

UNELE CAZURI DE ANOMALII FIZICO-CHIMICE ÎN SOLUȚIILE APOASE ALE MACROMOLECULELOR HIDROFILE.

I. Anomaliile de difuzie a roșului de Congo în soluțiile de Macrodex (M), Rheomacrodex (R), Haemacel (H) și plasma sanguină (P)

I. Papp, dr. Șt. Csögör, E. Bachner

Soluțiile apoase macromoleculare fiind mai viscoase decât apa, ar fi de așteptat ca difuzia substanțelor din această fază să se facă mai lent (13, 15, 16, 17).

În 1966 Șt. Csögör a semnalat că, roșul de Congo difuzează mai rapid dintr-o fază apoasă conținând 10 % plasmă sanguină, față de un lichid cu aceeași compoziție, dar fără plasmă. În 1968 P. Ionescu-Stoian și colab. (10), studiind interacțiunea unor medicamente cu macromolecule prin metoda vitezei de dializă (1), au constatat că alcoolul polivinilic mărește viteza de dializare a unor substanțe.

Aceste fenomene contrazic într-o oarecare măsură teoria clasică asupra difuziei, fapt care ne-a determinat să întreprindem o serie de experiențe pentru elucidarea cauzei anomaliilor observate.

În lucrarea de față am cuprins o parte din rezultatele obținute în cercetarea difuziei roșului de Congo în mediu macromolecular.

Material și metodă

Seria A. Soluția de 0,9 % NaCl s-a folosit în calitate de solvent în care s-a dizolvat fie 1 % roșu de Congo (K), fie una din soluțiile de Macrodex (Pharmacia), Rheomacrodex (Pharmacia), Haemacel (Behring) sau plasmă sanguină umană (P) într-o proporție de 10 %.

Compoziția fazelor supuse studiilor de difuzie, în aparatul „Elektrophoreserät 35” Tiselius, la $20,00 \pm 0,01$ °C, este redată în tabelul nr 1.

Tabelul nr. 1
Compoziția fazelor supuse studiilor de difuzie

| | | | | | | | | | |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Nr. probei | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| Faza nr. I. | K | — | K+M | — | K+M | M | K | M | |
| Faza nr. II | — | K | — | K+M | M | K+M | M | K | |
| Nr. probei | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
| Faza nr. I. | K+R | — | K+R | R | K | R | K+H | — | K+H |
| Faza nr. II | — | K+R | R | K+R | R | K | — | K+H | H |
| Nr. probei | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
| Faza nr. I. | H | K | H | K+P | — | K+P | P | K | P |
| Faza nr. II | K+H | H | K | — | K+P | P | K+P | P | K |

O asemenea combinare a gradientelor de concentrație, la diferite experiențe, a permis măsurarea constantei de difuzie a roșului de Congo în următoarele condiții;

1. în mediu creat numai de solvent,
2. la un gradient de concentrație macromolecular de același sens (probele nr 3, 4, 9, 10, 15, 16, 21, 22),
3. la un gradient de concentrație macromolecular de sens contrar (probele nr. 7, 8, 13, 14, 19, 20, 25, 26),
4. în prezența macromoleculor în ambele faze, în aceeași concentrație.

Seria B. Într-o pipetă Westergreen închisă la unul din capete, s-a introdus o soluție de NaCl 5% până la o înălțime de 110 mm (faza nr. I). Peste această soluție s-a stratificat aceeași cantitate dintr-o soluție, folosind ca solvent NaCl 0.9% (faza nr. II). Colorantul și soluțiile macromoleculare au fost utilizate în aceeași concentrații ($C_0=1\%$) ca și la seria A, după o schemă identică cu cea prezentată în tabelul nr. 1. S-a urmărit variația distanțelor (X) parcurse în funcție de timp (t) a zonelor cu aceeași concentrație (C), măsurate pe un segment de 2 mm ($C/C_0=0.05$).

Constanta de difuzie pentru roșul de Congo (D) a fost calculată din forma integrată a ecuației diferențiale

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 C}{\partial X^2}$$

care după transformare Laplace și reducerea numărului de variabile C, t, X, la două (C, y), introducând funcția

$$\frac{X}{2\sqrt{D \cdot t}}$$

dă următoarea funcție:

$$C/C_0 = \frac{1}{2} \cdot [1 - f(y)] = \frac{1}{2} \cdot \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^y e^{-\beta^2} d\beta\right)$$

Soluționarea numerică a acestei integrale,* (care este de fapt similară cu integrala erorilor lui Gauss) este reprodusă în tabelul nr 2, după Saunders (14);

Tabelul nr. 2
Valorile numerice ale funcției erorilor

| y | f(y) | C/C ₀ |
|------------------|-------|------------------|
| 2,330 | 0,999 | 0,0005 |
| 2,030 | 0,996 | 0,002 |
| 1,820 | 0,990 | 0,005 |
| 1,600 | 0,976 | 0,012 |
| 1,4 ⁰ | 0,960 | 0,020 |
| 1,2 ⁰ | 0,920 | 0,040 |
| 1,100 | 0,880 | 0,060 |
| 1,000 | 0,840 | 0,080 |
| 0,910 | 0,800 | 0,100 |
| 0,730 | 0,700 | 0,150 |
| 0,595 | 0,600 | 0,200 |
| 0,477 | 0,500 | 0,250 |
| 0,371 | 0,400 | 0,300 |
| 0,179 | 0,200 | 0,400 |
| 0,000 | 0,000 | 0,500 |

Cunoscând valorile C/C₀, t și X corelate, se poate găsi ușor valoarea corespunzătoare de y, iar constanta de difuzie se calculează apoi cu formula:

$$D = \frac{X^2}{4 \cdot y^2 \cdot t}$$

Rezultate

Constantele de difuzie astfel calculate sînt grupate pentru diferite medii (probe numerotate diferit) din seriile A și B, fiind cuprinse în tabelul nr. 3.

Analizînd cu atenție rezultatele obținute, reies următoarele:

1. Dacă macromoleculele sînt prezente în ambele faze în aceeași concentrație, viteza de difuzie a roșului de Congo practic nu este modificată (probe 5, 6, 11, 12, 17, 18, 23, 24).

* În care β este variabila funcției de eroare.

Tabelul nr 3

Constanta de difuzie a roșului de Congo în medii diferite

| S e r i a „A” | |
|--|-------------------------------------|
| Probele cu constanta de difuzie identică | D cm ² sec ⁻¹ |
| 1, 2, 5, 6, 11, 12, 17, 18, 23, 24, | (8,5±0,1)·10 ⁻⁷ |
| 15, 16, 19, 20 | (5,8±0,1)·10 ⁻⁶ |
| 3, 4, 7, 8 | (8,1±0,1)·10 ⁻⁶ |
| 22, 21, 25, 26 | (2,1±0,1)·10 ⁻⁴ |
| 9, 10, 13, 14 | (2,7±0,1)·10 ⁻³ |
| S e r i a „B” | |
| Probele cu constanta de difuzie identică | D cm ² sec ⁻¹ |
| 1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25. | (8,6±0,1)·10 ⁻⁷ |
| 15, 20 | (5,9±0,1)·10 ⁻⁸ |
| 3, 8 | (8,1±0,1)·10 ⁻⁶ |
| 21, 26 | (2,1±0,1)·10 ⁻⁴ |
| 9, 14 | (2,7±0,1)·10 ⁻³ |

2. Dacă macromoleculele se găsesc în soluția de NaCl 5 %, difuzia colorantului va avea loc cu aceeași viteză ca și în soluțiile fără conținut macromolecular (probele nr. 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 din seria B).

3. În toate celelalte cazuri studiate (care nu se încadrează în punctele 1 și 2), prezența macromoleculelor în concentrațiile utilizate, mărește viteza de difuzie a roșului de Congo (chiar cu 2—3 ordine de mărime!), indiferent dacă gradientul de concentrație macromolecular este de același sens, sau de sens contrar cu gradientul de concentrație al colorantului.

Discutarea rezultatelor

Greutatea moleculară a roșului de Congo ($G.M.=6,50 \cdot 10^2$) se situează între greutatea moleculară a componentelor solventului ($1,8-3,6 \cdot 10^3$) și greutatea moleculară a macromoleculelor ($H \sim 3,5 \cdot 10^4$, $R \sim 4 \cdot 10^4$, $P \sim 6,8 \cdot 10^4$, $M \sim 7,5-8 \cdot 10^4$). Astfel, cu ocazia difuziei roșului de Congo într-un mediu în care există un gradient de concentrație macromolecular, condiția „omogenității spațiale” nu este îndeplinită. Or, s-a demonstrat într-o lucrare anterioară (3), că mișcarea Browniană, considerată ca un proces aleator (care stă și la baza fenomenului de difuzie), se poate caracteriza cu ecuația Fokker-Planck,* de forma:

$$\frac{\delta p(s, x_0, t)}{\delta t} = - \frac{\delta}{\delta x} [b(t, x) \cdot p(s, x_0, t, x)] + \frac{1}{2} \frac{\delta^2}{\delta x^2} [a(t, x) \cdot p(s, x_0, t, x)]$$

* p = densitatea probabilității de trecere, a = coeficient de difuziune, b = coeficient de transport, s = variabila funcției de eroare a proceselor stohastice, x = distanța parursă de la punctul de pornire x_0 în timpul t .

care se transformă într-o relație similară cu legea II-a a lui Fick:

$$\frac{\partial p}{\partial t} = D \cdot \frac{\delta^2 p}{\delta x^2}$$

numai dacă condiția omogenității spațiale [adică dependența lui $p(t, x_0, x)$ numai de $x - x_0$] este satisfăcută (11).

O creștere a probabilității de trecere (deci și a vitezei de migrare a particulelor roșului de Congo) poate fi condiționată:

- fi de creșterea forțelor motrice ale migrării.
- fi de scăderea rezistenței impuse de mediu.
- fi de ambii factori.

Creșterea forțelor motrice ale migrării particulelor poate fi imaginată prin concurența potențialului osmotic existent între cele două faze.

Faptul că roșul de Congo migrează practic cu aceeași viteză, atât în soluție de NaCl de 0,9%, cât și din soluție de NaCl 0,9% în NaCl 5% și invers — deși în acest ultim caz există o diferență de presiune osmotică considerabilă între cele două faze — ne sugerează că diferența de presiune osmotică *singură*, nu determină o creștere a vitezei de difuzie cu 2—3 ordine de mărime. Pe de altă parte este adevărat că, ionii de Cl^- și Na^+ difuzează mai rapid față de colorant ($D_{\text{Cl}^-} = 2 \cdot 10^{-5}$, $\text{cm}^2\text{sec}^{-1}$, $D_{\text{Na}^+} = 1,3 \cdot 10^{-5}$, $\text{cm}^2\text{sec}^{-1}$, $D_{\text{Congo}} = 8,5 \cdot 10^{-7}$, $\text{cm}^2\text{sec}^{-1}$), astfel diferența de presiune osmotică se egalează între cele două faze, înaintea difuziei roșului de Congo.

Macromoleculele au o viteză de migrare mult mai scăzută, astfel și diferența de presiune oncotică existentă la început între cele două faze persistă, ceea ce permite concluzia că, o presiune oncotică persistentă poate fi socotită una dintre cauzele vitezei de difuzie crescute a roșului de Congo în prezența substanțelor macromoleculare.

Trebuie menționat însă că, există macromoleculele (de ex. albumina) care în condiții cu totul similare nu favorizează difuzia roșului de Congo, cu toate că, au o presiune oncotică considerabilă. Această observație, pare să confirme ipoteza că, diferența de presiune osmotică *singură* nu explică fenomenul de creștere a vitezei de difuzie cu 2—3 ordine de mărime.

Dintre factorii, care determină rezistența impusă de mediu, trebuie observat că viscozitatea soluțiilor coloidale macromoleculare, în concentrațiile utilizate în experiențe, a fost mai mare în fiecare caz, decât cea a soluției de NaCl 0,9%. Probleme nr. 7, 8, 13, 14, 19, 20, 25 și 26 arată că, viteza de difuzie a roșului de Congo a fost crescută și atunci când colorantul a migrat în direcția NaCl \rightarrow soluție macromoleculară. Astfel, diferența de viscozitate a fazelor, ca impediment principal al fenomenului observat, trebuie exclus.

Scăderea rezistenței impuse de mediu în aceste condiții, poate fi imaginată, dacă presupunem că moleculele migrează într-un spațiu (sau câmp de forțe) orientat. Ținând cont de puternica interacțiune dintre macromoleculele studiate și apă, pe de altă parte, de existența unei suprafețe de orientare puternic polară (experiențele fiind făcute în vase de sticlă, cu pereții interni destul de apropiati), considerăm că această presupunere nu poate fi exclusă. Măsurători crioscopice efectuate în soluțiile macromoleculare studiate — care în prezența unor suprafețe mari și puternic polare (capilare, pulbere de sticlă, perle de sticlă) arată o creștere a punctului de congelare — par să confirme presupunerea de mai sus. Izolarea apei structurate, cu anomalii la punctul de congelare și de viscozitate — fiind făcută de Deryagin și colab. (2, 7, 8) de asemenea în prezența suprafețelor puternic polare care fixează prin asociere moleculele de apă, asigurând astfel o „configurație spațială corect aranjată” (4). — pledează într-o oarecare măsură pentru validitatea presupunerii noastre

Concluzii

Viteza de difuzie a roșului de Congo, în soluțiile apoase diluate de electrolit (NaCl 0,9%), crește semnificativ (cu 2—3 ordine de mărime) în prezența unor macromolecule, dacă se asigură concomitent și un gradient de concentrație macromolecular. Cauza probabilă a acestui fenomen este pe de o parte transformarea potențialului oncotic în energie cinetică moleculară, pe de altă parte scăderea rezistenței mediului, realizată printr-o orientare spațială a moleculelor de apă, stabilizată în prezența macromoleculelor studiate.

Datorită faptului că fenomenul prezintă multe trăsături comune cu cel al difuziei „ușurate“ (erleichterte Diffusion) (6) elucidarea lui prezintă un interes biofarmaceutic, iar rezultatele experiențelor efectuate în acest sens sînt în curs de prelucrare.

Sosit la redacție: 30 martie 1970.

Bibliografie

1. AGREN A., ELOFFSON R.: Acta Pharm. Suecica (1967), 4, 281; 2. ANISIMOVA B. J., DERYAGIN B. V., ERSHOVA I. G., LITSNIKOV D. S., RABINOVICH Ya. I., SIMONOVA V. K., CHURAEV N. V.: Zh. Fiz. Khim. (1967), 41, 2377; 3. BACHNER E., PAPP I.: Unele aspecte ale proceselor de difuziune clasică tratate prin ecuațiile lui Kolmogorov. A VII-a Sesiune științifică a I.M.F. Tg. Mureș, 12—13 decembrie 1969; 4. BELLAMY L. J., OSBORN A. R.: Chemistry and Industry (1969), 24 mai, 686; 5. BOLF J.: Biophysik (1968), 5, 111; 6. BÜCHI J.: Pharm. Acta Helv. (1966), 41, 257; 7. DERYAGIN B. V., FEDYAKIN N. N.: Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R. (1962), 147, 403; 8. DERYAGIN B. V., LITSNIKOV D. S., MERZHANOV K. H., RABINOVICH Ya. I., CHURAEV N. V.: Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R. (1968), 181, 823; 9. HUGH A. E., LYNCH P. R.: Science (1968), 159, 975; 10. IONESCU-STOIAN P., SAVOPOL E., ȘERBANESCU DESPINA, IONICA VERONA: Farmacia (1968), 16, 3, 129; 11. IOSIFESCU M., TAUTU P.: Procese stohastice și aplicații în biologie și medicină, Ed. Acad. R.S.R., București, 1968, 154; 12. LEWIN S.: Hydration and Biological Conformation, Meeting of the Structure of liquid-water, solute-water interactions, London, 19—20 sept. 1968, p. 21; 13. ROSENKRANZ H. S., SIEGAL F. F.: Naturwissensch. (1968), 55, 9, 445; 14. SAUNDERS L.: Principles of Physical Chemistry, Oxford Univ. Press, 1966, 353; 15. SCHAAFFS W.: Kolloid Z. Z. Polymeren, (1967), 221, 1, 61; 16. SCHAAFFS W.: Naturwissensch. (1967), 54, 22, 586; 17. STUMF W. E.: Science (1968), 161, 1262; 18. TIMMONS C. O., ZLSMAN W. A.: J. Colloid Interface Sci., (1968), 28, 1, 106.