

АДСОРБЦИЯ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА МУЛЬТИСЛОЙНЫХ ПЛЕНКАХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ ПОЛИСАХАРИДОВ

Т.Г. Шутова, А.А. Шеремет, К.С. Ливонович

ГНУ “Институт химии новых материалов НАН Беларуси”, Минск, Республика Беларусь
email: tshutova@yahoo.com

Введение

Биоинертные материалы, на поверхности которых отсутствует неспецифическая адсорбция белков, могут быть использованы при создании медицинских изделий, контактирующих с организмом, нанокапсул для целевой доставки лекарственных препаратов и наночастиц для функциональной диагностики [1]. Химическая модификация поверхности полиэтиленгликолем (ПЭГ) позволяет варьировать ее взаимодействие с макромолекулами белка в растворе [2]. ПЭГ может быть также иммобилизован путем адсорбции привитых сополимеров полиэлектролитов и полиэтиленгликоля на поверхности, имеющей противоположный заряд [3,4,5].

При адсорбции блок-сополимеров полиэлектролитов и ПЭГ цепей неионогенного полимера недостаточно для формирования плотного слоя, обеспечивающего высокую резистентность поверхности к адсорбции белков. Поэтому для придания биоинертности поверхность дополнительно модифицируют ковалентно связанным слоем ПЭГ [6] или используют производные ПЭГ с разветвленной структурой, например, блок-сополимер полистиролсульфоната (ПСС) с поли(метокси(полиэтиленгликоль)акрилатом [7].

Согласно современным представлениям адсорбция белков на ПЭГилированных поверхностях, характеризующихся высокой степенью гидратации полиэтиленгликоля водой, термодинамически невыгодна, поскольку должна сопровождаться вытеснением воды из привитого слоя [8,9].

Мультислойные пленки, сформированные методом послойной сборки на основе биополимеров, проявляют антикоагуляционные, тромборезистентные, антибактериальные свойства и могут выполнять роль резервуара для капсулирования биоактивных молекул (белков, лекарственных соединений, ДНК) [10]. Несмотря на то, что мультислойные пленки биополиэлектролитов содержат до 95% мас. воды [10], адсорбция альбуминов и иммуноглобулинов на их поверхности значительна [11].

Хитозан (Х) является природным полимером, молекулярная масса, доля ацетилированных (χ_{Ac}) и деацетилированных (χ_{Am}) N-глюкозаминовых звеньев в основной цепи которого варьируется в зависимости от условий получения полисахарида [12]. Аминогруппы хитозана могут быть ковалентно модифицированы полиэтиленгликолем. В зависимости от соотношения ПЭГ и хитозана при синтезе доля звеньев, модифицированных ПЭГ ($\chi_{пэг}$), в привитых сополимерах Х-ПЭГ может достигать 0,56 [13]. Модифицирование хитозана полиэтиленгликолем существенно увеличивает растворимость полисахарида в воде и улучшает его биосовместимость [12,14,15]. Дегградация ферментами протеинов и пептидных лекарств в комплексах с модифицированными полиэтиленгликолем хитозанами уменьшается, тем самым увеличивается их эффективность [15,16]. Сополимеры хитозана и ПЭГ уменьшают адсорбцию белков на поверхности пленок, сформированные методом послойной сборки [13].

Цель работы – исследование влияния структуры привитых сополимеров хитозана и полиэтиленгликоля на свойства тонких пленок, сформированных методом послойной сборки Х-ПЭГ и декстран сульфата, и адсорбцию белков сыворотки крови на их поверхности.

Методы исследования

В работе использованы: хитозан средней молекулярной массы (Х1, степень деацетилирования 75–85%, Sigma), полиэтиленгликоль 5 кДа (ПЭГ1, Sigma), декстран

сульфат (ДекС, Sigma), полиэтиленимин (ПЭИ, Sigma), полистиролсульфонат (ПСС, Sigma), эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), поставленная компаниями Sigma, происхождение – США, и NuClone, GE Healthcare, происхождение - Южная Америка.

Деполимеризованный хитозан X2 получали обработкой X1 1,4% пероксидом водорода по методике [13]. Молекулярные массы исходного и деполимеризованного хитозана определяли вискозиметрически в 1% уксусной кислоте. Средневязкостную молекулярную массу хитозанов рассчитывали по уравнению Марка-Куна-Хаувинка ($K=1,38 \cdot 10^{-4}$, $\alpha=1,02$) [17].

Деполимеризованные полиэтиленгликоли с молекулярной массой 0,9 кДа (ПЭГ2) и 1,6 кДа (ПЭГ3) и полиэтиленгликоль ПЭГ1 с концевыми карбоксильными группами получали согласно [18]. Концентрацию карбоксильных групп в окисленном полиэтиленгликоле определяли спектрофотометрически (Solar CM 2203, Беларусь). Метод основан на переводе карбоновых кислот в этиловые эфиры, которые взаимодействуют с гидроксиламином и хлорным железом с образованием окрашенного гидроксамового комплекса [19]. Для построения калибровочного графика использовали уксусную кислоту. Среднюю молекулярную массу полученных образцов определяли вискозиметрически, используя эталонные ПЭГ с молекулярной массой 1,5 и 5,0 кДа для определения коэффициентов в уравнении Марка-Куна-Хаувинка.

Спектры ИК с Фурье преобразованием полимеров записывали на приборе Tensor 27, Bruker в таблетках KBr. Отнесение полос поглощения в ИК спектрах хитозанов проводили согласно [20,21]. Степень ацетилирования (СА) хитозана рассчитывали по формуле:

$$CA = A_{1625}/A_{3450} \cdot 100/1,3 \quad (1),$$

где A_{1625} и A_{3450} – интенсивность полос поглощения с частотой 1625 и 3450 cm^{-1} в ИК спектре образца [20].

Хитозаны различного молекулярного веса с привитым полиэтиленгликолем X-ПЭГ получали в фосфатном солевом буфере (рН 7,4), используя 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодииимид и N-гидроксисульфосукцинимид в качестве сшивающих агентов [2]. Количество незамещенных $-\text{NH}_2$ групп в X-ПЭГ определяли с использованием красителя метиленового синего и к-каррагинана [22].

Количественные закономерности чередующейся адсорбции хитозанов различной структуры и декстран сульфата изучали методом кварцевого микровзвешивания на приборе QCM200 (Stanford Research Systems, США) с использованием жидкостной проточной ячейки. QCM 200 позволяет измерить частоту колебаний (F) и динамическое сопротивление (R) кварцевого резонатора с фундаментальной частотой колебаний 5 МГц. Резонатор с золотой рабочей поверхностью помещали в измерительную ячейку прибора, которую заполняли дистиллированной водой. Затем через ячейку быстро пропускали 2 мл раствора полиэлектролита с концентрацией 1 мг/мл (рН 6,0) и регистрировали изменение F и R во времени до установления постоянных значений (в течение 3–5 мин). Избыток полимера удаляли, подавая в ячейку 3 мл воды. Чередую адсорбцию положительно и отрицательно заряженных компонентов, формировали покрытие с заданным числом бислоев n. Перед адсорбцией полисахаридов поверхность резонатора модифицировали тремя бислоями ПЭИ/ПСС для получения равномерного распределения заряда на поверхности резонатора. После нанесения заданного числа бислоев хитозан/декстран сульфат ячейку заполняли ЭТС и оставляли на 1 ч. Неадсорбированную фракцию белков ЭТС удаляли, пропуская через ячейку 10 мл воды.

Массу адсорбированного вещества (m) рассчитывали по уравнению Сауэрбрея [23]:

$$m = - \Delta F/C \quad (2),$$

где ΔF – изменение частоты колебаний кварцевого резонатора, Гц; C – константа прибора ($56,6 \text{ Гц мкг}^{-1} \text{ см}^2$). Расчет толщины пленок проводили, принимая плотность материала равной $1,3 \text{ г/см}^3$ [24].

Гидрофильность поверхности мультислойных пленок (X-ПЭГ/ДекС)_{5.5} характеризовали тангенсом краевого угла смачивания ($\text{tg}\theta$) методом растекающейся капли [25]. На предварительно гидрофилизированной поверхности стекла адсорбировали требуемое число бислоев X-ПЭГ/ДекС из их водных растворов (1 мг/мл, рН 6,0). Перед измерением пленки высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 24 ч. Измерения краевого угла смачивания проводили при 42% влажности и температуре $18 \pm 1^\circ\text{C}$ через 30 с после нанесения капли (10 $\mu\text{л}$) H_2O на поверхность пленки. Значения $\text{tg}\theta$ усредняли по пяти измерениям для каждого образца.

Морфологию поверхности пленок исследовали с помощью сканирующего зондового микроскопа *MultiMode Nanoscope III (Veeco, USA)* в режиме высоты. Условия сканирования: скорость – 3–5 Гц; кантилевер из нитрида кремния с константой жесткости 0,12 Н/м. Плотность информации составляла 512×512 пикселей. Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения *Nanoscope v531*.

Результаты и обсуждение

Средневязкостная молекулярная масса хитозанов X1 и X2 равна 460 и 18 кДа, соответственно. Обработка X1 1,4% раствором пероксида водорода в кислой среде приводит к деполимеризации основной цепи полимера, но не вызывает деацетилирования N-ацетил-D-глюкозаминовых звеньев полисахарида. Концентрация аминогрупп в хитозанах X1 и X2 составляет $5,4 \pm 0,4$ и $4,6 \pm 0,5$ ммоль/г, соответственно. По данным ИК спектроскопии доля N-ацетилированных глюкозаминовых звеньев в структуре немодифицированного хитозана X1 равна $0,25 \pm 0,03$, а деполимеризованный хитозан X2 имеет сравнимую с исходным полисахаридом долю ацетилированных звеньев ($0,26 \pm 0,09$). В дальнейшем при расчетах величину χ_{Ac} принимали равной 0,25 для всех образцов.

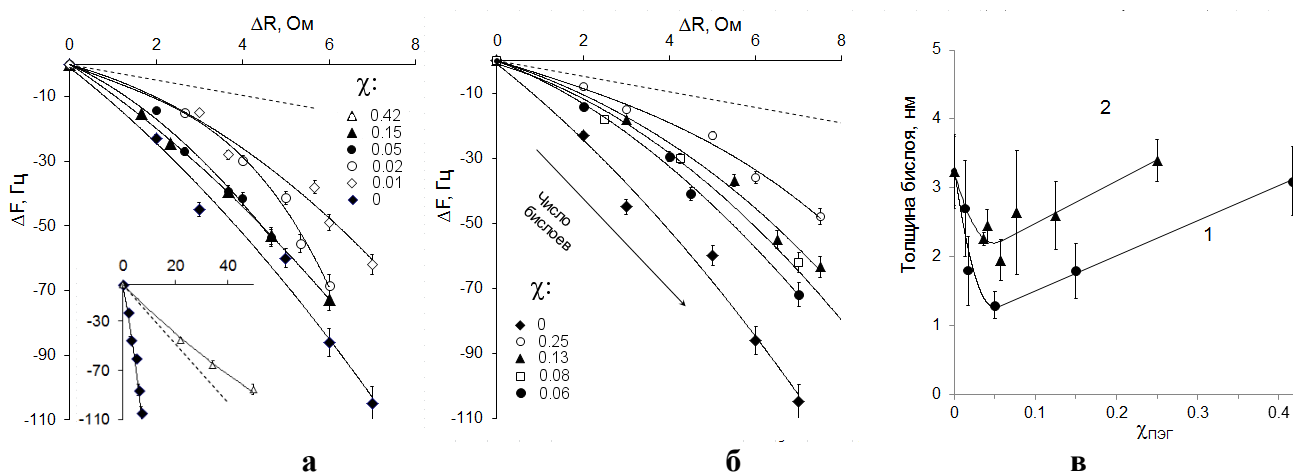
Хитозаны X1 и X2 ковалентно модифицировали боковыми цепями полиэтиленгликоля, имеющего различную молекулярную массу. Доля аминогрупп, модифицированных ПЭГ, в синтезированных сополимерах X-ПЭГ находится в пределах от 0 до 0,42. Степень прививки g характеризует суммарное число N-ацетил-глюкозаминовых и глюкозаминовых звеньев основной цепи, приходящихся на одну боковую цепь полиэтиленгликоля. Значения g для синтезированных сополимеров, рассчитанные на основе экспериментальных значений $\chi_{пэг}$, варьируются от 2,4 до 75. Таким образом, в сополимерах X-ПЭГ доля имеющих незамещенную аминогруппу звеньев χ_{Am} превышает 0,33. Они доступны для формирования интерполиэлектролитного комплекса с ДекС.

В процессе чередующейся адсорбции сополимера X-ПЭГ и ДекС на поверхности резонатора ΔF уменьшается (рис. 1 а, б), что указывает на рост пленки на его поверхности. При этом ΔR в процессе формирования пленки увеличивается незначительно, для 5 бислоев X-ПЭГ/ДекС величина ΔR не превышает 10 Ом.

Следует отметить, что для всех исследованных сополимеров X-ПЭГ кривые зависимости ΔF от ΔR в процессе формирования пленки лежат ближе к оси абсцисс, чем для исходного хитозана (рис. 1 а, б). Величина $\Delta F/\Delta R$ характеризует вязкоэластичные свойства материала на поверхности резонатора [26]. Для пленок (X-ПЭГ/ДекС)_n значения $\Delta F/\Delta R$ в несколько раз меньше, чем для ньютоновских жидкостей ($-2,4 \text{ Гц/Ом}$), оказывающих только вязкую нагрузку на резонатор. Это свидетельствует о высокой жесткости формируемых слоев полисахаридов. Тем не менее, мультислои, сформированные на основе сополимеров хитозана с полиэтиленгликолем, менее жесткие, чем на основе немодифицированного полимера. Для пленок на основе немодифицированного хитозана величина $\Delta F/\Delta R$ равна $-12 \pm 1 \text{ Гц/Ом}$, в то время как для X1-ПЭГ1 и X1-ПЭГ2 она составляет $-11,0 \pm 0,6$ и $-7,9 \pm 2,0 \text{ Гц/Ом}$, соответственно. Лишь для сополимера X1-ПЭГ1 с $\chi_{пэг}=0,42$ кривая $\Delta F-\Delta R$ лежит

ближе к оси абсцисс, чем кривая вязкой нагрузки (рис 1 а, вставка). При адсорбции этого сополимера, имеющего максимальное число привитых боковых цепей ПЭГ1 на единицу длины основной цепи, происходит образование островков насыщенного водой геля, что существенно увеличивает диссипацию энергии колебаний резонатора.

С увеличением числа бислоев X-ПЭГ/ДекС в пленке отрицательное значение тангенса угла наклона кривых ΔF - ΔR увеличивается (рис. 1 а, б), т.е. растет жесткость материала, адсорбированного на поверхности резонатора. Это может быть связано с формированием плотно упакованной пленки, имеющей меньше дефектов, и постепенным формированием слоя из цепей ПЭГ, направленных перпендикулярно к поверхности пленки [26].



Точки соответствуют целым значениям числа бислоев n . Прерывистая линия - вязкая нагрузка. а) X1-ПЭГ1, вставка – кривая для $\chi_{\text{ПЭГ}}=0,42$, б) X1-ПЭГ2. в) Влияние $\chi_{\text{ПЭГ}}$ на толщину бислоя X-ПЭГ/ДекС (1- X1-ПЭГ1, 2-X1-ПЭГ2).

Рисунок 1 – а, б) Зависимость ΔF от ΔR в процессе роста пленки (X-ПЭГ/ДекС) $_n$.

Для всех исследованных сополимеров X-ПЭГ со второго по шестой бислою рост толщины пленок близок к линейному. Меньшая толщина бислоев, сформированных на основе X1-ПЭГ1 (рисунок 1в), может быть связана со стерическим отталкиванием макромолекул с большой M_v от поверхности пленок, содержащих сополимер с длинными, 5 кДа, боковыми цепями ПЭГ. Толщина бислоев X-ПЭГ/ДекС зависит от степени замещения глюкозаминовых групп полиэтиленгликолем. Минимум наблюдается для сополимеров с $\chi_{\text{ПЭГ}}$ в области 0,05 (рисунок 1 в), в которых на одну боковую цепь полиэтиленгликоля приходится около 15 элементарных звеньев основной цепи хитозана. Такая зависимость, по видимому, связана с изменением конформации макромолекул полисахарида при модифицировании их полиэтиленгликолем и формированием компактных “клубков” [12]. Увеличение толщины бислоев для хитозанов с $\chi_{\text{ПЭГ}} > 0,05$ можно объяснить уменьшением плотности заряда макромолекул, содержащих большое количество неионогенных боковых цепей, что приводит к росту массы сополимера, необходимого для компенсации отрицательного заряда ДекС, адсорбированного на поверхности.

Толщина бислоя X/ДекС на основе немодифицированного ПЭГ низкомолекулярного хитозана X2 несколько выше, чем для X1 ($4,1 \pm 0,7$ нм и $3,0 \pm 0,2$ нм соответственно), что связано с различной молекулярной массой полисахаридов, влияющей на механизм формирования слоев. Известно, что полиэлектролиты с меньшей молекулярной массой при формировании покрытий методом послойной сборки могут проникать вглубь пленки, а затем диффундировать в противоположном направлении при адсорбции альтернативно заряженного полимера, что приводит к образованию более толстых слоев [10]. При модифицировании полиэтиленгликолем M_v макромолекул увеличивается (с 18 кДа до ~40 кДа при $\chi_{\text{ПЭГ}}=0,15$ для X2-ПЭГ1), что также может влиять на закономерности адсорбции

сополимеров. Независимо от длины основной цепи хитозана после модифицирования полисахарида полиэтиленгликолем ПЭГ1 ($\chi_{\text{ПЭГ}}=0,15$) наблюдали уменьшение толщины бислоев X-ПЭГ1/ДекС (до $3,0\pm 0,4$ нм и $1,8\pm 0,4$ нм соответственно для X2 и X1).

Согласно данным СЗМ, пленка на основе немодифицированного хитозана X1 и декстран сульфата, имеет малодефектную поверхность с низкой шероховатостью, которая не превышает 1 нм (рисунок 2). Это хорошо согласуется с высокой жесткостью покрытий, наблюдаемой методом кварцевого микровзвешивания. В то же время, на поверхности пленок на основе хитозанов, модифицированных ПЭГ, увеличивается доля зерен высотой 3-5 нм. Наличие более крупных агрегатов согласуется с более высокой диссипацией энергии колебаний такими пленками по сравнению с пленками на основе немодифицированного хитозана X1.

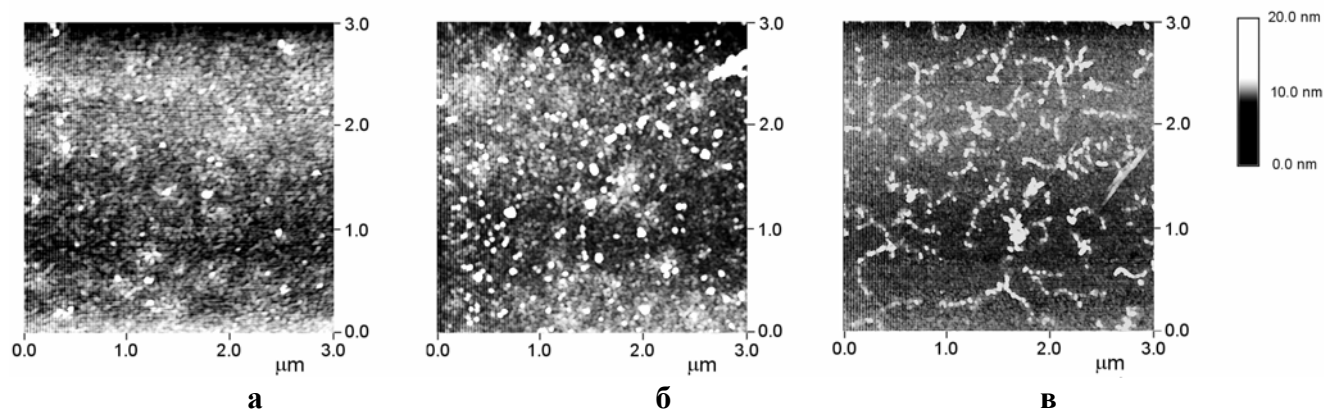


Рисунок 2 - СЗМ изображение поверхности мультислоев $(X1/ДекС)_{5,5}$ (а) и $(X1-ПЭГ1/ДекС)_{5,5}$ (б, в; $\chi_{\text{ПЭГ}}=0,05$ (б) и $0,15$ (в)). Масштаб изображений по высоте указан на рисунке справа.

На поверхности пленок $(X1-ПЭГ1/ДекС)_{5,5}$ для сополимера с $\chi_{\text{ПЭГ}}=0,15$ наблюдаются разупорядоченные цепочки зерен высотой 5-9 нм, и шириной около 80 нм (рисунок 2 в). Такая морфология поверхности, по-видимому, отражает изменение механизма адсорбции сополимеров с большой M_v боковых цепей ПЭГ на подслое противоположно заряженного полимера (ДекС) с увеличением степени замещения аминогрупп, а именно переход от адсорбции монослоев к формированию массивных островков геля, как в случае сополимера X1-ПЭГ1 с $\chi_{\text{ПЭГ}}=0,42$.

Таким образом, мультислойные пленки $(X-ПЭГ/ДекС)_n$ могут быть получены на основе сополимеров X-ПЭГ с различной длиной основной глюкозаминовой цепи, степень замещения аминогрупп $\chi_{\text{ПЭГ}}$ для которых не превышает 0,15 и 0,25 для боковых цепей полиэтиленгликоля 5,0 и 0,9 кДа, соответственно.

Для стеклянной подложки тангенс краевого угла смачивания равен $1,06\pm 0,05$, а для поверхности пленок $(X/ДекС)_{5,5}$ на основе немодифицированных хитозанов X1 и X2 величина $\text{tg}\theta$ уменьшается до $0,57\pm 0,03$ и $0,51\pm 0,05$, соответственно. Введение хитозана, модифицированного ПЭГ1 с $\chi_{\text{ПЭГ}}$ около 0,02, в мультислойные пленки снижает $\text{tg}\theta$ до $\sim 0,3-0,4$, а при дальнейшем увеличении степени замещения аминогрупп полиэтиленгликолем - до $\sim 0,25$. Значения $\text{tg}\theta$ для мультислоев на основе сополимеров с боковыми цепями полиэтиленгликоля 0,9 и 1,6 кДа также понижаются с увеличением значения $\chi_{\text{ПЭГ}}$ сополимера, однако, гидрофильность таких слоев меньше, чем на основе сополимеров с более длинными боковыми цепями 5,0 кДа.

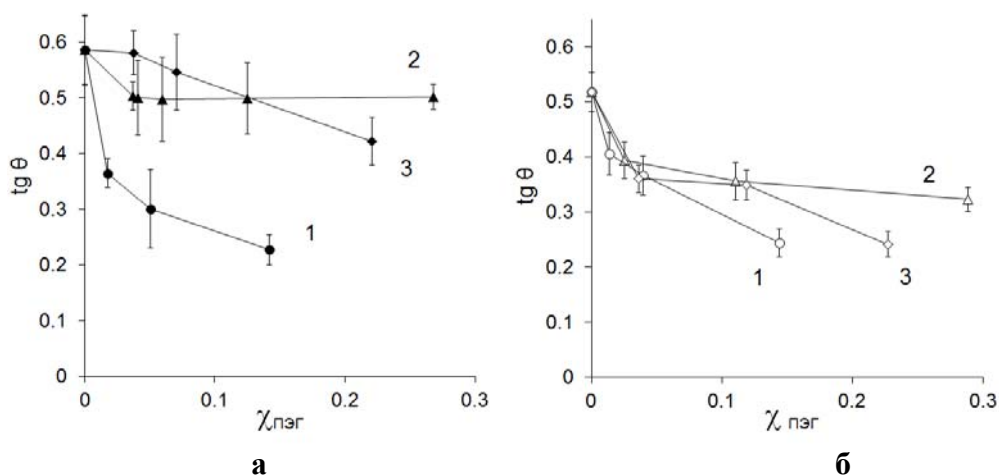


Рисунок 3 – Зависимость тангенса краевого угла смачивания поверхности пленок (X-ПЭГ/ДекС)_{5,5} от $\chi_{\text{ПЭГ}}$ сополимеров. а) X1-ПЭГ; б) X2-ПЭГ. 1- ПЭГ1, 2-ПЭГ2, 3-ПЭГ3.

Эмбриональная телячья сыворотка содержит белки (альбумины и глобулины), витамины, гормоны, липиды, углеводы, неорганические соединения [27]. Адсорбция белков является первой стадией взаимодействия поверхности материалов с компонентами крови [28].

Адсорбция белков ЭТС на поверхности слоев (X2/ДекС)_n на 65% больше, чем на поверхности (X1/ДекС)_n (рисунок 4 а), что может быть связано как со взаимодействием белков ЭТС с диффундирующими из пленки в раствор слабо адсорбированными макромолекулами X2, так и с различной морфологией поверхности пленок. Тем не менее, для пленок на основе полимеров, модифицированных ПЭГ, адсорбция белков ЭТС уменьшается и для хитозанов с одинаковым $\chi_{\text{ПЭГ}}$, равным 0,15, практически не зависит от длины основной цепи хитозана.

Адсорбция белков ЭТС на поверхности пленок сополимеров X-ПЭГ и ДекС, существенно снижается по сравнению с немодифицированным хитозаном (рисунок 4 б). При этом сополимеры с небольшими значениями $\chi_{\text{ПЭГ}}$ и длинными боковыми цепями полиэтиленгликоля 5,0 кДа, значительно эффективнее ингибируют адсорбцию белковых соединений, чем имеющие боковые цепи 0,9 кДа. Расчет показывает, что 50% уменьшение количества белков ЭТС Sigma, адсорбированных на поверхности пленки (X1-ПЭГ/ДекС)_{5,5}, достигается при использовании сополимера с $\chi_{\text{ПЭГ}}$ равным 0,013 и 0,025 для привитого полиэтиленгликоля 5 кДа и 0,9 кДа, соответственно. В то же время, в диапазоне $\chi_{\text{ПЭГ}}$ от 0,05 до 0,15, биоинертные свойства мультислоев на основе сополимеров с различной длиной боковых цепей ПЭГ сравнимы, а адсорбция белков ЭТС составляет 15–30% от величины для немодифицированного полисахарида. Влияние на адсорбцию белков сополимера X1-ПЭГ1 ($\chi_{\text{ПЭГ}}=0,15$) с более длинными боковыми цепями ПЭГ сравнимо с X1-ПЭГ2 ($\chi_{\text{ПЭГ}}=0,125$), имеющего в 6 раз более короткие боковые цепи. На количественные закономерности адсорбции белков, помимо гидрофильных свойств поверхности, влияют ее морфологические характеристики [29]. Масса белков, адсорбированных на островковой гелеобразной пленке (X1-ПЭГ1/ДекС)_{5,5}, формирующейся при максимальном значении $\chi_{\text{ПЭГ}}$, равном 0,42, на 20% превышает величину для немодифицированного хитозана.

Адсорбция белков ЭТС HyClone (рисунок 4б) на поверхности (X1-ПЭГ2/ДекС)_{5,5} выше в 1,5 раза, чем из ЭТС Sigma, что связано с различиями в составе сыворотки различного происхождения [27]. Тем не менее, при введении сополимеров X1-ПЭГ2 в состав пленки масса адсорбированных соединений ЭТС снижалась с увеличением $\chi_{\text{ПЭГ}}$ сополимера.

Адсорбция белков ЭТС уменьшается с увеличением числа адсорбированных слоев (рисунок 4в). Для X1-ПЭГ2 с $\chi_{\text{ПЭГ}}=0,25$ адсорбция на пленке, состоящей из 5,5 бислоев

X1-ПЭГ2/ДекС, практически не происходит. Дальнейшее увеличение числа бислоев в пленке практически не влияет на массу адсорбированного белка.

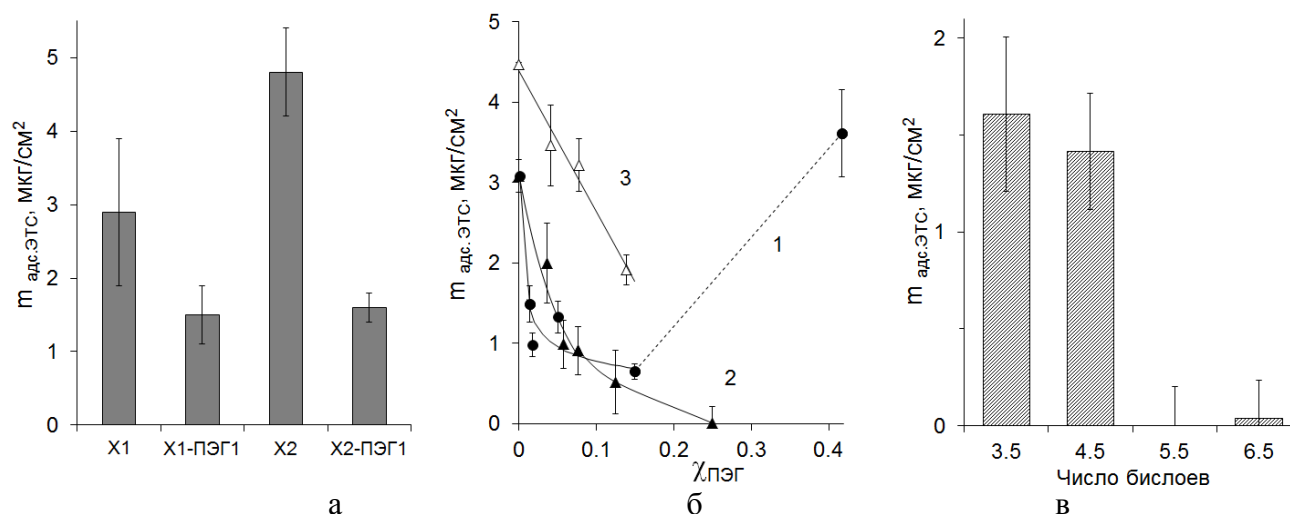


Рисунок 4 – Адсорбция белков ЭТС Sigma на поверхности пленок (X-ПЭГ/ДекС)_n:

а) с различной длиной основной цепи ($n=4,5$, X-ПЭГ1, $\chi_{\text{ПЭГ}}=0,15$); б) различной степенью замещения аминогрупп полиэтиленгликолем $\chi_{\text{ПЭГ}}$ ($n=5,5$, 1–X1-ПЭГ1; 2–X1-ПЭГ2, 3–X1-ПЭГ2, ЭТС NuClone). в) различным числом бислоев, X1-ПЭГ2, $\chi_{\text{ПЭГ}}=0,25$).

Несмотря на то, что с увеличением $\chi_{\text{ПЭГ}}$ сополимера X-ПЭГ уменьшается как тангенс краевого угла смачивания поверхности пленок (X-ПЭГ/ДекС)_n, так и адсорбция белков ЭТС на ней, выраженная корреляция между ними отсутствует. Адсорбция макромолекул белков на мультислойных пленках полиэлектролитов является сложным процессом и зависит не только от гидрофильных свойств пленок, но и от морфологии поверхности и электростатического взаимодействия белков с ней [10, 11, 28, 29].

Выводы

Таким образом, мультислойные пленки (X-ПЭГ/ДекС)_n могут быть получены на основе сополимеров X-ПЭГ с различной длиной основной глюкозаминовой цепи, степень замещения аминогрупп $\chi_{\text{ПЭГ}}$ для которых не превышает 0,15 и 0,25 для боковых цепей полиэтиленгликоля 5,0 и 0,9 кДа, соответственно. При адсорбции декстран сульфата и хитозана, в котором 42% аминогрупп замещено ПЭГ 5,0 кДа происходит образование островков геля.

Адсорбция белков эмбриональной телячьей сыворотки на поверхности пленок (X-ПЭГ/ДекС)_n зависит от длины боковых цепей ПЭГ, доли модифицированных ПЭГ глюкозаминовых звеньев и числа бислоев n . Адсорбция белков ЭТС на пленке (X1-ПЭГ2/ДекС)_{5,5} с $\chi_{\text{ПЭГ}}=0,25$ практически не происходит.

Работа выполнена в рамках задания 4.10 ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация», подпрограмма «Химфармсинтез».

Список литературы

1. Functional Polymer Films / Ed. W. Knoll, R.C. Advincula – Wiley-VCH Verlag, 2013. – 1128 p.
2. Hermanson, G. Bioconjugate techniques: 2nd ed. – Elsevier. 2008. – P. 215–222.
3. Investigation of Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolytes on Fully Functional Human Red Blood Cells in Suspension for Attenuated Immune Response / S. Mansouri [et al.] // Biomacromolecules. – 2011. – Vol. 12, № 3. – P. 585–592.
4. Wattendorf, U. Stealth Function for Hollow Polyelectrolyte Microcapsules through a Poly(ethylene glycol) Grafted Polyelectrolyte Adlayer / U. Wattendorf, O. Kreft, M. Textor // Biomacromolecules. – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 100–108.

5. Bovine serum albumin nanoparticles with multilayers and aptamers for pH-responsive and targeted anti-cancer drug delivery / L. Xie [et al.] // *J. Mater. Chem.* – 2012. – Vol. 22, № 13. – P. 6053–6060.
6. Layer-by-layer nanoencapsulation of camptothecin with improved activity / G. Parekh [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2014. – Vol. 465, № 1–2. – P. 218–227.
7. Multilayer Buildup and Biofouling Characteristics of PSS-b-PEG Containing Films / C. Cortez [et al.] // *Langmuir.* – 2010. – Vol. 26, № 12. – P. 9720–9727.
8. Химия привитых поверхностных соединений / Под ред. Г.В. Лисичкина–М.:Физматлит, 2003. - 592 с.
9. Protein – surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory / S.I. Jeon [et al.] // *J. Coll. Int. Sci.* – 1991. – Vol.142, № 1. – P. 149–158.
10. Picart C., Polyelectrolyte Multilayer Films: From Physico-Chemical Properties to the Control of Cellular Processes // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15, № 7. – P. 685–697.
11. Human Serum Albumin Self-Assembly on Weak Polyelectrolyte Multilayer Films Structurally Modified by pH Changes / C. Gergely [et al.] // *Langmuir.* – 2004. – Vol. 20, № 13. – P. 5575–5582.
12. Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting, and polymer therapeutics / Ed B. Sarmiento, J. das Neves. – John Wiley & Sons, Ltd, 2012. – Chapter 17. – P. 556.
13. Шутова, Т.Г. Мультислойные пленки модифицированных полиэтиленгликолем полисахаридов / Т.Г. Шутова, А.А. Мاستич, К.С. Ливонович // *Труды БГУ.* – 2014. – Том 9, № 1 – С. 102–109.
14. Du, J. PEGylation of chitosan for improved solubility and fiber formation via electrospinning / J. Du, Y.-L. Hsieh // *Cellulose.* – 2007. – Vol. 14, № 6. – P. 543–552.
15. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens / M. Amidi [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2010. – Vol. 62, №1. – P. 59–82.
16. Werle, M. Modified chitosans for oral drug delivery. / M. Werle, H. Takeuchi, A. Bernkop-Schnürch, // *J. Pharm. Sci.* – 2009. – Vol. 98, № 5. – P. 1643–1656.
17. Ильина, А.В. Гидролиз хитозана в молочной кислоте / А.В. Ильина, В.П. Варламов // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2004. – Том 40, № 3. – С. 300–303.
18. Ueyama, N. A poly(oxyethylene)-supported Cys-Pro-Leu-Cys/Fe(II) complex as a rubredoxin model: protection of the Fe-Cys coordination from hydrolysis in aqueous solution// N. Ueyama, M. Nakata, A. Nakamura // *Polymer J.* – 1985. – Vol. 17, № 5. – P. 721–727.
19. Bartos, J. Colorimetric determination of organic compounds by formation of hydroxamic acids/ J. Bartos // *Talanta.* – 1980. – Vol. 27, № 7. – P.583–590.
20. Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods / Czechowska-Biskup R. [et al.] // *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives.* – 2012. – Vol. 17. – P. 5–20.
21. Волькенштейн, М.В. Молекулярная биофизика – М.: Наука, 1975. – С. 326–334.
22. Структура и свойства к-каррагинана красных водорослей *Eucheuma gelatina* / Т.Г. Шутова [et al.] // *Весті НАН Беларусі, Сер. хім. навук.* – 2011. – №.4. – С. 62–67.
23. Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung (use of quartz vibrator for weighing thin layers and as a micro-balance) / G. Sauerbrey // *Z. Phys.* – 1959. –Vol. 155, № 2. – P. 206–222.
24. A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation / Y. Lvov [et al.] // *Colloids Surf.* – 1999. – Vol. A146, № 1–3. – P. 337– 346.
25. Сумм, Б.Д. Гистерезис смачивания // *Соросовский образовательный журнал* – 1999. – №7. –С. 98–102.
26. A quartz crystal microbalance cell biosensor: detection of microtubule alterations in living cells at nM nocadaze concentrations / K.A. Marx [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics.* –

2001. – Vol. 16, № 9–12. – P. 773–782.

27. Amoozgar, Z. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems / Z. Amoozgar, Y. Yeo // WIREs Nanomed. Nanobiotechnol. – 2012. – Vol. 4, № 2. – P. 219–233.

28. Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen / Ed.G. Gstraunthaler, T. Lindl, – Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2013. – 340 p.

29. Биосовместимость / Под ред. В.И. Севастьянова. – М., 1999. – 368 с.

30. Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness / Rechendorff K. [et al.] // Langmuir. – 2006. – Vol. 22, № 26. – P. 10885-10888.

ADSORPTION OF BLOOD SERUM PROTEINS ON LAYER-BY-LAYER FILMS OF POLYSACCHARIDES MODIFIED WITH POLYETHYLENE GLYCOL

T.G. Shutava, A.A. Sheremet, K.S. Livanovich

*Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
email: tshutova@yahoo.com*

On the basis of synthesized graft-copolymers of chitosan and polyethylene glycol (X-PEG) with varying length of backbone, the degree of amino group substitution (χ_{PEG}) of which does not exceed 0.15 and 0.25 for side polyethylene glycol chains of 5,0 и 0,9 kDa, respectively, layer-by-layer films (X-PEG / dextran sulfate)_n were assembled. By adsorption of dextran sulfate and chitosan in which 42% of amino groups are substituted with PEG 5.0 kDa, gel forms.

The adsorption of fetal bovine serum proteins on the surface of (X-PEG/DexS)_n films depends on the length of PEG side chains, χ_{PEG} , and the number of bilayers n. The introduction of copolymer X-ПЭГ with $\chi_{\text{PEG}}=0.05\div 0.15$ instead of chitosan decreases protein adsorption by 70-85%. The surface of films consisted of 5.5 bilayers of copolymer X-PEG0,9 kDa with $\chi_{\text{PEG}}=0.25$ and dextran sulfate shows a high resistivity to protein adsorption.