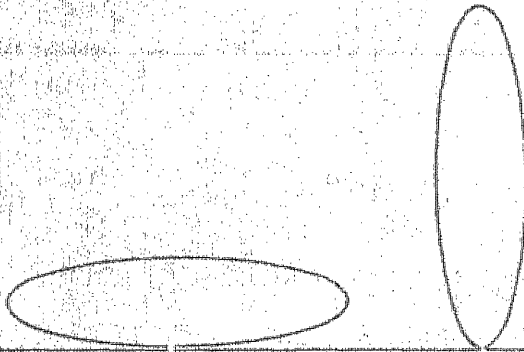


# CONCURRENTIE ADSORPTIE VAN PLASMA EMITTEER AAN VAST/WOERSTOF GRENSLAKKEN



Henry Lensen



**CONCURRERENDE ADSORPTIE  
VAN PLASMA EIWITTEN AAN  
VAST/VLOEISTOF GRENSVLAKKEN**

Promotoren: prof. dr. C.A. Smolders  
prof. dr. J. Feijen  
prof. dr. ir. P. Bergveld  
Assistent-promotor: dr. D. Bargeman

# CONCURRERENDE ADSORPTIE VAN PLASMA EIWITTEN AAN VAST/VLOEISTOF GRENSVLAKKEN

## PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad  
van doctor in de technische wetenschappen  
aan de Technische Hogeschool Twente,  
op gezag van de rector magnificus,  
Prof. ir. W. Draijer,  
volgens besluit van het College van Dekanen  
in het openbaar te verdedigen  
op 22 maart 1985 te 16.00 uur

door

Henricus Gerardus Wilhelmus Lensen  
geboren op 13 mei 1952 te 's-Hertogenbosch

aan Jan, Toos,  
Mariëtte en Jettie

## WOORD VOORAF

Bij de voltooiing van dit proefschrift wil ik eenieder danken die een bijdrage heeft geleverd aan de totstandkoming ervan.

Een aantal personen wil ik in het bijzonder vernoemen: Vanwege het multidisciplinaire karakter van het onderzoek heb ik gebruik mogen maken van de kennis en het inzicht van maar liefst drie promotoren en een assistentpromotor. Cees Smolders, Jan Feijen, Piet Bergveld en Dick Bargeman; bedankt voor jullie bijdragen.

Een ongekende gastvrijheid heb ik genoten op het ziekenhuis "De Stadsmaten" te Enschede bij Fred Olthuis (klinisch chemicus), Paul Krügers Dagneaux (apotheker), Jan Klein Elhorst, Tonny Knuijff en Marianne Zomer-v.d. Walle.

Ook bij Akzo Corporate Research te Arnhem was niets teveel. Rob Zsom schonk de polystyreen latices en op het analytisch laboratorium van AKZO zijn mijn gelabelde eiwitten gratis gekarakteriseerd (Ab Buytenhuis en Gerard Hoenselaar).

Hoofdstuk V van dit proefschrift had nooit geschreven kunnen worden zonder de medewerking van Wim Breemhaar, die hieraan een aanzienlijke bijdrage heeft geleverd.

Tony Neplenbroeck, Huub Klein Breteler, Corné Jägers en Johan Ronner hebben als student het nodige experimentele werk voor mij verricht. De omslag en de figuren zijn getekend door Anton Schupp en het typewerk is snel en goed verzorgd door typebureau SAS (Aliet Vos en Astrid Ouaaa).

De werksfeer in Enschede heb ik heel plezierig gevonden. Zowel op de afdelingen Chemische Technologie en Electrotechniek als het ziekenhuis "De Stadsmaten". Dat is één van de redenen waardoor ik moeiteloos de noodzakelijke 200.000 km (Nijmegen-Enschede v.v.) heb kunnen overbruggen. Ook het vaak prettige reisgezelschap heeft daartoe bijgedragen.

De lunchpauzes in de mensa werden veraangenaamd door discussies over de meest uiteenlopende zaken met Jan Heezen, Hans Wijmans, Frank Altena, Johan Ronner, Rick Bockhorst en Pieter de Bock.

Jan Heezen wil ik nog eens extra bedanken voor de genoten gastvrijheid bij hem thuis.

## INHOUD

### HOOFDSTUK I

#### INLEIDING

I.1	Algemeen	9
I.2	Grensvlakken en eiwitten	10
I.3	Meetmethoden voor eiwitadsorptie	14
I.4	De conformatie van eiwitmoleculen aan grensvlakken	18
I.5	De reversibiliteit van eiwitadsorptie	20
I.6	Kinetiek en mechanisme van eiwitadsorptie	22
I.7	Concurrerende eiwitadsorptie	25
I.8	Doelstellingen van dit proefschrift	27
	Referenties	29

### HOOFDSTUK II

#### AFWIJKEND ADSORPTIEGEDRAG VAN EIWITTEN TEN GEVOLGE VAN HET GEBRUIK VAN LABELINGSTECHNIEKEN EN/OF VAN ONGEZUIVERD EIWIT

II.1	Inleiding	35
II.2	Experimenteel	36
II.3	Methoden en voorschriften	37
II.4	Resultaten	41
II.5	Discussie	50
	Referenties	53
	APPENDIX II A/B KARAKTERISERING VAN RUNDER SERUM ALBUMINE EN GELABELD RUNDER SERUM ALBUMINE	55

### HOOFDSTUK III

#### DE REVERSIBILITEIT VAN EIWITADSORPTIE AAN POLYSTYREEN

III.1	Inleiding	61
III.2	Materialen en methoden	63
III.3	Resultaten	66
III.4	Discussie	74
	Referenties	81



## HOOFDSTUK IV

### HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAFIE (HPLC) ALS METHODE TER BESTUDERING VAN CONCURRERENDE ADSORPTIE VAN EIWITTEN

IV.1	Inleiding	83
IV.2	Materialen en methoden	85
IV.3	Resultaten	88
IV.4	Discussie	98
IV.5	Conclusie	100
	Referenties	101

## HOOFDSTUK V

### EEN VERGELIJKENDE STUDIE VAN DE ADSORPTIE VAN MENSELIJK ALBUMINE AAN POLYSTYREEN EN POLYVINYL CHLORIDE

V.1	Inleiding	103
V.2	Experimenteel	104
V.3	Adsorptiemethoden	104
V.4	Resultaten	106
V.5	Discussie	110
	Referenties	114

## HOOFDSTUK VI

### ADSORPTIE VAN PLASMA EIWITTEN AAN POLYSTYREEN LATEX VANUIT PLASMA

VI.1	Inleiding	114
VI.2	Materialen en methoden	115
VI.3	Resultaten	117
VI.4	Discussie	122
	Referenties	126

## HOOFDSTUK VII

### TOEPASSING VAN CAPACITEITSMETINGEN TER BESTUDERING VAN DE ADSORPTIE VAN EIWITTEN EN PEPTIDEN AAN SILICIUM/SILICUMOXIDE ELECTRODEN

VII.1 Inleiding	127
VII.2 Methoden	128
VII.3 Experimenteel	131
VII.4 Resultaten	132
VII.5 Discussie	136
Referenties	138
SUMMARY	139
SAMENVATTING	141
CURRICULUM VITAE	143

9

# HOOFDSTUK I

## INLEIDING

### I.1. Algemeen

In dit proefschrift wordt de adsorptie van eiwitten aan vast/vloeistof grensvlakken beschreven. Over dit onderwerp zijn al veel publicaties verschenen.

De kennis van eiwitadsorptie wordt onder andere toegepast in de levensmiddelenindustrie, cosmetische industrie en farmaceutische industrie. Er bestaat vanuit verscheidene disciplines de behoefte aan meer inzicht in eiwitadsorptie. Zo is de laatste jaren een toenemende interesse voor dit onderwerp waarneembaar in de biomedische techniek. Dit komt vooral door de veelvuldige toepassing van lichaamsvreemde materialen in de geneeskunde. Te denken valt aan het gebruik van medische hulpmiddelen (catheters, bloedzakken) en kunstorganen (kunstnieren en kunststof implantaten). Het materiaal waaruit deze hulpmiddelen en kunstorganen vervaardigd zijn dient bloedcompatibel te zijn.

Wanneer lichaamsvreemd materiaal in contact komt met bloed, kan trombusvorming optreden ten gevolge van bloedplaatjesadhesie en activering van de intrinsieke stolling. Hierbij speelt de eiwitadsorptie een belangrijke rol. Zo blijkt dat bij oppervlakken waaraan albumine gepreadsorbeerd is, in contact met bloed de bloedplaatjesadhesie geringer is dan bij oppervlakken waaraan fibrinogeen gepreadsorbeerd is (ZUCKER en VROMAN, 1969).

Ondanks het grote aantal publicaties over adsorptie van plasma eiwitten aan polymere oppervlakken is het beeld tot nu toe nog niet consistent. Dit komt doordat eiwitadsorptie een ingewikkeld proces is waarbij vele wisselwerkingen tussen adsorbens oppervlak en eiwitmoleculen een rol spelen en doordat hypothesen slechts moeilijk getoetst kunnen worden door de beperkingen van de onderzoekstechnieken.

De literatuur over eiwitadsorptie is samengevat in een aantal overzichtsartikelen (BRASH, LYMAN, 1971; MACRITCHIE, 1978; VAN DER SCHEER, 1979). Dit Hoofdstuk geeft een overzicht van de ontwikkelingen met betrekking tot de adsorptie van menselijk serum albumine (HSA), menselijk fibrinogeen (HFB) en menselijk gamma globuline (HIGG) aan vast/vloeistof grensvlakken over de laatste 6 jaar. Hierbij wordt onder andere aandacht besteed aan de karakterisering van de grensvlakken, de ruimtelijke structuur van het eiwit en het adsorptie/desorptie proces.

Bij het adsorptie/desorptie proces zal aandacht besteed worden aan de adsorptie/desorptie kinetiek, de reversibiliteit van de adsorptie en de conformatie van geadsorbeerde eiwitten. De concurrerende adsorptie vanuit mengsels en plasma komt eveneens aan de orde. Tenslotte worden in dit Hoofdstuk de doelstellingen van het onderzoek uiteengezet.

## I.2. Grensvlakken en eiwitten

Een goede karakterisering van het vaste oppervlak en het eiwit is onontbeerlijk voor de bestudering van het adsorptieproces aan vast/vloeistof grensvlakken.

### *Het materiaal oppervlak*

Een goed overzicht over oppervlakte karakterisering is gegeven door B.D. RATNER (1982). Enkele methoden zijn:

- *ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis)*, waarbij met röntgenstralen electronen worden vrijgemaakt waardoor over een afstand van 1-10 nm vanaf het oppervlak een analyse van de bindingstoestanden van atomen kan plaatsvinden.
- *ATR-IR (Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy)*; hierbij worden infraroodstralen door het te onderzoeken oppervlak geabsorbeerd en gereflecteerd. Het IR spectrum geeft chemische informatie over het materiaal oppervlak. De doordringdiepte is de laatste jaren teruggebracht van 1-5  $\mu\text{m}$  (bij eerdere IR studies) tot 50 nm in modernere apparatuur.

- *Randhoek meting* is een van de oudste technieken om oppervlakken te karakteriseren en kan gebruikt worden om te bepalen hoe hydrofoob of hydrofiel het substraat is (VAN DER SCHEER, 1979).
  - Verder kan de lading van materiaaloppervlakken bepaald worden door middel van *Potentiometrische titraties* en *Electrokinetische metingen*.
  - *Electronen microscopie* wordt ook wel gebruikt voor karakterisering van het materiaaloppervlak. Dit is echter een globale methode die alleen elementaire informatie over de morfologie van het oppervlak verschaft.
- Er wordt meestal van uitgegaan dat bij adsorptie van eiwitten aan vast/vloeistof grensvlakken de structuur en de eigenschappen van het materiaal oppervlak behouden blijven.

#### *Plasma eiwitten*

In dit proefschrift is de adsorptie van de plasma eiwitten menselijk serum albumine (HSA), menselijk fibrinogeen (HFb) en menselijk gamma globuline (HIgG) aan vast-vloeistof grensvlakken beschreven. Deze eiwitten hebben verschillende fysiologische functies in het bloed.

Zo reguleert HSA de osmotische druk, de pH en het transport van metaalionen, fosfolipiden en andere verbindingen (Th. Peters, 1975).

HFb speelt een belangrijke rol in het bloedstollingsproces. Onder invloed van trombine worden peptides van het HFb molecule afgesplitst, waardoor de ontstane fibrine monomeren spontaan polymeriseren tot het fibrine polymeer, dat na crosslinking onderdeel kan uitmaken van een trombus (R.F. DOOLITTLE, 1975).

HIgG is het meest voorkomende antilichaam uit een serie van vijf, bestaande uit HIgG, HIgD, HIgE, HIgM en HIgA. HIgG is samengesteld uit een aantal electroforetisch te scheiden subklassen. Globulines spelen een belangrijke rol in het complexe afweersysteem van de mens.

Hoewel een gedetailleerde ruimtelijke structuur van de plasma eiwitten HSA, HFb en HIgG niet bekend is hebben WALTON en KOLTISKO (1982) op basis van röntgen diffractie- en circulair dichroïsme (CD) studies een redelijk beeld kunnen geven van de vorm van deze eiwitten. Figuur 1 toont de ruimtelijke voorstelling van HSA, HFb en HIgG. Tabel I.1 geeft een overzicht van een aantal belangrijke gegevens van HSA, HFb en HIgG.

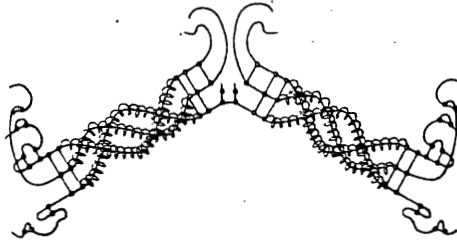
Tabel I.1

	HSA	HFb	HIgG	litera- tuurplaats
Plasma concentratie( $\text{gl}^{-1}$ )	40	2-4.5	12	
Moleculegewicht	66248	340000	160000	
Diffusie coëfficiënt ( $\text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$ )	$6.1 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$		v.d.SCHEER(1979)
Extinctie coëff. ( $\text{gl}^{-1}$ ) (280 nm)	0.53	1.55	1.40	
Dimensies (nm)	14,0x4,0 11,5x4,0	45,0x9,0 47,5x6,5	23,5x4,4	v.d.SCHEER(1979) BASZKIN(1980)
Adsorptiewaarden voor *End-on monolaag ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ ) *Side-on " ( " )	0,90 0,25	1,85 0,27	1,70 0,18	BASZKIN(1980) BASZKIN(1980)

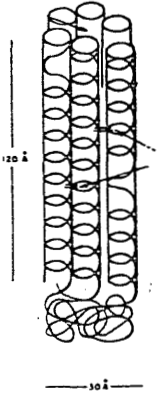
\*) Deze waarden zijn berekend op basis van de hierboven door BASZKIN (1980) opgegeven dimensie voor HSA, HFb en HIgG, uitgaande van een dichtste bolstapeling.

Bij de in de literatuur vermelde adsorptiestudies is vaak onvoldoende aandacht besteed aan de zuiverheid van de eiwitten. Dit heeft een grote invloed op het adsorptiegedrag, zoals in Hoofdstuk II van dit proefschrift zal worden aangetoond. Een nauwkeurige zuivering en karakterisering van eiwitten is dan ook noodzakelijk.

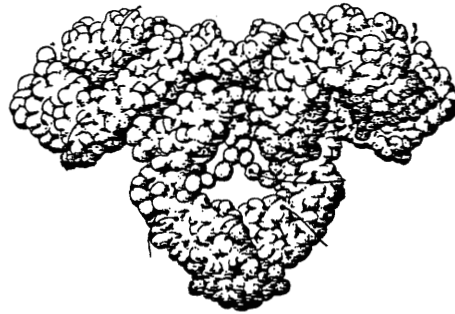
FIGUUR 1.



Menselijk fibrinogeen



Menselijk serum albumine



Menselijk gamma globuline

Deze ruimtelijke voorstellingen van menselijk albumine (HSA), menselijk fibrinogeen (HFb) en menselijk gamma-globuline (HIG) zijn overgenomen uit *Biomaterials: interfacial phenomena and applications, advances in chemistry series 199* S.L. COOPER en N.A. PEPPAS (pag. 250 en 251).

HSA en HFb zijn reconstructies gebaseerd op gegevens verkregen uit circulair dichroïsme spectroscopie en röntgendiffractie. HSA bestaat voor 48% en HFb voor 33% uit  $\alpha$ -helices.

HIG heeft een  $\beta$ structuur. Het hier weergegeven HIG model is gereconstrueerd uit elektronen microscopiefoto's. Voor HFb en HIG zijn geen dimensies gegeven (zie hiervoor Tabel I.1).

### I.3. Meetmethoden voor eiwitadsorptie

Voor een ideale adsorptiestudie moet aan een aantal voorwaarden worden voldaan. De eiwitadsorptie moet continu in situ kunnen worden geregistreerd, kwantitatieve metingen moeten mogelijk zijn. Verschillende eiwitten moeten worden onderscheiden en bovendien moet opheldering over de conformatie van het eiwit aan het oppervlak kunnen worden verkregen. Veel methoden zijn ontwikkeld om eiwitadsorptie te bestuderen, maar geen enkele methode kan volledig aan bovenstaande voorwaarden voldoen. Een kort overzicht van deze methoden wordt nu gegeven.

#### *Adsorptie meting via depletie*

De oudste adsorptiemetingen zijn gebaseerd op uitputting (depletie) van de eiwitoplossing door middel van adsorptie aan een fijn verdeelde dispersie van deeltjes waardoor een groot oppervlak beschikbaar is. Momenteel worden bij voorkeur latices gebruikt omdat deze bestaan uit goed gekarakteriseerde deeltjes. Deze techniek geeft kwantitatieve resultaten en wordt vaak toegepast (NORDE, 1976; Van der SCHEER, 1979; FAIR, 1980; MITZUTANI, 1980 en SUZAWA, 1981). De adsorptie wordt bepaald uit de concentratieafname van eiwit in oplossing en uit de bepaling van het aangeboden oppervlak.

De toepasbaarheid van deze methode voor oppervlakken die van belang zijn voor biomedisch gebruik is echter beperkt. Vaak gaat het hierbij om kleine oppervlakken waardoor een te geringe concentratieafname bereikt wordt.

De concentratieafname kan op een aantal manieren worden gevolgd: colorimetrisch (HLADY, 1978), immunologisch (KLEIN, 1980), spectroscopisch of met behulp van radioactiviteitsmetingen (KLEIN ELHORST, 1978).

#### *Radiolabeling van eiwitten*

Het gebruik van radiotracers in adsorptiestudies komt veel



vuldig voor. Met deze techniek kan de adsorptie van eiwitten kwantitatief worden bestudeerd aan kleine oppervlakken. Het voordeel van deze methode is dat, door het aanbrengen van verschillende labels in de verschillende eiwitten, het in principe mogelijk is eiwitten van elkaar te onderscheiden aan het oppervlak.

De meest gebruikte labels zijn  $I^{125}$  en  $I^{131}$ . Diverse labelingsprocedures zijn mogelijk:

- chlooramine T labeling (HUNTER, 1962; KLEIN ELHORST, 1978 en PENNERS, 1981)

- lactoperoxidase labeling (VAN OSS, 1981 en BORNZIN, 1982), en de monochloride labeling (BRASH en SCHMITT, 1983).

Ook wordt er gebruik gemaakt van commercieel gelabelde eiwitten (LEMM, 1980 en VAN DULM, 1983), die meestal gelabeld zijn met de chlooramine T methode.

VAN DER SCHEER heeft drie labelingsmethoden (electrolyse lactoperoxidase en chlooramine T.) getoetst op hun bruikbaarheid in adsorptiestudies aan de hand van albumineadsorptie aan polystyreen. Hij komt tot de conclusie dat er sprake is van preferentiële adsorptie van gelabeld eiwit (VAN DER SCHEER, 1979).

Hoewel radiolabeling een eenvoudige techniek is om eiwitadsorptie te bestuderen blijkt dat er ten gevolge van labeling veranderingen in de eiwitconformatie kunnen optreden waardoor het adsorptiegedrag verandert (WALTON, 1979). Ook VAN WAGENEN en ANDRADE stellen dat de aanwezigheid van een extrinsiek label de fysische eigenschappen en ook het adsorptiegedrag van eiwitten kan beïnvloeden (VAN WAGENEN, 1980).

Anderzijds zijn talrijke onderzoekers tot de conclusie gekomen dat er geen verschil bestaat tussen het adsorptiegedrag van gelabelde en niet gelabelde eiwitten (BRASH, 1983; VAN OSS, 1981; BORNZIN, 1982 en VAN DULM, 1983). Een belangrijke voorwaarde blijft dat de label onder milde omstandigheden moet worden aangebracht.

Ook de concurrerende adsorptie van eiwitten is bestudeerd door gebruikmaking van gelabelde eiwitten. HORBETT gebruikte

hiervoor een techniek waarbij uit plasma geadsorbeerde eiwitten werden gelabeld met  $I^{125}$ . Daarna desorbeerde hij de eiwitten met natrium dodecylsulfaat en met behulp van polyacrylamidegel elektroforese werden vervolgens de eiwitten in het verkregen mengsel gescheiden. (HORBETT, 1981).

IHLENFELD (1979) en YOUNG (1982) gebruikten gelabelde eiwitten voor in vivo adsorptiestudies. Hoewel de labelingsmethode voor wat betreft betrouwbaarheid beperkt is, is dit de enige adsorptiemethode, die in vivo mogelijk is.

#### *Fluorescentie metingen*

Met deze methode wordt het eiwit niet met een radioactief label gelabeld maar met een fluorescerend label (fluoresceïne-isothiocyanaat, FITC). Deze labeling veroorzaakt ook artefacten in de adsorptieresultaten ten gevolge van optredende structuurveranderingen (CRANDALL en ANDRADE, 1981). Tegenwoordig wordt gebruik gemaakt van Totale Interne Reflectie Fluorescentie, TIRF (VAN WAGENEN en ANDRADE, 1982). Met deze techniek is geen extrinsiek label meer nodig maar wordt gebruik gemaakt van de intrinsieke fluorescentie van eiwitten als HSA en HfB, gebaseerd op de excitatie van tryptofaan in het eiwit. Toch blijft het probleem bestaan dat geen directe kwantitatieve informatie verkregen kan worden uit de fluorescentiesignalen, omdat door adsorptie het fluorescentie signaal van het eiwit verandert. Een onafhankelijke calibratie methode blijft dus noodzakelijk. Vaak wordt dan toch weer gebruik gemaakt van radioactief gelabelde eiwitten.

Adsorptiestudies met extrinsiek fluorescerende labels zijn uitgevoerd door BEISSINGER (1982), WALTON (1979), DE BRUIN en VAN OSS (1980).

#### *Ellipsometrie*

Een adsorptiemethode waarbij, in principe, in situ en continu informatie verkregen kan worden over de dikte en de

brekingsindex van de geadsorbeerde eiwitlaag is ellipsometrie (CUYPERS, 1978; JÖNSSON, 1982 en STENBERG, 1979). Door de vaak geringe verschillen in brekingsindex van substraat, geadsorbeerde eiwit en gebruikte buffer geeft deze methode weinig informatie over structuur en aard van de geadsorbeerde eiwitlaag.

#### *Infrarood spectroscopie*

Infrarood spectroscopie is op velerlei wijze toegepast bij de bestudering van eiwitadsorptie. Infrarood interne reflectie spectroscopie werd in 1974 al toegepast door LEE en KIM. Op hetzelfde principe berust de infrarood verschil spectroscopie van MORRISEY (1974); de veelvoudige infrarood spectroscopie (BRYNDA, 1978) en ATR-IR (Attenuated total reflectance infrared spectroscopy). De IR spectra geven veel chemische informatie over de aard van de geadsorbeerde eiwitlaag via verschuivingen in de amidebanden ( $1300 \text{ cm}^{-1}$ ). Deze informatie wordt echter vaak verstoord door onder andere het spectrum van water. Deze verstoringen kunnen momenteel vrijwel geheel onderdrukt worden door gebruik te maken van FTIR, Fourier Transform Infrarood spectroscopie (GENDREAU 1982). Hoewel deze methode veelbelovend is, blijft de interpretatie van de IR spectra moeilijk.

#### *Overige methoden*

Naast de boven beschreven methoden staan er nog een aantal andere methoden ter beschikking voor de bestudering van eiwitadsorptie.

- Circulair dichroïsme, waarmee informatie verkregen kan worden over de structuur van geadsorbeerde eiwitten (WALTON en MAENPA, (1979).
- Het meten van grensvlakspanningen (BAGNALL, 1978, 1980; VAN DER SCHEER, 1979; EN VAN OSS, 1981)
- Electronenmicroscopie (EBERHART, 1977, 1982)
- Calorimetrie (NORDE en LYKLEMA, 1978)
- ESCA (HANSON en RATNER, 1980)
- Enzym immuno assay methode (BREEMHAAR, 1982).
- Impedantiemetingen (STENBERG, 1979)

Deze laatste twee methoden worden in dit proefschrift nog uitvoerig beschreven (Hoofdstuk V en VII).

#### *Conclusies betreffende adsorptiemetingen van eiwitten*

Geen van deze technieken afzonderlijk geeft voldoende informatie. Om een goed beeld te kunnen vormen over de adsorptie van eiwitten zullen resultaten, verkregen via verschillende technieken, met elkaar vergeleken dienen te worden.

Een probleem hierbij is, dat de besproken technieken in het algemeen door verschillende groepen onderzoekers worden gebruikt waardoor vergelijking van de resultaten vaak onmogelijk wordt; verschillende materialen en eiwitten worden onder niet gelijke condities gebruikt.

#### I.4. De conformatie van eiwitmoleculen aan grensvlakken

Algemeen wordt aangenomen dat eiwitten geadsorbeerd aan vloeistof/vloeistof en vloeistof/lucht grensvlakken hun tertiaire structuur verliezen. Al vele jaren wordt er gespeculeerd over de structuur van eiwitten aan vast/vloeistof grensvlakken en de vraag doet zich voor of het eiwit van conformatie verandert wanneer het aan dit laatste type grensvlak adsorbeert. Er zijn aanwijzingen dat aan vast/vloeistof grensvlakken de eiwitten minder drastische conformatieveranderingen ondergaan dan bij vloeistof/vloeistof grensvlakken (McRITCHIE, 1978).

Verscheidene technieken zijn toegepast voor de bepaling van de conformatie van geadsorbeerde eiwitten. Veelal, met name bij oudere adsorptietechnieken zoals depletieingen, werd een schatting gemaakt van de moleculaire dimensies van het eiwit in geadsorbeerde toestand op basis van de gevonden oppervlakteconcentratie en de aanname dat monolaag adsorptie optrad. Zo concludeerden ORESKES en SINGER in 1961 reeds dat op basis van depletie van gamma globuline (IgG) aan polystyreen latex er sprake was van een side-on monolaag, waarbij de eiwit moleculen plat op het oppervlak liggen terwijl bij hogere eiwitconcentraties in de oplossing de interstitiële plaatsen aan het oppervlak opgevuld werden met end-on

geadsorbeerd IgG, waarbij de moleculen rechtop staan. Hierbij werd aangenomen dat de dimensies van IgG tijdens adsorptie niet veranderden.

NORDE bestudeerde in 1973 systematisch de adsorptie van HSA aan polystyreen latex onder verschillende condities (pH, temperatuur, en ionsterkte) en vond voor HSA dat de adsorptie maximaal was ( $0,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) bij het iso-eletrisch punt (pH 4,9). Deze oppervlakteconcentratie komt ongeveer overeen met een side-on monolaag. Boven en beneden het iso-eletrisch punt was de oppervlakteconcentratie lager (bij meerdere ionsterktes). Hieruit concludeerde hij dat HSA in die gevallen een meer ontvouwde conformatie aannam. Ook BRASH en LYMAN concludeerden in 1969 op basis van moleculaire dimensies dat tijdens het adsorptieproces de grootte van het molecule niet merkbaar veranderde.

Er zijn weinig technieken die direct informatie verschaffen over de structuur van geadsorbeerd eiwit. Bovendien is de interpretatie van de gegevens moeilijk. Zo gebruikten MORRISEY en STROMBERG in 1974 infrarood verschil spectroscopie waarbij op basis van de eiwit amide-I-band verschuiving in het spectrum inzicht verkregen werd in het percentage carbonylgroepen van het geadsorbeerde eiwit dat rechtstreeks contact maakte met het oppervlak ("bindingsfractie"). Deze metingen zijn uitgevoerd bij de adsorptie van albumine, protrombine en fibrinogeen in situ. Bij albumine en protrombine vonden ze een bindingsfractie van 0,11 die constant bleef bij alle waargenomen oppervlakteconcentraties. Zij concludeerden hieruit dat de interne bindingen en disulfidebruggen in deze eiwitten van dien aard zijn dat conformatieveranderingen ten gevolge van adsorptie niet optreden. Fibrinogeen daarentegen vertoont een toename in de "bindingsfractie" bij hogere oppervlakteconcentratie. Dit wordt verklaard door een mogelijke aggregatie van fibrinogeen. Bij gamma globuline bleek dat het aantal geadsorbeerde carbonylgroepen afnam bij toenemende oppervlakteconcentratie (FENSTERMAKER en MORRISEY, 1976). MORRISEY zag geen significante verandering van de conformatie van de eiwitten aan het oppervlak als functie van de tijd.

MC MILLIN en WALTON (1974) gebruikten circulair dichroïsme (CD) en concludeerden dat fibrinogeen tijdens de adsorptie aan silica geen verandering in conformatie ondergaat terwijl factor XII wel een sterke verandering ondergaat. Probleem bij deze techniek is dat het gebruikte substraat een storende factor kan zijn wanneer het ultraviolet licht absorbeert. Deze studie heeft overigens geen vervolg gehad.

Met fluorescentie spectroscopie is geen conformatieverandering van BSA aangetoond na adsorptie aan poly- $\alpha$ -aminozuren substraten (WALTON en MAENPA, 1979). Wel hebben SODERQUIST en WALTON in 1980 met behulp van CD spectra aangetoond dat verscheidene plasma eiwitten (HSA, HFb en HIgG) een verlies aan secundaire of helix structuur te zien gaven na adsorptie aan synthetische polypeptide films. In plaats van een conformatie analyse aan het oppervlak uit te voeren, bepaalden zij de verandering in structuur door vergelijking van de ellipticiteit van het natieve eiwit met gedesorbeerd eiwit, na elutie over een kolom waarvan de matrix bedekt was met poly- $\alpha$ -aminozuren. Alleen irreversibele veranderingen kunnen op deze wijze aangetoond worden.

Voortbordurend op de experimenten van SODERQUIST vinden BRASH en CHAN (1981) een verlies van 50% in  $\alpha$ -helix structuur van fibrinogeen na adsorptie aan pyrexglas. Ook zij maakten gebruik van CD.

Conclusie:

Uit het voorafgaande wordt duidelijk, dat een conformatieverandering van plasma eiwitten ten gevolge van adsorptie aan vast/vloeistof grensvlakken niet zonder meer uitgesloten mag worden.

### 1.5 De reversibiliteit van eiwitadsorptie

Adsorptie van eiwitten aan verschillende oppervlakken wordt vaak beschreven als "Langmuir adsorptie". (DILLMAN en MILLER, 1973; LEE en KIM, 1974; BRASH en SAMAK, 1978). Dit betekent echter geenszins dat eiwitadsorptie voldoet aan de basisvoorwaarden voor een "Langmuir adsorptie" gedrag. Deze voorwaarden zijn: een homogeen oppervlak, monolaag adsorp-

tie, reversibele adsorptie en geen laterale interacties in geadsorbeerde toestand.

Toch nemen bovenstaande auteurs impliciet aan dat eiwit-adsorptie reversibel is. Er zijn echter duidelijke aanwijzingen, vooral bij adsorptie aan hydrofobe oppervlakken, dat dit niet zonder meer het geval is.

VAN DER SCHEER (1979) stelde dat er sprake is van een "semi-reversibel" adsorptieproces. Hoewel er geen of erg weinig eiwit desorbeert van hydrofobe oppervlakken (polystyreen) wanneer de eiwitconcentratie in de oplossing verminderd wordt, adsorbeert er wel meer wanneer de eiwitconcentratie in de oplossing toeneemt. Dit geldt niet alleen voor eiwitten maar ook voor synthetische polymeren. Voor synthetische polymeren is dit verschijnsel verklaard op grond van hun heterodispersiteit (COHEN STUART, 1980). Grotere moleculen adsorberen met een grotere affiniteit dan de kleinere, en zijn in staat de kleinere van het oppervlak te verdringen. Bij een hoger polymeer aanbod zullen ook meer grote moleculen aan het oppervlak aanwezig zijn, deze grote moleculen desorberen moeilijker dan kleinere moleculen. Daardoor heeft de isotherm toch geen high affinity karakter terwijl het polymeer niet of zeer moeilijk desorbeert. Voor eiwitten gaat deze verklaring echter niet op, daar eiwitten in het algemeen monodispers zijn.

BRASH en SAMAK (1978, 1981) laten er geen twijfel over bestaan dat eiwitadsorptie (aan polyethyleen) een dynamisch proces is, waarbij uitwisseling van eiwitten aan het grensvlak optreedt onder "steady state" condities. Zij vinden in eerste instantie een uitwisseling tussen  $I^{125}$  HSA en  $I^{131}$  HSA en vervolgens, na ongeveer 60 uur, is geen uitwisseling meer merkbaar, terwijl 50 tot 70% van het oppervlak nog bezet wordt door het oorspronkelijk eiwit. Dit percentage is afhankelijk van de gekozen adsorptiecondities. De auteurs concluderen hieruit dat er sprake is van heterogeniteit in bindingsenergie tussen eiwit en de diverse plaatsen op het oppervlak. Zij vinden overigens ook geen desorptie ten gevolge van verdunning in oplossing. HFB gepreadsorbeerd aan glas desorbeert evenmin bij verdunning. De uitwisseling

is bij HFb sneller dan bij HSA. In tegenstelling tot BRASH vindt CHUANG (1978) enige desorptie van HFb bij hydrofiele oppervlakken (Cuprophaan) in de pure buffer. Ook vindt CHUANG uitwisseling.

VROMAN (1980) heeft de verdringing van één soort eiwit door een ander eiwit bestudeerd en komt tot de conclusie dat hoogmoleculaire eiwitten laagmoleculaire eiwitten verdringen van het oppervlak.

DE BRUIN en VAN OSS (1980) stellen dat de reversibiliteit van het adsorptieproces gerelateerd kan worden aan de hydrofobiciteit van adsorbens en adsorbaat. SCHMITT (1983), HORBETT (1981) en BASZKIN (1980) hebben adsorptiestudies uitgevoerd, waarbij de hydrofobiciteit van het oppervlak als parameter is gebruikt. Uit deze studies blijkt dat "hydrofiele" oppervlakken aanleiding geven tot reversibele eiwitadsorptie terwijl aan "hydrofobe" oppervlakken eiwitten irreversibel adsorberen.

Veel auteurs (SODERQUIST, 1980; BRYNDA, 1978; BORNZIN en MILLER, 1982) maken melding van twee gelijktijdige processen: een reversibel adsorptieproces naast een irreversibel adsorptieproces. Dit kan zowel veroorzaakt worden door de heterogeniteit van het oppervlak als door de aanwezigheid van een reversibele eiwitconformatie en een irreversibele eiwitconformatie. In Hoofdstuk III van dit proefschrift wordt een overgang gesuggereerd van reversibel geadsorbeerd eiwit naar "irreversibel" geadsorbeerd eiwit.

Concluderend kan gesteld worden dat plasma eiwitten niet waarneembaar desorberen van hydrofobe oppervlakken, zodat verlaging van de eiwitconcentratie in de oplossing niet leidt tot een aanzienlijke vermindering in de geadsorbeerde hoeveelheid. Uitwisseling tussen eiwit aan het oppervlak en eiwit in de oplossing kan echter wel optreden.

#### 1.6. Kinetiek en mechanisme van eiwitadsorptie

De beschrijving van de adsorptie van kleine moleculen aan grensvlakken is een klassiek probleem dat redelijk goed wordt begrepen. De adsorptie van macromoleculen aan vaste oppervlakken is niet zo duidelijk. Er zijn echter wel een



aantal modellen bekend waarmee het adsorptieproces beschreven kan worden (SILBERBERG, 1970; COHEN STUART, 1980). De adsorptie van eiwitten vanuit oplossing aan vaste oppervlakken is door de vele wisselwerkingen nog ingewikkelder. Bij het opzetten van een adsorptiemodel dient rekening te worden gehouden met conformatieveranderingen die op kunnen treden ten gevolge van adsorptie (zie I.4), het reversibele of irreversibele karakter van de adsorptie (zie I.5), eventuele denaturatie van geadsorbeerde eiwitten, maar ook met de experimentele omstandigheden en de gebruikte adsorptietechniek (zie I.3).

#### Kinetiek

Bij de bestudering van de kinetiek van eiwitadsorptie zijn twee effecten van belang. In de eerste plaats de aanvoer van het eiwit naar de grenslaag en in de tweede plaats de adsorptie aan het grensvlak.

LEE en KIM (1974) bestudeerden adsorptiesnelheden van plasma eiwitten aan verscheidene hydrofobe biomaterialen gebruikmakend van interne reflectie infrarood spectroscopie. GORMAN (1971) heeft fibrinogeen adsorptie aan mica gevolgd als functie van de tijd door de geadsorbeerde moleculen te "tellen" met behulp van elektronenmicroscopie. CUYPERS (1978) gebruikte ellipsometrie terwijl ROOJK (1977), BRASH (1974) en KOCHWA (1977) radiolabeling toepasten om snelheidscurves te bepalen waarbij de oppervlakteconcentratie uitgedrukt is als functie van de tijd bij een constante eiwitconcentratie in de oplossing.

VAN DULM en NORDE (1983) stellen met behulp van metingen met gelabelde eiwitten vast dat de adsorptie van HSA aan glas en polystyreen diffusie-bepaald is. Wanneer echter eiwit en oppervlak negatief geladen zijn wordt de kinetiek bepaald door een adsorptie barrière veroorzaakt door electrostatische repulsies.

BORNZIN concludeert aan de hand van 40 snelheidscurves van de adsorptie van runder albumine en runder fibrinogeen aan siliconrubber en cuprophaan dat een deel van het eiwit reversibel en een deel "irreversibel" adsorbeert. Het "irre-

versibele" deel wordt beschreven met behulp van een diffusie vergelijking en het reversibele gedeelte met behulp van een tweede orde Langmuir kinetiek.

BEISSINGER (1980) heeft een kinetisch model opgesteld, uitgaande van reversibele adsorptie, waarbij sprake is van twee soorten interacties tussen eiwit en oppervlak. Hij maakt hierbij gebruik van de Langmuir-Hinshelwood benadering. Het model wordt gecontroleerd aan de hand van de adsorptie van HIgG aan kwarts. Dit model heeft hij een jaar later verder uitgebreid waardoor het toepasbaar was voor concurrerende adsorptie. De experimentele resultaten (adsorptie van HSA en HIgG) weken sterk af van de modelfitting (BEISSINGER 1981).

Een adsorptiemodel wordt ook gegeven door SODERQUIST (1980). Hij gaat uit van 3 stadia in het adsorptieproces: een initiële korte periode waarbij de adsorptie reversibel is, een tweede fase waarbij de geadsorbeerde eiwitten een langzame conformatieverandering aan het oppervlak ondergaan, waardoor desorptie onmogelijk wordt en een eindstadium waarbij geadsorbeerde eiwitten gedenatureerd zijn en wederom kunnen desorberen.

FAIR (1980) neemt op grond van experimenten met runder albumine en runderglobuline, geadsorbeerd aan polystyreen, aan dat er 3 gebieden in de adsorptie isotherm te onderscheiden zijn. Bij lage oppervlakteconcentraties is er een willekeurige verdeling van eiwitten aan het oppervlak met onderling zwakke laterale interacties. Een tweede gebied wordt gekenmerkt door een "glasachtige" eiwitstructuur aan het oppervlak. Bij hoge oppervlakteconcentraties is er sprake van een kristalstructuur met sterke laterale interacties. Over effecten in de tijd wordt niet gesproken.

Vrijwel in alle verschenen publicaties over adsorptie van eiwitten wordt aangenomen dat eiwitten adsorberen in een monolaag, en dat het oppervlak verzadigd raakt met eiwitten. In Hoofdstuk III van dit proefschrift zijn de in de literatuur vermelde verzadigingswaarden voor HFb en HSA bijeengezet.

## Conclusie

De adsorptie van eiwitten aan vast/vloeistof grensvlakken is een ingewikkeld proces, waarvan het mechanisme nog niet goed bekend is. Dit komt vooral door de onduidelijkheid die er bestaat omtrent de reversibiliteit van het proces.

### I.7. Concurrerende eiwitadsorptie

Bij de meeste adsorptiestudies met eiwitmengsels is gebruik gemaakt van HSA, HIgG en HFb. Bij concurrerende eiwitadsorptie blijkt dat de geadsorbeerde eiwitlaag is samengesteld uit de drie in oplossing aanwezige eiwitten. De aard van de geadsorbeerde eiwitlaag wordt bepaald door de concentratie van de eiwitten in de oplossing en het substraat. Zo stelt HORBETT (1975) dat de HFb oppervlakteconcentratie gehalveerd wordt wanneer een tienvoudige overmaat HSA en HIgG wordt toegevoegd.

Meestal blijkt HFb echter preferentieel te adsorberen ten opzichte van HSA en HIgG (KOCHWA, 1977; ROOJK (1977); BRASH, 1979, 1981; LEE, 1974).

ROOJK (1977), UNIYAL (1982) en KIM (1979) stellen dat er een nauwe relatie bestaat tussen HFb adsorptie enerzijds en de daarmee gepaard gaande trombogeniciteit en plaatjesadhesie anderzijds. YOUNG en COOPER concluderen bovendien dat de adsorptie van HIgG, fibronectine en de Van Willebrand factor eveneens tromboseversterkend werkt (1982). In al deze studies is gebruik gemaakt van radiolabeling.

BEISSINGER en LEONARD (1982) maken gebruik van fluorescentie labeling. Op grond van hun adsorptieexperimenten met HSA en HIgG aan kwarts komen zij tot de conclusie dat de samenstelling van de geadsorbeerde eiwitlaag afhankelijk is van het aangeboden eiwitmengsel in oplossing.

LEMM en UNGER (1980) hebben de concurrerende adsorptie van HIgG, HSA en HFb aan polyurethaan en siliconrubber oppervlakken als functie van de tijd gevolgd en vinden dat HFb en HIgG in eerste instantie oververtegenwoordigd zijn en dat vervolgens uitwisseling plaatsvindt van geadsorbeerd eiwit

met albumine in de oplossing. Dit is ook gevonden door LEE en KIM (1974).

Een andere waarneming komt uit het werk van GENDREAU (1982). Hij heeft gebruikmakend van Fourier Transformatie Infrarood spectroscopie de concurrerende adsorptie van HSA en HFb aan germanium bestudeerd. Hij komt tot de conclusie dat HSA het snelst adsorbeert en dat geadsorbeerd HSA vervolgens uitgewisseld wordt met HFb in de oplossing, zodat uiteindelijk HFb preferentieel adsorbeert.

Omdat de diffusiecoëfficiënt van HSA groter is dan die van HFb is inderdaad te verwachten dat in eerste instantie HSA preferentieel adsorbeert. Verdringing aan het oppervlak van het geadsorbeerde HSA door HFb is vervolgens niet uit te sluiten (HFb is een groter molecule dan HSA).

Wanneer meerdere componenten in het systeem aanwezig zijn wordt de interpretatie van de gevonden resultaten nog gecompliceerder. Dat is het geval wanneer de concurrerende adsorptie van eiwitten uit plasma wordt bestudeerd. BRASH (1981) constateert dat de HSA en HFb adsorptie vanuit plasma beduidend lager is dan in modelsystemen. Hij maakt hierbij gebruik van radiolabeling en adsorptie aan glas. Aan polyurethanen adsorbeert vanuit plasma in het geheel geen HFb of HSA. Alleen HIGG wordt waargenomen aan het oppervlak.

VROMAN (1982) vindt gedurende de eerste minuten van de adsorptie uit plasma een hoge fibrinogeenconcentratie aan het oppervlak en vervolgens een gereduceerde fibrinogeen adsorptie. Dit wordt ook gevonden door BREEMHAAR (1982). VROMAN spreekt van verdringing door kininogeen, BREEMHAAR van verdringing door hoge dichtheid lipoproteïnen.

HORBETT en WEATHERSBY hebben de adsorptie van HSA, HFb, HIGG, hemoglobine en protrombine bestudeerd aan poly-HEMA en poly-EMA. Zij konden geen HSA adsorptie detecteren. UNİYAL (1982) stelt dat door de aanwezigheid van rode bloedcellen in plasma de adsorptie van HFb en HSA vermindert. Het is bekend dat hemoglobine preferentieel adsorbeert ten opzichte van HFb (BRASH 1981).

IHLENFELD en COOPER (1979) hebben in vivo eiwitadsorptie bestudeerd aan PVC, silastic en polyurethaan, gebruikmakend

van radiolabeling. Zij vinden in eerste instantie een piek in de fibrinogeen adsorptie en vervolgens een uitwisseling van geadsorbeerd fibrinogeen met albumine en gamma globuline. Er wordt geen adsorptie van andere eiwitten vermeld.

### *Conclusie*

Het moge duidelijk zijn dat uit deze concurrerende adsorptie experimenten geen eenduidige conclusies getrokken kunnen worden. Wat wel duidelijk wordt uit deze resultaten is dat gedurende de eerste minuten van de adsorptie verdringing van geadsorbeerd eiwit optreedt met andere woorden de eiwitsamenstelling aan het oppervlak kan variëren als functie van de tijd.

Zo is op grond van de hoge HSA concentratie in plasma en de hoge diffusie coëfficiënt van HSA een preferentiële adsorptie van HSA te verwachten. Dit is echter niet het geval. Wel is het mogelijk dat aanvankelijk geadsorbeerd HSA verdrongen wordt door HFb of door andere eiwitten in de oplossing.

### I.8. Doelstellingen van dit proefschrift

Uit het literatuuroverzicht wordt duidelijk dat het hoofdstuk van de eiwitadsorptie nog zeker niet afgerond is. Zo blijkt de gebruikte adsorptiemethode invloed te hebben op de adsorptieresultaten. De mogelijkheid van afwijkingen in de adsorptieresultaten ten gevolge van radiolabeling wordt aan de orde gesteld in Hoofdstuk II. Dit gebeurt aan de hand van een vergelijkend onderzoek van de adsorptie van gelabeld en ongelabeld eiwit. Vervolgens wordt gelabeld eiwit gekarakteriseerd met behulp van High Performance Liquid Chromatography. (Appendix II)

Ook de vraag of eiwitadsorptie een reversibel proces is, is nog niet bevredigend beantwoord. In Hoofdstuk III wordt, rekening houdend met de beperking van de radiolabelingsmethode, nader ingegaan op de reversibiliteit van eiwitadsorptie. In dit Hoofdstuk wordt ook een adsorptie model beschreven.

In de Hoofdstukken IV, V, VI en VII worden achtereenvolgens adsorptiestudies beschreven waarbij gebruik is gemaakt van alternatieve methoden. In Hoofdstuk IV worden depletie-metingen in combinatie met HPLC beschreven, waarmee de concurrerende adsorptie van HSA, HFb en HIgG aan polystyreen latices is bestudeerd. In Hoofdstuk V wordt de enzym immuno assay methode toegepast in combinatie met radiolabeling van eiwitten. De adsorptie van HSA aan PVC en PS is hier bestudeerd. Hoofdstuk VI behandelt de concurrerende eiwitadsorptie van HFb, HSA en HIgG uit plasma aan PS latices. In dit Hoofdstuk wordt gebruik gemaakt van depletie-metingen in combinatie met HPLC en radiaal immuno diffusie (MANCINI, 1965). Tot slot wordt in Hoofdstuk VII de mogelijke toepassing van capaciteitsspanningsmetingen beschreven ter bestudering van de adsorptie van peptiden en eiwitten aan  $\text{SiO}_2$ .

Het verkrijgen van een beter inzicht in de (concurrerende) adsorptie van HFb, HIgG en HSA aan polystyreen staat in bijna alle Hoofdstukken van dit proefschrift centraal.

REFERENTIES.

- BAGNALL, R.D., J. Biomed. Mater. Res., 12, 707 (1978).
- BAGNALL, R.D., ANNIS, J.A.D., and SHERLIKER, S.J., J. Biomed. Mater. Res., 14, 1 (1980).
- BASZKIN, A., en LYMAN, D., J. Biomed. Mater. Res., 14, 393 (1980).
- BEISSINGER, R.L., and LEONARD, E.F., ASAIO J., 3, 160 (1980).
- BEISSINGER, R.L., and LEONARD, E.F., J. Colloid Interface Sci., 85, 521 (1982).
- BORNZIN, G.A., en MILLER, I.F., J. Colloid Interface Sci., 86, 539 (1982).
- BRASH, J.L., en LYMAN, D.J., J. Biomed. Mater. Res., 3, 175 (1969).
- BRASH, J.L., en LYMAN, D.J., in "Chemistry of Biosurfaces" (M.L. Hair Ed.), p. 177, Dekker, New York (1971).
- BRASH, J.L., en DAVIDSON, V.J., Thrombosis Res., 9, 249 (1976).
- BRASH, J.L., en SAMAK, Q.M., J. Colloid Interface Sci., 64, 495 (1978).
- BRASH, J.L., en UNIYAL, S., J. of Polymer Sci.: Polymer Symp. 66, 377 (1979).
- BRASH, J.L., UNIYAL, S., en CHAN, B.M.C., Art. Org., 5, 475 (1981).
- BRASH, J.L., UNIYAL, S., PUSINERI, C., en SCHMITT, A., J. Colloid Interface Sci., 95, 28 (1983).
- BREEMHAAR, W., ELLENS, D.J., BEUGELING, T., BANTJES, A., Proc. Eur. Soc. Artif. Organs 295 (1982).
- BRYNDA, E., HOUSKA, M., POKORNA, Z., en CEPALOVA, N.A., J. Bioeng., 2, 411 (1978).
- CHAN, B.M.C., en BRASH, J.L., J. Colloid Interface Sci., 82, 217 (1981).
- CHAN, B.M.C., en BRASH, J.L., J. Colloid Interface Sci., 84, 263 (1981).

- CHUANG, H.J., KING, W.F., en MASON, R.G., J. Lab. Clin. Med., 483 (1978).
- COHEN STUART, M.A., SCHEUTJES, J.M.H.M. en FLEER, G.J., J. Polymer Sci.: Polymer Phys. Ed. 58, 559 (1980).
- CRANDALL, R.E., JANATOVA, J., en ANDRADE, J.D., Prep. Biochem., 11, 111 (1981).
- CUYPERS, P.A., HERMENS, W.T., en HEMKER, H.C., Ann. New York Acad. Sci. 283, 77 (1977).
- DE BRUIN, H.G., VAN OSS, C.J., en ABSOLOM, D.R., J. Colloid Interface Sci., 76, 254 (1980).
- DILLMAN, W.J., en MILLER, I.F., J. Colloid Interface Sci. 44, 221 (1973).
- DOOLITTLE, R.F., "The Plasma Proteins II" Academic Press, New York (F.W. Putman, ed. ) (1975).
- EBERHART, R.C., PROKOP, L.D., WISSENGER, J., en WILKOV, M.A., Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs, Vol XXIII, 131 (1977).
- EBERHART, R.C., LYNCH, M.E., BILGE, F.H., WISSINGER, J.F., MUNRO, M.S. ELLSWORTH, S.R., en QUATTRONE, A.J., Ad. Chem. Series 199, "Biomaterials: Interfacial Phenomena and Application" (S.L. Cooper en N.A. Peppas, Eds.) p. 293 (1982).
- FAIR, B.D., en JAMIESON, A.M., J. Colloid Interface Sci., 77, 525 (1980).
- FENSTERMAKER, C., en MORRISEY, B.W., Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, Vol. XXII, 278 (1976).
- GENDREAU, R.M., LEININGER, R.I., WINTERS, S., en JAKOBSEN, R.B., in Adv. Chem. Series 199, p. 371 (1982).
- GORMAN, R.R., STONER, G.E., en CATLIN, A., J. Phys. Chem., 75, 2103 (1971).
- HANSON, S.R., HARKER, L.A., RATNER, B.D., en HOFFMAN, A.S., J. Lab. Clin. Med., 95, 289 (1980).
- HLADY, V., FURDI, M., J. Colloid Interface Sci., 69, 460 (1979).
- HORBETT, T.A., en HOFMANN, A.S., Advances in Chemistry Series 145 "Applied Chemistry at protein Interfaces" (R.E. Baier Ed.) p.230 (1975).



HORBETT, T.A., J. of Biomed. Mater. Res., 15, 673 (1981).

HORBETT, A., en WEATHERSBY, P.K., J. Biomed. Mater. Res., 15, 403 (1981).

HUNTER, W.M. en GREENWOOD, F.C. Nature, 194, 495 (1962).

IHLENFELD, I.V., en COOPER, S.L., J. Biomed. Mater. Res., 13, 577 (1979).

JONSSON, U., IVARSSON, B., LUNDSTROM, I., en BERGHEM, L., J. Colloid Interface Sci., 90, 148 (1982).

KIM, S.W., en LEE, E.S., J. of Polymer Sci.: Polymer Symp. 66, 429 (1979).

KLEIN, C.P.A.T., DE GROOT, K., VERMEIDEN, J.P.W., en KAMP, G., J. Biomed. Mater. Res. 14, 705 (1980).

KLEIN ELHORST, J., OLTHUIS, F.M.F.G., BARGEMAN, D., SMOLDERS, C.A., en FEIJEN, J., Int. J. of Artif. Organs, 1, 288 (1978).

KOCHWA, S., LITWAK, R.S., ROSENFELD, R.E., en LEONARD, E.F., Ann. N.Y. Acad. Sci., 283, 37 (1977).

LEE, R.G., en KIM, S.W., J. Biomed. Mater. res., 8, 251 (1974).

LEMM, W., en UNGER, V., in "Evaluation of Biomaterials", (G.D. Winter, J.L. Lerey en K. de Groot) p. 505 (1980).

MAC MILLIN, C.R., en WALTON, A.G., J. Colloid Interface Sci., 48, 345 (1974).

MAC RITCHIE, F., Adv. Protein Chem., 32, 283 (1978).

MANCINI, G., CARBONARA, A.D., en HEREMANS, J.F., Immunochem 2, 235 (1965).

MIZUTANI, T., J. Colloid Interface Sci., 82, 162 (1980).

MORRISEY, B.W., SMITH, L.E., FENSTERMAKER, C.A., STROMBERG, R.R., en GRANT, W.H., National Bureau of Standards Special Publications 415 (1974).

NORDE, W., Proefschrift "Proteins at Interfaces", commun. Agric. Univ. Wageningen 76-6 (1976).

NORDE, W., en LYKLEMA, J., J. Colloid Interface Sci. 66, 285 (1978).

ORESKES, I., en SINGER, J.M., J. Immun., 86, 338 (1961).

- PENNERS, G., PRIEL, Z., en SILBERBERG, A., J. Colloid Interface Sci, 80, 437 (1981).
- PETERS, T., "The Plasma Proteins I", Academic Press New York (F.W. Putman Ed.) (1975).
- RATNER, B.D., Adv. Chem. Series 199 p.9 (1982).
- ROOHK, H.V., NAKAMURA, M., HILL, R.L., HUNG, E.K., en BARTLETT, R.H., Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, Vol. XXIII, 152 (1977).
- SCHMITT, A., VAROQUI, R., UNİYAL, S., PUSINERI, C., J. Colloid Interface Sci. 92, 25 (1983).
- SILBERBERG, A., J. Polymer Sci. C30, 393 (1970).
- SODERQUIST, M.E., en WALTON, A.G., J. Colloid Interface Sci., 75, 386 (1979).
- STENBERG, M., ARWIN, H., en NILSSON, A., J. Colloid Interface Sci., 72, 255 (1979).
- SUZAWA, T., SHIRAMA, H., en FUJIMOTO, T., J. Colloid Interface Sci., 86, 144 (1982).
- UNİYAL, S., BRASH, J.L., en DEGTEREV, I.A., Adv. Chem. Series 199, p.277 (1982).
- VAN DULM, P., en NORDE, W., J. Colloid Interface Sci., 91, 248 (1983).
- VAN DER SCHEER, A., Proefschrift "Adsorption of Plasma Proteins" Krips Repro B.V. Meppel (1978).
- VAN DER SCHEER, A., SMOLDERS, C.A., J. Colloid Interf. Sci., 63, 7 (1978).
- VAN DER SCHEER, A., FEIJEN J., KLEIN ELHORST J., KRUGERS DAGNEAUX, P.G.L.C. en SMOLDERS, C.A., J. Colloid Interface Sci., 66, 136 (1978).
- VAN OSS, C.J., ABSOLOM, D.R., NEUMANN, A.W., en ZING, W., Biochim. Biophys. Acta, 670, 64 (1981).
- VAN WAGENEN, R.A., ZSADIUK, B.J., en ANDRADE, J.D., Organic Coatings and Plastic Chem., 42, 749 (1980).
- VAN WAGENEN, R.A., ROCKHOLD, S., en ANDRADE, J.D., Adv. Chem. Series 199, 351 (1982).
- VROMAN, L., ADAMS, A.L., FISCHER, G.C., MUNOZ, P.C., Blood, 55, 156 (1980).

WALTON, A.G., en MAENPA, F.C., J. Colloid Interface Sci.,  
72, 265 (1979).

WALTON, A.G., en KOLTISKO, B., Adv. Chem. Series 199, p.245 .  
(1982).

YOUNG, B.R., LAMBRECHT, L.K., COOPER, S.L., en MOSHER, B.F.,  
Adv. Chem. Series, 199, p.317 (1982).

ZUCKER, M.B., VROMAN, L., Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 131,  
20 (1969).



## HOOFDSTUK II

### AFWIJKEND ADSORPTIEGEDRAG VAN EIWITTEN TEN GEVOLGE VAN HET GEBRUIK VAN LABELINGSTECHNIEKEN EN/OF VAN ONGEZUIVERD EIWIT.

#### II.1. Inleiding

Het radiolabelen van eiwitten wordt al vele jaren toegepast voor eiwit adsorptiestudies. Ter verkrijging van zinvolle, betrouwbare resultaten moet voldaan worden aan een aantal voorwaarden, verbonden aan het gebruik van radioactief gelabelde eiwitten. Zo dient de eiwitoplossing homogeen en monodispers te zijn. Na het labelingsproces mag geen ongebonden radioisotoop in de eiwitoplossing achterblijven. De labeling behoort eenduidig en gelijkmatig te zijn en het adsorptiegedrag van het gelabelde eiwit moet identiek zijn aan het adsorptiegedrag van het niet gelabelde eiwit. Wanneer aan deze voorwaarden is voldaan, dan is het radiolabelen van eiwitten een elegante methode om kwantitatief de adsorptie van eiwitten te bestuderen aan kleine oppervlakken. Ook kan, gebruikmakend van verschillende specifieke labels, concurrerende eiwitadsorptie gelijktijdig en kwantitatief worden bestudeerd.

In de meeste eiwit adsorptiestudies wordt impliciet aangenomen dat aan bovenstaande voorwaarden is voldaan. Zo refereren R.G. GREIG en D.E. BROOKS (1981) een aantal adsorptiestudies waarbij zonder meer aangenomen is dat de gebruikte eiwitoplossingen homogeen en monodispers zijn. Echter eiwitpreparaten bevatten vaak dimeren en oligomeren. Bovendien blijkt de heterogeniteit dikwijls nog toe te nemen tijdens de bewerkingen noodzakelijk voor eiwitadsorptiestudies (JANATOVA en ANDRADE, 1980).

Dat het adsorptiegedrag van gelabeld en niet gelabeld eiwit niet altijd identiek hoeft te zijn is aangetoond door GRANT (1977), V.D. SCHEER (1978), en KLEIN ELHORST (1978). Dit in tegenstelling tot CHUANG (1978), PENNERS (1981), V. OSS (1981), BORNZIN (1982), SCHMITT (1983) en V. DULM (1983),

die het bewezen achten dat er geen verschil in adsorptiegedrag bestaat tussen gelabelde en niet gelabelde eiwitten. CRANDALL en ANDRADE (1981) hebben aangetoond dat door labeling drastische veranderingen optreden in het chromatografisch en electroforetisch gedrag van BSA en waarschuwen voor het gebruik van radiolabeling in adsorptiestudies.

In dit Hoofdstuk wordt het belang van de karakterisering en zuivering van de plasma eiwitten menselijk albumine, menselijk fibrinogeen en menselijk immuno gamma globuline aangegeven met betrekking tot de adsorptie aan vaste oppervlakken. Vervolgens wordt met gebruikmaking van gezuiverde eiwitten de invloed van radiolabeling van deze eiwitten op het adsorptiegedrag bestudeerd. Dit gebeurt aan de hand van gelijktijdige bepaling van de adsorptie van gelabeld en niet gelabeld eiwit aan polystyreen-latex. Aan de hand van deze resultaten zal nader ingegaan worden op bovenstaande controverse.

## II.2. Experimenteel

### Materialen

*Menselijk serum albumine* (Human Serum Albumin, HSA; kristallijn,  $MW=6,6 \times 10^4$ ) was afkomstig van Sigma, USA (Lot nr. A9511). Het opgegeven eiwitgehalte bedroeg 98% (gewichtsprocenten, gew.%).

*Menselijk fibrinogeen* (Human Fibrinogen, HFb; kristallijn,  $MW=3,4 \times 10^5$ ) was afkomstig van Kabi, Zweden en had de volgende samenstelling 38,5 gew.% HFb, 46 gew.% natriumacetaat en 15,4 gew.% Natrium-chloride .

*Menselijk immuno gamma globuline* (Human Immuno gamma Globulin, HIgG, kristallijn  $MW=1,6 \times 10^5$ ) was afkomstig van het Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusiedienst. Het totale eiwitgehalte bedroeg 74% bepaald in dit laboratorium met behulp van HPLC. Ook is gebruik gemaakt van HIgG afkomstig van KABI, AB Stockholm, Zweden. HIgG is in beide gevallen bereid uit de Cohnfracties II en III door precipitatie uit alcohol. Het totale eiwitgehalte van HIgG

(Kabi) bedroeg 95 gew.% waarvan 98 gew.% HIgG.

De eiwitten zijn gekarakteriseerd, gezuiverd en wederom gekarakteriseerd voor gebruik (zie verderop onder resultaten).

Alle experimenten zijn uitgevoerd in fosfaat gebufferde zoutoplossingen (phosphate buffered saline solutions, PBS), die bereid zijn door een oplossing van 0,01 N NaOH en 0,15 M NaCl toe te voegen aan een oplossing van 0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en 0,15 M NaCl tot een pH van 7,35 is bereikt. De gebruikte chemicaliën waren analytisch zuiver.

De polystyreen latex (PS-latex) was afkomstig van SERVA (Dow uniform latex particles no 41932). De opgegeven deeltjesdiameter was  $399 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ . Dit is geverifieerd met behulp van een scanning electronen microscoop. De electroforetische mobiliteit van de latexdeeltjes werd gemeten bij  $20^\circ\text{C}$  en een pH van 7,35 in een PBS buffer met een Rank Brothers Mark II micro-electroforese apparatuur (de berekende zêta potentiaal is  $-20\text{mV}$ ). Het specifieke oppervlak van de PS-latex is  $1,43 \text{ m}^2 \text{ ml}^{-1}$  gebaseerd op een vaste stof percentage van 10% en een dichtheid van  $1,05 \text{ gcm}^{-3}$  voor PS.

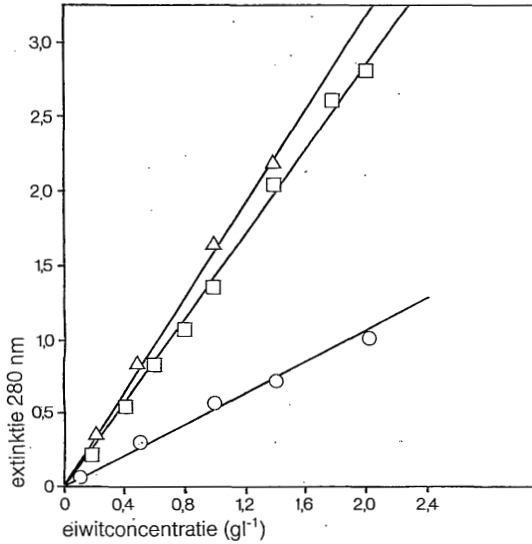
### II.3. Methoden en voorschriften

#### *Concentratiebepaling*

De eiwitconcentraties zijn routinematig bepaald door het meten van de extinctie bij 280 nm. Hierbij is gebruik gemaakt van extinctiecoëfficiënten (de extinctie van  $1 \text{ gl}^{-1}$  eiwitoplossingen in een 1 cm kwartscuvet bij 280 nm), die bepaald zijn door verdunningsreeksen met bekende eiwitconcentraties. Figuur 1 geeft de ijklijnen voor HSA, HFb en HIgG. Op basis van deze grafiek zijn de extinctiecoëfficiënten respectievelijk bepaald op 0,53 voor HSA; 1,40 voor HIgG en 1,55 voor HFb.

#### *Labeling van eiwitten*

De eiwitten zijn gelabeld met  $\text{I}^{125}$  afkomstig van



Figuur 1 IJkcurves van HSA (O), HlgG (□) en HFb (Δ) voor de bepaling van extinctiecoëfficiënten.

Amersham, Engeland (IMS 30) gebruikmakend van de chlooramine T methode. Deze methode is ontwikkeld door HUNTER (1962) en later enigszins gewijzigd door KLEIN ELHORST (1978). Het principe is als volgt: chlooramine T is een oxydatiemiddel dat het jodide, beschikbaar als natriumzout, oxydeert tot jodium. Hierbij wordt aangenomen dat vervolgens substitutie plaatsvindt d.m.v.  $I_2$  op de orthoplaats van de phenolring in het aminozuur tyrosine, dat deel uitmaakt van de eiwitmoleculen. Voorts wordt aangenomen dat slechts een jodiumatoom per eiwitmolecule wordt ingevoerd.

De procedure is als volgt: aan 5 ml eiwitoplossing (bijvoorbeeld  $1 \text{ g l}^{-1}$  HSA) wordt  $50 \text{ } \mu\text{l NaI}$ , waarin  $5 \text{ } \mu\text{l}$  radioactief NaI van Amersham aanwezig is met een activiteit van  $1000 \text{ } \mu\text{Ci}$ , toegevoegd. De in de oplossing aanwezige hoeveelheden eiwit en jodide zijn equimolair. De substitutiereactie wordt vervolgens gestart door  $50 \text{ } \mu\text{l}$  chlooramine T ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ) toe te voegen aan de eiwitoplossing; na 5 minuten wordt de oxydatie reactie gestopt door



toevoeging van een overmaat reducerend agens (50  $\mu$ l natrium bisulfiet met een concentratie van  $2\text{gl}^{-1}$ ). Alle componenten zijn opgelost in PBS buffer pH 7,35 bij  $20^\circ\text{C}$ . Na de labeling wordt het labelingspercentage bepaald met behulp van dunne laag chromatografie (STERN 1965). Hierbij wordt een druppeltje van het reactiemengsel aangebracht op aluminiumfolie bedekt met een dunne laag cellulose-acetaat (MERCK no. 5574/0025). Als eluens wordt een methanol-water oplossing (85%-15%) gebruikt. Op deze wijze wordt vrij jodide gescheiden van aan eiwit gebonden jodium. Door de aluminiumfolie in stukken te knippen en vervolgens de radioactiviteit te bepalen in een COBAS gamma-teller kan het percentage gebonden jodium worden berekend. Dit percentage kan bij de chlooramine T methode variëren van 75% tot 85%.

Wanneer aangenomen wordt dat slechts 1 jodium atoom per eiwitmolecule is ingebouwd en dat de labelingsreactie voor radioactief jodium ( $\text{I}^{125}$ ) niet verschilt met de labelingsreactie van niet radioactief jodium ( $\text{I}^{127}$ ), dan kan gesteld worden dat van de gezuiverde eiwitoplossing na labeling 75-85% van het eiwit gelabeld is met jodium en dat daarvan slechts 0,02% gelabeld is met radioactief jodium. Het reactiemengsel kan op twee manieren gezuiverd worden van chlooramine T, natriumbisulfiet en vrij jodide. Dit kan door gedurende 16 uur bij  $20^\circ\text{C}$  de eiwitoplossing te dialyseren tegen PBS buffer of door te elueren over een GPC kolom (G25, PD-10 Pharmacia Fine Chemicals). Deze laatste methode heeft als voordeel dat de eiwitoplossingen binnen enkele minuten gezuiverd kunnen worden van de verontreinigingen. Dit komt de stabiliteit van de eiwitoplossing ten goede. Na de zuiveringsstap is wederom met behulp van dunne laag chromatografie het percentage vrij jodide bepaald. Dit varieerde van 0,2 tot 1%.

Na 1 week zijn de gelabelde eiwitoplossingen opnieuw gecontroleerd op aanwezigheid van vrij jodide met behulp van dunne laag chromatografie. Er kon geen toename van vrij jodide worden aangetoond.

Alle experimenten zijn uitgevoerd binnen 5 dagen na

labeling met gezuiverde eiwitoplossingen waarin 1-10% gelabeld eiwit (uit 75-85% verkregen door verdunning).

#### Adsorptie van eiwitten

De adsorptie van de gezuiverde eiwitten HSA, HIgG en HFb is bestudeerd met de depletietechniek. Deze methode bestaat uit het meten van de eiwitconcentratie voor en na toevoegen van een bekende hoeveelheid PS-latex aan een eiwitoplossing. Ter verkrijging van betrouwbare resultaten zijn de concentraties latex en eiwit meestal zodanig gekozen, dat ongeveer 25% van het in oplossing aanwezige eiwit adsorbeert aan de latex. PS-latex en eiwitten zijn vooraf gesuspendeerd in PBS buffer pH 7,35 bij een temperatuur van 20° C.

Na toevoeging van 10-200  $\mu$ l PS-latex oplossing aan 2-3ml eiwitoplossing, wordt het geheel af en toe geschud tot de vereiste adsorptietijd is bereikt. Dan wordt het mengsel gecentrifugeerd in een Sorvall Superspeed RC-2B centrifuge gedurende 15 minuten (versnelling 20.000 g).

De initiële eiwitconcentraties van de oplossing en van de heldere bovenstaande oplossing worden op twee manieren bepaald. Hierbij wordt rekening gehouden met verdunning van de oplossingen ten gevolge van de toevoeging van PS-latex. De eiwitconcentratie wordt bepaald door

- meting van de radioactiviteit in de oplossing met een Cobas gamma-teller of door
- UV spectroscopie bij 280 nm.

Uit de verandering in eiwitconcentratie veroorzaakt door adsorptie aan de PS-latex en het bekende latex oppervlak kan de geadsorbeerde hoeveelheid eiwit per oppervlakte eenheid worden berekend.

In gevallen waarbij geen heldere supernatant verkregen werd, is de bovenstaande oplossing gefiltreerd door een Millipore cellulose-acetaat filter (Poriediameter 0,2  $\mu$ m). Bij filtratie van de heldere supernatanten kon geen detecteerbare vermindering in de eiwitconcentratie worden waargenomen.

Door op twee manieren de eiwitconcentratie te bepalen kan

gelijktijdig de adsorptie van gelabeld en niet gelabeld eiwit aan PS-latex worden gevolgd in dezelfde oplossing onder exact dezelfde omstandigheden.

#### II.4. Resultaten

##### *Karakterisering en zuivering van de eiwitten*

Voor gebruik zijn de eiwitten gekarakteriseerd en gezuiverd. Ter karakterisering van HSA, HIgG en HFb is gebruik gemaakt van HPLC (High Performance Liquid Chromatography), Polyacrylamide gel electroforese en immuno-electroforese. HIgG is bovendien nog gekarakteriseerd met iso-electrische focusering. Uit de karakterisering van HSA, HFb en HIgG bleek dat deze eiwitten voor gebruik gezuiverd moesten worden. Dit is gebeurd met Sepharose 6B chromatografie.

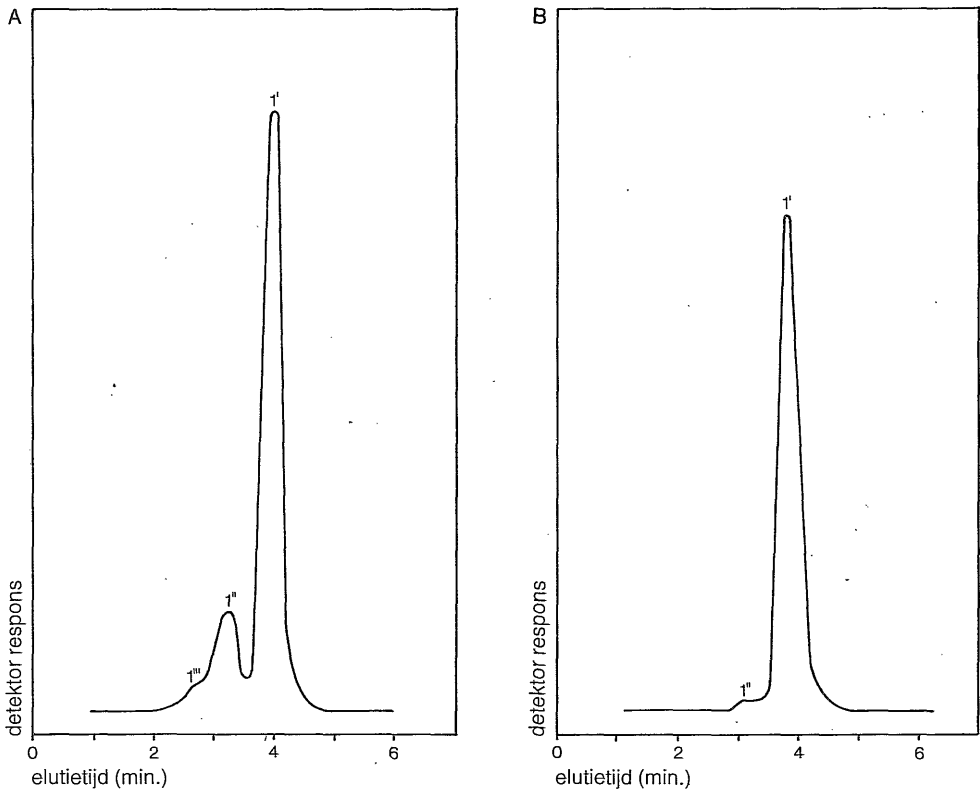
##### *Karakterisering met HPLC*

Gebruik is gemaakt van een Waters Associates chromatograaf gekoppeld aan een UV spectrofotometer (UV Cord, LKB) voorzien van een micro doorstroom cel. De HPLC kolom waarvan gebruik is gemaakt is een TSK-GEL SW 3000 kolom afkomstig van VARIAN. Deze kolom bevat een poreuze gel met hydrofiele deeltjes (diameter 10  $\mu\text{m}$ ) gestapeld in gedistilleerd water; de kolom is speciaal vervaardigd voor eiwitscheidingen.

Het HPLC chromatogram van ongezuiverd HSA laat 3 pieken zien (Figuur 2A), die kunnen worden toegeschreven aan HSA monomeer (1), HSA dimeer (1') en HSA trimeer (1"). Een hoeveelheid van ongeveer 14% dimeer is aanwezig en minder dan 1% trimeer is gedetecteerd (berekend op basis van de piekoppervlakken).

Na zuivering is nog slechts een kleine hoeveelheid dimeer aanwezig (Figuur 2B). Ook HIgG (Kabi) en HIgG (CLB) bevatten hoogmoleculaire componenten. Na sepharose 6B chromatografie bevat HIgG (Kabi) nog steeds meer hoogmoleculair materiaal dan HIgG (CLB) HFb kan met HPLC niet gescheiden worden in meerdere componenten, dit wil echter nog niet zeggen dat de HFb oplossing geen andere componenten bevat dan HFb

monomeer. Echter met de TSK gel SW kolommen is het niet mogelijk HFb te scheiden van hoogmoleculaire aggregaten.



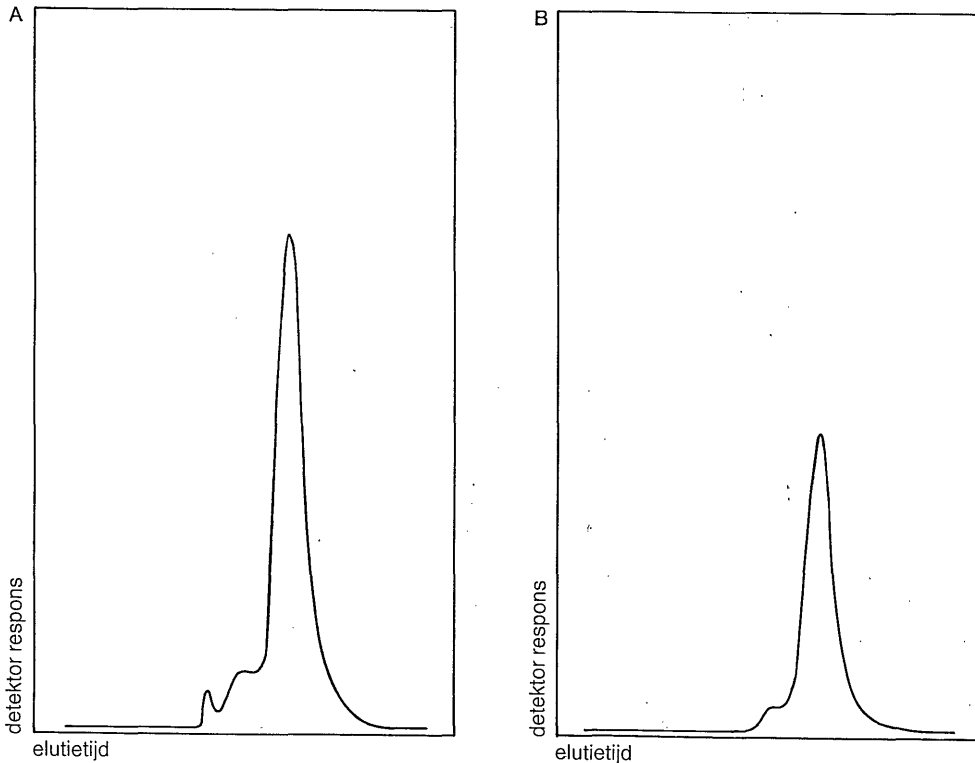
**Figuur 2** HPLC chromatogram van niet gezuiverd HSA (Figuur A), monomeer (1'), dimeer (1''), trimeer (1'''), en HSA na Sepharose 6B zuivering (Figuur B).

*Karakterisering met polyacrylamide gel electroforese*

HSA is gekarakteriseerd met behulp van disc-electroforese op een polyacryl amide gel. Naast vorm en grootte van het molecuul, zoals bij HPLC, speelt hier ook de lading van het eiwit een belangrijke rol bij de scheiding tussen monomeer en eventueel aanwezige dimeren. Met deze karakteriseringsmethode konden na eiwitkleuring 3 eiwitbandjes gedetecteerd worden die op grond van hun plaats corresponderen met HSA

monomeer, HSA dimeer en HSA trimeer. Polyacryl amide gel electroforese van HFb leverde ook hier slechts één band op.

Het HIgG preparaat bevatte een groot aantal componenten zichtbaar in een groot aantal bandjes, dit in tegenstelling tot het HPLC chromatogram (Figuur 3) dat slechts 2 extra componenten aangaf.

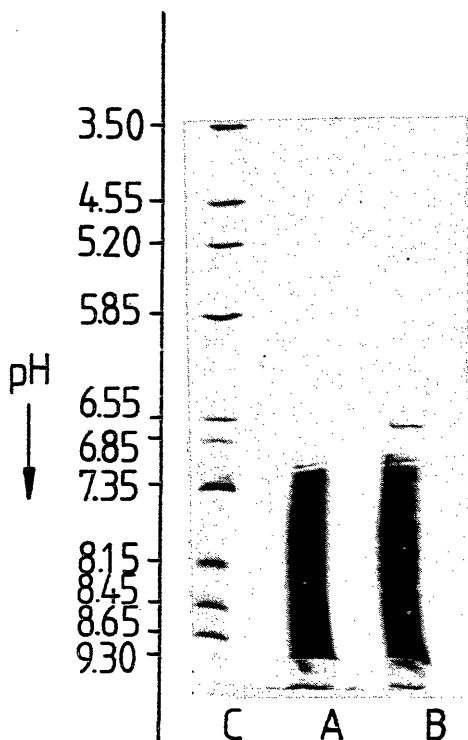


Figuur 3 HPLC chromatogrammen van gezuiverd HIgG Kabi (Figuur A) en gezuiverd HIgG, CLB (Figuur B).

#### *Karakterisering met iso elektrische focusering*

HIgG is bovendien gekarakteriseerd met behulp van iso-electrische focusering (RIGNETTI en DRYSDALE) waarbij over het electroforesemedium een pH-gradiënt is aangelegd, waardoor een scherpe concentrering (focusering) van elk eiwit op zijn iso-electrisch punt plaatsvindt. HIgG (CLB)

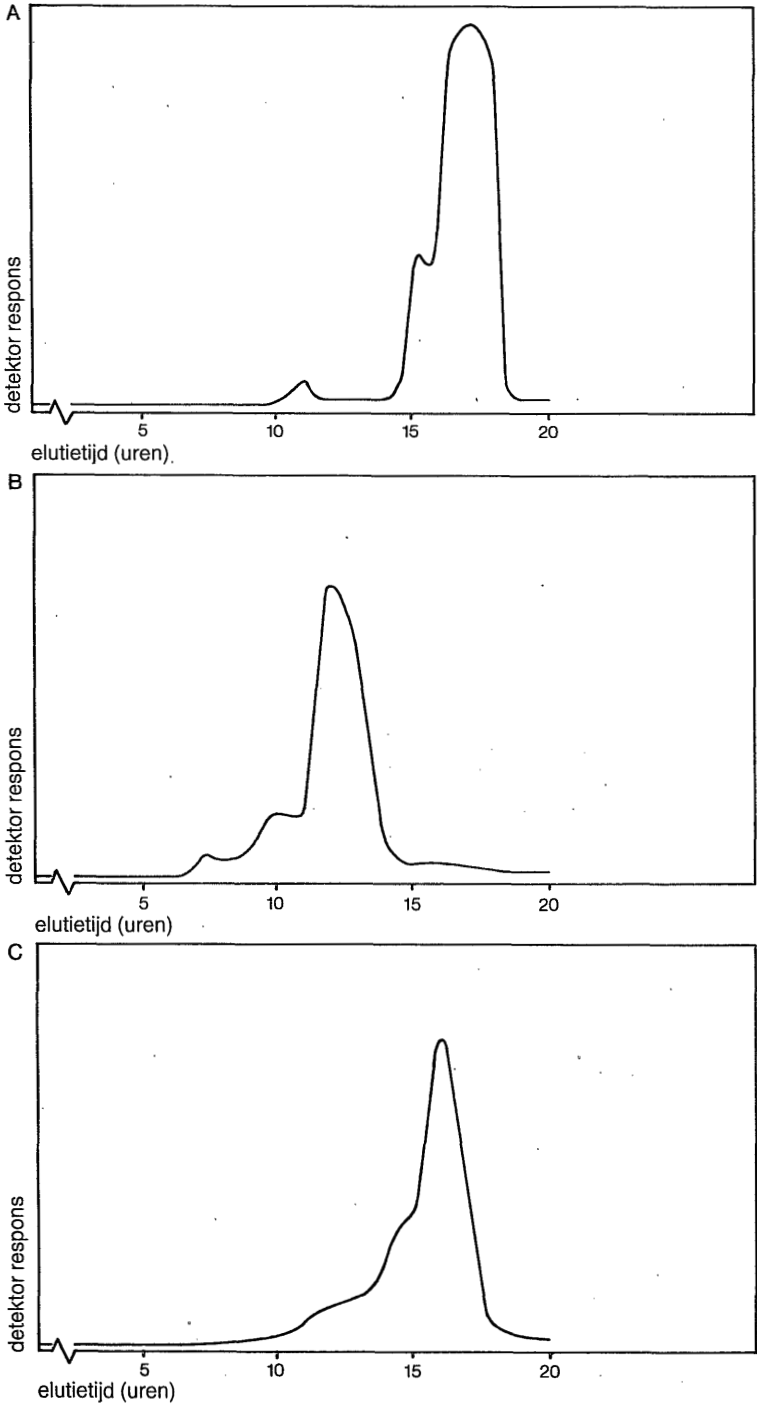
bevat eiwitcomponenten met iso-electrische punten in het lage pH traject ( $5,2 < \text{pH} < 7,0$ ), terwijl HIgG (Kabi) geen componenten bevat met een I.E.P  $< \text{pH} 7,0$  (Figuur 3\*).



Figuur 3\* Iso-electrische focusering resultaten  
 A. HIgG (Kabi)  
 B. HIgG (CLB)  
 C. Calibratie kit pH 3-10 van Hoechst.

#### *Immuno electroforese*

Door karakterisering met immuno electroforese (GRABAR, 1953), waarbij gebruik gemaakt werd van konijnen anti-menselijk serum kon bij zowel HSA, HFb als HIgG geen ander eiwit worden aangetoond.



**Figuur 4** Elutiepatronen van HSA (A), HFb (B) en HlgG (C) na Sepharose 6B kolomchromatografie.

### *Zuivering van eiwitten*

HSA, HIgG en HFb zijn gezuiverd, gebruikmakend van gel-filtratie. Deze methode was oorspronkelijk alleen bedoeld voor zuivering van HFb, waardoor met behulp van Sepharose 6B chromatografie de in HFb aanwezige hoogmoleculaire component ( $MW=10^6$ ) kon worden verwijderd (VISSER, 1979). Deze methode bleek later ook geschikt om HSA te zuiveren van dimeer en monomeer (Figuur 2B). Het was echter niet mogelijk om op deze wijze de extra componenten in de HIgG oplossing volledig te verwijderen (Figuur 3B). Figuur 4 toont de elutiepatronen van HSA, HFb en HIgG. PBS (pH 7,35) werd gebruikt als elutiebuffer bij 20°C. Uit het elutiepatroon van de HFb oplossing blijkt dat ook hierin hoog moleculaire componenten aanwezig zijn. Na zuivering van HFb bleek de stabiliteit van het eiwit aanzienlijk te zijn toegenomen. De monomeer en dimeer fracties van HSA zijn verzameld en afzonderlijk gekarakteriseerd, Na 3 dagen zijn deze fracties opnieuw gekarakteriseerd. Het HPLC chromatogram van HSA monomeer en dimeer bleek na 3 dagen niet veranderd, waardoor geconcludeerd kan worden dat er geen snel evenwicht bestaat tussen monomeren, dimeren of eventuele oligomeren.

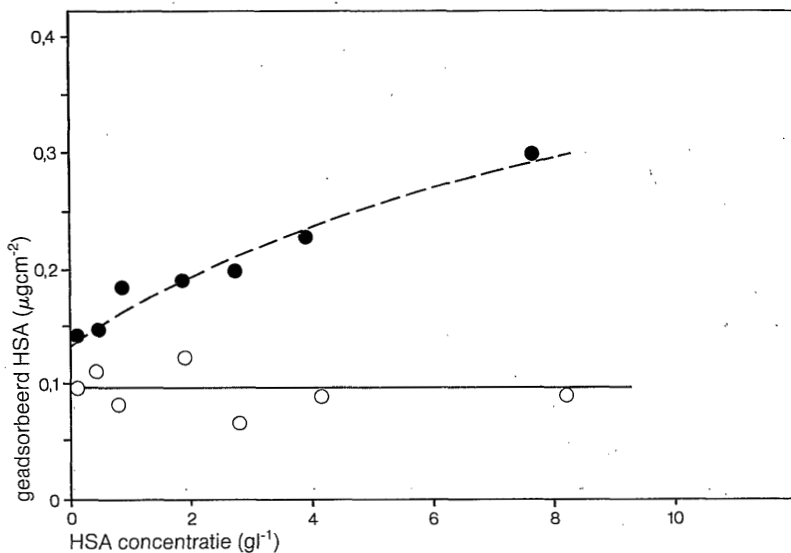
Ook na het labelen van de gezuiverde eiwitten kon met HPLC, immuno electroforese en polyacrylamide gel electroforese geen verandering ten gevolge van labeling in de eiwitoplossingen worden waargenomen.

### *Eiwitadsorptie*

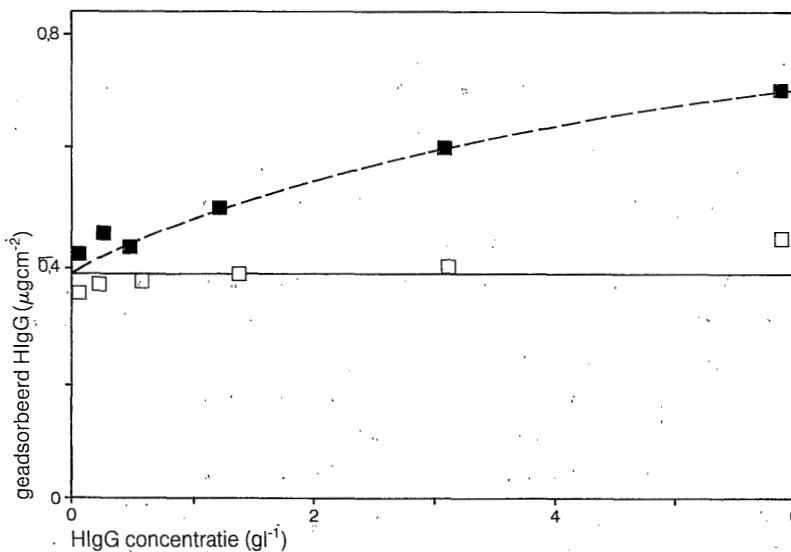
De adsorptie van gezuiverde gelabelde en niet gelabelde eiwitten HSA, HIgG en HFb aan PS-latex is gemeten als functie van de tijd. Binnen 15 minuten werd een plateauwaarde bereikt, die na 20 uur niet veranderd was.

Behalve de snelheidscurves zijn ook de adsorptie isothermen van gezuiverde gelabelde eiwitten (HSA, HFb en HIgG) bepaald d.m.v. zowel *Radioactiviteitsmetingen (RAD)* als metingen met behulp van *UV spectroscopie (UV)*. De isothermen zijn weergegeven in Figuur 5-7. In alle gevallen verschilden de isothermen verkregen door radioactiviteitsmetingen aanzienlijk

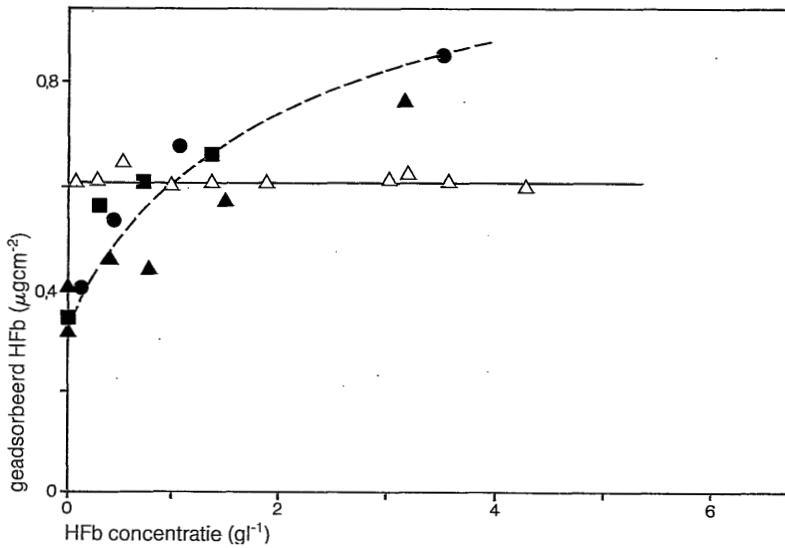




Figuur 5 Adsorptie isothermen van HSA (3% gelabeld, de rest van het eiwit is ongelabeld) aan een PS-latex na 1 uur adsorptie gebruikmakend van UV spectroscopie (O) en van radioactiviteitsmetingen (●).



Figuur 6 Adsorptie isothermen van HIgG (3,3% gelabeld) aan een PS-latex na 3 uur adsorptie gebruikmakend van UV spectroscopie (□) en van radioactiviteitsmetingen (■).

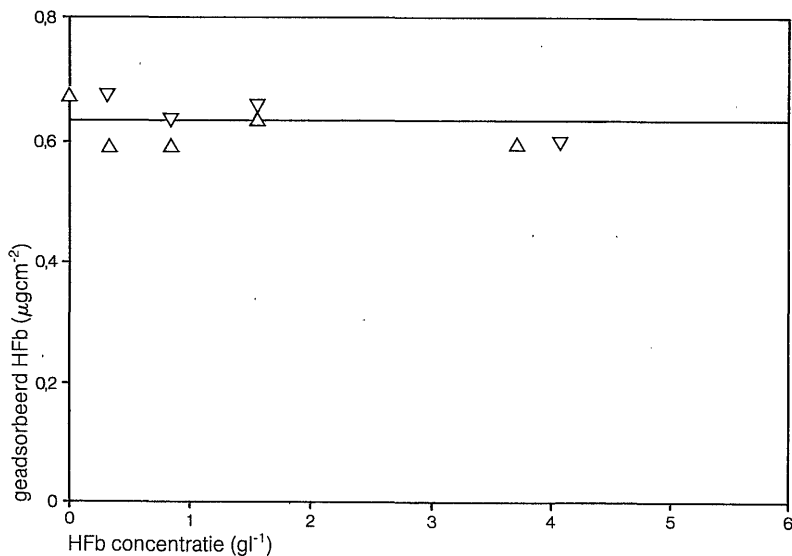


Figuur 7 Adsorptie isothermen van partieel gelabeld HFb aan een PS-latex na 4 uur adsorptie gebruikmakend van UV spectroscopie ( $\Delta$ ) en van radioactiviteitsmetingen. Het HFb bevatte voor adsorptie respectievelijk 8% (■), 1,6% (●) en 0,8% (▲) gelabeld eiwit.

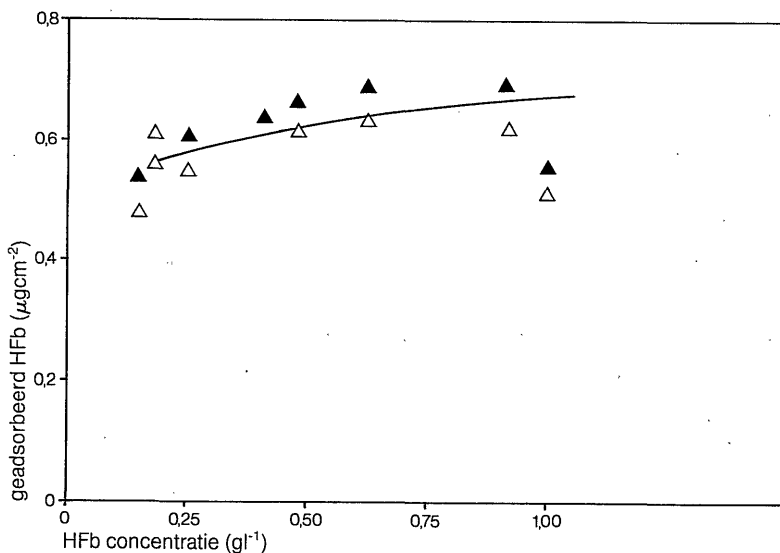
van de isothermen verkregen met behulp van UV spectroscopie. Terwijl de RAD isothermen geen plateauwaarden bereikten bij eiwitconcentraties in oplossing variërend van 0-8 gl<sup>-1</sup>, werden wel plateauwaarden bereikt voor UV isothermen.

Figuur 8 laat zien dat, als UV spectroscopie wordt gebruikt voor de eiwitconcentratiebepaling, dezelfde adsorptie isothermen verkregen worden voor 78% gelabeld HFb (waarbij de totale HFb oplossing vooraf de labelingsprocedure heeft ondergaan) en niet gelabeld HFb. Normaal gesproken geldt voor gelabelde eiwitoplossingen dat slechts 3-10% van het opgeloste eiwit de labelingsprocedure heeft ondergaan.

Figuur 9 toont adsorptie isothermen (RAD en UV) van HFb aan PS-latex, waarbij de totale HFb oplossing vooraf de labelingsprocedure heeft ondergaan (78% gelabeld eiwit). In dit geval kan geconstateerd worden dat geen significant verschil waarneembaar is tussen de RAD isotherm en de UV isotherm. Dit



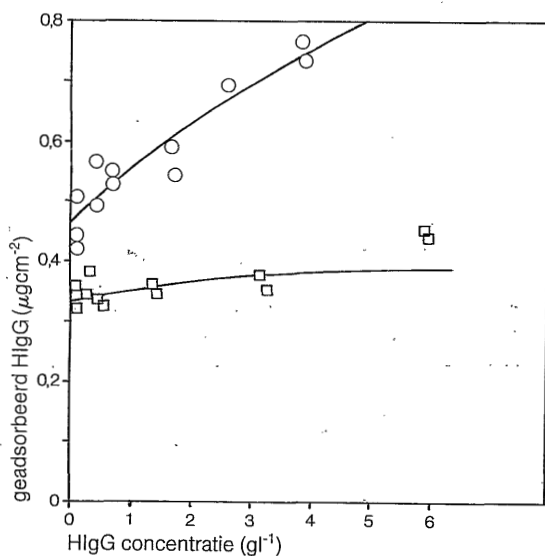
**Figuur 8** Adsorptie isothermen bepaald met behulp van alléén UV spectroscopie van 78% gelabeld HFb ( $\Delta$ ), waarbij al het in de oplossing aanwezige HFb de labelingsprocedure heeft ondergaan en niet gelabeld HFb ( $\nabla$ ). Adsorptietijd 1 uur.



**Figuur 9** Adsorptie isothermen van HFb dat voor 78% gelabeld is (al het in de oplossing aanwezige HFb heeft de labelingsprocedure ondergaan) na 1 uur adsorptie aan PS-latex gebruikmakend van UV spectroscopie ( $\Delta$ ) en van radioactiviteitsmetingen ( $\blacktriangle$ ).

geldt ook voor HSA en HIgG isothermen.

Dat niet alleen radiolabeling leidt tot verschillen in adsorptieisothermen wordt duidelijk in Figuur 10. De adsorptieisotherm voor HIgG (CLB) bereikt een plateauwaarde lage eiwitconcentratie in de oplossing ( $0,4 \mu\text{gcm}^{-2}$  bij  $0,1 \text{gl}^{-1}$ ), terwijl de isotherm van HIgG (Kabi) nog helemaal geen plateauwaarde heeft bereikt bij deze eiwitconcentratie. Kennelijk zijn verschillen in de voorbehandeling van deze eiwitten verantwoordelijk voor het verschil in adsorptie.



Figuur 10 Adsorptie isothermen van HIgG (Kabi) (O) en HIgG (CLB) ( $\square$ ) aan polystyreen latex bepaald met UV spectroscopie.

## II.5. Discussie

Uit de karakterisering en zuivering van HFb, HSA en HIgG blijkt dat geen van deze eiwitten alleen uit monomeren bestaat. HFb, HSA en HIgG bevatten een niet te verwaarlozen hoeveelheid dimeer en oligomeren. Veel adsorptiestudies zijn gepubliceerd waarbij plasma eiwitten geadsorbeerd zijn aan vaste oppervlakken zonder deze eiwitten vooraf te karakteriseren.

Ook bij deze eiwitstudies kunnen naast het aanwezige monomeer, polymere materialen aanwezig zijn, die de adsorptie van het monomeer sterk kunnen beïnvloeden (door concurrerende adsorptie) en de analyse van de adsorptieresultaten aanzienlijk kunnen verstoren. Dit is aangetoond in ons laboratorium aan de hand van 2 gamma globuline preparaten (afkomstig van KABI, Stockholm en CLB, Amsterdam), die onder dezelfde adsorptie condities een zeer verschillend adsorptie gedrag vertoonden (Figuur 10). Uit de karakterisering van HIgG (Kabi) en HIgG (CLB), zie Figuur 3, bleek dat deze preparaten niet identiek waren (RONNER, 1984). Ook blijkt uit de karakterisering van HIgG dat één methode niet voldoende is om een goed inzicht te krijgen in de in de oplossing aanwezige eiwitcomponenten. De zuivering van eiwitten voor adsorptie vereenvoudigt het te bestuderen systeem in ieder geval aanzienlijk en maakt de verkregen resultaten gemakkelijker interpreteerbaar.

Toch blijkt dat in ons systeem, bij gebruik van radio-gelabelde eiwitten, ook na zuivering, geen eenduidige interpretatie van de adsorptieresultaten mogelijk is. De isothermen van gelabeld HSA, HIgG en HFb vertonen significante verschillen afhankelijk van de gebruikte detectie methode (Figuur 5-7).

Er kan geconcludeerd worden dat in dit soort systemen het gebruik van gelabelde eiwitten leidt tot onbetrouwbare resultaten. VAN DER SCHEER (1978) en KLEIN ELHORST (1978) constateerden reeds eerder preferentiële adsorptie van met jodium gelabelde eiwitten aan PS-latex. Zij kwamen echter tot de conclusie dat wanneer een plateauwaarde bereikt was, de door labeling bepaalde adsorptiewaarde omgezet kon worden in de reële adsorptiewaarde door gebruik te maken van een constante preferentiële adsorptiefactor. De figuren 5-7 laten zien dat dit niet mogelijk is: het verschil tussen de adsorptiewaarde van de UV isotherm en de RAD isotherm is niet constant maar concentratieafhankelijk. Er is dus geen sprake van een constante preferentiële adsorptiefactor. GRANT (1977) vond verschillende adsorptiewaarden voor HSA

aan platina, waarbij HSA gelabeld werd met  $I^{125}$ ,  $I^{131}$  of tritium. Dezelfde auteurs vonden ook dat de adsorptie van HSA- $I^{125}$  verschilde van HSA- $I^{131}$  aan drie polymere oppervlakken, polyethyleen, siliconen rubber en poly ethyleen terephthalaat onder exact dezelfde condities. Hieruit zou geconcludeerd kunnen worden dat zelfs de aard van de label invloed heeft op het adsorptiegedrag.

GRANT vond echter ook dat de adsorptie onafhankelijk was van de specifieke activiteit in de oplossing.

Dit is eveneens gevonden door CHUANG (1978), VAN OSS (1981), PENNERS (1981), BORNZIN (1982), SCHMITT (1983) en VAN DULM (1983), die mogelijke preferentiële adsorptie van gelabelde eiwitten bepaalden door, uitgaande van een constante bulk eiwitconcentratie, het percentage gelabeld eiwit in oplossing te variëren.

Op basis van deze experimenten concludeerden zij dat de aanwezigheid van een label in eiwitten geen effect heeft op het adsorptiegedrag van deze eiwitten aan de verschillende oppervlakken. Bij al deze experimenten wordt uitgegaan van radioactiviteitsmetingen van geadsorbeerde moleculen aan kleine oppervlakken. VAN DER SCHEER (1978) heeft aangetoond dat radioactiviteitsmetingen aan kleine oppervlakken niet gevoelig genoeg zijn om een eventuele preferentiële adsorptie te detecteren.

De met UV bepaalde adsorptieisothermen aan PS-latex van ongelabeld HFb en HFb dat in zijn geheel de labelingsprocedure heeft ondergaan (78% gelabeld) zijn identiek (Figuur 8). Hieruit kan geconcludeerd worden dat de verschillen in eiwitstructuur, ontstaan ten gevolge van labeling, niet van dien aard zijn dat hierdoor het specifiek oppervlak van het eiwit in de geadsorbeerde toestand aanzienlijk veranderd wordt. Ook de RAD isotherm van 78% gelabeld HFb is identiek aan de UV isotherm (Figuur 9). Dit houdt in dat de verhouding tussen de radioactiviteit in oplossing en oppervlak gelijk is aan de verhouding tussen de hoeveelheid eiwit in oplossing en oppervlak. Dit is een van

de voorwaarden voor het gebruik van radiogelabelde eiwitten in adsorptiestudies. Met andere woorden, door gebruik te maken van volledig gelabeld eiwit, zouden toch enigszins betrouwbare resultaten verkregen kunnen worden. Bovendien kan uit Figuur 9 geconcludeerd worden dat het adsorptiegedrag van radioactief gelabeld eiwit niet verschilt van dat van gelabeld eiwit.

Toch blijft als slotconclusie gelden dat, wanneer eiwit-adsorptiestudies uitgevoerd worden met behulp van radio-labelingstechnieken aan ongezuiverde eiwitten, de betrouwbaarheid van de kwantitatieve resultaten gering is. Ook relatief nieuwe methodes zoals Fourier Transform Infrared Spectroscopy (GENDREAU, 1982) en Total Internal Reflection Fluorescence (VAN WAGENEN, 1982) worden gecalibreerd met gelabelde eiwitten. Gezocht dient te worden naar een adsorptiemethode, waarbij het direct of indirect gebruik van gelabelde eiwitten niet meer nodig is ter kwantificering.

#### REFERENTIES

- BORNZIN, G.A., en MILLER, I.F., J. Colloid Interface Sci., 86, 539 (1982).
- CHUANG, H.J., KING, W.F., en MASON, R.G., J. Lab. Clin. Med., 483 (1978).
- CRANDALL, R.E., JANATOVA, J., en ANDRADE, J.D., Prep. Biochem., 11, 111 (1981).
- GENDREAU, R.M. LEININGER, R.I., WINTERS, S., en JACOBSEN, R.B., in Adv. Chem. Series 199, p. 371 (1982).
- GRABAR P. en WILLIAMS C.A., Biochem. Biophys. Acta, 10, 193 (1953).
- GRANT, W.H., SMITH, L.E., STROMBERG, R.R., J. Biomed. Mater. Res. Symp., 8, 33 (1977).
- GREIG, R.G., en BROOKS, D.E., J. Colloid Interface Sci., 83, 661 (1981).
- HUNTER W.M., en GREENWOOD, F.C. Nature, 4827, 495 (1962).

- JANATOVA, J., CRANDALL, R.E., en ANDRADE, J.D., Prep. Biochem., (1980).
- KLEIN ELHORST, J., OLTHUIS, F.M.F.G., BARGEMAN, D., SMOLDERS, C.A., en FEIJEN J., Int. J. of Artif. Organs, 1, 288 (1978).
- PENNERS, G., PRIEL, Z., en SILBERBERG, A., J. Colloid Interface Sci, 80, 437 (1981).
- RONNER, J., LENSEN, H.G.W., OLTHUIS, F.M.F.G., SMOLDERS, C.A., en FEIJEN, J., Biomaterials 5, 241 (1984).
- STERN, H.S., MCAFFEE, J.G., en ZOLLE, I., Radioactive Pharmaceuticals, U.S. Atomic Energy Commission, 359 (1966).
- VAN DER SCHEER, A., FEIJEN, J., KLEIN ELHORST, J., KRUGERS DAGNEAUX, P.G.L.C., en SMOLDERS, C.A., J. Colloid Interface Sci., 66, 136 (1978).
- VAN DULM, P., en NORDE, W., J. Colloid Interface Sci., 91, 248 (1983).
- VAN OSS, C.J., ABSOLOM, D.R., NEUMANN, A.W., en ZING, W., Biochim. Biophys. Acta, 670, 64 (1981).
- VAN WAGENEN, R.A., ROCKHOLD, S., en ANDRADE, J.D., Adv. Chem. Series 199, 351 (1982).
- VISSER, A., persoonlijk gesprek NIZO, Ede (1979).



## APPENDIX IIA

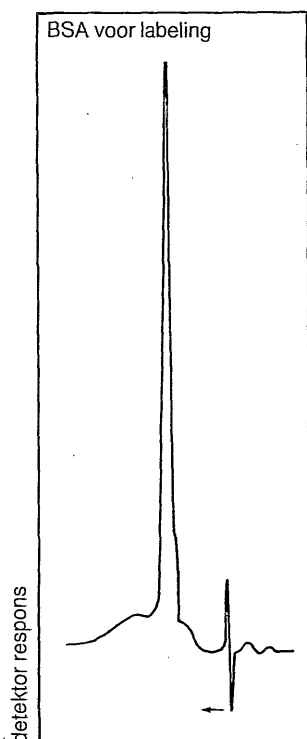
### KARAKTERISERING VAN RUNDER SERUM ALBUMINE EN GELABELD RUNDER SERUM ALBUMINE

Om inzicht te krijgen in de oorzaken van het afwijkend adsorptiegedrag van gelabeld HSA, HFb en HIgG aan PS-latex is runder serum albumine (BSA) en geïodeerd BSA gekarakteriseerd met behulp van HPLC (High-Performance Liquid Chromatography); BSA is gekozen vanwege de bestaande expertise met dit eiwit op HPLC gebied.

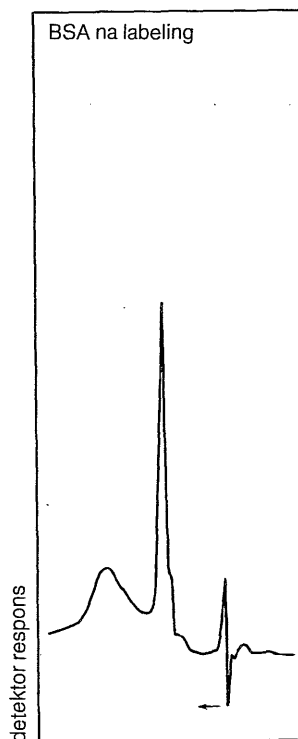
Bij het onderzoek naar verschillen in adsorptiegedrag tussen gelabeld en ongelabeld eiwit met behulp van HPLC is gebruik gemaakt van gel permeatie chromatografie, reversed phase chromatografie en ionenwisseling. Bij gel permeatie (SW 3000 kolom), met PBS als elutiebuffer, kon geen verschil in chromatografisch gedrag worden aangetoond tussen BSA en gelabeld BSA. Door de labeling en/of de labelingsprocedure worden de grootte en vorm van BSA kennelijk niet aanzienlijk gewijzigd.

Met reversed phase chromatografie, waarbij in de elutiebuffer de methanol/water ratio is gevarieerd kon eveneens geen verschil in chromatografisch gedrag worden aangetoond tussen BSA en BSAI. De hydrofobe interacties tussen kolommatrix en eiwit worden door labeling of labelingsprocedure eveneens niet merkbaar gewijzigd.

Wanneer echter een 545 TSK anionenwisselaar als kolommatrix gebruikt wordt ter karakterisering blijkt dat ten gevolge van de labeling van BSA een extra component is ontstaan die een hogere affiniteit voor de kolommatrix bezit (Figuur 1.). Met de vorming van deze component gaat een afname van ongemodificeerd BSA in de oplossing gepaard. De vorming van deze component wordt stopgezet wanneer, door toevoeging van natriumbisulfit, de oxiderende werking van chlooramine T wordt opgeheven. Bij de gevolgde labelingsprocedure (Hoofdstuk II van dit proefschrift) wordt op deze wijze een gedeelte van het in de oplossing aanwezige BSA



elutietijd



elutietijd

HPLC chromatogrammen van BSA (conc.  $1 \text{ gl}^{-1}$ ) voor en na jodiumlabeling. Kolommatrix, 545 TSK anionenwisselaar; elutiebuffer,  $\text{H}_2\text{O}/0,11 \text{ NH}_4\text{OAc}$  pH 5,5. injectievolume  $50 \mu\text{l}$ , flowsnelheid  $0,5 \text{ ml/min}$ . UV detectie bij  $280 \text{ nm}$ .

omgezet in een eiwit met een grotere affiniteit voor de kolommatrix van de ionenwisselaar.

Op basis van deze resultaten kan slechts geconcludeerd worden dat de veranderde ionogene interactie van gelabeld BSA ten gevolge van de aanwezigheid van deze nieuwe component veroorzaakt wordt door jodiuminbouw of door de gebruikte labelingsprocedure. Om dit na te gaan werden onder andere

oplossingen van BSA in aanwezigheid van chlooramine T zonder jodium en oplossingen van BSA in aanwezigheid van jodium zonder chlooramine T geanalyseerd met behulp van een 545 TSK anionenwisselaar. Uit de gegevens in TABEL A1 blijkt dat chlooramine T de oorzaak is van de vorming van een nieuwe component en niet de inbouw van jodium.

TABEL A1: De HPLC analyse van BSA in aanwezigheid van de verschillende labelingscomponenten

BSA	jodium	chloor- amine T	natrium bisulfiet	vorming van een nieuwe component
+	+	+	+	JA
+	-	+	+	JA
+	+	-	-	NEEN
+	+	-	+	NEEN

+ aanwezig in oplossing - niet aanwezig in oplossing

Chlooramine T is echter noodzakelijk in de labelingsprocedure om  $I^-$  te oxyderen tot jodium. Om veiligheidsredenen wordt radioactief jodium geleverd in de vorm van jodide zouten. Jodium is namelijk vluchtig. Concluderend blijkt dat door de gebruikte labelingsprocedure extra componenten ontstaan met andere adsorptieve eigenschappen dan BSA. Het is niet onmogelijk dat door labeling van HSA, HFb en HIgG eveneens extra componenten ontstaan, waardoor de homogeniteit van de componenten in deze oplossing verloren gaat.

APPENDIX IIB

Ter verklaring van het afwijkend adsorptiegedrag van gelabeld eiwit aan PS-latices in Hoofdstuk II volgt hier een afleiding voor de bepaling van de oppervlakteconcentratie op basis van radioactiviteitsmetingen waarbij rekening gehouden wordt met de chromatografische gegevens van gelabeld BSA.

De adsorptiewaarden van de isothermen in Hoofdstuk II zijn berekend door gebruikmaking van de formule

$$C_s = \frac{C_s^*}{C^*} C \quad (1)$$

waarin

$C_s^*$  = de gemeten radioactiviteit per oppervlakte eenheid, een maat voor de concentratie gelabeld eiwit aan het oppervlak ( $\text{Rad cm}^{-2}$ )

$C^*$  = de gemeten radioactiviteit per volume eenheid, een maat voor de concentratie gelabeld eiwit in de oplossing ( $\text{rad cm}^{-3}$ )

$C$  = de concentratie eiwit in de oplossing ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) (gelabeld én ongelabeld)

$C_s$  = de berekende concentratie eiwit aan het oppervlak ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )

Deze formule mag alleen worden toegepast wanneer gelabeld eiwit en ongelabeld eiwit een identiek adsorptiegedrag vertonen. VAN DER SCHEER heeft aangetoond dat er sprake was van preferentiële adsorptie van gelabeld eiwit ten opzichte van ongelabeld eiwit. Hij ging er echter van uit dat al het aanwezige gelabelde eiwit in oplossing preferentieel adsorbeerde en uitgaande van deze veronderstelling heeft hij een

formule afgeleid gebruikmakend van een eenvoudig kinetisch model. Op deze wijze kon de juiste oppervlakteconcentratie verkegen worden door toepassing van

$$C_s = \phi \frac{C_s^*}{C^*} C \quad (2)$$

De evenredigheidsfactor of preferentiële adsorptiefactor  $\phi$  is een constante wanneer er sprake is van een volledig bedekte monolaag. Dit geldt voor zowel reversibele als irreversibele eiwitadsorptie. (VAN DER SCHEER, 1978)

Uit de karakterisering met behulp van HPLC van gelabeld BSA blijkt dat slechts een deel van het gelabelde eiwit een afwijkend adsorptie gedrag vertoont. Formule 1 en formule 2 zijn in dit geval niet van toepassing. In formule 1 dient  $C_s^*$  en  $C^*$  vervangen te worden door  $A_s^* + B_s^*$  en  $A^* + B^*$ . En  $C$  door  $A + A^* + B^*$ .

- A is ongelabeld eiwit.
- A\* is gelabeld eiwit dat geen afwijkend adsorptiegedrag vertoont ten opzichte van A.
- B\* is gelabeld eiwit dat wel een afwijkend adsorptiegedrag vertoont ten opzichte van A.

Formule 1 kan nu geschreven worden als

$$C_s = \frac{C_s^*}{C^*} C = \frac{A_s^* + B_s^*}{A^* + B^*} (A + A^* + B^*) \quad (3)$$

$A^* + B^*$  is meestal veel kleiner dan A (laag labelingspercentage).

Formule 3 is dan te vereenvoudigen tot

$$C_s = \frac{A_s^* + B_s^*}{A^* + B^*} A \quad (4)$$

Om inzicht te krijgen uit wat voor eiwitmoleculen de geadsorbeerde eiwitlaag bestaat wordt de volgende redenering opgezet.

Het percentage gelabeld eiwit in de oplossing  $A^*+B^*$  is meestal zeer laag (3%).

Van dit percentage vertoont slechts een gedeelte  $B^*/A^*+B^*$  een afwijkend adsorptie gedrag. Als aangenomen wordt dat, géén extreme preferentiële adsorptie optreedt, zodat

$A_{S^*}+A_S \gg B_S^*$  en  $A_S^* \ll A_S$ , dan volgt hieruit dat

$$C_S = A_S + A_S^* + B_S^* \approx A_S$$

Om te komen tot een juiste berekening van  $A_S$  zal dus gebruik moeten worden gemaakt van de formule

$$C_S \approx A_S = \frac{A_S^*}{A^*} A \quad (5)$$

In de praktijk is echter alleen  $A_S^*+B_S^*$  en  $A^*+B^*$  bekend. En in de veronderstelling dat gelabeld eiwit geen afwijkend adsorptiegedrag vertoont wordt dan ook altijd gebruik gemaakt van vergelijking (1) of eigenlijk van vergelijking (4). Dit betekent dat door toepassing van deze vergelijkingen een afwijking in de berekende adsorptiewaarde ontstaat die gegeven wordt door

$$\phi' \approx \frac{1 + B_S^*/A_S^*}{1 + B^*/A^*} \quad (6)$$

$\phi'$  is kwantitatief moeilijk te bepalen omdat  $B^*/A^*$  en  $B_S^*/A_S^*$  onbekend zijn.

## HOOFDSTUK III

### DE REVERSIBILITEIT VAN EIWITADSORPTIE AAN POLYSTYREEN

#### III.1. Inleiding

Er bestaat nog steeds verschil van mening over de vraag of eiwitadsorptie beschouwd kan worden als een reversibel proces. Gepreadsorbeerde eiwitten aan hydrofobe oppervlakken desorberen niet of zeer langzaam wanneer deze oppervlakken in contact komen met bufferoplossingen waarin geen eiwit aanwezig is (BRASH, 1969 en BRYNDA, 1978).

Eiwitadsorptie aan hydrofobe oppervlakken wordt in dit opzicht beschouwd als "irreversibel", terwijl voor hydrofiele oppervlakken zowel reversibele (BRASH, UNİYAL, 1979) als "irreversibele" adsorptie (MC RITCHIE, 1972) is gevonden (zie noot).

In een uitstekend review zet MC RITCHIE alle factoren met betrekking tot reversibele en irreversibele eiwitadsorptie op een rij (MC RITCHIE, 1978).

In veel eiwitadsorptiestudies aan hydrofobe oppervlakken is aangetoond dat de adsorptietak van de isotherm afhankelijk is van de eiwitconcentratie in de oplossing. Deze concentratie afhankelijkheid wordt vaak beschreven met een Langmuir isotherm (ORESQUES en SINGER, 1961; BRASH en LYMAN, 1969; DILLMAN en MILLER 1973; LEE en KIM 1974). Dit vooronderstelt reversibele eiwitadsorptie.

Noot: In de literatuur wordt eiwitadsorptie beschouwd als irreversibel wanneer geadsorbeerd eiwit in contact met een buffer niet desorbeert. Desorptie van geadsorbeerd eiwit door verdringing blijft dan nog altijd mogelijk. In dit proefschrift wordt het begrip irreversibel alleen dan gehanteerd wanneer ook geen verdringing of uitwisseling van geadsorbeerde eiwitten meer mogelijk is. Het begrip irreversibel uit de literatuur, waarbij nog wel verdringing mogelijk is, wordt in dit hoofdstuk tussen aanhalingstekens geplaatst ("irreversibel").

Als de eiwitconcentratie in de oplossing hoog genoeg is nadert de isotherm een plateauwaarde, waarbij aangenomen wordt dat bij die concentraties een volledig bezette monomoleculaire eiwitlaag aanwezig is op het oppervlak. De eiwitmoleculen in deze geadsorbeerde eiwitlaag kunnen in principe end-on (staand) gesitueerd zijn op het oppervlak (BRASH, 1969) of side-on (liggend) zoals Norde aanneemt (NORDE, 1976).

Dat eiwitadsorptie niet een echt irreversibel proces is blijkt eveneens uit de albumine desorptie van glas en zelfs van polystyreen oppervlakken, wanneer deze met albumine gepreadsorbeerde oppervlakken in contact gebracht worden met bloedplasma (COLEMAN et 1976). Ook BRASH (1978, 1983) en CHAN (1981) tonen aan dat eiwitadsorptie een dynamisch proces is, waarbij uitwisseling van eiwitten aan het grensvlak optreedt onder "steady state" condities. Deze adsorptiestudies zijn uitgevoerd aan polyethyleen/albumine systemen (BRASH, 1978), glas/fibrinogeen systemen (CHAN, 1981) en aan fibrinogeen in aanwezigheid van positieve negatieve en neutrale polyelectrolyet complexen (BRASH, 1983). Bij al deze experimenten wordt  $I^{125}$  gelabeld eiwit uitgewisseld met  $I^{131}$  gelabeld eiwit. BRASH vindt een uitwisseling van geadsorbeerde eiwitten aan het oppervlak met eiwitten in oplossing voor al deze systemen. Ook blijkt telkens een fractie van het geadsorbeerde eiwit niet uitwisselbaar te zijn.

In dit Hoofdstuk wordt de adsorptie beschreven van menselijk albumine (HSA) en menselijk fibrinogeen (HFb) aan PS-latex (een grote oppervlakte/volume verhouding en een negatief geladen oppervlak) en PS-films (een kleine oppervlakte/volume verhouding). Op basis van desorptie en uitwisselingsexperimenten van HSA en HFb aan deze PS oppervlakken wordt nader ingegaan op de reversibiliteit van het eiwitadsorptieproces. Al deze experimenten zijn uitgevoerd in een fosfaatbuffer pH 7,35 bij 0,9% NaCl. Aan de hand van de resultaten wordt een voor dit systeem toepasbaar adsorptiemodel opgesteld.



### III.2. Materialen en methoden

Menselijk serum albumine (HSA) en menselijk fibrinogeen (HFb) zijn gezuiverd en gekarakteriseerd zoals beschreven in hoofdstuk II. HSA was afkomstig van Sigma (A9511), HFb van KABI, Stockholm.

Polystyreen (PS), MW 670.000 Mw/Mn=1,15, was afkomstig van Pressure Chemical Company, Pittsburgh, Mellon Institute (Lot no 13A). Polystyreen films zijn vervaardigd door oplossen van PS in toluen (7%) en deze oplossing vervolgens uit te strijken over een glasplaat, waarna het oplosmiddel verdamt onder uitsluiting van vocht. Op deze wijze wordt een transparante PS film verkregen met een dikte van 20  $\mu\text{m}$ . Tijdens de experimenten is gebruik gemaakt van PS-filmpjes met een totaal oppervlak van 2  $\text{cm}^2$ .

Polystyreen-latex (PS-latex) was afkomstig van AKZO Corporate Research, Arnhem (nr. VS08). De diameter van de latexdeeltjes is bepaald met behulp van een electronenmicroscop en bedroeg 326 nm  $\pm$  14 nm. Het vaste stof gehalte was 1,51 gew.%, de pH was 7,35.

Tijdens de experimenten is gebruik gemaakt van phosphate buffered saline solution (PBS buffer), pH 7,35. De eiwitten zijn gelabeld met  $\text{I}^{125}$  volgens de chlooramine T methode, zoals beschreven in Hoofdstuk II.

De adsorptieexperimenten zijn uitgevoerd door gebruik te maken van 2 adsorptie methoden.

#### a. Adsorptie aan PS-filmpjes (kleine oppervlakte/volume verhouding)

De adsorptie van eiwit aan PS-filmpjes kan bepaald worden door gebruik te maken van radiolabelingstechnieken.

De radioactiviteit op het PS oppervlak na adsorptie van eiwit vanuit de oplossing is een maat voor de hoeveelheid radioactief gelabeld eiwit aanwezig op het oppervlak.

Hieruit kan de totale hoeveelheid eiwit aan het oppervlak berekend worden, doordat de radioactiviteit van de oplossingen met bekende eiwitconcentraties bekend is (volgens

een ijkcurve) en er een lineair verband bestaat tussen de radioactiviteit en de hoeveelheid eiwit. Wanneer een gelijk adsorptiegedrag voorondersteld wordt van gelabeld, radioactief gelabeld en ongelabeld eiwit mag gebruik worden gemaakt van de volgende formule:

$$C_s = \frac{C_{s^*}}{C^*} C \quad (1)$$

In formule 1 is  $C_s$  de oppervlakteconcentratie ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ ) van geadsorbeerd eiwit,  $C_{s^*}$  de radioactiviteit gemeten aan het oppervlak ( $\text{counts min}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ),  $C^*$  de radioactiviteit in de oplossing ( $\text{counts min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ) en  $C$  de totale eiwitconcentratie in de oplossing ( $\mu\text{gml}^{-1}$ ). De adsorptie experimenten zijn uitgevoerd bij  $20^\circ\text{C}$  onder steady state condities in buisjes gevuld met 3 ml eiwitoplossing. De totale eiwitconcentratie in de oplossing vermindert tijdens adsorptie niet waarneembaar doordat gebruik wordt gemaakt van relatief kleine PS-oppervlakken. Tijdens de experimenten is contact van de polystyreen oppervlakken met het vloeistof/lucht grensvlak vermeden ter voorkoming van artefacten ten gevolge van de eventuele aanwezigheid van een Langmuir-Blodgett laag aan het grensvlak.

Ook tijdens de wasprocedure is contact van het oppervlak met het vloeistof/lucht grensvlak vermeden. Dit was mogelijk door de eiwitoplossing te verdringen met PBS buffer. De eiwitoplossing werd dermate verdund dat de eiwitconcentratie uiteindelijk gereduceerd was tot nul.

Alle metingen zijn uitgevoerd in drievoud. De maximale spreiding in de berekende oppervlakteconcentraties van geadsorbeerd eiwit bedroeg 8%.

Het percentage gelabeld eiwit in de oplossing was meestal 3%, verkregen door menging van gelabeld en ongelabeld eiwit. Van die 3% was slechts een kleine fractie radioactief gelabeld ( $1,2 \times 10^{-5}$ ).

*b. Adsorptie aan PS-latex (groot oppervlak).*

Deze methode is eerder beschreven in hoofdstuk II. In dit geval wordt de oppervlakteconcentratie van geadsorbeerd eiwit bepaald uit de verlaging van de eiwitconcentratie in oplossing ten gevolge van adsorptie aan PS-latex. Bij deze methode kan zowel gebruik gemaakt worden van gelabeld als ongelabeld eiwit, omdat naast de radioactiviteitsmeting een UV meetmethode beschikbaar is.

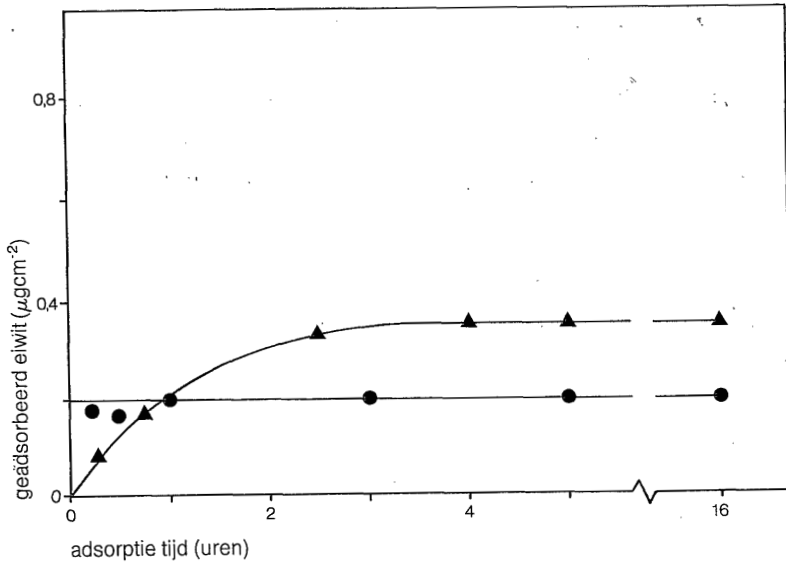
*Uitwisseling van geadsorbeerd eiwit met eiwit in de oplossing*

Deze experimenten zijn uitgevoerd aan PS-latex en PS films voor HSA en HFb in PBS buffer pH 7,35 bij 20°C. Ter bestudering van eiwituitwisseling aan kleine PS oppervlakken zijn deze oppervlakken gepreadsorbeerd met gelabeld eiwit bij een bekende concentratie in de oplossing. De oppervlakteconcentratie is dan te berekenen aan de hand van de radioactiviteit aan het oppervlak. De oplossing wordt nu vervangen door ongelabeld eiwit met dezelfde concentratie als de oorspronkelijke concentratie gelabeld eiwit. Bij deze procedure wordt contact tussen het oppervlak en het vloeistof/lucht grensvlak vermeden. De vermindering van radioactiviteit aan het oppervlak wordt nu geregistreerd met behulp van een gamma-teller als functie van de tijd. Op deze wijze wordt de desorptie van gelabeld eiwit berekend onder evenwichtscondities. Als aangenomen wordt dat in evenwicht de totale oppervlakteconcentratie constant blijft bij een constante eiwitconcentratie in oplossing, kan gesteld worden dat de hoeveelheid geadsorbeerd ongelabeld eiwit bij evenwicht gelijk is aan de hoeveelheid gedesorbeerd gelabeld eiwit. Dit experiment kan herhaald worden door het oppervlak eerst te preadsorberen met ongelabeld eiwit bij een bepaalde concentratie ongelabeld eiwit in de oplossing en vervolgens de ongelabelde eiwitoplossing te vervangen door oplossing van gelabeld eiwit, weer met dezelfde eiwitconcentratie.

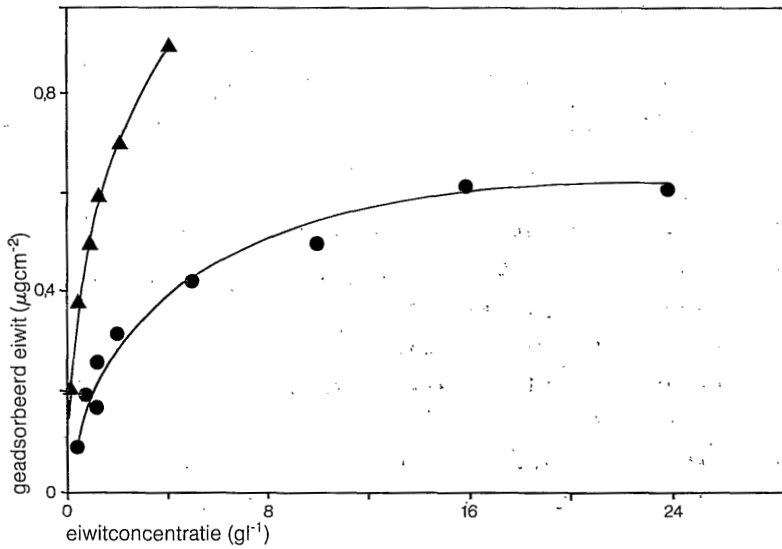
Nu kan de uitwisseling van eiwit aan het oppervlak bij gelijkblijvende eiwitconcentraties in oplossing worden bepaald als functie van de tijd door registratie van de toename in radioactiviteit aan het oppervlak. Als er inderdaad sprake is van één op één uitwisseling zonder verschil in affiniteit zal de desorptie als functie van de tijd complementair zijn aan de adsorptie in het tweede experiment bij dezelfde eiwitconcentratie in de oplossing. De uitwisseling van eiwitten aan PS-latex is uitgevoerd op identieke wijze als boven beschreven. Echter met dit verschil dat nu de desorptie respectievelijk adsorptie van eiwit aan latex onder evenwichtscondities is bepaald aan de hand van de verhoging respectievelijk verlaging van de radioactiviteit in de oplossing. Hiervoor was het noodzakelijk de latex suspensies telkens te centrifugeren en vervolgens te resuspenderen in eiwitoplossingen met dezelfde concentratie.

### III.3. Resultaten

*Adsorptie van HFb en HSA aan PS-plaatjes* (oppervlak  $2 \text{ cm}^2$ ) is bepaald als functie van de tijd (Figuur 1). Bij een HSA concentratie van  $0,7 \text{ gl}^{-1}$  wordt een evenwicht bereikt binnen 15 minuten en na 16 uur is de oppervlakteconcentratie niet veranderd. De adsorptie van HFb verloopt langzamer. De adsorptie isothermen van HSA en HFb aan PS-plaatjes worden gegeven in Figuur 2. Bij een concentratie van  $16 \text{ gl}^{-1}$  HSA in de oplossing blijkt het PS oppervlak verzadigd. De oppervlakteconcentratie is dan  $0,6 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$ . Bij HFb adsorptie wordt geen verzadigingswaarde waargenomen. Wanneer HFb concentraties in de oplossing hoger worden dan  $4 \text{ gl}^{-1}$  ontstaat vlokking van het eiwit in de oplossing.

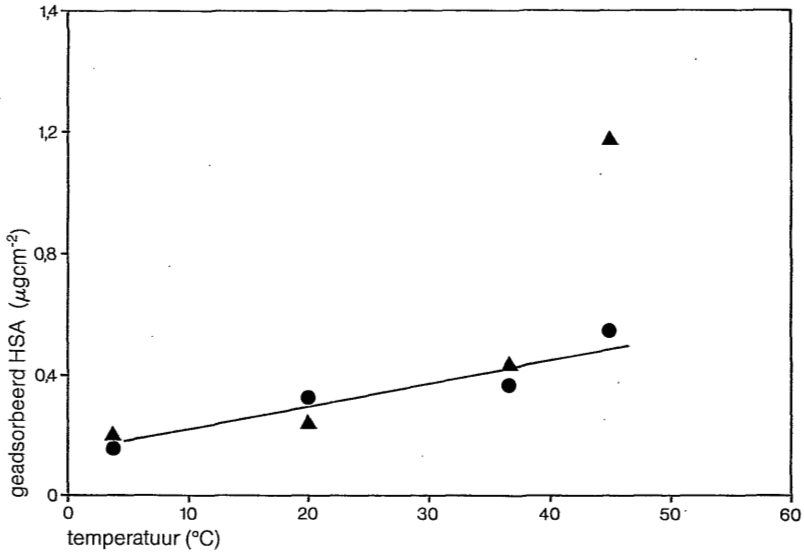


Figuur 1 Adsorptie van HSA (●) en HFb (▲) als functie van de tijd aan PS films. De concentratie HSA in oplossing is  $0,7 \text{ gl}^{-1}$ , de concentratie HFb in oplossing is  $0,4 \text{ gl}^{-1}$ .



Figuur 2 Adsorptieisothermen van HSA (●) en HFb (▲) aan PS-films. De adsorptietijd is 3 uur. Conditie PBS buffer pH 7,35, temp.  $23^{\circ}\text{C}$ .

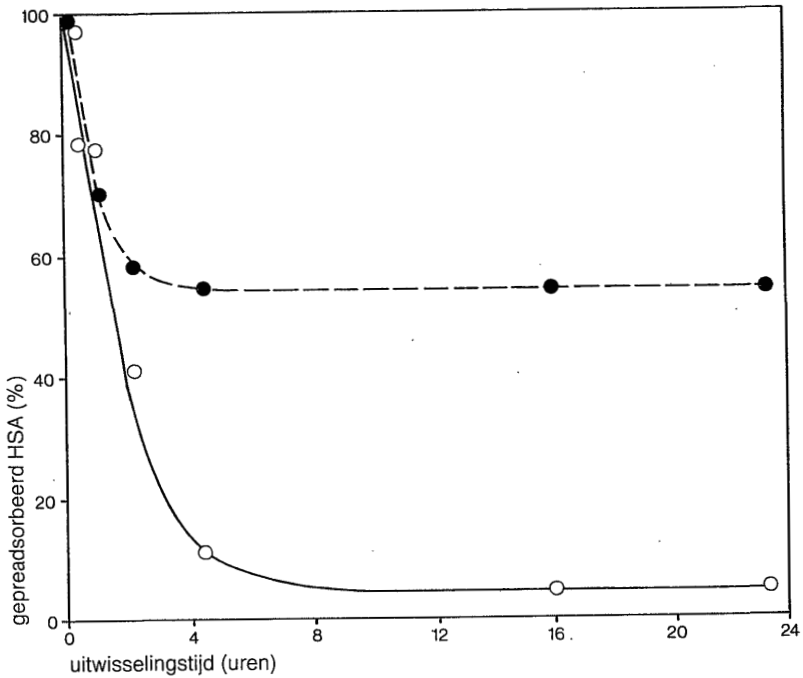
In figuur 3 is de adsorptie van HFb en HSA gegeven als functie van de temperatuur. Een lichte toename van de hoeveelheid geadsorbeerd eiwit aan het oppervlak wordt waargenomen bij toenemende temperatuur en bij 45°C treedt vlokking op van HFb in de oplossing. De oppervlakteconcentratie is



Figuur 3 Adsorptie van HSA (●) en HFb (▲) als functie van de temperatuur aan PS-film. De adsorptietijd is 3 uur.

telkens bepaald door meting van de radioactiviteit aan het oppervlak van PS. Desorptie van eiwit is met PBS buffer in geen enkel geval waargenomen. De PS oppervlakken waren bij deze desorptieproeven met bufferoplossingen voor gedurende 1 à 3 uur gepreadsorbeerd met HSA en HFb, waarbij de concentratie HSA (van 0,1 tot 10  $\text{gl}^{-1}$ ) en HFb (van 0,1 tot 4  $\text{gl}^{-1}$ ) gevarieerd is. Zelfs na 50 uur contact met de bufferoplossing was de oppervlakteconcentratie van geadsorbeerd eiwit niet verminderd.

De uitwisseling van HSA en HFb aan PS-plaatjes is gegeven als functie van de tijd in Figuur 4 en Figuur 5. Hierbij



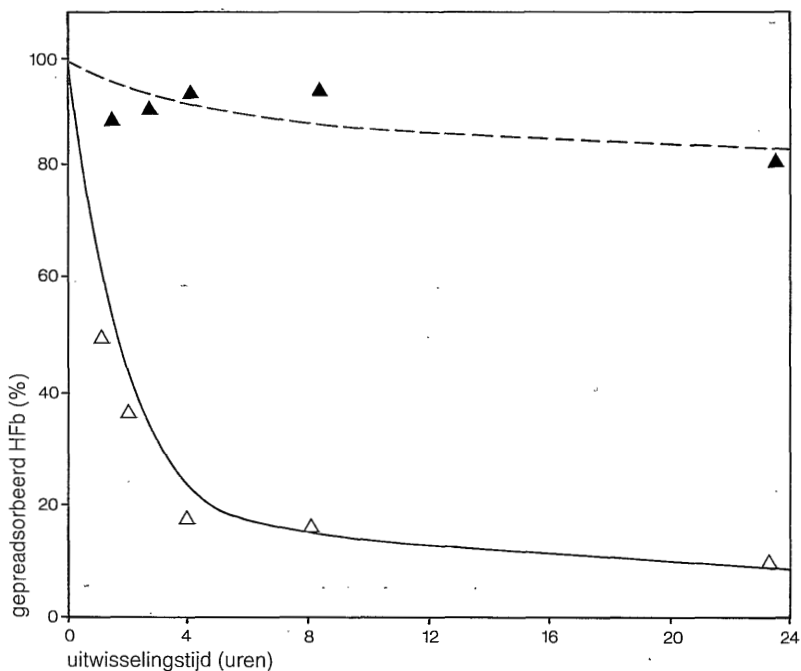
**Figuur 4** Uitwisseling van HSA geadsorbeerd aan PS-films bij evenwicht.

Het percentage van de oorspronkelijke oppervlakteconcentratie is uitgezet als functie van de tijd.

Dit is verkregen door:

- a. Initiële adsorptie van HSA I<sup>125</sup> en vervolgens uitwisseling met ongelabeld eiwit (●) of
- b. Initiële adsorptie met ongelabeld HSA en vervolgens uitwisseling met <sup>125</sup>I gelabeld HSA (○).

De evenwichtsconcentratie HSA in oplossing is  $1 \text{ gl}^{-1}$ . De evenwichtsconcentratie aan het oppervlak is  $0,2 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$ .



Figuur 5 Uitwisseling van HFb geadsorbeerd aan PS-film bij evenwicht. Het percentage van de oorspronkelijke oppervlakteconcentratie is uitgezet als functie van de tijd. Dit is verkregen door:

- a. Initiële adsorptie van HFb<sup>125</sup> (▲), vervolgens uitwisseling met ongelabeld HFb of
- b. Initiële adsorptie met ongelabeld HFb (△), vervolgens uitwisseling met <sup>125</sup>I gelabeld HFb.

De evenwichtsconcentratie HFb in oplossing is  $0,67 \text{ gl}^{-1}$ . De evenwichtsconcentratie aan het oppervlak is  $0,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ . De preadsorptie tijd was 3 uur.



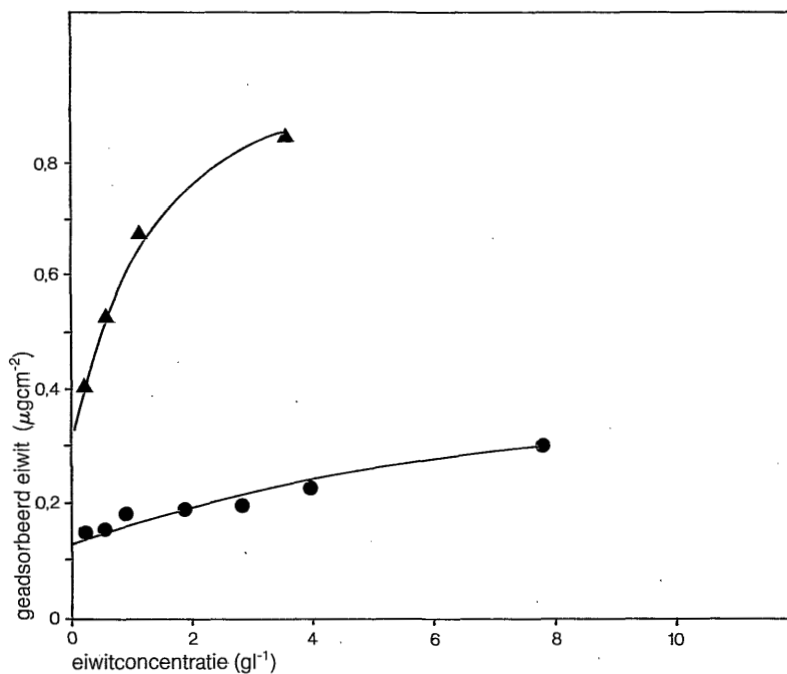
zijn de oppervlakken gepreadsorbeerd gedurende 15-60 minuten met gelabeld en ongelabeld eiwit. Voor preadsorptie en uitwisseling van HSA is steeds gebruik gemaakt van een HSA oplossing met een eiwit concentratie van  $1 \text{ gl}^{-1}$ . Voor preadsorptie en uitwisseling van HFb bedroeg de HFb concentratie in de oplossing  $0,67 \text{ gl}^{-1}$ . Uit Figuur 4 blijkt dat een bepaalde fractie (ca. 60%) gelabeld HSA geadsorbeerd aan het PS oppervlak niet uitwisselt met ongelabeld HSA in de oplossing (stippellijn) terwijl ongelabeld HSA geadsorbeerd aan het PS oppervlak, gezien de adsorptie van gelabeld eiwit, vrijwel volledig uitwisselt met gelabeld eiwit in de oplossing.

Voor fibrinogeen is eenzelfde verschijnsel waargenomen. Ook bij HFb blijkt slechts een kleine fractie geadsorbeerd gelabeld HFb, circa 10%, uitwisselbaar met ongelabeld HFb in de oplossing, terwijl ook nu ongelabeld geadsorbeerd HFb vrijwel geheel uitwisselt met gelabeld HFb in de oplossing. Na 4 uur lijkt in het geheel geen uitwisseling van eiwit meer op te treden. In Figuur 4 en 5 is aangenomen dat de totale eiwitconcentratie aan het oppervlak tijdens uitwisseling constant blijft als functie van de tijd.

#### *Adsorptie van HFb en HSA aan PS-latex*

In tegenstelling tot de adsorptie van HFb aan PS-plaatjes blijkt dat HFb adsorptie aan PS-latex binnen 15 minuten een evenwichtswaarde heeft bereikt. Voor HSA adsorptie aan PS-latex wordt eveneens binnen 15 minuten een evenwichtswaarde bereikt. De vorm van de isotherm hangt sterk af van de bepalingmethode van de eiwitconcentratie in de oplossing voor en na adsorptie van eiwit aan de latices (zie hoofdstuk II). Wanneer de vermindering in de eiwitconcentratie ten gevolge van adsorptie aan PS-latex wordt bepaald met behulp van UV spectroscopie worden "high-affinity" isothermen verkregen, waarbij reeds bij lage eiwitconcentratie in de oplossing het verzadigingsniveau is bereikt. De HSA plateau-waarde ligt bij  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$  bij adsorptie aan PS-latex

gebruikmakend van UV detectie. Dit is een factor 6 lager dan de plateauwaarde van HSA-adsorptie aan PS-plaatjes bepaald door meting van de radioactiviteit aan het oppervlak ( $0,6 \mu\text{gcm}^{-2}$ ). De met UV detectie bepaalde plateauwaarde ( $0,6 \mu\text{gcm}^{-2}$ ) van HFb aan PS-latex is niet vergelijkbaar met "de plateauwaarde" van HFb aan PS-plaatjes omdat in dit geval geen plateau bereikt is.



Figuur 6 Adsorptieisothermen voor HSA (●) en HFb (▲) aan PS-latex. Bepaald uit de vermindering in radioactiviteit in de oplossing ten gevolge van adsorptie van gelabeld eiwit. Adsorptietijd 1 uur.

De overeenkomst tussen de adsorptieisothermen van HFb en HSA aan PS-latex (Figuur 6) bepaald door vermindering van de radioactiviteit in de oplossing en de adsorptieisothermen van HSA en HFb (Figuur 2), bepaald door meting van de radioactiviteit aan het oppervlak van PS-plaatjes is veel groter, dan bij vergelijking van de twee detectiemethoden UV en RAD bij adsorptie aan latices.

De op deze wijze verkregen HFb isotherm aan PS-latex is identiek aan de HFb isotherm aan PS-plaatjes. De HSA isotherm aan PS-latex heeft wel dezelfde vorm als de HSA isotherm aan PS-plaatjes, maar de oppervlakteconcentratie is bij PS-latex gemiddeld 40% lager dan de HSA oppervlakteconcentratie aan PS-plaatjes bij dezelfde eiwitconcentraties in oplossing.

Ook uitwisseling van HFb en HSA bij evenwicht is bestudeerd aan een systeem met PS-latex. Uit deze experimenten blijkt dat aan PS-latex geadsorbeerd gelabeld HSA en HFb totaal niet uitwisselt met ongelabeld HSA en HFb in de oplossing. Geadsorbeerd ongelabeld HSA en HFb wisselt slechts gedeeltelijk uit met gelabeld HSA en HFb in de oplossing. (Tabel III.1)

De preadsorptietijd bedroeg 1 uur en er is gebruik gemaakt van eiwitoplossingen met een concentratie van  $1 \text{ gl}^{-1}$ . De uitwisselingstijd was maximaal 16 uur. De resultaten met betrekking tot eiwituitwisseling aan PS-latex zijn vergeleken met de uitwisseling van HSA en HFb aan PS-plaatjes en worden gegeven in Tabel III.1 Tot slot dient nog vermeld te worden dat ook aan PS-latex geadsorbeerd HSA en HFb in het geheel niet desorbeert tegen een PBS buffer binnen 50 uur.

TABEL III.1 Uitwisselingspercentage bij evenwicht van aan PS-latex en PS-plaatjes geadsorbeerd HSA en HFb na 16 uur bij 20°C.

A/B*	PS-latex	PS-plaatjes
HSA/HSA*	7%	100%
HSA*/HSA	0%	40%
HFb/HFb*	38%	100%
HFb*/HFb	0%	10%

- \* A/B wil zeggen preadsorptie met A en vervolgens uitwisseling met een evenwichts concentratie B in de oplossing; een sterretje beduidt radioactief gelabeld materiaal. De evenwichtskoncentratie was steeds  $1 \text{ gl}^{-1}$  echter voor uitwisseling van HFb aan plaatjes was deze concentratie  $0,67 \text{ gl}^{-1}$

#### III.4. Discussie

Plateauwaarden van de adsorptie isothermen

Hoewel, zoals uit de resultaten blijkt, niet altijd plateauwaarden worden bereikt bij de adsorptie van plasmaeiwitten aan vaste oppervlakken, wordt toch algemeen aangenomen dat als het oppervlak verzadigd is met geadsorbeerd eiwit er sprake is van een monomoleculaire eiwitlaag. Baszkin en Lyman (1980) hebben adsorptiewaarden berekend voor HSA en HFb op basis van de dimensies van deze eiwitmoleculen voor side-on en end-on adsorptie, waarbij zij uitgaan van een monomoleculaire eiwitlaag. De voor HSA berekende oppervlakteconcentratie is dan  $0,25 \mu\text{g cm}^{-2}$  voor side-on adsorptie en  $0,90 \mu\text{g cm}^{-2}$  voor end-on adsorptie. Voor HFb zijn deze waarden respectievelijk  $0,27 \mu\text{g cm}^{-2}$  en  $1,85 \mu\text{g cm}^{-2}$ . (Hoofdstuk I, Tabel I.1).

In tabel III.2 zijn de plateauwaarden gegeven voor de adsorptie van plasma eiwitten (HFb en HSA) aan polystyreen, polyethyleen en glas voor zover bekend in de literatuur. Uit

TABEL III.2

"PLATEAUWAARDEN" VOOR DE ADSORPTIE VAN PLASMAEIWITTEN AAN  
POLYSTYREEN (PS), GLAS EN POLYETHYLEEN (PE).

## A. MENSELIJK SERUM ALBUMINE (HSA)

polymeer	plateauconc. ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	methode	referentie	pH	temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	ionsterkte ( $\text{mol l}^{-1}$ )
PS	0.5	IR	BRASH (69)	7.4	37	0.15
PS-latex	0.20	depletie	NORDE (76)	4.7	20	0.01
PS-latex	0.11	depletie	NORDE (76)	7.0	20	0.01
PS-latex	0.14	depletie	VDSCHEER(78)	7.3	22	0.01
PS	0.62	labeling	VDSCHEER(78)	7.3	37	0.15
PS*	0.20	labeling	BRASH (81)	7.4	23	0.05
PS	0.60	labeling	LENSEN (84)	7.4	22	0.15
PS-latex	0.10	depletie	LENSEN (84)	7.4	22	0.15
glas*	0.04	labeling	BRASH (76)	7.4	23	0.20
glas*	0.20	labeling	BRASH (81)	7.4	23	0.05
glas	0.14	labeling	NORDE (83)	7.4	22	0.05
PE	0.80	IR	BRASH (69)	7.4	37	0.15
PE*	0.20	labeling	BRASH (76)	7.3	23	0.20
PE	0.16	IR	BRYNDA (78)	7.4	37	0.20
PE*	0.17	labeling	BRASH (81)	7.4	23	0.05

## B. MENSELIJK FIBRINOGEEN (HFb).

polymeer	plateauconc. ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	methode	referentie	pH	temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	ionsterkte ( $\text{mol l}^{-1}$ )
PS	1.7	IR	BRASH (69)	7.4	37	0.15
PS-latex	0.55	depletie	VDSCHEER(78)	3.5	23	0.01
PS-latex	0.70	depletie	VDSCHEER(78)	8.9	22	0.01
PS	0.90	labeling	KLEIN E.(78)	7.4	37	0.15
PS	1.00	labeling	BRASH (79)	7.4	23	0.05
PS-latex	0.60	depletie	LENSEN (84)	7.4	22	0.15
glas*	0.74	labeling	BRASH (76)	7.3	23	0.20
glas*	0.70	labeling	BRASH (81)	7.4	23	0.05
glas	0.60	labeling	UNYAL (82)	7.4	23	0.15
glas	0.28	ellipso.	JONSSON (82)	7.4	22	0.15
glas	1.00	labeling	SCHMITT (83)	7.4	37	0.05
PE	1.3	IR	BRASH (69)	7.4	37	0.15
PE*	1.18	labeling	BRASH (76)	7.3	23	0.20
PE*	1.06	labeling	BRASH (82)	7.4	22	0.05

\* eiwitconcentratie in de oplossing 1  $\text{gl}^{-1}$

deze tabel wordt duidelijk dat de plateauwaarden, voor zover er werkelijk sprake van is, nogal uiteenlopen afhankelijk van de gekozen adsorptiecondities en de gebruikte adsorptiemethode. In de meeste gevallen blijken de plateauwaarden wel te liggen tussen de door Baszkin berekende extreme waarden voor side-on en end-on monolaag adsorptie. Echter de plateauwaarde van HSA adsorptie aan PS-latex is lager dan verwacht op basis van de berekende waarde voor side-on adsorptie. NORDE verklaart dit door aanname van een conformatieverandering van HSA ten gevolge van adsorptie.

De in Hoofdstuk II en III bepaalde plateauwaarden voor HSA en HFb adsorptie gemeten aan PS zijn consistent met de door NORDE en VAN DER SCHEER bepaalde plateaus onder bijna dezelfde condities (NORDE, 1976; VAN DER SCHEER, 1978). De plateauwaarde van HSA aan PS plaatjes, bepaald door meting van de radioactiviteit aan het PS oppervlak, is 6 maal hoger dan de plateauwaarde van HSA aan PS-latex met behulp van UV detectie (Figuur 5, Hoofdstuk II). Vergelijking tussen de "plateauwaarden" van gelabeld HSA aan plaatjes met de "plateauwaarden" van gelabeld HSA aan latex (Figuur 5, Hoofdstuk II) is in het geheel niet mogelijk, omdat bij de adsorptie van gelabeld HSA geen plateau wordt waargenomen. Al deze adsorptie-isothermen zijn bepaald onder exact dezelfde adsorptiecondities met dezelfde batch HSA. Het verschil in plateauwaarden zou verklaard kunnen worden door het verschil in aangeboden PS oppervlak. Het PS-latex oppervlak is negatief geladen, terwijl de PS plaatjes ongeladen zijn. Echter op basis van de zêta potentiaal (-20 mV) is een oppervlaktelading berekend van minder dan  $2 \mu\text{C cm}^{-2}$  voor het latex oppervlak (NORDE, 1976). Dit correspondeert met de aanwezigheid van 1 of 2 negatieve ladingen per geadsorbeerd eiwitmolecuul in de monolaag. Het effect van de oppervlakte-lading op de adsorptiewaarden lijkt te verwaarlozen. Het verschil in berekende oppervlakteconcentratie dient veeleer gezocht te worden in de heterogeniteit van gelabeld eiwit, zoals uit de karakterisering van gelabeld eiwit blijkt.

(Appendix IIA). Dit in combinatie met de oppervlakte/volume-verhouding, die bij PS plaatjes anders is dan bij latex experimenten. Een deel van het gelabeld eiwit adsorbeert preferentieel aan polystyreen. Deze preferentiële adsorptie komt bij kleine oppervlakken (PS-filmpjes) sterker tot uiting dan bij grote oppervlakken (PS-latex). Hierdoor wordt aan PS-filmpjes een hogere oppervlakte concentratie berekend.

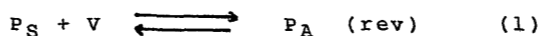
In hoofdstuk IV van dit proefschrift wordt dit nog eens geïllustreerd aan de hand van de concurrerende adsorptie van HSA monomeren en dimeren. De preferentiële adsorptie van dimeren komt ook hier aan kleinere oppervlakken sterker tot uitdrukking (zie TABEL IV.2).

#### Beschrijving van de eiwitadsorptie aan hydrofobe oppervlakken.

Uit de figuren 2 en 6 blijkt dat de adsorptie van gelabeld HFb en HSA afhankelijk is van de concentratie in de oplossing. Echter desorptie van eiwitten geadsorbeerd aan PS oppervlakken in contact met buffer wordt niet gevonden. Toch is er sprake van een dynamisch evenwicht, waarbij eiwitten adsorberen en desorberen (figuren 4 en 5) en waarbij verondersteld wordt dat de totale oppervlakteconcentratie constant blijft tijdens uitwisseling. In aanwezigheid van eiwit in de oplossing kan het adsorptie-desorptie gedrag van eiwitten aan hydrofobe oppervlakken beschouwd worden als een reversibel proces, wanneer de eiwitconcentratie in de oplossing na adsorptie constant blijft.

Aan de hand van een aantal vergelijkingen zal een beschrijving worden gegeven voor het adsorptie-desorptie gedrag van eiwitten en de rol die eiwitten in oplossing daarbij spelen.

Voor monolaagadsorptie kan het volgende evenwicht worden opgesteld:

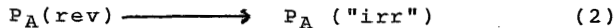


Hierin staat  $P_s$  voor het eiwitmolecule in oplossing,  $V$  (vacature) voor de beschikbare plaats aan het oppervlak en  $P_A$  (rev) het reversibel geadsorbeerd eiwitmolecule.

Met deze vergelijking zou het adsorptie/desorptie proces beschreven kunnen worden bij een volledig reversibel proces. De realiteit is echter dat bij vermindering van de eiwitconcentratie in de oplossing geadsorbeerd eiwit zeer langzaam desorbeert of in het geheel niet desorbeert.

Nu zijn er aanwijzingen dat eiwitten in geadsorbeerde toestand een andere conformatie bezitten dan eiwitten in oplossing (Hoofdstuk I.) De verandering in de eiwitstructuur ten gevolge van adsorptie aan het oppervlak heeft tot gevolg dat desorptie in afwezigheid van eiwit in oplossing niet mogelijk is of slechts zeer langzaam verloopt. Wanneer er wel eiwit in oplossing is, blijkt desorptie echter wel mogelijk, hoewel de totale oppervlakte concentratie dan wel gelijk blijft (uitwisseling). Aan het oppervlak is evenwel naast reversibel geadsorbeerd eiwit ook eiwit aanwezig, dat moeilijk of niet desorbeerbaar is. Bij afwezigheid van eiwit in de oplossing blijkt bijna al het aanwezige geadsorbeerde eiwit gefixeerd in de "irreversibele" toestand, zoals blijkt uit het gegeven dat eiwit onder deze condities niet desorbeert.

Een tweede vergelijking voor de beschrijving van het adsorptieproces is daarom noodzakelijk.



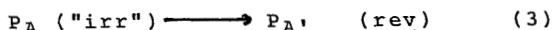
In (2) is  $P_A$  ("irr") moeilijk desorbeerbaar geadsorbeerd eiwit.

De overgang van  $P_A$  (rev) naar  $P_A$  ("irr") kan afhankelijk zijn van de contacttijd tussen geadsorbeerd eiwit en oppervlak en van de aard van de interactie tussen geadsorbeerd eiwit en oppervlak. (SODERQUIST, 1980)

Dan is er nog een derde vergelijking noodzakelijk voor de



beschrijving van het desorptieproces:



Deze overgang wordt mogelijk gemaakt door de kinetische energie, die de eiwitmolekulen in oplossing bezitten en waarmee desorptie van  $P_A$  ("irr") slechts in de vorm van verdringing of uitwisseling wordt mogelijk gemaakt.  $P_A'$  (rev) hoeft niet identiek te zijn aan de  $P_A$  (rev) en op dezelfde wijze aan het oppervlak gebonden. Dit blijkt o.a. uit circulair dichroïsme experimenten, waarbij het  $\alpha$ -helix gehalte van fibrinogeen tot de helft was gereduceerd nadat het gedesorbeerd was van een glas oppervlak (CHAN, 1981).

#### *Uitwisseling van HSA en HFb aan PS*

Bij de uitwisseling van HSA en HFb aan PS filmpjes (Figuren 4 en 5) als functie van de tijd vallen twee dingen onmiddellijk op. Gepreadsorbeerd ongelabeld eiwit vertoont een ander desorptie respectievelijk uitwisselingsgedrag bij evenwicht dan gepreadsorbeerd gelabeld eiwit. Bovendien blijkt een fractie gepreadsorbeerd gelabeld eiwit niet uitwisselbaar met ongelabeld eiwit in de oplossing. Deze resultaten komen overeen met het werk van BRASH. (1978 en 1983). Er is sprake van 2 adsorptieprocessen doordat gelabeld eiwit in oplossing heterogeen blijkt te zijn (Appendix IIA).

1. Een reversibel adsorptieproces, geldend voor ongelabeld eiwit en een deel van het gelabeld eiwit. Dit eiwit adsorbeert reversibel in aanwezigheid van eiwit in oplossing en uitwisseling is mogelijk. Hierop is de voorafgaande adsorptiebeschrijving van toepassing.
2. Daarnaast treedt een tweede adsorptieproces op, waarbij geen uitwisseling mogelijk blijkt. Dit geldt slechts voor een deel van het gelabeld eiwit. Voor dit gelabeld eiwit is de voorgaande beschrijving van het adsorptie model niet van toepassing. Deze beschrijving is slechts van

toepassing op identieke eiwitmoleculen. Er is dus sprake van heterogeniteit van gelabeld eiwit. Brash (1978 en 1983) vindt deze heterogeniteit terug voor zowel I<sup>131</sup> als I<sup>125</sup> gelabeld HFb en HSA.

### *Conclusie*

Eiwitadsorptie mag beschouwd worden als een reversibel proces, waarbij eiwit in oplossing in evenwicht is met geadsorbeerd eiwit aan het oppervlak. Uitwisseling tussen geadsorbeerd eiwit en eiwit in oplossing is mogelijk. Wanneer de eiwitoplossing vervangen wordt door een bufferoplossing zonder eiwit wordt de evenwichtssituatie onmiddellijk bevroren of gefixeerd. Dit geldt voor ongelabelde eiwitten. Voor gelabelde eiwitten geldt dat een deel van het gelabelde eiwit een sterkere affiniteit heeft met het oppervlak dan ongelabelde eiwitten. Dit deel is in geadsorbeerde toestand niet uitwisselbaar met ongelabeld eiwit.

## REFERENTIES

- BASZKIN, A., en LYMAN, D., J. Biomed. Mater. Res., 14, 393 (1980).
- BRASH, J.L., en LYMAN, D.J., J. Biomed. Mater. Res., 3, 175 (1969).
- BRASH, J.L., en DAVIDSON, V.J., Thromobosis Res., 9, 249 (1976).
- BRASH, J.L., en SAMAK, Q.M., J. Colloid Interface Sci., 64, 495 (1978).
- BRASH, J.L., en UNIYAL, S., J. of Polymer Sci.: Polymer Symp. 66, 377 (1979).
- BRASH, J.L., UNIYAL, S., PUSINERI, C., en SCHMITT, A., J. Colloid Interface Sci., 95, 28 (1983).
- BRYNDA, E., HOUSKA, M., POKORNA, Z., en CEPALOVA, N.A., J. Bioeng., 2, 411 (1978).
- CHAN, B.M.C., en BRASH, J.L., J. Colloid Interface Sci., 82, 217 (1981).
- COLEMAN, D.L., ATWOOD, A.I., en ANDRADE, J.D., J. Bioeng. 1, 33 (1976).
- DILLMAN, W.J., en MILLER, I.F., J. Colloid Interface Sci. 44, 221 (1973).
- JONSSON, U., IVARSSON, B., J. Colloid Interface Sci, 90, 148 (1982).
- KLEIN ELHORST, J., OLTHUIS, F.M.F.G., BARGEMAN, D., SMOLDERS, C.A., en FEIJEN J., Int. J. of Artif. Organs. 1, 288 (1978).
- LEE, R.G., en KIM, S.W., J. Biomed. Mater. Res., 8, 251 (1974).
- MAC RITCHIE, F., J. Colloid Interface Sci., 38, 484 (1972).
- MAC RITCHIE, F., Adv. Protein Chem., 32, 283 (1978).
- NORDE, W., Proefschrift "Proteins at Interfaces ", commun. Agric., Univ. Wageningen 76-6 (1976).
- NORDE, W., "Adhesion and adsorption of polymers, B p 80 Ed: Lee, N.York (1980).
- ORESKE, I. en SINGER, J.M., J. Immun. 86, 338 (1961).

SCHMITT, A., VAROQUI, R., UNIYAL, S., PUSINERI, C., J.  
Colloid Interface Sci. 92, 25 (1983).

SODERQUIST, M.E., en WALTON, A.G., J. Colloid Interface  
Sci., 75, 386 (1979)

VAN DER SCHEER, A., Proefschrift "Adsorption of Plasma  
Proteins" Krips Repro B.V. Meppel (1978).

## HOOFDSTUK IV

### HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAFIE (HPLC) ALS METHODE TER BESTUDERING VAN CONCURRERENDE ADSORPTIE VAN EIWITTEN

#### IV.1. Inleiding

Wanneer lichaamsvreemde materialen in contact komen met bloed is een van de eerst optredende verschijnselen de adsorptie van plasma eiwitten aan het materiaal oppervlak. De samenstelling van de aan het oppervlak geadsorbeerde eiwitten wordt vaak in verband gebracht met de bloedcompatibiliteit van deze materialen. Om inzicht te krijgen in de aan het oppervlak geadsorbeerde eiwitlaag is bestudering van de concurrerende adsorptie van plasma eiwitten noodzakelijk. Slechts enkele studies zijn bekend waarbij de concurrerende adsorptie van plasma eiwitten (meestal menselijk albumine-HSA, menselijk fibrinogeen-HFb en menselijk immuno gamma globuline-HIgG) systematisch is onderzocht.

MOYER EN GORIN (1940) maakten gebruik van depletie metingen om het concurrerende adsorptiegedrag van HSA en HIgG aan kwarts te bestuderen. Zij vonden dat eiwitten niet of nauwelijks adsorbeerden aan tevoren met een willekeurig ander eiwit gepreadsorbeerde oppervlakken. BRASH (1969) concludeerde met behulp van radiolabeling dat oppervlakken waaraan HSA preferentieel adsorbeerde minder trombogene waren dan oppervlakken waaraan HFb preferentieel adsorbeerde. LEE (1974) bestudeerde met behulp van radiolabeling de concurrerende adsorptie van HFb, HSA en HIgG aan hydrofobe oppervlakken. De oppervlakconcentratie van de respectievelijke eiwitten bij concurrerende adsorptie was beduidend lager dan bij afzonderlijke aanbidding. Tot dezelfde bevindingen kwam KOCHWA (1977) voor de concurrerende adsorptie van HSA, HFb en HIgG aan polyurethaan. Tevens vond hij gebruikmakend van radiolabeling, dat deze eiwitten onderling gedeeltelijk uitwisselbaar waren. In latere studies van BRASH (1979), maakt deze melding van preferentiële adsorptie van HFb aan polystyreen, polyurethaan en silicon rubber oppervlakken.

BEISSINGER (1982) heeft getracht gebruikmakend van fluorescentielabeling de kinetiek van de concurrerende adsorptie van HSA en HIgG aan kwarts te beschrijven met behulp van Langmuir-Hinshelwood vergelijkingen.

Behalve het ruim veertig jaar oude onderzoek van MOYER en GORIN zijn bovenstaande studies allemaal uitgevoerd door gebruikmaking van labelingstechnieken. Uit hoofdstuk II en III blijkt dat door radiolabeling het adsorptiegedrag van eiwitten kan veranderen. Maar ook bij gebruikmaking van fluorecentielabeling kunnen artefacten optreden (CRANDALL 1981). Ter verkrijging van betrouwbare resultaten dient gebruik te worden gemaakt van ongelabelde eiwitten. Momenteel zijn twee nieuwe methoden bekend waarbij concurrerende adsorptie van plasma eiwitten bestudeerd kan worden zonder labeling vooraf. Dit zijn de Enzym Immuno Assay Methode (BREEMHAAR 1983) en de Fourier Transformatie Infrarood Reflectie methode (GENDREAU 1982). De kwantificeerbaarheid van de met deze methoden verkregen adsorptieresultaten vormt nog een probleem. Tot nu toe worden de resultaten van deze methoden gekwantificeerd door gebruik te maken van adsorptieresultaten verkregen met gelabelde eiwitten.

In deze studie wordt teruggegrepen naar de oude depletie techniek, maar nu gecombineerd met High Performance Liquid Chromatografie (HPLC). Met deze methode is het mogelijk de concurrerende adsorptie van plasma eiwitten te bestuderen als functie van de tijd en de samenstelling van het eiwitmengsel. Bij deze methode is er geen sprake van modificatie van eiwitten ten gevolge van labeling. Op deze wijze is de concurrerende adsorptie van HSA, HIgG en HFb aan polystyreen latex (PS-latex) bestudeerd, door zowel een gelijktijdige als opeenvolgende aanbieding van plasma eiwitten. Ter vergelijking is ook gebruik gemaakt van labelingstechnieken.

## IV.2. Materialen en methoden

De gebruikte polystyreen (PS-latex) was afkomstig van SERVA (Dow uniform latex particles no. 41932) en is gekarakteriseerd zoals beschreven in hoofdstuk II van dit proefschrift. Het latex oppervlak per ml. bedroeg  $0,143 \text{ m}^2$ . Tijdens de concurrerende adsorptie experimenten is gebruik gemaakt van de volgende plasma eiwitten: HSA (no. A 9511 afkomstig van SIGMA, USA), HIGG (afkomstig van het Centraal Laboratorium voor de Bloedtransfusiedienst) en HFb (no. 65313 afkomstig van de firma KABI, Zweden). De karakterisering van deze eiwitten is eveneens beschreven in Hoofdstuk II. HSA monomeer en dimeer is verkregen door preparatieve zuivering van HSA (no. A 9511), dat 10-14% dimeer bevat. Met behulp van Sepharose 6B chromatografie was het mogelijk HSA monomeer en dimeer in handen te krijgen met zuiverheden van meer dan 97%. De gebruikte elutiebuffer was PBS (0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 N NaOH en 0,15 M NaCl). Overigens zijn alle adsorptie experimenten uitgevoerd in PBS oplossingen bij een pH van 7,35 en een temperatuur van  $20^\circ\text{C}$ .

Concurrerende eiwitadsorptie is met behulp van de HPLC/depletie techniek bepaald. Er is daarbij gebruik gemaakt van een High Performance Liquid Chromatograaf (Waters Associates) in combinatie met een Toyo Soda Micropack TSK-Gel 3000 SW kolom (VARIAN). Deze kolom is speciaal geschikt voor scheiding van plasma eiwitten en bevat een poreuze gel met hydrofiele deeltjes ( $10 \mu\text{m}$  in diameter). De detector bestond uit een UV spectrofotometer (UV Cord, LKB) toegerust met een doorstroomcel en afgesteld op een golflengte van 280 nm.

### *Concentratiebepaling van het eiwit in de oplossing*

Normaal gesproken wordt bij depletie metingen de oppervlakteconcentratie van het eiwit bepaald uit de afname van eiwitconcentratie in de oplossing ten gevolge van adsorptie. De concentraieafname kan o.a. gevolgd worden met behulp van UV spectroscopie (280 nm) gebruikmakend van

bekende extinctiecoëfficiënten zoals in hoofdstuk II beschreven. Bij de HPLC/depletietechniek wordt de eiwitconcentratie in oplossing eveneens bepaald met behulp van UV spectroscopie, maar nu is het specifiek oppervlak van de eiwitpiek (ook wel de piekhoogte) in het HPLC chromatogram een maat voor de bij deze piek behorende eiwitconcentratie in de oplossing.

Om inzicht te krijgen in de juistheid en nauwkeurigheid van deze methode is de piekhoogte van de respectievelijke HSA en HFb pieken in het HPLC chromatogram uitgezet als functie van hun concentratie in de oplossing (Fig 1). De spreiding in de piekhoogte was niet groter dan 3% bij dezelfde eiwitconcentraties in de oplossing en dezelfde HPLC condities.

#### *Concurrerende adsorptie:*

Bij de concurrerende adsorptie experimenten kan nu de depletie gevolgd worden met behulp van HPLC. Vooraf wordt van een eiwitmengsel (b.v. HSA monomeer, HSA dimeer of HSA in combinatie met HFb en HlgG) met bekende eiwitconcentraties een HPLC chromatogram gemaakt. Vervolgens wordt aan dit mengsel een bekende hoeveelheid PS-latex toegevoegd (zie Tabel IV.1 en IV.2) en na de vereiste adsorptietijd worden de PS-latex eiwit suspensies gecentrifugeerd gedurende 15 minuten in een SORVALL RC-28 centrifuge (20.000 g). De bovenstaande heldere vloeistof wordt geïsoleerd en de afname in de eiwitconcentratie wordt bepaald door de afname in piekhoogte van de respectievelijke eiwitpieken in het HPLC chromatogram.

Twee factoren spelen een belangrijke rol in de nauwkeurigheid van de op deze wijze verkregen adsorptiegegevens.

Ten eerste het scheidend vermogen van de gebruikte HPLC kolom. Een goede basislijnscheiding van alle in de oplossing aanwezige componenten is noodzakelijk. Ten tweede, de depletie moet beduidend groter zijn dan 3% van het aanwezige eiwit in oplossing, gezien de spreiding in de concentratiebepaling.

Als aan beide voorwaarden voldaan is kan op deze wijze de



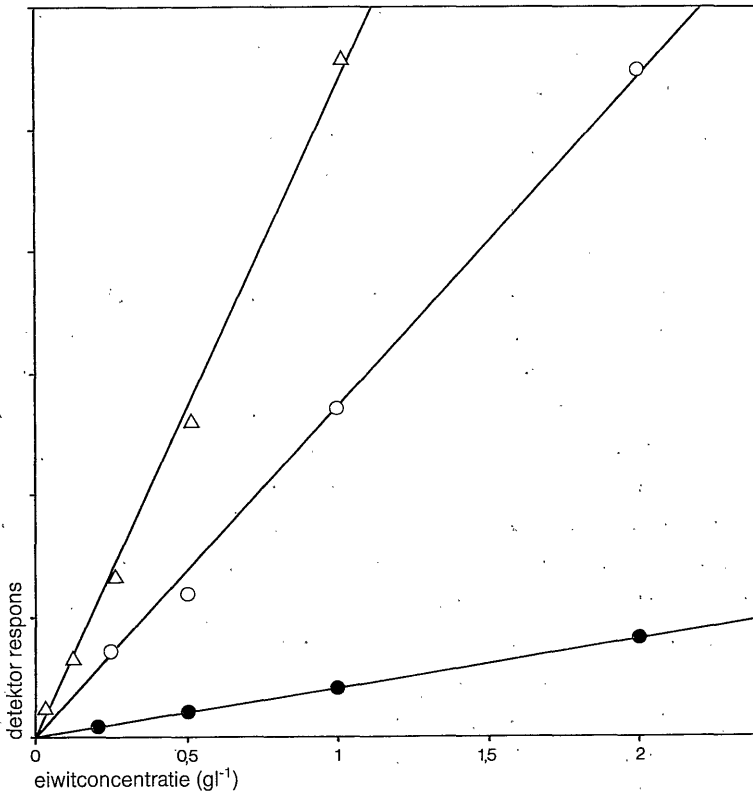


Fig. 1 De hoogte van de HSA monomeer (O) en dimeer (●) pieken en van de HFB (Δ) piek in het HPLC chromatogram als functie van de eiwitconcentratie in oplossing. Uit de lineariteit is af te leiden dat de piekhoogte een maat is voor de eiwitconcentratie in oplossing.

concurrerende adsorptie van ongelabelde eiwitten kwantitatief worden bepaald.

Ter vergelijking is de concurrerende adsorptie van gelabelde eiwitten bestudeerd. De eiwitten zijn gelabeld volgens de chlooramine T methode (KLEIN ELHORST 1978). Door gebruik te maken van  $I^{125}$  en  $I^{131}$  labels is het mogelijk gelijktijdige adsorptie van 2 eiwitten in een eiwitmengsel te vol-

gen. Ook kan op deze wijze de uitwisseling tussen verschillende eiwitten worden gevolgd, zoals beschreven in Hoofdstuk III van dit proefschrift.

#### IV.3. Resultaten

In de figuren 2 t/m 4 worden de HPLC chromatogrammen gegeven van verschillende combinaties HSA, HIgG en HFb voor en na adsorptie aan PS-latex. In figuur 2 wordt een chromatogram getoond van een mengsel bestaande uit  $0,37 \text{ gl}^{-1}$  HFb en  $1,8 \text{ gl}^{-1}$  HIgG voor en na adsorptie. Het verschil (gearceerd oppervlak) wordt veroorzaakt door adsorptie van eiwit. In figuur 3 wordt een chromatogram gegeven van een mengsel waarin ongezuiverd HSA ( $3 \text{ gl}^{-1}$ ) en HFb ( $0,3 \text{ gl}^{-1}$ ) voorkomen, voor en na adsorptie. In beide concurrerende adsorptie experimenten wordt aangetoond dat HFb sterk preferentieel adsorbeert. Als in deze concurrerende adsorptieexperimenten de concentratie van de eiwitten wordt gevarieerd op een zodanige wijze dat na adsorptie nog steeds HFb in de oplossing aanwezig is, blijkt dat geen of tenminste een niet detecteerbare hoeveelheid HIgG of HSA adsorbeert aan het PS-latex oppervlak.

In figuur 4 wordt de verandering in het HPLC chromatogram gegeven ten gevolge van adsorptie aan PS-latex van een mengsel bestaande uit 3 eiwitten te weten gezuiverd HSA ( $2,0 \text{ gl}^{-1}$ ), HFb ( $0,45 \text{ gl}^{-1}$ ) en HIgG ( $0,76 \text{ gl}^{-1}$ ). De berekening van de adsorptiegegevens is in dit geval gecompliceerder doordat de piek van HSA niet volledig te scheiden is van die van HIgG in het chromatogram. De adsorptieconcentraties behorend bij figuur 4 zijn berekend door aanname van volledige HFb adsorptie en geen HSA adsorptie. De adsorptiegegevens verkregen door toepassing van de HPLC/depletie techniek (Figuren 2 t/m 4) zijn samengevat in Tabel IV.1.

Het berekenen van kwantitatieve adsorptiegegevens voor de concurrerende adsorptie van HSA en HIgG aan PS-latex is met de huidige experimentele opstelling erg lastig. Dit komt,

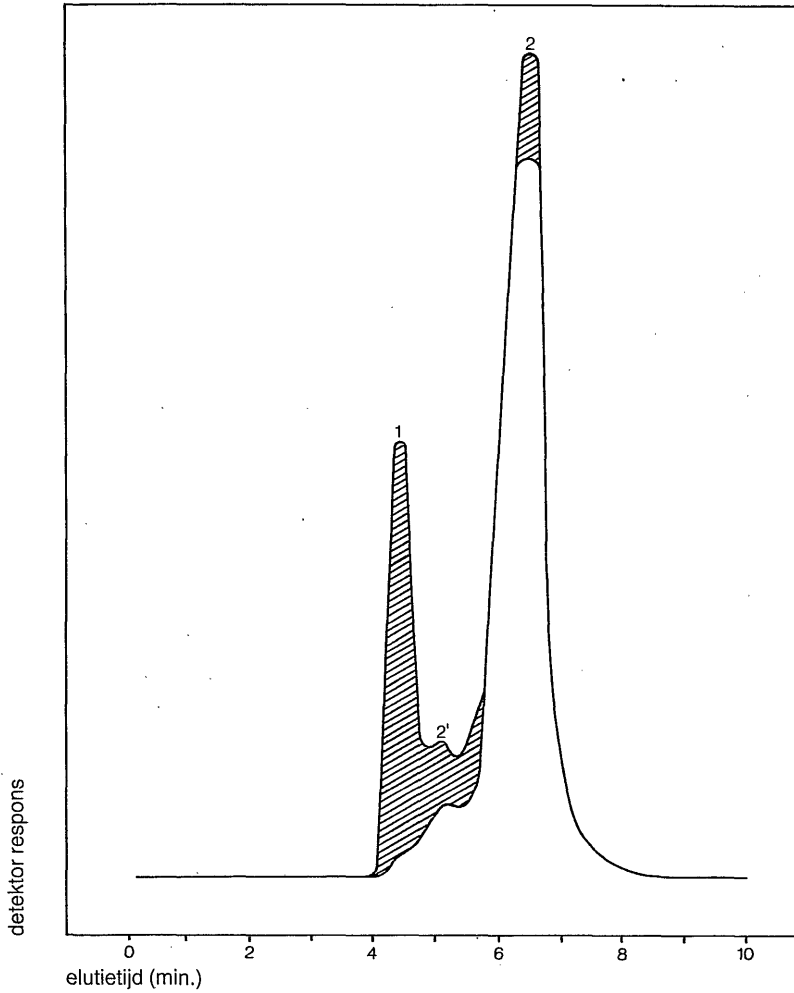


Fig. 2 HPLC chromatogram van een mengsel HFb ( $0,37 \text{ gl}^{-1}$ ), piek 1 en HIGG ( $1,8 \text{ gl}^{-1}$ ) piek 2 en 2' in PBS, pH 7,35,  $20^\circ\text{C}$  elutiesnelheid  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , elutiebuffer PBS. Het gearceerde oppervlak verdwijnt door adsorptie. Adsorptietijd is vier uur.

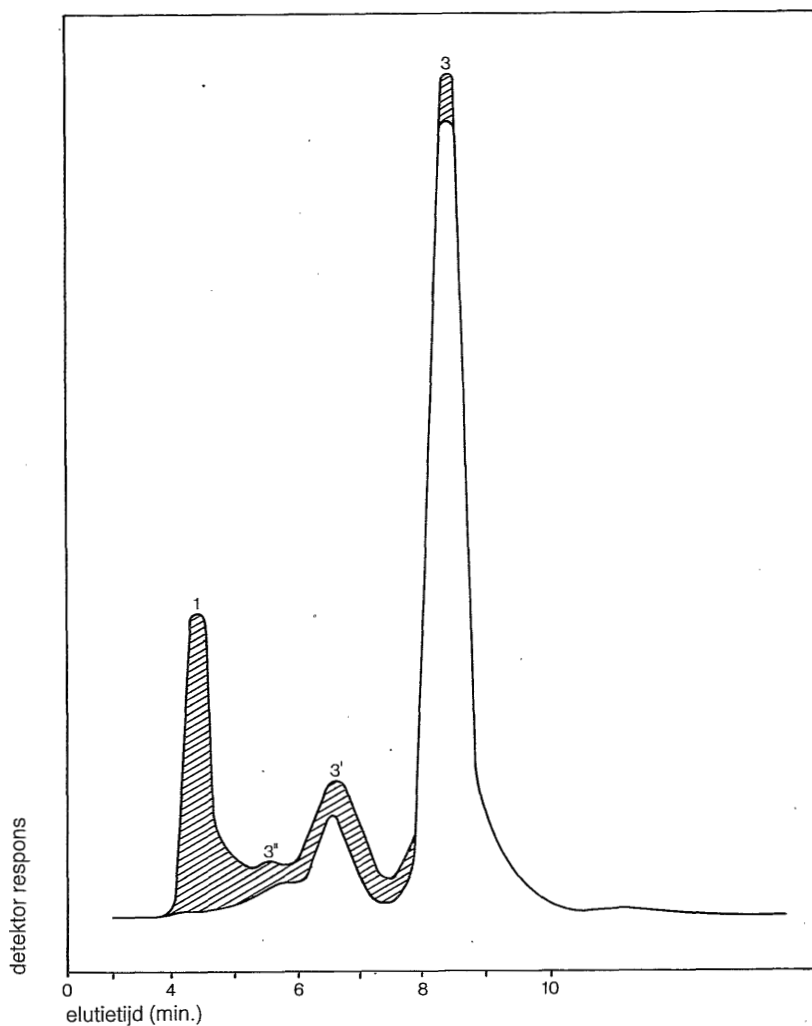


Fig. 3 HPLC chromatogram van een mengsel HFb ( $0,3 \text{ gl}^{-1}$ ), piek 1 en ongezuiverd HSA ( $3 \text{ gl}^{-1}$ ), piek 3, 3' en 3". De condities zijn gelijk aan die van figuur 2. Het gearceerde oppervlak verdwijnt door adsorptie.

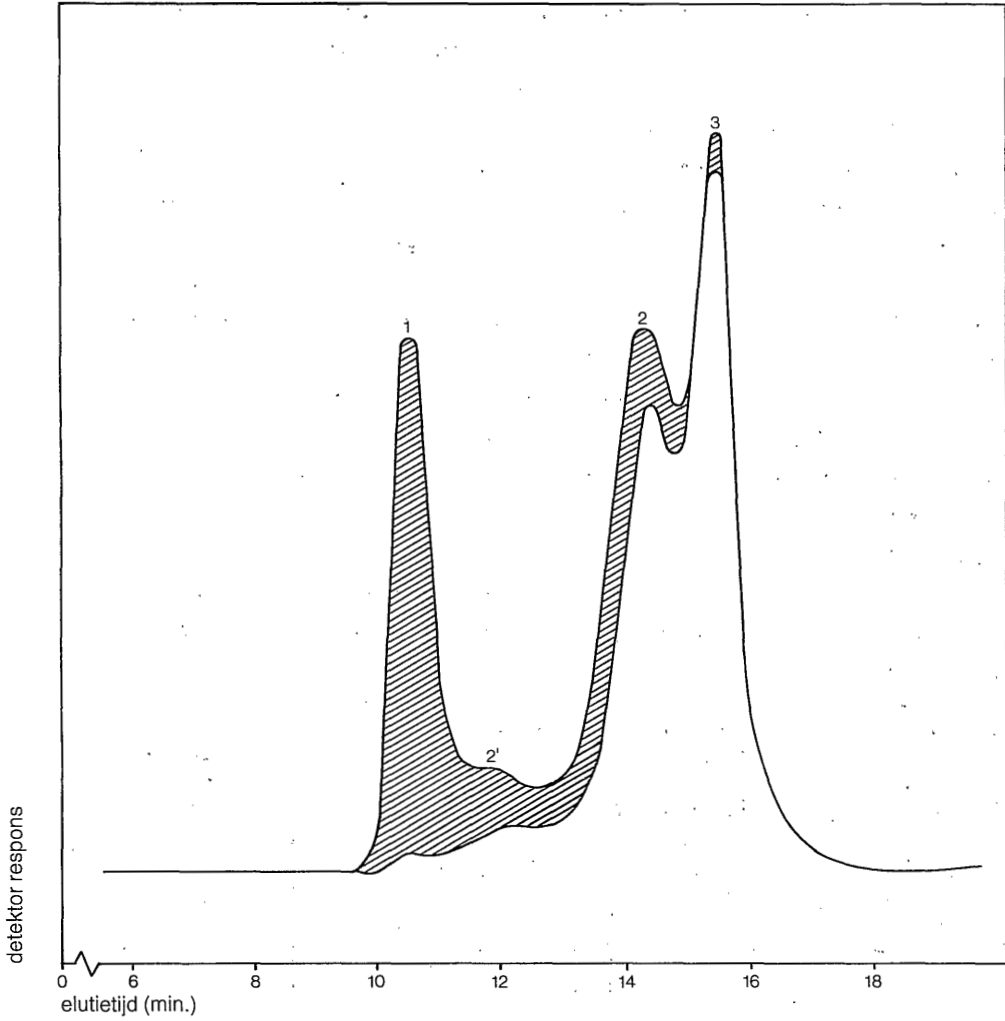


Fig. 4 HPLC chromatogram van een mengsel HFb ( $0,45 \text{ gl}^{-1}$ ), piek 1, HIgG ( $0,76 \text{ gl}^{-1}$ ), piek 2 en 2' en gezuiverd HSA ( $2,0 \text{ gl}^{-1}$ ), piek 3. De condities voor adsorptie zijn als bij figuur 2. Het gearceerde oppervlak verdwijnt door adsorptie.

zoals reeds eerder vermeld, doordat het niet mogelijk is met de gebruikte HPLC kolom de HSA en HIgG componenten volledig te scheiden. Kwantitatieve adsorptiewaarden kunnen dan ook niet worden gegeven. Wel is geconstateerd dat bij gelijke beginconcentraties HSA en HIgG in de oplossing en voldoende PS-latex aanbod na adsorptie alleen nog HSA detecteerbaar is in de oplossing. In de literatuur zijn geen concurrerende resultaten beschikbaar, die vergeleken kunnen worden met voorgaande resultaten. Wel is in ons laboratorium de concurrerende adsorptie bestudeerd van HSAI<sup>125</sup> en HFbI<sup>131</sup> aan PS-latex en PS plaatjes onder overeenkomstige condities. Gezien de resultaten in Hoofdstuk II en III is echter een vergelijkende studie niet zonder complicatie (mogelijk preferentiële adsorptie van gelabeld eiwit).

TABEL IV.1

CONCURRERENDE ADSORPTIE VAN VERSCHILLENDE EIWITTEN AAN PS LATEX ( $0.143\text{m}^2$ )

buffer volume (ml)	eiwitten	eiwit conc. in de oplossing (gl-1)		eiwitconcentratie aan het PS latex oppervlak ( $\mu\text{gcm}^{-2}$ )
		voor adsorptie	na adsorptie	
1.5	HFb	0.37	niet detecteerbaar	0.4
	HIgG	1.8	1.58	0.2
1.0	HFb	0.3	niet detecteerbaar	0.2
	HSA	3.0	2.90	0.07
1.5	HFb	0.45	niet detecteerbaar	0.5
	HSA	0.76	0.76	-
	HIgG	2.0	1.80	0.2

In Figuur 5 is de adsorptieisotherm van HSA aan PS plaatjes gegeven bij aanwezigheid van een vaste concentratie HFb ( $0,3\text{ gl}^{-1}$ ) in oplossing. De HSA isotherm lijkt een

plateauwaarde te benaderen bij  $5 \text{ gl}^{-1}$  in de oplossing, waarbij de oppervlakteconcentratie  $0,4 \text{ } \mu\text{gcm}^{-2}$  is. De HFb oppervlakteconcentratie is dan  $0,1 \text{ } \mu\text{gcm}^{-2}$ . De oppervlakteconcentratie HFb neemt duidelijk af bij toenemende concentratie HSA in oplossing. Wel blijkt dat door aanwezigheid van HFb in de oplossing de plateauwaarde voor HSA 30% lager is in vergelijking met de plateauwaarde van de adsorptieisotherm van gelabeld HSA (zonder bijmenging van andere eiwitten) aan PS ( $0,6 \text{ } \mu\text{gcm}^{-2}$ ).

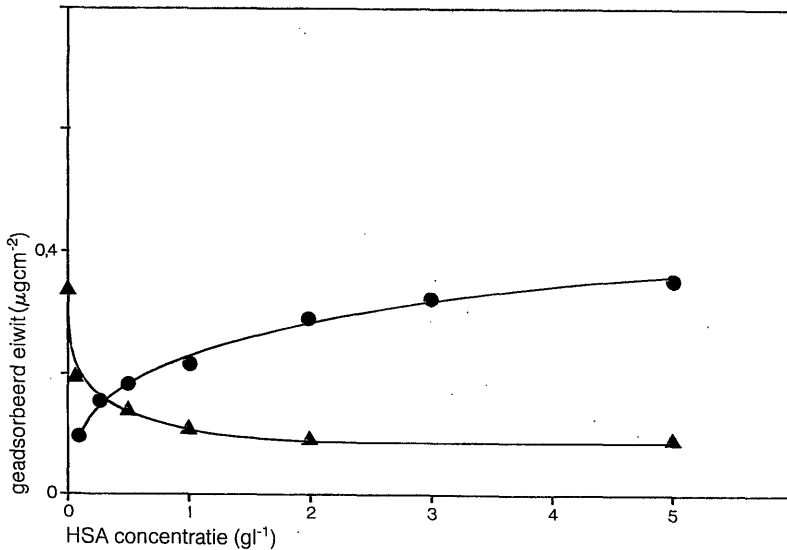


Fig. 5 Adsorptie isotherm van gelabeld HSA bij vaste HFb concentratie van  $0,3 \text{ gl}^{-1}$  aan PS film ( $2 \text{ cm}^{-2}$ ). De adsorptie van HSAI<sup>125</sup> (●) en HFBI<sup>131</sup> (▲) is gegeven als functie van de concentratie HSA in oplossing. De adsorptietijd is zes uur.

In figuur 6 wordt een gelijksoortige isotherm van gelabeld HSA gegeven als in figuur 5. Nu voor de adsorptie HSAI<sup>125</sup> aan PS-latex bij aanwezigheid van een vaste beginconcentratie HFb van  $0,8 \text{ gl}^{-1}$ . Na adsorptie is haast alle

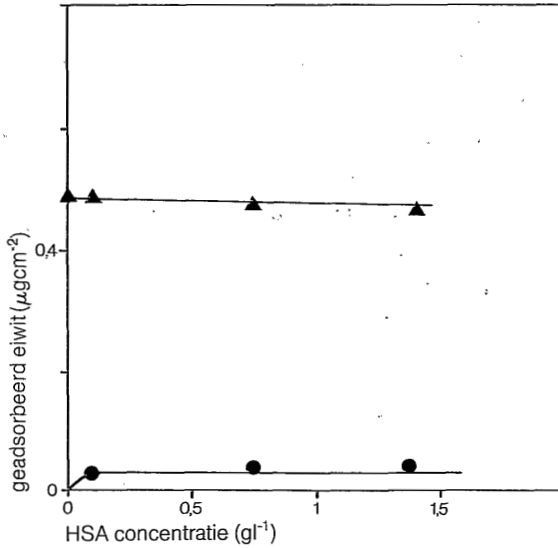


Fig. 6 Adsorptie isotherm (adsorptietijd een uur) van HSAI<sup>125</sup> (●), bij een vaste beginconcentratie HFBI<sup>131</sup> (0,8 gl<sup>-1</sup>) aan PS-latex (1068 cm<sup>-2</sup>) in een buffervolume van 600 µl. De adsorptie van HSAI<sup>125</sup> (●) en HFBI<sup>131</sup> (▲) is gegeven als functie van de evenwichtsconcentratie HSA in oplossing. De eindconcentratie HFBI<sup>131</sup> is na adsorptie minder dan 3% van de beginconcentratie.

HFb uit de oplossing verdwenen. Er is hier dus sprake van een sterke preferentiële adsorptie van HFb. De plateauwaarde voor HSA is nu 0,04 µgcm<sup>-2</sup>.

De concurrerende adsorptie van HSA en HFb is ook bestudeerd als functie van de tijd. Bij adsorptie aan PS-latex bleek dat binnen 15 minuten de evenwichtswaarde was bereikt, zowel voor gelabelde als voor ongelabelde eiwitten. Bij adsorptie aan PS-plaatjes bleek HFb binnen 15 minuten in evenwicht, echter de oppervlakteconcentratie van HSA was na 15 minuten slechts 0,25 µgcm<sup>-2</sup> en bereikte pas na 5 uur een evenwichtswaarde van 0,4 µgcm<sup>-2</sup> bij 5 gl<sup>-1</sup>. Vanzelfsprekend zijn alle isothermen onder evenwichtsomstandigheden bepaald.



#### *Uitwisseling van HSA en HFb aan PS-latex.*

Uitwisseling tussen geadsorbeerd HSA en HFb in oplossing is bij latex niet aangetoond met de HPLC/depletie techniek. Wel is in speciale gevallen extra adsorptie aangetoond. Wanneer aan PS latex gedurende 5, 10, 30 en 60 minuten, gebruikmakend van  $1 \text{ gl}^{-1}$  HSA oplossing, HSA gepreadsorbeerd wordt en vervolgens een oplossing van  $1 \text{ gl}^{-1}$  HFb wordt toegevoegd, dan blijkt dat de HSA oppervlakteconcentratie constant blijft, terwijl toch een extra hoeveelheid HFb adsorbeert ( $0,35 \mu\text{gcm}^{-2}$ ). HSA adsorbeert niet aan latex waaraan HFb gepreadsorbeerd is.

Uitwisselingsstudies aan PS-latex zijn ook uitgevoerd met behulp van gelabelde eiwitten (HSAI<sup>125</sup> en HFbI<sup>131</sup>). Gepreadsorbeerd gelabeld HFb wisselt niet meer uit met gelabeld HSA in oplossing. Wel adsorbeert gelabeld HSA aan latex oppervlakken waaraan gelabeld HFb gepreadsorbeerd is. De HSA adsorptie is dan wel aanzienlijk lager in vergelijking met HSA adsorptie aan PS-latex oppervlakken waarbij geen gelabeld HFb is gepreadsorbeerd. Wanneer aan de latex-oppervlakken HSA met een waarde van  $0,14 \mu\text{gcm}^{-2}$  gepreadsorbeerd wordt en vervolgens in contact gebracht worden met gelabeld HFb in oplossing, dan wordt gelabeld HSA gedeeltelijk verdrongen door het HFb in de oplossing. De adsorptie van gelabeld HFb wordt niet beïnvloed door aanwezigheid van HSA, tevoren geadsorbeerd aan het latexoppervlak.

#### *Uitwisseling van HSA en HFb aan PS-plaatjes*

Anders is het gesteld wanneer bij uitwisselingsstudies in plaats van PS-latex gebruik wordt gemaakt van PS plaatjes. De uitwisseling van HFb en HSA aan PS plaatjes wordt weer gegeven in fig. 7. In dit geval wordt gelabeld HFb aan het oppervlak gedeeltelijk verdrongen door ongelabeld HSA in oplossing. Ook wordt gelabeld HSA aan het oppervlak gedeeltelijk verdrongen door ongelabeld HFb in oplossing.

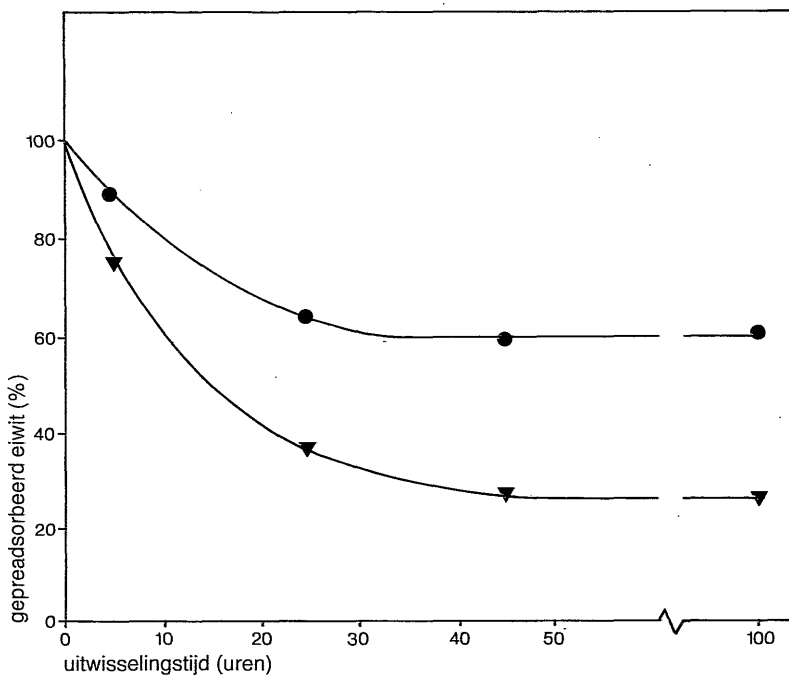


Fig. 7 Uitwisseling van  $\text{HFbI}^{125}$  ( $0,34 \mu\text{gcm}^{-2}$ ) geadsorbeerd aan PS-plaatjes met  $3 \text{ gl}^{-1}$  HSA in oplossing (▼). Uitwisseling van  $\text{HSAI}^{125}$  ( $0,33 \mu\text{gcm}^{-2}$ ) geadsorbeerd aan PS plaatjes met  $0,3 \text{ gl}^{-1}$  HFb in oplossing (●). Het percentage van de oorspronkelijke oppervlakteconcentratie is uitgezet als functie van de tijd. Aan de PS oppervlakken is met respectievelijk  $3 \text{ gl}^{-1}$  HSA en  $0,3 \text{ gl}^{-1}$  HFb gedurende drie uur vooraf HSA en HFb geadsorbeerd.

*De concurrerende adsorptie van HSA monomeren en dimeren aan PS-latex*

Naast bestudering van de concurrerende adsorptie van HSA, HFb en HIgG is het ook mogelijk om met behulp van de HPLC/depletie methode de concurrerende adsorptie van dimeren en monomeren van eenzelfde eiwit te bestuderen. Dit wordt geïllustreerd aan de hand van de HSA dimeer en monomeer adsorptie aan PS-latex. Het blijkt dat het percentage HSA dimeer in de totale hoeveelheid geadsorbeerd HSA verandert

TABEL IV.2

CONCURRERENDE ADSORPTIEGEVEVENS VAN HSA DIMEER EN MONOMEER  
AAN PS LATEX\*

S (cm <sup>2</sup> ) PS latex oppervlak	oplossing		perc.geads. eiwit (%)	oppervlak	
	HSA conc. (gl <sup>-1</sup> )	dimeer (%)		geads.hoe- veelheid HSA (μgcm <sup>-2</sup> )	perc.dim (%)
447	0.325	12	4.4	0.067	58
447	0.310	12	8.8	0.137	34
894	0.294	11	13.4	0.104	34
894	0.294	11	13.4	0.104	34
1787	0.240	10	29.4	0.114	24
1787	0.247	10	27.5	0.107	24
3575	0.151	10	55.6	0.107	18
3575	0.155	10	54.4	0.105	17
7150	0.034	13	90.0	0.086	14
7150	0.032	14	90.6	0.086	14

\* Adsorptie na 1 uur bij 20°C in een PBS oplossing, pH = 7,35. Mengsels van 1,4 ml ongezuiverd HSA (14% dimeer) en 0,5 ml PS latex met verschillende concentraties zijn gebruikt. De HSA beginconcentratie van het mengsel is steeds 0,34 (gl<sup>-1</sup>).

met de hoeveelheid toegevoegd PS-latex bij een konstante beginconcentratie HSA in oplossing (Tabel IV2).

Bij een grote verhouding van latex oppervlak tot volume van de eiwitoplossing is de dimeer/monomeer verhouding aan het oppervlak gelijk aan de verhouding in de oplossing. Bij een kleine verhouding latex oppervlak tot volume van de eiwitoplossing komt de preferentiële dimeer adsorptie goed tot uiting.

#### IV.4. Discussie

Hoewel verschillende methoden zijn toegepast voor de bestudering van eiwitadsorptie aan vast-vloeistof grensvlakken, hebben slechts het gebruik van radiolabeling en fluorescentielabeling van eiwitten geleid tot kwantitatieve adsorptiegegevens bij concurrerende adsorptie experimenten.

Het gebruik van gelabelde eiwitten, zo blijkt uit hoofdstuk II en III leidt niet altijd tot betrouwbare adsorptieresultaten. In dit hoofdstuk is aangetoond dat kwantitatieve gegevens voor concurrerende adsorptie experimenten verkregen kunnen worden zonder gebruik te maken van labeling van eiwitten. De bruikbaarheid van de HPLC/depletie methode is geïllustreerd aan de hand van de concurrerende adsorptie van HIgG, HFb, HSA monomeer en HSA dimeer. Gezien de snelle ontwikkeling met betrekking tot de HPLC eiwitanalyse, zal het in de toekomst mogelijk worden de concurrerende adsorptie van meerdere eiwitten te bestuderen. Beperkende factor blijft dat het met deze methode niet mogelijk is concurrerende eiwitadsorptie aan kleine oppervlakken te bestuderen.

Uit de resultaten blijkt dat steeds een sterke preferentiële adsorptie van HFb wordt waargenomen wanneer mengsels van zowel HSA en HFb of HIgG en HFb in contact gebracht worden met PS-latex. Bovendien treedt geen adsorptie op van HSA en HIgG wanneer er nog sprake is van HFb in oplossing. Dit stemt overeen met de resultaten verkregen met behulp van radiolabeling waarbij de concurrerende adsorptie van HSAI<sup>125</sup> en HFbI<sup>131</sup> is bestudeerd aan PS-latex. Uit onze experimenten wordt duidelijk dat hoewel HSAI<sup>125</sup> preferentieel adsorbeert ten opzichte van ongelabeld HSA (Hoofdstuk II) deze preferentie niet tot uiting komt ten opzichte van ongelabeld HFb. Daarbij moeten we ook bedenken dat HSAI<sup>125</sup> bestaat uit een mengsel van ongelabeld eiwit (97%) en gelabeld eiwit (3%) waarvan slechts een zeer kleine fractie radioactief gelabeld is. Bij uitputtingsmetingen is gelabeld HSA niet in staat ongelabeld HFb van het PS-latex oppervlak te verdringen.

Hoewel HFb sterk preferentieel adsorbeert, is het te verwachten dat in eerste instantie HSA en HIgG wel adsorberen aan het oppervlak in aanwezigheid van HFb. Dit kan gebeuren omdat de diffusiecoëfficiënten van HSA en HIgG groter zijn dan die van HFb. Hieruit moet geconcludeerd worden dat in aanwezigheid van HFb initieel geadsorbeerd HSA of HIgG snel uitwisselt met HFb. Echter na 5 minuten preadsorptietijd laat geadsorbeerd HSA (ongelabeld) zich niet meer verdringen door HFb (ongelabeld). Dit betekent dat de door het oppervlak geïnduceerde verandering van het geadsorbeerde HSA binnen vijf minuten optreedt. Deze verandering wordt in hoofdstuk III van dit proefschrift beschreven met vergelijking (2) als  $P_A(\text{rev}) \rightarrow P_A(\text{"irr"})$ . GENDREAU vindt echter wel uitwisseling tussen HSA en HFb gedurende de eerste minuten van adsorptie gebruikmakend van de FTIR detectietechniek bij concurrerende adsorptie van HSA en HFb aan een germaniumkristal.

Opvallend is dat, wanneer HSA een plateauwaarde heeft bereikt in de adsorptie, het voor HFb nog steeds mogelijk is om te adsorberen. Kennelijk zijn er dan nog steeds open plaatsen aan het oppervlak aanwezig waarop HFb kan adsorberen. Op basis van theoretische berekeningen is het oppervlak volledig bedekt met HSA bij een oppervlakconcentratie van  $0,25 \mu\text{gcm}^{-2}$  (een dichtste stapeling van side-on geadsorbeerd HSA aannemende). De gevonden plateauwaarde voor HSA is  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$ . Op basis van deze berekeningen zijn bij deze plateauwaarde nog open plaatsen aan het oppervlak aanwezig. Bij onderlinge vergelijking van de concurrerende adsorptiegegevens van HFb en HSA aan PS-latex en PS-plaatjes springen de afwijkende adsorptieresultaten van HSA en HFb aan PS-plaatjes onmiddellijk in het oog. Kennelijk speelt de oppervlakte/volume verhouding een belangrijke rol bij de concurrentie tussen gelabeld en ongelabeld HSA en HFb. Dit wordt geïllustreerd bij de preferentiele adsorptie van HSA dimeer ten opzichte van HSA monomeer. Hier blijkt dat de oppervlakte/volume verhouding in ieder geval een belangrijke rol speelt (Tabel IV.2).

De discrepantie tussen de concurrerende adsorptieresultaten van ongelabeld HFb en HSA enerzijds en gelabeld HFb en HSA anderzijds is niet vreemd als men bedenkt dat er al artefacten optreden ten gevolge van labeling in de adsorptie bij een ééncomponentensysteem zoals uit hoofdstuk II bleek.

Uit de resultaten verkregen met de HPLC/depletie techniek blijkt dat HSA dimeer preferentieel adsorbeert ten opzichte van HSA monomeer. In veel adsorptiestudies wordt gebruik gemaakt van ongezuiverd HSA. Ongezuiverd HSA bevat verschillende hoeveelheden dimeer (10-15%) en zelfs trimeer (GITLIN 1975). Het is te verwachten dat door aanwezigheid van HSA dimeer in oplossing er afwijkingen ontstaan in de adsorptie resultaten van HSA monomeer, zoals door BROOKS gesuggereerd (BROOKS 1981). Dit is echter niet het geval. Zelfs bij de adsorptie van 100% dimeer wordt dezelfde adsorptiewaarde gevonden aan PS-latex onder dezelfde condities als bij adsorptie van HSA monomeer. Hieruit moet geconcludeerd worden dat het specifiek oppervlak van dimeer tweemaal zo groot is als dat van HSA monomeer.

#### IV.5. Conclusie

Resumerend kan gesteld worden dat betrouwbare concurrerende adsorptiegegevens verkregen kunnen worden met niet gelabelde eiwitten door gebruikmaking van de HPLC/depletie methode. Als eiwitmengsels van HSA, HFb en HIgG in contact gebracht worden met een PS-latex oppervlak wordt een sterke preferentiele adsorptie van HFb waargenomen.

Uit de adsorptie experimenten met HSA oplossingen waarin dimeer en monomeer aanwezig zijn, blijkt HSA dimeer preferentieel te adsorberen. Wederom blijkt dat door vergelijking van concurrerende adsorptiegegevens van gelabeld HFb en HSA én van ongelabeld HFb en HSA er afwijkingen optreden ten gevolge van labeling. Deze komen bij adsorptie aan PS-plaatjes het sterkst tot uiting.

## REFERENTIES

- BEISSINGER, R.L. en LEONARD, E.F., J. Colloid Interface Sci. 85,521 (1982).
- BRASH, J.L. en LYMAN, D.J., J. Biomed. Mater. Res., 3, 175 (1969).
- BRASH, J.L. en UNIYAL, S., J. Polymer Sci: Polymer Symp. 66, 377 (1979).
- BROOKS, D.E. en GREIG, R.G., J. Colloid Interface Sci., 83, 661 (1981).
- BREEMHAAR, W., ELLENS, D.J., BEUGELING, T., BANTJES, A., in Proc. 1 Ann. Meeting ESAO 295 (1982)
- CRANDALL, R.E., JANATOVA, J. en ANDRADE, J.D., Prep. Biochem. 11, 111 (1981).
- GENDREAU, R.M., LEININGER, R.I., WINTERS, S. en JAKOBSON, R.B., in "Biomaterial: interfacial phenomena and applications ACS", 199 S.L. Cooper en N.A. Peppas, Eds., p. 371 (1982).
- GITLIN, D. en GITLIN, D.J., in "plasma proteins", (F.W. Putman), Voll II, p. 329, Academic Press, New York, 1975.
- KLEIN ELHORST, J., OLTHUIS, F.M.F.G., BARGEMAN, D., SMOLDERS, C.A. en FEIJEN J., Int. J. of Artif. Organs, 1, 288 (1978).
- KOCHWA, S., LITWAK, R.S., ROSENFELD, R.E. en LEONARD, E.F., Ann N.Y. Acad. Sci. 283, 37 (1977).
- LEE, R.G. en KIM, S.W., J. Biomed. Mater. Res. 8, 251 (1974).
- MOYER, L.S. en GORIN, M.H., J. Biol. Chem. 133, 605 (1940).





## HOOFDSTUK V

### EEN VERGELIJKENDE STUDIE VAN DE ADSORPTIE VAN MENSELIJK ALBUMINE AAN POLYSTYREEN EN POLYVINYLCHLORIDE

#### V.1 Inleiding

Om inzicht te krijgen in de bloedcompatibiliteit van materialen is een goed begrip van het adsorptiegedrag van plasma eiwitten aan deze materialen noodzakelijk. Vele methodes worden toegepast om de adsorptie van plasma eiwitten aan vaste oppervlakken te bestuderen (Hoofdstuk I.3). Echter met geen enkele methode wordt een volledig inzicht verkregen in het adsorptiegedrag van eiwitten uit plasma.

Zo is de depletie van eiwitten uit de oplossing weliswaar kwantitatief bij gebruik van latices maar de nauwkeurigheid van deze methode bij kleine oppervlakken, noodzakelijk voor studies aan bijvoorbeeld biomedische materialen, is zeer beperkt. Door radiolabeling van eiwitten kunnen wel kwantitatieve adsorptiewaarden aan kleine oppervlakken worden verkregen. Maar uit Hoofdstuk II en III blijkt dat het adsorptiegedrag van eiwitten door radiolabeling kan veranderen. Ellipsometrie en infraroodreflectiespectroscopie worden eveneens gebruikt voor adsorptiestudies, maar deze technieken hebben als nadeel dat de resultaten moeilijk interpreteerbaar zijn en dat de toepasbaarheid voor concurrerende adsorptie van eiwitten beperkt is. BREEMHAAR heeft in 1982 gebruik gemaakt van een nieuwe adsorptiemethode gebaseerd op een enzymimmunoassay techniek waarbij op relatief eenvoudige wijze de concurrerende adsorptie van eiwitten vanuit plasma kon worden bestudeerd aan polystyreen en polyvinylchloride. De kwantificeerbaarheid van de verkregen resultaten vormt ook hier nog steeds een probleem. In dit Hoofdstuk wordt de adsorptie beschreven van menselijke albumine (HSA) aan polystyreen en polyvinylchloride waarbij gebruik gemaakt is van drie adsorptietechnieken:

- de enzymimmunoassay methode
- radiolabeling van eiwitten en de
- Biorad desorptie methode.

Bij deze studie zijn de adsorptiecondities voor de verschillende methoden exact gelijken gehouden. Op deze wijze wordt getracht de betrouwbaarheid en de bruikbaarheid van de verschillende methoden onderling te toetsen.

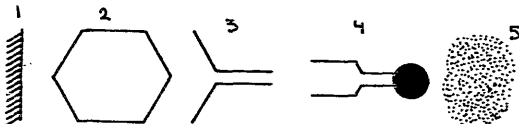
### V.2. Experimenteel

*Polystyreen* (PS) is afkomstig van Hepanostika, Organon Technika, Turnhout, België. *polyvinylchloride* (PVC) Batch no. 1-220-29 is afkomstig van Dynatech, Virginia, USA. Deze polymeren zijn gebruikt in de vorm van microtiterplaten bestaande uit respectievelijk 110 PS titreerputjes met een beschikbaar oppervlak van  $1,9 \text{ cm}^2$  per stuk en 96 PVC titreerputjes met ieder een oppervlak van  $2,0 \text{ cm}^2$ . Dit zijn de contactoppervlakken na afvullen met  $75 \mu\text{l}$  eiwitoplossing. Menselijk albumine (HSA) is verkregen van het Centraal Laboratorium van de Nederlandse Bloedtransfusiedienst en gebruikt zonder verdere zuivering (20% oplossing). Deze oplossing is verdund met 0,01 M Fosfaatbuffer waarin 0,15 M NaCl bij een pH van 7,35 (PBS) tot de gewenste eiwitconcentraties. PBS en PBS in aanwezigheid van 0,05% Tween-20 (PBS-Tw) zijn gebruikt als wasbuffers; Tween-20 is een oppervlakte actieve stof. De pH van deze buffers is 7,35.

### V.3. Adsorptiemethoden

#### *Enzym immunoassay (EIA)*

Deze methode is uitvoerig beschreven door BREEMHAAR (1982). Het principe is hieronder schematisch weergegeven.



Hierin is (1) de vaste fase, (2) het antigeen (eiwit), (3) het antilichaam, (4) het enzym gekoppelde tweede antilichaam en (5) het substraat (nodig voor de kleuringsreactie met het enzym).

Eiwit (2) adsorbeert op een vast oppervlak (1). Het geadsorbeerde eiwit is te beschouwen als een antigeen dat vervolgens reageert met een antilichaam (3). In dit geval wordt als antilichaam gebruikt konijnenserum verdund in PBS. Het serum is afkomstig van het CLB. Vervolgens wordt een tweede anti-lichaam (conjugaat) (4) toegevoegd dat complexeert met het eerste antilichaam (3). Dit conjugaat bestaat uit gezuiverd schapen anti-konijnen immunoglobuline G dat eveneens afkomstig is van het CLB. Dit immunoglobuline G is vooraf gekoppeld met het enzym mierikswortelperoxidase, dat afkomstig is van Boehringer, Mannheim West Duitsland volgens de methode van Carlsson (CARLSSON 1978). Vervolgens wordt het substraat (5) ureumperoxidase (Hepanostika, Organon Technika, Turnhout België) in aanwezigheid van 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (Fluka, Zwitserland) toegevoegd. Dit substraat geeft uiteindelijk een kleuring met de gekoppelde mierikswortelperoxidase. De extinktie van het omgezette substraat ( $A_{450}$ ) is een maat voor de hoeveelheid geadsorbeerd eiwit aan het oppervlak. De adsorptieprocedure met de EIA methode is als volgt:

De titreerputjes van de PS en PVC microtiterplaten worden in contact gebracht met 75  $\mu$ l HSA oplossing (variërend van  $10^{-6}$  tot  $10^{-1}$  g l<sup>-1</sup>) bij 20 °C gedurende één uur. De microtiterplaten zijn tijdens adsorptie afgedekt ter voorkoming van verdamping. Na één uur worden de putjes geledigd en viermaal gewassen met 150  $\mu$ l PBS of PBS-Tw. Iedere wasbeurt duurt dertig seconden. De adsorptie wordt gemeten bij 450 nm ( $A_{450}$ ) met behulp van een colorimeter voorzien van een 80  $\mu$ l doorstroomcel (Vitatron).

### *Radiolabeling*

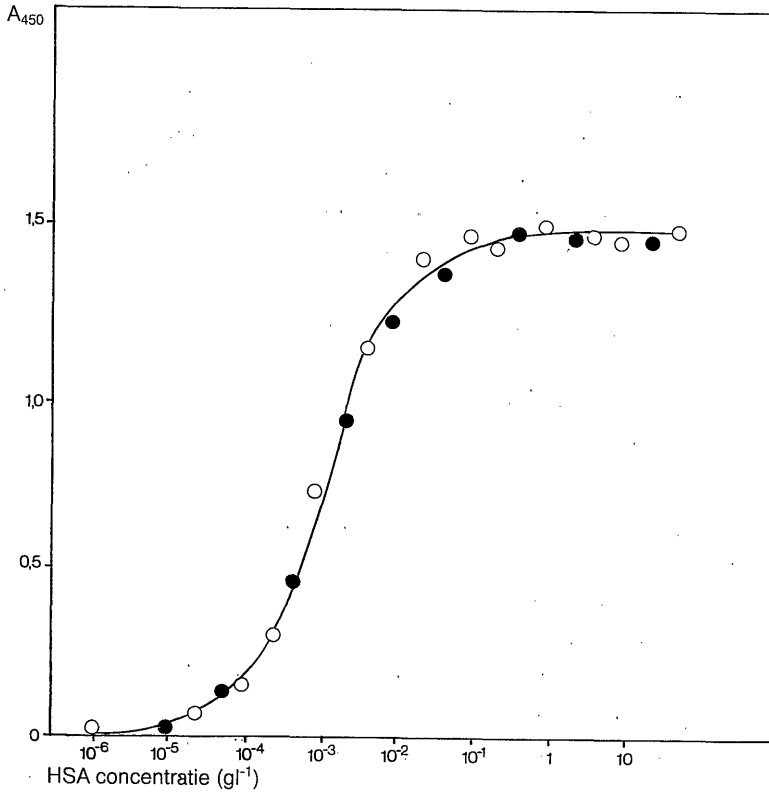
HSA wordt vooraf gelabeld met het radioactieve  $I^{125}$  volgens de chlooramine T methode zoals elders beschreven (KLEIN ELHORST 1978). Vervolgens worden de titreerputjes van de PS en PVC microtiterplaten gevuld met 75  $\mu$ l gelabeld HSA van verschillende concentratie (3% gelabeld eiwit). Na één uur wordt de albumine oplossing weggenomen en worden de oppervlakken viermaal gewassen met 150  $\mu$ l PBS of PBS-Tw. De HSA oppervlakteconcentratie kan worden bepaald aan de hand van de radioactiviteit op het oppervlak van de putjes die gemeten wordt met een COBAS gamma teller. De radioactiviteit per  $\mu$ g eiwit is bekend uit ijkproeven.

### *Biorad eiwit assay*

Met de Biorad eiwit assay kit (Biorad Laboratories, California, USA), kunnen slechts lage eiwitconcentraties gedetecteerd worden in oplossing (van 1 tot 25  $\text{mg l}^{-1}$ ). Deze methode is het eerst beschreven door BRADFORD (1976) en is gebaseerd op eiwitkleuring met behulp van Coomassie Brilliant Blue G-250 dat bij koppeling met eiwit een absorptiemaximum heeft bij 595 nm. De PVC putjes worden ook hier gevuld met 75  $\mu$ l HSA van verschillende concentraties en na één uur adsorptie bij 20°C worden de oppervlakken viermaal gewassen met PBS of PBS-Tween. Vervolgens wordt de geadsorbeerde hoeveelheid eiwit gedesorbeerd in een oplossing van 400  $\mu$ l PBS, die 0,01% Triton X-100 bevat. Na zestien uur desorptie wordt 100  $\mu$ l Coomassie Brilliant Blue G-250 toegevoegd en de extinctie bij 595 nm met behulp van een colorimeter (Vitatron) bepaald. Met een ijkcurve kan de oorspronkelijke hoeveelheid geadsorbeerd eiwit worden bepaald.

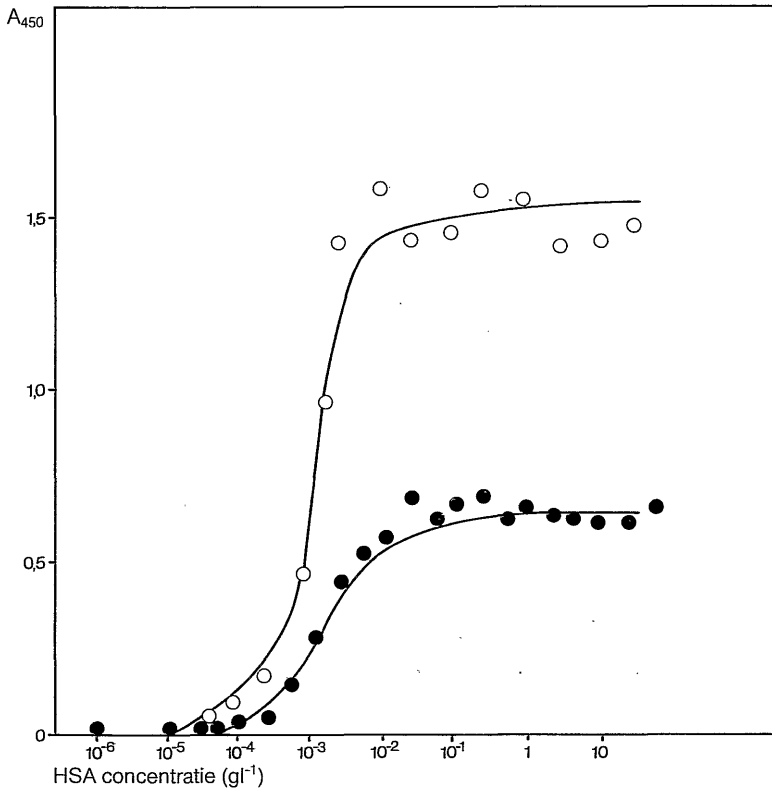
### V.4. Resultaten

De adsorptie isothermen van HSA aan PVC (Figuren 1, 3 en 5) en PS (Figuren 2 en 4) zijn bepaald met de EIA methode (Figuren 1 en 2), door radiolabeling van HSA (Figuren 3 en 4) en met behulp van de Biorad eiwit assay (Figuren 5). Bij



Figuur 1 Adsorptie isotherm van HSA aan PVC bepaald met EIA. Adsorptie tijd één uur, temp. 20°C, pH 7,35 in PBS buffer. Twee wasprocedures zijn toegepast PBS (○) en PBS-Tween (●).

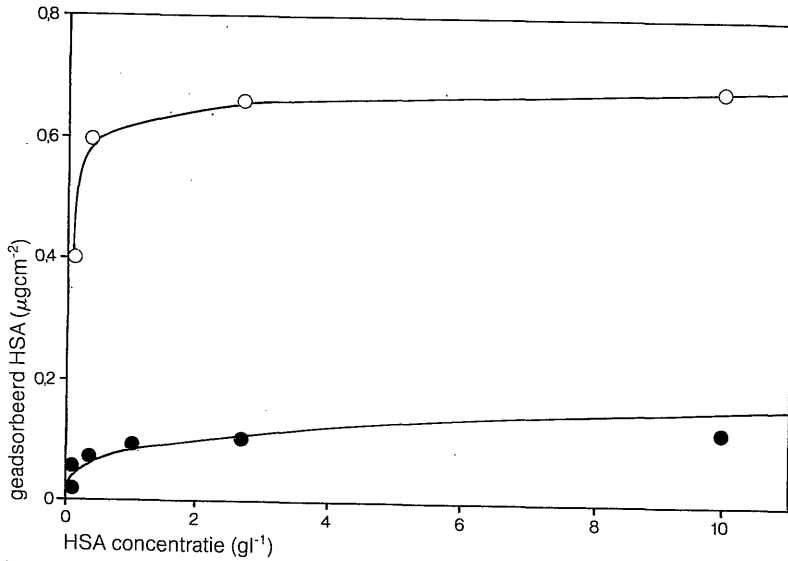
gebruik van de EIA methode blijkt dat reeds bij concentraties van minder dan 0,1 gl<sup>-1</sup> het oppervlak verzadigd is met geadsorbeerd eiwit (Figuren 1 en 2). De oppervlakteconcentraties zijn echter niet kwantificeerbaar. De adsorptie wordt uitgedrukt in extinctiewaarden (A<sub>450</sub>). Bij ver-



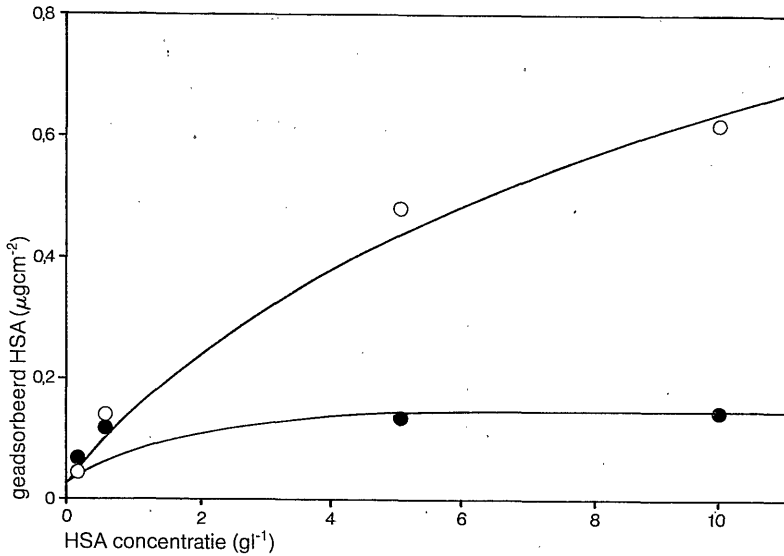
Figuur 2 Adsorptie isotherm van HSA aan PS bepaald met de EIA methode.

Conditie als bij Figuur 1. Wasprocedure PBS (O) en PBS-Tween (●).

verzadiging is  $A_{450}$  gelijk aan 1,5. De isothermen, bepaald door radiolabeling van HSA, zijn wel kwantificeerbaar. Voor PS wordt bij  $5 \text{ g l}^{-1}$  HSA in oplossing een plateau bereikt van  $0,5 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$ . PBS is gebruikt als wasbuffer. Ook de HSA isotherm aan PVC bepaald met behulp van Biorad eiwit-assay, vertoont een verzadigingswaarde ( $0,6 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Er is sprake van een "high affinity" isotherm evenals bij de HSA isothermen aan PS en PVC bepaald met EIA. Ook hier is het oppervlak bij zeer lage eiwitconcentraties in de oplossing reeds verzadigd met eiwit. Bij deze isotherm is

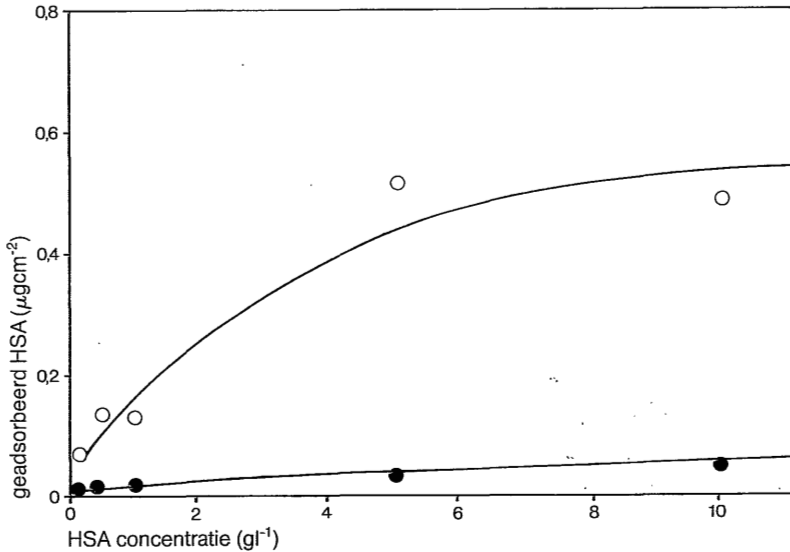


Figuur 3 Adsorptie isotherm van HSA aan PVC bepaald met radiolabeling.  
 Conditie als bij Figuur 1. Wasprocedure PBS (○) en PBS-Tween (●).



Figuur 4 Adsorptie isotherm van HSA aan PS bepaald met radiolabeling.  
 Conditie als bij figuur 1. Wasprocedures PBS (○) en PBS-Tween (●).

PBS eveneens gebruikt als wasbuffer. Wanneer PBS-Tween gebruikt wordt als wasbuffer, blijkt dat in bijna alle gevallen lagere adsorptiewaarden worden verkregen. Slechts de adsorptie isotherm van HSA aan PVC, bepaald met EIA, ondervond geen invloed van de gebruikte wasbuffer (Figuur 1).



Figuur 5 Adsorptie isotherm van HSA aan PVC bepaald met de biorad. Eiwitassay. Conditiees als bij figuur 1. Wasprocedure PBS (○) en PBS-Tween (●).

### V.5. Discussie

In de standaardprocedure van enzym immuno assays wordt meestal PBS-Tween gebruikt als wasbuffer na adsorptie van eiwitten (van WEEMEN, 1971; ENGVALL, 1971; BREEMHAAR 1982). Uit de isothermen (Figuren 2, 3, 4 en 5), waarbij de adsorptie van HSA aan PVC en PS gegeven is als functie van HSA concentratie in de oplossing gebruikmakend van verschillende adsorptiemethoden, blijkt dat het gebruik van PBS-Tween als wasbuffer leidt tot lagere adsorptiewaarden



voor HSA in vergelijking met PBS als wasbuffer. Aan PVC en PS geadsorbeerd HSA desorbeert wanneer het in contact komt met PBS-Tween oplossingen. Dit is reeds eerder gevonden voor adsorptie van BSA (runder serum albumine) aan PS door LETHONEN in 1980. Zij vonden dat BSA geadsorbeerd aan PS oppervlakken bijna volledig desorbeerde na zesmaal wassen met PBS-Tween. Hierdoor verminderde de oppervlakteconcentratie van  $0,57 \mu\text{gcm}^{-2}$  tot  $0,05 \mu\text{gcm}^{-2}$ . Tween is een oppervlakteactieve stof en verdringt eiwit van het oppervlak. PBS-Tween is dus minder geschikt als wasbuffer bij eiwitadsorptiestudies. Wanneer hierna gesproken wordt van HSA adsorptie isothermen, dan is PBS gebruikt als wasbuffer tenzij anders vermeld.

Hoewel er veel gepubliceerd is over de adsorptie van HSA vanuit waterige oplossingen aan polymere oppervlakken is nog steeds niet duidelijk welke methode het meest geschikt is voor eiwitadsorptiestudies. Uit de resultaten van deze studie, waarbij een aantal adsorptiemethoden zijn vergeleken voor de adsorptie van HSA aan PS en PVC, blijkt dat onder dezelfde adsorptiecondities de adsorptie isotherm afhankelijk is van de gebruikte adsorptiemethode. Het adsorptiegedrag van HSA aan PVC en PS vertoont onderling een gelijkheid, tenminste wanneer dezelfde adsorptiemethode wordt toegepast. Uit het feit dat desorptie van HSA, geadsorbeerd aan PVC, geringer is dan de desorptie van HSA geadsorbeerd aan PS bij wassen met PBS-Tween, zou geconcludeerd kunnen worden dat de affiniteit tussen HSA en PVC groter is dan die tussen HSA en PS.

De adsorptie isothermen van HSA aan PVC en PS (Figuren 3 en 4), bepaald door gebruikmaking van gelabeld HSA, zijn in overeenstemming met reeds eerder beschreven HSA isothermen aan PS, waarbij gebruik is gemaakt van gelabeld HSA (Hoofdstuk III van dit proefschrift en VAN DER SCHEER, 1978). Ook hier blijkt dat high-affinity isothermen, zoals in de Figuren 1, 2 en 5 gevonden wordt, met gelabeld eiwit niet

verkregen worden. Een reden hiervoor zou kunnen zijn dat, zoals in appendix II van dit proefschrift wordt duidelijk gemaakt aan de hand van adsorptie studies met gelabeld BSA, gelabeld eiwit bestaat uit twee soorten moleculen die in affiniteit voor het oppervlak verschillen. Eiwitoplossingen worden zo vergelijkbaar met heterodisperse systemen van macromoleculen. COHEN STUART (1980) heeft aangetoond dat voor adsorptie vanuit dergelijke systemen een low affinity isotherm wordt verkregen terwijl er toch sprake is van een sterke affiniteit van de macromoleculen voor het oppervlak.

Wanneer de "EIA" adsorptiewaarden (Figuren 1 en 2) gekwantificeerd worden aan de hand van de "radiolabeling" adsorptiewaarden (Figuren 3 en 4), moet geconcludeerd worden dat de verandering in HSA oppervlakteconcentratie van  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$  tot  $0,6 \mu\text{gcm}^{-2}$  over het concentratie gebied van ca. 0,1 tot  $10 \text{gl}^{-1}$ , zoals in Figuren 3 en 4 gevonden wordt niet merkbaar is in de "EIA" waarden ( $A_{450}$  blijft 1,5). Een verklaring voor de "constante" adsorptiewaarden in Figuren 1 en 2 bij concentraties groter dan  $0,1 \text{gl}^{-1}$  kan gezocht worden in de sterische hindering die de antilichamen ondervinden wanneer ze gekoppeld zijn aan geadsorbeerd HSA bij een HSA oppervlakteconcentratie hoger dan  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$ . Bij een HSA oppervlakteconcentratie van  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$  is het beschikbaar oppervlak per HSA molecule  $114 \text{nm}^2$ . Dit is ongeveer gelijk aan de dwarsdoorsnede van een antilichaam ( $103 \text{nm}^2$ ). De interactie tussen geadsorbeerd HSA en antilichaam is dan maximaal ( $A_{450} = 1,5$ ). Bij hogere HSA oppervlakteconcentraties zal één op één interactie tussen antilichaam en geadsorbeerd HSA echter niet meer mogelijk zijn ten gevolge van de onderlinge sterische hindering van de gekoppelde antilichamen. Het bereik van de EIA methode is voor HSA adsorptie beperkt tot HSA oppervlakteconcentraties van  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$ . Dit wordt nog eens verduidelijkt wanneer ten gevolge van het wassen van PBS-Tween door desorptie de HSA oppervlakteconcentratie aan PVC wordt verlaagd tot  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$  (Figuren 3 en 5) en aan

PS tot  $0,05 \mu\text{gcm}^{-2}$  (Figuur 4). De verlaging tot  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$  aan PVC is niet merkbaar in de "EIA" isotherm, omdat  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$  HSA aan het oppervlak nog steeds een maximale  $A_{450}$  waarde geeft van 1,5. De verlaging tot  $0,05 \mu\text{gcm}^{-2}$  HSA aan PS is wel merkbaar en reduceert de  $A_{450}$  waarde in Figuur 2 tot circa 50%. Ook de verlaging in de "biorad" adsorptiewaarden van  $0,6 \mu\text{gcm}^2$  tot  $0,1 \mu\text{gcm}^2$  (Figuur 5) is in Figuur 1 niet detecteerbaar. Op grond van deze bevindingen kan geconcludeerd worden dat kwantificering van de EIA methode mogelijk is tot oppervlakteconcentraties van ten hoogste  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$  HSA.

Bovendien blijkt uit vergelijking van de Figuren 1 en 3 met de Figuren 2 en 4 dat de affiniteit van HSA voor PS lager is dan voor PVC en/of dat de affiniteit van Tween-20 voor PS hoger is dan voor PVC.

#### REFERENTIES

- BRADFORD, M.M., Anal. Biochem., 72, 248 (1978).
- BREEMHAAR, W., ELLENS, D.J., BEUGELING, T. en BANTJES, A., Proc. IX Ann. Meeting ESAO 295 (1982).
- CARLSSON, J. DREVIN, H. en AXEN, R., Biochem. J., 173, 723 (1978).
- COHEN STUART, M.A., SCHEUTJES, I.M.H.M. en FLEER, G.J., J. Polymer Sci.; Polymer Phys. Ed. 58, 559 (1980).
- ENGVALL, E. en PELMANN, P., Immunochemistry, 8, 871 (1971).
- KLEIN ELHORST, J. OLTHUIS, F.M.F.G., BARGEMAN, D., SMOLDERS, C.A. en FEIJEN, I., Int. J. Artif. Org. 1, 288 (1978).
- LEHTONEN, O.D. en VILLANEN, M.K., J. Immun. Methods, 34, 61 (1980).
- VAN DER SCHEER, A., FEIJEN, J., KLEIN ELHORST, J.K., KRUGERS DAGNEAUX, P.G.L.C. en SMOLDERS, C.A., J. Colloid Interface Sci. 66, 136 (1978).
- VAN WEEMEN, B.K. en SCHUURS, A.H.W.M., FEBS Letters, 15, 232 (1971).

## HOOFDSTUK VI

### ADSORPTIE VAN PLASMA EIWITTEN AAN POLYSTYREEN LATEX VANUIT PLASMA

#### VI.1. Inleiding

Wanneer bloed in contact komt met lichaamsvreemde materialen kan binnen enkele minuten trombusvorming optreden. Aan het materiaaloppervlak zullen plasma eiwitten adsorberen en de samenstelling van deze geadsorbeerde eiwitlaag is een bepalende factor in de door het materiaal geïnduceerde stolling.

Tot op dit moment is van geen enkel materiaaloppervlak in contact met bloed, de tijdafhankelijkheid en de samenstelling van de geadsorbeerde eiwitlaag exact bekend. Wel is systematisch onderzoek verricht naar de concurrerende eiwitadsorptie in modelsystemen met twee of drie plasmaeiwitten. Zo is de adsorptie van albumine, fibrinogeen en gamma globuline bestudeerd voor verschillende materialen (BRASH, 1976; HORBETT, 1975; LEE, 1974; LENSEN, 1984). Uit deze studies blijkt dat fibrinogeen sterk preferentieel adsorbeert aan een groot aantal oppervlakken.

Bloed bevat echter meer dan 100 plasma eiwitten (SWICK, 1980). Een vergelijking met deze modelsystemen is dan ook niet zonder meer mogelijk. Daarom is het noodzakelijk de eiwitadsorptie te bestuderen vanuit plasma. BRASH heeft de concurrerende adsorptie van albumine, fibrinogeen en gamma-globuline bestudeerd vanuit plasma door gebruik te maken van radiolabeling. Het verrassend resultaat van dit onderzoek is dat in tegenstelling tot de studie van modelsystemen, waarbij mengsels van eiwitten worden gebruikt, bij plasma de fibrinogeen adsorptie sterk is gereduceerd (BRASH 1982). IHLENFELD (1979) en VROMAN (1982) vinden eveneens een gereduceerde fibrinogeen adsorptie bij gebruik van bloed en plasma, maar gedurende de eerste minuten van de adsorptie is er wel sprake van een hoge fibrinogeenconcentratie aan het

oppervlak. VROMAN schrijft dit toe aan uitwisseling tussen geadsorbeerd fibrinogeen en in plasma aanwezig kininogeen. Ook BREEMHAAR (1982) komt door middel van plasma verdunningsexperimenten tot de conclusie dat geadsorbeerd fibrinogeen uitwisselt met een hoogmoleculaire component in het plasma. Hij heeft aangetoond dat hoge dichtheid lipoproteïnen fibrinogeen verdringen van het oppervlak. WEATHERSBY (1976) maakt melding van de preferentiële adsorptie van hemoglobine en een vijftal onbekende eiwitten wanneer bloed in contact komt met kunststoffen.

In dit hoofdstuk wordt de adsorptie van menselijk albumine (HSA), menselijk gamma globuline (HIgG) en menselijk fibrinogeen (HFb) uit plasma aan polystyreen-latex beschreven als functie van de tijd. De adsorptie is bestudeerd met behulp van de HPLC/depletie techniek, waarbij de eiwitconcentratie in oplossing bepaald wordt met behulp van UV spectroscopie en een methode waarbij de depletie in combinatie wordt gebruikt met een eiwitconcentratie bepaling door middel van radiale immuno diffusie. Met behulp van deze methoden kan op twee manieren de depletie van eiwit uit plasma worden gevolgd als functie van de tijd.

## VI.2. Materialen en methoden

Vers ingevroren gecitreeerd plasma (fosfaat en dextrose bevattend) is verkregen van de stichting Rode Kruis Bloedbank, Twente-Achterhoek (no. 31). Polystyreen latex (PS-latex) was afkomstig van AKZO Corporate Research, Arnhem (nr. VS 08). Deze latex bevat een vaste stof gehalte van 1,51 gew.% en een deeltjesdiameter van  $326 \pm 14$  nm. De latex was gesuspenseerd in PBS buffer pH 7,35 en bereid zonder emulgator.

De adsorptie van de specifieke eiwitten is bestudeerd door toepassing van de depletietechniek, zoals reeds eerder beschreven (LENSEN 84). 1 ml PS-latex werd hierbij in con-

tact gebracht met 100  $\mu$ l plasma. Na de vereiste adsorptie-tijd werd het mengsel van plasma en latex gedurende 15 minuten gecentrifugeerd (SORVALL 20.000 g). Uit de afname van de specifieke eiwitconcentraties in het plasma ten gevolge van adsorptie aan de latex kan de geadsorbeerde hoeveelheid van de respectievelijke eiwitten worden bepaald. Op deze wijze is de adsorptie van HFb, HIgG en HSA bestudeerd. De adsorptie-experimenten zijn uitgevoerd bij 20°C.

#### *Bepaling van de concentratie eiwit in plasma.*

##### *a. Radiaal immuno diffusie (RID)*

Om de afname van de specifieke eiwitconcentraties te kunnen bepalen is de concentratie HFb, HSA en HIgG in plasma voor en na adsorptie bepaald met behulp van radiaal immuno diffusie (RID). Deze methode is reeds in 1965 beschreven door G. MANCINI, A.O. CARBONARA en J.F. HEREMANS. Voor de radiaal immuno diffusie van HFb, HSA en HIgG in plasma is gebruik gemaakt van Nor-Partigeen immuno-diffusieplaten afkomstig van Behringwerke A.G., Marburg W. Germany.

De methode verloopt als volgt: 5  $\mu$ l plasma wordt opgebracht in een agarose medium dat een antiserum bevat, specifiek voor het te onderzoeken eiwit. Het plasma zal radiaal diffunderen door het agarose medium, waardoor precipitatie ontstaat ten gevolge van de koppeling tussen het plasmaeiwit dat als antigeen te beschouwen is en het antilichaam aanwezig in de agarose. De diameter van de ontstane precipitaatring is logaritmisch gerelateerd aan de eiwitconcentratie in het plasma. Op deze wijze zijn de concentraties van HSA, HFb en HIgG in plasma bepaald. De concentratiebepalingen zijn in drievoud uitgevoerd en duurden afhankelijk van het te bepalen eiwit 4 tot 80 uur. Voor het gebruikte plasma waren de beginconcentraties van HFb, HIgG en HSA respectievelijk  $3,7 \pm 0,2 \text{ gl}^{-1}$ ,  $10,1 \pm 0,4 \text{ gl}^{-1}$  en  $35 \pm 1,0 \text{ gl}^{-1}$ .

## b. UV spectroscopie

De afname in de concentratie HFb, HSA en HIgG in plasma is eveneens gevolgd met behulp van UV spectroscopie (LC-75 detector bij 280 nm) door toepassing van een HPLC kolom, zoals reeds eerder beschreven (LENSEN 1984). Het piekoppervlak van de specifieke pieken in het HPLC chromatogram is een maat voor de concentratie eiwit in het plasma. De gebruikte HPLC kolom was een TOYO SODA 3000 SW kolom, afkomstig van VARIAN.

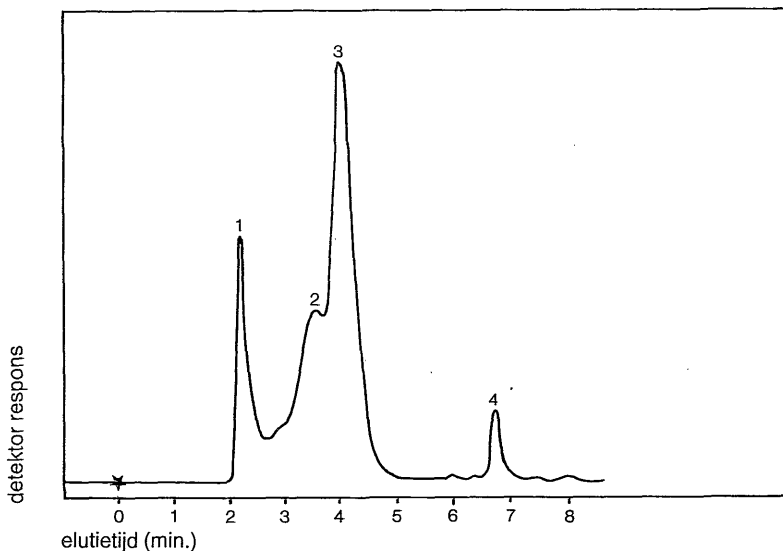
Zoals bekend bevat menselijk plasma meer eiwitten dan alleen HFb, HIgG en HSA. Deze eiwitten absorberen eveneens in het UV gebied en leveren dus een bijdrage aan het HPLC chromatogram van plasma. Aangenomen wordt dat de extinctiebijdrage van deze eiwitten in vergelijking met de bijdrage van HFb, HIgG en HSA te verwaarlozen is.

## VI.3. Resultaten

Het HPLC chromatogram van gecitreerd plasma is gegeven in Figuur 1. Vier duidelijke pieken zijn zichtbaar: HFb (piek 1), HIgG (piek 2) en HSA (piek 3). Ook is een merkbare hoeveelheid laagmoleculair materiaal aanwezig (piek 4). Uit Figuur 1 blijkt dat HIgG en HSA niet volledig te scheiden zijn. Dit maakt de berekening van de adsorptiewaarden voor HSA en HIgG gecompliceerd, tenminste wanneer zowel HSA als HIgG adsorberen. In de praktijk blijkt, uitgaande van de HPLC chromatogrammen, dat HSA niet detecteerbaar adsorbeert (Figuur 2). Waardoor bij voldoende HIgG aanbod, de HIgG adsorptie eenvoudig kwantitatief te bepalen is (zie Hoofdstuk IV).

Ook de radiaal immuno diffusie methode kent zijn beperkingen. Zo kunnen HFb concentraties lager dan  $0,3 \text{ g l}^{-1}$  in verdund plasma niet meer worden gedetecteerd.

Algemeen geldt voor depletie metingen dat de meest nauwkeurige adsorptiewaarden verkregen worden bij een depletie van ongeveer 50%. Bij zelfgemaakte eiwitmengsels kan de verhouding tussen de concentratie van de ver-



Figuur 1. HPLC chromatogram van plasma (gecitreerd), waarin HFb (piek 1), HIgG (piek 2), HSA (piek 3) en laag moleculair materiaal (piek 4) voorkomen. De elutiebuffer is PBS pH 7,35.

schillende eiwitten enerzijds en het latex oppervlak anderzijds zodanig gekozen worden, dat aan deze voorwaarde voldaan kan worden. In plasma is de verhouding tussen de verschillende eiwitconcentraties vooraf vastgelegd.

Ondanks bovenstaande beperkingen en voorwaarden is het toch mogelijk de adsorptie van HFb, HIgG en HSA uit plasma te bepalen als functie van de tijd (TABEL VI.1). In deze Tabel zijn de adsorptiewaarden gegeven voor HFb, HSA en HIgG, berekend op grond van de concentratievermindering in plasma door adsorptie aan PS-latex bepaald met behulp van UV spectroscopie en radiaal immuno diffusie.

In Figuur 2 is de adsorptie van HSA uit plasma aan PS-latex gegeven als functie van de tijd. De adsorptie is op twee manieren bepaald (UV spectroscopie en RID). Hieruit blijkt dat HSA niet merkbaar adsorbeert. Twee adsorptie-



TABEL VI.1

De adsorptie van HSA, HFb en HIgG aan polystyreen latex (2670 cm<sup>2</sup>) uit plasma als functie van de tijd.

Radiaal immuno diffusie bepaling

Ads.tijd (minuten)	conc. in oploss.			geadsorb. fractie			oppervlakte conc.		
	(gl <sup>-1</sup> )						(µg cm <sup>-2</sup> )		
	HFb	HSA	HIgG	HFb	HSA	HIgG	HFb	HSA	HIgG
0	0,34	3,2	0,92	-	-	-	0,00	0,00	0,00
1	-	3,3	0,55	-	0,00	0,40	-	0,00	0,15
5	-	3,3	0,67	-	0,00	0,27	-	0,00	0,10
15	-	3,5	0,64	-	0,00	0,30	-	0,00	0,11
30	-	3,0	0,64	-	0,06	0,30	-	0,08	0,11
60	-	1,3	0,12	-	0,59	0,86	-	0,77	0,33
180	-	1,6	0,14	-	0,50	0,84	-	0,66	0,32

\* De HFb conc. in oplossing is niet bepaalbaar na adsorptie.

HPLC/UV bepaling

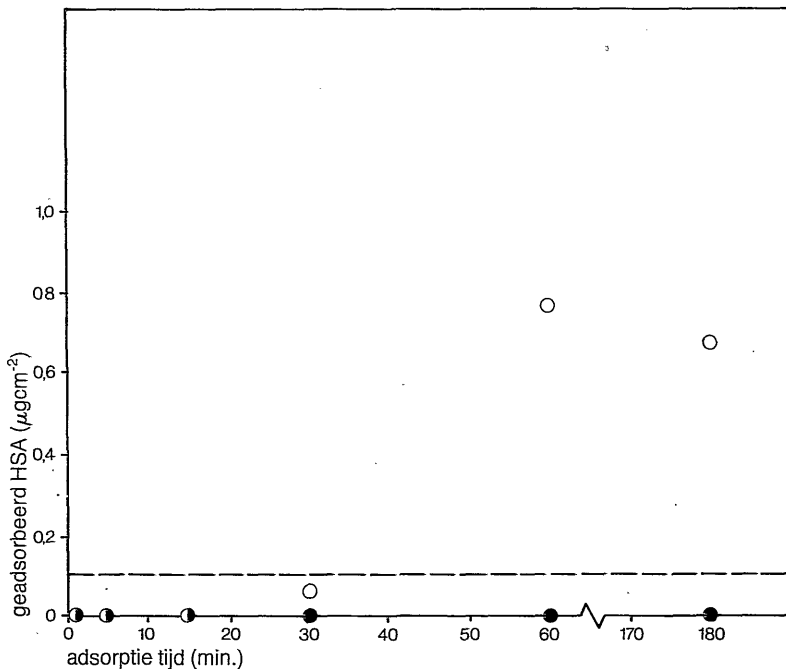
Ads.tijd (minuten)	conc. in oploss.			geadsorb. fractie			oppervlakte conc.		
	(gl <sup>-1</sup> )						(µg cm <sup>-2</sup> )		
	HFb	HSA	HIgG	HFb	HSA	HIgG	HFb	HSA	HIgG
0	0,34	3,2	0,92	-	-	-	0,00	0,00	0,00
1	0,23	3,2	0,57	0,33	0,00	0,38	0,05	0,00	0,14
5	0,21	3,4	0,60	0,37	0,00	0,35	0,05	0,00	0,13
15	0,20	3,0	0,62	0,39	0,00	0,33	0,06	0,00	0,12
30	0,19	3,0	0,57	0,43	0,00	0,38	0,06	0,00	0,14
60	0,17	3,4	0,36	0,50	0,00	0,61	0,07	0,00	0,23
180	0,16	3,3	0,32	0,54	0,00	0,65	0,07	0,00	0,25

noot: Het totale volume bedroeg 1,1 ml 100 µl plasma en 1 ml PS-latex. Bij de HPLC/UV bepalingen is de beginconcentratie bepaald met behulp van RID.

waarden in deze figuur wijken sterk af. De HSA oppervlakteconcentraties bepaald met RID na 1 uur en 3 uur adsorptie ( $0,7 \mu\text{gcm}^{-2}$ ) komen overeen met een zevenvoudige plateauwaarde ( $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$ ) verkregen bij zuiver HSA na adsorptie aan PS-latex.

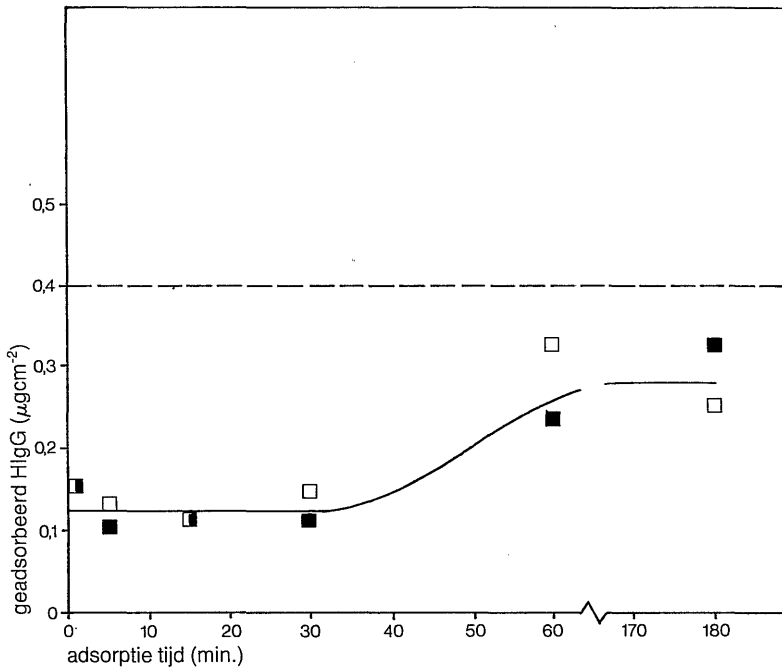
De HIgG adsorptiewaarden, bepaald met UV en RID, zijn goed in overeenstemming met elkaar (Figuur 3). De HIgG oppervlakteconcentratie varieert van  $0,12 \mu\text{gcm}^{-2}$  (na 1 minuut) tot  $0,28 \mu\text{gcm}^{-2}$  (na 1 uur).

Doordat de detectiegrens van de HFb concentratie in plasma  $0,3 \text{gl}^{-1}$  bedraagt en de HFb concentratie na adsorptie

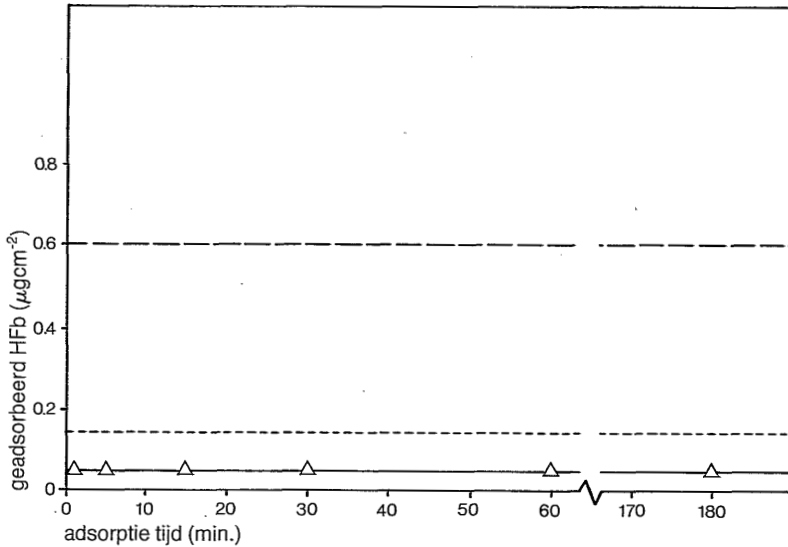


Figuur 2. De adsorptie van HSA aan PS-latex uit verdund plasma als functie van de tijd. In de grafiek is de HSA plateauwaarde (voor zuiver HSA) eveneens aangegeven (- - -). De adsorptiewaarden zijn bepaald met behulp van UV (●) en RID (○).

lager was dan  $0,3 \text{ gl}^{-1}$ , kon met behulp van RID de HFb adsorptie niet worden bepaald. De HFb adsorptie, bepaald met UV, is gegeven in Figuur 4. De oppervlakteconcentratie van HFb neemt langzaam toe tot  $0,07 \mu\text{g cm}^{-2}$  na 3 uur. Ook blijkt uit de afname van piek 4 na adsorptie laagmoleculair materiaal te adsorberen aan PS-latex. Onbekend is hoeveel en wat voor materiaal.



Figuur 3. De adsorptie van HIgG aan PS-latex als functie van de tijd uit verdund plasma. De HIgG plateauwaarde is eveneens aangegeven (- - ). De adsorptiewaarden zijn bepaald met behulp van UV (■) en RID (□).



Figuur 4. De adsorptie van HFb uit plasma (11 x verdund) bepaald met UV spectroscopie aan PS-latex als functie van de tijd. In de grafiek is aangegeven de HFb plateauwaarde (---) en de onder de gegeven omstandigheden maximaal mogelijke oppervlakteconcentratie (.....).

#### VI.4. Discussie

De concentratie HSA, HFb en HIgG kan van plasma tot plasma sterk variëren. Dit betekent dan ook dat de verkregen adsorptiewaarden sterk afhankelijk zijn van het gebruikte plasma.

Het is opvallend te noemen dat HSA in het geheel niet adsorbeert aan PS-latex vanuit plasma, terwijl HSA in zeer hoge concentraties voorkomt in plasma. Dit betekent dat de geadsorbeerde eiwitlaag in samenstelling geen afspiegeling is van de verhoudingen tussen de eiwitten, zoals ze in plasma voorkomen. Kennelijk spelen specifieke eiwit-oppervlakte interacties een bepalende rol in het adsorptieproces.

Toch, zo blijkt uit de snelheidscurve van Figuur 2, wordt voor HSA na 1 uur adsorptie een zeer hoge oppervlakte concentratie berekend, wanneer de HSA concentratie bepaald wordt met radiaal immuno diffusie. Deze methode is gebaseerd op de immunologische activiteit van het HSA en er wordt impliciet aangenomen dat deze immunologische activiteit tijdens het adsorptieproces niet wordt beïnvloed. Dit lijkt echter wel het geval. Op grond van de concentratie bepaling van HSA met UV spectroscopie na 1 uur kan geconcludeerd worden dat ook na 1 uur er geen sprake is van een concentratieafname van HSA in plasma en dat er dientengevolge geen HSA adsorptie optreedt in de mate zoals gesuggereerd uit de RID metingen. De met behulp van RID bepaalde hoge HSA adsorptiewaarden zijn een gevolg van het teruglopen in immunologische activiteit van HSA ten gevolge van het langdurig contact tussen HSA in plasma en de PS-latex. Deze terugloop in immunologische activiteit wordt niet waargenomen bij controle experimenten, waarbij HSA niet in contact is geweest met PS-latex. Ook KOCHWA vindt voor HIgG adsorptie aan hydrofobe materialen een afname in immunologische activiteit van HIgG (KOCHWA 1967). Dit kan duiden op structuurveranderingen in het HIgG molecule ten gevolge van adsorptie/desorptie. Voor HFb zijn de structuurveranderingen ten gevolge van adsorptie aangetoond met circulair dichroïsme spectroscopie (CHAN, 1980) aan glas. Vreemd is echter, dat in geval van HSA in contact met PS-latex in het geheel geen adsorptie waargenomen is. De mogelijkheid blijft aanwezig, dat HSA kortstondig geadsorbeerd is aan PS-latex en dat HSA vervolgens door andere moleculen verdrongen wordt van het oppervlak.

Hoewel ook bij HIgG voor de concentratie in plasma na 1 uur adsorptie lagere waarden worden bepaald met radiaal immuno diffusie, is op grond van deze experimenten niet vast te stellen of deze vermindering veroorzaakt wordt door het teruglopen van de immunologische activiteit van HIgG. Het blijkt dat ook met behulp van UV spectroscopie een verlaging

van de HIGG concentratie wordt waargenomen na 1 uur. De HIGG adsorptie lijkt te veranderen. De oppervlakte concentratie neemt toe van  $0,1 \mu\text{g cm}^{-2}$  tot  $0,3 \mu\text{gcm}^{-2}$ . De HIGG plateauwaarde behorend bij de adsorptie van zuiver HIGG bedraagt  $0,41 \mu\text{g cm}^{-2}$ .

Op basis van de resultaten met modelsystemen bestaande uit HFb, HIGG en HSA zou HFb sterk preferentieel moeten adsorberen. Dit is echter voor plasma niet het geval. De HFb adsorptie bedraagt slechts  $0,07 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Er zijn een aantal redenen waarom de preferentiële adsorptie van HFb zich niet zo duidelijk manifesteert.

In de eerste plaats zijn de adsorptie condities van dien aard dat wanneer alle oorspronkelijk in plasma aanwezige HFb zou adsorberen, de oppervlakteconcentratie nog maar  $0,15 \mu\text{g cm}^{-2}$  zou bedragen (stippellijn in Figuur 4).

In de tweede plaats geldt dat de HFb adsorptie alleen bepaald is met behulp van HPLC/UV en zoals reeds eerder gesteld is het zeer goed mogelijk dat de HFb piek (piek 1 in Figuur 1) van het HPLC chromatogram ook nog andere hoogmoleculaire componenten bevat, waardoor het onmogelijk is een juiste HFb oppervlakteconcentratie te bepalen.

Ook BRASH, VROMAN en BREEMHAAR vinden een lagere waarde van de HFb adsorptie uit plasma in vergelijking met modelsystemen. Zij verklaren dit door verdringing van HFb door hoogmoleculaire componenten, zoals HDL en kininogeen. Deze verklaring is wel plausibel voor adsorptie aan kleine oppervlakken, maar voor latexoppervlakken is dit minder waarschijnlijk.

Dit is het best te illustreren met een rekenvoorbeeld. Stel dat de oppervlakteconcentratie van een hoogmoleculaire component, b.v. kininogeen,  $1 \mu\text{g cm}^{-2}$  is bij volledige bedekking van het oppervlak en dat kininogeen sterk preferentieel adsorbeert. Dan is uitgaande van 2 ml eiwitoplossing een concentratie van  $0,001 - 0,005 \text{gl}^{-1}$  al voldoende om fibrinogeen van het oppervlak te verdringen, wanneer het oppervlak  $2 \text{cm}^2$  is. Uitgaande van een latex oppervlak van

2000 cm<sup>2</sup> is uitgaande van 2 ml eiwitoplossing een kininogeenconcentratie van 1 tot 5 gl<sup>-1</sup> noodzakelijk. De kininogeenconcentratie in plasma bedraagt echter slechts 0,06 gl<sup>-1</sup> (SWICK 1980). Dit betekent, dat kininogeen in dit soort experimenten waar PS-latex wordt gebruikt nooit in staat is fibrinogeen van het oppervlak te verdringen.

### Conclusie

In dit hoofdstuk is de concurrerende adsorptie van eiwitten uit plasma aan PS-latex beschreven. De adsorptie van HSA blijkt in aanwezigheid van de andere eiwitten verwaarloosbaar te zijn. Toch is het meest opvallende resultaat het teruglopen in de immunologische activiteit van HSA na 1 uur contact met PS-latex. Dit gegeven kan gevolgen hebben voor het gebruik van immuno assays, een standaard methode die veelvuldig wordt toegepast in klinisch chemische laboratoria om eiwitten in plasma te detecteren. Men neemt bij gebruik van deze methode aan dat de immunologische activiteit van eiwitten door adsorptie niet wordt beïnvloed. Voor wat betreft de concurrerende adsorptie van eiwitten uit plasma aan PS-latex kan gesteld worden dat zowel HlgG als HFb adsorberen uit plasma, maar dat HSA, dat in de hoogste concentratie in plasma voorkomt, niet of slechts in zeer geringe mate adsorbeert.

REFERENTIES

- BRASH, J.L., DAVIDSON, V.J., *Thromb. Res.* 9, 2498, (1976).
- BREEMHAAR, W., ELLENS, D.J., BEUGELING, T., BANTJES, A.,  
*Proc. Eur. Soc. Artif. Organs* 295 (1982).
- CHAN, B.M.C. en BRASH, I.L., *J. colloid Interface Sci.* 84,  
263 (1981).
- HORBETT, T.A., HOFFMAN, A.S., *CLS Adv. Chem. Ser.* 145, 230  
(1975).
- IHLENFELD, J.V., COOPER, S.L. *J. Biomed. Mat. Res.* 13, 577  
(1979).
- KOCHWA, S., BROWNELL, M., ROSENFELD, R.E. en WASSERMAN,  
L.R., *J. Immunol.* 99, 981 (1967).
- LEE, R.G., ADAMSON, C., KIM, S.W., *Thromb. Res.* 4, 485  
(1974).
- LENSEN, H.G.W., BARGEMAN, D., BERGVELD, P., SMOLDERS, C.A.,  
FEIJEN, J., *J. Colloid Interface Sci.* 99, 1 (1984).
- MANCINI, G., CARBONARA, A.O., en HEREMANS, J.F., *Immunochem.*  
2, 235 (1965).
- SCHWICK, H.G., HAUPT, H., *Angew. Chem.* 92, 83 (1980).
- UNIYAL, S., BRASH, J.L., *Thromb. Heamostas.* 47, 285 (1982).
- VROMAN, L., ADAMS, A.L., FISCHER, G.C., MUNOZ, P.C., *Blood*  
55, 156 (1980).
- WEATHERSBY, P.K., HORBETT, T.A., HOFFMAN, A.S., *Trans. Am.*  
*Soc. Artif. Intern. Organs*, 22, 242 (1976).



## HOOFDSTUK VII

### TOEPASSING VAN CAPACITEITSSPANNINGSMETINGEN TER BESTUDERING VAN DE ADSORPTIE VAN EIWITTEN EN PEPTIDEN AAN SILICIUM/SILICIUMOXIDE ELECTRODEN

#### VII.1. Inleiding

In dit Hoofdstuk wordt een meettechniek beschreven voor de bestudering van de elektrische eigenschappen van geadsorbeerde polypeptiden en eiwitten. Met deze techniek is het mogelijk de adsorptie van eiwitten en polypeptiden continu te meten als functie van de tijd.

IVARSSON en ARWIN hebben deze techniek reeds eerder toegepast voor de adsorptie van eiwitten aan metalen (ARWIN 1980, IVARSSON 1981). Zo heeft IVARSSON de adsorptie van fibrinogeen en albumine gemeten aan titanium als functie van de tijd door gebruik te maken van twee electrochemische methoden (Galvanipotentialmetingen en electrodecapaciteitsmetingen) in combinatie met ellipsometrie. ARWIN heeft de adsorptie van albumine aan platina gemeten met behulp van capaciteitsmetingen, ook in combinatie met ellipsometrie. In beide gevallen is echter sprake van preliminaire experimenten.

STENBERG heeft eveneens de adsorptie van albumine bestudeerd met behulp van capaciteitsmetingen. Hij heeft echter het metalen substraat vervangen door silicium/siliciumoxide. Gebruikmakend van een  $\text{SiO}_2$  laag met een dikte van 1,6 nm. wordt ten gevolge van albumine adsorptie een capaciteitsverlaging waargenomen van 1,5%. (STENBERG 1979).

Evenals STENBERG hebben ook wij in plaats van een metalen oppervlak gebruik gemaakt van een silicium/siliciumoxide electrode. Dit heeft een aantal voordelen. Door gebruik te maken van het isolerende  $\text{SiO}_2$  als electrodemateriaal kan stroomdoorgang vermeden worden. Bij gebruikmaking van metalen electroden is dit niet zo.  $\text{SiO}_2$  is een isolator en als zodanig beter vergelijkbaar met polymeren (zoals o.a. polystyreen). Bovendien is het  $\text{SiO}_2$  oppervlak een goed

gedefinieerd oppervlak bekend uit de chromatografie en de ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) technologie.

Naast de beschrijving van de meettechniek worden in dit hoofdstuk de resultaten gegeven van de adsorptie van het tripeptide S2238 en de eiwitten HFb, HlgG en HSA aan  $\text{SiO}_2$ . Ter vergelijking is eveneens de adsorptie van HSA aan  $\text{SiO}_2$  bepaald als functie van de tijd en concentratie door gebruikmaking van de radiolabelingsmethode.

## VII.2. Methode

### Algemeen.

Door in een wisselstroomschakeling te meten hoe de effectieve capaciteit van de door een metaalelectrode, siliciumoxidelaag en silicium gevormde condensator afhangt van de aangelegde gelijkspanning, kunnen gegevens worden verkregen over de aard van het  $\text{Si}/\text{SiO}_2$  grensvlak, de dotering van het silicium, eventuele lading in het oxide, etc.

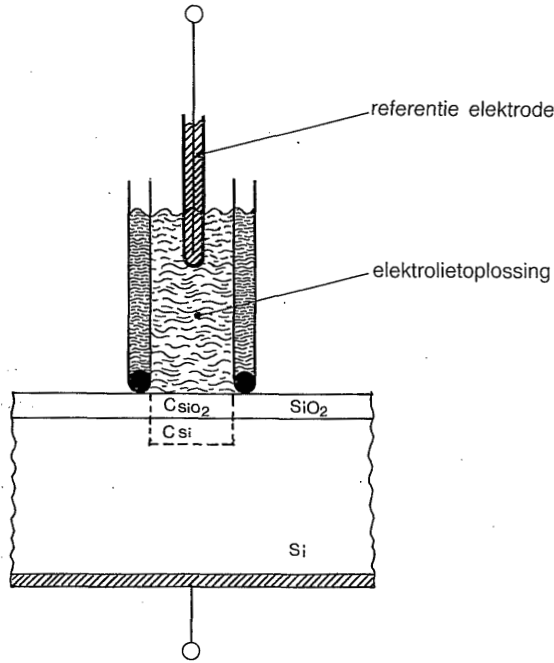
Er zijn veel metingen verricht aan dergelijke MOS (Metal Oxide Semiconductor) structuren, maar ook zijn metingen verricht aan EOS (Electrolyte Oxide Semiconductor) (DE ROOY 1978, BOUSSE 1982), waarbij het metaal vervangen is door een vloeistof plus referentieelectrode (Figuur 1). Bij een EOS systeem, waarvan de ISFET een praktische representant is, kan men nu tevens de eigenschappen van het  $\text{SiO}_2$ /electrolyte grensvlak bestuderen.

De capaciteit  $C$  die men bij een bepaalde frequentie meet, kan beschouwd worden als de resultante van een capaciteit  $C_{\text{SiO}_2}$  over de oxidelaag in serie met een capaciteit  $C_{\text{Si}}$ ,<sup>2</sup> die verband houdt met de ruimteladingswolk in het silicium.

$$C^{-1} = C_{\text{SiO}_2}^{-1} + C_{\text{Si}}^{-1}$$

Als  $C_{\text{SiO}_2} \gg C_{\text{Si}}$  is, wordt  $C \approx C_{\text{Si}}$ . Is  $C_{\text{Si}} \gg C_{\text{SiO}_2}$  dan is  $C \approx C_{\text{SiO}_2}$ .

In deze vergelijkingen is  $C_{SiO_2}$  een constante, maar  $C_{Si}$  hangt af van de dikte van de depletie laag, die een functie is van de aangelegde gelijkspanning en van de doperingsconcentratie van het silicium.

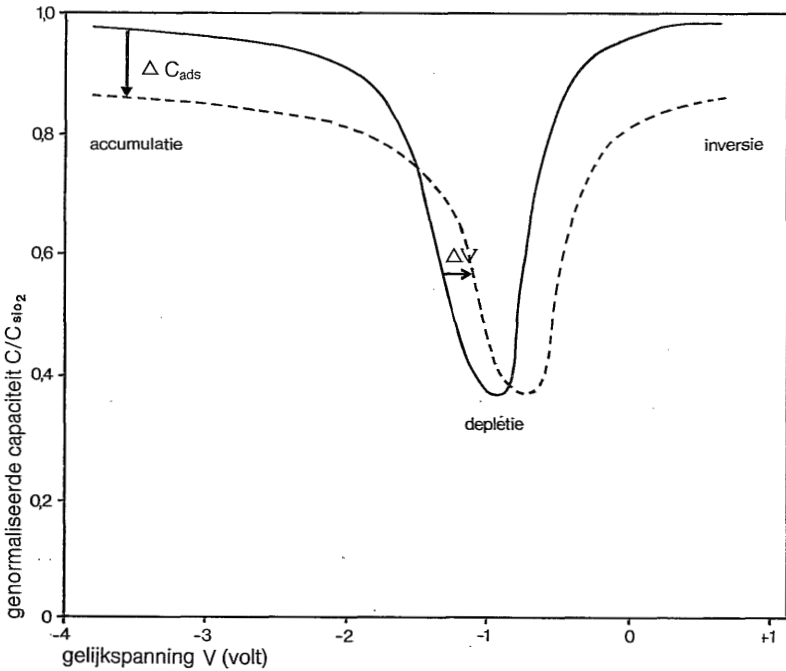


Figuur 1 Meetopstelling referentieelectrode/electroliet/ $SiO_2/Si$  (EOS). De aan de klemmen gemeten capaciteit is die van de serieschakeling van  $C_{SiO_2}$  en  $C_{Si}$ . De grootte van  $C_{Si}$  is afhankelijk van de aangelegde gelijkspanning.

Het verband tussen capaciteit  $C$  en de aangelegde gelijkspanning  $V$  voor een MOS of EOS configuratie bij lage frequentie (minder dan 100 Hz) is gegeven in Figuur 2. Een curve als in Figuur 2 wordt capaciteitsspannings (CV) curve genoemd. Men onderscheidt de gebieden accumulatie, depletie en inversie, welke respectievelijk te maken hebben met op-

hoping van meerderheidsladingsdragers, verarming daarvan en ophoping van minderheidsladingsdragers aan het grensvlak Si/SiO<sub>2</sub>.

Ten gevolge van adsorptie aan het SiO<sub>2</sub>/vloeistof grensvlak kan de capaciteit C worden verlaagd, doordat een extra capaciteit wordt geïntroduceerd in serie met C<sub>SiO<sub>2</sub></sub> en C<sub>Si</sub>. Dit effect zal het sterkst optreden in het accumulatie of inversie gebied. Deze capaciteitsverlaging wordt in figuur 2 aangeduid als  $\Delta C_{ads}$ .



Figuur 2 Het verloop van de capaciteit (C) van een EOS condensator met de aangelegde gelijkspanning. De EOS condensator heeft een capaciteit  $C_{SiO_2}$ , wanneer het silicium vlak onder het oxide goed geleidend is. Dit is het geval in accumulatie en in inversie.

De stippelijne geeft een mogelijke CV curve weer na adsorptie.  $\Delta C_{ads}$  en  $\Delta V$  worden nader uitgelegd in de tekst.

STENBERG heeft een duidelijke capaciteitsverlaging in het accumulatiegebied gemeten tengevolge van peptideadsorptie aan  $\text{SiO}_2$ .

Door adsorptie aan het  $\text{SiO}_2$ /vloeistof grensvlak kan ook de oppervlakte potentiaal ( $\Psi_0$ ) aan het electroliet/isolator grensvlak veranderen. Dit is merkbaar in de vorm van een horizontale verschuiving in de CV curve. Deze verschuiving is in Figuur 2 aangeduid met  $\Delta V$ .

BOUSSE heeft de relatie tussen oppervlaktepotentiaal en  $\Delta V$  bepaald als functie van de pH van de elektrolietoplossing (BOUSSE 1980).

JANATA heeft ten gevolge van albumine adsorptie drain-stroomveranderingen gemeten bij een ISFET, die eveneens wijzen op veranderingen in de oppervlakte potentiaal ten gevolge van de adsorptie.

Via CV metingen kunnen in principe dus twee effecten worden gemeten:

- A. Een verandering in capaciteit resulterend in een  $\Delta C_{\text{ads}}$ .
- B. Een verandering in oppervlaktepotentiaal resulterend in een  $\Delta V$ .

### VII.3. Experimenteel

#### materialen:

Voor de adsorptieexperimenten is gebruik gemaakt van gezuiverd HSA (lotnr. A9511 van SIGMA), HFb (KABI) en HIGG (Centraal laboratorium van de Bloedtransfusiedienst). De zuivering en karakterisering van deze eiwitten is beschreven in Hoofdstuk II.

Het peptide S2238 was afkomstig van KABI, Stockholm. S2238 staat voor H-D-phenylalanyl-L-pipecolyl-L-arginine-p nitroanilide dihydrochloride ( $M=625,6$ ). Het preparaat wordt gewoonlijk gebruikt voor de bepaling van protrombine en antitrombine in activiteit in plasma. In dit geval is S2238 gebruikt voor controlemetingen, waarbij S2238 geadsorbeerd werd aan  $\text{SiO}_2$ .

## methode

De methode is gebaseerd op het meten van CV curven aan een referentieelectrode/electrodeoplossing/SiO<sub>2</sub>/Si opstelling (Figuur 1) voor en tijdens adsorptie van eiwit of peptide vanuit de electrolietoplossing (PBS) aan het SiO<sub>2</sub> oppervlak. Het gebruikte silicium (halfgeleider) was van het n type (110) en had een specifieke weerstand van 10 ohm cm. De laagdikte van het thermisch oxide (SiO<sub>2</sub>) varieerde van 7,5 nm tot 60 nm afhankelijk van het monster. Op het SiO<sub>2</sub> oppervlak is een kwartskuvet geplaatst, die aan de onderkant open is en voorzien van een viton O-ring, waardoor de in de cuvet gepipetteerde oplossingen niet weg kunnen lekken (zie Figuur 1). Het contact oppervlak tussen SiO<sub>2</sub> en de electrolietoplossingen is 0,18 cm<sup>2</sup>.

Met behulp van een referentiecapaciteit (751 nF) en een PAR 129A twee fase lock-in versterker is de capaciteit van het systeem continu gemeten als functie van de aangelegde gelijkspanning. De frequentie van de meetspanning was steeds 20 Hz.

Na elke adsorptiemeting zijn de SiO<sub>2</sub> oppervlakken grondig gereinigd met rokend salpeterzuur en gedistilleerd water.

## Radiolabeling

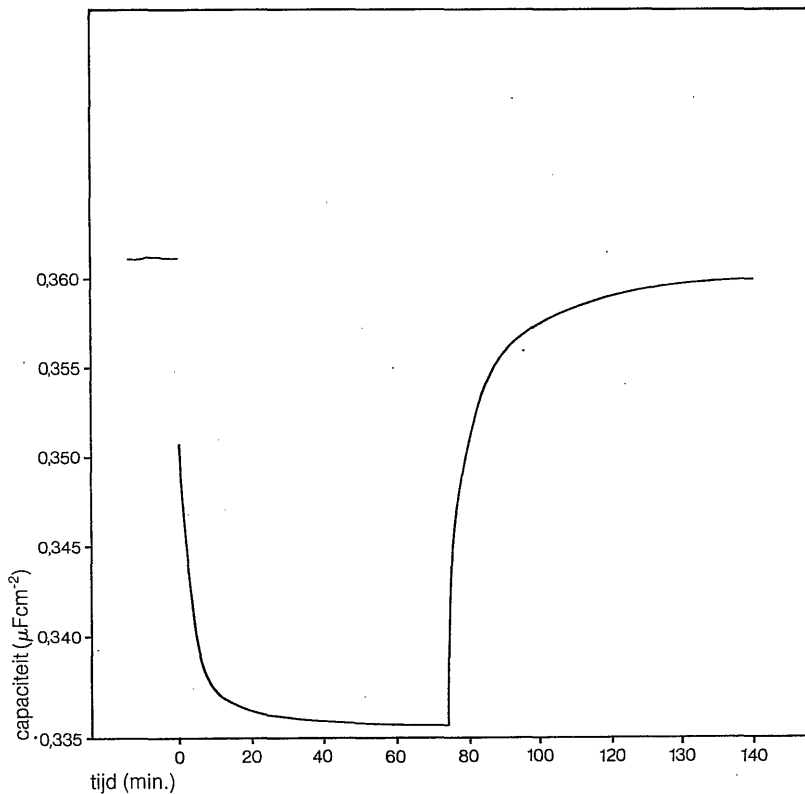
De labelingstechniek is toegepast om de adsorptie van HSA en SiO<sub>2</sub> oppervlakken te bestuderen. HSA is gelabeld met I<sup>125</sup> gebruikmakend van de chlooramine T methode, zoals beschreven in Hoofdstuk II.

## VII.4. Resultaten

Ter contrôle van de meetopstelling en meetmethode is de adsorptie aan SiO<sub>2</sub> als functie van de tijd bestudeerd van het peptide S2238. In Figuur 3 is de capaciteitsverlaging van het systeem weergegeven ten gevolge van S2238 adsorptie evenals de verhoging in capaciteit ten gevolge van desorptie aan SiO<sub>2</sub>. Het silicium bevond zich hierbij in accumulatie door  $V = -4V$  te kiezen. De capaciteitsverlaging is continu

te volgen als functie van de tijd na toevoeging van S2238 aan het electrolyet (PBS). Na 20 minuten stabiliseert de capaciteit zich op een eindwaarde. Het oppervlak is dan waarschijnlijk verzadigd met S2238.

Wanneer vervolgens het oppervlak gespoeld wordt met PBS



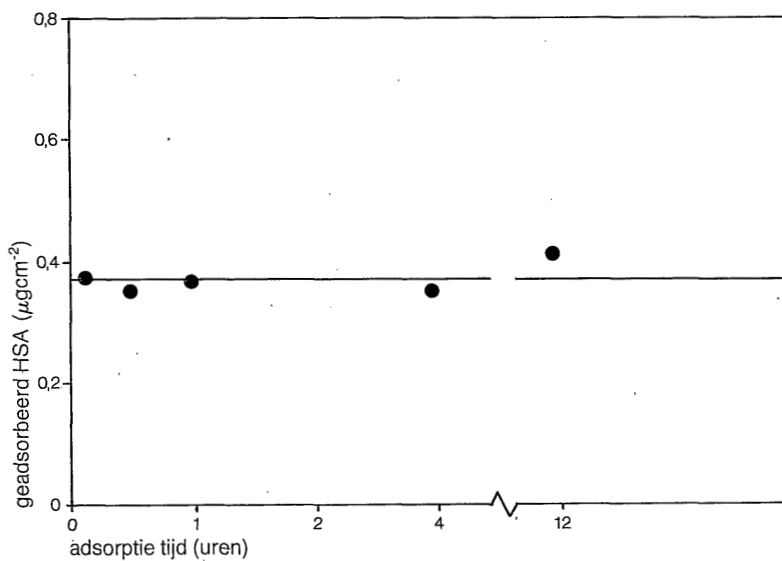
Figuur 3 De capaciteitsverandering van een Si/SiO<sub>2</sub> (8nm)/PBS (0,15 NaCl)/referentie electrode opstelling ten gevolge van adsorptie/desorptie van S2238 aan SiO<sub>2</sub> als functie van de tijd. V = -4V.

buffer, keert de capaciteit weer op de oorspronkelijke waarde terug. Er is hier sprake van vers opgelost S2238 (Figuur 3). Volgens de bijsluiters van KABI treedt, bij niet verse oplossingen S2238, hydrolyse op van het peptide ten gevolge van de aanwezigheid van microorganismen in de oplossing. Dit is ook merkbaar in de capaciteitsmeting. Een niet verse oplossing S2238 veroorzaakt sterk afwijkende resultaten. Er worden geen detecteerbare capaciteitsveranderingen meer gemeten ten gevolge van toevoeging van S2238 aan de PBS oplossing, wanneer de S2238 oplossingen ouder zijn dan 1 week.

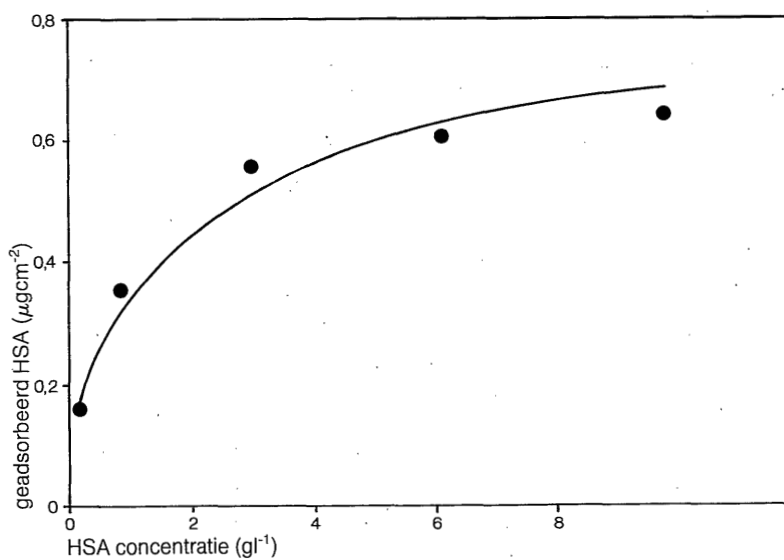
Voor de bepaling van de albumine adsorptie aan  $\text{SiO}_2$  is de labelingsmethode gebruikt, waarbij de adsorptie van HSA aan  $\text{SiO}_2$  bepaald is als functie van de tijd en als functie van de concentratie (Figuren 4 en 5). De HSA oppervlakteconcentratie neemt na 15 minuten niet meer toe. De plateauwaarde voor de HSA adsorptie ( $0,6 \mu\text{gcm}^{-2}$ ) komt overeen met de HSA plateauwaarde voor adsorptie aan polystyreen, die bepaald werd met radiolabeling.

Met behulp van capaciteitsmetingen is getracht de adsorptie van HSA, HFb en HIgG te volgen als functie van de tijd, waarbij de eiwitconcentratie varieerde van  $0,01 \text{ gl}^{-1}$  tot  $10 \text{ gl}^{-1}$ . Dit is interessant t.a.v. de adsorptieverschijnselen gedurende de eerste 15 minuten, die via de labelingsmethode moeilijk geregistreerd kunnen worden. Wanneer de elektrolytoplossing bestaat uit PBS buffer (ionsterkte 0,15 M) blijkt de capaciteit van het referentie electrode/electrolyte/ $\text{SiO}_2/\text{Si}$  systeem door de adsorptie van eiwitten niet detecteerbaar te veranderen. Wel zijn ten gevolge van HSA, HFb en HIgG adsorptie horizontale verschuivingen in de CV curve waargenomen, die duiden op een veranderde oppervlaktepotentiaal aan het  $\text{SiO}_2$ /vloeistof grensvlak. De pH werd tijdens de meting niet veranderd (pH = 7,35).





Figuur 4 De snelheidscurve van HSA adsorptie aan  $\text{SiO}_2$ , bepaald met behulp van radiolabeling. De HSA concentratie is  $1\text{gl}^{-1}$



Figuur 5 De adsorptieisotherm van HSA aan  $\text{SiO}_2$ , bepaald met behulp van radiolabeling.

### VII.5. Discussie

Het meest opvallende resultaat in dit hoofdstuk is dat de adsorptie van HSA, HFb en HIgG geen capaciteitsverlaging ten gevolge van het referentie electrode/electrolyet/SiO<sub>2</sub>/Si systeem heeft.

Een verklaring voor dit resultaat kan gezocht worden in de structuur van de eiwitten. Eiwitten zijn macromoleculen die een primaire, secundaire en tertiaire structuur bezitten. Met name de tertiaire structuur, wanneer deze behouden blijft tijdens de adsorptie van het eiwit, is er de oorzaak van dat kleine ionen vrij door het geadsorbeerde eiwit kunnen diffunderen. De geadsorbeerde eiwitlaag is daardoor te beschouwen als een elektrisch poreuze laag. EIRICH heeft ook reeds gewezen op de aanwezigheid van een vrije doorgang voor watermoleculen en ionen in een laag eiwitmoleculen (EIRICH 1977).

Peptiden zijn veel kleiner dan eiwitten en bezitten geen tertiaire en secundaire structuur. Een geadsorbeerde peptidelaag is dan ook elektrisch gezien veel minder poreus en gedraagt zich daardoor meer als een isolator.

Dit blijkt ook uit de resultaten (Figuur 3) waaruit een duidelijke capaciteitsverlaging waarneembaar is ten gevolge van de peptideadsorptie aan SiO<sub>2</sub>. De resultaten met betrekking tot de eiwitadsorptie en peptideadsorptie aan SiO<sub>2</sub>, gemeten met behulp van capaciteitsmetingen, stemmen grotendeels overeen met de resultaten van STENBERG. Hij vindt echter wel een zeer geringe capaciteitsverlaging ten gevolge van HSA adsorptie (1,5%), waarschijnlijk ten gevolge van een grotere gevoeligheid van de meetopstelling (een dunnere SiO<sub>2</sub> laag).

Gezien het "irreversibele" karakter van eiwitadsorptie (Hoofdstuk III) en de reversibele adsorptie van S2238 aan SiO<sub>2</sub> mag verondersteld worden, dat de interactie en het contact tussen eiwit en oppervlak groter is dan tussen peptide en oppervlak. De verklaring die STENBERG geeft, dat

ten gevolge van een zeer gering contact tussen geadsorbeerd eiwit en substraat geen sterke capaciteitsverlaging optreedt. In vergelijking met peptideadsorptie is dan ook minder aannemelijk.

In tegenstelling tot capaciteitsmetingen blijkt, dat ten gevolge van HSA, HFb en HIgG adsorptie wel de  $\text{SiO}_2$  oppervlaktepotentiaal verandert. De optredende veranderingen bleken echter niet reproduceerbaar en dermate grillig, dat op grond hiervan op dit moment geen verdere uitspraken mogen worden gedaan.

JANATA ziet op basis van de door hem aan een ISFET gemeten veranderende oppervlaktepotentiaal ten gevolge van albumine adsorptie, mogelijkheden voor de ontwikkeling van een immuno-electrode. Hij vermeldt echter niets over reproduceerbaarheid en nauwkeurigheid van zijn metingen.

### *Conclusie*

T.a.v. de capaciteitsmetingen kan gesteld worden, dat deze voor de bestudering van eiwitadsorptie niet direct geschikt zijn.

Het is echter wel mogelijk met behulp van capaciteitsmetingen de kinetiek van adsorptie en desorptie van laagmoleculair materiaal, zoals peptiden, continu in situ te volgen als functie van de tijd. Ook is het mogelijk om op deze wijze de concurrerende adsorptie van peptiden en eiwitten te bestuderen.

T.a.v. de meting van een verandering in oppervlaktepotentiaal ten gevolge van eiwitadsorptie kan gesteld worden, dat een ISFET meting directer is dan een CV meting en in de toekomst perspectieven kan bieden met betrekking tot de ontwikkeling van een eiwitgevoelige  $\text{Si/SiO}_2$  electrode. De reproduceerbaarheid en eenduidigheid van de met deze electrode verkregen respons dienen echter wel beter te zijn, dan de in dit hoofdstuk vermelde resultaten.

REFERENTIES

ARWIN, H., Thesis (1980).

BOUSSE, L., Proefschrift "The chemical sensitivity of electrolyte/insulator silicon structures" (1982).

DE ROOIJ, N.F., Proefschrift "The ISFET in Electrochemistry" (1978).

EIRICH, J., J. Colloid Interface Sci. 58, 423 (1977).

IVARSSON, B., JÖNSSON, U., LUNDSTRÖM, I., and Mc QUEEN, D.,  
Collection of papers from the lab. of Applied Physics,  
Linköping Institute of Technology L APPH 81-1 (1981).

JANATA, B., J. Am. Chem. Soc 97, 2914 (1978).

STENBERG, M., ARWIN, H., NILSSON, A., J. Colloid Interface  
Sci. 72, 255 (1979).

## SUMMARY

In this thesis the results of adsorption studies with some plasma proteins (human serum albumin (HSA), fibrinogen (HFb) and human immuno gamma globulin (HIgG)) onto solid/liquid interfaces are described. The aim of these investigations is to obtain more insight in the processes occurring at the surface of polymeric materials in contact with blood.

A review of the literature about protein adsorption at interfaces is presented in Chapter I. It is shown that still many contradictions about protein adsorption like the question of the reversibility of adsorption do exist.

In Chapter II it is shown, that protein dimers and oligomers are presented in non purified solutions. The presence of these products in protein solutions used for adsorption studies may lead to a misinterpretation of the adsorption data. This Chapter also describes that the adsorption behaviour of radiolabeled proteins onto a polystyrene latex differs from that of the non-labeled ones. Isotherms for the adsorption of HSA, HIgG and HFb onto a polystyrene latex are determined by measuring the depletion of protein in the solution. This has either been followed by radioactivity measurements or by UV spectroscopy. Different adsorption isotherms for the same protein were obtained when either radioactivity or UV spectroscopy was used as a detection technique.

The adsorption of proteins onto polystyrene latex seems to be irreversible (no spontaneous desorption has been observed once the protein has been adsorbed). However, it also appears that exchange of proteins at the surface with these in solution is possible. Based on this information one is inclined to infer that protein adsorption is reversible as long as exchange of protein molecules is considered.

A description of the adsorption/desorption process of proteins at the polystyrene surface has been given in Chapter III.

This description included the assumption of a structural change of protein as a result of the adsorption at the solid/liquid interface.

In order to obtain reliable results from competitive protein adsorption experiments, a method based on the use of High Performance Liquid Chromatography was developed as an alternative of the radiolabeling method. This method is described in Chapter IV. Competitive adsorption studies with HSA, HFb and HIgG onto PS-latex show that a strong preferential adsorption of HFb takes place. When adsorption studies were carried out with solutions containing HSA monomer and dimer, a preferential adsorption of HSA dimer was observed.

The adsorption of HSA onto polystyrene and poly(vinyl chloride) measured by radiolabeling and an Enzyme Immuno Assay (EIA) has been described in Chapter V. This comparative study was done in order to quantify the EIA method. It is shown that HSA surface concentrations of more than  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$  can not be quantified by EIA.

The adsorption of proteins at solid/plasma interfaces has been described in Chapter VI. No HSA adsorption from plasma onto PS-latex was found. However the larger HFb and HIgG molecules do adsorb onto PS-latex.

In Chapter VII Capacity-Voltage (CV) measurements are used for adsorption studies. The adsorption of HSA, HIgG and HFb onto  $\text{SiO}_2$  is not measurable as yet because of the high capacity of the proteins as compared with the  $\text{SiO}_2$  capacity (proteins are electrically "porous"). The adsorption and desorption kinetics of peptides however could be followed in this way. It is shown from results that the adsorption of peptides onto  $\text{SiO}_2$  is a reversible process.

## SAMENVATTING

In dit proefschrift worden de resultaten van een studie naar de adsorptie van enkele plasma eiwitten (menselijk albumine (HSA), fibrinogeen (HFb) en gamma globuline (HIgG)) aan vast/vloeistof grensvlakken beschreven. Het doel van het onderzoek is om meer inzicht te verkrijgen in de processen die zich afspelen aan het grensvlak van polymere materialen en bloed.

Uit een literatuur overzicht in Hoofdstuk I wordt duidelijk dat er met betrekking tot de adsorptie van eiwitten aan grensvlakken nog veel tegenstrijdige opvattingen bestaan. Vooral het al of niet reversibele karakter van eiwitadsorptie is een onderwerp waarover nog geen eensluidende mening is gevormd.

In Hoofdstuk II wordt met behulp van verschillende karakteriseringsmethoden aangetoond, dat oplossingen van eiwitten die niet gezuiverd zijn, dimeren en oligomeren bevatten. De aanwezigheid van deze dimeren en oligomeren in de eiwitoplossing kan de adsorptieresultaten aanzienlijk beïnvloeden. Ook wordt in dit Hoofdstuk melding gemaakt van het afwijkend adsorptiegedrag van gelabelde eiwitten in vergelijking met ongelabelde eiwitten. De isothermen HSA, HIgG en HFb aan polystyreen-latex werden bepaald door meting van de afname van de eiwitconcentratie in de oplossing. Deze afname werd zowel met behulp van radioactiviteitsmetingen als met UV spectroscopie gemeten. Er werden verschillende isothermen verkregen voor de adsorptie van hetzelfde eiwit aan polystyreen-latices indien gebruik gemaakt werd van radioactiviteitsmetingen of van UV spectroscopie als detectie-techniek.

De adsorptie van de eiwitten aan polystyreen oppervlakken lijkt irreversibel (eenmaal geadsorbeerde eiwitmoleculen desorberen niet meer spontaan). Uitwisseling blijkt wél mogelijk. Op grond van dit gegeven wordt geconcludeerd dat de adsorptie toch reversibel is, wanneer men naar uitwisseling van eiwitmoleculen kijkt.

In Hoofdstuk III wordt, rekening houdend met de beperkingen van de radiolabelingsmethode, een beschrijving gegeven van het adsorptie/desorptie proces van eiwitten aan polystyreen. Er wordt hierbij een structuurverandering van het eiwit ten gevolge van adsorptie aangenomen.

Ter verkrijging van betrouwbare resultaten uit concurrerende eiwitadsorptie experimenten is een methode ontwikkeld waarbij gebruikt gemaakt wordt van High Performance Liquid Chromatografie. Dit als alternatief voor de labelingsmethode. De HPLC methode wordt beschreven in Hoofdstuk IV. In dit hoofdstuk worden tevens de resultaten gegeven van de concurrerende adsorptie van HSA, HIgG en HFb aan PS-latex. Er wordt een sterke preferentiële adsorptie van HFb waargenomen. Wanneer adsorptiestudies worden verricht met oplossingen waarin HSA monomeer en dimeer aanwezig zijn, adsorbeert HSA dimeer preferentieel.

In Hoofdstuk V wordt de adsorptie van HSA aan polystyreen en poly(vinylchloride) beschreven. De metingen werden uitgevoerd met behulp van radiolabeling en met behulp van een Enzym Immuno Assay (EIA). De EIA methode zou op deze wijze in principe te kwantificeren zijn. Het bleek echter dat HSA oppervlakte concentraties van meer dan  $0,1 \mu\text{gcm}^{-2}$  niet te kwantificeren zijn met behulp van EIA.

De adsorptie van eiwitten aan PS-latex vanuit plasma wordt beschreven in Hoofdstuk VI. Er werd geen HSA adsorptie aan PS-latex vanuit plasma waargenomen. De grotere HFb en HIgG moleculen adsorberen echter wel aan PS-latex.

In Hoofdstuk VII zijn de Capaciteits-Spannings (CV) metingen voor adsorptiestudies beschreven. De adsorptie van HSA, HIgG en HFb aan  $\text{SiO}_2$  is vooralsnog niet meetbaar vanwege de hoge capaciteit van de eiwitten in vergelijking met die van het  $\text{SiO}_2$  (eiwitten zijn elektrisch "poreus"). Wel is de adsorptie en desorptie van peptiden op deze wijze gevolgd als functie van de tijd. Uit de resultaten blijkt dat de adsorptie van peptiden aan  $\text{SiO}_2$  een reversibel proces is.



## CURRICULUM VITAE

Henny Lensen werd in 1952 geboren te 's-Hertogenbosch. Hij bezocht daar het St. Janslyceum (Eindexamen HBS-B 1971). In 1971 begon hij zijn scheikundestudie aan de Katholieke Universiteit Nijmegen, alwaar hij in 1975 het kandidaats-examen (met als bijvakken wiskunde, natuurkunde en biologie) en in 1979 het doctoraalexamen aflegde.

Het doctoraal gedeelte bestond uit een hoofdvak Biofysische chemie onder leiding van Prof. Dr. G.A.J. van Os en een tweede hoofdvak Vaste stof chemie onder leiding van Prof. Dr. J. Bloem. In het kader van Vaste stof chemie werd een student assistentschap bekleed, gefinancierd door de Commissie van Europese Gemeenschappen. Voorts heeft hij enige jaren schei- en natuurkundelessen verzorgd aan twee opleidingen voor verpleegkundigen.

In 1979 werd hij wetenschappelijk assistent aan de Technische Hogeschool Twente. Vanaf 1979 werd het in dit proefschrift beschreven promotieonderzoek uitgevoerd aan de afdelingen Chemische Technologie en Elektrotechniek van de THT en het ziekenhuis "De Stadmaten" te Enschede.





