка величины поверхности угля, занимаемой полипирролом.

Таким образом, радиус окружности (R), описанной вокруг правильного пятиугольника составляет:

$$R = 0,85065 \cdot L = 0,11909 \text{ (нм)} \quad (1)$$

Площадь круга с таким радиусом принималась за площадь молекулы (S_m):

$$S_m = \pi \cdot R^2 = 0,0445 \text{ нм}^2 = 4,45 \cdot 10^{-20} \text{ м}^2. \quad (2)$$

Количество молекул пиррола (N), электрохимически прореагировавших при прохождении количества электричества (Q), находили по формуле:

$$N = \nu \cdot N_A = QN_A / nF, \quad (3)$$

где ν – количество вещества, вступившего в реакцию, моль, рассчитанное согласно первому закону Фарадея; $N_A = 6,02 \cdot 10^{23}$ – число Авогадро (моль⁻¹); Q – количество прошедшего электричества, Кл; n – количество электронов, участвующих в реакции электрополимеризации принимали равным 2, согласно данным [8]; $F = 96500$ – постоянная Фарадея, Кл/моль.

Таким образом, поверхность, занимаемая полипирролом $S_{\text{пп}}$, составит:

$$S_{\text{пп}} = S_m \cdot N \quad (4)$$

Разделив занимаемую ПП поверхность на общую поверхность активированного угля $S_{\text{ау}}$, получим долю поверхности (W , %), занятой ПП:

$$W = S_{\text{пп}} / S_{\text{ау}} \quad (5)$$

Адсорбция ионов Cu^{2+} на поверхности активированных углей проводилась путем предварительной поляризации углей до диапазона потенциалов от +450 до +550 мВ с помощью электрохимической обработки согласно [9]. Перед адсорбцией ионов Cu^{2+} угли многократно промывались дистиллированной водой, после чего они погружались в 0,10 моль/л CuSO_4 . После контакта в течение 30 мин угли промывались дистиллированной водой, а затем хранились в растворе 0,10 моль/л Na_2SO_4 . Важным было иммобилизовать медь на поверхности в виде двухвалентного катиона. Это было подтверждено с помощью методики, описанной в [9].

Водные растворы свободного гемоглобина готовили путем разбавления эритроцитарной массы физиологическим раствором до концентрации свободного гемоглобина от 0,4 до 1,5 г/л. Для этого 1 мл эритроцитарной массы разводили в 9 мл дистиллированной воды (с целью разрушения эритроцитов), затем доводили объем до 200 мл физиологическим раствором. Измерения адсорбции свободного гемоглобина проводили в 10 мл раствора, содержащего свободный гемоглобин, приведенного в контакт с образцом модифицированного угля в соотношении 1/10 в течение часа при перемешивании. Указанные в работе величины скорости адсорбции приведены в расчете на 1 грамм модифицированного активированного угля. Определение концентрации свободного гемоглобина проводили согласно [10]. Значения потенциалов в работе приведены относительно насыщенного хлорсеребряного электрода сравнения.

Результаты и их обсуждение

В соответствии с поставленными задачами первоначально была исследована адсорбция свободного гемоглобина из водного раствора на немодифицированных активированных углях ВСК-А и СКТ-6.

В Таблице 1 приведены данные по адсорбции свободного гемоглобина из водного раствора указанными углями.

Таблица 1. Адсорбция свободного гемоглобина из водного раствора в течение 1 часа на углях ВСК-А и СКТ-6А.

Название угля	Убыль гемоглобина	
	%	мг Нб/час
ВСК-А	2,23	0,71
СКТ-6А	6,26	2,34

Как видно из этих данных, адсорбция гемоглобина исходными углями из раствора крайне незначительна, а низкие величины скорости адсорбции не позволяют рассчитывать на использование немодифицированных углей для очистки плазмы, т.к. процесс реинфузии должен продолжаться в клинических условиях не более 1 часа. Поэтому следующим этапом работы стало увеличение скорости адсорбции свободного гемоглобина с помощью

иммобилизации на углях модифицирующих агентов со специфическим сродством к молекуле гемоглобина.

Для выбора указанных агентов были проанализированы строение и свойства молекулы гемоглобина. Если гем (Рисунок 2) рассматривать в качестве комплекса «мягкого» комплексообразующего иона железа и «мягкого» лиганда порфирина, можно прийти к выводу о возможности придания селективных свойств углям с помощью иммобилизации на их поверхности «мягких» лигандов, способных координироваться с ионом железа из комплекса железа с порфирином. В этом случае можно использовать шестое координационное положение железа, которое локализовано в так называемом «кармане для лигандов» в молекуле свободного гемоглобина (зона А, Рисунок 3).

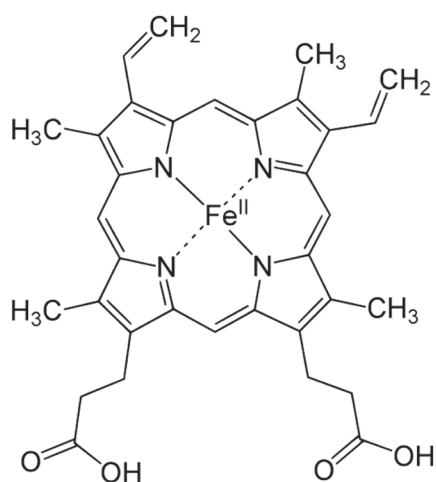


Рисунок 2. Структурная формула молекулы гема.

Среди группы «мягких» лигандов^[11, 12] был выбран ион йодида. Выбор был обусловлен высоким сродством «мягкого» иона железа в составе гема к другим «мягким» лигандам.

Другим путем придания угольным сорбентам селективности по отношению к свободному гемоглобину является использование свойства ионов тяжелых металлов прочно связываться с белками, поскольку в состав гемоглобина входит белковая часть (зона Б, Рисунок 3). В качестве такого иона был выбран ион Cu^{2+} .

Оказалось, что модифицирование поверхности угля СКТ-6А йодид ионом действительно привело к увеличению его адсорбционной активности по отношению к свободному гемоглобину. Однако, скорость адсорбции свободного гемоглобина из водных растворов на модифицированном угле составила всего 3,10 мг/час против 2,34 для исходного угля СКТ-6А, то есть использование йодида оказалось не эффективным.

Для того чтобы усилить действие йодида, было решено ввести его в виде допанта в цепочку электропроводного полимера – полипиррола,^[13] поскольку ранее были обнаружены электрокаталитические свойства ПП.^[14]

Электроосаждение полипиррола с йодид ионом в качестве допанта проводилось на углях СКТ-6 и ВСК-А. Также было исследовано влияние концентрации пиррола в электролите на адсорбцию свободного гемоглобина (Рисунок 4).

Было измерено количество электричества, пошедшее на электрополимеризацию в расчете на 100%-ный выход по току, и с помощью формулы (5) вычислена доля поверхности активированного угля, занимаемая ПП (Таблица 2).

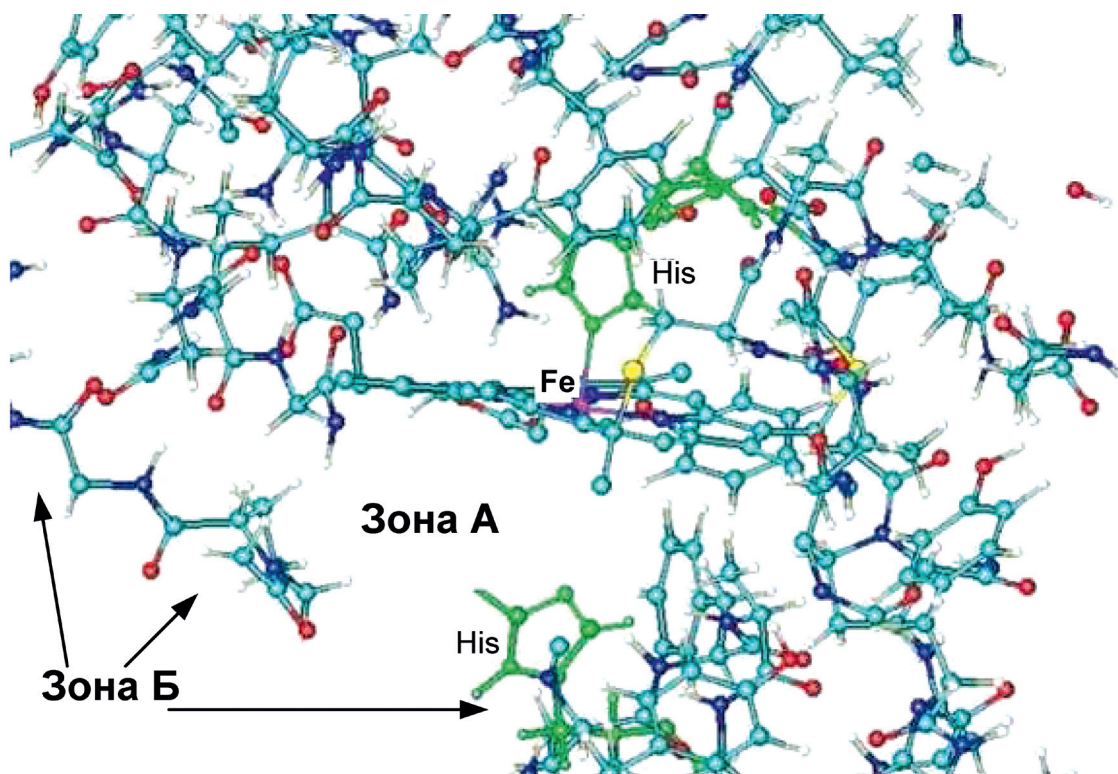


Рисунок 3. Гем гемоглобина и его ближайшее аминокислотное окружение (глобин).^[15]

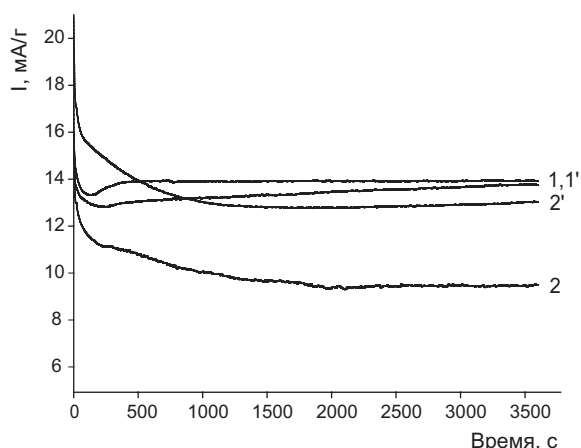


Рисунок 4. Электрополимеризация пиррола на поверхности активированных углей: 1, 1' – СКТ-6, 2, 2' – ВСК-А. Электрополимеризация проводилась из растворов состава: 1, 2 – 0,10 моль/л KI + 0,10 моль/л пиррол и 1', 2' – 0,10 моль/л KI + 0,36 моль/л пиррол.

Таблица 2. Расчет доли поверхности активированных углей, занимаемой пленкой ПП.

Состав модифицированного угля	Q, Кл	W, %
СКТ-6А/ПП/Г разб.	62,01	0,69
СКТ-6А/ПП/Г конц.	59,78	0,67
ВСК-А/ПП/Г разб.	52,36	0,50
ВСК-А/ПП/Г конц.	69,98	0,66

Как видно из этих данных, концентрация пиррола в электролите не оказывает существенного влияния на величину доли поверхности, занимаемой ПП. Особо подчеркнем, что доля поверхности АУ, занятая ПП, весьма мала (менее 1 %).

Адсорбция свободного гемоглобина из водного раствора проводилась в день получения модифицированных углей и на следующий день после получения для оценки возможностей хранения. Адсорбционные характеристики полученных модифицированных углей приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Адсорбция свободного гемоглобина из водного раствора в течение 1 часа на модифицированных углях [СКТ-6А/ПП/Г] и [ВСК-А/ПП/Г].

Состав модифицированного угля	Убыль гемоглобина	
	%	мг Нб/час
СКТ-6А/ПП/Г разб.	24,9	7,40
	26,0	7,70
СКТ-6А/ПП/Г конц.	25,0	8,00
	21,0	6,70
ВСК-А/ПП/Г разб.	9,1	2,30
	8,8	2,20
ВСК-А/ПП/Г конц.	8,6	2,30
	11,0	2,90

Из данных в Таблице 3 видно, что адсорбция свободного гемоглобина модифицированными углями на основе двух марок углей существенно не зависела от концентрации пиррола в электролите; поэтому в дальнейших экспериментах использовался электролит состава: 0,10 моль/л KI + 0,10 моль/л пиррол.

Максимальная скорость адсорбции свободного гемоглобина среди изученных модифицированных активированных углей обнаружена на [СКТ-6А/ПП/Г]. Скорость адсорбции на нем достигала величины 8,00 мг/час, что в 3,4 раза больше, чем на немодифицированном угле СКТ-6А. Максимальная скорость адсорбции модифицированным углем [ВСК-А/ПП/Г] составляла 2,90 мг/час, что в 4 раза выше значения скорости адсорбции на немодифицированном ВСК-А.

Таким образом, занимая менее 1 % поверхности АУ, ПП, допированный йодид ионом, значительно увеличил скорость адсорбции свободного гемоглобина по сравнению с немодифицированными углями и по сравнению с АУ, на поверхность которых непосредственно нанесен йодид ион.

Как указано выше, другим вариантом модифицирования активированного угля с целью придания ему селективности по отношению к адсорбции свободного гемоглобина является иммобилизация ионов Cu^{2+} на поверхности углей СКТ-6А и ВСК-А. Адсорбционные характеристики углей, модифицированных ионами Cu^{2+} , приведены в Таблице 4.

Таблица 4. Адсорбция свободного гемоглобина из водного раствора в течение 1 часа на модифицированных углях [СКТ-6А/ Cu^{2+}] и [ВСК-А/ Cu^{2+}].

Состав модифицированного угля	Убыль гемоглобина	
	%	мг Нб/час
СКТ-6- Cu^{2+}	77,00	37,50
ВСК-А- Cu^{2+}	81,10	33,40

Из этих данных видно, что максимальная скорость адсорбции свободного гемоглобина наблюдалась на модифицированном угле [СКТ-6А/ Cu^{2+}]. Значение скорости адсорбции достигало величины 37,50 мг/час, что в 16 раз больше, чем на немодифицированном угле и в 4,7 раза превышало скорость адсорбции на [СКТ-6А/ПП/Г]. Скорость адсорбции на модифицированном угле [ВСК-А/ Cu^{2+}] составляла 33,40 мг/час, что в 47 раз выше значения скорости адсорбции на немодифицированном ВСК-А и в 11,5 раз превышает скорость адсорбции на [ВСК-А/ПП/Г].

Таким образом, наиболее активными сорбционными материалами по отношению к свободному гемоглобину в водных растворах оказались активированные угли, модифицированные ионами Cu^{2+} – [АУ/ Cu^{2+}]. Таким образом, адсорбционная активность синтезированных нами модифицированных углей зависит как от природы модификатора, так и от природы угля.

Полученные в водных растворах данные позволили выбрать в качестве наиболее перспективных материалов для реализации электрохимического метода очистки плазмы крови от свободного гемоглобина следующие

наиболее активные материалы: [СКТ-6А/Cu²⁺] и [СКТ-6А/ПП/І].

Выводы

1. Разработаны методы электрохимического модифицирования активированных углей ионами І и Cu²⁺ путем электроосаждения полипиррола с йодид ионом в качестве допанта и адсорбции Cu²⁺ при потенциалах положительнее +380 мВ;

2. Установлено, что модифицирование активированных углей «мягкими» ионами и лигандами позволило увеличить скорость адсорбции свободного гемоглобина по сравнению с немодифицированными активированными углями;

3. Покрытие полипирролом с йодид ионом в качестве допанта менее 1 % поверхности угля приводит к значительному увеличению адсорбционной активности по отношению к свободному гемоглобину;

4. Обнаружено, что наиболее эффективными сорбентами для адсорбции свободного гемоглобина из водных растворов оказались модифицированные угли [СКТ-6А/Cu²⁺] и [ВСК-А/Cu²⁺]. Скорости адсорбции на модифицированных углях [АУ/Cu²⁺] в несколько раз превышают скорости адсорбции свободного гемоглобина на [АУ/ПП/І];

5. Исследования адсорбции свободного гемоглобина из водных растворов показали эффективность использования углей, модифицированных «мягкими» ионами и лигандами, и необходимость изучения их поведения в плазме крови для разработки метода очистки плазмы, пригодного для клинических условий.

Список литературы

References

1. Urman M.G. *Travma zhivota [Abdominal Injury]*. Perm: IPK Zvezda, **2003**. 259 p. (in Russ.).
2. Dementeva I.I., Morozov Yu.A., Charnaya M.A. *Anesteziologiya i Kardioreanimaciya* **2008**, 6, 60-63 (in Russ.).
3. Lopukhin Yu.M., Molodnikov M.N., Shurkalin B.K. In: *Gemosorbtsiya [Hemosorption]*. Abstract book of 2nd N.I. Pirogov MOLGMI. Moskva, **1977**. p. 64-69 (in Russ.).
4. Hamburger J. *Presse méd.*, **1960**, 68, 279-281.
5. Kim D.K., Oh K.W., Ahn H.J., Kim S.H. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, 107, 3925-3932.
6. Tamm Yu., Alumaa A., Hallik A., Iohanson U., Tamm L., Tamm T. *Elektrokhimiya* **2002**, 38, 210-216 (in Russ.).
7. Kazarinov V.E., Frumkin A.N., Ponomarenko E.A., Andreev V.N. *Elektrokhimiya* **1975**, 2, 860-866 (in Russ.).
8. Ansari R. *E-Journal of Chemistry* **2006**, 3, 186-201.
9. Khubutia M.Sh., Goldin M.M., Kurilkin Yu.A., Goldin M.M., Grafov B.M., Davydov A.D., Kolesnikov V.A. *Khimicheskaya Promyshlennost Segodnya* **2011**, 7, 51-55 (in Russ.).
10. Harboe M. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **1959**, 11, 66-70.
11. Pearson R.G. *J. Chem. Educ.* **1968**, 45, 581-587.
12. Pearson R.G. *J. Chem. Educ.* **1968**, 45, 643-648.
13. Rodríguez F.J., Gutiérrez S., Ibanez J.G., Bravo J.L., Batina N. *Environmental Science and Technology* **2000**, 34, 2018-2023.
14. Khubutia M.Sh., Goldin M.M., Stepanov A.A., Kolesnikov V.A., Kruglikov S.S. *Carbon* **2012**, 50, 1146-1151.
15. Stepanov V.M. *Molekulyarnaya Biologiya. Struktura i Funktsii Belkov [Molecular Biology. Structure and Functions of Proteins]*. Moskva: Vysshaya shkola, **1996**. 335 p. (in Russ.).

Received 01.09.2012

Accepted 19.11.2012