

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 676:66.08/09; 541.64; 544.773.432

**ДОСЛІДЖЕННЯ АДСОРБЦІЇ АЛЬБУМІНУ НА ПОВЕРХНЮ СКЛА
МОДИФІКОВАНОГО ПРИЩЕПЛЕНИМ НАНОШАРОМ ОЛІГОПЕРОКСИД-
ГРАФТ-ПОЛІ(N-ІЗОПРОПІЛАКРИЛАМІД) МЕТОДОМ ЕЛІПСОМЕТРІЇ**

**А. Коструба¹, Т. Курисько², О. Жолобок², В. Дончак², Х. Гаргай²,
Л. Ріпак², Ю. Стецишин²**

¹*Інститут фізичної оптики, вул. Драгоманова, 23, Львів 79005,
Львівська комерційна академія, вул. Самчука, 9, Львів 79011, Україна*

²*Національний університет «Львівська Політехніка»*

вул. С. Бандери, 12, Львів 79013, Україна

e-mail: andriykostruba@yahoo.com, yrstecushun@ukr.net

В останні роки інтенсивно розвивається новий, перспективний напрям модифікації поверхні чутливими полімерами, які змінюють свої властивості під дією чинників оточуючого середовища. Важливою складовою цих досліджень є визначення взаємодії чутливих поверхонь з білками за різних умов середовища. У роботі методом еліпсометрії досліджено адсорбцію бичачого сироваткового альбуміну при різних рН і температурах на поверхні амінованого скла, модифікованого прищепленими наночастинами олігопероксиду та олігопероксид-графт-ПМПАМу. Показано, що значний вплив на величину адсорбції альбуміну на поверхню амінованого скла, модифікованого наночастинами олігопероксид-графт-ПМПАМу, здійснює температура середовища.

Ключові слова: адсорбція білків, альбуміни, BSA, еліпсометрія.

Поверхні відіграють важливу роль у проходженні біологічних реакцій. Значна кількість біологічних реакцій, таких як взаємодія поверхні клітин і синтетичного біоматеріалу, адсорбція білків на поверхні та біологічні тканини, взаємодія кисню з поверхнею легень тощо, перебігають на поверхні або границі розподілу двох фаз [7]. Одним із ключових моментів у цих дослідженнях є вивчення закономірностей процесу адсорбції білків, у результаті якого поверхня може набувати таких біоспецифічних властивостей, як біосумісність, зокрема гемосумісність, здатність впізнавати і специфічно взаємодіяти з певними типами клітин тощо [2, 13]. У попередніх роботах нами було проведено модифікацію поверхні скла прищепленими наночастинами та досліджувалась адсорбція білків. Зокрема, у роботі [1] методом еліпсометрії досліджувались основні закономірності формування адсорбційних наночастинок бичачого сироваткового альбуміну на поверхнях: склі, амінованому склі (модифікованому 3-амінопропіл(триетокси)силаном) і амінованому склі, модифікованому декстраном. В останні роки інтенсивно розвивається новий, перспективний напрям модифікації поверхні чутливими полімерами, які змінюють свої властивості під дією чинників оточуючого середовища, наприклад, температури, світла, рН тощо [8]. На нашу думку, найбільший інтерес становлять полімери, що здатні змінювати свою конформацію при відносно незначних змінах температури, зокрема полі(N-ізопропілакриламід) – (ПМПАМ) [8].

Метою даної роботи було дослідити вплив рН і температури на адсорбцію білка альбуміну на поверхні, модифікованій прищепленим температуро- та рН-чутливим наночастинами олігопероксид-графт-ПМПАМу.

Матеріали та методи

Матеріали: скляні пластинки, модифіковані прищепленими наночарами олігопероксида та олігопероксид-графт-ПМПАМу, сироватковий бичачий альбумін (Sigma) із вмістом основної речовини 99%, цитратно-фосфатний буфер (рН 3 та 7,4).

Дослідження адсорбції бичачого сироваткового альбуміну методом еліпсометрії. Товщину й оптичні параметри адсорбованих наночарів альбуміну досліджували методом еліпсометрії “ex situ”. Еліпсометричні вимірювання проводили для кожного зразка поверхні перед і після проведення адсорбції з застосуванням нуля-еліпсометрії LEF-3М (Інститут Напівпровідникової Фізики, Новоросійськ, Росія), точність оптичного елементу становила 0.010.

Результати і їхнє обговорення

Адсорбцію макромолекул альбуміну досліджували на поверхні силікатного скла, яка попередньо модифікована прищепленням температу- та рН-чутливим наночаром олігопероксид-графт-ПМПАМу. Для створення такої поверхні скляні пластинки обробляли 3-амінопропіл(триетокси)силаном, у результаті чого на них іммобілізувались первинні аміногрупи. За участю аміногруп до поверхні амінованого скла прищеплювали пероксидовмісний олігоестерний модифікатор. Методом ініціювання “від поверхні” до олігопероксидного наночару прищеплювали щітки ПМПАМу (рис. 1).

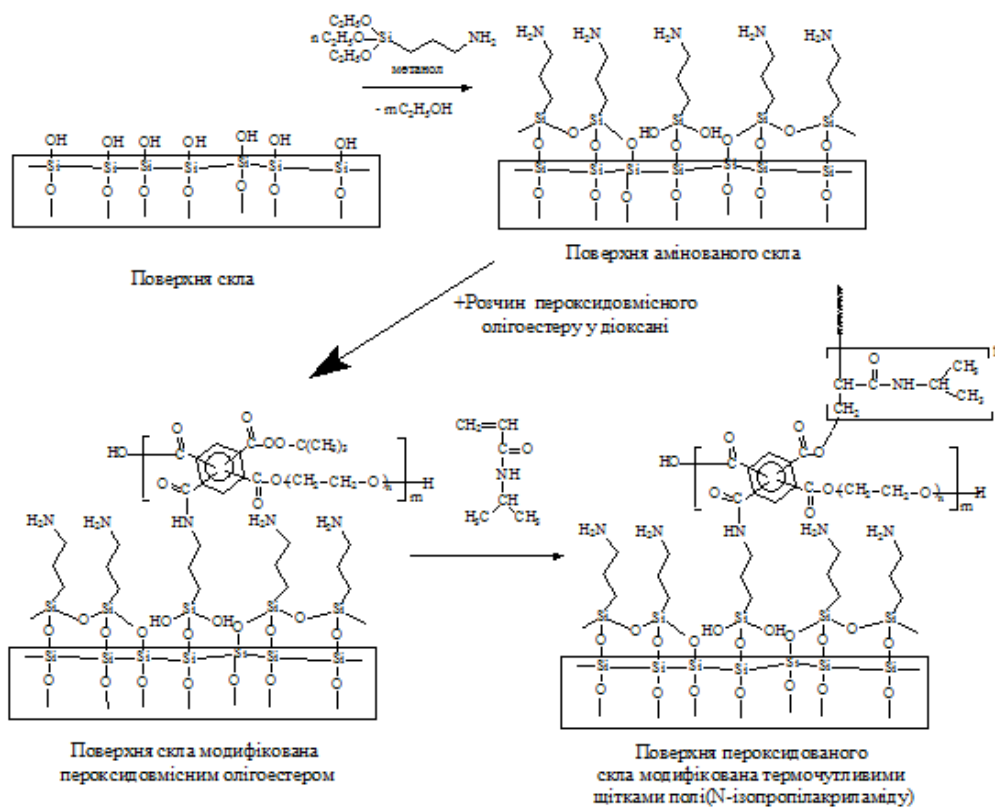


Рис. 1. Схема модифікації поверхні амінованого скла прищепленням наночаром олігопероксид-графт-ПМПАМу.

Відомо, що прищеплені наночари ПМПАМу мають термочутливі властивості [7]. Дослідження нами властивостей модифікованих поверхонь показало, що крім

термочутливих, отримані поверхні, які чутливі до рН. Це підтверджено здатністю змінювати конформацію прищеплених щіток після занурення у цитратно-фосфатні буферні розчини з різним значенням рН. Зміна конформації прищеплених щіток ПМПАМу оцінювалась за контактним кутом змочування водою модифікованих поверхонь при різних умовах (рис. 2).

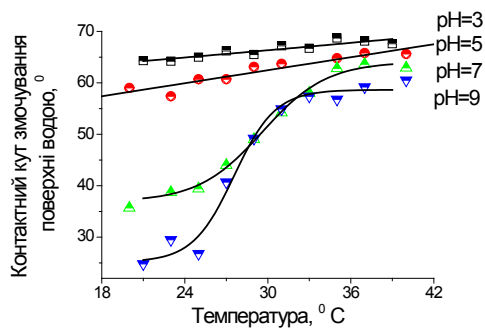


Рис. 2. Залежність контактної кута змочування водою поверхні амінованого скла, модифікованої прищепленим нанощаром олігопероксид-графт-ПМПАМ від температури після занурення у цитратно-фосфатні буферні розчини з різним рН.

Одержані властивості безпосередньо пов'язані з методом модифікації поверхні з використанням пероксидовмісного олігоестеру на основі тетрахлорангідриду піромелітової кислоти, поліетиленгліколю-9 та трет-бутилгідропероксиду, запропонованим авторами роботи. Взаємодія карбоксильних груп, які містяться у структурі модифікатора, з амідними групами ПМПАМу надають модифікованій поверхні рН-чутливих властивостей [14].

З літературних джерел відомо [10], що інтенсивність адсорбції білків на модифікованій поверхні залежить від природи білка, рН і температури буферного розчину (конформації макромолекул білка та прищеплених полімерних щіток).

Бичачий сироватковий альбумін (BSA) є найбільш цікавим білком для створення біосумісних поверхонь і біосенсорних систем [5, 6, 15]. Дослідженню закономірностей його адсорбції на поверхні різного типу присвячено низку публікацій [9, 11, 12].

Ми застосували еліпсометричний метод для дослідження залежності товщини й оптичних параметрів адсорбованих нанощарів альбуміну від часу адсорбції та властивостей буферного розчину. У роботі використано цитратно-фосфатні (буферні) розчини 0,2 мг/мл альбуміну зі значеннями рН 3 і 7,4 при температурах 20 і 37°C.

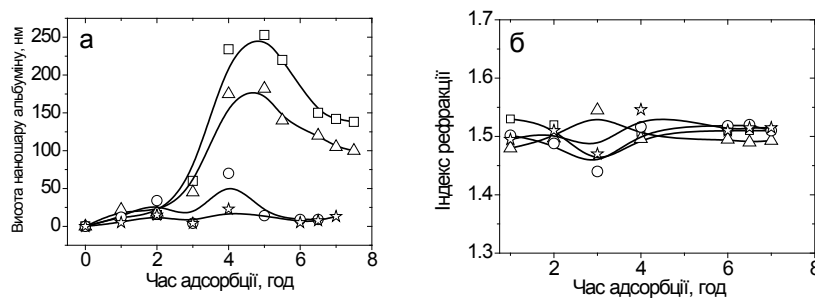


Рис. 3. Залежність висоти (а) та індексу рефракції (б) нанощару альбуміну від часу адсорбції. Концентрація розчину альбуміну становить 0,2 мг/мл, рН=7,4; Поверхня амінованого скла модифікована олігопероксидом, Т=20°C – кружки; Т=37°C – зірочки; олігопероксид-графт-ПМПАМом, Т=20°C – трикутники; Т=37°C – квадратики.

На рис. 3 наведені криві залежності висоти (*a*) та індексу рефракції (*b*) наночару альбуміну від часу адсорбції з цитратно-фосфатного розчину ($\text{pH}=7,4$) при температурах 20 і 37°C. Очевидно, адсорбція білка на поверхні з різними модифікаторами відбувається за різними кінетичними моделями [10]. Так, у випадку модифікації поверхні наночаром олігопероксиду адсорбція альбуміну відбувається з порівняно незначною інтенсивністю протягом усього часу адсорбції. Однак при температурі 37°C спостерігається незначне зростання товщини адсорбованого шару альбуміну в ділянці 4-ї години та подальше її зменшення внаслідок десорбції до значення 15–20 нм, що визначається динамічною рівновагою між процесами адсорбції та десорбції.

Для поверхонь, модифікованих олігопероксид-*графт*-ПМПАМом, кінетична модель адсорбції альбуміну є набагато складнішою (квадратики і трикутники). Пролонгований час повільної адсорбції до 3 год змінюється швидким зростанням товщини шару альбуміну до 175 нм при 20°C та 250 нм при 37°C. На наступному етапі відбувається часткова десорбція альбуміну до встановлення динамічної рівноваги, яка веде до формування на поверхні термодинамічно стійкого наночару з товщинами 100–140 нм.

Значні зміни індексу рефракції альбуміну (рис. 3, *b*) в проміжку 1–4 год свідчать про суттєві процеси перебудови (конформаційні зміни структури макромолекул білка), які відбуваються у структурі адсорбованого шару в цьому часовому інтервалі.

Процес адсорбції альбуміну з буферного розчину при $\text{pH}=3$ (рис. 4, *a*) на поверхні, модифіковані олігопероксидом, має суттєві відмінності порівняно з кінетикою описаного вище процесу, що відбувався з буферного розчину при $\text{pH}=7,4$. Так, уже після першої години адсорбування спостерігається стрімке зростання товщини шару альбуміну при обох досліджуваних температурах і максимальні значення товщин досягаються на другій годині процесу. Після тригодинної адсорбції фактично встановлюється термодинамічна рівновага при обох температурах.

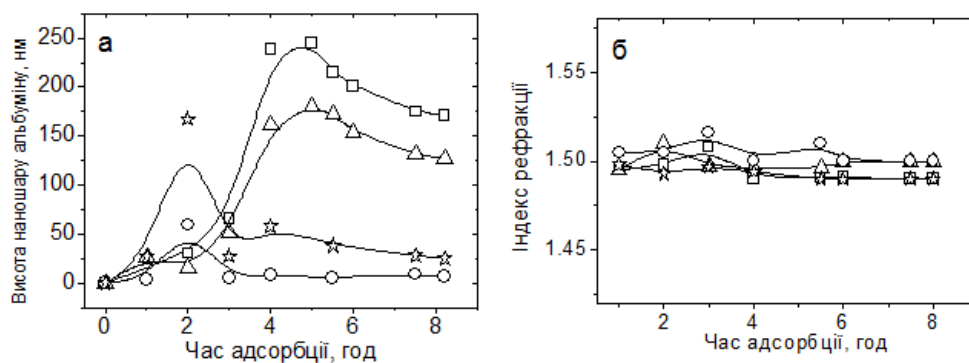


Рис. 4. Залежність висоти наночару альбуміну (*a*) та індексу рефракції отриманої плівки (*b*) від часу адсорбції альбуміну. Концентрація розчину альбуміну становить 0,2 мг/мл, $\text{pH}=3$: Поверхня амінованого скла модифікована олігопероксидом, $T=20^\circ\text{C}$ – кружки; $T=37^\circ\text{C}$ – зірочки; олігопероксид-*графт*-ПМПАМом, $T=20^\circ\text{C}$ - трикутники; $T=37^\circ\text{C}$ – квадратики.

У той же час адсорбція альбуміну з розчину ($\text{pH}=3$) на поверхні модифіковані олігопероксид-*графт*-ПМПАМом (рис. 4, *a*), відбувається за тими ж закономірностями, що і адсорбція з розчину $\text{pH}=7,4$. Разом з тим, зміни індексу рефракції адсорбованих плівок у цьому випадку є значно меншими у досліджуваному часовому діапазоні (рис. 4, *b*). Слід також відзначити, що товщини адсорбованих шарів у рівноважному стані (135 нм при 20°C і 175 нм при 37°C) перевищують аналогічні значення для розчинів із $\text{pH}=7,4$.

Цікаво порівняти дані щодо адсорбції альбуміну на поверхні, модифіковані олігопероксидом та олігопероксид-*графт*-ПМПАМом, з попередньо опублікованими даними [1], які стосуються адсорбції альбуміну на поверхні силікатного скла, амінованого скла й амінованого скла, модифікованого декстраном. Назагал можна відзначити суттєві аналогії у кінетичних моделях адсорбції на перелічені вище поверхні. Спільною особливістю для усіх згаданих поверхонь є досягнення швидкого максимуму адсорбції альбуміну приблизно на другій годині проходження адсорбції з подальшою десорбцією до досягнення стану рівноваги уже після тригодинної тривалості процесу.

У той же час адсорбція на поверхню амінованого скла, модифіковану олігопероксид-*графт*-ПМПАМом, характеризується пролонгованим терміном сповільненої адсорбції альбуміну, максимум якої припадає приблизно на четверту годину від початку процесу. Після цього переважає процес десорбції альбуміну, і рівновага у системі встановлюється аж на восьмій годині від початку процесу.

Особливості структури наночастинок альбуміну можна оцінити за значенням індексу рефракції. Значення індексу рефракції поверхневої плівки несе інформацію про об'ємну фракцію альбуміну (щільність упакування плівки) в адсорбованому шарі. У гетерогенній системі об'ємну фракцію альбуміну можна розрахувати за рівнянням Максвелла-Гарнета [3, 4]. Розраховані значення показують, що протягом першої години формується відносно щільна плівка (близько 90% щільність пакування) на поверхні всіх досліджуваних зразків. У часовому діапазоні від 2 до 4 год адсорбції у всіх зразках спостерігаються процеси переорієнтації макромолекул альбуміну, а також, можливо, макромолекул прищеплених шіток, унаслідок чого щільність пакування макромолекул на поверхні змінюється незначно в межах 87–93%. Після 4 год процесу адсорбції щільність пакування альбуміну на отриманих поверхнях досягає сталого значення (близько 90%).

Кінетична модель адсорбції на поверхню амінованого скла, модифіковану олігопероксид-*графт*-ПМПАМом, у всіх випадках (за різних рН і температур) має складний характер. Вона характеризується сповільненою адсорбцією альбуміну протягом перших двох годин процесу та подальшим стрімким наростанням швидкості адсорбції від 3 до 4 год із досягненням максимуму на 4–5 год. Після цього відбувається переважанням десорбції до настання стабільності у системі на восьму годину процесу. Важливою особливістю даного процесу є також досягнення значних (100–175 нм) значень товщини альбумінового шару в рівноважному стані, що свідчить про високу адсорбційну здатність таких поверхонь для білкових макромолекул.

Дослідження процесу адсорбції бичачого сироваткового альбуміну на поверхні амінованого скла, модифікованого олігопероксид-*графт*-ПМПАМом, показали, що суттєвий вплив на проходження процесу адсорбції виявляє температура оточуючого середовища, тоді як рН середовища здійснює вплив в основному на кінцевих стадіях адсорбції, що проявляється у збільшенні адсорбційної здатності поверхонь, модифікованих олігопероксид-*графт*-ПМПАМом, при більш низьких значеннях рН середовища.

Температуро- та рН-чутливі поверхні мають значні перспективи для використання їх як «розумних» імплантатів і біосенсорних систем.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Стецишин Ю., Коструба А., Гаргай Х. та ін. Дослідження адсорбції альбуміну на поверхні модифікованого скла методом еліпсометрії // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2010. Т. 54. С. 51–58.

2. *Andrade J. D., Hlady V.* Protein adsorption and material biocompatibility: A tutorial review and suggested hypothesis // *J. Polym. Sci.* 1986. Vol. 79. P. 1–63.
3. *Azzam R. M. A., Bashara N. M.* Ellipsometry and polarized light // Mir. Moscow. 1981. 330 p.
4. *Bootsma G. A., Meyer F.* Ellipsometry in the sub-monolayer region // *Surface Sci.* 1969. Vol. 14. P. 52.
5. *Brynda E., Houska M., Jirouskova M., Dyr J. E.* Albumin and heparin multilayer coatings for blood-contacting medical devices // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. Vol. 51. P. 249–257.
6. *Brynda E., Houska M.* Ordered multilayer assemblies: Albumin/heparin for biocompatible coatings and monoclonal antibodies for optical immunosensors // In: Lvov Y, Mohwald H editors. *Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Technology*. New York: Marcel Dekker. 2000. P. 251–286.
7. *Castner D. G., Ratner B. D.* Biomedical surface science: Foundations to frontiers // *Surface Sci.* 2002. Vol. 500. P. 28–60.
8. *Cole M. A., Voelcker N. H., Thissen H., Griesser H. J.* Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein–surface and cell–surface interactions // *Biomaterials.* 2009. Vol. 30. P. 1827–1850.
9. *Ladam G., Schaaf P., Decher G.* et al. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films // *Biomol. Eng.* 2002. Vol. 19. P. 273–280.
10. *Rabe M., Verdes D., Seeger S.* Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces // *Adv. in Col. and Int. Sci.* 2011. Vol. 162. P. 87–106.
11. *Rabe M., Verdes D., Seeger S.* Surface-induced spreading phenomenon of protein clusters // *Soft Mat.* 2009. Vol. 5. P. 1039–1047.
12. *Sapsford K. E., Ligler F. S.* Real-time analysis of protein adsorption to a variety of thin films // *Biosensors and Bioelectronics.* 2004. Vol. 19. P. 1045–1055.
13. *Walker R. K., Krishnaswamy S.* The contribution of the substrate-membrane interaction to catalysis // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 27441–27450.
14. *Xia F., Feng L., Wang S.* et al. Dual-Responsive Surfaces That Switch between Superhydrophilicity and Superhydrophobicity // *Adv. Mater.* 2006. Vol. 18. P. 432–436.
15. *Yu S. Y., Hu J. H., Pan X. Y.* et al. Stable and pH-sensitive nanogels prepared by self-assembly of chitosan and ovalbumin // *Langmuir.* 2006. Vol. 22. P. 2754–2759.

Стаття: надійшла до редакції 01.03.12

доопрацьована 07.05.12

прийнята до друку 10.05.12

**RESEARCH OF ALBUMIN ADSORPTION ONTO THE GLASS SURFACE
MODIFIED BY OLIGOPEROXIDE-GRAFT-POLY(N-ISOPROPYLACRYLAMIDE)
USING METHOD OF ELLIPSOMETRY**

**A. Kostruba¹, T. Kurysko², O. Zolobko², V. Donchak², H. Harhay²,
L. Ripak², Yu. Stetsyshyn²**

¹*Lviv Institute for Physical Optics, 23, Dragomanov St., Lviv 79005,
Lviv Academy of Commerce, 9, Samtshuk St., Lviv 79011, Ukraine*

²*National University «Lvivska Politechnika»
12, S. Bandera St., Lviv 79013, Ukraine*

e-mail: andriykostruba@yahoo.com, yrstecushun@ukr.net

In last year's novel, perspective trend of the surface modification by stimuli polymers intensive has been developed. An important part of these studies is determination of the stimuli surfaces interactions with proteins at different surrounding conditions. In our study we investigated a bovine serum albumin adsorption at different pH and temperatures onto surfaces which is modified by oligoperoxide or oligoperoxide-graft-PNIPAM. We demonstrated that dramatic effect on albumin adsorption plays a medium temperature.

Keywords: protein adsorption, albumin, BSA, ellipsometry.

**ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ АЛЬБУМИНА НА ПОВЕРХНОСТЬ СТЕКЛА,
МОДИФИЦИРОВАННОГО ПРИВИТЫМ НАНОШАРОМ ОЛИГОПЕРОКСИД-
ГРАФТ-ПОЛИ(N-ИЗОПРОПИЛАКРИЛАМИД) МЕТОДОМ ЭЛЛИПСОМЕТРИИ**

**А. Коструба¹, Т. Курисько², О. Жолобка², В. Дончак², Х. Гаргай²,
Л. Рипак², Ю. Стецишин²**

¹*Институт физической оптики, ул. Драгоманова, 19, Львов 79011, Украина
Львовская коммерческая академия, ул. Самчука, 9, Львов 79011, Украина*

²*Национальный университет «Львовская Политехника»,
ул. С. Бандеры, 12, Львов 79013, Украина*

e-mail: andriykostruba@yahoo.com, yrstecushun@ukr.net

В последние годы интенсивно развивается новое, перспективное направление модификации поверхности чувствительными полимерами, которые изменяют свои свойства под действием факторов окружающей среды. Важной составляющей этих исследований является определение взаимодействия чувствительных поверхностей с белками в различных условиях среды. В работе методом эллипсометрии исследована адсорбция бычьего сывороточного альбумина при различных рН и температурах среды на поверхность аминированного стекла, модифицированного привитыми нанослоями олигопероксида и олигопероксид-графт-ПНПАМ. Показано, что значительное влияние на значение адсорбции альбумина на поверхность аминированного стекла, модифицированную нанослоем олигопероксид-графт-ПНПАМ, оказывает температура окружающей среды.

Ключевые слова: адсорбция белков, альбумин, BSA, эллипсометрия.