

УДК 541.183.02

## **МОНОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СЛОИ БЕЛКОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА ИХ ОСНОВЕ**

**Г. П. Ямпольская, С. М. Левачев, А. Е. Харлов, А. С. Фадеев, В. Н. Измайлова**

*(кафедра коллоидной химии; E-mail: Izmailova@ Colloid Chem.msu.ru)*

**Обсуждены свойства и принципы самоорганизации специфических структур глобулярных и фибриллярных (коллагена) белков, являющихся природными наночастицами, в мономолекулярных слоях на границе раздела фаз вода – воздух. В качестве модельных систем изучены поверхностные пленки латексов. Рассмотрены способы конструирования тонких пленок белков и смешанных белок-липидных пленок на твердых подложках, в которых структурным элементом служит организованный мономолекулярный слой. Проанализированы экспериментальные методики, позволяющие повысить надежность получения ЛБ-пленок белков с заданными составом и структурой. Рассмотрены примеры использования таких пленок в нанотехнологии, а также перспективы ее развития.**

Задачу данной статьи авторы видели в обсуждении перспективности исследований мономолекулярных слоев белков для нужд нанотехнологии. Первая часть посвящена результатам изучения самоорганизации глобулярных белков и основных направлений использования метода

мономолекулярных слоев для конструирования белковых наноматериалов с заданными свойствами, во второй – рассматриваются новые экспериментальные данные, характеризующие свойства мономолекулярных слоев фибриллярного белка – коллагена. Заметим, что свойства

монослоев фибриллярных белков мало изучены, несмотря на большую потенциальную возможность практического использования наноматериалов на основе коллагена.

Молекулы белков представляют собой природные наночастицы, обладающие всеми свойствами, присущими наносистемам, и, кроме того, специфическими биологическими функциями, чрезвычайно заманчивыми для нанотехнологий. Получение наноматериалов в этом случае основано на принципах самоорганизации биоструктур. Проблема самоорганизации имеет фундаментальное значение, поскольку направлена на поиск ответа на вопрос, как из неживых предшественников возникают сложные биологические системы. В отличие от синтетических гомополимеров или регулярных сополимеров, не имеющих четко определенных конформационных структур, белки с неповторяющейся последовательностью аминокислотных остатков в полипептидной цепи имеют компактную глобулярную конформацию, необходимую для их биологических функций. В 60-х годах прошедшего века Анфинсен высказал гипотезу о том, что вся информация, определяющая нативную структуру белка, содержится в первичной структуре – аминокислотной последовательности полипептидных цепей. Главное заключается в том, что нативное компактное состояние отвечает наименьшей свободной конформационной энергии. Размеры глобулярных белков определяются размером упорядоченных вторичных (линейных) структур (1–2 нм), а радиус (нм) эквивалентной молекуле глобулярного белка сферы с хорошей точностью определяется выражением  $R = 0,067 M^{1/3}$  [1]. Принципиально иная структура фибриллярных белков, ярким представителем которых являются коллагены, связана с тем, что в полипептидных последовательностях этих белков наблюдается некоторая регулярность состава. Так, например, в коллагене каждая третья аминокислота вдоль последовательности представлена глицином, так что состав можно представить простой формулой (-Гли-Х-У-)n. На рис. 1 для примера представлены структуры молекул глобулярного белка (а) и коллагена (б). К исследованиям мономолекулярных слоев прибегают при решении разнообразных задач. Основная задача классических исследований монослоев белков состояла в развитии представлений о поверхностной активности белков и принципах регулирования их поведения на границах раздела фаз, впоследствии монослои белков стали изучать, рассматривая их в качестве моделей белков в биомембранах и специфического фолдинга биоструктур. В последние годы внимание исследователей сосредоточено на получении ЛБ-пленок белков для записи и хранения информации, в микро-оптике, микроэлектронике и биотехнологии [2–4]. ЛБ-пленки белков используют как высокочувствительные биосенсоры [5–7] и высокопродуктивные биореакторы [8]. Высокоупорядоченные ЛБ-пленки бактериородопсина могут выполнять функции фотосенсоров [9] и служить для хранения информации [10]. Совершенно очевидно, что ЛБ-техника получения упорядоченных пленок белков незаменима для создания биомолекулярных электронных

устройств [11]. Однако успехи биосенсоров и биоэлектроники существенно зависят от возможности приготовления белковых слоев заданной структуры [12].

В качестве инструментального метода создания белковых наноматериалов используют конструирование пленок по методу Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ-пленки) или Ленгмюра–Шеффера. При этом получение мономолекулярных слоев подходящего состава и структуры служит неперменной первой стадией создания пленок. Совокупность задач включает изучение широкого круга вопросов: 2D-упорядоченные пленки белков, принципы образования специфических структур, 2D-кристаллизация белков, смешанные липид-белковые упорядоченные системы. Несмотря на растворимость многих белков в воде, они

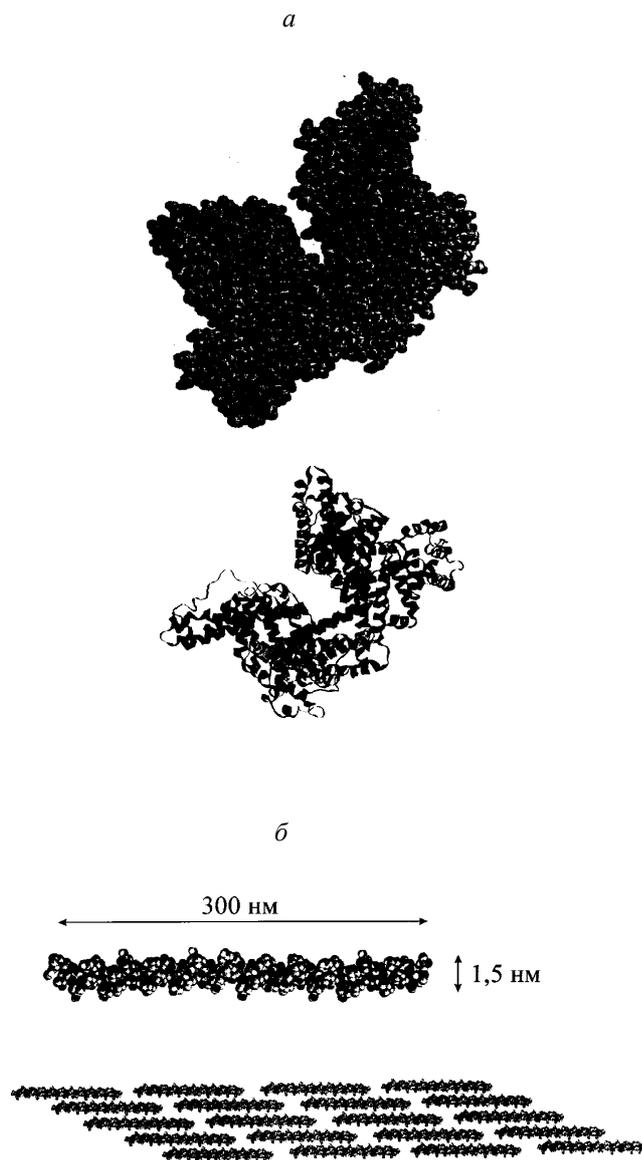


Рис. 1. Примеры молекулярных структур белков: а – глобулярный белок бычий сывороточный альбумин (BSA): полная пространственная структура (вверху), пространственная структура полипептидной цепи с высоким содержанием  $\alpha$ -спиралей (внизу); б – фибриллярный белок коллаген I: молекула коллагена (вверху), укладка молекул в фибриллы (внизу)

образуют при нанесении на границу раздела фаз вода–воздух устойчивые мономолекулярные слои, свойства которых хорошо изучены [13–27]. Детали экспериментальной техники получения ЛБ-пленок белков можно найти в [28].

Рассмотрим некоторые особенности получения монослоев белков и свойства изотерм двумерное давление–площадь. Изотермы двумерное давление–площадь монослоев белков в большинстве случаев имеют однотипный вид (рис. 2). Здесь представлены данные для двух белков–гемоглобина (Hb) и бычьего сывороточного альбумина (BSA) [14, 17]. Регистрация участка А–В обычно вызывает трудности из-за небольшого увеличения двумерного давления при сжатии монослоя, В–С – характерная ветвь изотерм сжатия для белков. ЛБ-пленки обычно получают перенесением монослоя белка, состояние которого (двумерное давление и площадь на молекулу) описывается точкой чуть выше точки С. На последующих участках С–D и D–E протекают процессы, приводящие к коллапсу: монослой коробится, превращается в бислой, сворачивается в мультислойные пленки. Участок А–В на основании измерений поверхностного натяжения для 7 глобулярных белков представляется возможным связать с переориентацией молекул (от ориентации большой осью эллипсоида к ориентации малой осью параллельно поверхности [29]). На основании проведенного ранее [14] анализа изотерм монослоев глобулярных белков и полиаминокислот (рассмотрено 20 систем) участок В–С можно связать с увеличением ориентационного порядка в монослое глобулярных белков, причем ориентирующимися в плоскости монослоя элементами могут выступать  $\alpha$ -спирали, четвертичные структуры или глобулы. Причины образования двумерных упорядоченных структур привлекают внимание многих исследователей. Так, в [30] на основании результатов изучения модельных систем (латексы с диаметром

частиц 1,78 мкм) показано, что порядок возникает вследствие неспецифических латеральных капиллярных сил притяжения из-за перекрытия менисков вокруг частиц. Обнаружено два типа стягивающих капиллярных сил: флотационные (движущая сила – гравитация) и иммерсионные (движущая сила – смачивание). Энергия притяжения между молекулами белка за счет капиллярных сил составляет около 10 кТ. Решающим для 2D-структуры может оказаться вклад специфического взаимодействия белок–белок. Техника мономолекулярных слоев позволяет моделировать отдельные этапы самоорганизации и получать информацию, важную для идентификации биоструктур, отвечающих как норме, так и патологии. Использование *in situ* ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием для исследования мономолекулярных слоев амилоидных белков (прионы) позволило обнаружить переход между вторичными структурами по типу  $\alpha$ -спираль –  $\beta$ -структура [31]. Считается, что такой переход является причиной образования фибрилл *in vivo*, что приводит к появлению амилоидных структур в виде внеклеточных отложений на стенках кровеносных сосудов в различных тканях и органах, являющихся причиной ряда фатальных нейродегенеративных и раковых заболеваний человека и животных.

Несмотря на очевидную заманчивость конструирования наноматериалов на основе белков с помощью метода мономолекулярных слоев, нередко высказывались сомнения в целесообразности широкого распространения технологии в связи с экспериментальными трудностями переноса монослоев на твердые подложки.

Чрезвычайная важность задачи получения упорядоченных 2D-структур белков привела к попыткам разработать альтернативные методу Ленгмюра способы. Среди них – нанесение растворов белков на поверхность ртути [32] и динамический метод ламинарного течения [33]. Оба метода пока недостаточно надежны для получения упорядоченных структур: на образцах латексов удавалось добиться 2D-кристаллизации, а на белках – нет. Однако бесспорным преимуществом метода мономолекулярных слоев является возможность контролировать образование упорядоченных монослоев при регулировании и измерении двумерного давления и площади на молекулу. Следует сказать, что многие сомнения по поводу перспективности метода легко снимаются при соблюдении определенных правил приготовления и перенесения монослоев белков.

Для получения гомогенного монослоя при нанесении водорастворимых белков необходимо, чтобы поверхностное натяжение субфазы было выше поверхностного натяжения наносимого раствора белка. Для этого необходимо наносить раствор на поверхность воды в органическом растворителе. Но безусловно, лучше при исследовании белков наносить на поверхность раствор белка в воде, а в качестве субфазы использовать растворы солей в воде. Однако в этом случае ЛБ-пленки будут содержать электролит, поскольку трудно избежать его осаждения на твердые подложки при перенесении монослоя белка. Эта

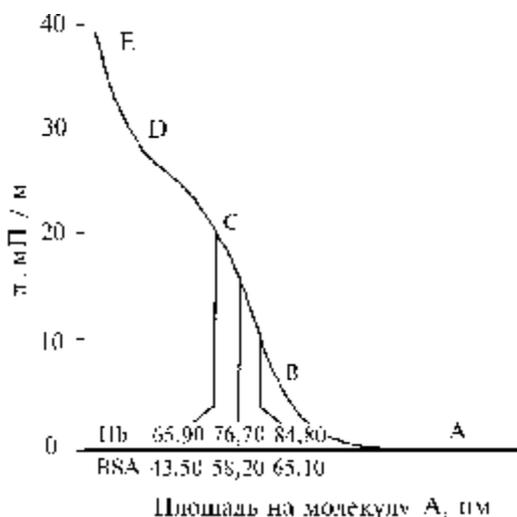


Рис. 2. Типичный вид изотерм двумерное давление ( $\pi$ ) – площадь (A); на абсциссе указаны площади на молекулу белков при разных  $\pi$ : Hb – гемоглобин, BSA – бычий сывороточный альбумин

экспериментальная трудность решается двойным переносом монослоя белка – сначала монослой, организованный на поверхности раствора соли, переносится на поверхность чистой воды, а затем уже на твердые подложки, формируя ЛБ-пленки. Такой способ успешно используется для создания ферментативных биосенсоров [19].

Поскольку при адсорбции белков на различных границах раздела фаз, как правило, формируются конденсированные слои, проявление специфических свойств в которых в значительной мере ингибируется, и наибольшей активностью обладают изолированные глобулы [34], при конструировании биосенсоров для предотвращения ассоциации молекул белка используют встраивание белка в мономолекулярные слои липидов с последующим переносом на твердые подложки. Считается, что такой способ позволяет избежать высыхания и изменений структуры слоя из-за длительного контакта монослоя с воздухом. Если белок встраивается в монослой липида за счет адсорбции из субфазы, липиды позволяют регулировать заряд поверхности, число встроенных молекул фермента и добиваться оптимальных свойств пленки. При получении упорядоченных пленок белка хорошие результаты дает использование принципа специфической адсорбции [35–37], использование полимеризующихся липидов [38], сшивок белка глутаровым альдегидом или специальной химической модификации белка и многих других приемов. В [39] длинноцепочечные алкил-дикетоны взаимодействовали с поверхностными группами аргинина цитохрома С, что значительно улучшало 2D-ориентацию белка. В отсутствие специфической адсорбции белки не взаимодействуют с липидами в монослое, а встраиваются в промежутки между доменами конденсированных липидов [40].

Поскольку мономолекулярные слои самоорганизуются под влиянием минимизации свободной поверхностной энергии, оказалось полезным для облегчения самоорганизации монослоя и улучшения свойств пленки произвести расширение полученного смешанного белок-липидного монослоя с последующим ее сжатием. Многие методики отработаны при разработке содержащих глюкооксидазу сенсоров, позволяющих в экспресс-анализах эффективно определять содержание глюкозы в крови [7]. При формировании упорядоченных структур белков или 2D-кристаллов полезно для лучшего закрепления белка в монослое усилить электростатические взаимодействия или обеспечить специфическую адсорбцию, после этого монослой сжимают с последующим растяжением или оставляют на некоторое время для самоорганизации. Структурные перестройки белка при длительном контакте с воздухом создают большие проблемы как для биосенсоров, так и для 2D-кристаллизации. В [41] реализована двумерная кристаллизация белков, вступающих во взаимодействие антиген–антитело, что позволило провести структурный анализ комплексов с помощью электронной микроскопии. 2D-кристаллизация оказывается незаменимым способом получения кристаллов белков в тех случаях, когда это не удается обычными приемами кристаллизации в

трехмерных системах, а также для получения кристаллических форм сложных белковых комплексов. Во всех случаях 2D-кристаллы исследуются с применением информативных структурных методов. Весьма подробно способы 2D-кристаллизации разработаны на примере белка стрептовицина и большого числа его точечных мутантов [42]. Показано, что изменение специфических взаимодействий белка в монослоях приводит к разнообразию морфологических форм кристаллов. Как правило, образуются менее упорядоченные паракристаллы, которые затем вследствие двумерного твердофазного фазового перехода преобразуются в более упорядоченные кристаллические формы. Макроскопическими и микроскопическими изменениями в свойствах 2D-кристаллов можно управлять путем влияния на межмолекулярные взаимодействия. Манипулирование Ленгмюровскими монослоями белков позволяет получать любые кристаллы и получать необходимую информацию для развития представлений о белок-белковых взаимодействиях и деталях специфической самоорганизации.

В заключение рассмотрим результаты исследований мономолекулярных слоев фибриллярного коллагена. Коллагены относятся к самому распространенному классу белков животного происхождения с ярко выраженной способностью к молекулярной самоорганизации. Этот процесс в данном случае включает следующую иерархию структур: три полипептидные  $\alpha$ -цепи (первичная структура), свернутые в левую спираль (вторичная структура), ассоциируются с образованием тройной (право-закрученной) спирали, образуя молекулу коллагена. Молекула коллагена представляет собой жесткую, практически недеформируемую палочку (рис. 1, б) с молекулярной массой 270–350 кДа. Молекулы самоассоциируются в фибриллы, которые, в свою очередь, образуют супрамолекулярные ансамбли, выполняющие *in vivo* роль внеклеточного матрикса. Внеклеточный матрикс не только выполняет функции несущих конструкций, но и принимает участие в передаче информации клеткам, регулируя их адгезию, миграцию и др., а также специфические взаимодействия с белками, нуклеиновыми кислотами и неорганическими ионами [43]. Известны более 30 типов коллагенов, различающихся первичной структурой, а потому и пространственным строением молекул и ассоциатов высшего порядка. Наиболее распространен коллаген I, состоящий из двух  $\alpha 1$ -цепей и одной  $\alpha 2$ -цепи. Экспериментальная работа выполнена с этим типом коллагена. Нарушение специфической самоассоциации коллагена приводит к тяжелым патологиям (коллагеновые болезни). *In vivo* нарушения самоассоциации связаны с мутациями в первичной структуре, когда один-два остатка глицина заменяются на любую другую аминокислоту. *In vitro* правильность самоассоциации может нарушаться под влиянием ряда физико-химических факторов, изучение этих явлений представляет несомненный интерес. Фибриллообразование коллагена изучено в большом числе работ и основные результаты обсуждены в обзорах [44–45]. Молекулы коллагена ассоциируются латерально «конец к

концу» с промежутком в 40 нм, что до сих пор не нашло объяснения. Дискутируется и вопрос о природе межмолекулярных взаимодействий, обуславливающих специфичность образования и стабильность супрамолекулярных структур коллагена. По данным [46], при переходе от одной структуры (молекула) к другой (фибрилла) перестраивается сложная сетка водородных связей, формируемых молекулами воды, вокруг соответствующей пространственной структуры коллагена. Способ укладки фибрилл в соединительных тканях также довольно сложен и мало изучен. Остается открытым вопрос о роли жидкокристаллического (ЖК) состояния в процессах самоорганизации. Теория ЖК-состояния, разработанная для жестких палочкообразных частиц, позволяет считать образование ЖК для молекул или фибрилл коллагена вполне допустимым. Исследованию ЖК-структур коллагена посвящено множество работ [47–58]. ЖК-фазы также представляют значительный практический интерес для нанотехнологии. В случае коллагена возникновению ЖК-фаз способствует уменьшение концентрации воды, сдвиговые напряжения, магнитные и электрические поля, межфазная ориентация на поверхности синтетических полимеров [59–65]. Для изучения ЖК-состояний мы воспользовались методом мономолекулярных слоев, поскольку теория [66–68] предсказывает различные типы и условия образования ЖК-фаз для жестких палочкообразных частиц в мономолекулярных слоях. Таким образом, цель проводимых исследований состояла в изучении специфической самоорганизации и роли ЖК-состояний коллагена с использованием метода мономолекулярных слоев. Вероятно, результаты будут представлять интерес для биологии, а также при разработке условий надежного практического использования материалов на основе коллагена в медицине и парфюмерии [69]. Кроме того, коллагеновые материалы считаются весьма перспективными в качестве имплантируемых материалов, причем задача сводится к воспроизводству *in vitro* организованных структур коллагена, механические свойства которых соответствовали бы характеристикам заменяемых тканей и органов [70–73]. Роль электростатических взаимодействий в самоассоциации коллагена изучали при варьировании pH (3,0–12,0) и ионной силы субфазы. Обнаружено, что наиболее стабильные монослои и поверхностные пленки коллагена образуются, когда pH подложки совпадает с изоэлектрической точкой коллагена ( $pH = pI = 5,7$ ), о чем свидетельствует наибольшее давление коллапса [74]. Для изотерм «двумерное давление–площадь» идеально стабильного монослоя коллагена (рис. 3, верхняя кривая) характерно наличие двух участков (жидко-растянутого и жидко-конденсированного), разделенных широким плато, в области которого происходит образование фибрилл из отдельных латерально-ориентированных молекул коллагена (рис. 1, б). Геометрические параметры фибрилл, рассчитанные из изотерм двумерного давления, согласуются с данными прямыми методами исследования фибрилл коллагена [44, 45]. Участок сжатия монослоя коллагена вблизи плато (до 600–

700 нм<sup>2</sup> на молекулу) свидетельствует о высокой степени ориентации молекул коллагена параллельно друг другу, поскольку при реальной площади на молекулу коллагена, равной 450 нм<sup>2</sup> (рис. 1, б), только взаимно ориентированные на поверхности молекулы-стержни могут занимать площадь, равную 600–700 нм<sup>2</sup>. Это дает основание полагать, что двумерные ориентационные ЖК-структуры формируются как предшественники специфического структурообразования. Участок после плато (конец плато наблюдается независимо от состава субфазы при 300 нм<sup>2</sup>, что можно рассматривать как еще одну характеристическую точку двумерной самоорганизации молекул коллагена) отражает сжатие поверхностного слоя, состоящего из фибрилл коллагена вплоть до коллапса поверхностной пленки. Площадь проекции молекулы коллагена в фибрилле составляет 134 нм<sup>2</sup>. В какой-то мере коллапс можно рассматривать как формирование трехмерных структур высшего порядка. Ветвь жидко-конденсированного состояния в свою очередь отражает взаимную ориентацию анизометричных фибрилл. Изменение состава субфазы (растворы гексилового и *трет*-бутилового спиртов, мочевины и тиомочевины) приводит при определенных концентрациях вводимого в водную фазу компонента к весьма значительным изменениям свойств мономолекулярных слоев коллагена. На рис. 3 кроме изотермы двумерного давления на воде ( $pH = pI$ , верхняя кривая) представлены изотермы, которые регистрируются при увеличении концентрации гексилового спирта в субфазе. Видно, что поверхностные пленки теряют устойчивость и давление коллапса падает по мере увеличения концентрации гексанола. Однако свойства монослоя изменяются не сразу. До концентрации гексанола  $2,5 \cdot 10^{-3}$  М плато на изотермах по-прежнему сохраняется и в гомогенном смешанном монослое, содержащем коллаген и гексанол, поджатие приводит к образованию фибрилл, однако эффективная площадь на молекулу коллагена в присутствии спирта уменьшается: 700–600 нм<sup>2</sup> (на воде), 600–500 (концентрация гексанола  $1 \cdot 10^{-3}$  М) и 550–500 нм<sup>2</sup> (концентрация спирта в субфазе увеличивается до  $2,5 \cdot 10^{-3}$  М (рис. 3)). Учитывая размеры молекул и фибрилл коллагена, можно оценить расстояние между молекулами, на котором проявляются силы притяжения и фибриллизация коллагена в плоскости монослоя, которое составляет в зависимости от концентрации спирта 1,6–1,0 нм. Полученный результат идеально согласуется с результатами [75], полученными при прямом измерении сил взаимодействия. По данным авторов [75], энергия притяжения между жесткими, напрямую не контактирующими, молекулами коллагена составляет 10 кТ. Притяжение идентифицировано с гидратными силами. Баланс множества сил притяжения и отталкивания, возникающих по мере уменьшения расстояния между молекулами коллагена, приводит к изменению сетки связанных водородными связями молекул воды при объединении молекул коллагена в фибриллы. Так возникает специфическое белок-белковое взаимодействие, контролируемое энтропийным выигрышем из-за высвобождения определенного

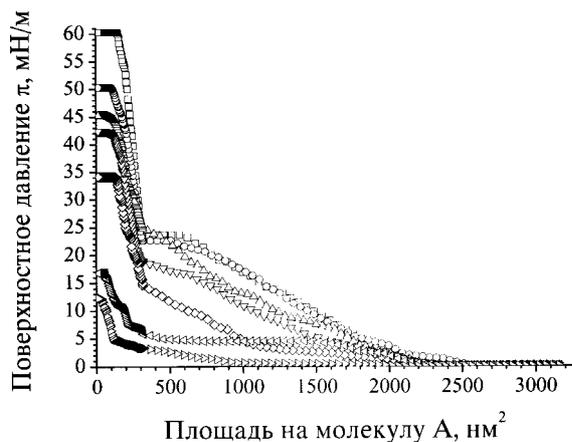


Рис. 3. Изотермы двумерное давление ( $\pi$ ) – площадь ( $A$ ) на молекулу коллагена при различных составах субфазы

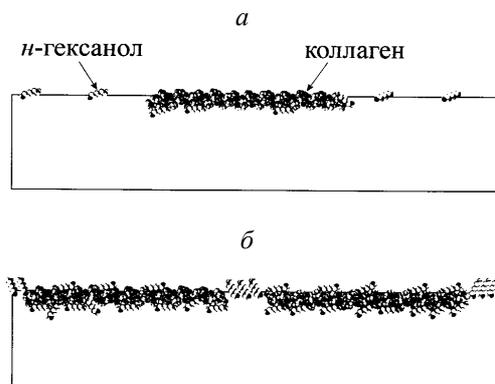


Рис. 4. Модели смешанного монослоя коллаген – гексиловый спирт: *a* – гомогенный смешанный монослой (концентрация *n*-гексанола  $10^{-3}$ – $2,5 \cdot 10^{-3}$  М), *b* – гетерогенный смешанный монослой (концентрация *n*-гексанола  $7,5 \cdot 10^{-3}$ – $10^{-2}$  М)

числа молекул воды. Аналогичные выводы были получены при исследовании специфических взаимодействий антиген-антиген. Присутствие молекул гексанола в монослое коллагена приводит к проявлению сил отталкивания осмотической природы, несколько затрудняющих процесс объединения молекул коллагена в фибриллы, с одновременным уменьшением ориентационного порядка. В пользу последнего свидетельствуют изменения модулей сжатия. В случае больших концентраций гексанола в субфазе в результате фазового разделения смешанного монослоя на домены конденсированного гексанола и коллагена даже при небольшом поджатии монослоя регистрируется плато при низком двумерном давлении, что и свидетельствует о коллапсе монослоя (рис. 3, нижние кривые).

Модели гомогенного и гетерогенного смешанных монослоев представлены на рис. 4, *a* и *b* соответственно. Важным доказательством зависимости 2D-самоорганизации коллагена от состояния гексанола в смешанном монослое служит зависимость давления коллапса от двумерного давления  $\Delta\sigma$  равновесных с субфазой адсорбционных слоев гексанола (рис. 5). Зависимость проходит

через начало координат и выражается прямой вида  $\pi_c = 1,5 \Delta\sigma$ , а условие  $\pi_c = 0$  соответствует полному нерастеканию коллагена в молекулярный монослой и образованию агрегатов молекул коллагена в неупорядоченных системах. Исследование свойств монослоев коллагена на растворах *трет*-бутанола, при некоторой специфике воздействия на поверхностную самоорганизацию, также показало, что монослои коллагена теряют устойчивость, если поверхностное натяжение подложки становится равным  $35 \text{ мН м}^{-1}$  (рис. 5, кривая 2). Таким образом, вводимые в субфазу дополнительные компоненты, снижающие поверхностное натяжение, нарушают самоорганизацию молекул коллагена, приводя вблизи критических концентраций к вытеснению коллагена с поверхности по оргогенетическому механизму. Мочевина и тиомочевина – компоненты, не обладающие поверхностной активностью, также предотвращают самоорганизацию. В этом случае, по-видимому, вследствие денатурации коллагена под действием этих добавок, причем эффективность денатурирующего действия в поверхностных слоях выше, чем для объемных фаз.

Представляет интерес сравнить свойства двумерных слоев коллагена со свойствами желатины. Желатина – продукт денатурации коллагена – представлена обычно набором в той или иной степени модифицированных полипептидных цепей с характерной для коллагена аминокислотной последовательностью. Эти цепи способны к частичной ренатурации – восстановлению трехспиральных участков, присущих молекулам коллагена. На рис. 6 показаны изотермы «сжатие – растяжение» для монослоев желатины. Видно, что качественно ход изотерм повторяет изотермы «двумерное давление – площадь коллагена» (рис. 3). В количественном отношении изотермы существенно различаются. Двумерные слои желатины

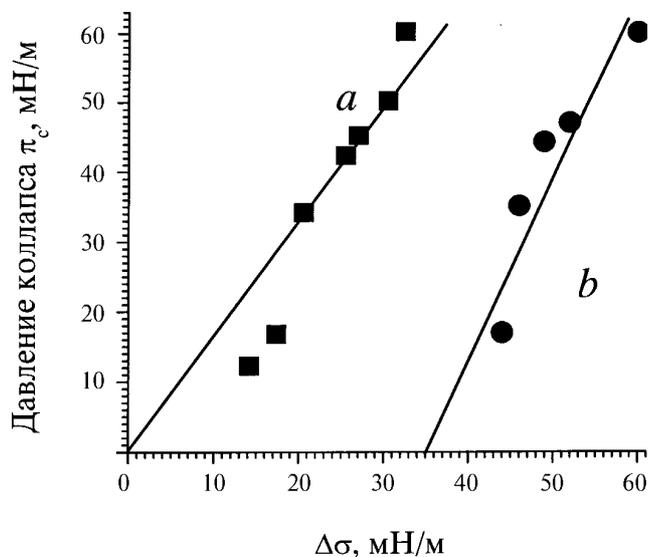


Рис. 5. Зависимость давления коллапса мономолекулярных слоев коллагена в зависимости от двумерного давления субфазы, содержащей гексанол (*a*) или третичный бутиловый спирт (*b*)

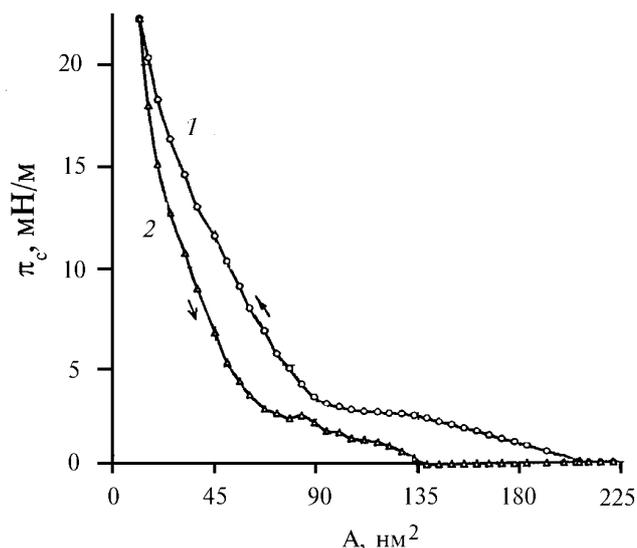


Рис. 6. Изотермы сжатия–растяжения мономолекулярных слоев желатины на растворах 0,4 М сульфата аммония

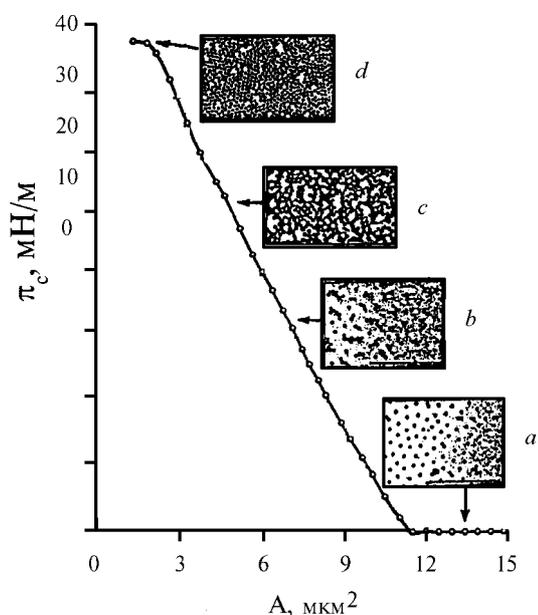


Рис. 7. Изотермы сжатия и структура поверхностной пленки латекса

менее устойчивы вследствие меньшей упорядоченности и дефектности. Давление коллапса уменьшается с 60 до 22,5 мН м<sup>-1</sup>. Двумерное давление монослоев желатины начинает расти при эффективной площади на молекулу 225 нм<sup>2</sup>, что соответствует 600–700 нм<sup>2</sup> на молекулу коллагена, когда в монослое наблюдается фибриллообразование с высоким ориентационным порядком. По-видимому, на участке роста двумерного давления происходит постепенное и ограниченное формирование ассоциатов полипептидных цепей желатины с образованием структур, аналогичных молекулам коллагена. На участке плато такие самоорганизованные ассоциаты образуют фибриллы,

на это указывает площадь, при которой плато заканчивается (~90 нм<sup>2</sup> на молекулу желатины), что отвечает завершению фибриллизации молекул коллагена в монослоях при площади ~300 нм<sup>2</sup>. Таким образом, метод мономолекулярных слоев можно в определенных условиях использовать для восстановления нативной структуры белков. Конструирование ЛБ-пленок желатины также представляется перспективным для создания ряда материалов медицинского назначения.

Хорошей моделью образования упорядоченных 2D-систем являются изотермы «двумерное давление – площадь» для латексов, нанесенных на поверхность раствора электролитов. Использованы латексы с узким распределением отрицательно заряженных частиц по размерам (наиболее вероятный диаметр 1,13 мкм), электрокинетический потенциал 32,2 мВ. Типичный вид изотермы сжатия представлен на рис. 7. Здесь же на врезках показаны электронномикроскопические картины, характеризующие состояние поверхностного слоя для определенных значений двумерного давления и площади на частицу. Электронная микроскопия выполнена в работе [76]. Видно, как по мере сжатия и роста двумерного давления на поверхности появляются димеры и кластеры частиц с возрастающими числами агрегации (рис. 7, в, с), а затем на прямолинейном участке изотермы достигается плотная упаковка сферических частиц (рис. 7, d), вблизи коллапса образуются периодические коллоидные двумерные системы. Исследование структурообразования латексов имеет и самостоятельный интерес в силу широких перспектив использования латексов в современных технологиях: латексы применяют в качестве наполнителей и пластификаторов в эмульсионных слоях светочувствительных материалов; в биотехнологии латексы выполняют роль носителей биолигандов. В связи с этим представляло интерес выяснить влияние адсорбции желатины на поверхности латексных частиц на образование упорядоченных поверхностных слоев. Модификация поверхности латексных частиц за счет физической адсорбции желатины приводила к образованию адсорбционных слоев толщиной 75 нм (данные квазиупругого рассеяния лазерного света). В результате модификации поведение поверхностных слоев латексов заметно изменяется, так, давление коллапса снижается до 33 мН м<sup>-1</sup>, причем обнаруживается уменьшение сжимаемости поверхностной пленки, модуль упругости возрастает почти на 5 мН м<sup>-1</sup> по сравнению с немодифицированным латексом и на 12 мН м<sup>-1</sup> по сравнению с желатиной. Заряд поверхности частиц остается отрицательным, электрокинетический потенциал уменьшается в результате модификации желатиной до 22,4 мВ. Модификация желатиной латексных частиц, по-видимому, затрудняет образование упорядоченных 2D-структур, а при масштабировании на трехмерные системы это означает повышение устойчивости латексов к агрегированию.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Richards F.M. // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1977. **6**. P. 151.
2. Reichert W.M., Bruckner C.J., Joseph J. // Thin Solid Films. 1987. **152**. P. 345.
3. Andrade J.D. // Thin Solid Films. 1987. **152**. P. 335.
4. Roberts G.G. // Adv. Phys. 1985. **34**. P. 475.
5. Arya A., Krull U.J., Thompson M. // Anal.Chim. Acta. 1985. **173**. P. 331.
6. Okahata Y., Tsuruta T., Ijiri K. // Ariga, Langmuir. 1988. **4**. P. 1373.
7. Syriudthsak M., Yamagishi H., Moriizumi T. // Thin Solid Films. 1988. **160**. P. 463.
8. Ohnishi M., Ishimoto C. Extended Abstracts of 2<sup>nd</sup> Int. symp. on Bioelectronics and Molecular Devices, Research and Development Association for Future Electron Devices. Tokyo, Japan. 1988. P. 147.
9. Miyasaka D.T., Koyama K., Itoh I. // Science. 1988. **255**. P. 342.
10. Oesterhelt D., Brauchle C., Hampp N. // Rev. Biophys. 1988. **24**. P. 425.
11. Carter F.L. // Molecular Electronics Devices. N.Y., 1982.
12. Sethi R.S. Biosens. Bioelectron. 1994. **9**. P. 243.
13. Langmuir I., Schaefer V.J. // Science. 1937. **2194**. P. 76.
14. Ямпольская Г.П., Измайлова В.Н., Разникова Г.Ц., Нусс П.В. // Изв. АН. Сер. Физ. 1995. **59**. P. 109.
15. Разникова Г.Ц., Ямпольская Г.П., Нусс П.В., Измайлова В.Н. Коллоид. журн. 1988. **55**. P. 110.
16. Yamashita T., Bull H.B. // J.Colloid Interface Sci. 1988. **24**. P. 310.
17. Said M., Rosen D., Hasted J.B. // J.Chem. Soc. Faraday Trans. I. 1988. **85**. P. 99.
18. Nitsch W., Maksimov R. // J.Colloid Interface Sci. 1988. **141**. P. 322.
19. Nakagawa T., Kakimoto M., Miwa T., Airawa M. // Thin Solid Films. 1988. **202**. P. 151.
20. Demeny M., Kochwa S., Sobotka H. // J. Colloid Interface Sci. 1988. **22**. P. 144.
21. Holly F.J., Dolow K., Yamada K.M. // J. Colloid Interface Sci. 1988. **100**. P. 210.
22. Ерохин В.В. Дис. ... канд. хим. наук. М., 1988.
23. Nitsch W., Maksimov R. // Colloid Polym. Sci. 1990. **268**. P. 452.
24. Zhou N.F., Pethica B.A. // Langmuir. 1986. **2**. P. 4750.
25. McRitchie F. // Adv. Colloid Interface Sci. 1986. **25**. P. 341.
26. TerMinnassian Saraga L. // Pure Appl.Chem. 1985. **57**. P. 621.
27. Ямпольская Г.П., Нусс П.В., Разникова Г.Ц., Измайлова В.Н. // Усп. коллоид. хим. Л., 1992. P. 292.
28. Львов М.Ю., Широков Г.Б. Биологические мембраны. 1997. **14**. P. 229.
29. Yampolskaya G.P., Izmailova V.N. International Workshop on Surface Science in Medicine and Biology, May 24-26, 2000, Donetsk, Ukraine. Programme and Abstracts P. 23.
30. Denkov N.D., Kralchevsky P.A., Ivanov I.B. //J. Dispersion Sci. and Technology. 1987. **18**. P. 577.
31. Hermel H., Schladitz C., Vieira E.P. // Annual Report 1999. P. 46.
32. Picard G., Takoda S., Yamaki M., Yoshimura H. Sixth International Conference on Organized Molecular Films, Trois Riviers, Canada, 1993.
33. Picard G., Nevernov I., Alliata D., Pazdernik L. // Langmuir. 1997. **13**. P. 264.
34. Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм Б.Д. Поверхностные явления в белковых системах. М., 1988. P. 239.
35. Chen Xiaoxi, Moser Ch. C., Pilloud D.L., Gibney B.R. // J. Phys. Chem. 1999. **B 103**. P. 9029.
36. Shnek D.R., Pack D.W., Sasaki D.Y., Arnold F.H. // Langmuir. 1994. **10**. P. 2382.
37. Fainerman V.B., Zhao J., Vollhardt D., Makievski A.V. Li J.B. // J. Phys. Chem. 1999. **B 103**. P. 8998.
38. Norde W., Giesbers M., Pingsheng H. // Coll. Surf. B: Biointerfaces. **5**. 1995. P. 255.
39. Riccio A., Lanzi M., Antolini F., Nitti C.De, Tavani C. Nicolini C. // Langmuir. 1996. **12**. P. 1545.
40. Gidalevitz D., Huang Zh., Rice S.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. **96**. P. 2608.
41. Kornberg R.D., Darst S.A. Curr. Opin. Struct. Biol. 1991. P. 642.
42. Su-Wen Wang, Robertson Ch.R., Gast A.P. // J. Phys. Chem. 1999. **B 103**. P. 7751.
43. Nimni M.E. Collagen: Biochemistry, Biomechanics, Biotechnology. N.Y., 1999.
44. Kadler K. Protein Profile. 1994. **1**. P. 519.
45. Kadler K. Protein Profile. 1995. **2**. P. 491.
46. Kadler K., Hojima Y., Procop D.J. // J. Biol. Chem. 1987. **262**. P. 15698.
47. Murthy N.S. // Biopolymers 23. 1984. **6**. P. 1261.
48. Hukins D.W.L., Woodhead-Galloway J. // Mol. Cryst. Liquid Cryst. 1977. **41**. P. 33.
49. Hukins D.W.L., Woodhead-Galloway J. // Biochem. Soc.Trans. 1978. **6**. P. 238.
50. Knight D.P., Feng D., Stewart M., King E. // Philos. Trans. Roy. Soc. B. 1993. **341**. P. 419.
51. Knight D.P., Feng D. // Tissue and Cell. 1994. **26**. P. 155.
52. Guraud-Guille M.-M. // Mol. Cryst. Liquid Cryst. 1987. **153**. P. 15.
53. Guraud-Guille M.-M. // J. Mol. Biol. 1989. **224**. P. 861.
54. Guraud-Guille M.-M. // Microscop. Res. Tech. 1994. **27**. P. 420.
55. Guraud-Guille M.-M. // Int. Rev. Cytol. 1996. **166**. P. 59.
56. Guraud-Guille M.-M. // J. Struct. Biol. 1994. **113**. P. 99.
57. Beseau L., Guraud-Guille M.-M. // J. Mol. Biol. 1995. **251**. P. 197.
58. Feng D., Knight D.P. // Tissue and Cell. 1994. **26**. P. 649.
59. Knight D. P., Nash L., Hu X. W., Haffeege J., Ho M.-W. // J. Biomed. Mater. Res. 1998. **41**. P. 186.
60. Yoshioka K., O'Konski Ch. T. // Biopolymers. 1966. **4**. P. 499.
61. Kahn L. D., Wilnauer L. P. // J. Amer. Leather Chem. Assoc. 1969. **64**. P. 12.
62. Hutschenreiter J., Scheuner G. // Acta Histochemica. 1970. **35**. P. 337.
63. Kahn L. D., Witnauer L. P. // Biochim. Biophys. Acta. 1971. **243**. P. 388.
64. Bernengo J. C., Roux B., Herbage D. // Biopolymers. 1974. **13**. P. 641.
65. Murthy N. S. // Biopolymers. 1988. **23**. P. 1261.
66. Caillü A., Agren G. // Can. J. Phys. 1975. **53**. P. 2369.
67. Matsubara F., Kurokawa Y. // Coll. Surf. 1987. **29**. P. 209.
68. Frenkel D., Eppenga K. // Phys. Rev. 1985. **31**. P. 1776.
69. Cotte J., Duman H. // J. Pharm. Belgique. 1991. **46**. P. 201.
70. Dunn M. W., Nishihara T., Stenzel K. H. // Science. 1967. **157**. P. 1329.
71. Пугач Б.М., Сорокин Е.Я., Котылевская В.Г. // Хим. волокна. 1973. **2**. P. 77.
72. Kato Y., Silver F. // Biomaterials. 1990. **11**. P. 169.
73. Kuwano M., Horibe Y., Kawashima Y. // J. Ocul. Pharmacol. Ther. 1997. **13**. P. 31.
74. Фадеев А. С., Левачев С. М., Ямпольская Г. П., Рудой В. М., Измайлова В. Н. // Коллоид. журн. 1999. **61**. P. 558.
75. Leikin S., Rau D.C., Parsedgian V.A. // Struct. Biol. 1995. **2**. P. 205.
76. Aveyard R., Clint J.H., Ness D., Paunov V.N. // Langmuir. 2000. **16**. P. 1969.