

# Высокомолекулярные соединения

## Серия Б

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, Серия Б, 2003, том 45, № 9, с. 1574–1579

УДК 541.64:547.96

### НАНЕСЕНИЕ МНОГОСЛОЙНОГО БЕЛКОВОГО ПОКРЫТИЯ НА ПОВЕРХНОСТЬ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТА<sup>1</sup>

© 2003 г. А. Ю. Соловьев\*, Е. Brynda\*\*, М. Houska\*\*, М. Bleha\*\*, Л. К. Шатаева\*

\*Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук  
199004 Санкт-Петербург, Большой пр., 31

\*\*Institute of Macromolecular Chemistry Academy of Sciences of the Czech Republic  
Heyrovsky sq. 2, 16206 Prague 6, Czech Republic

Поступила в редакцию 21.11.2002 г.

Принята в печать 15.05.2003 г.

Путем последовательной сорбции сывороточного альбумина и декстрансульфата получены многослойные, сшитые глутаровым альдегидом белковые покрытия на поверхности пленок ПЭТФ и ПЭ, а также на трековых мембрanaх из ПЭТФ. Покрытия устойчивы в широком диапазоне pH и ионной силы. Методами ИК-спектроскопии подтверждено существование полученных белковых покрытий на поверхности полимеров и рассчитано количество белка, связанного в каждом слое. Методом измерения контактных углов смачивания полимерной поверхности с белковым покрытием показано, что гидрофильно-гидрофобные свойства поверхности изменяются при нанесении каждого белкового слоя. Установлено, что покрытие практически не меняет гидродинамического сопротивления трековой мембрany потоку фильтрата.

### ВВЕДЕНИЕ

Использование полимерных материалов в биотехнологии, медицинской технике и пищевой промышленности требует, как правило, модификации их поверхности для улучшения функциональных свойств. Формирование многослойных покрытий как один из методов модификации является предметом многих исследований. Природа полимерной поверхности и характер компонентов, составляющих покрытие, определяют выбор применяемой методики: от химической пришивки олигомеров до нанесения многослойных покрытий [1–3]. Обычно такие системы состоят из последовательно сорбируемых слоев полизелектро-

литов, несущих суммарные заряды противоположного знака.

В работах [4, 5] авторы исследовали формирование молекулярных слоев альбумина, фибриногена, иммуноглобулинов и других белков на разных полимерных поверхностях, таких как ПЭ, ПС, ПУ и другие. Однако закономерности формирования молекулярных ансамблей до сих пор недостаточно изучены, особенно для полимерных поверхностей сложного рельефа.

В настоящей работе исследовали нанесение многослойного покрытия сывороточного альбумина (СА) на поверхность ПЭТФ в двух формах: однородной пленки и трековых мембрaн, изготовленных из этой пленки. В этом случае использование трековых мембрaн позволяет осуществлять фиксацию полислоев на поверхности, достаточной для использованных аналитических методов. СА был выбран потому, что в ряде исследований было показано повышение гемосов-

<sup>1</sup> Работа выполнена при поддержке Grant Agency of the Czech Academy of Sciences (Contract IAA4050006), the Grant Agency of the Czech Academy of the Czech Republic (Contract 203/02/1326A) and the Ministry of Education of the Czech Republic (Contract LN00A065).

E-mail: soloviev@mail.macro.ru (Соловьев Андрей Юрьевич).

местимости полимерных поверхностей, покрытых СА [6].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали пленку ПЭТФ толщиной 10 мкм и изготовленные из нее трековые мембранных двух образцов с диаметром пор 500 и 120 нм производства Объединенного Института ядерных исследований (Дубна), а также для сравнения пленку ПЭНП толщиной 50 мкм. Для сорбционной иммобилизации и нанесения многослойного покрытия использовали бычий сывороточный альбумин и дектрансульфат с  $M = 10^4$  фирмы "Sigma" (ФРГ). Растворы этих компонентов при концентрации 1 мг/мл готовили в 0.01 моль/л цитратном буфере при pH 4 с добавлением NaCl до ионной силы 0.1. Сшивющим агентом служил 0.2%-ный раствор глутарового альдегида в цитратном буфере.

Перед использованием ПЭТФ- и ПЭ-пленки очищали последовательной промывкой толуолом, ацетоном, метанолом, дистиллированной водой. Трековые мембранные кондиционировали по методике [7].

Сорбцию белка на ПЭТФ-, трековых мембранных и ПЭ изучали в статических условиях. Емкость сорбции СА на исследуемых полимерах рассчитывали по разности его концентраций в исходном и равновесном растворах по оптической плотности при  $\lambda = 280$  нм и относили к единице поверхности полимерного материала. Как известно, трековые мембранные имеют цилиндрические поры с узким распределением по размерам, поэтому пористость и удельную поверхность трековых мембранных рассчитывали по данным сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

СЭМ интактных и модифицированных образцов трековых мембранных проводили на электронном микроскопе марки Vega Plus TS 5135 MM. Для этого методом вакуумного напыления предварительно наносили на образцы мембранных слой платины толщиной 40–50 Å.

Для нанесения полимолекулярных слоев альбумина на поверхность исследуемых полимеров была использована методика [4]. Для этого образцы пленок ПЭТФ, ПЭ и трековых мембранных с диаметром пор 500 нм нарезали на полоски 2 × 9 см и выдерживали до установления равновесия на

поверхности раздела фаз жидкость–твердое тело в цитратном буфере в течение 15 мин. Сорбцию СА и дектрансульфата проводили в статических условиях, последовательно замещая растворы полиэлектролитов. После каждой стадии сорбции образцы отмывали от избытка полиэлектролита. Степень промывки контролировали по оптической плотности промывных вод при  $\lambda = 280$  нм. Процесс включает в себя следующие этапы: полислоиную сорбцию СА, дектрансульфата, СА, дектрансульфата, СА; ковалентную сшивку слоев СА с помощью глутарового альдегида при 25°C; удаление дектрансульфата из многослойного покрытия исчерпывающей промывкой фосфатным буфером при pH 7.4. В этой области pH молекулы СА приобретают суммарный отрицательный заряд, и межмолекулярные связи СА и дектрансульфата разрушаются.

Полученные модифицированные мембранные сушили при 25°C в ламинарных потоках сухого воздуха течение 2 ч, после этого снимали ИК-спектры и измеряли контактные углы смачивания исходных и модифицированных пленок.

ИК-спектры снимали на спектрофотометре "Perkin-Elmer" (модель 580) методом МНПВО с использованием призмы из германия с углом 45° и числом отражений 32. Количество белка в покрытии определяли по интегральной площади спектров при характеристической полосе поглощения Амид II в области 1549 см<sup>-1</sup>.

Объемные потоки для интактных и модифицированных трековых мембранных по отношению к фосфатному буферному раствору исследовали при постоянном гидростатическом давлении водного столба. Для этого образец помещали в мембранный ячейку и измеряли скорость протекания буферного раствора в единицу времени при постоянном давлении.

Контактные углы смачивания пленок фосфатным буфером определяли по методу пластинки Вильгельми на приборе "Kruss-12" (ФРГ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Макромолекулы СА, имеющие в растворе форму эллипсоида вращения 132 × 38 Å [8] с изоэлектрической точкой в области pH 4.9, характеризуются неоднородным распределением на поверхности глобул гидрофобных и гидрофильных

**Таблица 1.** Характеристики полимерных поверхностей и сорбции СА на них при pH 4

Полимер	Титруемое количество групп COOH на 1 см <sup>2</sup> [13]	Удельная площадь поверхности полимера $S_{уд}$ , м <sup>2</sup> /г	Емкость полимера по отношению к белку $m_{ср} \pm 0.03$ , мкг/см <sup>2</sup>	Площадь поверхности полимера на 1 молекулу белка, нм <sup>2</sup>
ПЭ	—	0.073	0.14	71.4
ПЭТФ	$3 \times 10^{12}$	0.071	0.25	40.1
Трековая мембрана (500 нм)	$5 \times 10^{13}$	0.97	0.24	41.7
Трековая мембрана (120 нм)	$8 \times 10^{13}$	1.11	0.20	49.9

участков, а также положительных и отрицательных зарядов; это определяет их поверхностно-активные свойства. Известно, что СА имеет собственный дипольный момент [9]. Это позволяет предполагать определенное влияние электростатических и гидрофобных взаимодействий при ориентации макромолекулы в процессе сорбции на поверхности полимера. Из литературы известно [10], что при упаковке на поверхности полимера ориентация большой оси макромолекулы может быть направлена как параллельно, так и по нормали к поверхности.

ПЭТФ относится к умеренно гидрофобным полимерам, на поверхности которых имеются полярные и неполярные участки. Как известно, альбумин проявляет высокое сродство к гидрофобным поверхностям, поэтому в качестве системы сравнения был выбран ПЭ, имеющий более гидрофобную поверхность [11, 12]. Сорбция СА на ПЭ проходит по гидрофобному механизму, при этом макромолекула ориентируется к поверхности полимера той стороной, где преобладают гидрофобные участки. Трековые мембранны имеют более гидрофильную поверхность из-за щелочного гидролиза ПЭТФ в процессе производства трековых мембранных. Ранее было показано, что концентрация карбоксильных групп на поверхности трековых мембранных, измеренная методом мессбаузеровской спектроскопии, составляет  $5 \times 10^{13}$  групп на 1 см<sup>2</sup> [13].

Полученные результаты по сорбции СА на различных полимерных поверхностях приведены в табл. 1. Большее количество белка, адсорбированного на ПЭТФ по сравнению с ПЭ, можно объяснить дополнительным участием полярных групп остатков терефталевой кислоты в связывании положительно заряженных групп СА. При

изменении ионной силы раствора от 0.02 до 5 моль/л и повышении pH среды до 9.6 не наблюдалось десорбции белка, сорбированного в первом слое, что свидетельствует о преимущественно неполярном (гидрофобном) характере взаимодействия белка с поверхностью этих полимеров.

При pH 4 молекула СА находится ниже своей изоточки и имеет суммарный положительный заряд (изоточка СА pH 4.9), тогда как декстрансульфат несет отрицательный заряд за счет своих сульфатных групп. Поэтому сорбция декстрансульфата на слой СА происходит под действием ион-ионных взаимодействий этих макромолекул. Количество декстрансульфата при сорбции на слой белка составляет ~0.12 мкг/см<sup>2</sup> [4]. После переноса полимерной подложки со сформированными слоями (СА + декстрансульфат) в раствор СА следующий слой белка сорбируется по свободным сульфатным группам полиэлектролита. Таким образом, при последовательной сорбции компонентов достигается требуемое количество слоев. Эти операции повторяли  $N$  раз и завершали сорбцией СА для получения ( $N + 1$ ) белковых слоев.

При pH 4 многослойное покрытие остается стабильным. Однако при отсутствии ковалентной сшивки слоев СА изменение pH раствора от 4 до 7.4 приводит к перезарядке слоев СА и последующей десорбции всех слоев, за исключением первого белкового слоя, сорбированного на поверхность полимера под действием гидрофобных сил. Это подтверждает электростатическую природу сил между слоями СА и декстрансульфата.

Сшивка многослойного покрытия СА глутаровым альдегидом проходит при pH 4 в мягких условиях, что способствует сохранению нативной конформации белка [14]. В основе сшивки лежит реакция поликонденсации с образованием шиф-

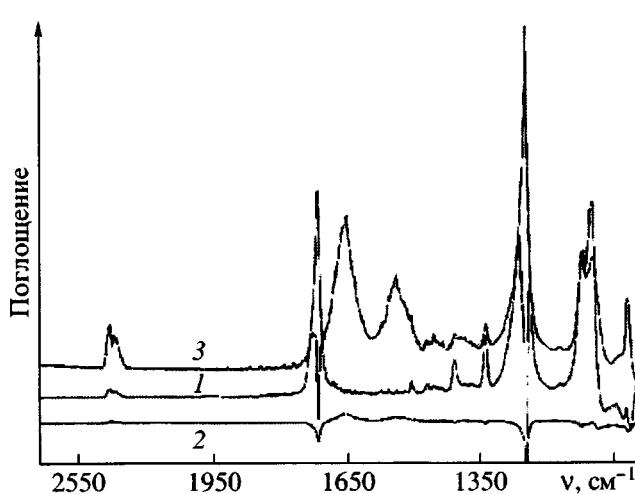


Рис. 1. ИК-спектры СА, иммобилизованного на поверхности трековых мембран: 1 – интактная мембра, 2 – один слой СА, 3 – четыре ковалентно сшитых слоя СА.

фова основания между альдегидными группами глутарового альдегида и аминогруппами белка. Последующая промывка мембранны с многослойным покрытием в фосфатном буферном растворе при pH 7.4 приводит к перезарядке СА, в результате чего макромолекула приобретает суммарный отрицательный заряд и происходит взаимное отталкивание декстронсульфата от сшитых слоев СА с его последующим вымыванием из покрытия. Таким образом было получено ковалентно сшитое многослойное покрытие СА с разным количеством слоев, прочно зафиксированное гидрофобными взаимодействиями первичного слоя белка на поверхности полимера. Существование многослойного покрытия, состоящего из слоев СА на поверхности полимера, было подтверждено методом ИК-спектроскопии (рис. 1). На спектре хорошо идентифицируются характеристические полосы поглощения для белка: Амид I, соответствующая колебаниям связи C=O в области 1600–1700 см<sup>-1</sup>, и Амид II – в области 1510–1570 см<sup>-1</sup>. Количество связанного СА в каждом слое показано на рис. 2. Из диаграммы видно, что количество СА в белковом покрытии возрастает с увеличением числа наслоений. Следует подчеркнуть, что во втором и последующих слоях наблюдается больший прирост количества СА по сравнению с первым слоем. Этот факт можно объяснить изменением ориентации эллипсоида макромолекулы СА по отношению к сорбционной поверхности, когда она покрыта макро-

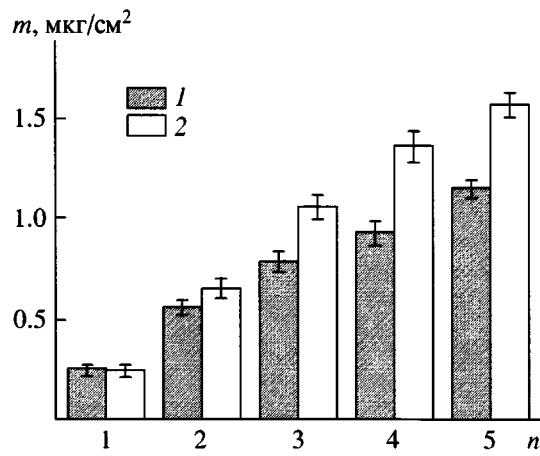


Рис. 2. Количество *m* СА, связанного единицей площади поверхности, при различном числе слоев *n* в покрытии на ПЭТФ (1) и на трековой мембре (2).

молекулами декстронсульфата. Подобные результаты были продемонстрированы в работе [15] при сорбции СА на гидрофильных подложках.

Измерение контактных углов смачивания интактной и модифицированной мембранны фосфатным буфером отражает изменение межфазной энергии на поверхности раздела полимера и водного раствора. СА, иммобилизованный на поверхности мембранны, вносит свой вклад в гидрофильно-липофильный баланс системы за счет гидрофильных участков макромолекулы, экспонированных в сторону раствора. В табл. 2 представлены результаты измерения контактных углов натекания и оттекания при смачивании интактных пленок ПЭ и ПЭТФ, и их

Таблица 2. Динамические контактные углы натекания и оттекания  $\theta_H/\theta_O$  при смачивании из раствора фосфатного буфера при pH 7.4 полимерной поверхности с покрытием  $(\text{CA})_n$

Вид поверхности	Значения контактных углов $\theta_H/\theta_O$ , град	
	ПЭ	ПЭТФ
Интактный полимер (Х)	101/91	83/45
X + СА	95/45	74/2
X + (СА–СА)	98/29	93/17
X + (СА–СА–СА)	100/30	103/28

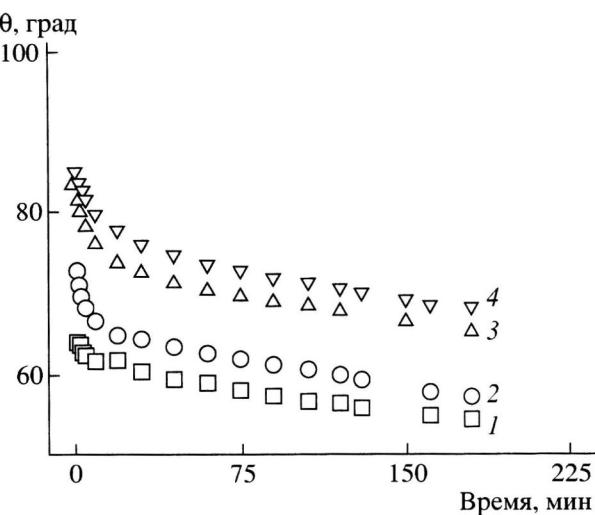


Рис. 3. Зависимость угла натекания  $\theta$  от времени при смачивании раствором фосфатного буфера с pH 7.4 интактной мембранны (1), трековой мембранны + СА (2), трековой мембранны + (СА–СА) (3) и трековой мембранны + (СА–СА–СА) (4).

модификаций покрытиями с разным количеством слоев СА на поверхности. Как видно из таблицы, пленка с монослоем белка в режиме динамического измерения обнаруживает большую гидрофильность поверхности по сравнению с исходным полимером. Измерение контактных углов трековых мембран в динамических условиях не проводили из-за замедленной кинетики смачивания пористой поверхности мембранны, что затрудняет интерпретацию результатов.

Статические условия измерения контактных углов смачивания интактных и модифицирован-

ных образцов позволяют проследить за кинетикой этого процесса (рис. 3). Контактный угол смачивания образцов постепенно уменьшается, достигая своего равновесного значения только через несколько часов. Из рис. 3 видно, что дегидратированная мембрана с тремя слоями белка в начальный момент соприкосновения с водной фазой ведет себя как гидрофобная, однако более длительный контакт с растворителем приводит к постепенному уменьшению угла смачивания. Повидимому, этот эффект связан с увеличением гидратации пространственной сетки СА в многослойном покрытии [16].

Из литературы известно, что толщина трех ковалентно спищих слоев СА в фосфатном буфере на стеклянной подложке составляет  $\sim 37$  нм по данным метода атомной силовой микроскопии [17]. Использованный нами метод СЭМ позволил проконтролировать однородность покрытия пор белковыми слоями. На рис. 4 видно, что сечение капилляра сохраняет свою исходную форму окружности при нанесении белкового покрытия, и, кроме того, уменьшение диаметра пор мембранны при нанесении четырехслойного альбуминового покрытия происходит от 500 до  $\sim 440$  нм. В то же время, как показали результаты измерения объемных потоков при использовании модифицированных мембран для микрофильтрации, гидродинамическое сопротивление возрастает не более, чем на 5% по сравнению с интактными.

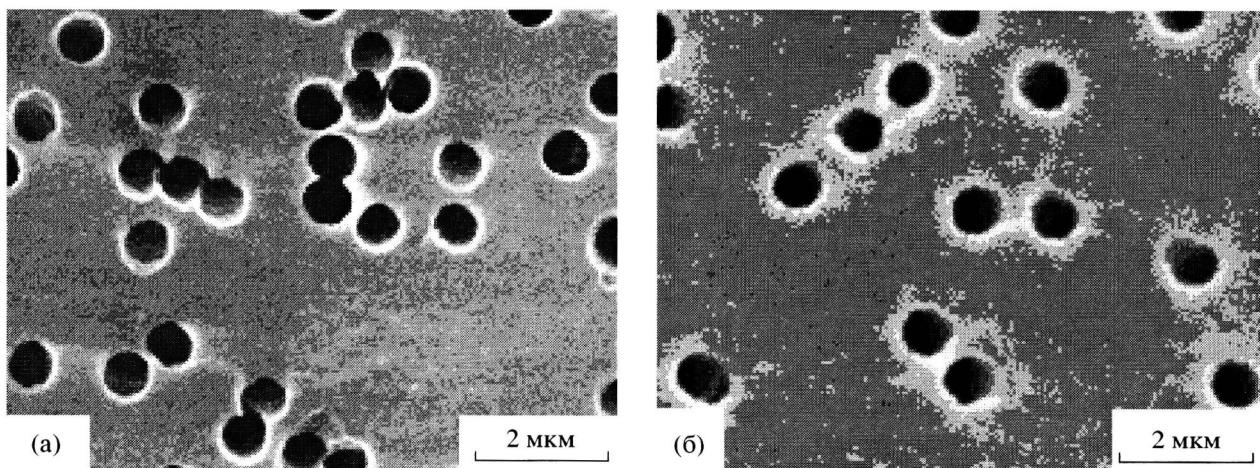


Рис. 4. Микрофотографии СЭМ интактной мембранны до (а) и после нанесения четырехслойного альбуминового покрытия (б).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Праценко С. А., Яскевич А. Л., Бильдюкович А. В., Мовчанский М. А. // Высокомолек. соед. А. 2002. Т. 44. № 7. С. 1192.
2. Papra A., Hicke H.-G., Dieter P. // J. Appl. Polym. Sci. 1999. V. 74. № 7. P. 1669.
3. Ermolaev S.V., Jitariouk N., Moel L. A. // Nuclear Instrument and Methods in Physics Research. 2001. Section B. V. 185. № 1–4. P. 184.
4. Brynda E., Houska M. // Macromol. Rapid. Commun. 1998. V. 19. № 4. P. 173.
5. Houska M., Brynda E. // J. Colloid and Interface Sci. 1997. V. 188. № 2. P. 243.
6. Sevastianov V. I. // CRC Crit. Reviews in Biocompatibility. 1988. V. 4. № 2. P. 109.
7. Шатаева Л. К., Ряднова И. Ю., Нечаев А. Н., Сергеев А. В., Чихачева И. П., Мчедлишвили Б. В. // Коллоид. журн. 2000. Т. 62. № 1. С. 126.
8. Peters T. // Advan. Prot. Chem. 1985. V. 37. P. 167.
9. Sugio S., Kashima A., Moshizuki S., Noda M., Kobayashi K. // Protein. Eng. 1999. V. 12. № 6. P. 439.
10. Malmsten M. // J. Colloid and Interface Sci. 1994. V. 166. № 2. P. 333.
11. Brynda E., Houska M., Pokorna Z., Cepalova N. A., Moiseev Yu. V., Kalal J. // J. Bioeng. 1978. V. 2. № 5. P. 411.
12. Andrade J.D. Surface Chemistry and Physics. New York: Plenum Press, 1985. V. 2
13. Хромов В.И., Плачинда А.С., Камышанский С.И., Суздалев И.П., Шатаева Л.К. // Журн. физ. химии. 1995. Т. 69. № 10. С. 1803.
14. Кузнецова Н.П., Гудкин Л.Р., Михаева Р.Н. // Журн. прикл. химии. 2002. Т. 75. № 6. С. 991.
15. Тарасевич Ю.И., Монахова Л.И. // Коллоид. журн. 2002. Т. 64. № 4. С. 535.
16. Van Oss C.J., Good R.J., Chaudhury M.K. // Langmuir 1988. V. 4. № 4. P. 884.
17. Brynda E., Houska M., Wikerstal A., Pientka Z., Dyr E.J., Branderburg A. // Langmuir. 2000. V. 16. № 9. P. 4352.

**Deposition of Multilayered Protein Coating onto Poly(ethylene terephthalate)****A. Yu. Solov'ev\*, E. Brynda\*\*, M. Houska\*\*, M. Bleha\*\*, and L. K. Shataeva\****\*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,  
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia**\*\*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic,  
Heyrovsky sq. 2, 16206 Prague 6, Czech Republic*

**Abstract**—Using the method of the repeated sorption of serum albumin and dextrane sulfate, multilayered protein coatings crosslinked by glutaric aldehyde were deposited onto the surface of PET and PE films and track-etched PET membranes. The coatings were found to be stable over a wide range of variations in pH and ionic strength. The existence of the as-formed protein coatings on the surface of polymers was proved by IR spectroscopy, and the content of protein in each layer was estimated. By measuring the contact angles for a polymer surface coated with a protein layer, hydrophilic–hydrophobic properties of the surface were shown to be changed upon deposition of each protein layer. The coating was found to have almost no effect on the hydrodynamic resistance of the track-etched membrane to the penetrant flow.