

УДК 544.023.22+576.524

И. В. ПАРИБОК¹, Г. К. ЖАВНЕРКО¹, В. Е. АГАБЕКОВ¹, И. А. ГАВРИЛОВА²**МИКРОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ
ПЛЕНОК ЛЕНГМЮРА–БЛОДЖЕТТ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ФИКСАЦИИ
БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI***¹Институт химии новых материалов НАН Беларуси,
²Белорусский государственный медицинский университет

Направленная фиксация клеток на твердой поверхности играет важную роль при разработке биосенсоров [1–3], в тканевой инженерии [4] и клеточной биологии [5, 6], а также при проведении биохимического и фармацевтического скрининга [7, 8]. Значительная часть исследований ведется на клетках млекопитающих – эндотелиальных, эпителиальных, астроглиальных, нейрональных, HeLa и др. [9, 10]. Литературные данные о локальной иммобилизации бактериальных клеток на микроструктурированных поверхностях немногочисленны [11]. Ключевым моментом здесь является проблема создания вспомогательного структурированного подслоя, промотирующего направленную адгезию микроорганизмов. Если подобрать также инертный подслоя, не влияющий на поведение бактериальных клеток, то он может служить своеобразной матрицей для введения активного компонента, оказывающего бактерицидное или бактериостатическое действие.

Цель данной работы – разработать методики формирования микроструктурированных покрытий, пригодных для направленной фиксации бактериальных клеток, а также изучить влияние введенного в пленки антибиотика (азитромицин) на жизнеспособность и активность зафиксированных на поверхности микроорганизмов.

Экспериментальная часть. Материалы. Блок-сополимер стирола и акриловой кислоты (ПСПАК, $M_w = 8200$, Aldrich), полиэтиленимин (ПЭИ, $M_w = 60000$, Aldrich) и азитромицин (Az, $M = 749$) были использованы без дополнительной очистки. Кремниевые подложки очищали и гидрофилизировали в смеси концентрированной серной кислоты и 30%-ной перекиси водорода в соотношении 7:3 (v/v) при температуре ~ 70 °C в течение 10–15 мин с последующей тщательной промывкой дистиллированной водой.

Методы модификации поверхности. Нанесение тонких полиэлектролитных пленок осуществляли, помещая подложки в 1 мг/мл раствор ПЭИ на 15–20 мин. Затем образцы промывали дистиллированной водой и сушили в токе азота.

Моно-, би- и трехкомпонентные монослои Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ) выделяли на поверхность кремния методом «горизонтального осаждения» (ГО) [12]. Микроструктурированные ЛБ-пленки формировали на кремнии методом микроконтактной печати (МКП), используя штампы из полидиметилсилоксана (ПДМС) [13, 14].

Работа с тест-культурой бактерий *Escherichia coli*. Для приготовления бактериальной суспензии 18–20-часовые агаровые культуры микроорганизмов смывали стерильным 0,85 %-ным водным раствором NaCl. Полученную бактериальную суспензию тщательно пипетировали, перемешивали с помощью шейкера и стандартизировали тем же раствором до $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл (по стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича).

В пробирки с приготовленной взвесью бактериальных клеток помещали модифицированные кремниевые подложки и инкубировали в термостате при 37,0 °C в течение 6 ч, периодически перемешивая. По истечении времени инкубации образцы извлекали из бактериальной суспензии, промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Методы исследования. Для записи изотерм сжатия «поверхностное давление–площадь на молекулу» (π -A) и выделения ЛБ-пленок использовали специализированную автоматизированную установку LT-103 производства ОДО «Микротестмашины» (г. Гомель, Беларусь). Ленгмюровские монослои формировали, нанося рабочие растворы на поверхность дистиллированной воды и выдерживая ~5 мин для испарения растворителя. Скорость уменьшения площади, занимаемой монослоем, составляла 15–20 см²/мин.

Морфологию поверхности образцов получали на воздухе с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) Nanoscope III D (Veeco, США), оборудованного «J-сканером» в контактном режиме. Были использованы 100- и 200-мкм кантилеверы «Nanoprobe» из Si₃N₄ с константой упругости 0,12 и 0,36 Н/м соответственно. Сила воздействия иглы на образец в контактном режиме составляла 5–10 нН. Частоту строчной развертки при получении изображения варьировали от 1 до 5 Гц. Обработку АСМ-изображений проводили с использованием таких операций, как вычитание поверхности среднего наклона (первого и второго порядка), медианная фильтрация, усреднение по строкам. Подсчет количества бактерий *Escherichia coli* выполняли с использованием функции Particle analysis специализированной программы обработки АСМ-изображений Nanoscope 5.31r1. Для этого осуществляли сканирование поверхности на участке 40×40 мкм в трех случайно выбранных точках с последующим подсчетом числа обнаруженных микроорганизмов.

Результаты и их обсуждение. Согласно данным Европейской фармакопеи [15], Az представляет собой антибиотик-макролид широкого спектра действия. Установлено, что хотя сам Az не обладает поверхностной активностью, можно подобрать условия его включения в ЛБ-пленки других поверхностно-активных веществ. В качестве матрицы для формирования Az-содержащих ЛБ-пленок использованы блок-сополимер ПСПАК или смесь ПСПАК+ПЭИ.

При записи π -A-изотерм сжатия монослоев ПСПАК (1) и ПСПАК+Az (2), а также ПСПАК+ПЭИ (3) и ПСПАК+ПЭИ+Az (4) (рис. 1) входные данные были одинаковыми. Это означает, что при отсутствии Az в монослоях (2) и (4), их изотермы сжатия должны полностью совпадать с кривыми (1) и (3) соответственно. Смещение изотерм (2) и (4) вправо (в область больших значений A) относительно (1) и (3), а также появление на изотерме (4) протяженного участка в области значений π от 2 до 10 мН/м, соответствующего жидко-растянутому состоянию монослоя, свидетельствует о включении низкомолекулярной добавки (Az) в пленки (2) и (4).

Морфологию ЛБ-монослоев ПСПАК (1), ПСПАК+Az (2), ПСПАК+ПЭИ (3) и ПСПАК+ПЭИ+Az (4) на кремнии исследовали методом АСМ. Толщину пленок оценивали по глубине искусственно сформированного дефекта.

При введении Az в пленки их морфология и толщина практически не изменяются, а добавка ПЭИ способствует увеличению толщины покрытий в ~ 2 раза (таблица).

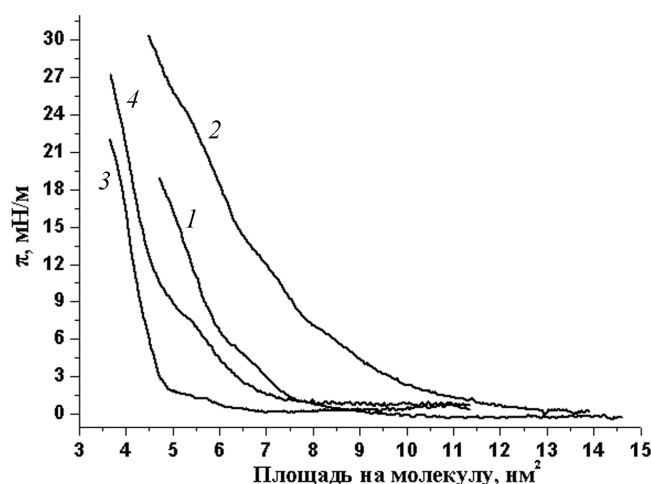


Рис. 1. π -A-изотермы для монослоев ПСПАК (1), ПСПАК+Az (2), ПСПАК+ПЭИ (3) и ПСПАК+ПЭИ+Az (4)

С помощью АСМ были также исследованы особенности адгезии клеток *Escherichia coli* на пленки ПСПАК (1), ПСПАК+Az (2), ПСПАК+ПЭИ (3) и ПСПАК+ПЭИ+Az (4). Установлено, что бактерии присутствуют только на ПЭИ-содержащих пленках (таблица), в то время как наличие либо отсутствие антибиотика практически не влияет на их склонность к адгезии. В то же время, когда из состава покрытий исключили добавку полиэлектролита, зафиксировать клетки *Escherichia coli* на поверхности не удавалось.

Таким образом, ПЭИ промотирует адгезию *Escherichia coli*, а ПСПАК является инертным полимером по отношению к этому виду клеток. Поэтому для локальной иммобилизации *Escherichia coli* достаточно было

создать микроструктурированное покрытие с чередующимися полосами ПЭИ и ПСПАК. А для исследования влияния антибиотика на активность зафиксированных на поверхности клеток в полосы ПСПАК был дополнительно введен Az. Схема получения и АСМ-изображение такого покрытия представлены на рис. 2. Сначала на поверхности гидрофильного кремния методом послойного осаждения был сформирован сплошной полиэлектролитный подслоя, а затем дополнительно «напечатана» ЛБ-пленка ПСПАК+Az. Для изготовления контрольного образца в качестве «чернил» при МКП был использован ЛБ-монослой ПСПАК без добавки Az.

Характеристики ЛБ-монослоев

Номер ЛБ-монослоя	Состав	Толщина, нм	Результат посева <i>Escherichia coli</i> на поверхность
1	ПСПАК	2,7±0,2	–
2	ПСПАК+Az	3,0±0,2	–
3	ПСПАК+ПЭИ	6,4±0,2	+
4	ПСПАК+ПЭИ+Az	7,0±0,2	+

Качество формируемых Az-содержащих микроструктур зависит от способа переноса ЛБ-монослоя на штамп, его компонентного состава, а также поверхностного давления выделения (π). Показано, что применение «вертикального» и ГО методов для модификации гидрофобных ПДМС-штампов неприемлемо. Для этой цели оптимальным оказался метод Ленгмюра–Шеффера.

После инкубации в бактериальной суспензии образцы повторно исследовали методом АСМ. Было обнаружено, что на экспериментальных образцах (с добавкой Az) одиночные бактерии локализируются на полосах полиэлектролита (рис. 3, а), а на контрольных – присутствуют скопления бактерий, расположенные хаотично относительно полос ПСПАК и ПЭИ (рис. 3, б). Таким образом, азитромицин, включенный в инертную матрицу ПСПАК, подавляет способность *Escherichia coli* к размножению.

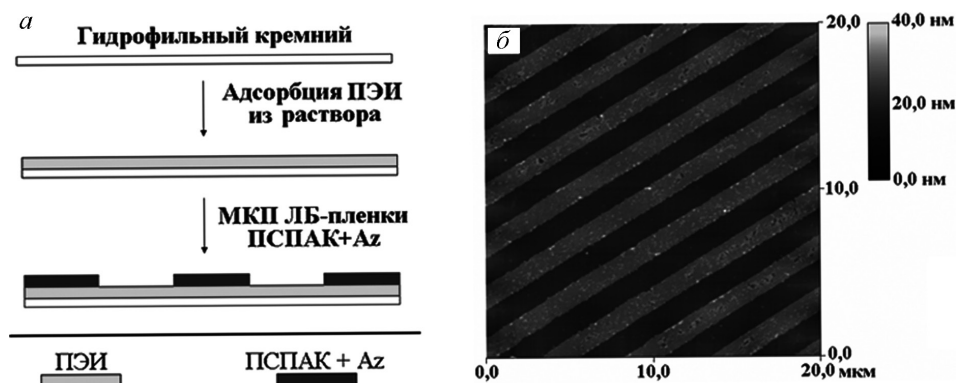


Рис. 2. Схема формирования (а) и АСМ-изображение (б) микроструктурированной ЛБ-пленки ПСПАК+Az

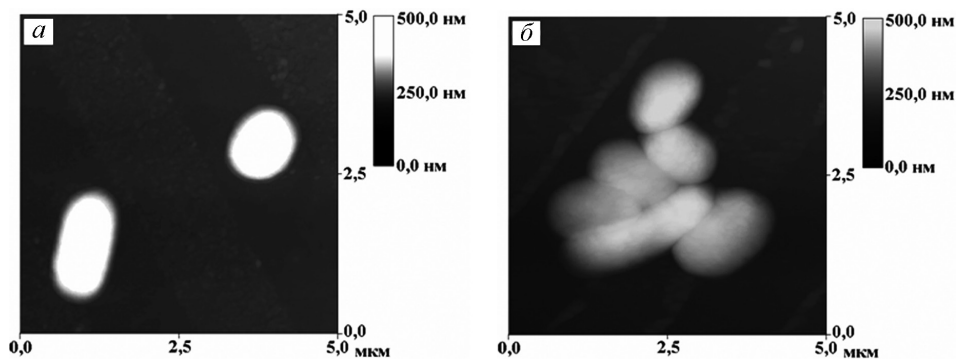


Рис. 3. АСМ-изображения микроструктурированных ЛБ-монослоев ПСПАК+Az (а) и ПСПАК (б) после инкубации в бактериальной суспензии *Escherichia coli*

Заклучение. Доказана возможность включения низкомолекулярного компонента (Az) в ленгмюровские пленки ПСПАК и ПСПАК+ПЭИ. Особенности адгезии клеток *Escherichia coli* на различные типы модифицирующих покрытий исследованы с помощью АСМ. Установлено, что бактерии присутствуют только на ПЭИ-содержащих пленках, в то время как наличие либо отсутствие антибиотика практически не влияет на их склонность к адгезии. Сформированы микроструктурированные ЛБ-пленки, пригодные для направленной фиксации бактерий *Escherichia coli*. Установлено, что антибиотик, включенный в полимерную пленку, оказывает антимикробное действие на зафиксированные на поверхности бактериальные клетки. Разработанная методика локального введения лекарственного вещества на поверхность может быть использована для исследования влияния самых различных соединений на процессы клеточного роста и деления.

Литература

1. Gross G. W., Rhoades B. K., Azzazy H. M. E., Wu M. C. // Biosens. Bioelectron. 1995. Vol. 10. Iss. 6–7. P. 553–567.
2. Mrksich M., Whitesides G. M. // Trends Biotechnol. 1995. Vol. 13. Iss. 6. P. 228–235.
3. Urban G. // Sensor. Actuator. 1999. Vol. 74. P. 219–224.
4. Principles of tissue engineering / Edited by R. P. Lanza, W. L. Chick, R. Langer. Austin. 1997. P. 211–223.
5. Vogt A. K., Stefani F. D., Best A., Nelles G., Yasuda A., Knoll W., Offenhäusser A. // J. Neurosci. Meth. 2004. Vol. 134. P. 191–198.
6. Zhang Z., Yoo R., Wells M., Beebe T. P., Biran R., Tresco P. // Biomaterials. 2005. Vol. 26. Iss. 1. P. 47–61.
7. Kaji H., Takii Y., Nishizawa M., Matsue T. P // Biomaterials. 2003. Vol. 24. Iss. 23. P. 4239–4244.
8. Thiebaud P., Lauer L., Knoll W., Offenhäusser A. // Biosens. Bioelectron. 2002. Vol. 17. P. 87–93.
9. Наноструктуры в биомедицине / Под ред. К. Е. Гонсалвес, К. Р. Хальберштадт, К. Т. Лоренсин, Л. С. Наир; пер. с англ. М.: Бином, 2012. С. 392.
10. Falconnet D., Csucs G., Grandin H. M., Textor M. // Biomaterials. 2006. Vol. 27. Iss. 16. P. 3044–3063.
11. Weibel D. B., DiLuzio W. R., Whitesides G. M. // Nature Reviews. Microbiology. 2007. Vol. 5. P. 209–218.
12. Zhavnerko G. K., Zhavnerko K. A., Agabekov V. E., Gallyamov M. O., Yaminsky I. V., Rogach A. L. // Colloid. Surface. A. 2002. Vol. 198–200. P. 231–238.
13. Парібок І. В., Жавнерко Г. К., Агабеков В. Е., Каратай Н. В., Кантулець С. П., Полецук Н. Н., Кантулець Н. Н. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2010. № 2. С. 53–57.
14. Paribok I. V., Zhavnerko G. K., Agabekov V. E. // Physics, chemistry and applications of nanostructures: Reviews and short notes to Nanomeeting-2005. World Scientific, 2005. P. 527–530.
15. Azithromycin // European Pharmacopoeia. 5th Edition. Main Vol. 5.0. EDQM, 2005. P. 1039.

I. V. PARIBOK, G. K. ZHAVNERKO, V. E. AGABEKOV, I. A. GAVRILOVA

PATTERNED COATINGS BASED ON LANGMUIR–BLODGETT FILMS FOR REGULATED FIXATION OF *ESCHERICHIA COLI*

Summary

Formation of patterned coatings suitable for *Escherichia coli* directed fixation on a solid surface, has been performed by the microcontact printing method in combination with Langmuir–Blodgett technology. The possibility has been shown for azithromycin introduction into Langmuir films based on a styrene-acrylic acid block copolymer. Adhesion of *Escherichia coli* cells to various types of surfaces has been investigated by atomic force microscopy. It has been shown that the antibiotic introduced into a polymer film, affects bacterial cells.