

АДСОРБЦИЯ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА НА ПОВЕРХНОСТИ КРЕМНЕЗЕМА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ТРИМЕТИЛСИЛИЛЬНЫМИ ГРУППАМИ

И.В. Сиора, Н.Ю. Клименко, Н.П. Галаган, В.М. Богатырев

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова 17, 03164, Киев-164*

Изучена адсорбция бычьего сывороточного альбумина (БСА) на поверхности гидрофильного и частично гидрофобизованного кремнезема, модифицированного гексаметилдисилазаном. Адсорбция проведена из водного и водносолевого растворов при pH 4.8 и 7.4, охарактеризованы изотермы адсорбции. Установлено, что во всех случаях величины предельной адсорбции БСА для гидрофильной поверхности кремнезема выше, чем для частично гидрофобизованной. Получены и проанализированы ИК-спектры адсорбированного на кремнеземах белка. Обсуждаются изменения во вторичной структуре белка, адсорбированного на частично гидрофобизованном кремнеземе.

Введение

Биополимеры обладают рядом особенностей, которые широко используются при создании наноматериалов (НМ) разного назначения [1]. Особое внимание уделяется белкам, в частности белкам крови, что обусловлено перспективой применения таких НМ для развития тканевой инженерии. Эта технология должна обеспечить разработку новых видов биологических тканей, предназначенных для компенсации утраченных организмом функций [2]. Изготовление материалов, способных повторять свойства некоторых белков, даст возможность создать высокостабильные биоспецифические поверхности для долговременной эксплуатации заменителей тканей. Такие материалы чаще всего создаются на основе биомолекул, иммобилизованных на органических или неорганических носителях [3, 4]. В закрепленном на носителе состоянии они могут проявлять новые свойства. Это стимулирует исследования по изучению изменений физико-химических свойств биомолекул, в частности белков, при их иммобилизации на различных носителях.

Особый интерес в качестве носителя приобретает высокодисперсный кремнезем (ВДК), который давно используется в фармацевтической практике как вспомогательное вещество при изготовлении разных лекарственных средств [5]. Известно также [6], что благодаря его физико-химическим свойствам, в том числе развитой поверхности и высокой сорбционной способности по отношению к биомолекулам, особенно белкам, он является перспективным носителем при создании биологически активных НМ. Ранее было установлено [7], что ВДК в концентрации выше 0,1 масс. % при контакте с суспензией эритроцитов крови доноров повреждает их мембрану, что сопровождается гемолизом клеток. Иммобилизация БСА на ВДК способствует увеличению пороговой концентрации нанокомпозита (НК), разрушающей клетки, в сравнении с пороговой концентрацией исходного кремнезема. В то же время известно [8], что кремнезем с гидрофобизованной поверхностью менее токсичен, чем ВДК и, соответственно, может оказаться более перспективным носителем при создании НК для биосистем. Однако адсорбция большинства биомолекул, в том числе и БСА, как процесс, предшествующий созданию НК, на кремнеземе с гидрофобизованной или частично гидрофобизованной

поверхностью исследована недостаточно. Поэтому представляет интерес выяснить способность к адсорбции белка БСА на частично гидрофобизованном кремнеземе в сравнении с немодифицированным ВДК из водного и физиологического растворов.

Экспериментальная часть

Материалы.

В работе использовали:

1. Высокодисперсный кремнезем с гидроксильной поверхностью ВДК (А-300, $S_{уд}=285 \text{ м}^2/\text{г}$, г. Калуш, Украина);
2. Кремнезем с частично гидрофобизованной поверхностью (ТМС), $S_{уд}=285 \text{ м}^2/\text{г}$ (Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины)
3. Бычий сывороточный альбумин, м.в. 67000 (Sigma, USA).

Методика синтеза кремнезема с частично гидрофобизованной поверхностью.

Химическое модифицирование поверхности кремнезема проводили взаимодействием высокодисперсного кремнезема А-300 с гексаметилдисилазаном в соответствии с реакцией [9]:



В результате обработки кремнезема согласно этой реакции на поверхности его частиц образуются привитые триметилсилильные группы, устойчивые к гидролизу в водной среде. Полное замещение поверхностных силанольных групп триметилсилильными приводит к гидрофобизации всей поверхности кремнезема. Для смачивания такого кремнезема водой и получения его водной дисперсии, необходимой для проведения экспериментов по адсорбции, был синтезирован образец с частично модифицированной поверхностью.

Модифицирование ВДК проводили в стеклянном реакторе с пропеллерной мешалкой. Предварительно высушенный при $200 \text{ }^\circ\text{C}$ ВДК помещали в реактор и повышали температуру до $150 \text{ }^\circ\text{C}$. Затем при непрерывном интенсивном перемешивании в реакционную зону вводили небольшими порциями расчетное количество гексаметилдисилазана, необходимое для частичного замещения гидроксильных групп поверхности ВДК на триметилсилильные группы. По окончании модифицирования охлажденный порошок выгружали из реактора и прогревали в сушильном шкафу при $200 \text{ }^\circ\text{C}$ для удаления продуктов реакции, после чего проводили определение степени модифицирования поверхности кремнезема триметилсилильными группами с использованием ИК-спектроскопии. Этот метод основан на исследовании интенсивности полос поглощения связей С-Н (2964 см^{-1}) и Si-OH (3748 см^{-1}) триметилсилилированного кремнезема в зависимости от температуры термообработки образца на воздухе.

Методика определения степени гидрофобизации поверхности кремнезема.

Методика определения степени модифицирования кремнезема триметилсилильными группами состояла в следующем. Пластинку из прессованного кремнезема с модифицированной поверхностью (плотность прессования $13\text{-}15 \text{ мг}/\text{см}^2$, навеска 25 мг) после удаления продуктов реакции помещали в кварцевую кювету для ИК-спектральных измерений и нагревали 1 час на воздухе при $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Затем образец вакуумировали, охлаждали и проводили запись спектров на ИК-спектрометре «SPECORD M-80» (Karl Zeiss, Jena). Далее напускали в кювету воздух, повышали температуру до $650 \text{ }^\circ\text{C}$ и повторяли указанные операции. Степень модифицирования рассчитывали по формуле

$$N=1-D_{250}/D_{650},$$

где D – оптическая плотность полосы поглощения при 3748 см^{-1} после нагревания при температурах $250 \text{ }^\circ\text{C}$ и $650 \text{ }^\circ\text{C}$.

Методики изучения адсорбции-десорбции БСА на кремнеземах.

Адсорбцию белка проводили по методу [10] из водного и водносолевого (0,14 М NaCl) растворов с концентрацией 1-14 мг/мл в статических условиях при 20-22 °С в течение 2 часов. Объем адсорбата составлял 10мл, а навеска адсорбента 100мг. Поскольку величина адсорбции белков зависит от рН среды [6, 11, 12], исследование проводили в области изоэлектрической точки (и.э.т.) белка БСА, то есть при рН 4,8, а также при рН 7,4, что отвечает нормальному физиологическому значению рН крови. Для получения необходимых значений рН к раствору БСА перед адсорбцией добавляли щелочь (0,01 М NaOH) или кислоту (0,01 М HCl) при постоянном перемешивании, после чего измеряли рН на ионометре И-130.

После проведения адсорбции твердую фазу отделяли центрифугированием (4000 об/мин, 10 мин), затем высушивали при 25 °С и механически измельчали. В надосадочной жидкости определяли концентрацию белка микробиуретовым методом [13] с использованием фотоэлектроколориметра КФК-2. Величину адсорбции (А) белка на поверхности кремнезёмов определяли по разности исходной и равновесной его концентраций в растворе до и после контакта с сорбентами по формуле:

$$A = (C_0 - C_p)V/m,$$

где C_0 и C_p – соответственно исходная и равновесная концентрации белка в растворе, мг/мл; V – объем раствора, мл; m – навеска адсорбента, г.

Для исследования десорбции альбумина с поверхности кремнезёмов к навескам полученных на их основе НК с белком добавляли дистиллированную воду с рН 4,8 или 7,4 при тех же соотношениях адсорбента и адсорбата, что использовали в экспериментах по адсорбции БСА. Твердую фазу отделяли от надосадочной жидкости центрифугированием, как указано выше, с последующим высушиванием. Концентрацию десорбированного белка в надосадочной жидкости определяли тем же методом [13].

ИК-спектральный анализ кремнезёмов с адсорбированным белком БСА.

ИК-спектральные измерения кремнезёмов с БСА после десорбции были проведены в области 4000-400 см^{-1} на спектрофотометре Thermo Nicolet Nexus FTIR с использованием приставки диффузного отражения «SMART Collector», для чего готовили образцы с разной степенью заполнения поверхности SiO_2 белком, используя следующий способ их приготовления. К навескам кремнезёма массой 100 мг добавляли раствор БСА с таким расчетом, чтобы количество белка на поверхности кремнезёмов соответствовало 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40%. Затем образцы высушивались при температуре 25 °С, после чего подвергались механическому измельчению и смешивались с предварительно подсушенным KBr (Riedel-de Haen, France, чда) в соотношении 1:19 для белка и 1:4 – для высокодисперсных кремнезёмов для уменьшения рассеивания ИК-излучения. Навески в этих измерениях составляли 250 мг. При анализе ИК-спектров использовалась программа «Omnics». Взаимодействие белка с поверхностью исследуемых кремнезёмов оценивалось по интенсивности полос поглощения с максимумом в области 3750 см^{-1} , характерной для валентных колебаний изолированных гидроксильных групп. Разница в максимумах полос поглощения силанольных групп (2 см^{-1}) при измерениях на ИК-спектрометрах разных фирм определялась, по-видимому, их конструктивными особенностями и не влияла существенно на полученные результаты.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 и 2 представлены результаты исследований по частичному модифицированию поверхности кремнезёма триметилсилильными группами. Из рис.1 следует, что для образцов, полученных в соответствии с методикой [9], в ИК-спектре 1, по сравнению с контрольным образцом (спектр 2), наблюдается резкое снижение

интенсивности полосы поглощения в области колебаний силанольных групп 3748 см^{-1} и появление полосы при 2964 см^{-1} , характерной для колебаний связи С–Н. Эти данные свидетельствуют о появлении на поверхности кремнезема хемосорбированных триметилсилильных групп с участием в этом процессе изолированных гидроксидов. Значения оптической плотности полос поглощения в зависимости от температуры обработки модифицированного кремнезема (рис. 2) позволили рассчитать степень замещения части гидроксильных групп на триметилсилильные, которая соответствовала 0,52. Полученные образцы ТМС были использованы при изучении адсорбционных взаимодействий его поверхности с молекулами БСА.

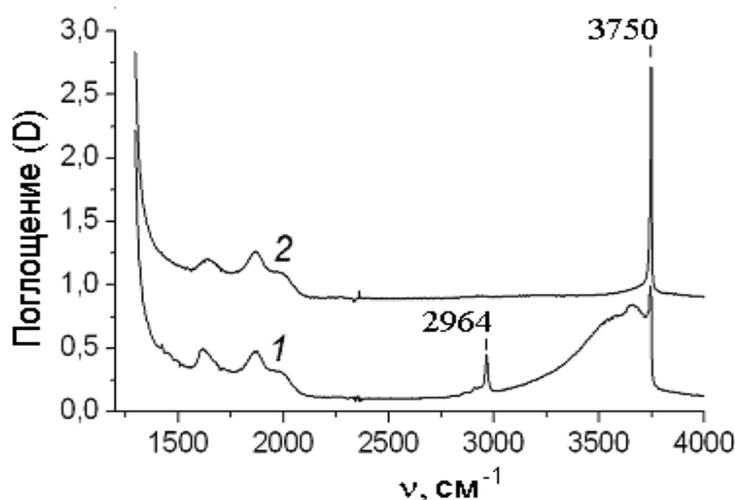


Рис. 1. ИК-спектры образца модифицированного кремнезема после нагревания на воздухе при 250 °C (1) и 650 °C (2). Степень замещения $N=0,52$.

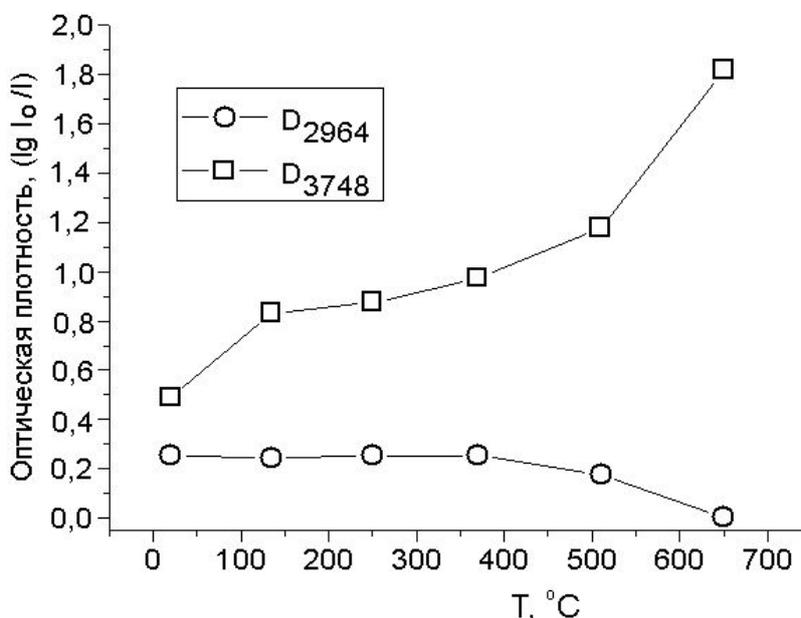


Рис. 2. Изменение оптической плотности полос поглощения связей С – Н (2964 см^{-1}) и SiO – Н (3748 см^{-1}) в зависимости от температуры обработки модифицированного кремнезема в окислительной атмосфере воздуха.

На рис. 3 приведены изотермы адсорбции альбумина на исследуемых кремнеземах с гидрофильной и частично гидрофобизованной поверхностью при разных значениях рН из водного и водносолевого (0,14 М NaCl) растворов. Для всех случаев

установлено, что их форма соответствует Ленгмюровской [14]. При сравнении изотерм было установлено, что наличие на поверхности SiO_2 триметилсилильных групп снижает эффективность взаимодействия белка с ТМС. Это проявлялось в более низких величинах предельной адсорбции (таблица 1), которые рассчитывались по значениям равновесной концентрации на изотермах при выходе их на плато.

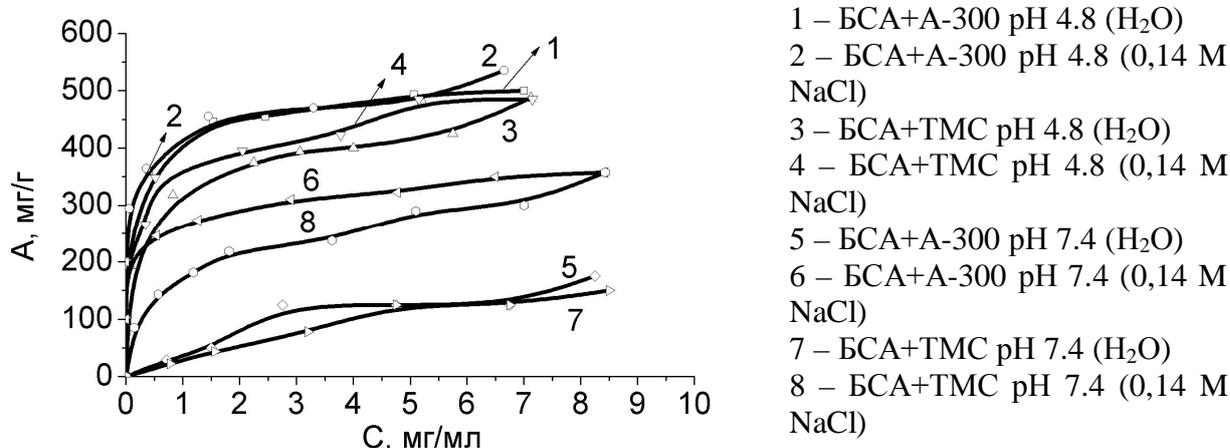


Рис. 3. Изотермы адсорбции бычьего сывороточного альбумина на кремнеземе.

Для адсорбции из водного раствора в области низких равновесных концентраций, не превышающих для ВДК 1,0 мг/мл (кривая 1), а для ТМС 1,75 мг/мл (кривая 3) наблюдается резкое увеличение величины адсорбции БСА на кремнеземах. Выход на плато достигается для ВДК при 1,25-2,75 мг/мл, тогда как для ТМС это происходит при 1,85-3,5 мг/мл, что свидетельствует о главенствующей роли силанольных групп в адсорбционных взаимодействиях БСА с поверхностью ВДК.

Существенными для процесса адсорбции оказались не только различия в структуре поверхности двух кремнезёмов, но также и в химическом составе раствора и значении рН. Так, при адсорбции белка из 0,14 М NaCl при рН 7,4 наблюдаются более высокие значения величин предельной адсорбции (более, чем в 2 раза) для каждого из исследуемых кремнезёмов, чем при адсорбции из воды. При рН 4,8, что соответствует и.э.т. белка, этот эффект ослаблен. Так, при адсорбции БСА на ВДК при рН 4,8 влияние состава раствора незначительно, что проявилось в совпадении изотерм 1 и 2 при высоких концентрациях белка в растворе. Только при равновесных концентрациях 0,2-0,5 мг/мл величина предельной адсорбции БСА для ВДК из физиологического раствора на 10 % выше, чем из водного. Следует отметить также, что при увеличении рН до 7,4 адсорбционные взаимодействия водного раствора белка как с ВДК, так и с ТМС резко снижаются (рис. 3, изотермы 5, 7).

Полученные изотермы являются типичными для адсорбции глобулярных белков на кремнеземе: для них наблюдается довольно крутой начальный участок с последующим выходом на плато. Согласно литературным данным [11, 15], это свидетельствует о значительном химическом сродстве белка к адсорбенту. При его высоких концентрациях изотермы приближаются к насыщению, хотя и не становятся строго горизонтальными. Такой характер кривых наблюдался для всех случаев, кроме изотерм 5 и 7, для которых в начальной части характерен меньший наклон.

При исследовании зависимости величины адсорбции БСА от рН было установлено, что максимум, как для ВДК, так и для ТМС находится при одном и том же значении рН, равном 4,8 (рис. 4). При смещении рН в щелочную или кислую области

наблюдается снижение величины адсорбции. При сравнении этих результатов с данными таблицы 1, где приведены величины предельной адсорбции белка (A_{∞}), отнесенные к 1г адсорбента (A) и 1 м² его поверхности, можно видеть, что максимальное количество альбумина на поверхности ВДК и ТМС адсорбируется при рН 4,8 – значении, близком к и.э.т. БСА. Эти данные хорошо согласуются с данными других авторов, которые получили значения рН для и.э.т. белка, равные 4,9-5 [6, 10]. При таком рН заряд белковой молекулы равен нулю, что, согласно утверждению Тарасевича и соавторов [10], обусловлено минимальным и равным количеством ионизированных amino- и карбоксильных групп аминокислот, входящих в ее состав. В этом случае они находятся в белковой цепи в форме диполярных ионов (цвиттер-ионов) и могут образовывать водородные связи ($\equiv\text{SiO}(\text{H}) \cdots \text{H}^+\text{NR}\text{COO}^-$, $\equiv\text{SiOH} \cdots \text{NR}$, $\equiv\text{SiOH} \cdots \text{OR}$) с гидроксильными группами поверхности кремнезема [12]. Такой характер взаимодействия белка с ВДК обеспечивает многоцентровое связывание его молекул с поверхностью.

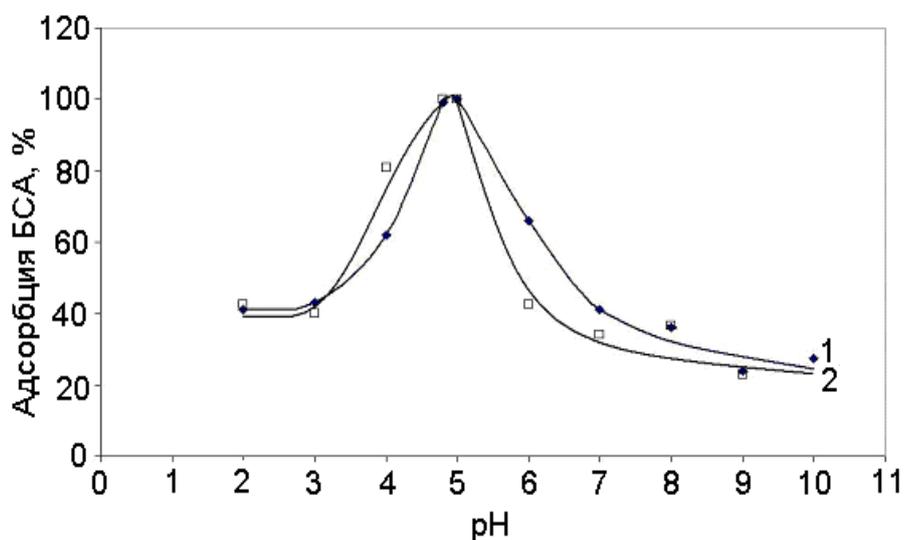


Рис. 4. Зависимость величины адсорбции бычьего сывороточного альбумина на кремнеземе (1 – А-300, 2 – ТМС) от рН среды.

В публикации [6] отмечено, что зависимость величины адсорбции белка от рН объясняется наличием электростатического взаимодействия адсорбент-белок. Однако при рН, которые отличаются от и.э.т., природа взаимодействий белка с ВДК имеет иной характер, зависящий от заряда аминокислотных остатков в белковой молекуле. Поэтому снижение величины адсорбции, наблюдаемое нами при рН 7,4 как для ВДК, так и для ТМС, может происходить из-за появления отрицательных зарядов на белковых глобулах и одновременного увеличения концентрации отрицательно заряженных диссоциированных силанольных групп, что приводит к отталкиванию молекул белка от одноименно заряженной поверхности адсорбента. Кроме электростатических взаимодействий альбумин - кремнезем, уменьшение величины адсорбции при смещении рН раствора белка от 4,8 до 7,4, наблюдаемое нами, может быть вызвано также латеральным отталкиванием одноименно заряженных белковых молекул в адсорбционном слое, что соответствует данным, приведенным в обзоре [6]. В том случае, когда белковые молекулы становятся катионами, что имеет место при понижении рН, возникает ион-дипольное взаимодействие с силанольными группами, которое способствует ослаблению взаимодействия между белком и поверхностью ВДК, что препятствует адсорбции на ней белка.

Таблица 1. Предельная адсорбция бычьего сывороточного альбумина на кремнеземе

| рН растворов | A_{∞} , мг/г | A_{∞} , моль/г | A_{∞} , мг/м ² | R^2 |
|--|---------------------|-----------------------|----------------------------------|-------|
| Кремнезем А-300 Адсорбция из H ₂ O | | | | |
| рН 4,8 | 446 | $6,7 \times 10^{-4}$ | 1,57 | 0,82 |
| рН 7,4 | 125 | $1,9 \times 10^{-4}$ | 0,44 | 0,99 |
| Адсорбция из 0,14 М NaCl | | | | |
| рН 4,8 | 455 | $6,8 \times 10^{-4}$ | 1,60 | 0,98 |
| рН 7,4 | 310 | $4,6 \times 10^{-4}$ | 1,09 | 0,95 |
| Кремнезем ТМС Адсорбция из H ₂ O | | | | |
| рН 4,8 | 375 | $5,6 \times 10^{-4}$ | 1,32 | 0,94 |
| рН 7,4 | 78 | $1,2 \times 10^{-4}$ | 0,27 | 0,99 |
| Адсорбция из 0,14 М NaCl | | | | |
| рН 4,8 | 395 | $5,9 \times 10^{-4}$ | 1,39 | 0,96 |
| рН 7,4 | 218 | $3,3 \times 10^{-4}$ | 0,77 | 0,96 |

Как следует из данных таблицы 1, во всех случаях величины предельной адсорбции БСА ниже для ТМС, чем для ВДК. Более низкие значения для ТМС в сравнении с исходным кремнеземом можно связывать с уменьшением количества адсорбционных центров, а именно гидроксильных групп ($\equiv\text{SiOH}$), и заменой их части на триметилсилильные группы ($\equiv\text{SiOSi}(\text{CH}_3)_3$). Поэтому между поверхностью ТМС и альбумином возможны гидрофобные взаимодействия за счет ассоциации неполярных групп остатков таких аминокислот, как аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, триптофан с триметилсилильными группами поверхности кремнезема. Согласно публикации [15], это может способствовать гетерокоагуляции ассоциатов макромолекул и частиц адсорбента, что осложняет взаимодействие между БСА и ТМС и приводит к снижению величины адсорбции.

При сравнении величин предельной адсорбции белка из водносолевого раствора и воды установлено, что в первом случае их значения выше как для ВДК, так и для ТМС. Полученные результаты хорошо согласуются с данными работы [14], где показано, что с увеличением ионной силы раствора величина адсорбции белков возрастает. Такой эффект можно объяснить как электростатическим взаимодействием белок – адсорбент, так и ослаблением латерального отталкивания молекул на поверхности из-за внедрения малых ионов из раствора.

При исследовании десорбции водного раствора БСА с поверхности ВДК и ТМС были использованы образцы, полученные при изучении адсорбции белка. На рис. 5 представлены данные по кинетике десорбции белка с поверхности исследуемых кремнеземов. Установлено, что в обоих случаях количество десорбированного белка незначительно, но для ВДК несколько выше, чем для ТМС. Так, в течение получаса количество БСА, которое десорбировалось с поверхности ВДК, составляло 0,46% от количества адсорбированного белка, тогда как для ТМС эта величина составляла 0,35%. Через 24 часа десорбция БСА составила 0,06% – для А-300 и 0,035% – для ТМС. Полученные данные свидетельствуют, что для молекул БСА адсорбция на кремнеземе может быть практически необратимой, при этом они более прочно связаны с частично гидрофобизированной поверхностью кремнезема, чем с гидрофильной.

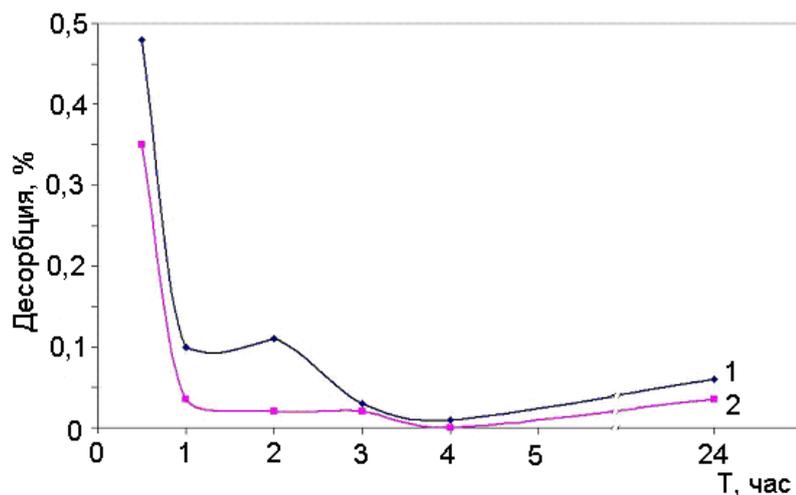


Рис. 5. Десорбция бычьего сывороточного альбумина из кремнезема (1 – А-300, 2 – ТМС).

С точки зрения авторов публикаций [12, 16] наблюдаемые нами низкие значения количества десорбированного белка можно объяснить затрудненностью десорбции, которая имеет место из-за необратимого многоцентрового связывания его молекул с большим количеством центров адсорбции. Поэтому полная десорбция возможна только при разрыве всех связей одновременно, что требует значительной величины энергии активации. Тот факт, что с гидрофильной поверхности кремнезема может десорбироваться большее количество белка, чем с частично гидрофобизованной, хорошо согласуется с литературными данными [12], которые указывают на большую способность гидрофильной поверхности десорбировать белок.

Следует принимать во внимание также возможные конформационные изменения молекулы белка при его взаимодействии с твердыми поверхностями, различающиеся структурой поверхностного слоя [17]. Так, в соответствии с [18], на гидрофобной поверхности степень разворачивания глобул альбумина более высокая, чем на гидрофильной, что способствует снижению величины предельной адсорбции белка, отнесенной к 1 м^2 поверхности адсорбента.

Известно [14], что для исследования конформаций полипептидных цепей белков, в частности бычьего сывороточного альбумина, в числе других методов используют также ИК-спектроскопию. Метод был использован нами для характеристики возможных пространственных изменений молекулы БСА при его адсорбции на ВДК и ТМС.

Известно, что БСА относят к глобулярным белкам α -спирального типа [16]. Пептидные группы белка могут образовывать довольно прочные внутримолекулярные или межмолекулярные водородные связи, что обеспечивает, соответственно, образование либо α -спирали, либо вытянутой β -формы, поскольку глобулярная структура альбумина достаточно лабильна [19]. Молекула состоит из гидрофильных и гидрофобных участков, что определяется структурой аминокислотных остатков, входящих в ее состав [12]. В водном растворе гидрофобные участки располагаются ближе к центральной части глобулы белка, которая окружена гидрофильными участками, образованными из остатков аминокислот аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Они способны обмениваться протонами и противоионами с окружающей средой, что определяет адсорбционные взаимодействия молекул белка с поверхностью.

На рис. 6 представлены ИК-спектры А-300, ТМС, а также БСА в исходном и адсорбированном на них состоянии. Главные адсорбционные центры поверхности

ВДК – изолированные силанольные группы $\equiv\text{Si-OH}$ в ИК-спектрах проявляются в виде интенсивной узкой полосы поглощения с максимумом 3750 см^{-1} [20-23]. В ИК-спектрах БСА, адсорбированного на исследуемых кремнеземах (рис. 6 а), для полосы поглощения 3750 см^{-1} наблюдается снижение ее интенсивности по мере повышения степени заполнения поверхности белком. Уменьшение интенсивности этой линии свидетельствует о взаимодействии силанольных групп с адсорбируемым веществом. В соответствии с [6, 12] это указывает на образование водородной связи между ОН-группами поверхности SiO_2 и молекулами белка.

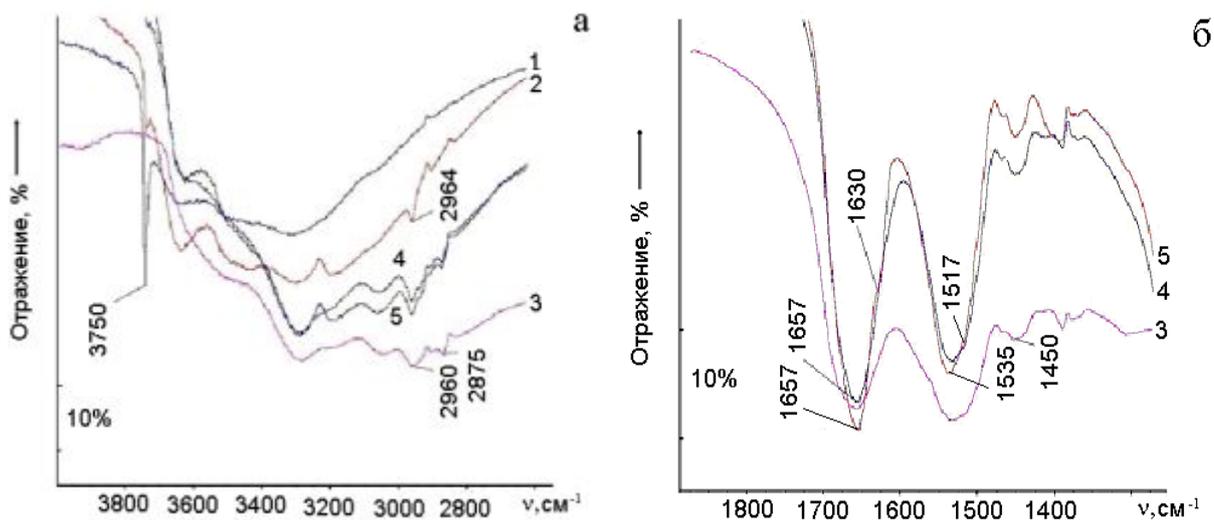


Рис. 6. ИК-спектры кремнезёмов А-300 (1), ТМС (2), БСА (3), БСА+А-300 (4) и БСА+ТМС (5).

При адсорбции БСА на А-300 интенсивность полосы уменьшается более, чем в четыре раза при количестве белка на поверхности, равном 10 % (таблица 2). Однако, даже при 40 %-ном заполнении поверхности ВДК белком еще проявляется, хотя и в незначительной мере, полоса поглощения, характерная для силанольных групп.

Таблица 2. Интенсивность полос поглощения (I, отн.ед.) силанольных групп при адсорбции бычьего сывороточного альбумина на кремнеземах

| Количество БСА на поверхности кремнезема, % | I, отн.ед. | |
|---|------------|-------|
| | А-300 | ТМС |
| 5 | 6,469 | 2,301 |
| 10 | 5,636 | 2,034 |
| 15 | 4,083 | 1,032 |
| 20 | 3,125 | - |
| 25 | 2,419 | - |
| 30 | 1,569 | - |
| 40 | 0,8 | - |
| 0 | 25,299 | 5,531 |

При адсорбции альбумина на ТМС эта полоса полностью исчезает уже при 20 %-ной степени заполнения поверхности белком. Этот факт дает основание предполагать, что при контакте полипептидной цепи с частично гидрофобизованной поверхностью взаимодействие молекул белка с ней может происходить по иному механизму, чем с

гидрофильной поверхностью, например по гидрофобному, с последующим изменением их конформации.

Пространственные изменения молекул белка по данным ИК-спектроскопии характеризуются по степени смещения полос Амид I и Амид II. Полосу Амид I с частотами в диапазоне 1658-1650 см^{-1} , обусловленную валентными колебаниями C=O и C-N связей используют для анализа вторичной структуры белков, поскольку частота полосы существенно отличается для разных их конформаций [24]. В спектрах адсорбированного БСА как на А-300, так и на ТМС фиксируется максимум в полосе поглощения при 1657 см^{-1} (рис. 6 б). Такое смещение согласно данным публикации [25] еще отвечает α -спиральной вторичной структуре белка. В полосе Амид I белка, адсорбированного на ТМС, есть низкочастотное плечо при 1630 см^{-1} , отсутствующее в спектре БСА, адсорбированного на А-300. Согласно [19, 26] оно может указывать на наличие вытянутой β -формы альбумина, что наблюдается при смещении полосы Амид I с 1658-1650 до 1635-1629 см^{-1} . Вместе с тем из данных литературы [27, 28] следует, что полоса поглощения 1630 см^{-1} может принадлежать также и деформационным колебаниям молекул воды. Для окончательного заключения необходимы измерения, позволяющие существенно уменьшить влияние адсорбированной воды на изменение полосы поглощения в этой области ИК-спектра. Однако, как указывалось выше, возможность гидрофобного механизма взаимодействия поверхности ТМС с БСА позволяет предполагать, что какая-то доля участков в полипептидной цепи альбумина может иметь вытянутую (распрявленную) β -форму. Такой вывод подтверждается и анализом полосы Амид II.

Для полосы Амид II характерно изменение частоты колебаний в области 1550 см^{-1} [24], которая по данным Тарасевича и Монаховой [29] определяется взаимодействием валентного колебания C-N с деформационным колебанием N-H с преобладанием последнего. Как оказалось, в спектре альбумина, адсорбированного на ТМС (рис.6 б), присутствует полоса поглощения с максимумом в более низких частотах, а именно в области 1535 см^{-1} , что может указывать на образование вытянутой β -структуры белка [29]. Авторы этой публикации объясняют появление данной полосы образованием водородной связи между N-H-группами молекулы альбумина и изолированными гидроксильными группами поверхности кремнезема. Такая связь является более слабой в сравнении с внутримолекулярной N-связью $\text{NH} \cdots \text{O} = \text{C}$, которая стабилизирует α -спиральную структуру белка.

В спектрах чистого альбумина и адсорбированного на А-300 и ТМС полоса Амид II имеет плечо с максимумом при 1517. см^{-1} (рис.6 б). Оно более выражено для неадсорбированного белка и адсорбированного на А-300, чем на ТМС. Это значение близко к частоте 1520 см^{-1} , которая относится к параллельной составляющей полосы Амид II для α -структуры белка [24]. Поскольку этот максимум является характеристическим для α -спирали и служит для ее идентификации, есть основание полагать, что при адсорбции БСА на А-300, в отличие от ТМС, α -структура белка сохраняется.

Валентным колебаниям C-N молекулы белка отвечают полосы 2960 и 2875 см^{-1} (рис.6 а), а деформационные колебания обуславливают максимум при 1450 см^{-1} (рис.6 б). Адсорбция белка на обоих носителях сопровождалась усилением интенсивности полос поглощения, характерных для деформационных колебаний, тогда как для валентных колебаний эти изменения малозначительны. Поскольку интенсивность полосы деформационных колебаний для образцов на ТМС более выражена, можно предполагать, что частичная гидрофобизация поверхности приводит к более глубокой деформации связей в полипептидных цепях белка, чем при их взаимодействии с гидрофильной поверхностью.

Поскольку область валентных колебаний группы С-Н составляет 2800 – 3300 см⁻¹ [30], ИК-спектральная оценка количества хемосорбированных триметилсилильных групп осуществляется по поглощению валентных колебаний связей С-Н при 2964 см⁻¹ (рис. 6 а). В спектрах белка, адсорбированного на ТМС, валентные колебания С-Н-групп белка и триметилсилильных групп накладываются, и наблюдается полоса поглощения в области 2963 – 2967 см⁻¹.

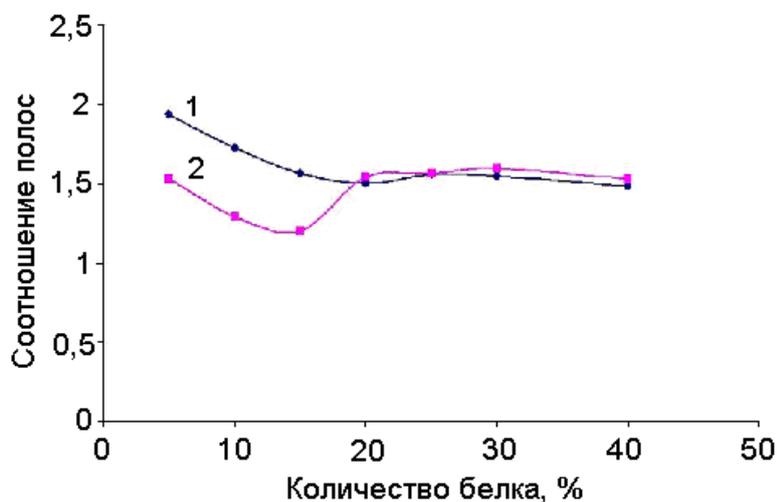


Рис. 7. Соотношение интенсивности полос поглощения СО-групп (1657 см⁻¹) к NH-группам (1535 см⁻¹) при адсорбции бычьего сывороточного альбумина на кремнеземе (1 – А-300, 2 – ТМС).

Возможность образования распрямленных участков молекулы белка подтверждает также рис. 7, из которого видно, что соотношение интенсивности полос поглощения, соответствующих карбонильным и имидным группам, при более низких концентрациях белка на поверхности кремнезёмов в значительной степени отличаются друг от друга.

Таким образом, наблюдаемое снижение величин предельной адсорбции БСА на ТМС по сравнению исходным ВДК по данным ИК-спектральных исследований можно объяснить тем, что взаимодействие БСА с частично гидрофобизованной поверхностью кремнезема в отличие от гидрофильной сопровождается переходом некоторых участков глобул белка от α -спиральной формы пептидной цепи к β -форме.

Выводы

Установлено, что белок БСА способен адсорбироваться на кремнеземе, как с гидрофильной, так и с частично гидрофобизованной поверхностью (N=0,52) из водного и водносолевого растворов при рН 4,8 и 7,4. Процесс зависит от рН и природы растворителя. Во всех случаях изотермы имеют лэнгмюровскую форму. Максимальная адсорбция белка наблюдалась для обоих кремнезёмов в области изоэлектрической точки белка при рН 4,8. Рассчитанные по изотермам величины предельной адсорбции показали, что наличие триметилсилильных групп на поверхности SiO₂ существенно снижает эту величину во всех исследованных случаях. На основании ИК-спектрального анализа альбумина, адсорбированного на кремнеземах, этот эффект для ТМС можно объяснить наличием на его поверхности триметилсилильных групп, что в отличие от гидрофильной поверхности ВДК, способствует переходу некоторых участков полипептидной цепи от α -структуры в так называемую распрямленную β -форму.

Литература

1. Нанотехнология в ближайшем десятилетии. Прогноз направления исследований / Под ред. М.К. Роко, Р.С. Уильямс, П. Аливисатоса. – М.: Мир, 2002. – 292 с.
2. Bengt Kasemo Biological surface science // *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 1998. – 3. – P. 451-459.
3. Коршак В.В., Штильман М.И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. – М.: Наука, 1984. – 261 с.
4. Гайда А.В., Староверов С.М. Модифицированные кремнеземные носители в биотехнологии // *Журнал Всесоюзного хим. об-ва им. Д.И. Менделеева*, 1989. – Т.34, № 3. – С. 356-363.
5. Алюшин М.Т., Астраханова М.М. Аэросил и его применение в фармацевтической практике // *Фармация*. – 1958. – Т.17, № 6. – С. 73-77.
6. Адсорбционное взаимодействие высокодисперсного кремнезема с биомолекулами / Чуйко А.А., Власова Н.Н., Давиденко Н.К., Погорелый В.К. // В кн. *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния* / Под ред. А.А. Чуйко. – Киев: Наукова думка, 2003. – С. 116-152.
7. Гриценко І.В., Галаган Н.П., Осауленко В.Л. Створення нанокompозиту на основі високодисперсного кремнезему і альбуміну та його біологічна активність по відношенню до мембрани еритроцитів // *Вісник Одеського нац. університету. Серія: "Хімія"*. – 2004. – Т.9, Вип.7. – С. 171-176.
8. Лысенко Л.В., Чуешов В.И., Лаврушина Т.Т. Сравнительная токсичность модифицированных образцов аэросила // *Фармацевт.* – 1977. – Т. 26, № 1. – С. 56-58.
9. Influence of the Partial Hydrophobization of Fumed Silica by Hexamethyldisilazane on Interactions with Water / Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M. et all // *Langmuir*. – 2003. – V. 19, №26. – P. 10816-10828.
10. Тарасевич Ю.И., Смирнова В.А., Монахова Л.И. Адсорбция альбумина на кремнеземе // *Коллоидный журнал*. – 1978. – Т. 58, № 6. – С. 1214-1216.
11. Камышный А.Л. Адсорбция глобулярных белков на твердых носителях: некоторые физико-химические характеристики // *Журнал физической химии*. – 1969. – Т. 55, №3. – С. 562-580.
12. Казакова О.А., Гунько В.М., Воронин Е.Ф., Сильченко С.С., Чуйко А.А. Взаимодействие белков с поверхностью дисперсного кремнезема в водных суспензиях // *Коллоидный журнал*. – 1998. – Т. 60, № 5. – С. 613-617.
13. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высшая школа, 1980. – С. 223-224.
14. Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел: Пер. с англ. Г. Парфита, К. Рочестера. – М.: Мир, 1986. – 488 с.
15. Тарасевич Ю.И., Монахова Л.И., Юрасова В.А. Взаимосвязь между гидрофильностью дисперсных оксидов и адсорбцией на них глобулярных белков // *Украинский химический журнал*. – 1984. – Т. 50, №10. – С. 1032-1037.
16. Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм Б.Д. Поверхностные явления в белковых системах. – М.: Химия, 1988. – 240 с.
17. Jeffrey J. Gray The interaction of with solid surfaces // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2004. – V.14. – P. 110-115.
18. Scott J., McClellan., Elias I Adsorption of bovine serum albumin at solid/aqueous interfaces // *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Aspects*. – 2005. – V.260. – P. 265-275.
19. Тарасевич Ю.И. Взаимодействие глобулярных белков с поверхностью кремнеземов // *Теорет. и эксперим. химия*. – 2001, Т.37, №2, С. 95-99.
20. Айлер Р. Химия кремнезёма: пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – Ч. 1, 2. – 1127 с.

21. Киселёв А.В. Межмолекулярные взаимодействия в адсорбции и хроматографии. – М.: Высш. шк., 1986. – 360 с.
22. Тёртых В.А., Белякова Л.А. Химические реакции с участием поверхности кремнезёма. – К. Наук. думка, 1991. – 264 с.
23. Химия поверхности кремнезёма. / Под. ред. А.А. Чуйко. – К.: Укр. ИНТЭИ, 2001. – Т. 1, Ч. 1. – 736 с.; Ч. 2. – 500 с.
24. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. – М.: Наука, 1965. – 135 с.
25. Ямпольская Г.П., Тарасевич Б.Н., Еленский А.А. Вторичная структура глобулярных белков в адсорбционных слоях на границе фаз раствор – воздух по данным ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием // Коллоидный журнал. – 2005. – Т.67, № 3. – С. 426-432.
26. Сузи Г. Структура и стабильность биологических макромолекул. – М.: Мир, 1973 – 481 с.
27. Литтл Л. Инфракрасные спектры адсорбированных молекул. – М.: Мир, 1969. – 514 с.
28. Химия привитых поверхностных соединений / Под. ред. Г.В. Лисичкина. – Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2003. – 592 с.
29. Тарасевич Ю.И., Монахова Л.И. Взаимодействие глобулярных белков с поверхностью кремнеземов // Коллоидный журнал. – 2002. – Т.64, № 4. – С.535-540.
30. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия. – М.: Мир, 1982. – 328 с.

**ADSORPTION OF BOVINE SERUM ALBUMIN ON THE SURFACE OF
ULTRAFINE SILICA MODIFIED BY TRIMETHYLSILYL GROUPS**

I.V. Siora, N.Y. Klymenko, N.P. Galagan, V.M. Bogatyrov

*Chuiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine
General Naumov street 17, 03164, Kyiv-164*

The adsorption of bovine serum albumin (BSA) on the surface of hydrophilic and partially hydrophobic ultrafine silica modified by hexamethyldisilane was investigated. The adsorption was carried out from aqueous and aqueous-salt solutions at pH 4,8 and 7,4 and obtained adsorption isotherms were characterized. IR-spectra of adsorbed protein on silica were obtained and discussed. It was shown that the hydrogen bonds between isolated hydroxyl groups of silica and NH-groups of protein were formed as a result of protein adsorption. The changes of the secondary structure of the protein adsorbed on partially hydrophobic silica are discussed.