

М. О. Огар, Ю. Б. Стецишин, А. М. Коструба, Н. Г. Марінцова,
Л. Р. Журахівська, С. В. Федорова, О. В. Штапенко, В. П. Новіков

Формування та властивості декстрановмісного покриття для контрольованої адсорбції альбуміну та вирощування клітин

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Ю. Ю. Керчею)

На поверхні скляної пластинки було сформовано прищеплений наночар 3-амінопропіл(триетокси)силану, що містить у своїй структурі первинні аміногрупи. За участю цих аміногруп до поверхні модифікованого скла прищеплено діальдегіддекстран, який отримували частковим окисненням декстрану перйодатною кислотою. Процес проходження модифікації поверхні контролювали методами еліпсометрії, атомно-силової мікроскопії та визначення контактних кутів змочування поверхні водою. На поверхнях досліджено адсорбцію бичачого сироваткового альбуміну та інтенсивність проліферативного росту культури фібробластів лінії NIH3/T3.

Більшість біологічних реакцій проходять на поверхні або межі розділу фаз. Тому властивості поверхонь і поверхневі процеси відіграють важливу роль у проходженні біологічних реакцій. Типові біологічні реакції, що відбуваються на поверхнях — це взаємодія клітини з синтетичними матеріалами, адсорбція білків, ріст та розвиток біологічної тканини на поверхні синтетичних матеріалів тощо [1]. Створення стійких білкових наночарів на поверхні неорганічних матеріалів є необхідним і значущим етапом при розробці біоімплантатів та біосенсорних систем [2]. На сьогодні вирощування біологічних тканин, які можна використовувати в хірургії як імплантатні матеріали, вже широко застосовуються на практиці. Відзначимо два основні підходи — це використання плоских твердих поверхонь (plate solid surface) або губчастих формувань (scaffold) — найчастіше гідрогелів з порами великого розміру [1–3].

Культивування культур клітин на синтетичних поверхнях дозволяє забезпечити оптимальні, що найбільш наближені до *in vivo*, умови та визначає всі подальші процеси їх диференціації, проліферації та формування міжклітинного матриксу. Хімічний та фазовий склад поверхонь, їх топографія, конформація прищеплених макромолекул на поверхні — головні фактори, які регулюють ріст клітин на поверхні та їх функції [4].

У попередніх роботах [5, 6] було показано, що перспективними з точки зору біоінженерії є модифіковані полісахаридами поверхні. Тому нами було запропоновано новий підхід формування на поверхні промислового скла декстрановмісного покриття для контрольованої адсорбції білка альбуміну та вирощування клітинних ліній.

Експериментальна частина. *Модифікація поверхні скляної пластинки.* Для модифікації поверхні скла 3-амінопропіл(триетокси)силаном (“Merck Chemical Co.”) скляні пластинки занурювали у 0,2%-й розчин 3-амінопропіл(триетокси)силану в метанолі на 24 год. Після цього молекули силану, що неприщеплені ковалентно, екстрагувалися метанолом

в апараті Сокслета [7, 8]. На подальшому етапі аміновані скляні пластинки на 6 год занурювали у 2%-й за масою розчин діальдегіддекстрану, який було отримано частковим окисненням декстрану періодатною кислотою у воді. Окиснення декстрану проводили впродовж 2 год. Молекули декстрану, які не прищепились ковалентно, змивали водою в апараті Сокслета.

Вимірювання контактного кута змочування. Кут змочування досліджуваної поверхні дистильованою водою вимірювали таким чином. На поверхню пластинки за допомогою мікрошприца наносили краплі рідини. Для даного типу поверхні проводилось не менше 12 паралельних вимірювань. Кювету з пластинкою витримували у термостаті при заданій температурі впродовж 10 хв, після чого заміряли розміри крапель.

Дослідження поверхні методом атомно-силової мікроскопії (АСМ). Топографію модифікованої та немодифікованої поверхонь скла вивчали безконтактним АСМ методом з використанням приладу “CP Park Scientific Instruments” (щуп Si_3N_4) за звичайних умов у пульсаційно-силовому режимі.

Дослідження поверхні методом еліпсометрії. Товщину та оптичні параметри адсорбованих полімерних наночастинок вимірювали методом еліпсометрії *ex situ*. Еліпсометричні вимірювання проводили для кожного зразка поверхні до і після прищеплення полімерних шарів із застосуванням нуля-еліпсометра ЛЕФ-3М (Інститут фізики напівпровідників, Новосибірськ, Росія). Прилад забезпечує визначення еліпсометричних параметрів Ψ і Δ з точністю $0,01^\circ$, що дозволяє визначати товщину і показник заломлення прозорої поверхневої плівки з похибками $\pm 0,1$ нм й $\pm 0,01$ відповідно.

Адсорбція альбуміну на модифіковані поверхні. Для проведення адсорбції у роботі використано цитратно-фосфатний (буферний) розчин альбуміну зі значенням рН 7,4 та концентрацією альбуміну у розчині 0,2 мг/мл. Ізоелектрична точка (рІ) сироваткових альбумінів лежить у межах значень рН 4,3–4,8.

Дослідження проліферативного росту культури клітин фібробластів лінії NIH3/T3 на поверхнях. Для визначення впливу поверхні на ріст і виживання клітини досліджуваної лінії засівали в кількості 200000 клітин на чашку Петрі, на дні якої була попередньо поміщена пластинка. Зразки інкубували в повноцінному середовищі впродовж 24–72 год. Кількість паралельних зразків для одного заміру не менше 3. Після завершення періоду інкубації клітини на поверхні зразка зафарбовували розчином трипанового синього (кінцева концентрація барвника 0,4%). Кількість живих (незафарбованих) і мертвих (зафарбованих) клітин підраховували в гемоцитометрі за допомогою світлового мікроскопа.

Обговорення результатів. Для створення на поверхні декстрановмісного покриття скляні пластинки спочатку обробляли 3-амінопропіл(триетокси)силаном, у результаті чого на них іммобілізувались первинні аміногрупи. За участю цих аміногруп до поверхні модифікованого скла прищеплювали діальдегіддекстран, який отримували частковим окисненням декстрану періодатною кислотою (рис. 1) [6, 9].

Контроль за процесом модифікації поверхні здійснювався за допомогою вимірювання контактного кута змочування поверхні водою, АСМ та еліпсометрії. Формування прищепленого покриття 3-амінопропіл(триетокси)силану на поверхні скла призводить до значної зміни властивостей поверхні. Контактний кут змочування дистильованою водою немодифікованої поверхні скла становив $(21 \pm 3)^\circ$, а після прищеплення 3-амінопропіл(триетокси)силану — $(51,3 \pm 3)^\circ$.

У той самий час прищеплення діальдегіддекстрану знову зумовлює значну гідрофілізацію поверхні (контактний кут змочування водою $39,3^\circ$).

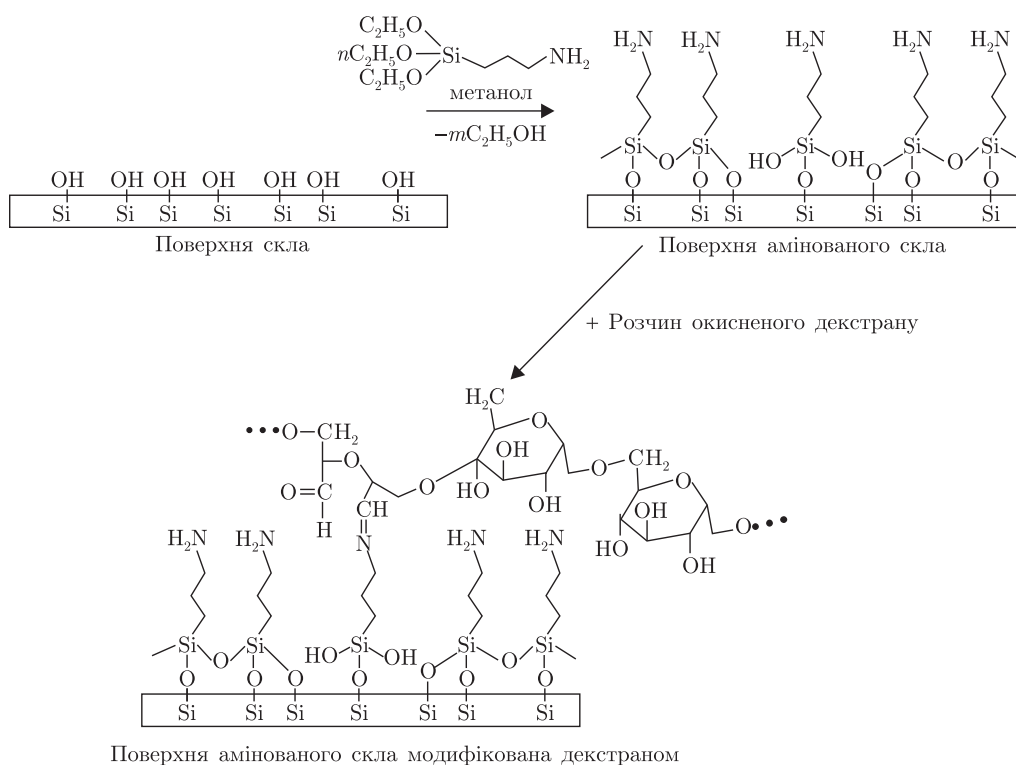


Рис. 1. Модифікації поверхні скла прищепленням наносаром декстрану

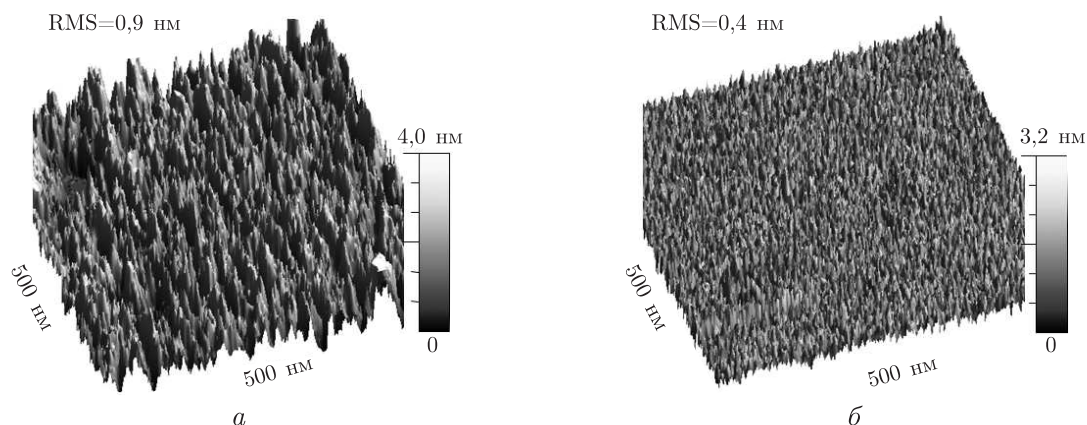


Рис. 2. Топографії поверхонь, отриманих методом атомно-силової мікроскопії: амінованого скла (а) та амінованого скла, модифікованого прищепленням наносаром діальдегіддекстрану (б)

Згідно з даними еліпсометрії, змінюється структура поверхні, а усереднена товщина прищепленого наносару 3-амінопропіл(триетокси)силану становить 0,5 нм. Товщина прищепленого наносару діальдегіддекстрану 0,5–5 нм і залежить від умов проведення реакції. Змінюючи час прищеплення діальдегіддекстрану можна досягти різного ступеня модифікації поверхні.

На рис. 2 наведено АСМ мікрофотографії поверхонь амінованого скла та амінованого скла з прищепленням наносаром декстрану. Слід відзначити, що поверхня амінованого скла та поверхня амінованого скла з прищепленням наносаром діальдегід декстрану значно від-

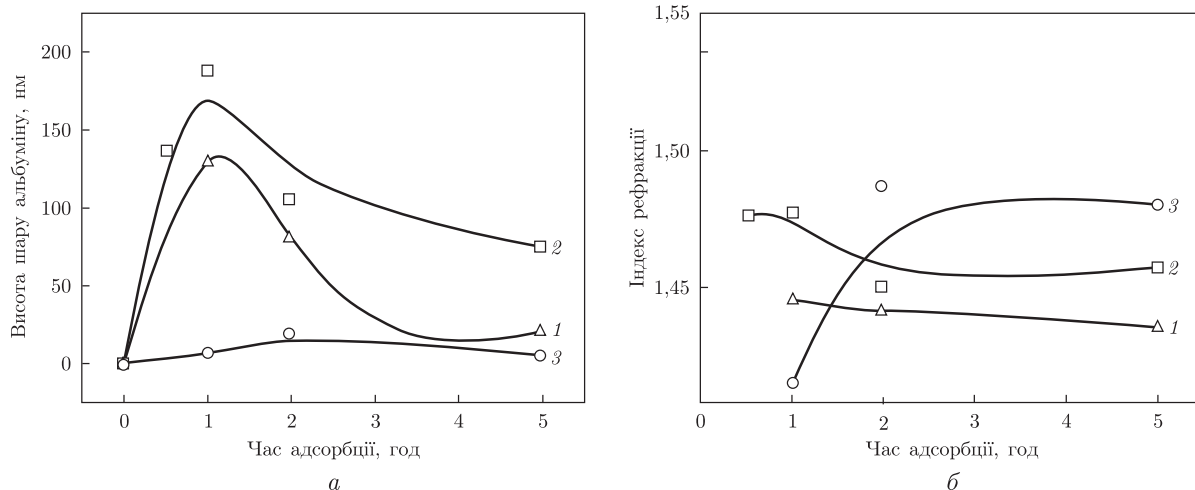


Рис. 3. Залежність висоти нанопару альбуміну (а) та індексу рефракції отриманої плівки (б) від часу адсорбції альбуміну:

1 — поверхня скла; 2 — поверхня скла, що модифікована 3-амінопропіл(триетокси)силаном; 3 — поверхня скла, що модифікована 3-амінопропіл(триетокси)силаном та декстраном

різняються за своєю структурою, зокрема RMS (середньоквадратична шорсткість) поверхні амінованого скла становить 0,9 нм, а RMS поверхні амінованого скла з прищепленим нанопаром діальдегід декстрану — 0,4 нм. Крім того, істотно помінявся рельєф у площині поверхні (відстань між сусідніми піками).

Перспективність застосування отриманих поверхонь у біоінженерії було оцінено дослідженням адсорбції бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та проліферації фібробластів лінії NIH3/T3 на модифіковані поверхні.

БСА є найбільш цікавим білком для створення біосумісних поверхонь та біосенсорних систем [10–12]. Дослідженню закономірностей його адсорбції на поверхні різного типу присвячено ряд публікацій [10–13]. Однак слід відзначити, що в цих публікаціях незначну увагу приділено вивченню структури утвореного нанопару альбуміну. Крім того, не достатньо висвітлено питання адсорбції альбуміну на поверхні, які модифіковані полісахаридом декстраном, хоча є публікації, в яких показано здатність утворювати стійкі комплекси між макромолекулами декстрану та альбуміну в розчині [14]. Тому особливо перспективною, на наш погляд, є адсорбція альбуміну на поверхні, попередньо модифікованої прищепленим нанопаром декстрану.

На рис. 3 наведено залежності висоти (а) та показника заломлення (б) поверхневого нанопару альбуміну від часу його адсорбції з цитратно-фосфатного буфера (концентрація розчину альбуміну 0,2 мг/л, рН 7,4). Ці дані дозволяють порівняти кінетику процесу адсорбції альбуміну на чистій скляній та модифікованій силаном і полісахаридом поверхнях. З рисунку видно, що після швидкого зростання товщини адсорбованого шару на поверхні скла відбувається часткова десорбція альбуміну. Після п'ятигодинної тривалості процесу встановлюється динамічна рівновага, яка веде до формування на поверхні термодинамічно стійкого нанопару. Максимум адсорбційної здатності спостерігається для тривалості процесу 1 год. Такі самі закономірності зберігаються і для амінованої поверхні, яка характеризується дещо більшою адсорбційною здатністю, про що свідчать відповідні залежності (див. рис. 2).

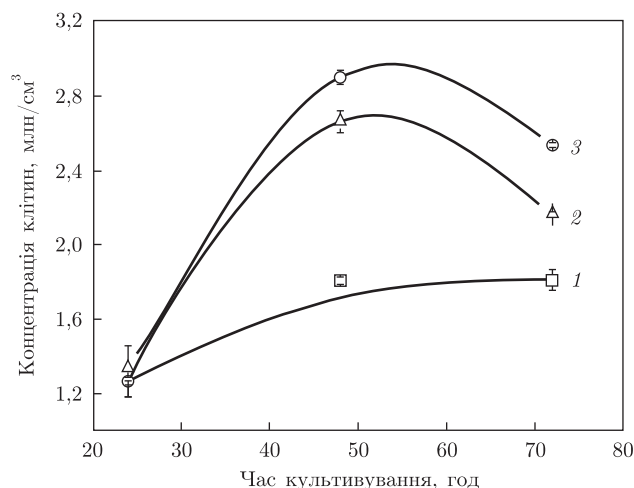


Рис. 4. Залежність інтенсивності проліферативного росту культури клітин фібробластів лінії NIH3/T3 на модифікованих поверхнях від часу культивування:
 1 — поверхня скла; 2 — поверхня скла, що модифікована 3-амінопропіл(триетокси)силаном; 3 — поверхня скла модифікована 3-амінопропіл(триетокси)силаном та декстраном

Істотно відмінною є кінетика процесу на модифікованій декстрином поверхні. Висота наночару альбуміну після досягнення певної величини (~20 нм) практично не змінюється. Однак в процесі адсорбції спостерігається значне зростання індексу рефракції адсорбованої плівки, що свідчить про утворення ущільненого наночару альбуміну на поверхні, модифікованій декстраном. Така значна відмінність у параметрах адсорбованих наночарів альбуміну на поверхнях різної природи може також свідчити про істотні конформаційні відмінності макромолекул альбуміну на різних поверхнях.

Важливим показником біосумісності поверхні є її здатність стимулювати проліферацію клітин, інтенсивність проліферації. У порівнянні з поверхнею скла (на 48 год) спостерігається значне зростання проліферації клітин на поверхнях, модифікованих 3-амінопропіл(триетокси)силаном та 3-амінопропіл(триетокси)силан/декстраном. Кількість клітин на поверхні цих зразків дещо знижується до 72 год, однак при порівнянні з поверхнею скла залишається вищою практично в два рази.

Таким чином, у результаті проведеної нами роботи було запропоновано простий спосіб формування декстрановмісного покриття на поверхні зразків скла. Методами еліпсометрії, АСМ та вимірювання контактного кута змочування поверхні водою показано високу ефективність запропонованих реакцій модифікації поверхні. Досліджено здатність до адсорбції БСА на скляній та модифікованих силаном і полісахаридом поверхнях. Найбільш стійкі, щільно упаковані наночари альбуміну утворюються на поверхнях, модифікованих декстраном, що може бути пов'язане з утворенням альбумін-декстранових комплексів.

При порівнянні даних проліферативного росту культур на поверхнях скла з різної хімічної природи можна стверджувати, що значне підвищення клітинного росту спостерігається на поверхні скла, модифікованої 3-амінопропіл(триетокси)силан/декстраном.

1. Castner D., Ratner B. Biomedical surface science: Foundations to frontiers // Surface Sci. – 2002. – **500**. – P. 28–60.
2. Andrade J. D., Hlady V. Protein adsorption and material biocompatibility: A tutorial review and suggested hypothesis // J. Polym. Sci. – 1986. – **79**. – P. 1–63.

3. Walker R., Krishnaswamy S. The contribution of the substrate-membrane interaction to catalysis // J. Biol. Chem. – 1994. – **269**. – P. 27441–27450.
4. Anselme K., Davidson P., Popa A. et al. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale // Acta Biomater. – 2010. – **6**. – P. 3824–3846.
5. Voronov S., Tokarev V., Samaryk V. et al. Chemische Modifizierung peroxidierter Polymeroberflächen für die Anwendung in der Medizin // Abstract book of Int. Symp. “Technomer”. – 2003. – P. 118.
6. Miksa D., Irish E. R., Chen D. et al. Dextran Functionalized Surfaces via Reductive Amination: Morphology, Wetting, and Adhesion // Biomacromolecules. – 2006. – **7**. – P. 557–564.
7. Kim J., Seidler P., Wan L. S., Fill C. Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates // J. Coll. and Interf. Sci. – 2009. – **329**. – P. 114–119.
8. Лисичкин Г. В., Фадеев А. Ю., Сердан А. А., Нестеренко П. Н., Мингалев П. Г., Фурман Д. Б. Химия привитых поверхностных соединений / Под ред. Г. В. Лисичкина. – Москва: Физматлит, 2003. – 592 с.
9. Кочетков Н., Бочков А., Дмитриев Б. Химия углеводов. – Москва: Химия, 1967. – 672 с.
10. Brynda E., Houska M. Ordered multilayer assemblies: Albumin/heparin for biocompatible coatings and monoclonal antibodies for optical immunosensors / Ed. Y. Lvov, H. Mohwald. – Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Technology. – New York: Marcel Dekker, 2000. – P. 251–286.
11. Rabe M., Verdes D., Seeger S. Surface-induced spreading phenomenon of protein clusters // Soft Matter. – 2009. – **5**. – P. 1039–1047.
12. Sapsford K., Ligler F. Real-time analysis of protein adsorption to a variety of thin films // Biosensors and Bioelectronics. – 2004. – **19**. – P. 1045–1055.
13. Ladam G., Schaaf P., Decher G. et al. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films // Biomolec. Eng. – 2002. – **19**. – P. 273–280.
14. Ponder E., Ponder R. The interaction of dextran with serum albumin, gamma globulin and fibrinogen // J. Gener. Phys. – 1960. – **43**. – P. 753–758.

Національний університет “Львівська політехніка”
Львівська комерційна академія
Інститут біології тварин НАН України, Львів

Надійшло до редакції 25.10.2012

**М. А. Огар, Ю. Б. Стецишин, А. М. Коструба, Н. Г. Маринцова,
Л. Р. Журахивская, С. В. Федорова, О. В. Штапенко, В. П. Новиков**

Формирование и свойства декстрансодержащих покрытий для контролируемой адсорбции альбумина и выращивания клеток

На поверхности стеклянной пластинки был сформирован привитый нанослой 3-аминопропил(триэтокси)силана, содержащий в своей структуре перинные аминные группы. При участии этих аминогрупп к поверхности модифицированного стекла прививали диальдегиддекстран, полученный частичным окислением декстрана периодатной кислотой. Процесс прохождения модификации поверхности контролировали методами эллипсометрии, атомно-силовой микроскопии и определением контактных углов смачивания поверхности водой. На поверхностях исследованы адсорбция бычьего сывороточного альбумина и интенсивность пролиферативного роста культуры фибробластов линии NIH3/T3.

M. O. Ohar, Yu. B. Stetsyshyn, A. M. Kostruba, N. G. Marintsova,
L. R. Zhurakhivska, S. V. Fyodorova, O. V. Shtapenko, V. P. Novikov

**The formation and properties of a dextran-containing coating for
controlled adsorption of albumin and the growth of cells**

On the glass surface, a grafted nanolayer of (3-aminopropyl)triethoxysilane, whose structure includes the primary aminogroups, has been formed. With participation of these aminogroups, dialdehydedextran obtained by the partial oxidation of the anhydroglucopyranoside subunits of dextran by periodate acid was covalently grafted to the surface of a modified glass. The process of surface modification has been controlled, by using the methods of ellipsometry and atomic-force microscopy and by measuring the contact angles of moistening. The adsorption of bovine serum albumin and the proliferation activity of the cells-fibroblasts NIH3/T3 line have been examined.