

УДК 541.64

ПРИЩЕПЛЕНІ НАНОШАРИ ПОЛІ(N-МЕТАКРИЛОЇЛ АМІНОКИСЛОТ) ДЛЯ КОНТРОЛЬОВАНОЇ АДСОРБЦІЇ БІЛКІВ ТА ВИРОЩУВАННЯ КЛІТИН

*Огар М., Стецишин Ю., Половкович С., Журахівська Л., Болібрех Л.,
Губицька І.І., Марінцова Н., Новіков В.*

*Національний університет „Львівська політехніка”, Львів, Україна
E-mail: vnovikov@polynet.lviv.ua*

У представленій роботі нами синтезовано N-метакрилоїльні мономери амінокислот та сформовано на поверхні модифікованого скла, що містить центри радикальної полімеризації їх прищеплені наночастиці. Було досліджено властивості прищеплених наночастиць, зокрема величини їх вільної поверхневої енергії. На прикладі, прищепленого полімерного наночастиці полі(N-метакрилоїл лейцину) було досліджено здатність полі(N-метакрилоїл амінокислот) взаємодіяти з білками та клітинами.

Ключевые слова: N-метакрилоїл амінокислоти, наночастиці, адсорбція білків.

ВСТУП

В останні роки інтенсивно розвивається напрямок синтезу та дослідження властивостей біоімітуючих полімерів, які найчастіше містять у своїй структурі фрагменти біологічного походження та здатні активно взаємодіяти з біологічними об'єктами [1–3]. Суттєва доля у цих дослідженнях належить модифікації поверхонь макромолекулами біоімітуючих полімерів. Серед різноманіття чутливих полімерів, особливої уваги заслуговують синтетичні полімери на основі амінокислот [4–5]. Включення амінокислотних залишків у синтетичні полімери дозволяє створити нові небіологічні макромолекули з біоімітуючою структурою та властивостями, що здатні утворювати само-впорядковані структури, біосенсорні системи та біосумісні матеріали [4–5].

У залежності від розміщення амінокислотного залишку, полімери на основі амінокислот поділяють на дві групи [6]. До першої відносять синтетичні поліпептиди, до другої полімери, що містять амінокислотні залишки у бічних ланцюгах. Полімери, що містять амінокислотні залишки у бічних ланцюгах найчастіше синтезують з попередньо синтезованих їх винільних мономерів [6].

На сьогоднішній день є обмежена кількість робіт, що стосуються формування прищеплених полімерних шіток амінокислот на твердих поверхнях. У наших попередніх публікаціях було описано метод створення прищеплених наночастиць, у тому числі на основі N-метакрилоїл-L-амінокислот, на поверхні пероксидованого скла. У продовженні цих робіт нами синтезовано ряд мономерів N-метакрилоїл амінокислот та сформовано на їх основі прищеплені полімерні наночастиці на поверхні пероксидованого скла. Нами було описано властивості синтезованих

поверхонь, зокрема складові вільної поверхневої енергії, товщину прищепленого наношару та ступінь модифікації поверхні. Крім того, досліджено вплив наношару полі(N-метакрилоїл лейцину) на адсорбцію бичачого сивороткового альбуміну за дії різних рН та ріст клітинних ліній НЕК 293.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Синтез N-метакрилоїл амінокислот (реакція Шотен-Баумана). Реакцію проводили згідно модифікованої методики. 0,1 моль відповідної амінокислоти розчиняли в 60 мл 2М гідроксиду натрію та потім охолоджують до 0 °С. Метакрилоїл хлорид (0,1 моль) і 60 мл 2 М гідроксиду натрію одночасно прикапували рівними порціями з інтервалом в 3 хв при енергійному перемішуванні.

Після закінчення прикапування реагентів суміш перемішували 2 год при кімнатній температурі та потім підкислювали конц. НСІ (≈20 мл). Суміш залишали на 2 год, а потім фільтрували, залишок на фільтрі промивали дистильованою водою і перекристалізовували з суміші етанол-вода. Структуру отриманого мономеру підтверджували за допомогою спектрів ІЧ-спектроскопії.

Модифікація поверхні скла. Скляні пластинки, що містили на своїй поверхні центри радикальної полімеризації (пероксидовмісний хлорангідрид піромелітової кислоти), поміщали в ампули з 0,1 М етанольним розчином N-метакрилоїл амінокислоти та продували вміст ампул аргоном. Після запаювання ампули прогрівали при 90 °С протягом певного часу. Модифіковані пластинки виймали з ампул, екстрагували в апараті Сокслета протягом 4 годин етанолом для видалення неприщепленого мономеру, сушили в вакуумі при кімнатній температурі.

Дослідження поверхні методом еліпсометрії. Товщину та оптичні параметри адсорбованих полімерних наношарів досліджували методом еліпсометрії "ex situ". Еліпсометричні вимірювання проводили для кожного зразка поверхні перед і після прищеплення полімерних шарів з застосуванням нуля-еліпсометрії LEF-3M (Інститут Напівпровідникової Фізики, Новоросійськ, Росія), точність оптичного елементу становила 0.010.

Вимірювання контактного кута змочування. На поверхню пластинки, за допомогою мікрошприца, наносили краплі рідини. Кількість паралельних замірів для одного виду пластинок не менше 12. Кювету з пластинкою термостатували при необхідних температурах протягом 10 хв, після чого вимірювали розміри крапель.

Дослідження адсорбції бичачого сироваткового альбуміну. Білок з флуоресцеїн ізоціанатом (адсорбує синє світло, $\lambda_{\text{абс}} = 490$ нм та випромінює зелене флуоресцентне світло $\lambda_{\text{вип}} = 525$ нм) використовували для дослідження адсорбції у при дії різних буферних розчинів. Краплю розчину білка наносили на поверхню пластинки та інкубували протягом 15 хв за відповідної температури. Змивали неадсорбований білок буфером та дистильованою водою, сушили у потоці азоту. Флуоресценцію білків досліджували за допомогою оптичного мікроскопу «Olympus BX51» з галогеновою лампою (100 Вт), фільтром U-MNG2 ($\lambda_{\text{збуд}} = 470-490$ нм, $\lambda_{\text{вип}} > 510$ нм) та камерою DP72.

Дослідження росту культури ембріональних клітин нирки лінії НЕК-293 на поверхнях модифікованих наношаром полі(N-метакрилоїл-L-лейцину).

Дослідження проводили на лінії клітин НЕК 293 (ембріональні клітини нирки), які культивували у середовищі Ігла, модифікованому Дюльбекко (DMEM, Sigma Chem. Co., США) за присутності 10% ембріональної телячої сироватки (Sangva, Україна), пеніциліну (100 ед/мл) та стрептоміцину (100 мкг/мл) (Gibco, США) при 37 °С в атмосфері 5% CO₂ при 100% вологості впродовж 72 годин. Клітини висівали з початковою концентрацією 0,8 млн/мл клітин на предметні скельця, модифіковані нанощаром полі(N-метакрилоїл-L-лейцином). Визначення кількості живих клітин проводили методом виключення барвника живими клітинами під час фарбування 0,1%-м розчином трипанового синього в ізотонічному розчині NaCl. Для оцінки інтенсивності проліферативного росту культури клітин визначали індекс проліферації шляхом підрахунку клітин кількості через кожні 24, 48 та 72 години культивування до посівної концентрації клітин в 1 мл. Досліди повторювали тричі з трьома паралельними постановками для кожного варіанта експериментальних і контрольних умов.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

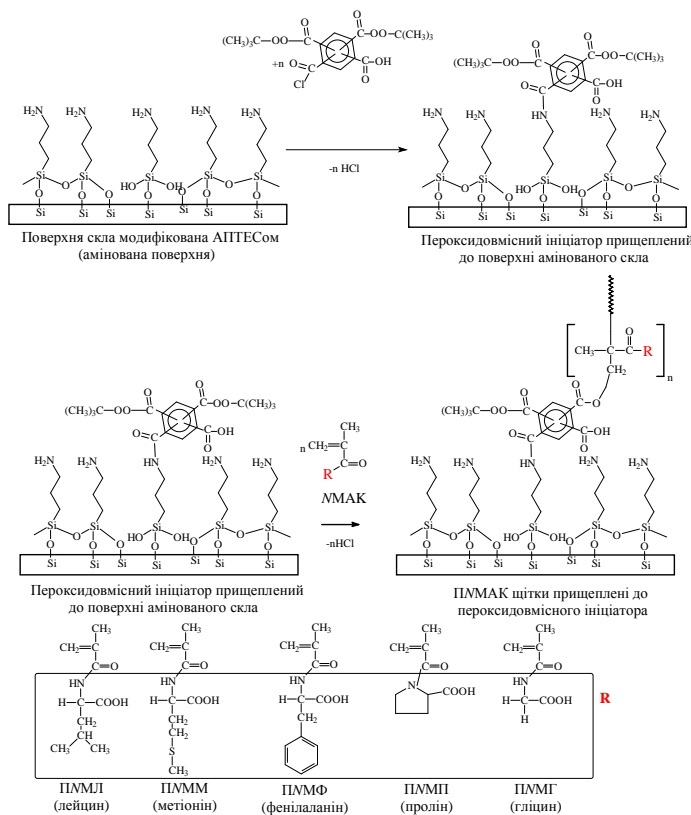


Рис. 1. Схема модифікації поверхні

Для формування прищеплених нанощарів полі(N-метакрилоїл амінокислот) на поверхні скла, скляні пластинки обробляли розчином 3-амінопропіл(триетокси)силану у метанолі. У результаті обробки на них були

імобілізовані первинні аміногрупи. За участю аміногруп, до поверхні модифікованого скла прищеплювали пероксидовмісний модифікатор згідно наведеної схеми (рис.1). Методом ініціювання “від поверхні” до отриманого пероксидованого наночастиці прищеплювали макромолекули полі(N-метакрилоїл амінокислот) з 0,01 М розчину мономеру у етанолі (рис.1).

На пероксидованих поверхнях було сформовано прищеплені наночастиці полі(N-метакрилоїл фенілаланіну) (ПНМФ), полі(N-метакрилоїл метіоніну) (ПНММ), полі(N-метакрилоїл проліну) (ПНМП), полі(N-метакрилоїл гліцину) (ПНМГ) та полі(N-метакрилоїл лейцину) (ПНМЛ) (рис.1). Значення контактних кутів змочування та величин вільної поверхневої енергії цих поверхонь наведені у табл.1.

Таблиця 1
Значення контактних кутів змочування та величин вільної поверхневої енергії для скляних поверхонь модифікованих прищепленими полімерними наночастицями

Природа наночастиці	Контактний кут змочування, град.			Значення вільної поверхневої енергії, мН/м				
	H ₂ O	CH ₂ I ₂	C ₃ H ₆ (OH) ₃	λ _s ^{LW}	λ _s ⁻	λ _s ⁺	λ _s ^{AB}	λ _s
Пероксидована поверхня	67	44,4	50,4	29,7	69,1	1	16,6	46,3
Полі(N-метакрилоїл гліцин)	36,4	50,8	65,6	22,2	24,5	6,0	24,3	46,5
Полі(N-метакрилоїл пролін)	30,6	52,1	59,6	25,2	20,0	6,3	22,6	47,8
Полі(N-метакрилоїл метіонін)	41,1	43,0	52,5	28,7	39,2	1,6	15,7	44,4
Полі(N-метакрилоїл лейцином)	50	38,7	62,7	40,2	40,4	0,1	4,9	45,1
Полі(N-метакрилоїл фенілаланін)	44,5	39,2	69,1	40	58,2	1,2	17,3	57,3

У таблиці наведено контактні кути змочування поверхні трьома різними рідинами та визначені величини сумарної вільної поверхневої енергії λ_s та її складових (Лівшица-Ван-дер-Ваальса - λ_s^{LW}, кислотної - λ_s⁻, основної - λ_s⁺ та полярної λ_s^{AB}). Отримані поверхні характеризуються досить високими значеннями сумарної вільної поверхневої енергії. Слід відмітити значний вплив у цю величину складових Лівшица-Ван-дер-Ваальса та кислотної. Для полімерних наночастиць на основі проліну

та гліцину також можна побачити відносно виражену основну складову вільної поверхневої енергії, для інших наночарів цього не спостерігається.

Цікаво, що складові вільної сумарної енергії у значній мірі корелюють з будовою амінокислот. Всі досліджувані поверхні містять у складі модифікуючих сполук гідрофобні та кислотні групи. Так у випадку пероксидовмісного модифікатора – бензенове ядро, пероксидовмісний фрагмент та вільні карбоксильні групи. У випадку прищеплених полі(N-метакрилоїл-L-амінокислот) - гідрофобний фрагмент метакрилової кислоти та вільна карбоксильна група тощо.

У таблиці 2 наведено значення товщин та індексів рефракції для прищеплених наночарів з вказаним ступенем модифікації поверхні. Еліпсометричні дослідження прищеплених наночарів показали, що товщина пероксидованого наночару становить близько 0,5 нм, а товщини наночарів полі(N-метакрилоїл амінокислот) відрізняються за своїми значеннями. Наприклад, при товщині наночару полі(N-метакрилоїл гліцину) у 30 нм, ступінь модифікації ним поверхні становить 75 %, у той же час при товщині наночару полі(N-метакрилоїл метіоніну) у 22 нм, ступінь модифікації ним поверхні становить близько 100 %. Ми пов'язуємо це з природою замісників у мономерів, їх об'ємними властивостями та здатністю до само впорядкування.

Таблиця 2

Значення товщин та індексів рефракції для прищеплених наночарів з вказаним ступенем модифікації поверхні

Природа наночару	Товщина, нм	Індекс рефракції	Ступінь модифікації, %
Пероксидована поверхня	0,5	1,49	100
Полі(N-метакрилоїл гліцин)	30	1,501	75
Полі(N-метакрилоїл пролін)	30	1,497	70
Полі(N-метакрилоїл метіонін)	22	1,49	100
Полі(N-метакрилоїл лейцином)	24	1,495	80
Полі(N-метакрилоїл фенілалаїнін)	23	1,5	100

На сьогоднішній день є стійка потреба у наноструктурах, що будуть контролювано взаємодіяти з живими об'єктами, перш за все з білками та клітинами. Нами на прикладі, прищепленого полімерного наночару полі(N-метакрилоїл-L-лейцину) було досліджено здатність полі(N-метакрилоїл-L-амінокислот) взаємодіяти з бичачим сироватковим альбуміном та клітинами лінії НЕК 293.

Адсорбція бичачого сироваткового альбуміну з прищепленою флуоресцентною міткою проводилась з розчинів альбуміну при різних рН (4, 6, 8), час адсорбції становив 5 хв. З рис. 2 видно, що у всіх досліджуваних випадках видно високі і

практично ідентичні значення флуоресцентної інтенсивності, що свідчить про високу адсорбційну активність цієї поверхні до бичачого сироваткового альбуміну. Важливим моментом є те, що незважаючи на різні рН розчинів альбуміну, що змінюють здатні змінювати конформацію білка, рівень адсорбованого альбуміну у всіх випадках практично однаковий.

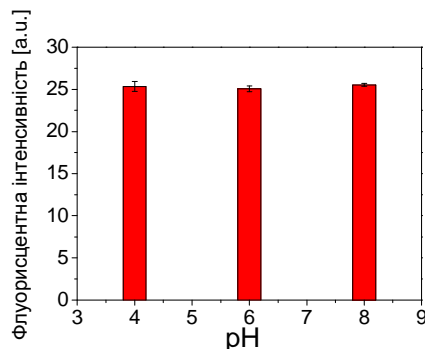


Рис. 2. Флуоресцентна інтенсивність бичачого сироваткового альбуміну адсорбованого на поверхні модифіковані наночастиною полі(N-метакрилоїл-L-лейцину за дії різних рН.

У таблиці 3 наведено динаміку проліферації ембріональних клітин нирки лінії НЕК-293 при культивуванні на поверхнях не модифікованого скла та модифікованого прищепленим наночастиною полі(N-метакрилоїл-L-лейцину).

Таблиця 3
Проліфераційний ріст клітин лінії НЕК 293 на модифікованій та контрольній поверхні після 24, 48 та 72 год культивування. Первинна густина клітин (800 000 клітин/мл)

Природа поверхні	Концентрація клітин млн/см ³ після культивування		
	24 год	48 год	72 год
Скло	1,01±0,04	1,69±0,1	2,82±0,02
Полі(N-метакрилоїл лейцин)	1,43±0,15	2,05±0,03	3,53±0,08

Аналіз даних показав, що при культивуванні клітин культури НЕК-293 спостерігається їх швидкий ріст з наступним формування моношару клітин. Клітини, культивовані на поверхнях модифікованих прищепленим наночастиною полі(N-метакрилоїл-L-лейцину), проявляли значно вищу проліферативну активність та життєздатність, ніж на поверхні немодифікованого скла.

ВИСНОВКИ

1. У представленій роботі нами синтезовано мономери N-метакрилоїл метіоніну, N-метакрилоїл гліцину, N-метакрилоїл проліну, N-метакрилоїл лейцину та N-

метакрилоїл фенілаланіну з яких було сформовано на поверхні модифікованого скла, що містить центри радикальної полімеризації їх прищеплені нанощари.

2. Було досліджено структуру та властивості прищеплених нанощарів амінокислотних похідних, наведено значення їх контактних кутів змочування та величин вільної поверхневої енергії.
3. Досліджено здатність нанощарів контролювано адсорбувати бичачий сироватковий альбумін та позитивно впливати на ріст клітин культури НЕК-293.

Список літератури

1. Motornov M. Stimuli-Responsive Nanoparticles, Nanogels and Capsules for Integrated Multifunctional Intelligent Systems. / M. Motornov, Y. Roiter, I. Tokarev [et al.] // Prog. Polym. Sci. – 2010. – Vol. 35,– P. 174–211.
2. Luzinov I. Responsive Brush Layers: from Tailored Gradients to Reversibly Assembled Nanoparticles / I. Luzinov, S. Minko, V. Tsukruk // Soft Matter – 2008. – Vol. 4,– P. 714–725.
3. Galaev I. ‘Smart’ Polymers and What They Could do in Biotechnology and Medicine. / I. Galaev, B. Mattiasson // Trends Biot. – 1999. – Vol. 17, – P. 335–340.
4. Mori H. Amino-Acid-Based Block Copolymers by RAFT Polymerization / H. Mori, T. Endo // Macromol. Rapid Commun. – 2012. – Vol. 33, – P. 1090–1107.
5. O’Reilly R. K Using controlled radical polymerization techniques for the synthesis of functional polymers containing amino acid moieties / R. K O’Reilly // Polym Int. – 2010. – Vol. 59,– P. 568–573.
6. Sanda F. Syntheses and functions of polymers based on amino acids / F. Sanda, T. Endo // Macromol. Chem. Phys. – 1999. –Vol. 200, – P. 2651–2661.

Огар М. Привитые нанослои поли(N-метакрилоил аминокислот) для контролируемой адсорбции белков и выращивание клеток / М. Огар, Ю. Стецишин, Н. Маринцова, О. Штапенко, С. Федорова, В. Новиков // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С.315-322.

В представленной работе нами синтезировано N-метакрилоильные мономеры аминокислот и сформировано на поверхности модифицированного стекла содержащего центры радикальной полимеризации их привитые нанослои. Было исследовано свойства привитых нанослоев, в частности значение их свободной поверхностной энергии.

На примере, привитого полимерного нанослоя поли(N-метакрилоил лейцина) было исследовано способность поли(N-метакрилоил аминокислот) взаимодействовать с белками и клетками.

Ключевые слова: N-метакрилоил аминокислоты, нанослои, адсорбция белков.

GRAFTED NANOLAYERS OF POLY(METHACRYLOYL AMINO ACIDS) FOR CONTROLLED PROTEIN ADSORPTION AND CULTIVATION OF CELLS

Ohar M., Stetsyshyn Y., Polovkovich S., Zhurahivska L., Bolibruh L., Gubitska I.I., Marintsova N., Novikov V.

National University “Lviv Politechnic”, Lviv, Ukraine

E-mail: vnovikov@polynet.lviv.ua

The surface modification of the materials for obtaining specific surface properties is an important trend of modern polymer chemistry. In the last years tendencies of the modification

of the surfaces by biomimetic polymers, which are biocompatible and sensitive, able to create self-assemble, highly ordered structures and biosensor systems has been developed.

Among diversities of the biosimilar polymers, synthetic amino-acid based polymers deserve special attention. They can be divided into two groups, depending on whether the amino acid residues are included in the main or side chain. In the synthetic polypeptides, belonging to the first group, the native amino-acid take part in creation of the peptide bonds. The polymers from the second group, having amino-acid residues in the side chain, are often synthesized by polymerization of vinyl monomers carrying amino acid residues in the side chain.

The incorporation of amino-acid residues, which are the constitutional components of proteins, into synthetic polymers draws growing attention, because such combination may lead to creation of new no-biological macromolecules with biomimetic properties.

In our work we propose a new approach to formation of biomimetic nanolayers. The surface of a glass plate was treated with (3-aminopropyl)triethoxysilane, as a result the primary aminogroups were immobilized on them. With participation of these aminogroups peroxidcontained pyromellitic acid chloride was covalently grafted to the surface of the modified glass. The polymer brushes of poly(N-methacryloyl amino acids) were grafted to the received peroxidcontained nanolayer by method of initiation "from a surface". We used as the biomimetic monomers N-methacryloyl methionine, N-methacryloyl proline, N-methacryloyl glycine, N-methacryloyl leucine and N-methacryloyl phenylalanine. The created films were investigated by the methods of measuring of contact angels of moistening and ellipsometry.

Main properties of the grafted nanolayers were studied. We demonstrated significant influence monomers nature onto surface modification process and structure of the grafted nanolayers. Thickness of the obtained nanolayers (10-30 nm) and volume fraction of polymers in grafted nanolayers were calculated using ellipsometry data. The Lifshitz-van der Waals and Acid-Base components and total surface energy of grafted nanolayers were calculated using the data of contact angles of moistening. Also we were determined protein adsorption and cells growth onto modified surfaces.

The surfaces, modified by grafted nanolayers of poly(N-methacryloyl amino acids), have perspectives for their use of them as biocompatible, sensitive and biosensory systems.

Keywords: N-methacryloyl amino acids, nanolayers, protein adsorption.

References

1. Motornov M., Roiter Y., Tokarev I. Stimuli-Responsive Nanoparticles, Nanogels and Capsules for Integrated Multifunctional Intelligent Systems, *Prog. Polym. Sci.*, **35**, 174 (2010)
2. Luzinov I., Minko S., Tsukruk V. Responsive Brush Layers: from Tailored Gradients to Reversibly Assembled Nanoparticles, *Soft Matter*, **4**, 714 (2008).
3. Galaev I., Mattiasson B. 'Smart' Polymers and What They Could do in Biotechnology and Medicine, *Trends Biot.*, **17**, 335 (1999).
4. Mori H., Endo T. Amino-Acid-Based Block Copolymers by RAFT Polymerization, *Macromol. Rapid Commun.*, **33**, 1090 (2012).
5. O'Reilly R. K Using controlled radical polymerization techniques for the synthesis of functional polymers containing amino acid moieties, *Polym Int.*, **59**, 568 (2010).
6. Sanda F., Endo T. Syntheses and functions of polymers based on amino acids, *Macromol. Chem. Phys.*, **200**, 2651 (1999).

Поступила в редакцію 25.11.2013 г.