

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника
Факультет природничих наук
Кафедра хімії

ДИПЛОМНА РОБОТА

на здобуття другого (магістерського) рівня вищої освіти

на тему: **Адсорбція пептидів і білків на TiO_2**

Виконала: студентка II курсу, групи Х-2м
спеціальності 102 Хімія
Підгірна М.Я.

Керівник: к.т.н., доцент кафедри хімії
Микитин І.М.
Рецензент: д.х.н., професор кафедри хімії
Миронюк І.Ф.

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника
Факультет природничих наук
Кафедра хімії
Освітній рівень другий (магістерський)

Затверджено на засіданні
кафедри хімії
Протокол № 9 від 18.10.2022 р.
Завідувач кафедри
_____ МIRONYUK I. F.
(підпис)

ЗАВДАННЯ НА ДИПЛОМНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ

Підгінній Марії Ярославівні

1. Тема роботи: «Адсорбція пептидів і білків на TiO_2 »

Керівник роботи: Микитин Ігор Михайлович, к.т.н., доцент кафедри хімії

2. Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Розглянути властивості пептидів та протеїнів.

2. Розглянути сорбцію протеїнів та білків на TiO_2 .

3. Синтезувати TiO_2 , провести мічення пептиду, дослідити адсорбцію міченого пептиду на синтезованому TiO_2 .

3. Дата видачі завдання 18 жовтня 2022 р

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Огляд літературних джерел, узагальнення та систематизація теоретичних матеріалів	Жовтень – грудень	Рукопис
2.	Синтез діоксиду титану, мічення пептиду, дослідження адсорбції пептиду на синтезованому TiO_2	Січень – травень	Рукопис
3.	Оформлення роботи та демонстраційного матеріалу	Вересень – листопад	Рукопис Презентація

Студентка

Керівник роботи

Підгінна М.Я.
(прізвище та ініціали)

Микитин І.М.
(прізвище та ініціали)

Підгірна М.Я. Адсорбція пептидів і білків на TiO_2 . Дипломна робота за напрямом підготовки 102 Хімія. Прикарп. нац. ун-т. ім. В. Стефаника. м. Івано-Франківськ, 2023. 35 с.

Дипломна робота є рукописом, який містить опис експериментів по сорбції протеїнів і пептидів на TiO_2 використовуючи флуоресцентний метод аналізу. Зроблено огляд матеріалу по властивостям протенів і білків, методів синтезу пептидів та білків. В роботі проведено приготування міченого флуоресцеїном BSA, виміряно адсорбцію протеїну та модельного пептиду міченого флуоресцеїном на діоксиді титану використовуючи флуоресценцію як засіб зчитування. Розраховано кількісні параметри адсорбції на основі ізотерм Ленгмюра та Френдліха, а також встановлено вплив іонної сили розчину схильність білків та протеїнів до сорбції на діоксиді титану.

Ключові слова: діоксид титану, пептид, протеїн, флуоресцеїн, адсорбція.

Pidhirna M.Ya. Adsorption of peptides and proteins on TiO_2 .

The diploma work is a manuscript which contains description of experiments on the sorption of proteins and peptides on TiO_2 using the fluorescence readout. It starts from the review of works on the properties of peptides and proteins, methods of peptide and protein synthesis. In this work, fluorescein-labelled bovine serum albumin (BSA) was prepared, and the adsorption of protein and a model peptide labelled with fluorescein on titanium dioxide was measured using fluorescence readout. Quantitative adsorption parameters were calculated based on Langmuir and Freundlich isotherms, and the effect of the ionic strength of the solution on the propensity of proteins and proteins to adsorb on titanium dioxide was determined.

Key words: titanium dioxide, peptide, protein, fluorescein, adsorption.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень.....	5
Вступ.....	6
Розділ 1. Літературний огляд.....	6
1.1. Протеїни та пептиди.....	8
1.1.1. Властивості протеїнів.....	8
1.1.2. Властивості пептидів.....	10
1.1.3. Групи протеїнів і пептидів що впливають на сорбцію на адсорбентах.....	11
1.2. Флуоресценція для вимірювання концентрації.....	13
1.2.1. Порівняння флуоресценції та адсорбції.....	13
1.2.2. Флуоресцентні барвники.....	15
Розділ 2. Експериментальна частина.....	19
2.1. Приготування сорбенту діоксиду титану.....	19
2.2. Приготування міченого пептиду.....	19
2.1.1. Вимірювання концентрації пептиду за допомогою світлопоглинання.....	21
2.1.2. Вимірювання флуоресценції міченого пептиду.....	21
2.3. Приготування міченого протеїну та вимірювання його концентрації за допомогою світлопоглинання.....	22
2.4. Кількісне визначення адсорбції пептиду та протеїну на діоксиді титану.....	22
2.5. Ізотерми адсорбції Ленгмюра та Френдліха.....	25
Висновки.....	30
Список використаних джерел.....	31

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- BSA (англ. *bovine serum albumin*) – бичачий сироватковий альбумін
- EFSA (англ. *European Food Safety Authority*) – Європейське агентство з безпеки харчових продуктів
- FESEM (англ. *Field emission scanning electron microscopy*) – польова емісійна скануюча електронна мікроскопія
- FITC (англ. *fluorescein isothiocyanate*) – флуоресцеїн-5-ізотіоціанат
- Fmoc (англ. *fluorenylmethyloxycarbonyl*) – 9-фторенілметилоксикарбоніл
- FRET (англ. *Fluorescence resonance energy transfer*) – флюоресцентний резонансний перенос енергії
- LPPS (англ. *Liquid-phase peptide synthesis*) – рідиннофазний пептидний синтез
- NMP (англ. *N-methyl-2-pyrrolidone*) – N-метил-2-піролідон
- РНК (англ. *ribonucleic acid*) – рибонуклеїнова кислота
- SPPS (англ. *Solid-phase peptide synthesis*) – твердофазний пептидний синтез
- ВЕРХ (англ. *High-performance liquid chromatography*) – високоефективна рідинна хроматографія
- ДІЕА (англ. *diisopropylethylamine*) – N,N-діізопропілетиламін
- ДМСО (англ. *dimethyl sulfoxide*) – диметилсульфоксид
- ДМФ (англ. *dimethylformamide*) – N,N-диметилформамід
- ДХМ (англ. *dichloromethane*) – дихлорметан
- ТФК (англ. *trifluoroacetic acid*) – трифлуороцтова кислота
- ТШХ (англ. *thin layer chromatography*) – тонкошарова хроматографія

ВСТУП

Актуальність теми. Діоксид титану (TiO_2) широко використовується як білий барвник у медицині, харчовій промисловості, сонцезахисних кремах і косметиці. Він діє як поглинач ультрафіолету і має чудові властивості стійкості до ультрафіолету та хімічну стабільність. Однак його безпечність нещодавно була поставлена під сумнів Європейським агентством з безпеки харчових продуктів (EFSA) [1], яке рекомендувало не використовувати його як пігментну харчову добавку через можливий канцерогенний вплив. Тим часом, TiO_2 входить до складу тисяч лікарських препаратів, де він використовується для захисту діючих речовин від руйнування під впливом сонячного світла та для покращення візуального сприйняття пацієнтами завдяки своєму білому кольору. Враховуючи, що його заміна є дороговартісною і не може бути зроблена швидко, органи влади не рекомендували вилучати його з обігу [2]. У цій суперечливій ситуації виникає необхідність глибокого вивчення взаємодії TiO_2 з організмом людини та біологічними тканинами. Білки є основним типом біологічних молекул, які можуть взаємодіяти з TiO_2 в організмі людини після перорального прийому TiO_2 -вмісних препаратів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, наказами, рішеннями. Тема дипломної роботи затверджена на засіданні кафедри хімії (протокол № 9 від 18.10.2022 р.) та на засіданні Вченої ради факультету природничих наук (протокол № 2 від 24.11.2022 р.).

Об'єктом дослідження є діоксид титану.

Предметом дослідження є взаємозв'язок між структурою і амінокислотним складом пептидів та білків та їх схильністю до адсорбції на діоксиді титану.

Мета та завдання дослідження.

Мета роботи полягає у вивченні адсорбції пептидів і білків на TiO_2 .

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні

завдання:

- зробити огляд матеріалу про властивості пептидів і білків, методи отримання мічених пептидів і білків та особливості їх адсорбції з використанням адсорбенту TiO_2 ;
- синтезувати діоксид титану;
- синтезувати білки і пептиди, кон'юговані з органічним барвником;
- проаналізувати сорбцію синтезованих білків і пептидів на TiO_2 методами флуориметрії та спектрофотометрії.

Методи дослідження. Для виконання поставлених у роботі завдань використовувалися наступні методи дослідження: аналіз, порівняння та узагальнення теоретичних даних, представлених у науковій літературі.

Особистий внесок здобувача полягає в проведенні досліджень, обробці отриманих результатів та їх аналізі.

Структура та обсяг дипломної роботи. Магістерська робота складається зі вступу, двох розділів, висновків, списку використаних джерел (39 найменувань), містить 2 таблиці та 15 рисунків. Загальний обсяг роботи складає 35 сторінок.

Апробація результатів роботи. Результати даної роботи доповідалися на VI Міжнародній науково-практичній конференції «An integrated approach to science modernization: methods, models and multidisciplinary».

Публікації:

1. Prokipchuk, I. V., Mykytyn, I. M., Bedrii, M. V., & Pidhirna, M. Ya. (2023). Fluorescence-based quantification of peptide adsorption on titanium dioxide. *Journal of Chemistry and Technologies*, 31(3). 486–492.
2. Прокіпчук, І., Микитин, І., Бедрій, М., & Підгірна, М. (2023). Оцінка адсорбції пептидів на діоксиді титану за допомогою флуоресцентного аналізу. *Grail of Science*, 29, 163–165.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Протеїни та пептиди

1.1.1. Властивості протеїнів

Білки – це макромолекулярні сполуки, що складаються з одного або декількох поліпептидних ланцюгів [1]. Вони різноманітні за структурою і функціями, і становлять найбільшу частку органічних сполук, знайдених в клітині. Їхня молекулярна маса знаходиться в діапазоні від 10 000 до мільйонів Da (Da - дальтон - 1/12 частина маси ізотопу вуглецю ^{12}C) [2]. До складу протеїнів входить 20 амінокислот які позначають або трибуквеним (Ала, Арг, ...) або однобуквеним кодом (A, R, ...) як показано на рис 1.

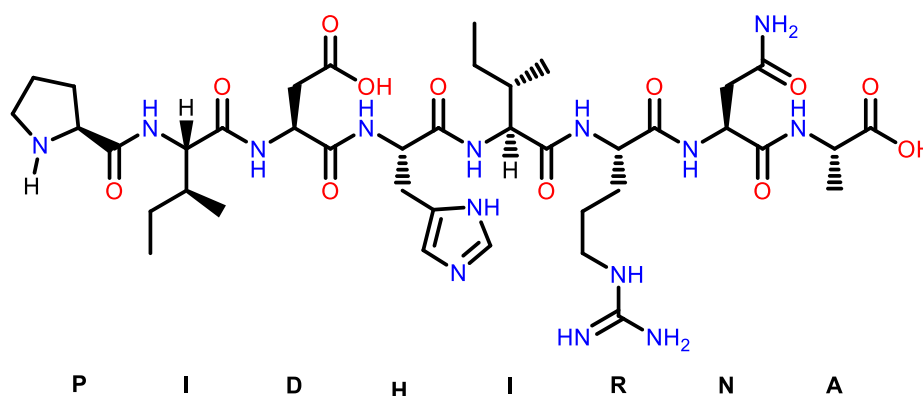


Рис. 1. Приклад пептиду з однобуквеними кодами амінокислот

Розмір типових молекул білків становить 2–10 нм що набагато більше за розмір типових малих органічних молекул (близько 0,5 нм) [3].

Первинна, вторинна, третинна структура дозволяє тримати білкам глобулярну ("клубкоподібну") форму. Гідрофобні залишки переважно знаходяться в середині протеїнів тоді як полярні – переважно на поверхні [4]. На рисунку 2 показано схильність залишків до розміщення на поверхні пептиду й кореляцію з їх гідрофобністю. (фіолетове – вода).

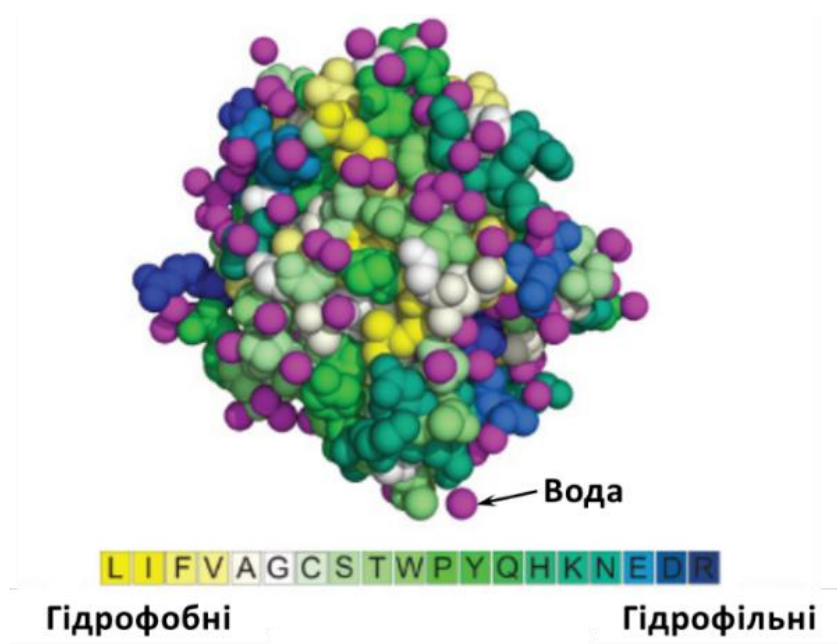


Рис. 2. Схема схильності залишків до розташування на поверхні пептиду

Спільною властивістю всіх білків є те, що вони складаються з довгих ланцюжків α -амінокислот (альфа-амінокислот) [5]. Загальну будову α -амінокислот показано на рис. 3. α -амінокислоти називаються так тому, що α -атом вуглецю в молекулі несе аміногрупу ($-\text{NH}_2$); α -атом вуглецю також несе карбоксильну групу ($-\text{COOH}$).

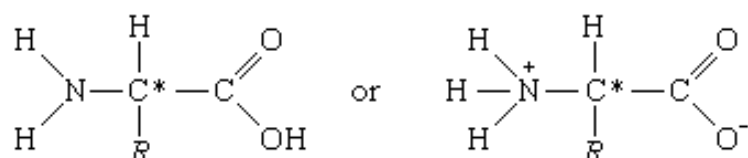


Рис. 3. Загальна будову α -амінокислот

Хоча в природі, зокрема в рослинах, зустрічається понад 100 амінокислот, лише 20 типів зазвичай зустрічаються в більшості білків. У білкових молекулах α -амінокислоти з'єднані одна з одною пептидними зв'язками (рис. 4) між аміногрупою однієї амінокислоти та карбоксильною групою її сусіда [6].

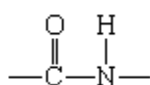


Рис. 4. Пептидний зв'язок

1.1.2. Властивості пептидів

Пептиди – це олігомери, що складаються з 2–40 амінокислот. Розмір пептидів відіграє вирішальну роль у визначенні їх біологічної активності та застосувань [7].

Розчинність пептидів у воді є критично важливою властивістю, яка впливає на їхню біодоступність та взаємодію в біологічних системах. Амінокислотний склад, послідовність і наявність заряджених або гідрофобних залишків впливають на неї. Розчинність у воді особливо важлива для розробки лікарських засобів на основі пептидів та їх ефективної доставки у фізіологічні середовища. Гідрофобні залишки (амінокислоти F, L, P, I, M, V, A) [8].

Отримання пептидів передбачає використання стратегічних методів для точного синтезу цих біомолекул. Для синтезу пептидів використовують кілька підходів, найпоширенішими з яких є твердофазний пептидний синтез (SPPS) та рідинно-фазний пептидний синтез (LPPS). SPPS, широко використовуваний метод, передбачає побудову пептидного ланцюга на твердій основі, що дозволяє поетапно додавати амінокислоти. LPPS, з іншого боку, включає хімію розчинної фази, що робить його придатним для великомасштабного виробництва.[9].

Твердофазний пептидний синтез (SPPS). У SPPS захищена амінокислота прикріплюється до твердої смоляної основи. Наступні амінокислоти додаються крок за кроком, причому кожна реакція приєднання відбувається під контролем. Зростаючий пептидний ланцюг залишається ковалентно зв'язаним з твердим носієм протягом усього синтезу [10].

Рідиннофазний пептидний синтез (LPPS). LPPS передбачає поетапний синтез пептидів у розчині. Амінокислоти послідовно додаються до реакційної суміші, а пептид, що росте, очищується після кожного етапу приєднання. LPPS підходить для синтезу довгих пептидів і піддається автоматизації для високопродуктивного виробництва [11].

Вибір методу синтезу залежить від конкретних вимог до пептиду і бажаного масштабу виробництва. Ці методи зробили значний внесок у

доступність пептидів для дослідницьких цілей, фармацевтичних розробок і промислового застосування [12].

Отже, розуміння властивостей пептидів, включаючи їх розмір, розчинність у воді та методи, що використовуються для їх отримання, є фундаментальним для розкриття їх потенціалу в різних галузях. З розвитком методів синтезу пептиди відіграватимуть ключову роль у створенні ліків, біоматеріалів та терапії, що ще більше підкреслює важливість розуміння їхніх фундаментальних властивостей та маніпуляцій з ними [13].

1.1.3. Групи що впливають на сорбцію

В пептидів і білків наявність і розташування функціональних груп в амінокислотах суттєво впливають на їхні сорбційні властивості. Унікальні характеристики бічних ланцюгів амінокислот, зокрема лізину, аргініну, аспарагінової кислоти, глутамінової кислоти, цистеїну, тирозину, серину, треоніну, триптофану і гістидину відіграють ключову роль у сорбційній поведінці цих біомолекул [14].

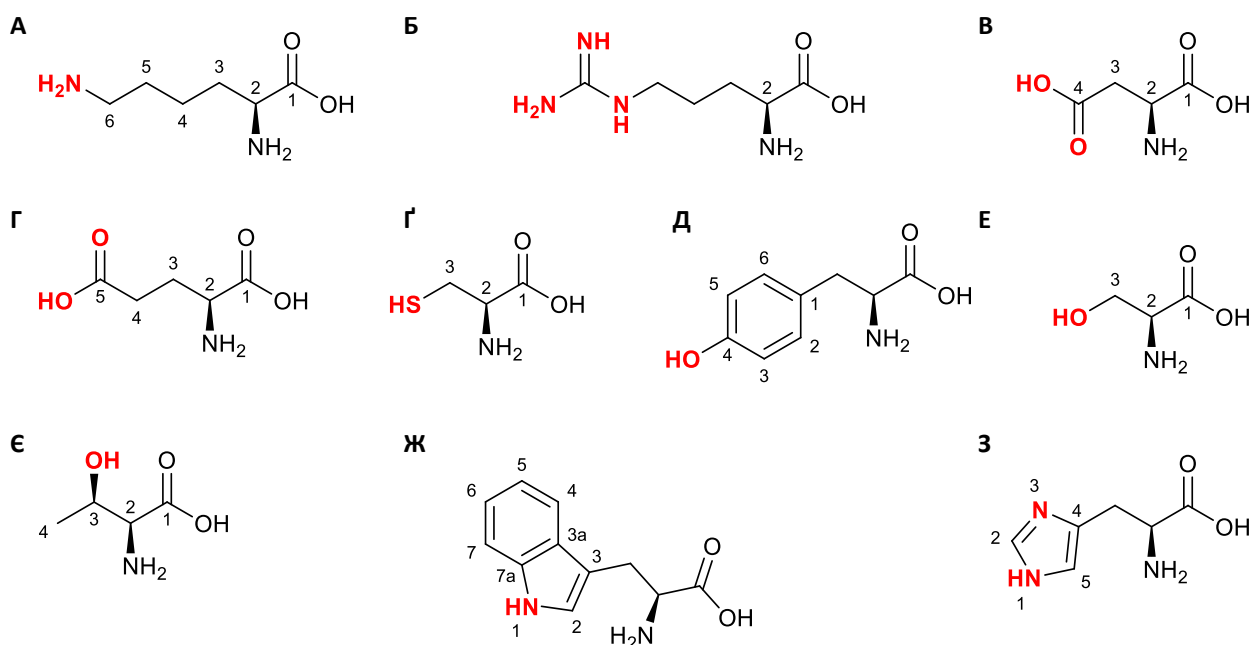


Рис. 5. Функціональні групи амінокислот: а) лізин; б) аргінін; в) аспаргінова кислота; г) глутамінова кислота; г) цистеїн; д) тирозин; е) серин; е) треонін; ж) триптофан; з) гістидин

Лізин та аргінін

Лізин і аргінін (рис. 5 а, б) – це амінокислоти з позитивно зарядженими бічними ланцюгами. Ці заряджені залишки часто взаємодіють з негативно зарядженими поверхнями за допомогою електростатичної взаємодії. Присутність цих основних амінокислот може посилювати сорбцію на поверхнях, що несуть негативний заряд, впливаючи на адсорбцію пептидів і білків у різних біологічних і промислових контекстах [15].

Аспарагінова та глутамінова кислоти

На відміну від лізину та аргініну, аспарагінова та глутамінова кислоти (рис. 5 в, г) мають негативно заряджені бічні ланцюги. Ці кислотні залишки можуть брати участь в електростатичній взаємодії з позитивно зарядженими поверхнями. Наявність цих кислотних функціональних груп може впливати на адсорбцію пептидів і білків на поверхнях, особливо з позитивним зарядом [16].

Цистеїн

Цистеїн (рис. 5 г) містить тіолову групу, що дозволяє утворювати дисульфідні зв'язки. Ці ковалентні взаємодії відіграють вирішальну роль у стабілізації структури білків. У сорбційних процесах реакційна здатність цистеїну може призводити до адсорбції через утворення дисульфідних зв'язків, сприяючи іммобілізації пептидів і білків на різних поверхнях [17].

Тирозин

Тирозин (рис. 5 д) має фенольну гідроксильну групу, що робить його здатним утворювати водневі зв'язки. Присутність тирозину в пептидній або білковій послідовності може впливати на сорбцію через водневі зв'язки з поверхнею. Ці взаємодії сприяють афінності біомолекул до певних субстратів.

Серин і треонін

Серин і треонін (рис. 5 е, є) містять гідроксильні групи. Гідроксильні групи в цих амінокислотах можуть брати участь у взаємодії водневих зв'язків, впливаючи на сорбційні властивості пептидів і білків. Наявність цих полярних функціональних груп сприяє загальній гідрофільності біомолекул [18].

Триптофан

Триптофан (рис. 5 ж) має велике ароматичне індольне кільце. Гідрофобна природа індольного кільця може сприяти взаємодії з гідрофобними поверхнями. Залишки триптофану часто відіграють роль у стабілізації гідрофобного ядра білків і можуть впливати на сорбцію пептидів і білків на гідрофобних поверхнях [19].

Гістидин

Гістидин (рис. 5 з) містить імідазольне кільце з азотом, який може бути позитивно зарядженим при певних рівнях рН. Імідазольна група може брати участь як у водневих зв'язках, так і в електростатичних взаємодіях, додаючи універсальності сорбційній поведінці пептидів і білків, що містять залишки гістидину [20].

Таким чином, різноманітні функціональні групи в складі амінокислот сприяють сорбційній поведінці пептидів і білків. Розуміння ролі цих функціональних груп має вирішальне значення при розробці біоматеріалів, оптимізації хроматографічного розділення та створенні поверхонь для конкретних біологічних застосувань. Взаємодія цих функціональних груп додає додатковий рівень складності до вивчення сорбції пептидів і білків, пропонуючи можливості для тонкого налаштування їхньої взаємодії в різних контекстах [21].

1.2. Флуоресценція для вимірювання концентрації

1.2.1. Порівняння флуоресценції та адсорбції

Розуміння взаємодії біомолекул має вирішальне значення в різних наукових галузях, від біохімії до матеріалознавства. Флуоресценція та адсорбція є двома широко використовуваними методами дослідження цих взаємодій. У той час як флуоресценція надає високочутливі дані в режимі реального часу, адсорбційні методи дають надійну інформацію про поверхневі взаємодії. Це дослідження має на меті порівняти ці методи, проливаючи світло на їхню взаємодоповнюючу роль у розшифровці складних молекулярних взаємозв'язків [21].

Метод флуоресценції

Флуоресценція є потужним інструментом для вивчення біомолекулярних взаємодій завдяки своїй високій чутливості та специфічності. У цьому дослідженні ми використали флуоресцентну спектроскопію для моніторингу динамічної поведінки біомолекул у розчині. Спектри збудження та випромінювання реєстрували, що дозволило кількісно оцінити константи зв'язування та визначити молекулярні конформації [22].

Метод адсорбції

Адсорбційні дослідження, з іншого боку, дають уявлення про зв'язування біомолекул з поверхнею. Наша експеримент включав кількісне визначення адсорбованої маси пептидів і білків на діоксиді титану. Такий підхід дозволив нам охарактеризувати силу та природу взаємодії між біомолекулами та поверхнею [23].

Методика дослідження

В якості модельних біомолекул було обрано мічений протеїн та пептид. Флуоресцентні експерименти включали мічення цих біомолекул флуоресцентними барвниками, тоді як адсорбційні дослідження використовували чітко визначені поверхні. Систематично досліджували різні концентрації та характеристики поверхні. Деталі експериментів, включаючи підготовку зразків та умови вимірювань, наведено в експериментальній частині [24].

Результати

Флуоресцентна спектроскопія надала кількісні дані про взаємодію між міченим протеїном та пептидом. І навпаки, адсорбційні дослідження продемонстрували вплив властивостей поверхні на зв'язування біомолекул. Результати підкреслюють переваги флуоресценції в динамічних дослідженнях і надійність адсорбції в розумінні поверхневих взаємодій [25].

Порівняння методів флуоресценції та адсорбції виявляє їхню взаємодоповнюваність. Флуоресценція дає змогу в реальному часі отримати інформацію про молекулярні взаємодії у фазі розчину, тоді як адсорбційні

методи дають детальну інформацію про поверхнєве зв'язування. Вибір між цими методами повинен визначатися конкретними дослідницькими питаннями і природою досліджуваних взаємодій [26].

1.2.2. Флуоресцентні барвники

Пептиди, мічені барвниками, є важливими інструментами в біохімічних і клітинних дослідженнях. Флуоресцентні пептиди широко використовуються у флуоресцентній флуориметрії, флуоресцентній мікроскопії, флуоресцентній поляризаційній спектроскопії, флуоресценції з часовою роздільною здатністю (TRF) та флуоресцентно-резонансній передачі енергії (FRET) [27]. Флуоресцентні пептиди, що беруть участь у пептид-рецепторних взаємодіях, можна контролювати для визначення місця розташування рецепторів у клітинах або тканинах, кількісного визначення рецепторів, визначення афінності рецепторів до різних невідомих лігандів (скринінг ліків), а також для ідентифікації різних популяцій клітин, наділених пептидними рецепторами. FRET–пептиди широко використовуються для виявлення активності протеаз і протеїнкіназ [28]. Інші застосування включають сортування рецепторів за допомогою флуоресцентно-асоційованого сортування клітин і вимірювання рівнів пептидів у сироватці крові за допомогою флуоресцентного імуноаналізу *in vivo* або *in vitro* для дослідницьких і діагностичних цілей. Найважливішими характеристиками флуоресцентних пептидів є висока чутливість і нерадіоактивне виявлення [29].

Флуоресцентний барвник може бути приєднаний до пептиду в певній точці за допомогою ковалентного зв'язку залежно від послідовності пептиду. Зв'язок між барвником і пептидом – це ковалентний зв'язок, який є стабільним і не руйнується в більшості біологічних умов. У деяких випадках між барвником і пептидом вводять функціональний лінкер, щоб мінімізувати зміну біологічної активності пептиду [29]. Для всіх пептидних міток барвник повинен бути приєднаний у певному місці: N–кінці, C–кінці або в середині послідовності.

Кумаринові барвники

Для отримання синіх флуоресцентних пептидів переважно використовують кумаринові барвники (рис. 6). Серед них найчастіше використовують 7-гідрокси-, 7-алкокси- та 7-амінокумаринові барвники. АМКА є найкращим синім флуоресцентним барвником для маркування пептидів завдяки своєму високому квантовому виходу флуоресценції та нечутливості до pH [30].

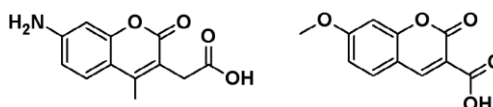


Рис. 6. Хімічна структура кислоти АМКА (ліворуч) та 7-метоксикумарин-3-карбонової кислоти (праворуч)

Флуоресцеїнові барвники

Похідні флуоресцеїну є найпоширенішими флуоресцентними дериватизаційними реагентами для ковалентного мічення пептидів [31]. На додаток до високої поглинальної здатності, відмінного квантового виходу флуоресценції і хорошої розчинності у воді, похідні флуоресцеїну мають максимум збудження (494 нм), який близько відповідає спектральній лінії 488 нм аргон-іонного лазера, що робить їх важливими флуорофорами для флуоресцентної мікроскопії та проточної цитофлуориметрії. Похідні 5-ФАМ переважно використовуються для мічення пептидів [32].

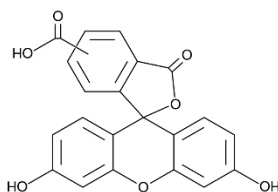


Рис. 7. Хімічна структура 5(6)-карбоксіфлуоресцеїну

Родамінові барвники

Родамінові барвники є доповненням до флуоресцеїнів, оскільки вони мають більшу довжину хвилі випромінювання і надають можливості для багатоколірного маркування та фарбування [33]. Родаміни мають набагато вищу фотостабільність, ніж флуоресцеїни та кумарини. Карбокситетраметилродамін (TAMRA) є поширеним флуорофором для

приготування пептидних кон'югатів. Сульфородамін 101 сульфонілхлорид – ще один популярний барвник для маркування пептидів. Однак, він нестабільний і дає набагато нижчий вихід зв'язування, ніж інші карбоксиргодамінові барвники (такі як 5–TAMRA) [34].

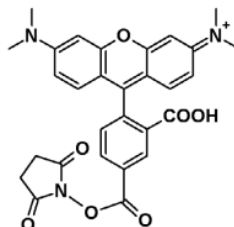


Рис. 8. Хімічна структура 5-TAMRA

Ціанінові барвники

Як флуоресцентні барвники, ціанінові барвники (рис. 9) мають багато застосувань, особливо в біомедичній візуалізації. Залежно від структури, вони покривають видиму та інфрачервону частину спектра. Cy3, Cy5 і Cy7 – найпопулярніші ціанінові барвники. Cy3 має помаранчеву флуоресценцію (~550/570 нм), тоді як Cy5 флуоресціює в червоній області (~650/670 нм). Cy3 і Cy5 зазвичай комбінують для двоколірного детектування. Вони зазвичай синтезуються з реакційноздатними групами на одному або обох азотистих бічних ланцюгах, щоб їх можна було хімічно зв'язати з нуклеїновими кислотами або білковими молекулами. Маркування здійснюється з метою візуалізації та кількісного визначення. Cy3 і Cy5 використовуються в широкому спектрі біологічних застосувань, включаючи порівняльну геномну гібридизацію і генні чіпи, які застосовуються в транскриптоміці. Вони також використовуються для мічення білків і нуклеїнових кислот для різних досліджень, включаючи протеоміку і локалізацію РНК (рибонуклеїнової кислоти) [35].

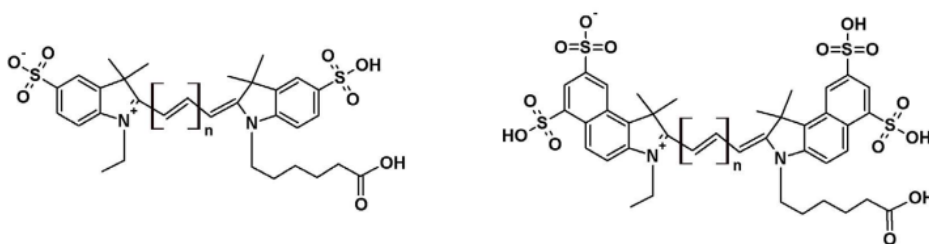


Рис. 9. Хімічні структури сульфонованих ціанінових барвників для мічення

пептидів. (Зліва: Cy3: $n=1$; Cy5: $n=2$; Cy7: $n=3$. Справа: Cy3.5: $n=1$; Cy5.5: $n=2$; Cy7.5: $n=3$)

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Приготування сорбенту діоксиду титану

Зразки TiO_2 готували рідиннофазним методом, з хлоридно-кислотного розчину тетрахлориду титану. Концентровану соляну кислоту (1,17 г/мл), охолоджену до 0 °С, додавали невеликими порціями до тетрахлориду титану TiCl_4 (1,4:1 за масою). Температура реакційної суміші не перевищувала 25 °С. Густина отриманого розчину прекурсору становила 1,515 г/мл (при 20 °С). 50 мл розчину прекурсору виливали в скляну склянку на 800 мл і додавали 250 мл дистильованої води. Потім склянку нагрівали до кипіння (112 °С) протягом 5 годин. Під час кип'ятіння, коли об'єм реакційної суміші зменшувався приблизно на 10 %, внаслідок випаровування води та HCl , у склянку додавали дистильовану воду для компенсації випаровування. На кінцевій стадії цього процесу температура кипіння реакційного середовища знижувалася до 106–108 °С.

Після 20–30 хвилин кип'ятіння розчини набувають білого кольору внаслідок утворення TiO_2 . Процес кипіння супроводжувався інтенсивною акустичною кавітацією. Бульбашки газу, що виникають при кип'ятінні, руйнуються і викликають потужні гідравлічні удари, спрямовані в об'єм реакційної суміші, що інтенсифікує перебіг реакцій. Синтезовані наночастинки TiO_2 видаляли з реакційного середовища вакуумною фільтрацією, промивали дистильованою водою, сушили протягом 2 годин при температурі 105 °С, а потім прожарювали протягом 2 годин в електричній печі при 350 °С. Потім розтирали у фарфоровій ступці.

Синтезовані наночастинки TiO_2 відокремлювали від реакційного середовища за допомогою вакуумної фільтрації, промивали дистильованою водою та сушили при 105 °С протягом 2 годин. Потім висушений матеріал піддавали прожарюванню протягом 2 годин в електричній печі при 350 °С.

2.2. Приготування міченого пептиду

Пептид Fl-GKVVIIKIAKIA (11 амінокислотний, молекулярна маса 1573 г/моль) був наданий лабораторією синтезу Інституту органічної хімії та

біохімії Чеської академії наук. Його було синтезовано методом твердофазного пептидного синтезу з використанням стандартних 9-фторенілметилоксикарбоніл (Fmoc) амінокислот, захищених бічними ланцюгами, протоколу приєднання HBTU/HOBt та смоли LL–NMP в якості твердої основи. Принагідно висловлюю подяку Інституту органічної хімії та біохімії Чеської академії наук за надані пептиди та створення сприятливого академічного середовища, яке заохочує інновації та наукові пошуки.

Два еквіваленти мітки (5(6)–карбоксифлуоресцеїну) розчиняли в N-метил–2–піролідоні (NMP), змішували з двома еквівалентами розчину сполуки HBTU/HOBt (в ДМФ) і додавали до пептидилової смоли, захищеної Fmoc. Після декількох хвилин струшування додавали п'ять екв. розчину N,N-діізопропілетиламіну (DIEA). Потім реакційну суміш перемішували протягом ночі при 40 °C. Смолу відфільтровували і промивали NMP, метанолом і дихлорметаном (ДХМ).

Розщеплення та депротекцію пептидної смоли проводили протягом 2 годин за допомогою 10 мл розчину трифлуороцтової кислоти (ТФК), що містив воду (5 %), TIS ($\text{}^i\text{Pr}_3\text{SiH}$, 2,5 %), фенол (1 %) та етанедітіол (2,5 %). Розчин концентрували у вакуумі і осаджували пептид за допомогою крижаного діетилового етеру, а потім центрифугуванням. Пептид солюбілізували 0,1 % водним ТФК і очищали методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на колонці C8 у суміші вода/ацетонітрил, що містить 0,1 % ТФК з лінійним градієнтом від 10 до 70 % ацетонітрилу протягом 30 хвилин.

Чистоту пептидів перед адсорбційними експериментами перевіряли за допомогою обернено-фазової тонкошарової хроматографії (ТШХ) у суміші вода–ацетонітрил 1:1 (рис. 10 а).

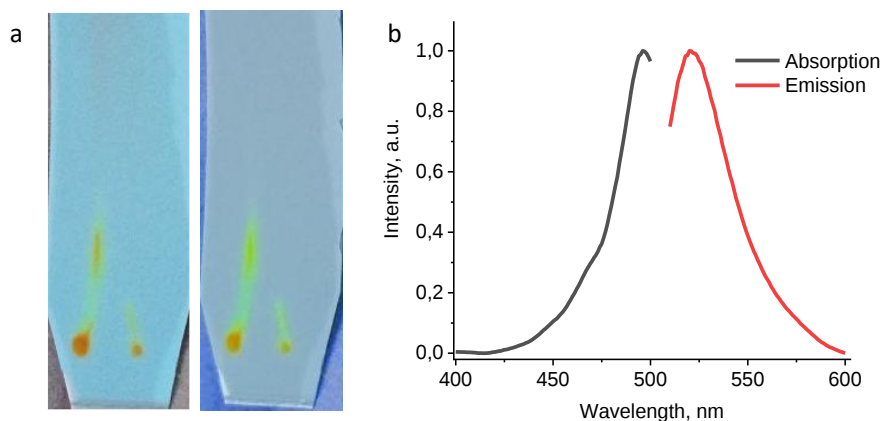


Рис. 10. Характеристика пептидів: а) ТШХ, візуалізована у видимому та УФ-світлі (365 nm); б) нормалізовані спектри поглинання та емісії

2.1.1. Вимірювання концентрації пептиду за допомогою світлопоглинання

Концентрацію флуоресцентно міченого пептиду визначали за світлопоглинанням мітки (5(6)–карбоксифлуоресцеїн, $\epsilon = 76000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\lambda = 480 \text{ nm}$) на спектрофотометрі DS-11 FX+ (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA).

2.1.2. Вимірювання флуоресценції міченого пептиду

Інтенсивність флуоресценції вимірювали на спектрофлуорофотометрі RF-5301 PC Shimadzu (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) з використанням збудження 470 nm (щілина 5 nm) і вимірюванням спектрів випромінювання в діапазоні 500–650 nm (крок 1 nm, щілини 5 nm) (рис. 10 б). Зразки об'ємом 500 мкл вимірювали в пластикових кюветах $4 \times 10 \text{ mm}$. Інтенсивність випромінювання коригували на базову лінію (сигнал від води в тій же кюветі) і, за необхідності, на розсіювання світла. Інтенсивність флуоресценції, яка використовувалася для розрахунків, зчитувалася при 530 nm (трохи зміщена в червоний бік від максимуму випромінювання, щоб мінімізувати вплив розсіювання світла від залишкових частинок TiO_2 в розчині). Для перерахунку інтенсивності флуоресценції в концентрацію міченого пептиду використовували калібрувальну криву, отриману для розчинів пептидів з відомими концентраціями в діапазоні від 10 до 100 мг/л.

2.3. Приготування міченого протеїну та вимірювання його концентрації за допомогою світлопоглинання

Протеїн BSA (Sigma-Aldrich), який зображений на рис. 11., розчиняли у фосфатному буфері (рН = 7,4. 10 мМ). Концентрацію розчину виміряли використовуючи поглинання триптофану на 280 нм ($\epsilon_{280} = 43\,824\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$). Він становив 495 мкМ. Враховуючи молекулярну масу 66480 кДа, а цю величину можна перевести в мг/мл і отримати 32.8 мг/мл.

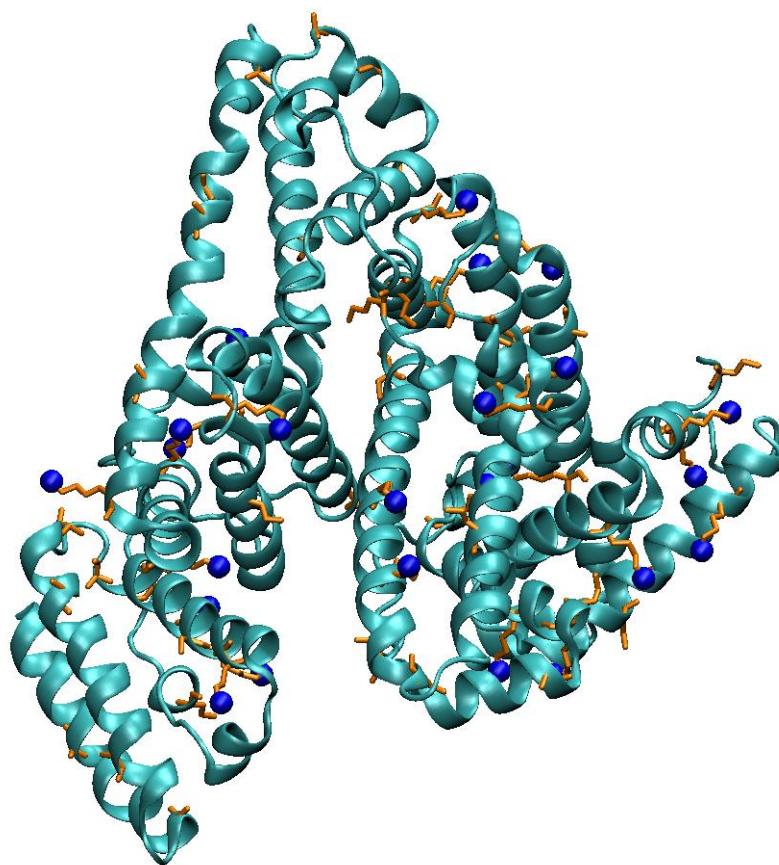


Рис. 11. Структура протеїну BSA побудована на основі координат атомів з даними pdb: 3V03 використовуючи програму VMD. Лізини позначено оранжевим. Атоми нітрогену на їх кінцях які доступні для мічення – синіми кульками. Розмір молекули приблизно 7,2нм

Для мічення протеїну використали розчин флуоресцеїнізотіоціанату (FITC) в ДМСО. Ступінь мічення оцінювали по вимірюванню поглинання флуоресцеїну в міченому протеїні на максимумі ($\epsilon_{490} = 76\,000\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$). Фінальна концентрація барвника в міченому протеїні становила 273 мкМ.

Тобто при міченні отримали продукта в якому було в середньому $273/495 = 0,55$ молекул барвника на протеїн. Оскільки кожна молекула BSA містить кілька лізинів доступних для мічення, ми очікуємо рівномірний розподіл барвників (рис.12) по них. Але низький загальний ступінь мічення дозволяє сподіватися, що додавання барвника мало впливає на здатність барвника сорбуватися на поверхні TiO_2 .

Концентрацію флуоресцентно міченого протеїну визначали на спектрофотометрі DeNovix (рис. 14).

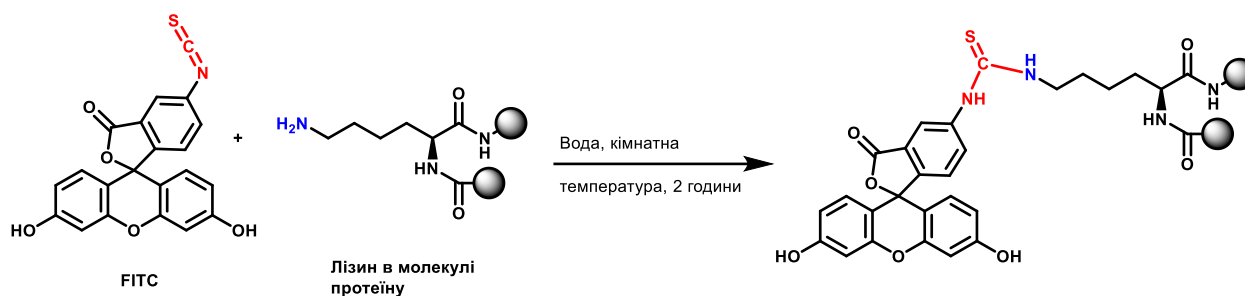


Рис. 12. Реакція мічення протеїну флуоресцеїнізотіюціанату

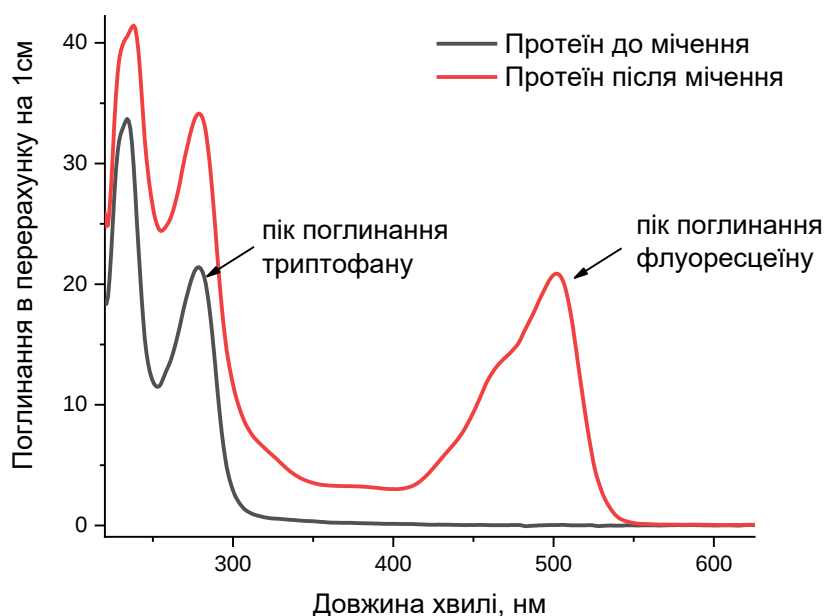


Рис. 13. Спектри до і після мічення протеїну

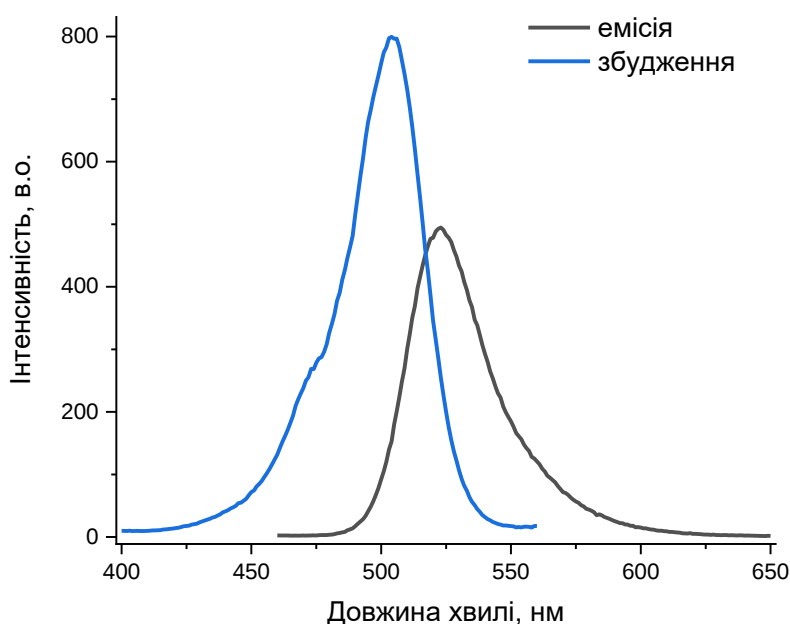


Рис. 14. Нормалізовані спектри поглинання та емісії міченого протеїну

2.4. Кількісне визначення адсорбції пептиду та протеїну

Адсорбцію пептиду та протеїну кількісно визначали в нейтральних розчинах (10 мМ фосфатний буфер, pH = 7), що містили 0, 150, 300 мМ NaCl. Пептид розчиняли у відповідному буфері до концентрації ($C_0 = 1, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 40, 60$ і 100 мг/л). 1 мл розчину пептиду та протеїну інкубували з 5мг TiO_2 у мікроцентрифужних пробірках протягом 4 годин з періодичним струшуванням кожні 10 хвилин, а потім ще 15 годин без струшування. Після цього пробірки центрифугували, а надосадові розчини, що не містили адсорбованого пептиду і протеїну, переносили в порожні пробірки. Концентрацію пептиду і протеїну в цих розчинах визначали за інтенсивністю флуоресценції, як описано нижче. Частку адсорбованого пептиду та протеїну (E) та адсорбційну ємність (q_e) розраховували за формулами (1) та (2) відповідно:

$$E(\%) = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \cdot 100\% \quad (1)$$

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (2)$$

де q_e – адсорбційна ємність, в мг пептиду/протеїну на 1 г сухого адсорбенту (мг/г); C_0 і C_e – початкова і рівноважна концентрація пептиду/протеїну в розчині (мг/л); V – об'єм розчину пептиду/протеїну (1 мл); m – маса адсорбенту (5 мг).

2.5. Ізотерми адсорбції Ленгмюра та Френдліха

Для кількісного визначення адсорбції пептиду та протеїну на поверхні TiO_2 ми інкубували сорбент з розчинами пептидів/протеїнів різної концентрації та різної іонної сили протягом 2 годин при кімнатній температурі. Потім розчин відокремлювали від сорбенту центрифугуванням і визначали частку адсорбованого пептиду/протеїну за інтенсивністю флуоресценції міченого пептиду/протеїну, що залишився в розчині.

Ми проводили адсорбційні експерименти за трьох умов, які відрізняються концентрацією NaCl у розчині: 0, 150 та 300 мМ. Вони були обрані для того, щоб варіювати іонну силу розчину від фізіологічного значення (~150 мМ NaCl) до вищих і нижчих значень. У всіх трьох випадках ми спостерігали поступове збільшення кількості адсорбованого пептиду і протеїну на поверхні TiO_2 зі збільшенням його концентрації в розчині (рис. 15 а, 16 а).

Сорбція пептиду та протеїну на поверхні TiO_2 може бути описана за допомогою моделей Ленгмюра та Френдліха (табл. 1, 2).

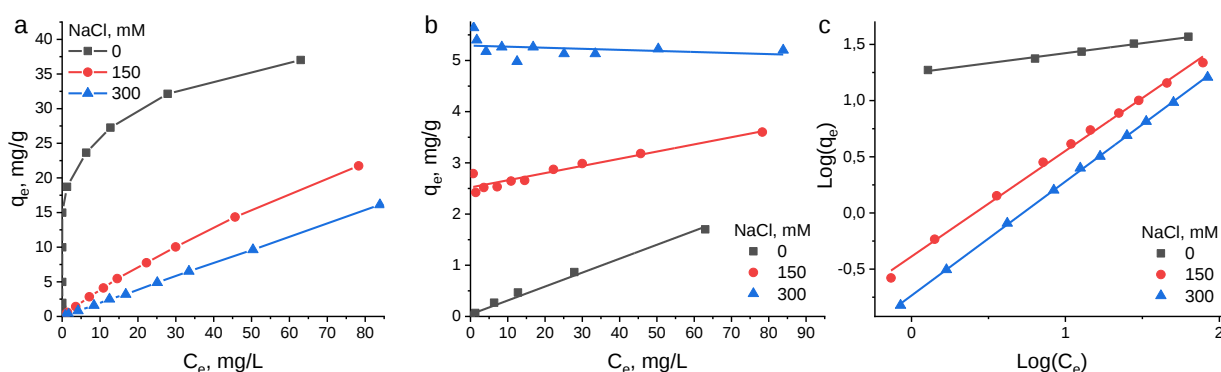


Рис. 15. Лінійні форми моделей Ленгмюра та Френдліха для адсорбції пептиду на TiO_2 у водних розчинах

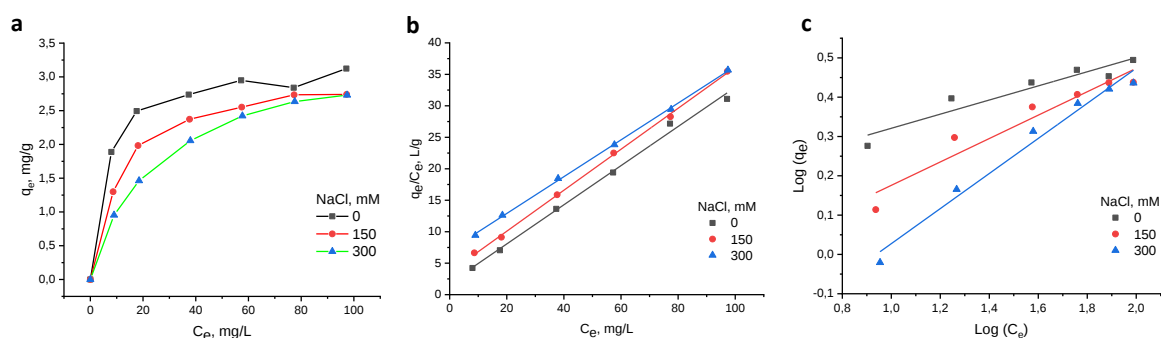


Рис. 16. Лінійні форми моделей Ленгмюра та Фрейндліха для адсорбції протеїну на TiO_2 у водних розчинах

Таблиця 1

Параметри ізотерм моделей Ленгмюра та Фрейндліха для адсорбції пептидів на TiO_2 у водних розчинах

Параметри моделі	Зразок		
	0NaCl/ TiO_2	150NaCl/ TiO_2	300NaCl/ TiO_2
Ізотерма Ленгмюра			
$q_{\max}$, МГ/Г	36.7	71.3	483
K_L , Л/МГ	0.68	0.0055 ± 0.0007	0.00039
R^2	0.992	0.996	0.999
Ізотерма Ленгмюра, фіксоване $q_{\max}$			
$q_{\max}$, МГ/Г	36.7	36.7^a	36.7^a
K_L , Л/МГ	0.68	0.0108	0.0051
R^2	0.992	0.992	0.992
Ізотерма Фрейндліха			
K_F , (МГ/Г)(Л/МГ) $^{1/n}$	17.6 ± 0.4	0.41	0.184
n	5.62	1.06	0.99
R^2	0.992	0.996	0.999

^aбуло зафіксовано на значенні, отриманому для зразка 0 NaCl

Таблиця 2

Параметри ізотерм моделей Ленгмюра та Фрейндліха для адсорбції протеїнів на TiO_2 у водних розчинах

Параметри моделі	Зразок		
	0NaCl/ TiO_2	150NaCl/ TiO_2	300NaCl/ TiO_2
Ізотерма Ленгмюра			
$q_{\max}$, мг/г	3.225	3.069	3.425
K_L , л/мг	0.2	0.078	0.048
R^2	0.994	0.999	0.999
Ізотерма Фрейндліха			
K_F , (мг/г)(л/мг) $^{1/n}$	0.14	0.12	0.42
1/n	0.17	0.29	0.45
R^2	0.883	0.908	0.975

^aбуло зафіксовано на значенні, отриманому для зразка 0 NaCl

Модель ізотерми адсорбції Ленгмюра передбачає оборотну сорбцію-десорбцію молекул на незалежних осередках зв'язування і характеризується двома параметрами: K_L – константа ізотерми Ленгмюра, що визначає ентальпію адсорбції [л мг $^{-1}$] та $q_{\max}$ – максимальна маса речовини, яка може бути адсорбована одиницею маси адсорбенту [мг г $^{-1}$]. Згідно з цією моделлю, маса адсорбованої речовини в стані рівноваги (q_e , [мг г $^{-1}$]) гіперболічно залежить від рівноважної концентрації речовини в розчині (C_e , [мг л $^{-1}$]):

$$q_e = \frac{q_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (3)$$

В області низьких концентрацій адсорбція аналіту зростає пропорційно концентрації, а потім досягає постійного значення через насичення активних центрів адсорбенту. Константи K_L і $q_{\max}$ можуть бути визначені з експериментальних даних або за допомогою нелінійного підбору, або шляхом перетворення рівняння (3) до лінійної форми:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_{\max} K_L C_e} + \frac{1}{q_{\max}} \quad (4)$$

Адсорбція досліджуваних пептидів та протеїнів задовільно описується моделлю Ленгмюра, що видно з лінійних залежностей q_e/C_e від рівноважної

концентрації пептиду в розчині (C_e) (рис. 16 б).

Для визначення параметрів зв'язування пептидів ми підігнали дані до моделі Ленгмюра. Однак для зразків 300 мМ NaCl невизначеність значення $q_{\max}$ була дійсно високою, найімовірніше, через відносно низьку спорідненість, яка не дозволяла досягти насичення в розумному діапазоні концентрацій. Логічно припустити, що різниця в іонній силі розчинів впливатиме на спорідненість, але не на максимальну ємність. Тому ми повторили підбір для Ленгмюрівської моделі, припускаючи, що $q_{\max}$ для всіх зразків однакова і дорівнює значенню, отриманому для зразка 0 мМ NaCl, де насичення було найбільш вираженим (рис. 15 а). Таке припасаування забезпечило більш надійні дані та вужчі довірчі інтервали.

Значення $q_{\max}$, отримане для пептиду і протеїну, були приблизно на 50 % вищим, ніж для невеликої органічної молекули Конго червоного, дослідженої в аналогічних умовах. Це можна пояснити відносно великим розміром пептиду, який може покривати діоксид титану, утворюючи товстіший шар, ніж менша молекула барвника. Значення константи ізотерми Ленгмюра K_L , що відображає ентальпію зв'язування, для досліджуваного пептиду приблизно в 3 рази більше, ніж для Конго червоного. Дуже ймовірно, що це є наслідком утворення множинного водневого зв'язку з поверхнею TiO_2 однією молекулою пептиду, що цілком узгоджується з наявністю в молекулі пептиду множинних полярних груп (амідних, аміногруп бічних ланцюгів лізину).

Наявність декількох полярних груп у молекулі пептиду також може призвести до взаємодії між пептидними молекулами на поверхні сорбенту, що призведе до кооперативності зв'язування. Для перевірки цієї гіпотези ми вирішили використати модель Фрейндліха, яка враховує такий тип взаємодії.

У випадку моделі ізотерми Фрейндліха ми маємо справу з фізичною адсорбцією, і рівняння, що описує модель, є емпіричним рівнянням:

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (5)$$

де K_F – константа ізотерми Фрейндліха, що описує адсорбційну ємність

$[(\text{мг/г})(\text{л/мг})^{1/n}]$; n – константа ізотерми Фрейндліха, що описує інтенсивність адсорбції, пов'язану з енергетичною неоднорідністю.

Модель припускає, що насичення поверхні адсорбенту не відбувається. Адсорбовані частинки першого шару взаємодіють між собою і з частинками, що утворюють наступні шари, за допомогою Ван-дер-Ваальсових або водневих зв'язків. Константи ізотерми Фрейндліха можна визначити, перетворивши рівняння (5) до лінійної форми шляхом двостороннього логарифмування:

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (6)$$

Наші дані добре узгоджуються з моделлю Фрейндліха, що призводить до майже прямих ліній після лінеаризації (рис. 15 в). Підгонка дає значення n 5,6 для розчинів з низькою іонною силою (0 NaCl) і ~ 1 для розчинів з 150 і 300 мМ NaCl. Обидва значення значно більші, ніж у випадку малого органічного барвника Конго червоного ($\sim 0,15$).

У моделі Ленгмюра константа K_L пов'язана з енергією адсорбції та спорідненістю між пептидом/протеїном і поверхнею адсорбенту. Значення цієї константи, отримане шляхом лінійної оцінки, становить 0,68 л/мг. Чим вище значення константи K_L , тим вища енергія адсорбції і тим вища афінність. Константа $1/n$ в моделі Фрейндліха, з іншого боку, говорить нам про гетерогенність поверхні. Чим менше значення $1/n$ (ближче до 0), тим більша гетерогенність поверхні сорбенту. У випадку даного дослідження значення $1/n$, отримане шляхом лінійної оцінки, становило від 1 до 5,6, що свідчить про відносно низьку гетерогенність поверхні адсорбенту.

ВИСНОВКИ

Ми виявили, що збільшення іонної сили сильно зменшує адсорбцію пептидів на діоксиді титану. Присутність іонів у розчині екранує заряди на поверхні пептиду і TiO_2 , послаблюючи електростатичні взаємодії та обмежуючи адгезію пептидів і білків до поверхні TiO_2 .

Для опису механізму адсорбції пептидів і протеїнів на поверхні зразків діоксиду титану використовували моделі Фрейндліха та Ленгмюра. На основі результатів досліджень встановлено, що повердінка зразків найкраще узгоджується з моделлю Ленгмюра.

Коефіцієнти кореляції для ізотерм Ленгмюра знаходяться в межах 0,994 – 0,999, тоді як значення R^2 для ізотерм Фрейндліха знаходяться в межах 0,952 – 0,989 відповідно. Низька кореляція експериментальних даних з моделлю Фрейндліха свідчить про те, що для пептидів не характерна багаточарова адсорбція.

Флуоресцентний метод дослідження зв'язування пептидів з поверхнею сорбенту дозволяє працювати з відносно низькими концентраціями пептидів і малими об'ємами зразків. Зокрема, для вимірювання сорбції в один умов ми використовували приблизно 10^{-4} моль пептиду чи протеїну, в той час як для адсорбційних вимірювань, описаних в наукових статтях, використовували приблизно в 100 разів більші об'єми і більші молярні концентрації, що призводило до витрати близько 0,07 моль барвника на один експеримент. Флуоресцентний підхід буде дуже корисним для подальших досліджень пептидної адгезії, оскільки він поєднує надійне зчитування, швидкий час вимірювання та економічну ефективність.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] Commission Regulation (EU) 2022/63 of 14 January 2022 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council as regards the food additive titanium dioxide (E 171). URL: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2022.011.01.0001.01.ENG
- [2] EMA. (2021). Final feedback from European Medicine Agency (EMA) to the EU Commission request to evaluate the impact of the removal of titanium dioxide from the list of authorised food additives on medicinal products. *European Medicines Authority*. EMA/504010/2021. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/final-feedback-european-medicine-agency-ema-eu-commission-request-evaluate-impact-removal-titanium_en.pdf
- [3] Prokipchuk, I. V., Mykytyn, I. M., Danyliuk, D. M., Bedrii, M. V., & Pidhirna, M. Ya. (2023). Fluorescence-based quantification of peptide adsorption on titanium dioxide. *Journal of Chemistry and Technologies*, 31(3). 486–492.
- [4] Прокіпчук, І., Микитин, І., Бедрій, М., & Підгірна, М. (2023). Оцінка адсорбції пептидів на діоксиді титану за допомогою флуоресцентного аналізу. *Grail of Science*, (29), 163–165.
- [5] Liu, C., Guo, Y., Hong, Q., Rao, C., Zhang, H., Dong, Y., Huang, L., Lu, X., & Bao, N. (2016). Bovine serum albumin adsorption in mesoporous titanium dioxide: Pore size and pore chemistry effect. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 32(16), 3995–4003.
- [6] Micksch, T., Liebelt, N., Scharnweber, D., & Schwenzer, B. (2014). Investigation of the peptide adsorption on ZrO₂, TiZr, and TiO₂ surfaces as a method for surface modification. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(10), 7408–7416.
- [7] Feng, B., Weng, J., Yang, B. C., Chen, J. Y., Zhao, J. Z., He, L., Qi, S. K.,

- & Zhang, X. D. (2002). Surface characterization of titanium and adsorption of bovine serum albumin. *Materials Characterization*, 49(2), 129–137.
- [8] Huangfu, C., Dong, Y., Ji, X., Wu, N., & Lu, X. (2019). Mechanistic study of protein adsorption on mesoporous TiO₂ in aqueous buffer solutions. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 35(34), 11037–11047.
- [9] Barberi, J., & Spriano, S. (2021). Titanium and protein adsorption: An overview of mechanisms and effects of surface features. *Materials*, 14(7), 1590.
- [10] Dong, Y., Lin, W., Laaksonen, A., & Ji, X. (2022). Complementary powerful techniques for investigating the interactions of proteins with porous TiO₂ and its hybrid materials: A tutorial review. *Membranes*, 12(4), 415.
- [11] Roth, C. M., & Lenhoff, A. M. (1993). Electrostatic and van der Waals contributions to protein adsorption: computation of equilibrium constants. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 9(4), 962–972.
- [12] Leader, A., Mandler, D., & Reches, M. (2018). The role of hydrophobic, aromatic and electrostatic interactions between amino acid residues and a titanium dioxide surface. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 20(47), 29811–29816.
- [13] Dong, Y., An, R., Zhao, S., Cao, W., Huang, L., Zhuang, W., Lu, L., & Lu, X. (2017). Molecular interactions of protein with TiO₂ by the AFM-measured adhesion force. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 33(42), 11626–11634.
- [14] Martins, M. C. L., Sousa, S. R., Antunes, J. C., & Barbosa, M. A. (2012). Protein adsorption characterization. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 141–161). Humana Press.
- [15] Ellingsen, J. (1991). A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials*, 12(6), 593–596.

- [16] Ranjan, S., Dasgupta, N., Srivastava, P., & Ramalingam, C. (2016). A spectroscopic study on interaction between bovine serum albumin and titanium dioxide nanoparticle synthesized from microwave-assisted hybrid chemical approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 161, 472–481.
- [17] Diebold, U. (2003). The surface science of titanium dioxide. *Surface Science Reports*, 48(5–8), 53–229.
- [18] Wassell, D. T. H., & Embery, G. (1996). Adsorption of bovine serum albumin on to titanium powder. *Biomaterials*, 17(9), 859–864.
- [19] Raffaini, G., & Ganazzoli, F. (2012). Molecular modelling of protein adsorption on the surface of titanium dioxide polymorphs. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 370(1963), 1444–1462.
- [20] Kopac, T., Bozgeyik, K., & Yener, J. (2008). Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects*, 322(1–3), 19–28.
- [21] Kopac, T., & Bozgeyik, K. (2010). Effect of surface area enhancement on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 76(1), 265–271.
- [22] Márquez, A., Berger, T., Feinle, A., Hüsing, N., Himly, M., Duschl, A., & Diwald, O. (2017). Bovine serum albumin adsorption on TiO₂ colloids: The effect of particle agglomeration and surface composition. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 33(10), 2551–2558.
- [23] Zhang, T., Chen, H., Tan, C., Li, L., Zhang, L., Liu, C., Li, W., Yan, C., Li, J., & Lu, R. (2023). Elucidating the binding mechanism between bovine serum albumin and TiO₂ nanoparticles with diverse properties: Insights from spectroscopic methods and molecular docking simulation. *Chemical Physics*, 573(111993), 111993.
- [24] Kathiravan, A., & Renganathan, R. (2008). Interaction of colloidal TiO₂

- with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects*, 324(1–3), 176–180.
- [25] Gertler, G., Fleminger, G., & Rapaport, H. (2010). Characterizing the adsorption of peptides to TiO₂ in aqueous solutions by liquid chromatography. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 26(9), 6457–6463.
- [26] Togashi, D. M., Ryder, A. G., Mc Mahon, D., Dunne, P., & McManus, J. (2007). Fluorescence study of bovine serum albumin and Ti and Sn oxide nanoparticles interactions. In D. Schweitzer & M. Fitzmaurice (Eds.), *SPIE Proceedings*. SPIE.
- [27] Pandit, S., & Kundu, S. (2021). Fluorescence quenching and related interactions among globular proteins (BSA and lysozyme) in presence of titanium dioxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects*, 628(127253), 127253.
- [28] Lu, R., Tan, C., Li, L., Zhang, T., Li, Y., Xin, X., Liu, C., Li, W.-H., Yan, C., & Li, J. (2022). A systematic study of the interaction mechanism between bovine serum albumin and TiO₂ nanoparticles with various shapes morphologies, surface charges, and hydrophobicity properties. *SSRN Electronic Journal*.
- [29] Bukackova, M., & Marsalek, R. (2020). Interaction of BSA with ZnO, TiO₂, and CeO₂ nanoparticles. *Biophysical Chemistry*, 267(106475), 106475.
- [30] Givens, B. E., Xu, Z., Fiegel, J., & Grassian, V. H. (2017). Bovine serum albumin adsorption on SiO₂ and TiO₂ nanoparticle surfaces at circumneutral and acidic pH: A tale of two nano-bio surface interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 493, 334–341.
- [31] Rajeshwari, A., Amrita, K., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2015). Spectroscopic studies on TiO₂ nanoparticles-bovine serum albumin interaction under visible light and dark conditions. *Asian Journal of*

Chemistry, 27(5), 1798–1804.

- [32] Anaya-Esparza, L. M., Villagrán-de la Mora, Z., Rodríguez-Barajas, N., Sandoval-Contreras, T., Nuño, K., López-de la Mora, D. A., Pérez-Larios, A., & Montalvo-González, E. (2020). Protein–TiO₂: A functional hybrid composite with diversified applications. *Coatings*, 10(12), 1194.
- [33] Vallee, A., Humblot, V., & Pradier, C.-M. (2010). Peptide interactions with metal and oxide surfaces. *Accounts of Chemical Research*, 43(10), 1297–1306.
- [34] Shi, J., Feng, B., Lu, X., & Weng, J. (2012). Adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide nanotube arrays. *International Journal of Materials Research (Zeitschrift Für Metallkunde)*, 103(7), 889–896.
- [35] Vian, R., Salehi, H., Lapierre, M., Cuisinier, F., Cavaillès, V., & Balme, S. (2021). Adsorption of proteins on TiO₂ particles influences their aggregation and cell penetration. *Food Chemistry*, 360(130003), 130003.