

**Біотехнологія**

УДК 676:66.08/09; 541.64; 544.773.432

**ДОСЛІДЖЕННЯ АДСОРБЦІЇ АЛЬБУМІНУ НА ПОВЕРХНІ  
МОДИФІКОВАНОГО СКЛА МЕТОДОМ ЕЛІПСОМЕТРІЇ**

**Ю. Стецишин<sup>\*</sup>, А. Коструба<sup>\*\*</sup>, О. Жолобка<sup>\*</sup>, Т. Курисько<sup>\*</sup>,  
В. Дончак<sup>\*</sup>, Х. Гаргай<sup>\*</sup>, Л. Ріпак<sup>\*</sup>, С. Воронов<sup>\*</sup>**

*<sup>\*</sup>Національний університет «Львівська Політехніка»  
вул. С.Бандери, 12, Львів 79013, Україна*

*<sup>\*\*</sup>Інститут фізичної оптики, вул. Драгоманова, 23, Львів 79005, Львівська  
комерційна академія, вул. Самчука, 9, Львів 79011, Україна  
e-mail: yrstecushun@ukr.net*

Створення стійких наношарів білків на поверхнях матеріалів має велике значення при розробці імплантатів і біосенсорних систем. Основний метод створення наношарів білків – це їхня специфічна та неспецифічна адсорбція на поверхні. У роботі, за допомогою методу еліпсометрії досліджували адсорбцію на поверхні модифікованого скла бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Показано закономірності адсорбції альбуміну на поверхні різної хімічної природи при різних рН. Розраховано товщини адсорбованих наношарів, об'ємну фракцію альбуміну в адсорбованих наношарах і питому кількість адсорбованого альбуміну. Особливо слід відзначити утворення щільно упакованих наношарів альбуміну на поверхнях, модифікованих декстраном, при відносно низькій його адсорбції.

*Ключові слова:* модифікація поверхонь, декстран, адсорбція білків, альбуміни, BSA, еліпсометрія.

Розуміння механізмів взаємодії білків з поверхнями є фундаментальним напрямом досліджень у біології, біотехнології, фармакології та медицині. 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 тощо [2, 25]. Важливим напрямом хімії біосумісних матеріалів є створення поверхонь, які запобігають адсорбції білків – «non fouling» поверхонь або легко адсорбують біологічно пасивні білки, наприклад альбумін [15]. Крім того, при створенні біосенсорних систем важливе значення має не тільки природа білка-біосенсора та спосіб його зв'язку з поверхнею, але і конформація адсорбованого білка на поверхні [12].

Дослідження адсорбції білків поділяють на два напрями. Перший – це скринінг модифікованих поверхонь на їхню резистентність до адсорбції або на здатність до контрольованої адсорбції певних білків [9, 17]. Другий напрям досліджень – вивчення кінетичних закономірностей процесів специфічної та неспецифічної адсорбції білків [7, 11, 13].

Бичачий сироватковий альбумін (BSA) є найцікавішим білком для створення біосумісних поверхонь і біосенсорних систем [5, 6, 26]. Дослідженню закономірностей його адсорбції на поверхні різного типу присвячено низку публікацій [14, 21, 22]. Проте слід відзначити, що у цих публікаціях вивченню структури утвореного наношару альбуміну приділяється незначна увага. Крім того, недостатньо висвітлено питання адсорбції альбуміну на поверхні, які модифіковані полісахаридом декстраном, хоча є

публікації, в яких показано здатність утворювати стійкі комплекси між макромолекулами декстрану й альбуміну в розчині [20]. Тому особливо перспективною, на наш погляд, є адсорбція альбуміну на поверхні, що попередньо модифіковані прищепленим шаром декстрану. У попередніх роботах [23] ми показали можливість модифікації поверхонь полімерів макромолекулами декстрану, а також значну адсорбційну активність альбуміну щодо модифікованих поверхонь [24].

Дана робота присвячена вивченню адсорбції макромолекул альбуміну на поверхню силікатного скла, яка попередньо модифікована прищепленим шаром декстрану. Для створення такої поверхні скляні пластинки обробляли  $\gamma$ -амінопропіл(триетокси)силаном, у результаті чого на них іммобілізувалися первинні аміногрупи. За участю цих аміногруп до поверхні модифікованого скла прищеплювали діальдегіддекстран [1], який одержували частковим окисненням декстрану періодатною кислотою (рис. 1) [16].

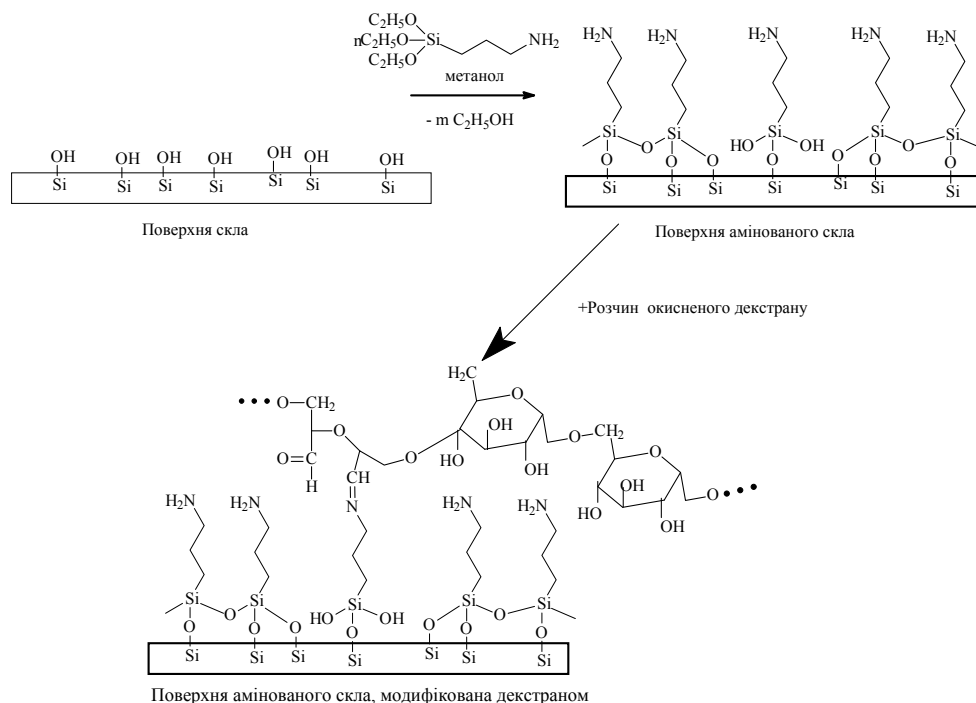


Рис. 1. Схема модифікації поверхні скла.

Важливим сучасним методом дослідження товщини та структури поверхневих наночарів є метод еліпсометрії [3, 4], який відзначається високою точністю й достовірністю одержаних результатів. У деяких роботах показана можливість застосування цього методу для дослідження адсорбції білків і встановлення структури отриманих білкових наночарів [14, 22]. Ми застосували еліпсометричний метод для дослідження залежності товщини й оптичних параметрів адсорбованих наночарів альбуміну від часу адсорбції. У роботі використані цитратно-фосфатні (буферні) розчини альбуміну зі значеннями рН 3 та 7,4 і концентрацією альбуміну у розчині 0,2 мг/мл. Ізоелектрична точка (pI) сироваткових альбумінів лежить у межах значень рН 4,3–4,8.

На рис. 2 наведені криві залежності висоти наночару альбуміну ( $a$ ) та індексу рефракції поверхні ( $\delta$ ) від часу адсорбції альбуміну з цитратно-фосфатного розчину при

pH=7,4 на поверхні «чистого» та модифікованого скла. Видно, що після значної початкової адсорбції альбуміну на поверхні скла відбувається його часткова десорбція і встановлюється динамічна рівновага, яка веде до формування на поверхні термодинамічно стійкого наночасу. Ці закономірності зберігаються як для немодифікованої, так і для амінованої скляних поверхонь.

Поряд із тим, на поверхні, модифікованій декстраном (кружки), висота наночасу альбуміну після досягнення певного значення практично не змінюється. Одночасно у процесі адсорбції зростає показник індексу рефракції, що свідчить про утворення ущільненого наночасу альбуміну на поверхні, модифікованій декстраном.

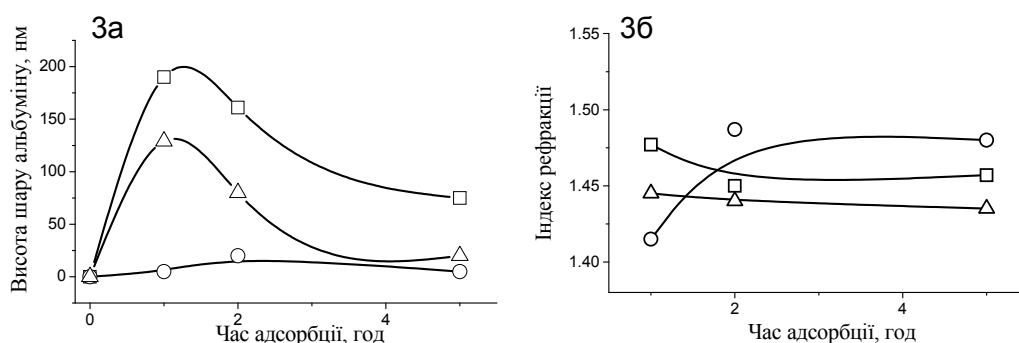


Рис. 2. Залежність висоти наночасу альбуміну (а) та індексу рефракції отриманої плівки (б) від часу адсорбції альбуміну. Концентрація розчину альбуміну становить 0,2 мг/мл, pH=7,4. Поверхня скла – трикутники; поверхня скла, модифікована  $\gamma$ -амінопропіл(триетокси)силаном, – квадрати; поверхня скла, модифікована  $\gamma$ -амінопропіл(триетокси)силаном і декстраном, – кружки.

Слід відзначити, що макромолекула бичачого сироваткового альбуміну складається з трьох доменів: при pH=7,4 два з них заряджені негативно, а один нейтрально (рис. 3) [8, 18]. Різні заряди на поверхні альбуміну дозволяють формувати наночаси його макромолекул на заряджених поверхнях. При утворенні розчину альбуміну з pH нижче ізоелектричної точки його властивості значно змінюються [19]. Зокрема, змінюється конформація, зростає в'язкість і значно знижується розчинність. Ці зміни можуть сприяти формуванню стійких наночасів альбуміну на поверхнях.

Процес адсорбції альбуміну з кислого буферного розчину (pH=3) відбувається дещо інакше. Так, висота отриманих наночасів альбуміну на поверхні скла й амінованого скла є значно меншою (рис. 4, а), а значення індексу рефракції – значно вищим (рис. 4, б). Зростання товщини наночасу альбуміну при адсорбції з кислого розчину можна пояснити зміною його конформації [8, 19], при якій утворюються більш щільно упаковані наноструктури аль-

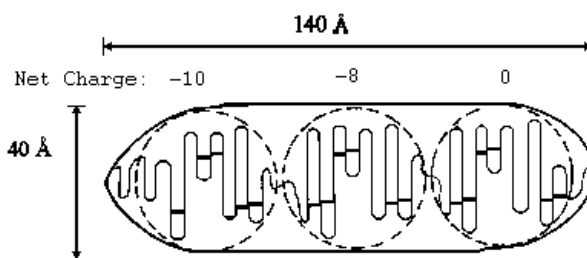


Рис. 3. Схематична репрезентація молекули бичачого сироваткового альбуміну (BSA) при pH=7,4 наведена у роботі [8, 18].

буміну. Поряд із тим, висоти наночарів альбуміну на поверхні, модифікованій декстраном, практично не залежать від значення рН альбумінового розчину, а індекс рефракції шару буде трохи більшим, якщо адсорбцію вести з кислого розчину.

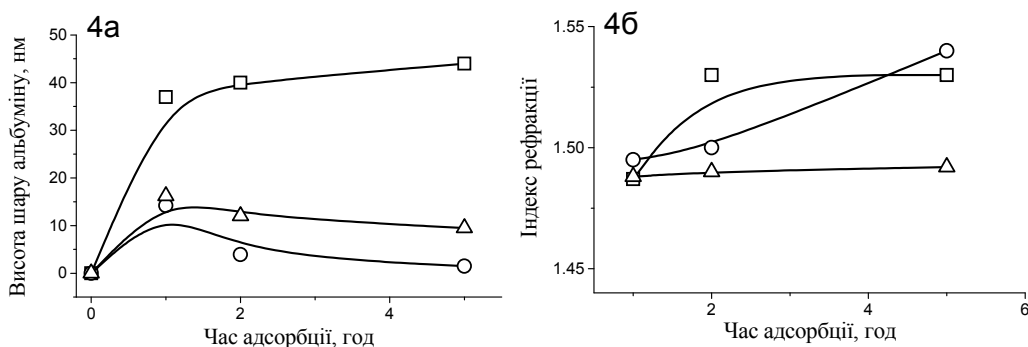


Рис. 4. Залежність висоти наночару альбуміну (а) та індексу рефракції отриманої плівки (б) від часу адсорбції альбуміну. Концентрація розчину альбуміну становить 0,2 мг/мл, рН=3. Поверхня скла – трикутники; поверхня скла, модифікована  $\gamma$ -амінопропіл(триетокси)силаном, – квадрати; поверхня скла, модифікована  $\gamma$ -амінопропіл(триетокси)силаном і декстраном, – кружки.

Особливості структури наночару альбуміну можна оцінити за індексом рефракції. Значення індексу рефракції поверхневої плівки несе інформацію про об'ємну фракцію альбуміну (щільність пакування плівки) в адсорбованому шарі. У гетерогенній системі об'ємну фракцію полімеру (альбуміну) можна розрахувати за рівнянням Максвелла-Гарнета [3, 4]:

$$q = \frac{V_{pol}}{V_f} = \frac{\frac{n_e^2 - n_m^2}{n_e^2 + 2n_m^2}}{\frac{n_{pol}^2 - n_m^2}{n_{pol}^2 + 2n_m^2}}, \quad (1)$$

де  $V_{pol}$  – об'єм плівки полімеру,  $V_f$  – об'єм гетерогенної поверхневої плівки,  $n_e$  – індекс рефракції поверхні, отриманий еліпсометричним методом,  $n_{pol}$  – індекс рефракції поверхні «чистого» альбуміну,  $n_m$  – індекс рефракції оточуючого середовища (розчинник або повітря), котрі формують гетерогенну структуру в полімерному наночарі. Індекс рефракції поверхні «чистого» матеріалу отримували шляхом інтерпретації лінійної залежності індексу рефракції розчину альбуміну ( $n_s$ ) від його концентрації у розчині ( $c$ ). Вимірювання проводили в ділянці концентрацій 0,1–2,5%, потім застосували лінійну апроксимацію як функцію:

$$n_s = f(c) = a + b \cdot c, \quad (2)$$

де  $a$ ,  $b$  – константи. Ці константи були використанні для визначення індексу рефракції альбуміну за умови  $c=100\%$ . Знайдене значення індексу рефракції для «чистого» альбуміну становить 1,54.

Залежність вмісту об'ємної фракції альбуміну від часу адсорбції для різних умов наведено на рис. 5. Щільність пакування альбуміну для всіх трьох видів поверхонь є вищою при адсорбції з кислого буферного розчину (рН=3).

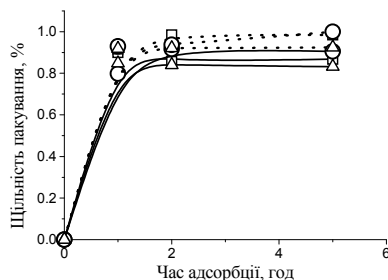


Рис. 5. Залежність об'ємної фракції (щільність пакування) альбуміну від часу адсорбції. Поверхня скла – трикутники; поверхня скла, модифікована  $\gamma$ -амінопропіл(триетокси)силаном, – квадрати; поверхня скла, модифікована  $\gamma$ -амінопропіл(триетокси)силаном і декстраном, – кружки. Пунктирною лінією позначені криві адсорбції з розчину альбуміну при рН=3, суцільною при рН=7,4.

Значення абсолютних величин адсорбції альбуміну ( $\text{мг}/\text{м}^2$ ) розраховували на основі даних експериментальних еліпсометричних досліджень згідно з рівнянням (3).

$$A = \rho \frac{V_{pol}}{V_f} d_f, \quad (3)$$

де  $\rho=1,281$  – густина альбуміну [10],  $d_f$  – товщина полімерного наночару.

На рис. 6 показана залежність кількості адсорбованого альбуміну ( $\text{мг}/\text{м}^2$ ) від тривалості процесу адсорбції. На поверхню як звичайного, так і амінованого скла більше альбуміну сорбується з нейтрального розчину (рН=7,4), ніж із кислого (рН=3). У випадку поверхні, модифікованої декстраном, кількість адсорбованого альбуміну практично не залежить від рН розчину.

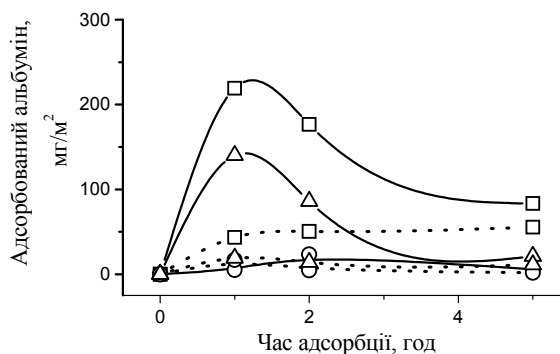


Рис. 6. Залежність кількості адсорбованого альбуміну ( $\text{мг}/\text{м}^2$ ) від часу адсорбції. Поверхня скла – трикутники; поверхня скла, модифікована  $\gamma$ -амінопропіл(триетокси)силаном, – квадрати; поверхня скла, модифікована  $\gamma$ -амінопропіл(триетокси)силаном-декстраном, – кружки. Пунктирною лінією позначені криві адсорбції з розчину альбуміну при рН=3, суцільною при рН=7,4.

У результаті дослідження процесу адсорбції бичачого сироваткового альбуміну на поверхні скла та модифікованого скла можна зробити висновок, що найбільш термодинамічно стійкі, щільно упаковані наночастиці альбуміну утворюються на поверхнях, модифікованих декстраном, що пов'язане з утворенням альбумін-декстранових комплексів. Крім того, структура утворених наночастиць при адсорбції альбуміну з розчинів, як при рН=3, так і при рН=7,4, на поверхні, модифіковані декстраном, є подібною. Поверхні, модифіковані декстраном, на які адсорбований альбумін, мають перспективи для використання їх як імплантатів і біосенсорних систем.

*Робота фінансово підтримувалася державним фондом фундаментальних досліджень України (ДФФД), грант Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених GP/F27/0070.*

1. *Кочетков Н., Бочков А., Дмитриев Б. и др.* Химия углеводов. М.: Химия, 1967. 672 с.
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 Science.* 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. *Calonder C., Tie Y., van Tassel P. R.* History dependence of protein adsorption kinetics // *PNSA.* 2001. Vol. 98. P. 10664–10669.
8. *Carter D.C., Ho J.X.* Structure of serum albumin // *Adv. Protein Chem.* 1994. Vol. 45. P. 153–203.
9. *Chapman R. G., Ostuni E., Liang M. N. et al.* Polymeric thin films that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacteria // *Langmuir.* 2001. Vol. 17. P. 1225–1233.
10. *Chick and Martin.* The density and solution volume of some proteins // *Zeitsch. Chem. Ind. Kolloide.* 1912. Vol. 11. P. 102–105.
11. *Fang F., Szleifer I.* Effect of molecular structure on the adsorption of protein on surfaces with grafted polymers // *Langmuir.* 2002. Vol. 18. P. 5497–5510.
12. *Gouda M. D., Kumar M. A., Thakur M. S., Karanth N. G.* Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents // *Biosens. Bioelectron.* 2002. Vol. 17. P. 503–507.
13. *Hibbert D. B., Googing J. J., Erokhin P.* Kinetics of irreversible adsorption with diffusion: Application to biomolecule immobilization // *Langmuir.* 2002. Vol. 18. P. 1770–1776.
14. *Ladam G., Schaaf P., Decher G., Voegel J.-C., Cuisinier F. J. G.* Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films // *Biomolecular Engineering.* 2002. Vol. 19. P. 273–280.
15. *Lassen B., Malmsten M.* Structure of protein layers during competitive adsorption // *J. Colloid Interface Sci.* 1996. Vol. 180. P. 339–349.
16. *Miksa D., Irish E. R., Chen D. et al.* Dextran Functionalized Surfaces via Reductive Amination: Morphology, Wetting, and Adhesion // *Biomacromolecules.* 2006. Vol. 7. P. 557–564.

17. *Ostuni E., Chapman R. G., Holmlin R. E.* et al. A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein // *Langmuir*. 2001. Vol. 17. P. 5605–5620.
18. *Peters T.* All About Albumin. Biochemistry, Genetics and Medical Applications // Academic Press. San Diego, USA. 1996. P. 188–250.
19. *Peters T. J.* Serum albumin // *Adv. Protein Chem.* 1985. Vol. 37. P. 161–245.
20. *Ponder E., Ponder R.* The Interaction of Dextran with Serum Albumin, Gamma Globulin and Fibrinogen // *J. General Physiol.* 1960. Vol. 43. P. 753–758.
21. *Rabe M., Verdes D., Seeger S.* Surface-induced spreading phenomenon of protein clusters // *Soft Matter*. 2009. Vol. 5. P. 1039–1047.
22. *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.
23. *Stetsyshyn Yu., Donchak V., Harhay Kh.* et al. Modification of poly(ethylene terephthalate) surface by attached dextran macromolecules // *Polym. Int.* 2009. Vol. 58. N 9. P. 1034–1040.
24. *Voronov S., Tokarev V., Samaryk V.* et al. Chemische Modifizierung peroxidierter Polymeroberflächen für die Anwendung in der Medizin // *Abstract Book of International Symposium “Technomer”*. 2003. P. 118.
25. *Walker R. K., Krishnaswamy S.* The contribution of the substrate-membrane interaction to catalysis // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 27441–27450.
26. *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.

#### RESEARCH OF ALBUMIN ADSORPTION ON THE MODIFIED GLASS SURFACES BY METHOD OF ELLIPSOMETRY

**Yu. Stetsyshyn<sup>\*</sup>, A. Kostruba<sup>\*\*</sup>, O. Zolobko<sup>\*</sup>, T. Kurysko<sup>\*</sup>,  
V. Donchak<sup>\*</sup>, H. Harhay<sup>\*</sup>, L. Ripak<sup>\*</sup>, S. Voronov<sup>\*</sup>**

*<sup>\*</sup>National University «Lvivska Politechnika»  
12, S. Bandera St., Lviv 79013, Ukraine*

*<sup>\*\*</sup>Lviv Institute for Physical Optics, 23, Dragomanov St., Lviv 79005,  
Lviv Academy of Commerce, 9, Samtshuk St., Lviv 79011, Ukraine  
e-mail: yrstecushun@ukr.net*

Creation of stable proteins nanolayers on the surfaces of materials has very much sense at development of implants and biosensory systems. Main method creation of protein nanolayers it is them specific and nonspecific adsorption on surfaces. In work by the method of ellipsometry, we investigated adsorption of bovine serum albumin (BSA) on the modified glass surfaces. Regularity of the albumin adsorption on surfaces with different chemical nature at different pH is showed. The thickness of adsorbed nanolayers, volume fraction of albumin in adsorbed nanolayers and albumin adsorbed amount is calculated. Especially, it is significant, formation high density packing albumin nanolayers on surface modified by dextran at relatively low amount his adsorption.

*Key words:* surfaces modification, dextran, protein adsorption, albumin, BSA, ellipsometry.

**ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ АЛЬБУМИНА НА ПОВЕРХНОСТИ  
МОДИФИЦИРОВАННОГО СТЕКЛА МЕТОДОМ ЭЛЛИПСОМЕТРИИ**

**Ю. Стецишин<sup>\*</sup>, А. Коструба<sup>\*\*</sup>, О. Жолобка<sup>\*</sup>, Т. Курисько<sup>\*</sup>,  
В. Дончак<sup>\*</sup>, Х. Гаргай<sup>\*</sup>, Л. Рипак<sup>\*</sup>, С. Воронов<sup>\*</sup>**

*<sup>\*</sup>Национальный университет «Львовская Политехника»  
ул. С. Бандеры, 12, Львов 7901, Украина*

*<sup>\*\*</sup>Институт физической оптики, ул. Драгоманова, 19, Львов 79011  
Львовская коммерческая академия, ул. Самчука, 9, Львов 79011, Украина  
e-mail: yrstecushun@ukr.net*

Создание стойких нанослоев белков на поверхностях материалов имеет существенное значение при разработке имплантатов и биосенсорных систем. Основным методом создания нанослоев белков – это их специфическая и неспецифическая адсорбция на поверхности. В работе с помощью метода эллипсометрии исследовали адсорбцию на поверхности модифицированного стекла бычьего сывороточного альбумина (BSA). Показаны закономерности адсорбции альбумина на поверхности различной химической природы при разных рН. Рассчитаны толщины адсорбируемых нанослоев, объемная фракция альбумина в адсорбируемых нанослоях и удельное количество адсорбируемого альбумина. Особенно следует отметить образование плотно упакованных нанослоев альбумина на поверхностях, модифицированных декстраном при относительно низком значении его адсорбции.

*Ключевые слова:* модификация поверхностей, декстран, адсорбция белков, альбумин, BSA, эллипсометрия.

Стаття надійшла до редколегії 07.06.10

Прийнята до друку 06.09.10