

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
им. А.Н.НЕСМЕЯНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи

РОДИОНОВ Илья Александрович

**КРИОГЕЛИ НА ОСНОВЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА:
СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, СТРУКТУРА
И ВОЗМОЖНОСТИ БИОМЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Лозинский В.И.

Москва – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ГЛАВА I. ВВЕДЕНИЕ.	6
ГЛАВА II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. КРИОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ ГЕЛЕВЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ.	11
2.1. Общие сведения о полимерных криогелях.	11
2.1.1. Криотропное гелеобразование и классификация криогелей.	11
2.1.2. Основные характеристики криогелей и криоструктуратов.	14
2.1.3. Применение криогелей для решения прикладных задач.	16
2.2. Криогели на основе белков.	17
2.2.1. Криогели и криоструктураты на основе фибриллярных белков.	18
2.2.1.1. Криогели и криоструктураты на основе коллагена.	18
2.2.1.2. Криогели и криоструктураты на основе фиброина шелка.	24
2.2.1.3. Криогели и криоструктураты, полученные с использова- нием других фибриллярных белков.	29
2.2.2. Криогели и криоструктураты на основе желатина.	30
2.2.3. Криогели и криоструктураты на основе глобулярных белков.	43
2.3. Сывороточный альбумин и функциональные материалы на его ос- нове.	47
2.3.1. Свойства и практическое применение сывороточного альбу- мина.	47
2.3.2. Примеры широкопористых криогелей и криоструктуратов на основе альбумина и других белков плазмы крови.	49
ГЛАВА III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.	52
ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.	63
4.1. Предварительные замечания.	63
4.2. Получение, свойства и микроструктура альбуминовых криогелей первого типа.	63
4.2.1. Влияние состава исходной реакционной системы на свойства БСА-криогелей 1-го типа.	64
4.2.2. Зависимость свойств БСА-криогелей 1-го типа от температуры	

криогенной обработки.	70
4.2.3. Устойчивость БСА-криогелей 1-го типа в различных солубилизирующих средах.	73
4.2.4. Предполагаемый механизм формирования БСА-криогелей 1-го типа.	75
4.2.5. Изменение конформационного состояния БСА под влиянием мочевины и цистеина в ходе криотропного гелеобразования в неглубоко замороженных средах.	77
4.2.6. Особенности широкопористой морфологии БСА-криогелей 1-го типа в зависимости от условий формирования.	79
4.3. Получение, свойства и структура БСА-криогелей 2-го типа.	84
4.3.1. Влияние исходной концентрации предшественников на свойства БСА-криогелей 2-го типа.	85
4.3.2. Зависимость свойств БСА-криогелей 2-го типа от температуры криотропного гелеобразования.	87
4.3.3. Микроструктура БСА-криогелей 2-го типа.	91
4.3.4. Конформационное состояние макромолекул альбумина, встроенных в пространственную сетку БСА-криогелей 2-го типа.	95
4.3.5. Поведение БСА-криогелей 2-го типа в различных солубилизирующих средах.	98
4.4. Получение, свойства и структура БСА-криоструктуратов	101
4.4.1. Влияние условий формирования на свойства БСА-криоструктуратов.	101
4.4.2. Поведение БСА-криоструктуратов в различных солубилизирующих средах.	109
4.4.3. Конформационные характеристики макромолекул альбумина в сшитой полимерной фазе широкопористых БСА-криоструктуратов.	109
4.4.4. Особенности широкопористой морфологии БСА-криоструктуратов.	111
4.5. Практическое применение альбуминовых криогелей и криоструктуратов.	114
4.5.1. Использование альбуминовых криогелей 1-го типа в качестве	

депо-форм антибиотиков для химиотерапии инфицированных ран.	114
4.5.2. Белковые криогели 1-го типа как подложки для трехмерного культивирования мультипотентных стволовых клеток.	120
4.5.3. Использование белковых криогелей 1-го типа в качестве подложек для трехмерного культивирования фибробластов человека.	122
4.5.4. Оценка сорбционных свойств БСА-криогелей 2-го типа.	124
4.5.5. Применение БСА-криоструктуратов в качестве носителей иммобилизованной органофосфатгидролазы.	126
ВЫВОДЫ.	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ.	132
ПРИЛОЖЕНИЯ.	151

Принятые в тексте обозначения и понятия

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ГА – глутаровый альдегид;

ДАК – диальдегид крахмала;

ДМСО – N,N-диметилсульфоксид;

ДМФА – N,N-диметилформамид;

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия;

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза;

НЖМФ – незамерзшая жидкая микрофаза.

ПВС – поливиниловый спирт;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

ТМЭД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин;

Трп – L-триптофан;

ФШ – фиброин шелка;

Цис – L-цистеин;

ЧСА – сывороточный альбумин человека;

ЭДК – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид;

V_{эл} – объем элюата.

Неглубоко замороженные системы – закристаллизованные системы, где еще сохраняется определенная доля невымороженного растворителя, т.е. существует НЖМФ; обычно – это область температур не ниже, чем несколько десятков градусов от точки кристаллизации чистого растворителя.

ГЛАВА I. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы:

Основной белок сыворотки крови, альбумин (в частности, бычий сывороточный альбумин, или БСА) может служить удобным объектом для получения на его основе макропористых криогелей биомедицинского назначения, однако криотропное гелеобразование с участием данного белка пока в недостаточной мере изучено. Первые работы, посвященные БСА-криогелям, сшитым с помощью глутарового альдегида, появились лишь в середине 1980-х годов [25-30], носили строго прикладной характер и не были направлены на изучение закономерностей, управляющих свойствами и структурой полученных материалов. За последующие годы были синтезированы и охарактеризованы криогели на основе альбумина, сшитого совместным действием фермента и альдегида [9]. Ранее в нашей лаборатории была показана возможность формирования ковалентных альбуминовых криогелей принципиально иным способом, не задействуя кросс-агент, путем замораживания/оттаивания систем «вода + БСА + низкомолекулярный восстановитель + денатурирующий агент». Потенциальное практическое применение таких полностью биосовместимых материалов в медицине требует более детального изучения зависимости их эксплуатационных характеристик от различных параметров процесса получения.

Криотропное гелеобразование в системах белок+карбодиимид, обеспечивающий сшивку «нулевой длины», также позволяет формировать широкопористые криогели, пространственная сетка которых не включает фрагментов небелковой природы [3, 53]. В литературе не имеется упоминаний об использовании данного подхода к синтезу материалов на основе сывороточного альбумина, в связи с чем к задачам настоящего исследования относилось получение и исследование свойств и структуры данных криогелей.

Исследования особенностей гелеобразования БСА в умеренно замороженных системах двух вышеописанных типов дает возможность оценить влияние различных его параметров на эффективность встраивания белка в гелевую сетку образующихся альбуминовых криогелей, получить информацию о некоторых особенностях процесса формирования узлов пространственной сетки, а также определить различные физико-химические характеристики исследуемых материалов.

В литературе имеется описание белковых криоструктуратов, полученных замораживанием/лиофильной сушкой плазмы крови с последующей химической фиксацией

суммарного белка в среде его нерастворителя с помощью глутарового альдегида [58, 59]. Представляло интерес применить данную методику для формирования криоструктуратов на основе чистого сывороточного альбумина, сшитого с помощью карбодиимида, аналогичного тому, что применен при синтезе ранее указанных БСА-криогелей. До настоящего исследования в литературе также не имеется примеров сравнительной оценки свойств белковых криогелей и криоструктуратов, полученных из эквиконцентрированных реакционных систем, содержащих одинаковые предшественники, но с помощью различных методов. Таким образом, сопоставление БСА-криогелей и криоструктуратов, сшитых с помощью карбодиимида, представляло возможность определить, каким образом на свойства широкопористых криоструктурированных систем влияет способ их получения. Ответы на эти вопросы определяли актуальность исследований, представляющих предмет данной диссертационной работы.

Целью работы являлось изучение свойств ковалентно сшитых криогелей и криоструктуратов на основе сывороточного альбумина, пространственная гелевая сетка которых не содержала включений, привнесенных извне действием на белок кросс-агента; изучение особенностей структуры полученных белковых материалов, их физико-химических свойств, а также оценка их применимости для ряда биомедицинских практических приложений.

Научная новизна. Установлена природа узлов, стабилизирующих гелевую сетку альбуминовых криогелей, полученных криогенной обработкой водных растворов «сывороточный альбумин + цистеин + мочеви́на»; установлены закономерности между эффективностью протекания критропного гелеобразования, физико-химическими свойствами, микроструктурой БСА-криогелей и условиями их формирования.

Впервые получены и охарактеризованы широкопористые БСА-криоструктураты методом замораживания/лиофильной сушки водных растворов белка с последующей химической сшивкой БСА в среде его нерастворителя с помощью карбодиимида.

Продемонстрировано, что исходной гелеобразующей системой для формирования БСА-криогелей и криоструктуратов может служить цельная плазма или сыворотка крови.

Исследования подобного рода ранее не проводились, что подтверждается отсутствием в доступной научной литературе какой-либо информации, относящейся к данному направлению химии высокомолекулярных соединений.

Практическая значимость. Продемонстрировано применение полученных альбуминовых криогелей в качестве основы биodeградируемых депо-форм различных антибиотиков и других антибактериальных агентов для химиотерапии инфицированных ран; показана принципиальная возможность использования губчатых БСА-криогелей в качестве сорбентов биологически активных веществ; метод формирования БСА-криоструктуратов, включающая замораживание/лиофилизацию замороженных растворов белка с последующей ковалентной сшивкой образованных пористых структуратов, может быть применен для получения широкопористых биокатализаторов, содержащих иммобилизованный фермент.

Публикации. Основные результаты диссертации изложены в 8 печатных работах: 2 статьях в научных журналах, включенных в перечень ВАК, и 6 тезисах докладов.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: конференция-аттестация ИНЭОС РАН «Веснянка» (2014, 2015 и 2016); Международная научная конференция «Chemistry of Organoelement Compounds and Polymers» (Москва, 2014); VIII Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015); II Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2016); X Конкурс Проектов Молодых Ученых в рамках выставки «ХИМИЯ-2016» (Москва, 2016); XVI Международная научно-техническая конференция «Наукоемкие химические технологии-2016» с элементами школы молодых ученых (Москва, 2016); Международная научная конференция «EMN Meeting on Hydrogel Materials» (Сингапур, 2016); Международная научно-практическая конференция «Биотехнология в комплексном развитии регионов» (Москва, 2016); VI Всероссийская конференция для молодых ученых с международным участием «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты» (Химки, 2016).

Работа выполнена в соответствии с основными направлениями исследований Лаборатории криохимии (био)полимеров ИНЭОС РАН при частичной финансовой поддержке проекта «Разработка экспериментальных образцов новых широкопористых носителей-подложек и микросфер на основе криогелей из синтетических и природных полимеров для клеточных технологий и регенеративной медицины» программы Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий на 2014-2016 гг.»; проекта № 16-13-10365 РФФИ «Криохимические подходы к созда-

нию новых гибридных наносистем и наноструктур для направленной доставки лекарственных веществ».

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 156 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы, список цитируемой литературы из 202 ссылок, а также приложения. Работа содержит 12 таблиц и 41 рисунок.

Содержание работы. Во введении дано обоснование актуальности диссертационной работы и указаны ее цели и задачи. В литературном обзоре приведена классификация макропористых криоструктурированных гелевых систем в зависимости от способа их формирования; проанализирована зависимость основных характеристик широкопористых криогелей и криоструктуратов от условий их получения, а также от типа белков, использованных в качестве высокомолекулярных предшественников, и кросс-агента. В методическом разделе дана характеристика используемых реагентов, описаны подходы к формированию альбуминовых криогелей и криоструктуратов, а также методов их исследования. В обсуждении результатов приведена характеристика полученных белковых материалов, сделаны выводы относительно закономерностей, влияющих на их свойства и структуру, описаны различные варианты практического применения таких криогелей и криоструктуратов. В приложении дано описание методик прикладных исследований альбуминовых криогелей, проведенных в сторонних специализированных организациях.

Перед изложением материала литературного обзора необходимо отметить, что помимо непосредственно метода криотропного гелеобразования, при котором формирование узлов пространственной гелевой сетки образующихся полимерных криогелей протекает в неглубоко замороженной реакционной системе, на практике реализуют и другой способ получения макропористых гелевых материалов, когда на начальном этапе полимерному предшественнику придают требуемую пористую морфологию путем замораживания и лиофильной сушки его раствора/суспензии, а затем фиксируют сформированный таким образом структурат сшивкой полимера в среде его нерастворителя. Данный подход к формированию широкопористых гелевых систем кардинальным образом отличается от криотропного гелеобразования, поскольку формирование узлов гелевой сетки получаемых криоструктуратов протекает после криогенной обработки поли-

мерного предшественника в условиях повышенной концентрации последнего, причем подвижность цепей высокомолекулярного соединения, подвергаемого химической сшивке, существенной ниже, чем в случае критического гелеобразования, при котором полимерный предшественник растворен в подвижной среде НЖМФ.

Автор выражает благодарность за неоценимую помощь в работе: научному руководителю проф., д.х.н. В.И. Лозинскому и всем сотрудникам Лаборатории криохимии (био)полимеров ИНЭОС РАН; в.н.с., д.х.н. В.Я. Гринбергу и сотрудникам его группы, (ИНЭОС РАН); к.м.н А.В. Цискарашвили и его сотрудникам (ЦИТО им. Приорова); проф., д.х.н. Е.Н. Ефременко и сотр. (Кафедра Химической Энзимологии, Химфак. МГУ им. М.В. Ломоносова); проф., д.б.н. И.П. Савченковой и сотр. (Лаборатория Стволовой Клетки, ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко), в.н.с., д.х.н. Т.И. Шабатиной и сотр. (Лаборатории химии низких температур, Хим. Фак. МГУ им. М.В. Ломоносова); д.б.н. Е.А. Воротеляк и сотр. (Лаборатории клеточной биологии, ИБР РАН им. Н.Н. Кольцова).

ГЛАВА II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

«Криоструктурированные гелевые системы на основе белков»

2.1. Общие сведения о полимерных криогелях

2.1.1. Криотропное гелеобразование и классификация криогелей.

К перспективным материалам для использования в медицине и биотехнологии относятся криогели (от греч. «криос» - мороз, лед) - макропористые гелевые системы, формирование которых протекает в неглубоко замороженных средах. Криотропное гелеобразование является сложным процессом, состоящим из нескольких стадий. На начальном этапе производят растворение подходящих веществ-предшественников в растворителе, в качестве которого наиболее часто используют воду, а также ряд органических растворителей (напр., ДМСО, ДМФА, и т.д.). Многочисленными исследованиями (см., например, обзоры [143, 100]) показано, что, аналогично полимерным гелям, криогели могут быть получены из различных реакционных систем подразделяемых на следующие категории:

а) Коллоидные дисперсии, замораживание которых приводит к усилению взаимодействия между отдельными частицами и в результате к образованию криогелей, стабилизированных как силами когезии, так и образующимися между частицами химическими связями, если в исходной системе присутствуют соответствующие кросс-агенты.

б) Растворы на водной или органической основе мономерных предшественников, полимеризация или поликонденсация которых при неглубоком замораживании приводит к образованию ковалентно сшитых гетерофазных гелевых систем.

в) Растворы высокомолекулярных предшественников, в которых при неглубоком замораживании протекают реакции межмолекулярной сшивки под действием химических агентов либо под действием облучения (электронное, гамма-, УФ-излучение, фотоллиз в присутствии подходящего инициатора), в результате чего формируются химически сшитые пористые матрицы.

г) Растворы так называемых саможелирующих полимеров, на основе которых формируются физические (нековалентные) криогели в результате «ухудшения» качества растворителя, или же в результате введения в раствор растворимых компонентов, приводящих к изменению конформации макромолекул полимера (денатуранты, в случае таких биополимеров, как белки) [24, 143].

д) Растворы полиэлектролитов и ионных низкомолекулярных либо полимерных кросс-агентов, когда в результате замораживания-оттаивания которых формируются криогели, чья гелевая сетка стабилизирована за счет устойчивых ионных связей между цепями полиэлектролита [101].

Принципиальная схема криотропного гелеобразования приведена на Рисунке 1 [98]. После растворения/распределения всех исходных компонентов полученную систему охлаждают для обеспечения равномерного температурного поля во всем объеме реакционной среды, а также с целью понижения начальной скорости реакции между компонентами системы, после чего вносят требуемый инициатор или сшивающий агент, запускающий процесс гелеобразования. Затем данную реакционную систему неглубоко замораживают и инкубируют в течение определенного периода времени при заданной отрицательной температуре.

Неглубоко замороженная (при температуре ниже не более нескольких десятков градусов точки кристаллизации растворителя) исходная система (раствор или коллоидный золь) является двухфазной (Рисунок1: 4) и состоит из поликристаллов замороженного растворителя (в случае воды – льда); и тонкой прослойки незамерзшей жидкости, называемой незамерзшей жидкой микрофазой (**НЖМФ**; Рисунок 1: 5) со сконцентрированными в ней гелеобразующими компонентами, суммарный объем которой в десятки раз меньше общего объема образца. Данная прослойка криоконцентрата, присутствующая между поликристаллами растворителя, служит реакционной средой, в которой протекают взаимодействия между предшественниками (Рисунок1: 1 и 3) с образованием фазы полимерного геля. При этом гелеобразование может протекать как непосредственно во время замерзания исходной системы (например, коллоидной дисперсии клейстеризованного крахмала [58]), так и при инкубирования образцов в замороженном состоянии (ковалентно сшитые криогели) [59, 60], либо в ходе оттаивания замороженных препаратов (чаще характерно для нековалентного криотропного гелеобразования) [61, 62].

По завершении криотропного гелеобразования образец оттаивают, в результате чего в массе криогеля остаются полости, заполненные оттаявшим растворителем (Рисунок1: 8), а силы поверхностного натяжения собственно гелевой фазы (Рисунок1: 6) ис-

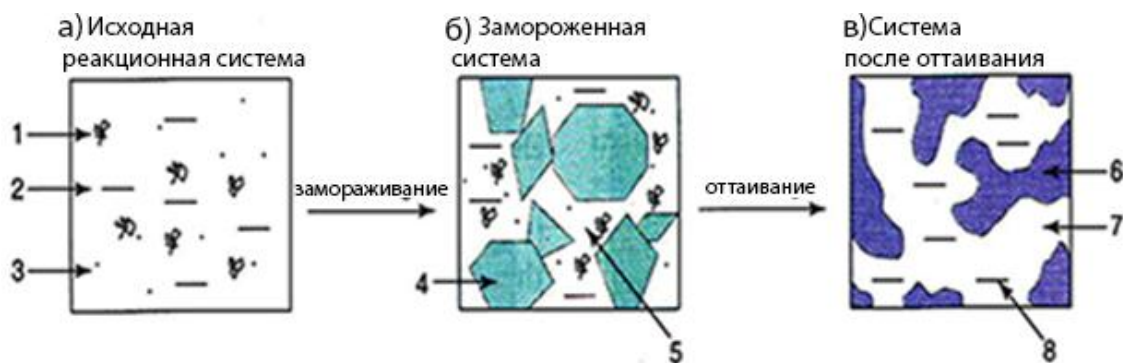


Рисунок 1. Схема процесса криотропного гелеобразования:

1 - высокомолекулярный гелеобразующий предшественник; **2** и **8** - растворитель; **3** - низкомолекулярный гелеобразующий предшественник или разбавитель; **4** - поликристаллы замерзшего растворителя; **5** - незамерзшая жидкая микрофаза; **6** - полимерная сетка криогеля (стенки макропор); **7** - макропоры; **8** - оттаявший растворитель [98].

кривляют поверхность стенок макропор (Рисунок 1: 7), которые принимают округлую форму вместо ограненной, свойственной частицам кристаллического порогена. Поскольку гелевая фаза криогеля формируется при высоких концентрациях предшественников она представляет собой частую пространственную сетку, обладающую собственной (гелевой) пористостью.

По типу связей, стабилизирующих узлы такой гелевой сетки, криогели подразделяют на:

а) Химически (ковалентно) сшитые криогели, как правило получаемые путем сшивки высокомолекулярных предшественников под действием различных сшивающих агентов, взаимодействующих с соответствующими функциональными группами высокомолекулярного предшественника, либо синтезируемые через реакции радикальной полимеризации в неглубоко замороженных системах.

б) Физические (нековалентные) криогели формируются в результате криогенной обработки систем, содержащих «саможелирующие» синтетические и природные полимеры. Как правило, узлы пространственной гелевой сетки физических криогелей стабилизированы либо водородными связями, как в случае с криогелями на основе поливинилового спирта (ПВС) [102], либо за счет гидрофобных взаимодействий между участками макромолекул предшественника. Нековалентные узлы пространственной сетки таких криогелей формируются в результате коагуляции полимерного предшественника, вызванной как ухудшением термодинамического качества растворителя, так и при введении в систему агента, вызывающего изменение конформации полимера.

в) Ионотропные (ионные) криогели образуются в результате сшивки полиэлектролитов с помощью ионов. Ионные криогели на основе белков практически не встречаются в научной литературе.

2.1.2. Основные характеристики криогелей и криоструктуратов

Одной из наиболее важных как с феноменологической, так и с практической точек зрения особенностей криогелей, является их гетерофазная макропористая текстура, причем поры во всем объеме криогеля являются взаимосвязанными [115, 131], а диаметр пор может быть от единиц до нескольких сотен микрон. Помимо линейных размеров, макропористую структуру криогелей характеризуют такие часто упоминаемые в литературе показатели, как форма и объем пор, распределение пор по размерам, степень их взаимосвязанности, толщина стенок макропор, степень пористости. Эти параметры поддаются регулировке и зависят от свойств исходной системы и условий криогенной обработки исходной реакционной системы. В частности, на диаметр пор влияют скорость и температура, при которых производят замораживание гелеобразующей системы [68], тип используемого порогена (кристаллизующегося растворителя) [116], природа и соотношение предшественников в исходной системе [117].

Микроструктуру криогелей в сольватированном и высушенном состояниях изучают с помощью таких методов, как оптическая (световая) микроскопия, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) [135], конфокальная лазерная сканирующая микроскопия и мультифотонная микроскопия [136], микрокомпьютерная томография (мКМ) [188]. Известен также метод криопорометрии по данным спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), в котором оценивают содержание жидкости внутри макропор набухшего криогеля и общий объем пор [138].

Взаимосвязанный характер макропор в криогелях предполагает возможность протекания жидкости через блок таких материалов. Соответственно, скорость протока и величину давления, препятствующего потоку, используют в качестве показателей, косвенно характеризующих диаметр пор. Повышенное обратное давление или малая скорость протока жидкости (чаще воды) могут указывать как на сравнительно узкие макропоры, так и на малую прочность их стенок, приводящую к блокировке макропор под напором протока. Напротив, стабильный проток и малое ему сопротивление говорят о наличии развитой взаимосвязанной широкопористой структуры [52]. Степень взаимосвя-

занности и суммарный диаметр макропор также могут быть оценены по данным кинетики набухания криогелей, которая характеризует объем и скорость абсорбции того или иного растворителя. Как правило, чем быстрее криогель достигает равновесной степени насыщения растворителем, тем макропоры в большей мере взаимосвязаны [139]. Помимо несвязанной жидкости, которая может быть удалена под действием значительной механической нагрузки, стенки макропор губчатых криогелей и криоструктуратов содержат связанный (сольватный) растворитель. Гравиметрически может быть произведена оценка содержания связанной влаги, и эти данные характеризуют степень сшивки гелевой фазы в стенках макропор: чем выше степень набухания, тем, как правило, реже химическая сшивка гелевой фазы. Такой показатель, как величина выхода гель-фракции характеризует количество полимерного или мономерного предшественника, вошедшего в результате криотропного гелеобразования в состав гелевой сетки губчатого криогеля [98].

Ряд практических приложений предъявляет высокие требования к механическим свойствам криогелей. Среди методов, используемых для характеристики прочностных свойств криогелей, следует отметить такие стандартные для описания свойств полимерных материалов испытания, как одноосное растяжение или сжатие, испытание на усталость, в котором к материалу прикладывают периодическую нагрузку и определяют максимальное напряжение, которое криогель выдерживает при многократном нагружении [140]. Также распространено исследование реологических свойств гелевой фазы криогелей с оценкой величин модуля упругости и модуля механических потерь [141]. В зависимости от природы предшественников и параметров криотропного гелеобразования, таких как температурный режим, циклическое замораживание и оттаивание образцов и пр., могут быть получены либо сравнительно мягкие и нестабильные криогели, или же довольно жесткие материалы, прочность на сжатие которых может достигать нескольких мегаспакалей [12]. Для оценки фазовых характеристик гелевой фазы криогелей применяют метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), а также метод спектроскопии кругового дихроизма [24]. Методы ДСК и спектроскопии кругового дихроизма также применяются для оценки свойств композитных криогелей и криоструктуратов, полученных из комбинации различных предшественников, а также имеющих включения частиц другой фазы, например, содержащих нано-частицы серебра, графита или различных глин [20, 62]. Определение химического состава таких широко-

пористых композитов осуществляют с использованием инфракрасной спектроскопии и метода рентгеновской дифракции [2, 12].

Благодаря широкопористой морфологии, сообщающемуся характеру макропор, а также сравнительно простой методике получения, губчатые криогели подходят для решения ряда практических задач в медицине и биотехнологии. По этой причине в последние годы общей тенденцией стало исследование практически в каждой публикуемой работе биосовместимости криогелей. При этом наиболее часто оценивают такие параметры криогелей, как их способность адсорбировать белки, например, белки плазмы крови для целей дальнейшего *in vitro* культивирования различных клеточных культур [56], биосовместимость и нетоксичность полимерной матрицы [21, 51], а также оценивают биосовместимость криогелей *in vivo* [48]. Различные варианты исполнения последних двух методов испытаний служат для оценки адгезии и жизнеспособности клеток, культивируемых в тонком слое или в объеме криогелей, а также биodeградируемости таких широкопористых полимерных матриц под действием различных факторов, включая различные ферменты [46]. Оценка биосовместимости криогелей *in vivo* дает представление о наличии либо отсутствии у живого организма каких-либо нежелательных реакций на имплантирование данных материалов.

2.1.3. Применение криогелей для решения прикладных задач.

Одно из первых упоминаний практического применения криогелей относится к иммобилизации в макропористой матрице криогелей на основе ПВС клеток *Citrobacter intermedius* для продуцирования 3-фтор-L-тирозина [118]. Макропористые гелевые системы могут также служить в качестве подложек для иммобилизации бактерий [26], клеток [123] и их органелл [25], низкомолекулярных веществ, напр. хелатов [119], и наночастиц неорганической природы [120], а также ферментов и других белков [121] с получением в результате проточных биореакторов для продуцирования ценных веществ [123, 25, 30], либо селективных фильтров, например, для очистки крови от избытка альбумина [122].

Благодаря высокой пористости криогели способны абсорбировать различные вещества из жидкостей, что делает возможным их использование в экологической биотехнологии в качестве фильтров вредных отходов. Так, на примере нековалентных криогелей на основе ПВС, содержащих иммобилизованные клетки вида *Rhodococcal* [124], ли-

бо нано-частицы смешанных оксидов железа и алюминия [125], была продемонстрирована возможность использования таких криогелей для селективного удаления из окружающей среды (чаще из водной) токсичных веществ, таких как, например, полиароматические углеводороды [126], мышьяк [127], тяжелые металлы [128].

Макропористая морфология полимерных криогелей (в частности, на основе белков) делает очень перспективным их применение в качестве эффективных губчатых носителей иммобилизованных ферментов, клеток и микроорганизмов, в качестве подложек («scaffolds») для объемного культивирования клеток и дальнейшего применения таких материалов в тканевой инженерии [129, 130]. Также белковые криогели все чаще привлекают внимание исследователей в качестве полимерной основы-носителей лекарственных средств [21, 46].

Использование микропористых криогелей для вышеуказанных биомедицинских целей, как правило, предполагает обязательное обеспечение условия их биосовместимости с живым организмом. В этом отношении преимуществом материалов на основе биополимеров является изначально свойственная последним способность промотировать биологическое распознавание импланта клетками организма, а также возможность регулирования скорости их биodeградации, которая не сопровождается выделением в организм цитотоксичных продуктов [150]. В последнее время в качестве биополимерных предшественников часто используют белки. Ниже приводится обзор работ, посвященных синтезу и исследованию свойств криогелей на основе белков. В обзоре сделана попытка обобщения накопленного за несколько десятилетий опыта получения белковых криогелей с целью описания зависимости их свойств от типа используемых предшественников, способов и параметров процесса получения. Также обсуждаются области их практического применения.

2.2. Криогели на основе белков

Биополимеры, используемые в качестве высокомолекулярных предшественников криогелей, можно подразделить на две группы: белки и полисахариды. Белки, такие как, например, коллаген, фиброин шелка, кератин, фибронектин, альбумины, фибрин и т.д., представляют собой биологически активные макромолекулы, способные имитировать среду внеклеточного матрикса [112, 113]. В соответствии с простейшей структурной классификацией белки могут быть разделены на три группы:

- (1) - неупорядоченные (макромолекулы которых имеют конформацию «клубка»),
- (2) - фибриллярные и
- (3) - глобулярные.

2.2.1. Криогели и криоструктураты на основе фибриллярных белков.

Макромолекулы фибриллярных белков имеют вытянутую нитевидную конформацию и характеризуются высокоорганизованным регулярным взаиморасположением в пространстве отдельных участков полипептидных цепей. В живых организмах белки данного класса служат для формирования соединительных тканей, отличающихся сравнительно высокой механической прочностью и выполняющих опорную и защитную функцию [150]. Это обстоятельство предполагает использование фибриллярных белков в качестве предшественников для получения белковых криогелей, устойчивость к механическим нагрузкам которых сопоставима с материалами на основе синтетических высокомолекулярных соединений. Такие прочные и в то же время обладающие губчатой морфологией криогели на основе фибриллярных белков могут быть использованы в качестве, например, имплантов для регенерации или замены костной и хрящевой тканей [12, 46].

2.2.1.1. Криогели и криоструктураты на основе коллагена.

Среди прочих, в литературе описаны примеры криогелей на основе коллагена – фибриллярного белка, составляющего основу соединительной ткани в животных организмах. Известно о 28 типах коллагена, отличающихся молекулярной массой и аминокислотной последовательностью [137]. При получении криогелей на основе данного белка часто используют коллаген, выделенный из сухожилий или кожи различных животных, например, свиней, крупного рогатого скота (КРС) или рыб. В виду нерастворимости коллагена в воде криогели на его основе, как правило, получают из водных суспензий, содержащих микроволокна данного белка и растворенный кросс-агент. В качестве последнего в работе [19] использован диальдегид крахмала (ДАК), который добавляли в суспензии коллагена, с последующей криогенной обработкой полученной реакционной системы в течение 72 ч при -15°C . В результате сшивки тройных спиралей коллагена по первичным аминогруппам с помощью ДАК с образованием альдиминных связей белок встраивался в ковалентную пространственную гелевую сетку с тетраметиле-

новыми группировками в узлах такой сетки радикалами в качестве межспиральных групп-спейсеров (Рисунок 2).

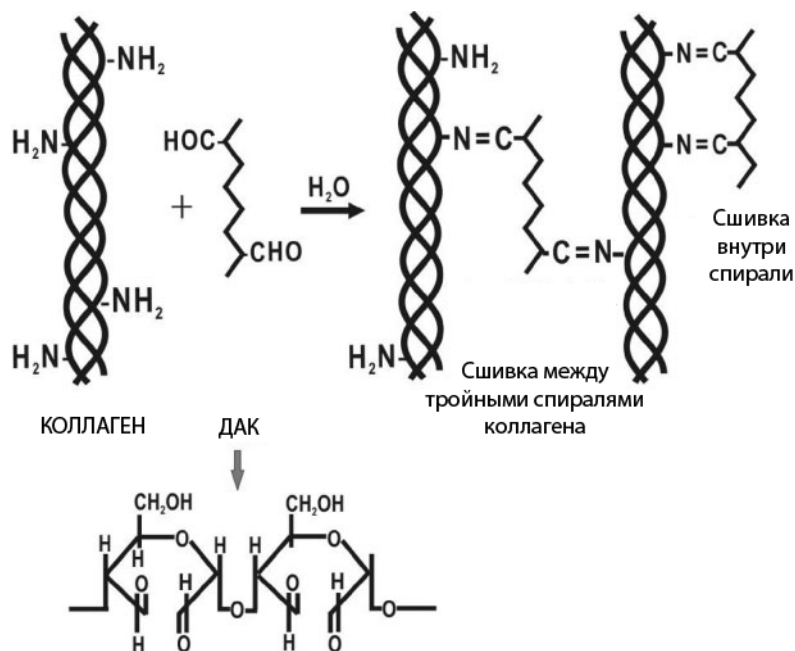


Рисунок 2. Схема взаимодействия микроспиралей коллагена и диальдегида крахмала (ДАК) [19].

Варьирование содержания сшивающего агента в исходном растворе в интервале от 0,002 до 0,1 % масс. приводило к некоторому ожидаемому снижению степени набухания формировавшихся криогелей, а также вызывало повышение температуры денатурации коллагена в составе полимерной матрицы на 10-15°C, что является следствием роста жесткости гелевой сетки таких криогелей за счет более частой сшивки. Также варьирование концентрации сшивателя позволяло контролировать оцениваемый *in vitro* гемолитический потенциал губчатых образцов, который выражается в количестве разрушаемых в присутствии данного материала кровяных телец. Авторами предложено использовать такие криогели в тканевой инженерии и в качестве материалов для повязок на раны.

Для аналогичных целей по схожей методике были получены коллагеновые криогели [22] с применением в качестве сшивающего агента диальдегида карбоксиметилцеллюлозы, полученного [66] окислением карбоксиметилцеллюлозы действием перйодата натрия в кислой среде (Рисунок 3). Поскольку данный кросс-агент имеет значительную молекулярную массу (вязкость 2%-ного раствора КМЦ ≥ 1200 мПа·с), замороженную при -20°C водную суспензию коллагена и диальдегида КМЦ инкубировали в таком со-

стоянии 5 суток. Повышение содержания кросс-агента в исходной системе от 0,001 до 0,01 мг/мл приводило, во-первых, к снижению равновесной степени набухания получаемых коллагеновых криогелей с 90 до 45 г воды/ г полимера, что авторы объясняли формированием более часто сшитой гелевой сетки, а также способствовало снижению скорости свертывания крови при испытаниях данных криогелей *in vitro*, что объяснялось авторами сокращением числа свободных NH_2 -групп в составе коллагена, влияющих на коагуляцию крови [114].

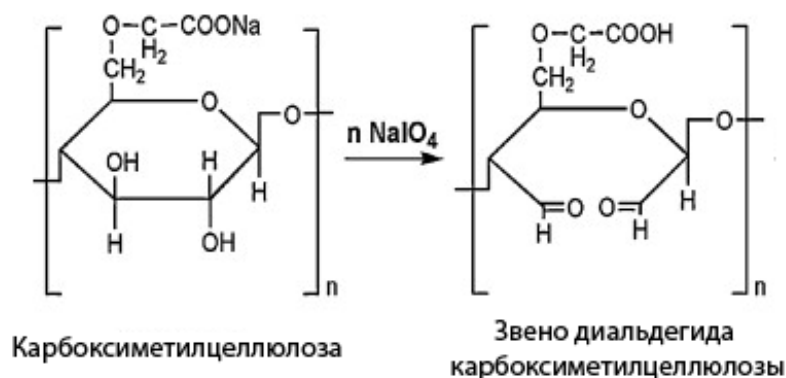


Рисунок 3. Реакция окисления карбоксиметилцеллюлозы под действием периодата натрия до диальдегида КМЦ [66].

Для придания белковым криогелям прочностных, антибактериальных и других специфических свойств в исходную реакцию систему часто вводят дополнительные компоненты, такие как высокомолекулярные соединения или твердые частицы, например, нано-частицы минерала гидроксиапатита, способствующего росту костной ткани и который используют в композитных материалах в качестве армирующей добавки [149]. В работе [20] описано получение ковалентно сшитых коллагеновых криогелей с улучшенными прочностными характеристиками для регенерации поврежденной костной ткани, содержащих частицы такого наполнителя. В данном исследовании в качестве реакционной системы была использована водная суспензия белка и минеральных частиц, в которую перед замораживанием (-18°C) и инкубированием вносили 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (ЭДК) в смеси с N-гидроксисукцинимидом. Особенность сшивающих агентов карбодиимидного типа, наиболее часто используемым примером которых является ЭДК, заключается в том, что данное соединение участвует в образовании амидной связи между боковыми карбоксильными и аминогруппами биополимерных предшественников (Рисунок 22), при этом не встраиваясь в формирующуюся гелевую сетку, стабилизированную «сшивками нулевой длины», т.е. когда ковалентная

сшивки не содержит остатка сшивателя [166, 168]. Средний диаметр пор и степень разброса пор по величине диаметра таких композитных криогелей уменьшались с ростом содержания наполнителя [20]. Также повышение содержания наполнителя в данных коллагеновых криогелях приводило к многократному росту модуля упругости получаемого материала от 12 до 43 ГПа, а также к снижению степени их набухания с 58 до 18 г воды/г полимера. Данная тенденция часто наблюдается для наполненных криогелей [67]. Испытания *in vitro* полученных композиционных материалов показали их биосовместимость с клетками остеобластов.

В статье [3] описан более сложный с точки зрения методики синтеза пример получения биоразлагаемых коллагеновых криоструктуратов для целей регенеративной медицины путем сшивки белка с помощью ЭДК. На начальном этапе систему «вода + растворенный альгинат-Na + микроволокна коллагена» замораживали при -20°C и высушивали лиофильно, после чего погружали полученный пористый лиофилизат в раствор ЭДК в буферном растворе (рН 5,5). Затем в данную систему лиофилизат/кросс-агент добавляли различные по молекулярному весу хитоолигосахариды с целью дополнительной модификации стенок макропор образующегося криоструктурата. Увеличение молекулярной массы привитых хитоолигосахаридов, использованных для улучшения биосовместимости и антибактериальных свойств [69] коллагеновых криоструктуратов, от 1 до 10 кДа приводило к уменьшению среднего диаметра макропор от 250 до 150 мкм, а также к росту модуля Юнга конечных губчатых гелей от 2,5 до 11,3 МПа. Сравнительный анализ характеристик данных коллагеновых криоструктуратов и коллагеновых криогелей, ковалентно сшитых с помощью ЭДК [20], показывает, что последние обладают меньшим средним диаметром макропор и гораздо большей равновесной степенью набухания в воде (17-52 против 4,7-6,7 г H_2O /г полимера).

Лиофилизация замороженных водных систем, содержащих биополимерные предшественники (в частности коллаген), приводит к удалению из двухфазной системы поликристаллов замерзшего растворителя (чаще, воды), в то время как белковые компоненты исходной системы формируют стенки макропор образующегося пористого белкового лиофилизата. Данный прием используется в практике получения широкопористых гелевых систем на белковой основе, причем данный процесс может дополнительно включать стадию стабилизации образованной широкопористой архитектуры с помощью сшивки биополимерного предшественника как ковалентно, например, под действием

сшивающих агентов в среде нерастворителя белка, либо нековалентно с помощью внешнего воздействия, приводящего к дополнительной структуризации белка в стенках макропор его лиофилизата. Иными словами, при криотропном гелеобразовании формирование узлов пространственной гелевой сетки криогелей протекает в процессе замораживания, а в случае криоструктуратов – после кригенной обработки. Вполне логично, что в практике применяется еще и третий вариант получения криоструктурированных гелевых систем, при котором на начальном этапе в реакционной системе проводят гелеобразование с формированием узлов пространственной гелевой сетки (ковалентных или нековалентных), а затем полученный гель подвергают криоструктурированию замораживанием и лиофильным высушиванием. В Таблице 1 приведена классификация всех таких широкопористых криотропных гелевых систем.

Таблица 1. Классификация гетерофазных криоструктурированных белковых гелевых систем по способу их получения.

Тип гелевой системы	Стадия формирования узлов пространственной гелевой сетки	Способ удаления растворителя / Ссылки
Криогели	В процессе проведения криогенной обработки исходной белковой системы при заданной отрицательной температуре	лиофилизация [46]
Криоструктураты 1-го типа	После проведения криогенной обработки исходной белковой системы	лиофилизация [45] криоэкстракция [65]
Криоструктураты 2-го типа	До проведения криогенной обработки исходной белковой системы	лиофилизация [58]

В случае криоструктуратов 1-го типа на стадии ковалентной сшивки пористого лиофилизата в среде нерастворителя биополимера могут использоваться любые подходящие кросс-агенты, не реагирующие с растворителем. Так, недавно [45] в качестве сшивающего агента использован проантоцианидин в фосфатном буфере (pH 6,8, 30% C₂H₅OH), которым обрабатывали лиофилизаты коллагена, полученные замораживанием при -20 - -60°C и последующей сублимационной сушкой водных суспензий рекомби-

нантного коллагена человека и хитозана в 0,12-молярной уксусной кислоте. Проантоцианидин относится к группе природных веществ-флавоноидов [132], и его структура включает о-катехольные группы (Рисунок 4: а), которые способны образовывать прочные водородные связи с атомами кислорода амидных связей в составе полипептидных цепей коллагена, что в результате приводит к их межцепной сшивке (Рисунок 4: б) [133]. Средний диаметр пор губчатых нерастворимых в воде коллагеновых криоструктуратов, полученных в результате такой обработки лиофилизата смеси белок / полисахарид, лежал в интервале 104-122 мкм и был тем меньше, чем ниже была температура замораживания исходной смеси биополимерных предшественников.

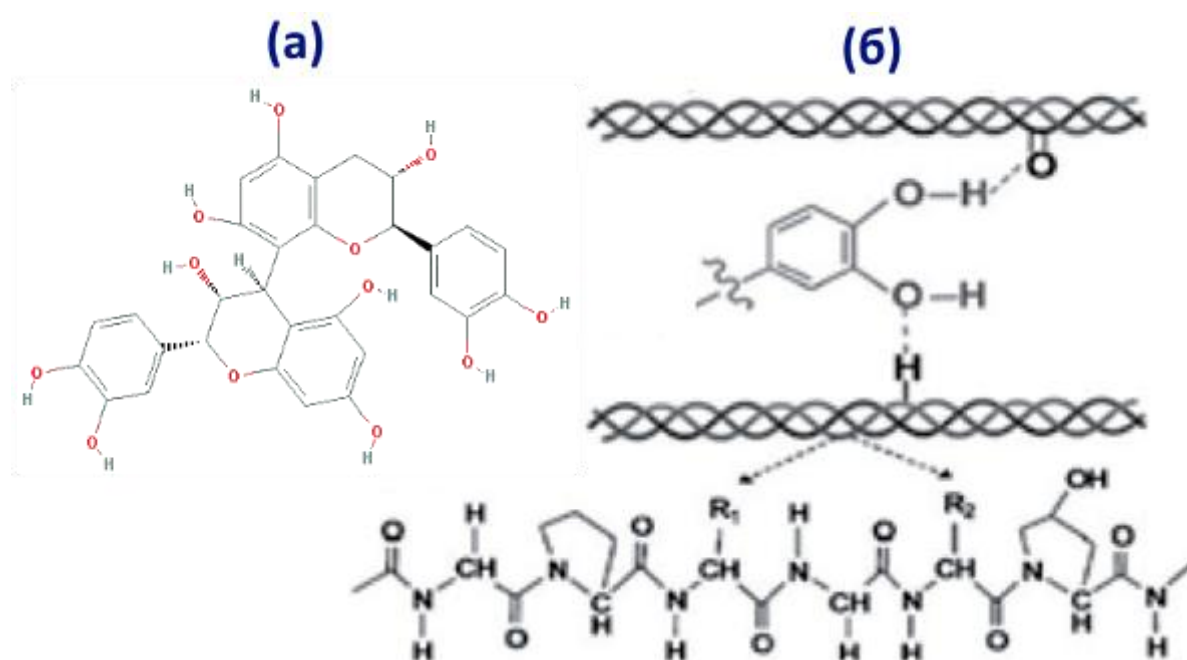


Рисунок 4. (а) Структура проантоцианидина и (б) образование узлов пространственной сетки коллагеновых нековалентных криоструктуратов с участием данного агента [A68].

Более подробно влияние режимов криогенной обработки суспензий коллагена на свойства получаемых в результате их дальнейшей лиофилизации широкопористых криоструктуратов рассмотрено в работе [43]. Авторы исследовали влияние геометрии пластиковой формы, использованной для градиентного замораживания суспензий коллагена при -30°C (другими словами, с охлаждающей пластиной криостата контактировал только один торец цилиндрической формы, в которую вносили исходную систему), и пришли к выводу, что увеличение площади поверхностного контакта цилиндра с охлаждающей пластиной приводит к формированию пористой структуры, менее гомогенной в

отношении диаметра и формы макропор. Также было обнаружено, что диаметр пор коллагеновых криоструктуратов был тем больше, чем продолжительнее была стадия инкубирования образцов в замороженном состоянии, а также наблюдалась анизотропия пор по размерам в зависимости от высоты образца: диаметр макропор в объеме криоструктурата увеличивался по мере отдаления от точки контакта исходной системы с охлаждающей пластиной. Последнее часто наблюдается для криогелей, полученных градиентным замораживанием исходных систем [33, 43].

2.2.1.2. Криогели и криоструктураты на основе фиброина шелка

Фиброин шелка (ФС) является другим фибриллярным белком, часто используемым в качестве биополимерного предшественника для получения криогелей и криоструктуратов в виду его биосовместимости, повышенных прочностных свойств, простоты в эксплуатации и регулируемых биоразлагаемых качеств. Чистый фиброин получают из шелка, продуцируемого различными насекомыми, и по причине большей производительности и лучшего качества материала наиболее часто для этой цели используют шелк, вырабатываемый шелковичными червями, в особенности, тутовым шелкопрядом (*Bombix mori*). Дегуммированием шелка (например, кипячением шелка в щелочной среде [70, 71]) производят фиброин, не содержащий серицина – еще одного белкового компонента шелка [72]. Фиброин является олигомерным белком, макромолекулы которого состоят из тяжелой и легкой полипептидных цепей, соединенных дисульфидным мостом и также нековалентно связанных с гликопротеином P25 (25 кДа), который, как полагают, выполняет роль стабилизатора данного полипептидного ансамбля [73, 74]. Макромолекула фиброина обладает вытянутой конформацией, состоящей из повторяющихся гидрофобных нанокристаллитов, образованных β -складками, и гидрофильных аморфных блоков в конформации «клубка», образованных объемистыми полярными боковыми цепями. Гидрофобные домены придают белку механическую прочность, в то время как гидрофильные области обуславливают сродство белка к воде и его высокоэластические характеристики. При этом свойства белка определяются точным контролем размера, числа, ориентации и взаимного расположения гидрофобных и гидрофильных доменов [75, 76]. Фиброин, выделяемый тутовым шелкопрядом, обладает наибольшей прочностью, что наряду с его биосовместимостью и биodeградируемостью делает данный белок перспективным материалом для изготовления на его основе различных

изделий биомедицинского назначения [145]. В частности, на основе фиброина шелка созданы губчатые криогели и криоструктураты, опробованные в качестве материалов для тканевой инженерии [65, 146].

Среди способов получения широкопористых структуратов на основе фиброина шелка можно выделить такие методы, как встраивание частиц порогена, которые могут быть удалены из материала после завершения гелеобразования с помощью соответствующего растворителя [77, 78, 79], вспенивание [65], а также, как и в случае с коллагеновыми криоструктуратами, формирование пористостой структуры лиофильной сушкой замороженной суспензии или раствора белка. В целях создания нерастворимых в воде криоструктуратов широкопористые лиофилизаты фиброина дополнительно подвергают фиксации как с помощью физического воздействия, приводящего к изменению конформации белка, так и ковалентной сшивкой фиброина сшивающими агентами в среде нерастворителя белка [78]. Например, известно, что воздействие на фиброин полярных растворителей, таких как низкомолекулярные спирты, приводит к кристаллизации аморфных доменов макромолекул данного белка через образование β -складок [65]. Замораживанием при -20°C в течение 12 часов и лиофилизацией водных растворов фиброина (4-12% масс.) и последующим инкубированием полученных структуратов в Me-OH в течение 1 ч получены [23] фиброиновые криоструктураты, средний размер пор которых составлял 150 ± 40 мкм - 81 ± 61 мкм, при этом поры были тем меньше, чем выше начальная концентрация ФШ. Примерно в том же диапазоне был диаметр пор фиброиновых криоструктуратов, полученных в работе [64]. Тенденция к некоторому уменьшению диаметра пор и сопутствующему снижению пористости таких губчатых криоструктуратов при повышении концентрации белка в замораживаемой системе подтверждено исследованием [63], в котором водные растворы ФШ (1-5% масс.) замораживали при -80°C и лиофилизировали, после чего полученные лиофилизаты обрабатывали 70%-ным этанолом; диаметр пор формировавшихся при этом нерастворимых в воде криоструктуратов находился (в зависимости от содержания белка в начальной системе) в диапазоне 80 мкм - 300 мкм, а пористость – в интервале 94-71%. Авторы связывают такую тенденцию с утолщением стенок пор в результате концентрирования исходных растворов. При такой же температуре замораживания (-80°C) и также с помощью обработки фиброина спиртом получены и охарактеризованы криоструктураты, диаметр пор которых составлял уже всего ~ 20 мкм [65]. Вероятной причиной столь значительной разницы в диамет-

ре пор криоструктуратов, полученных при почти идентичных условиях обработки белка [63, 65], может являться тип исходной замораживаемой системы: в случае последнего исследования замораживали вязкую пасту фиброина, полученную добавлением 25 об.% этанола к 6%-ному раствору белка. Когда данную коллоидную систему замораживали при -20°C , то это позволяло формировать фиброиновые криоструктураты с диаметром пор более 60 мкм. Такой результат подтверждает общую тенденцию, свойственную для полимерных криогелей [98, 143], которая также наблюдалась и для коллагеновых криоструктуратов [45, 43]: при более низкой отрицательной температуре криогенной обработки формируются криогели и криоструктураты с меньшим диаметром макропор.

Известны также примеры нековалентных ФШ-криогелей, получаемых криотропным гелеобразованием. В работе [62] применялась ультразвуковая обработка (продолжительностью ~ 30 с) для инициирования гелеобразования фиброина в водном растворе (4,5% масс.), который затем замораживали и инкубировали при -20°C в течение 24 ч. Полученные после оттаивания упругие губчатые образцы обладали модулем Юнга порядка 140 кПа и имели средний диаметр пор ~ 150 мкм. Внесение в гелеобразующую систему 1 или 5% масс. частиц костного угля (38 мкм) приводило к уменьшению диаметра пор в получаемых ФШ-криогелях до ~ 130 и ~ 100 мкм, соответственно.

В том же диапазоне находится диаметр пор химически сшитых криогелей на основе ФШ. Так, в работе [12] получены криогели путем замораживания при -18°C в течение 24 ч водных растворов с концентрацией ФШ 5, 12 и 18% масс., содержавших добавку диэпоксидного сшивающего агента – диглицидилового эфира этиленгликоля (ЭГДЕ) и N,N,N',N'-тетраметиленамина (ТМЭД) в качестве основания. С ростом [ЭГДЭ] от 10 до 30 ммоль эпокси-групп / г ФШ диаметр пор губчатых ковалентных ФШ-криогелей снижался с ~ 60 до ~ 24 мкм. К уменьшению размера пор (от ~ 40 до ~ 13 мкм) приводило также повышение [ФШ] в интервале 4,2-12,6% масс., а также снижение температуры замораживания исходной системы от -5 до -22°C . Схожим образом зависел размер пор ранее описанных коллагеновых и фиброиновых криогелей и криоструктуратов [43, 45, 63, 65]. Рассматриваемые ФШ-криогели характеризовались высокой упругостью, и модуль на сжатие составлял до 48 МПа (при наибольшей концентрации белка в исходном растворе), что значительно превышает показатели (от 0,01 до 0,5 МПа) ФШ-криоструктуратов, сформированных через лиофилизацию и обработку фиброина спиртом [23, 38, 62, 64].

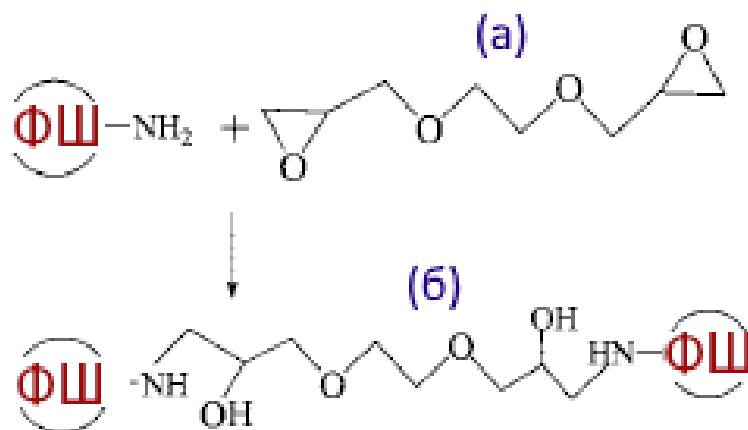


Рисунок 5. Реакция диглицидилового эфира этиленгликоля (а) с боковыми первичными аминогруппами в составе макромолекул фиброина шелка (ФС) с образованием межмолекулярных сшивок (б).

При синтезе ковалентно сшитых криогелей и криоструктуратов на основе белков отдают предпочтение нетоксичным сшивающим агентам, желательно, природного происхождения [22, 45]. В работе [46] был использован другой природный кросс-агент - дженипин (Рисунок 6; метил-(1R,2R,6S)-2-гидрокси-9-(гидроксиметил)-3-оксабицикло-[4.3.0]нона-4,8-диен-5-карбоксилат), выделяемый из плодов *Gardenia jasminoides Ellis* [81]. Сухой кросс-агент добавляли к раствору ФС и после растворения полученную смесь замораживали при -20°C в течение 48 ч, после чего лиофилизировали. Ведутся дискуссии относительно предполагаемого механизма реакции дженипина с первичными аминогруппами (био)полимерного предшественника, однако часто в литературе упоминают смешанный механизм реакции сшивки, в результате которой узлы, стабилизирующие пространственную гелевую сетку, включают один либо два сопряженных фрагмента исходной молекулы дженипина [144].

Испытания таких ковалентно сшитых ФС-криогелей на биodeградируемость показали, что образец теряет от 25 до 35% веса при инкубировании в течение 21 дня в растворе панкреатической эластазы или экссудата раны, соответственно, что существенно медленнее разложения *in vitro* нековалентных ФС-криоструктуратов, теряющих до 80% веса в течение суток при инкубировании в 5-микромольном растворе протеазы (pH 8 в обоих случаях) [38]. При этом степень набухания ФС-криогелей, сшитых с помощью дженипина, составляет порядка 30 г воды/г полимера, что сопоставимо с ФС-криогелями, сшитыми с помощью диэпоксида [12], и в 10 раз превышает степень набухания

нековалентного криогеля, полученного криогенной обработкой белковой системы, предварительно подвергнутой действию ультразвука [62].

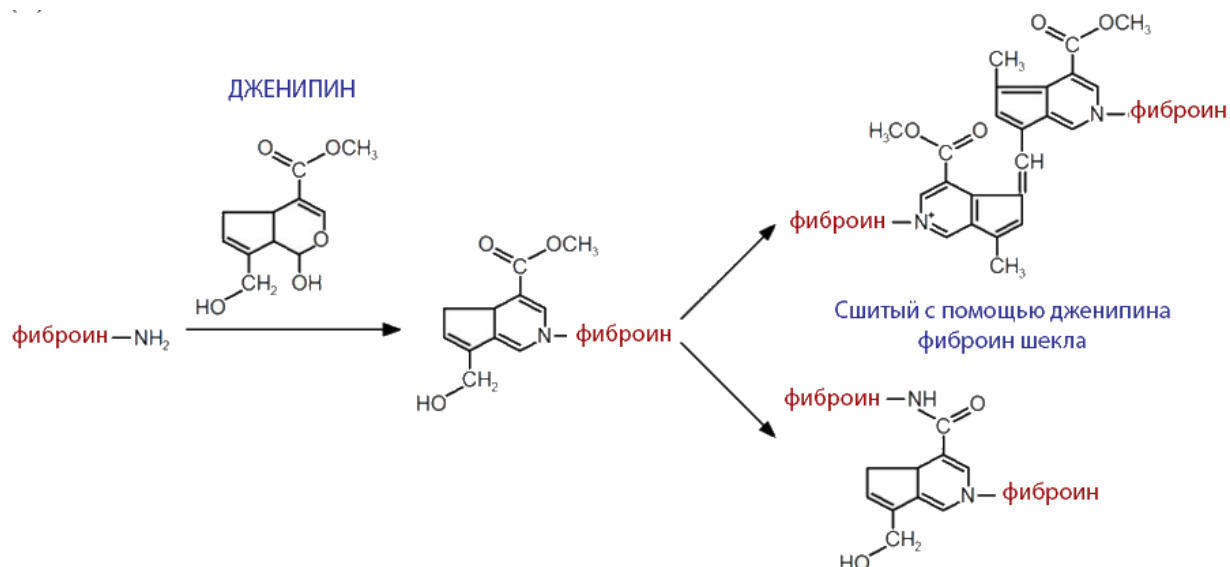


Рисунок 6. Структурная формула дженипина и предполагаемые пути его взаимодействия с макромолекулами фиброина с образованием пространственной гелевой сетки. [46]

Криогели и криоструктураты на основе фиброина по своим прочностным свойствам сравнимы с хрящевой тканью [12,65], а также являются биоразлагаемыми, что позволило применить их в тканевой инженерии в качестве матриц для регенерации костной и мягких тканей. Известны примеры использования фиброиновых криоструктуратов и криогелей в качестве пористых подложек для культивирования стромальных клеток костного мозга (МСК) [63], хондроцитов [64], фибробластов кожи [46], амниотических мультипотентных стволовых клеток [38]. Во всех случаях клетки хорошо прикреплялись к стенкам широкопористых белковых материалов и пролиферировали. Успешно проведен опыт по трансплантации фиброинового физического криоструктурата [63], который был засеян предварительно дифференцированными МСК, в область дефекта черепной ткани иммунодефицитной мыши. В результате испытаний *in vivo* было показано, что такой белковый препарат является полностью биосовместимым как с культивируемыми клетками, так и с организмом животного, и пересаживаемые дифференцированные клетки участвовали в процессе остеогенеза. Фиброиновые криогели, ковалентно сшитые с помощью дженипина, были нагружены антибактериальным препаратом гентамицином, и успешные результаты *in vitro* и *in vivo* биотестирования таких препаратов позво-

лили предположить высокий потенциал фиброиновых криогелей в качестве повязок на раны [46].

2.2.1.3. Криогели и криоструктураты, полученные с использованием других фибриллярных белков.

Известны примеры белковых криогелей, полученных на основе реакционных систем, содержащих добавки других фибриллярных белков, таких как ламинин [18], кератин [41] и эластин [46]. Последний был использован в комбинации с уже известным фиброином шелка для получения губчатых криогелей, сшитых с помощью дженипина. Повышение содержания эластина в исходной системе с 1 до 2% масс. приводило к повышению пористости формируемых композиционных криогелей от 85 до 95%, а также к некоторому повышению степени набухания и значительному росту скорости биоразложения под действием панкреатической эластазы или экссудата раны, а также к росту скорости размножения фибробластов в объеме белковых губок.

Ламинин – фибриллярный белок с молекулярной массой около 400 кДа, входящий в состав внеклеточного матрикса. В работе [18] были получены ковалентные белковые криогели из водных растворов смеси желатина и ламинина (4,4 и 0,01% масс., соответственно). В данный раствор добавляли в качестве кросс-агента глутаровый альдегид (ГА, Рисунок 7; конечная концентрация в растворе 0,01, 0,03 и 0,05% масс.), затем замораживали и инкубировали в течение 8 ч при -12°C . Средний диаметр пор полученных после оттаивания криогелей был от 80 до 120 мкм, а их степень набухания – ~ 30 г H_2O /г полимера. Данные содержавшие ламинин губки растворялись в 0,025%-ном растворе трипсина в течении 8 часов, а криогели, полученные из растворов с концентрацией ГА 0,01% масс. – уже через 10-15 минут.

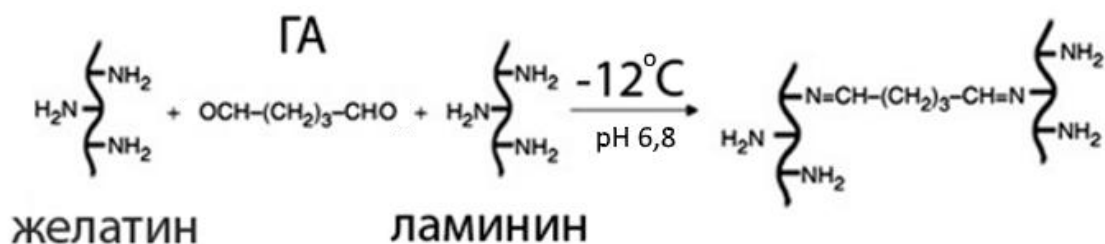


Рисунок 7. Схема реакции межмолекулярной сшивки макромолекул ламинина с помощью глутарового альдегида, использованной при формировании широкопористых двухкомпонентных желатиновых криогелей [18].

Включение ламинина в гелевую сетку белковых криогелей позволило успешно использовать такие материалы в тканевой инженерии в качестве подложек для культивирования мультипотентных стволовых клеток, их дальнейшей дифференцировки до нейробластов. Губчатый белковый препарат, содержащий нейробласты, был успешно имплантирован в поврежденную ткань головного мозга животных.

Еще один нековалентный губчатый белковый криоструктурат для целей тканевой инженерии был получен [41] при использовании в качестве гелеобразующих систем водных растворов «желатин + денатурированный кератин» (массовое соотношение белков 1 : 2) и «хитозан + денатурированный кератин» (массовое соотношение белков 1 : 2) в 30%-ной уксусной кислоте. Денатурированный (восстановленный) кератин получали обработкой исходного сырья (рога КРС) концентрированным водным раствором денатурантов (мочевина, додецилсульфат Na, меркаптоэтанол). Криоструктураты, сформированные в результате замораживания исходных растворов при -80°C и их последующей лиофильной сушки, сочетали макропористую морфологию (средний диаметр пор 80-100 мкм) со значительной механической прочностью (максимальное усилие при разрыве стержнеобразного образца составляло 1,7 МПа) и сравнительно невысокой степенью набухания (около 8 г воды/г полимера). Термически устойчивые и нерастворимые в воде хитозан/кератиновые криоструктураты были успешно использованы в качестве подложки для 3-мерного культивирования фибробластов, что продемонстрировало их цитосовместимость и нетоксичность.

2.2.2. Криогели и криоструктураты на основе желатина.

Желатин представляет собой смесь полипептидов в конформации «клубка», получаемых в результате частичного кислотного (так называемый «Gelatin Type A») или щелочного гидролиза («Gelatin Type B») коллагена, полученного из различных источников. Первичная структура данного белка близка к структуре коллагена, являющегося источником желатина. В отличие от коллагена, желатин, макромолекулы которого не обладают упорядоченной структурой, растворим в воде, что делает удобным приготовление на основе данного биополимера начальных гелеобразующих систем для формирования белковых криогелей, либо криоструктуратов. Вероятно, по этой причине в литературе наибольшее число упоминаний о биосовместимых криогелях и криоструктуратах на белко-

вой основе для широкого круга практических приложений относится к материалам на основе желатина.

На практике реализовано множество вариантов исходных реакционных систем, содержащих, помимо желатина, разнообразные добавки, сшивающие агенты и другие протеины, а также различные способы криогенной обработки таких систем. В результате были сформированы желатиновые криогели с широким спектром свойств, позволявшим использовать эти материалы для различных биомедицинских целей. Традиционно, гелевые системы на основе желатина синтезировали с использованием в качестве сшивающего агента глутарового ангидрида (Рисунок 7). Одними из первых были получены сшитые с помощью ГА широкопористые криогели в виде мембран толщиной 1-мм из раствора желатина (4% масс.), содержавшего взвешенные хроматофоры бактерий *Rhodopseudomonas capsulata* [29]. В результате криотропного гелеобразования при -20°C данные клеточные органеллы были включены в гелевую сетку желатиновых криогелей. Данные белковые матрицы с диаметром пор от 10 до 50 мкм были применены в качестве проточных биореакторов для эффективного фотосинтеза аденозин трифосфата. Позже сшитые с помощью ГА желатиновые криогели применяли почти исключительно в качестве матриц для 3-мерного культивирования клеток, и использовали такие клеточные препараты для регенерации мягких тканей. Так, криогенной обработкой при -12°C 4%-ного раствора желатины и 1% моль (по отношению к аминогруппам белка) ГА были получены губчатые криогели, в гелевую сетку которых белок встраивался с эффективностью 79%, а степень набухания которых составляла 33 г H_2O /г полимера [11]. Несмотря на сравнительно невысокую прочность (до 1 кПа), сформированные материалы успешно использованы в качестве подложки для культивирования фибробластов и миобластов, и была показана высокая скорость размножения этих клеток в объеме желатиновых криогелей. Схожим образом изготовлены желатиновые криогели, также примененные для культивирования фибробластов и первичных кератиноцитов человека [47]. На поверхности полученных губчатых образцов *in vitro* был сформирован сплошной слой эпителия, и было показано, что фибробласты беспрепятственно мигрируют вглубь пористой структуры таких подложек. Доклинические испытания на свиньях показали нетоксичность и биосовместимость желатиновых криогелей с живыми организмами. Гораздо большим модулем на сжатие порядка 50 кПа обладали желатиновые криогели, сформированные криогенной обработкой при -12°C реакционного раствора, содержавшего по-

мимо 3,2% масс. желатина, 0,8% масс. хитозана (150 кДа) и 4,5-5,5% масс. хондроитинсульфата [52] - гликозаминогликана, входящего в состав соединительных тканей, костей и хрящей и способствующего пролиферации и миграции хондроцитов [134]. Данные криогели имели степень набухания порядка 10 г воды/г полимера, систему взаимосвязанных пор диаметром 40-135 мкм, и вода с высокой скоростью (порядка 600 мл/ч) протекала через цилиндрический блок такого криогеля. Скорость высвобождения хондроитинсульфата в испытательной среде (фосфатный буфер, pH 7,4) была около 90% за 42 дня. Данные криогели с иммобилизованным хондроитинсульфатом были использованы для культивирования хондроцитов крупного рогатого скота. Эффект повышения прочности желатиновых криогелей в результате добавки в исходную композицию хитозана, который также способствует адгезии и пролиферации клеток [149], был использован при получении имплантов для восстановления хрящевых тканей [48]. Плоские образцы губчатых криогелей, изготовленных обработкой при -12°C водной смеси желатин-хитозан-агароза-ГА (1, 1, 3 и 0,01% масс., соответственно), были стерилизованы и имплантированы в место дефекта хрящевой ткани в коленном суставе кролика. Данные гистологии показали восстановление хрящевой ткани животных уже после 4 недель и отсутствие в районе раны каких-либо воспалительных реакций.

Аналогично криогелям на основе коллагена [19, 20] и фиброина шелка [62], для криогелей на основе желатина характерен меньший диаметр макропор, если исходная система являлась двухфазной, напр. суспензией тех же нано-частиц гидроксиапатита в водном растворе желатина, хитозана и ГА, использованной в работе [39]. Увеличение доли содержания в исходной суспензии нано-частиц с 30 до 65% масс. в расчете на сухой вес исходных компонентов приводило к уменьшению среднего диаметра пор получаемых композитных криогелей приблизительно с 70 до 40 мкм, а также обуславливало некоторое снижение пористости с 73 до 66% и ожидаемому росту прочности на сжатие от 2,6 до 3,5 МПа.

Влияние концентрации глутарового альдегида и желатина в исходном водном реакционном растворе на свойства формируемых белковых криогелей изучено в работе [33], в которой проведено *in vitro* и *in vivo* биотестирование таких материалов в качестве имплантов для заживления дефектов хрящевой ткани. Раствор, содержащий 1-5% желатина и 0,1-0,9% масс. ГА, вносили в стеклянные трубки высотой 50 и диаметром 20 мм, которые, в свою очередь устанавливали торцом на охлажденной с помощью кипя-

щего жидкого азота стальной плите и замораживали образец в направлении «от дна к верху», и далее замороженный цилиндрический препарат лиофилизировали. С повышением концентрации белка в исходном растворе характер пористой микроструктуры полученных криогелей изменялся от вытянутой стержневидной до практически идеальной сферической, а диаметр пор и степень пористости снижались от 200 до 40 мкм и от 99 до 95%, соответственно. Выше уже отмечалась схожая зависимость диаметра пор белковых криогелей и криосруктуратов от исходной концентрации фиброина шелка [23, 62, 12]. В меньшей степени к уменьшению пор и степени пористости желатиновых криогелей приводило повышение начальной концентрации ГА. Рост начальной концентрации либо белка, либо кросс-агента также был причиной значительного (в случае белка) снижения степени набухания формируемых криогелей с 25 до 5 г H_2O /г полимера ([ГА]=0,01% масс.) и с 12 до 10 г H_2O /г полимера ([желатин]=3% масс.), соответственно. Также в результате повышения концентрации кросс-агента в гелеобразующей системе росла прочность на сжатие получаемых материалов от 25 до 225 кПа, что в среднем в 4 раза больше прочности тех же материалов при сжатии в поперечном направлении.

Известны примеры синтеза ковалентных желатиновых криогелей, где межмолекулярную сшивку желатина с помощью ГА сочетали с процессами радикальной полимеризации мономеров, присутствующих в реакционной системе совместно с белком. Таким способом получали широкопористые криогели из водного раствора, содержащего желатин (выделенный из кожи рыбы; 60 кДа), альгинат, 2-гидроксиметилметакрилат (ГЕМА) и полиэтиленгликольдиакрилат (ПЭГДА) [55], и позже – из водного раствора желатина, N-изопропилакриламида, N,N'-метиленбисакриламида (0,9, 4 и 1,5% масс., соответственно) [61]. Реакцию межмолекулярной сшивки желатина в данных растворах инициировали введением 0,125% масс. ГА, а протекавшую параллельно с этим 3-мерную полимеризацию производных акриловой кислоты – введением системы персульфат аммония / ТЕМЕД, после чего образцы замораживали и инкубировали при -12°C в течение 24 ч. Несмотря на различные исходные компоненты, полученные губчатые криогели обладали практически идентичными свойствами: их степень набухания составляла от 8,6 до 10 г H_2O /г полимера, диаметр пор был в интервале 25 - 133 мкм, скорость протока воды – в интервале 420 - 480 мл/ч. В первом случае криогели обладали модулем на сжатие порядка 3 МПа и скоростью биоразложения в стерильных условиях около 60% за 8 недель, что в 4 раза быстрее, чем в случае ковалентных желатин-

хитозановых криогелей [52]. Данные образцы были успешно испытаны *in vitro* в качестве подложек для культивирования эпителиальных клеток легких человека, а также успешно испытаны *in vivo* на мышах. Желатиновые препараты, сформированные во втором случае, были успешно опробованы в качестве матриц для культивирования клеток печени человека *Her G2*, на основании чего был сделан вывод о возможности дальнейшего использования таких криогелей в качестве полимерной основы имплантов для регенерации повреждений печени.

Традиционно желатин является удобным объектом для химической модификации и функционализации с целью изготовления на его основе биосовместимых материалов со специфическими свойствами. Наряду с прививкой к желатину различных нановолокон (например, поликапролактоновых [83]), макромолекул других белков [86] либо полисахаридов [87], известны примеры химической модификации данного белка ненасыщенными соединениями акрилового ряда и дальнейшей радикальной криополимеризации таких «желатинизированных» мономеров, приводящей к синтезу белковых криогелей. Таким методом были получены криогели на основе модифицированного N-метакриламидом желатина, когда полученный высокомолекулярный «мономер» (Рисунок 8) полимеризовали в первом случае [8] при -12°C с использованием в качестве инициатора ПСА в присутствии ТЕМЕДа, и во втором случае при -30°C , инициируя процесс с помощью УФ-излучением в присутствии коммерческого фотоинициатора Irgacure, с последующей лиофилизацией замороженного образца [35].

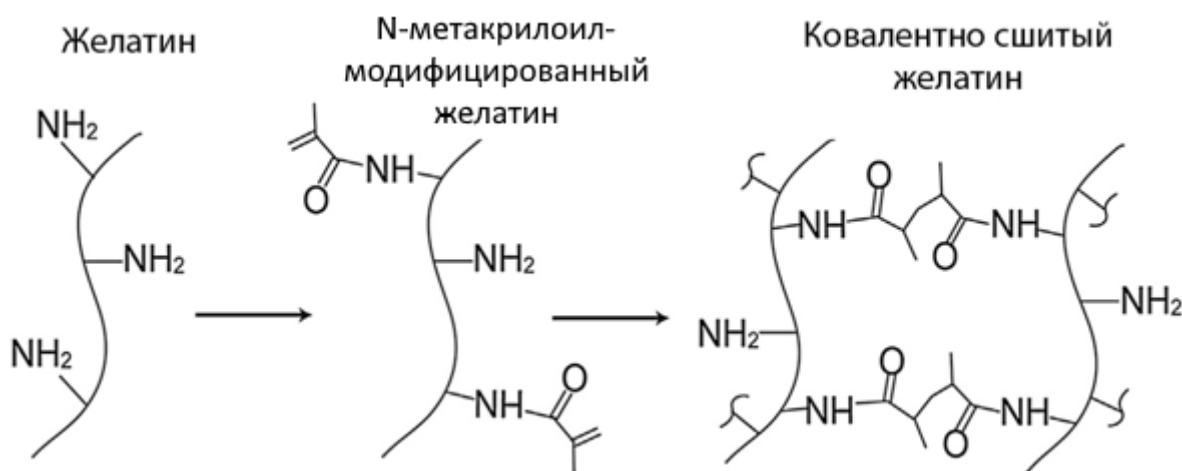


Рисунок 8. Общая схема синтеза желатинового криогеля путем радикальной полимеризации метакрилового производного желатина [8].

Криогели, синтезированные при -30°C , обладали диаметром пор не более 130 мкм, и больше 250 мкм – когда синтез вели при -12°C , т.е. наблюдалась известная для полимерных криогелей тенденция к уменьшению диаметра пор с понижением температуры криогенной обработки. Была продемонстрирована совместимость таких полимеризационных желатиновых криогелей с фибробластами человека; такие материалы были успешно имплантированы мышам [35].

В работе [50] исследовано влияние на свойства двухкомпонентных желатиновых криогелей типа использованного при синтезе кросс-агента. Криогели были получены замораживанием и инкубированием в течение 16 ч при -12°C водных растворов желатина (4% масс.) и полиэтиленгликоля (1,5% масс., молекулярная масса 2000 и 6000) с добавкой 0,1% ГА, либо 0,1% масс. ЭДК. В Таблице 2 приводится описание таких желатиновых криогелей, величины выхода гель-фракции, степени набухания, диаметра пор и пористости, модуля на сжатие и скорости биоразложения:

Для полученных материалов была характерна скорость протока порядка 120-240 мл/ч и диаметр пор в интервале 60-100 мкм независимо от типа кросс-агента. Из приведенных данных видно, что при прочих равных условиях использование сшивки «нулевой длины» позволяет получать криогели, обладающие повышенной жесткостью гелевой сетки, сочетаемой с высокой степенью набухания, хотя сшивка протекает несколько более эффективно с использованием диальдегида.

Таблица 2. Характеристики ковалентных желатиновых криогелей в зависимости от типа кросс-агента, использованного при их формировании [50].

Тип кросс-агента	Выход, %	Степень набухания	Пористость, %	Е, МПа	Скорость разложения (%/неделя) *
ГА	98,2	3,2	81	3,4	7
ЭДК	96,4	12	82	16,9	5

* (инкубирование при 25°C в течение 4 недель в асептических условиях, фосфатный буфер pH 7,4)

В работе [53] в качестве кросс-агента также был использован ЭДК при формировании желатиновых кригелей из реакционных систем, помимо желатина дополнительно

содержавших гиалуроновую кислоту (0,25% масс.), являющуюся основным компонентом внеклеточного матрикса и способствующей пролиферации клеток [80]. Авторами показано, что повышение в исходном растворе концентрации гелеобразующего биополимера с 4 до 10% масс. приводило к уменьшению среднего диаметра пор (с 245 до 170 мкм), а также к снижению степени пористости. Аналогичные тенденции наблюдались при получении криогелей на основе фиброина шелка и желатина, рассмотренных выше [23, 33, 63]. Рост концентрации желатина при постоянном содержании гиалуроновой кислоты и ЭДК (2% масс., по отношению к сухому весу исходных компонентов) в исходном растворе приводил к снижению степени набухания формировавшихся криогелей (с 12 до 8 г H₂O /г полимера), а также к росту величины их модуля Юнга (с ~22 до ~45 кПа). Вышеприведенная методика синтеза была модифицирована в работе [49], в которой криогенной обработке при -16°C в течение 16 ч подвергали водные растворы желатин/хондроитинсульфат/гиалуроновая кислота (10/2/0,1 % масс.) и желатин/хитозан/хондроитинсульфат/гиалуроновая кислота (10/2/2/0,1 % масс.). Как и в случае хитозан-желатиновых криогелей, сшитых с помощью ГА [48], введение в исходную систему 2% полисахарида приводило к значительному повышению упругости получавшихся криогелей (от 50 до 241 кПа), а также к заметному увеличению среднего диаметра макропор и пористости таких губчатых гелевых материалов (от 200 до 280 мкм и от 75 до 97%, соответственно). Желатиновые криогели, полученные в работе [53], были использованы в качестве подложки для культивирования стволовых клеток свиньи, а криогели, содержавшие хитозан – для культивирования хондроцитов. В обоих случаях было показано, что пористые матрицы, синтезированные сшивкой белка с помощью ЭДК, были нетоксичными по отношению к испытуемым клеткам, а полученные клеточные препараты были успешно имплантированы подопытным животным, что доказывает применимость таких белковых криогелей в тканевой инженерии.

Известны [40] композитные криогели, сформированные из водной суспензии, содержавшей желатин (0,5; 2,5; 5%) и частицы цеолита (0,5; 2,5; 5% масс.) в качестве антибактериального агента [82]. К обработанным ультразвуком суспензиям добавляли раствор формальдегида, смесь замораживали при -20°C и лиофилизировали. В отличие от композитных криогелей на основе желатина, коллагена и фиброина, содержавших включения нано-частиц гидроксиапатита [20, 39], повышение содержания цеолита приводило к увеличению размера пор формируемых губчатых композитных криогелей

от 100 до 500 мкм, что авторы объясняют агломерацией частиц дисперсного наполнителя. Полученные образцы были испытаны на животных в качестве антибактериальных повязок для заживления поврежденного кожного покрова: организм животных не отторгал наложенные на рану композитные криогели, которые обеспечивали нарастание на раневой области новой покровной ткани, а инкорпорированные в криогель частицы цеолита препятствовали загноению раны.

Цитотоксический эффект от использования низкомолекулярных альдегидов при синтезе криогелей, в дальнейшем применяемых в качестве подложек для культивирования клеток, можно резко уменьшать использованием для этой цели окисленных производных полисахаридов, например, крахмала, КМЦ или декстрана [19, 22, 84]. Так, в работе [54] в качестве сшивающего агента был использован диальдегид-декстран, полученный (Рисунок 9) окислением декстрана с помощью периодата натрия [85].

Раствор белка и производного декстрана (4 и 0,1 % масс., соответственно), в которых затем диспергировали частицы наночастицы гидроксиапатита, замораживали и икубировали при -12°C с получением после оттаивания (через 48 ч) упругих композитных желатиновых криогелей. Криогели обладали порами порядка 70-160 мкм, модулем на сжатие порядка 18 кПа и степенью набухания 5 г H_2O /г полимера. Эти материалы были успешно испытаны на кроликах в качестве имплантов для заживления дефектов костной и хрящевой тканей.

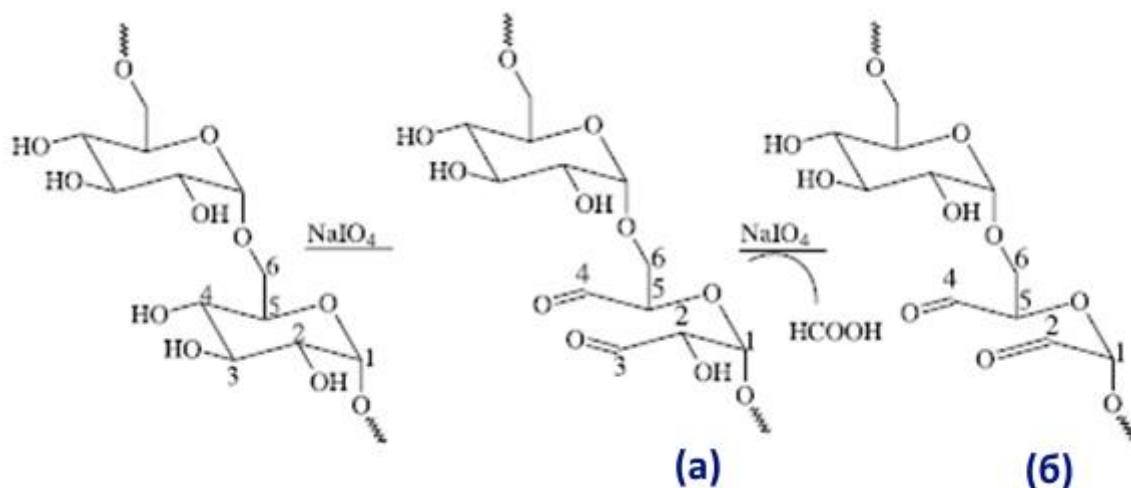


Рисунок 9. Схема реакции окисления декстрана под действием периодата натрия с получением карбонил-содержащего производного (б), использованного в работах [2, 13, 54] в качестве сшивающего агента при синтезе ковалентно-сшитых желатиновых криогелей.

Сшитые с помощью окисленного декстрана желатиновые криогели, не содержавшие каких-либо дисперсных добавок [2], были получены криогенной обработкой при -12°C начального водного раствора желатина и производного декстрана в массовых соотношениях 1:3 – 3:1 (суммарно 4% масс.). Авторы показали, что повышение содержания желатина в исходной системе приводило к образованию менее плотно сшитой гелевой сетки, что почти не сказывалось на степени набухания образцов (порядка $5,5 \text{ г H}_2\text{O} / \text{г полимера}$), но обуславливало некоторое повышение модуля на сжатие образцов в гидратированном состоянии (от 0,66 до 1,07 кПа; от 1,86 до 2,78 кПа в случае лиофилизированных образцов), что было связано с утолщением в меньшей мере сшитых стенок макропор. Теми же авторами [13] получены криогели путем криогенной обработки при аналогичных условиях водного раствора желатина, окисленного декстрана и хитозана (массовая доля каждого биополимера в растворе 1% масс.). Диаметр пор таких криогелей составлял 50-200 мкм, при этом поры имели более правильную форму и гладкие стенки, чем в случае эквиконцентрированных криогелей из хитозана и желатина, сшитых с помощью ГА. В работе этот эффект объяснен более быстрой сшивкой биополимеров с помощью ГА, в отличие от окисленного декстрана. Желатиновые криогели, содержавшие хитозан, обладали большей прочностью – 9 кПа против 1,07 кПа в исследовании [2].

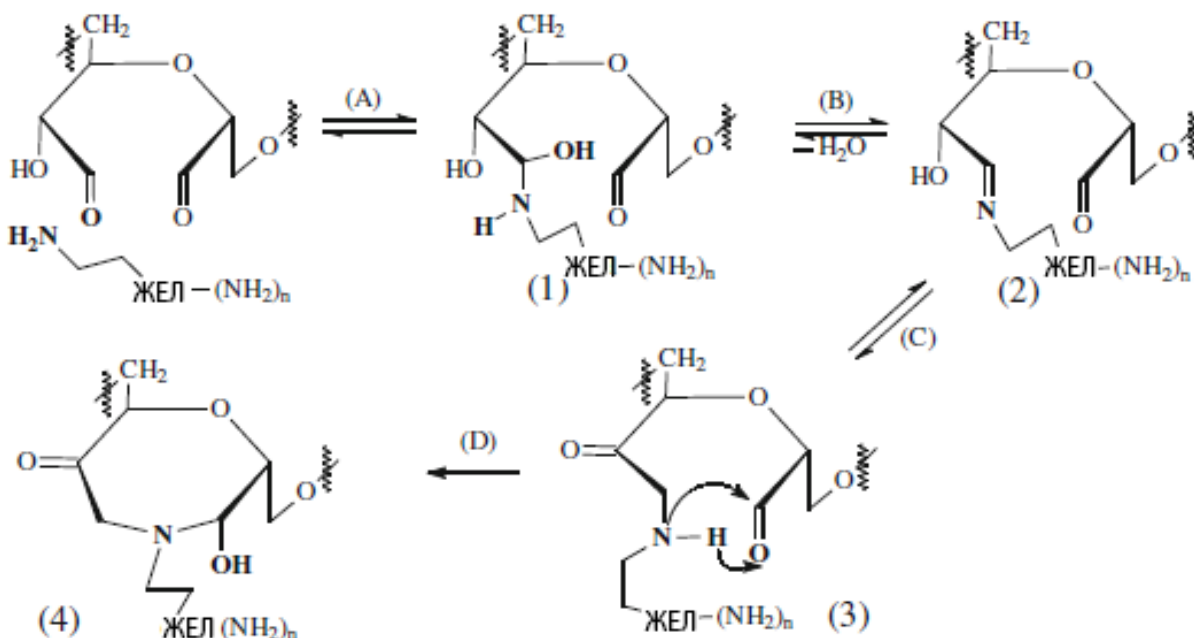


Рисунок 10. Обобщенная схема взаимодействия окисленного декстрана и желатина, предложенная авторами работы [2] по данным ЯМР-исследования продуктов реакции сшивки.

В наибольшей мере изученными нековалентными криогелями являются макропористые системы на основе поливинилового спирта (ПВС), которые также часто формируют в композиции с различными биополимерами, например, желатином. Так, губчатые криогели в форме мембран толщиной 1,5 мм были получены замораживанием при -20°C водного раствора ПВС и желатины (9 и 1% масс., соответственно), с последующим медленным оттаиванием и затем инкубированием в течение суток полученных образцов в коагуляционной ванне (7,5% КОН и 1М Na_2SO_4) [56]. Включение в данный процесс еще одного цикла замораживания/оттаивания позволяло формировать образцы с более плотной гелевой сеткой, о чем свидетельствует снижение степени набухания с 25 до 10 г H_2O /г полимера и что является известной тенденцией для ПВС-криогелей [98]. Аналогичный режим криогенной обработки системы, в которую предварительно вводили микро-суспензию эндотелиальных клеток КРС, также позволял получать макропористые криогели, содержавшие иммобилизованные клетки, равномерно распределенные во всем объеме материала и пролиферировавшие в ходе дальнейшего инкубирования образцов в питательной среде. Вышеописанная методика позже была модифицирована с целью формирования ПВС-желатиновых криогелей [57], содержавших инкапсулированные миобласты КРС, с целью повышения скорости размножения клеток при дальнейшем культивировании таких препаратов. В раствор ПВС и желатина (9 и 1% масс., соответственно) в смеси вода/ДМСО/плазма крови КРС (80/10/10% об., соответственно) вносили суспензию клеток, после чего системы замораживали и инкубировали в течение 24 ч при -70°C . Полученные после оттаивания криогели были использованы в качестве подложек для культивирования эндотелиальных клеток (введенных в объем уже готового криогеля) и миобластов. Показано, что низкотемпературная обработка гелеобразующих систем, содержавших клеточную суспензию, не приводила к гибели миобластов, и приложение к полученным криогелям циклической механической нагрузки способствовало пролиферации клеток обоих типов в объеме ПВС-желатинового криогеля.

При формировании криоструктурированных гелевых систем на основе фибриллярных белков, мало растворимых в воде, как правило отдают предпочтение получению криоструктуратов способом, предусматривающим замораживание и лиофилизацию двухфазных систем, содержащих такие биополимеры. Напротив, желатин хорошо растворим в воде, и его растворы в большинстве случаев служат исходной реакционной системой для формирования криогелей методом криотропного гелеобразования. Однако

в некоторых случаях в раствор белка вносят твердые частицы [41], и полученные суспензии, как и в случае фибриллярных белков, используют для формирования криоструктуратов. Однако, в случае легко растворимых в воде глобулярных белков, требуется дополнительная химическая стабилизация полученных на их основе широкопористых лиофилизатов. Для этой цели белковые криоструктураты обрабатывают кросс-агентами, растворенными в среде, являющейся одновременно нерастворителем для данного биополимера, например, желатина. Так, в работе [21] для этой цели использован 0,5%-ный раствор дженипина в этиловом спирте для сшивки лиофилизата, полученного из замороженной при -50°C водной дисперсии нано-частиц серебра, в свою очередь синтезированных *in situ* в растворе желатина [90]. Повышение содержания нано-частиц серебра в исходной системе с 10 до 40 мМ приводило к увеличению диаметра пор получаемых криоструктуратов 1-го типа со 100 до 1000 мкм, причем добавка в систему 30% масс. частиц мелкодисперсного стекла (в качестве армирующей добавки) приводила к снижению диаметра пор до 600 мкм, а также к некоторому росту выхода гель-фракции от 80 до 90% и к замедлению биodeградации таких композитных криоструктуратов.

В работе [34] был использован дженипин для получения ковалентных желатиновых криоструктуратов 2-го типа. На первой стадии из водного раствора желатин/агароза/дженипин (0,2/1,8/0,04% масс., соответственно) при комнатной температуре был сформирован гидрогель в форме мембран толщиной 0,4 мм, впоследствии подвергнутый замораживанию при -85°C и лиофилизации с получением твердого пористого структурата. Данные материалы были испытаны в качестве эффективных биodeградируемых мембранных фильтров для отделения примесей нефти от воды.

В работе [32] получены губчатые желатиновые криоструктураты 2-го типа на основе гидрогеля, являвшегося продуктом полимеризации при комнатной температуре метакрилового производного желатина, синтезированного по методике, ранее использованной в работах [8, 35], в присутствии 2 моль % фотоинициатора Irgacure 2959. Затем данный гель замораживали при -30°C и высушивали лиофильно, причем в первом варианте проводили градиентное замораживание образцов (цилиндрический образец гидрогеля охлаждали со стороны одного торца) со скоростью охлаждения $0,15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а в параллельном опыте – замораживали при конечной отрицательной температуре. Аналогично сшитым с помощью ГА желатиновым криогелям [33] и коллагеновым нековалентным криоструктуратам 1-го типа [43], сформированным при градиентном охлажде-

нии начальной системы, микроструктура синтезированных подобным образом желатиновых криоструктуратов 2-го типа имела ярко выраженный капиллярный характер макропор, при этом поперечный диаметр вытянутых пор был в диапазоне 20-30 мкм в районе непосредственного соприкосновения гидрогеля с охлаждающей поверхностью до порядка 300 мкм в верхней его части, не соприкасавшейся с охлаждающей плитой. Полученные упругие губчатые материалы были успешно испытаны в качестве подложек для трехмерного культивирования фибробластов, эндотелиальных, глиальных и др. клеток человека.

Ионотропные криоструктураты 1-го типа [51] были сформированы обработкой водным раствором CaCl_2 (0,5% масс.) биополимерного лиофилизата, полученного в результате замораживания и сублимационной сушки при -20°C раствора гиалуроновой кислоты, желатина и альгината (10; 0,5-2,25; 0,5-2,25 % масс., соответственно). При этом альгинат натрия в составе широкопористого многокомпонентного белкового лиофилизата выступал в качестве гелеобразующего биополимера, поскольку карбоксильные группы в составе β -D-маннуронатных фрагментов, составляющих основную цепь данного анионного полисахарида, образовывали множественные межмолекулярные хелатные связи с ионами Ca^{2+} на стадии обработки биополимерного лиофилизата раствором CaCl_2 . Эти ионные «мостики» стабилизировали гелевую сетку (Рисунок 11) формировавшегося в конечном итоге многокомпонентного криоструктурата. Полученные криоструктураты обладали гетерогенной в отношении формы и размера пор микроструктурой, с диаметром пор в интервале 50-250 мкм, а также имели степень набухания порядка 80 г H_2O /г полимера. Данные криоструктураты были имплантированы в субкутис животным, и было показано, что импланты полностью биосовместимы с организмом и прорастают клетками на половину толщины уже через 10 дней после вживления.

В патенте [31] описан принципиально новый способ формирования желатиновых широкопористых криоструктуратов, примененных в качестве подложек для трехмерного культивирования различных клеток. Раствор желатина в ДМСО, дополнительно содержащий еще один растворенный полимер (например, поливиниловый спирт) и суспензию мелкодисперсного наполнителя (например, измельченного коллагена) замораживали при температуре на $15...40^\circ\text{C}$ ниже точки кристаллизации диметилсульфоксида (19°C), затем замерзший растворитель экстрагировали этанолом при $-15...-30^\circ\text{C}$, после чего полученный структурат обраба-

тывают 6-36 ч при 0...30°C 1-10% масс. раствором кросс-агента (ГА, дженипин, либо ЭДК) в этаноле. Практически весь процесс формирования таких желатиновых криоструктуров протекает в безводной среде – это исключает риск контаминации гелевой фазы таких материалов микроорганизмами-паразитами и делает возможным использование данных губчатых криоструктуров в ответственных приложениях биомедицинского профиля, напимер, в качестве подложек для культивирования клеток и создания на их основе биоконструкций для тканевой инженерии. В частности, полученные криоэкстракцией ковалентные широкопористые желатиновые криоструктураты были применены в качестве подложек для культивирования ММСК либо фибробластов человека.

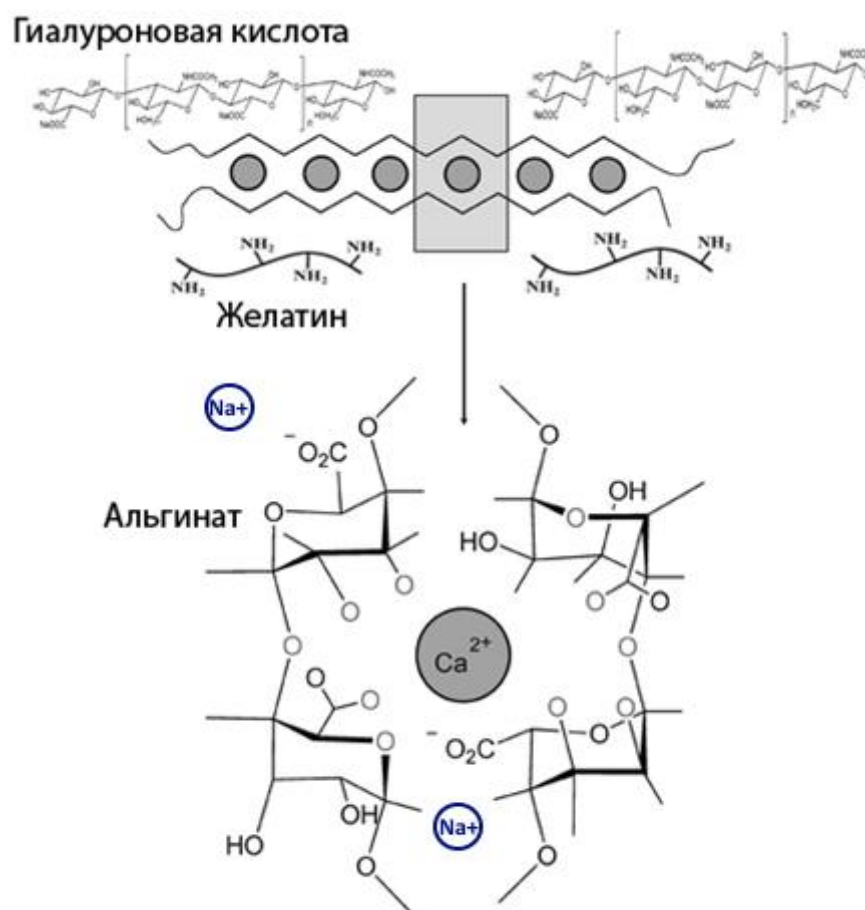


Рисунок 11. Обобщенная схема формирования композиционного биополимерного криоструктурата 1-го типа на основе желатина, гиалуроновой кислоты и альгината натрия [51], стабилизированных хелатными связями между макромолекулами последнего.

2.2.3. Криогели и криоструктураты на основе глобулярных белков.

Различные криогели и криоструктураты для применения в тканевой инженерии часто получают из смесей белков, включающих в свой состав, глобулярные белки. Глобулярные белки характеризуются компактной плотной сферообразной конформацией. Как правило, криогели получают из глобулярных белков животного происхождения, и эти белки обладают разнообразными функциями в организме: ферментативной, регуляторной, транспортной, структурообразующей и др.

Фибриноген является олигомерным глобулярным белком плазмы крови, состоящим из трех соединенных дисульфидными мостами пептидных цепей. Он участвует в процессе свертывании крови, а также промотирует взаимодействия между отдельными клетками [91]. В работе [15] данный белок добавляли в количестве 0,03-3,1% масс. к водному раствору желатин/ГА (4,3-2,1/0,05-0,5% масс., соответственно), который затем замораживали при -12°C и выдерживали в замороженном виде 24 ч с последующим оттаиванием при комнатной температуре. Средний диаметр пор полученных в результате белковых криогелей мало зависел от исходной концентрации фибриногена и кросс-агента и был в интервале 70-80 мкм. При этом повышение [ГА] приводило к значительному падению степени набухания (от 30 до 5 г H_2O /г полимера) таких губчатых криогелей, а также почти к 10-кратному падению скорости их 100%-ной биodeградации при инкубировании в 0,025%-ном растворе трипсина (от 30 до 750 мин). Было предложено использовать данные губчатые биоразлагаемые криогели в качестве подложек для культивирования фибробластов.

В другом исследовании [37] криогенной обработкой при -20°C водной суспензии нано-частиц гидроксиапатита (2% масс.) в растворе желатина (4% масс.), куда перед замораживанием вводили ЭДК (0,5 мг/мл) и морфогенетический белок кости (2% масс., так называемый МНР-2), были синтезированы композитные криогели. МНР-2 является глобулярным белком, входящим в суперсемейство трансформирующих факторов роста. Сейчас известно 20 белков, входящих в данную группу, которые выполняют различные функции: контролируют клеточную репродукцию, программируемую гибель клеток, миграцию клеток, спецификацию мезодермы, и др [88]. МНР-2 является фактором роста костной ткани, способствующим дифференцировке стволовых клеток [89], и его включение в состав композитных желатиновых криогелей позволило существенно повысить эффективность миодифференцировки стволовых клеток, которые культивировали в

объеме полученных губчатых материалов. Диаметр пор (112 ± 12 мкм) криогелей, синтезированных в отсутствие нано-частиц, практически не отличался от диаметра пор композитных криогелей (108 ± 10 мкм), и, не смотря на наличие нано-частиц в исходной системе и более низкую температуру замораживания, превышал диаметр пор желатиновых криогелей, полученных в исследовании [15]. Степень набухания композитных криогелей составляла порядка 10 г H_2O /г полимера. Их модуль упругости данных композитных белковых криогелей достигал 0,3 МПа за счет наличия в составе частиц гидроксиапатита, что позволило успешно использовать полученные материалы в качестве имплантов для регенерации костной ткани у подопытных животных. В частности, было показано, что в условиях *in vivo* остеобласты хорошо размножались в макропорах таких биосовместимых белковых подложек.

Другим примером криогелей, полученных из двухкомпонентных белковых систем, являются криоструктуры на основе водных суспензий суммарного белка, изолированного из семян растений семейства соевых, являющегося доступным биodeградируемым биополимерным предшественником для получения изделий биомедицинского назначения [105, 106]. Обезжиренный изолят соевого белка состоит на 80% из белков-глобулинов 7S (β -конглицинина), 11S (глицинина), а также γ -конглицинина [147, 149]. Широкопористые криогели на основе суммарного белка сои были получены в работе [14], где водную дисперсию изолята сои (3-5% масс.) нагревали при 90°C для частичной денатурации и желирования белка [103], с последующей добавкой в обработанную суспензию транsgлутаминазы (ТГЗ), после чего данную систему инкубировали в течение 1 ч при 40°C, замораживали при -15°C и лиофилизировали. Транsgлутаминаза катализирует реакцию между боковыми карбоксамидными и первичными аминогруппами макромолекул белка с образованием межмолекулярных ϵ -пептидных связей (Рисунок 12), при этом не встраиваясь в образующуюся сшитую полимерную сетку, что обуславливает применение данного природного кросс-агента в биотехнологии и пищевой промышленности. Диаметр пор полученных ферментативной сшивкой криогелей лежал в диапазоне 20-120 мкм и был несколько больше при наименьшем исходном содержании белка в системе (3% масс.). Было показано, что данные материалы полностью биосовместимы и нетоксичны по отношению к мезенхимным стромальным клеткам человека (МСК).

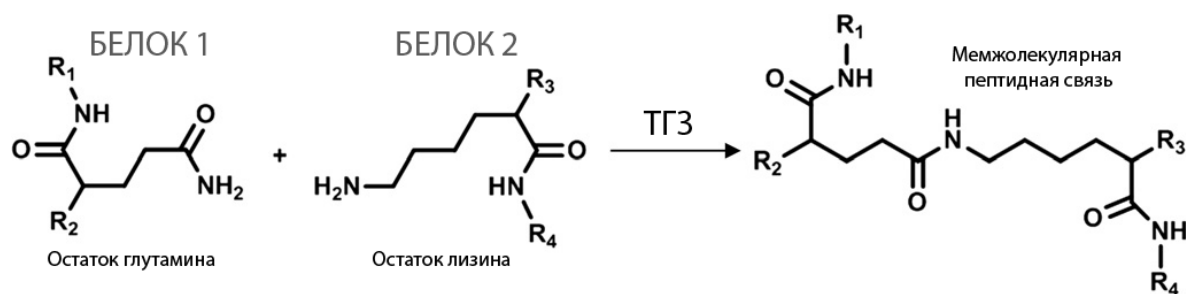


Рисунок 12. Схема реакции сшивки между глутамильными и лизильными группами в составе макромолекул белка сои под действием трансглутаминазы (ТГЗ) с образованием ϵ -пептидной межмолекулярной связи. [103]

При формировании ковалентных криоструктуров 2-го типа на основе соевого белка [42] в качестве водорастворимого кросс-агента был использован диальдегид - глиоксаль, являющийся менее токсичным, чем ГА [104], с точки зрения применения *in vivo* полученных с его помощью сшитых гелевых систем. В водные суспензии соевого белка (5% масс.) и желатина (либо, в альтернативном варианте, пектина) (5% масс.) вносили предварительно замороженный водный раствор глиоксаля, который при оттаивании, обеспечивал более равномерное введение кросс-агента в гелеобразующую систему, что, по мнению авторов, должно сказываться на формировании более однородной по частоте сшивки пространственной сетки. Смесь предшественников инкубировали при комнатной температуре в течение часа, замораживали при -40°C и лиофилизировали. Диаметр пор полученных биополимерных криоструктуров был в интервале 100-200 мкм, при этом в случае пектин-содержащих криоструктуров диаметр пор был существенно ниже (~ 70 мкм), что подчеркивает зависимость морфологии криоструктурированных гелевых систем от типа предшественников [98, 143]. Для сравнительной оценки цитотоксичности полученных материалов по отношению к фибробластам аналогичным способом были получены криоструктураты, сшитые с помощью ЭДК. При этом в случае объемного культивирования клеток в широкопористых подложках, сшитых с помощью диальдегида, наблюдалось значительное сокращение популяции клеток, в сравнении с подложками, сшитыми с помощью карбодиимида, что указывает на цитотоксическое действие продуктов биodeградации гелевой сетки, включавшей фрагменты диальдегида.

Основной белок молока казеин также был использован в качестве биополимерного предшественника для формирования белковых криогелей. Первичная структура данного белка примерно на 30 весовых % состоит из глутаминовой кислоты, пролина и лейцина, его вторичная структура не включает дисульфидных связей. Казеин является

олигомерным белком, не имеющим ярко выраженной третичной структуры, нерастворимым в воде и присутствующим в водных средах в виде мицелл [142]. В рамках исследования [11] были получены казеиновые криогели ферментативной сшивкой казеина (5% масс., фосфатный буфер, pH 8) с помощью трансклутаминазы (0,9% масс.) в неглубоко замороженной среде (-12°C, в течение 14 суток). Эффективность ферментативной сшивки составила порядка 80%, что было сопоставимо с величиной выхода гель-фракции желатиновых криогелей, полученных в параллельном опыте ковалентной сшивкой белка с помощью ГА при идентичной температуре. В то же время степень набухания казеиновых криогелей была в полтора раза ниже, чем у желатиновых криогелей, сшитых с помощью ГА (20 против 33 г H₂O /г полимера, соответственно), полученных в этой же работе, что может свидетельствовать о формировании под действием ТГЗ более плотно сшитой ковалентной гелевой сетки.

Глобулярные белки класса альбуминов благодаря доступности и относительной простоте выделения также используют в качестве биополимерных предшественников при получении широкопористых белковых криогелей и криоструктуратов. В частности, известны примеры формирования физических и ковалентно сшитых криогелей на основе альбумина, выделенного из яичного белка, т.е. овальбумина. Впервые эффект криотропного гелеобразования овальбумина под действием денатурирующего агента был описан в работе [24], в которой было показано, что обработка замораживанием при -11°C растворов овальбумина с концентрацией 0,25-5% масс., содержащих добавку хаотропного агента - мочевины (0,125-5,0 моль/л), приводит к формированию губчатых альбуминовых криогелей, гелевая сетка которых стабилизирована в основном за счет нековалентных гидрофобных взаимодействий между отдельными участками полипептидных цепей. Варьирование температуры криогенной обработки исходных смесей в диапазоне от -32 до -8°C практически не сказывалось на величине выхода гель-фракции (порядка 90%). Эффективность криотропного гелеобразования овальбумина в случае низкой концентрации мочевины (0,125 моль/л) в исходном растворе в значительной мере зависела от pH: повышение pH системы приводило к более чем 2-кратному снижению выхода гель-фракции до 40%. Ковалентно сшитые с помощью ГА овальбуминовые криогели были синтезированы в работе [16]. В водные растворы овальбумина и хитозана, дополнительно содержавшие ферменты глюкозооксидазы, либо пероксидазы хрена, вводили раствор ГА и замораживали при -18°C. После оттаивания образцов были полу-

чены губчатые белковые криогели с диаметром пор в интервале 40-120 мкм, гелевая фаза которых включала иммобилизованные ферменты. Повышение содержания хитозана в исходной реакционной системе приводило к росту механической прочности губчатых образцов. Для данных криогелей была характерна высокая скорость протока воды – порядка 660 мл/ч, что позволило использовать эти материалы в качестве биокатализаторов проточного типа. Было показано, что иммобилизованные в таких широкопористых матрицах ферменты сохраняли до 80% своей изначальной активности.

2.3. Сывороточный альбумин и функциональные материалы на его основе.

Содержание альбумина в сыворотке крови достигает 50% от ее суммарного белка, и в литературе описан ряд опытов по синтезу и исследованию свойств криогелей и криоструктуратов на основе сывороточного альбумина, а также суммарного белка сыворотки крови. Структура и свойства сывороточного альбумина незначительно отличаются в зависимости от видовой принадлежности используемой для его выделения крови, и в виду распространенности альбумин сыворотки крови крупного рогатого скота можно рассматривать как удобный объект для получения криогелей и криоструктуратов и их дальнейших испытаний *in vivo*.

2.3.1. Свойства и практическое применение сывороточного альбумина.

Альбумин сыворотки крови КРС (или бычий сывороточный альбумин - БСА) – это одноцепочечный белок сравнительно небольшой молекулярной массы, порядка 66 кДа, первичная структура которого включает 583 аминокислотных остатка (585 остатков в случае человеческого альбумина), в том числе 60 остатков лизина, суммарно 100 остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, и 35 остатков цистеина, 34 из которых образуют дисульфидные мосты, и один остаток (Цис-34) имеет свободную сульфгидрильную группу и способен образовывать дисульфидную связь с таким же свободным остатком другой макромолекулы альбумина, приводя к образованию его димера [157]. Около 67% всех аминокислотных остатков данного белка участвуют в образовании α -спиралей, а его третичная структура, согласно данным рентгеновской кристаллографии [148], имеет конформацию «сердца» (Рисунок 13: а), в растворе переходящую в эллипсоид. Третичная структура альбумина включает три гомологичных домена, каждый из

которых, в свою очередь, состоит из двух суб-доменов (А и В), содержащих по 4 и 6 α -спиралей, соответственно [99, 148].

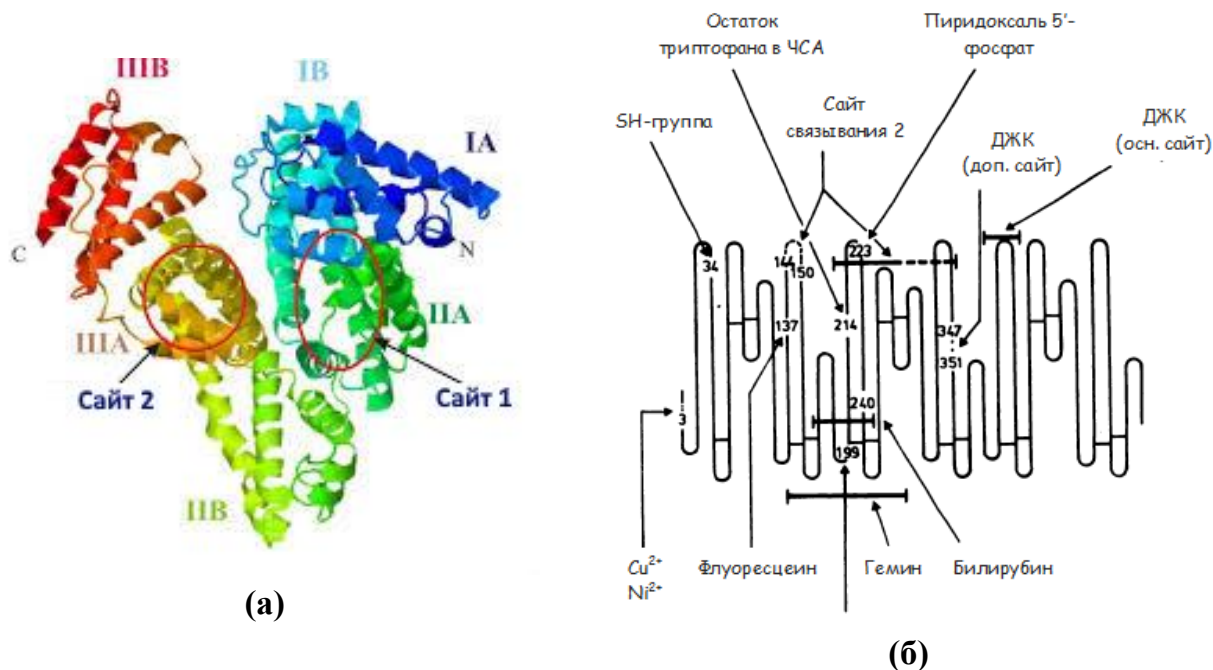


Рисунок 13. (а) Обобщенное изображение третичной структуры бычьего сывороточного альбумина, а также расположения в ней различных сайтов специфического связывания (б).

Таблица 3. Сайты связывания в макромолекуле сывороточного альбумина [99].

Сайт	Связываемый иганд
I	Жирные кислоты
II	L-тироксин, D- и L-триптофан, хлорид-ион
III	Билирубин, некоторые красители
IV	Cu^{2+} Ni^{2+}
V	гемин
VI	Салицилат, сульфатидол, сульфатиазол

В глобуле альбумина имеется несколько сайтов (Рисунок 13: б), характеризующихся низкой и высокой аффинностью к тем или иным лигандам [107]. Так, Сайт I в макромолекуле сывороточного альбумина участвует в связывании до 40-60 молекул прямого (несвязанного) билирубина. Способность альбумина связывать различные (Таблица 3) часто токсичные для организма метаболиты обусловила применение данного белка в качестве среды экстракорпоральных шунтов – устройств для инфльтрации крови, имплантируемых пациентам, страдающим от печеночной и/или почечной недостаточности [92]. Данные экстракорпоральные шунты наряду с такими методами, как, например, диафльтрация плазмы [93], предназначены для удаления билирубина, липо-

полисахаридов и др. Еще одной важной природной функцией альбумина является поддержание осмотического давления в кровеносных сосудах, и по этой причине в медицинской практике широко распространены инфузии раствора альбумина в качестве плазмозаменителя [94] пациентам, страдающим как от больших кровопотерь, так и в ряде других клинических случаев [95-97]. Доступность сывороточного альбумина, а также наличие в его первичной структуре большого количества боковых амино-, карбоксильных, амидных и др. функциональных групп и сайтов специфического связывания делает данный белок удобным объектом для синтеза на его основе биоконъюгатов-носителей различных лекарственных соединений [108, 109], белков [110] и др., а также биосорбентов [111] и прочих функциональных материалов и медицинских препаратов. В литературе также описан ряд исследований, посвященных получению губчатых криогелей и криоструктуратов на основе сывороточного альбумина.

2.3.2. Примеры широкопористых криогелей и криоструктуратов на основе альбумина и других белков плазмы крови.

К одним из первых упоминаний альбуминовых криогелей относится ряд работ [25-30], в которых альбуминовые губчатые матрицы были использованы в качестве носителей для иммобилизации различных органелл клеток с получением соответствующих биокатализаторов. Методика формирования БСА-криогелей в каждом из этих экспериментов, проведенных различными исследователями, была практически идентичной, и в качестве исходной системы авторы использовали суспензию каких-либо органелл клеток или бактерий в К-фосфатном буфере (pH 6,5-7,1) с растворенными в нем БСА (4,6-7%) и добавкой глутарового альдегида (0,35%). После смешения всех компонентов полученную двухфазную реакционную систему замораживали и инкубировали в течение 2-12 часов при заданной отрицательной температуре в интервале от -20 до -30°C с последующим оттаиванием образцов при 4°C. Авторы данного цикла исследований практически не уделяли внимания изучению физико-химических и структурных особенностей губчатых БСА-криогелей, сделав основной акцент на изучении активности иммобилизованных клеток. В этой связи можно дать лишь краткую характеристику каждой работы. В исследовании [29] по данным СЭМ охарактеризована микроструктура БСА-криогелей, содержащих иммобилизованные хроматофоры, выделенные из бактерий *Rhodopseudomonas capsulata*. Диаметр пор криогелей находился в интервале 10-50 мкм.

Полученные образцы были испытаны в качестве биореакторов для синтеза АТФ. Ранее этим же коллективом авторов БСА-криогели были использованы для иммобилизации по аналогичной методике тилакоидов, выделенных из листьев салата *Latuca sativa*, и фермента гидрогеназы, выделенной из бактерий *Clostridium pastorianum* [30]. Синтезированные в результате губчатые БСА-мембраны были испытаны в качестве биокатализаторов для получения водорода. В работе [25] БСА-криогели были использованы в качестве носителя иммобилизованного субмембранного фрагмента тилакоидов. В работе [28] изучено влияние присутствия в исходной реакционной системе различных катионов металлов на активность тилакоидов, иммобилизованных в БСА-криогелях. Полученные по идентичной методике БСА-криогели использованы в качестве пористой основы для иммобилизации термофильных бактерий линии PS3 и бактерий *Escherichia coli* [27], а также для иммобилизации цианобактерий вида *Phormidium luridum* и *Anacystis nidulans* [26].

В работе [9] была применена многостадийная методика формирования криоструктуратов 1-го типа на основе смеси альбуминов человека, свиньи и КРС. На начальном этапе в раствор сывороточного альбумина (10%, 0,125M NaCl, pH 8) вводили дитиотреит (0,5M), что приводило к расщеплению дисульфидных мостов в глобулах альбумина и олигомеризации денатурированных таким образом макромолекул через реакции тиол-дисульфидного обмена [12 из обсуждения]. Затем обработанный белок сшивали под действием ТГЗ (12,5 ммоль/л) при 37°C в течение 16 ч. В раствор, содержащий олигомерный альбумин, вводили 6-молярный раствор мочевины (0,1M NaAc, pH 5), инкубировали при 25°C в течение 4 ч и гомогенизировали обработанный таким образом препарат. Полученную микросуспензию белка замораживали при -80°C и высушивали лиофильно. Сформированный в результате широкопористый лиофилизат предварительно олигомеризованного альбумина дополнительно сшивали в течении 2 ч с помощью паров формальдегида. Таким образом, гелевая сетка полученных БСА-криоструктуратов была стабилизирована межмолекулярными дисульфидными, амидными и альдиминными связями. Данные БСА-криоструктураты обладали высокой степенью набухания (более 40 г H₂O /г полимера), значительной пористостью (97%) при среднем диаметре пор 89±35 мкм, и высокой прочностью (максимально усилие на разрыв достигало 130 кПа). Несмотря на использование при синтезе данных материалов токсичного кросс-агента (формальдегид), сформированные губчатые криоструктураты были успешно испытаны

на адгезию и пролиферацию мультипотентных мезенхимных стволовых клеток КРС, которые впоследствии подвергали остеогенной миодифференцировке. Данные БСА-криоструктураты обладали значительно более низкой скоростью биodeградации, в отличие от коллагеновых криогелей, синтезированных для аналогичных целей [78].

Еще одним фактором, обуславливающим высокий потенциал альбумина как биополимерного предшественника для различных материалов биомедицинского назначения, в том числе криогелей и криоструктуратов на его основе, является возможность использования в качестве исходной реакционной системы непосредственно плазмы или сыворотки крови. Так, сыворотка крови КРС, в которую вводили ГА (0,05% масс.), была использована в работах [58, 59] в качестве реакционной среды для синтеза белковых криоструктуратов 2-го типа: на начальном этапе сыворотку, содержащую кросс-агент, инкубировали при комнатной температуре с получением на ее основе гидрогеля, который затем замораживали при -20°C и лиофилизировали. Синтезированные в результате белковые криоструктураты были использованы в качестве подложек для культивирования остеобластов, и полученные таким образом клеточные структураты были успешно имплантированы животным и испытаны в условиях *in vivo* для регенерации костной ткани.

* * *

Как следует из литературного обзора, физико-химические и эксплуатационные характеристики белковых криогелей во многом зависят от природы предшественников, типа начальной реакционной системы, последовательности и параметров стадий формирования гелевой сетки и криоструктурирования. Существуют различные схемы синтеза криогелей и криоструктуратов на основе белков, выбор которых определяет природа используемого белкового предшественника. Учитывая, что в настоящее время литературные источники в основном касаются синтеза и изучения свойств широкопористых альбуминовых криогелей и криоструктуратов, сшитых с помощью токсичных альдегидных соединений, актуальной задачей является получение и исследование ковалентных альбуминовых криогелей, пространственная сетка которых не содержала бы включений, привнесенных с кросс-агентом. Многообещающим выглядит биомедицинское применение таких полностью состоящих из сывороточного альбумина криогелей, например, в качестве носителя различных клеточных культур для нужд тканевой инженерии, либо в качестве носителей лекарственных веществ.

ГЛАВА III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Материалы

В работе без дополнительной очистки были использованы бычий сывороточный альбумин (БСА; № по каталогу А7906), мочеви́на ($\geq 99.5\%$), цистеин (**Цис**, $\geq 99.5\%$), N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид гидрохлорид (**ЭДК**), глутаровый альдегид (**ГА**, 50%-ный водный раствор) (все – Sigma-Aldrich Inc., США), альбумин сыворотки крови человека (**ЧСА**, 10%-ный водный раствор, Микроген, РФ), додецилсульфат натрия (**ДДС-Na**, Serva, Германия), краситель метиленовый синий (Merck GmbH, Германия), 1,4-дитиотреит (**ДТТ**, Panreac Quimica S.A.U., Испания), гуанидин гидрохлорид (Helicon, РФ). Для приготовления растворов исходных реагентов применяли воду, очищенную по технологии Milli-Q.

Водный раствор фермента органофосфатгидролазы (His₆-ОФГ) с концентрацией 1,6 г/л и активностью фермента 3820 ед. акт./мл, а также раствор параоксона (Sigma-Aldrich Inc., США) с концентрацией 11 мМ предоставлены лабораторией экобиокатализа Химфака МГУ им. М.В. Ломоносова (Зав. лаб. д.б.н. Е.Н. Ефременко).

Для нагружения БСА-криогелей различными антибиотическими и антибактериальными агентами использовали следующие препараты: ванкомицин (Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Израиль), кларитромицин (Abbot France, Франция), тазоцин (Weyth, Австрия), гентамицин (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь), полиэтиленгликоль (ПЭГ-400, M_w=400, Clariant, Швейцария).

Для получения криогелей и криоструктуратов на основе суммарного белка сыворотки крови использовали плазму крови человека, предоставленную группой к.м.н. А.В. Цискарашвили (ЦИТО им. Н.Н. Приорова), а также плазму крови крупного рогатого скота, предоставленную группой д.б.н. И.П. Савченковой (ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко).

3.2 Оборудование

При замораживании растворов для формирования альбуминовых криогелей и криоструктуратов использовали криострат F-32 (Julabo, Германия) либо ультракриостат ТЖ-ТС-01/16Л-100 («Лабораторное Оборудование и Приборы», Санкт-Петербург, РФ). Высушивание полученных образцов альбуминовых криогелей и криоструктуратов, а также водных растворов БСА и образцов плазмы/сыворотки крови проводили с исполь-

зованием лиофильной установки ALPHA 1-2 LD plus (Martin Christ, Германия). Досушивание до постоянного веса отжатых от несвязанной влаги или лиофилизированных образцов альбуминовых криогелей и криоструктуратов проводили с помощью воздушного термостата SNOL 24/200 (AB Utenos Elektrotechnika, Литва). Калориметрические измерения проводили на дифференциальном адиабатном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (НПО «Биоприбор», Пущино) в группе д.х.н. В.Я. Гринберга (ИНЭОС РАН). Макропористую морфологию альбуминовых криогелей изучали с помощью оптического стереомикроскопа SMZ1000 (Nikon, Япония), оборудованного системой цифровой записи изображения MMC-50C-M (MMCSOFT, РФ). УФ-фотометрические измерения проводили с использованием УФ-спектрометра T70 UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltd., Великобритания).

3.3 Методики проведения экспериментов

3.3.1а. Формирование альбуминовых криогелей 1-го типа.

Сухой порошок БСА растворяли в рассчитанном объеме воды с получением растворов, конечная концентрация белка в которых составляла 30, 40, либо 50 мг/мл. Затем к полученному раствору добавляли и растворяли требуемое количество мочевины, концентрацию которой в испытуемых образцах варьировали от 0,5 до 3 моль/л. В течение 20 минут полученные растворы охлаждали на ледяной бане, после чего в каждый добавляли рассчитанный объем водного раствора цистеина с концентрацией 0,9 моль/л. Приготовленную таким образом реакционную систему порциями по 3 мл набирали в 5-миллилитровые пластиковые шприцы (BD Discardit II, Испания), которые герметизировали и погружали в хладагент камеры жидкостного криостата с заранее установленной отрицательной температурой (-15, -20 или -25°C), где образцы выдерживали в течение 20 ч. После этого шприцы погружали на 5 мин в водяную баню (при комнатной температуре) для оттаивания криогелей. Промывку сформированных криогелей от золь-фракции и непрореагировавших компонентов производили путем пропускания 200-кратного объемного избытка чистой деионизованной воды через цилиндрический блок широкопористого криогеля, находящегося внутри шприца. Каждый губчатый криогель перед проведением дальнейших операций осторожно извлекали из шприца и хирургическими ножницами удаляли фрагмент криогеля, образующийся в коническом патрубке шприца.

3.3.1.б. «Депо-формы» антибиотических и антибактериальных препаратов на основе БСА-криогелей 1-го типа.

Порошкообразный БСА растворяли в рассчитанном объеме кипяченой деионизованной воды с получением Раствора 1, конечная концентрация БСА в котором составляла 100 мг/мл. В альтернативном варианте, при получении криогелей на основе альбумина человека использовали коммерческий 10% водный раствор ЧСА.

Для получения Раствора 2 навеску сухой мочевины и Цис растворяли в рассчитанном объеме кипяченой деионизованной воды, таким образом, чтобы их конечная концентрация в растворе составляла 2,6 моль/л и 0,02 моль/л, соответственно. Затем в пластиковый шприц последовательно отбирали по 0,5 мл предварительно охлажденных на ледяной бане Раствора 1 и Раствора 2, полученную композицию осторожно смешивали внутри шприца, оставляли во впускном патрубке воздух и устанавливали каждый шприц в строго вертикальном положении патрубком вверх в камере криостата, охлажденной до -15°C , в которой образцы выдерживали в течение 20 ч. После этого полученные БСА-криогели оттаивали в водяной бане и промывали протоком деионизованной воды.

Из аналогичных растворов формировали образцы в пластиковых чашках Петри с внутренним диаметром 38 мм с таким расчетом, чтобы высота слоя в чашке составляла 4-5 мм. Замораживание исходных растворов осуществляли, помещая чашки на строго горизонтальную металлическую плиту, по внутреннему змеевику которой с помощью ультракриостата прокачивался охлажденный до -15°C этанол. После криогенной обработки полученные губчатые диски промывали водой от золь-фракции и далее помещали образцы под этиловый спирт на 1 час. Из каждого диска криогеля с помощью заостренного сверла для резиновых пробок ($d_{\text{внутр}} 9 \text{ мм}$) в спирте вырезали по 4 шайбы. Эти шайбы отмывали от этанола многократным избытком кипяченой деионизованной воды.

Далее из набухших в воде губчатых образцов на стеклянном фильтре под вакуумом (водоструйный насос) в течение 2 мин удаляли свободную жидкостью, и далее «отжатый» таким образом препарат помещали в водный раствор вещества, предназначенного для насыщения губчатого носителя, конкретно: ванкомицина, кларитромицина, тазоцина или их смесей с ПЭГ-400 концентрации антибиотика и ПЭГ-400 25 мг/мл и 1,25-5 %масс., соответственно. Образцы набухших криогелей инкубировали в данном

растворе в холодильной камере в течение 5 ч при 15°C, после чего помещали каждый на стеклянную подложку, замораживали при -20°C и высушивали лиофильно.

3.3.1.в. Формирование криогелей 1-го типа на основе суммарного белка сыворотки крови.

Мочевину и Цис растворяли в рассчитанном объеме кипяченой деионизованной воды таким образом, чтобы их конечная концентрация в получаемом растворе составляла 2,5 моль/л и 0,02 моль/л, соответственно. Затем данный раствор охлаждали на ледяной бане и отбирали требуемый объем в пластиковый шприц, после чего в шприц вносили равный объем охлажденной на ледяной бане плазмы крови. Полученную композицию осторожно смешивали внутри шприца, оставляли во впускном патрубке воздух и устанавливали каждый шприц в строго вертикальном положении (патрубком вверх) в охлажденный до -15°C хладагент камеры криостата, где образцы выдерживали в течение 20 ч. После этого полученные белковые криогели оттаивали в водяной бане и промывали протоком кипяченой деионизованной воды.

3.3.2. Формирование БСА-криогелей 2-го типа.

Готовили водный раствор БСА необходимой концентрации, далее его охлаждали в ледяной бане и вносили расчетное количество 1,9 молярного водного раствора ЭДК, после чего 3 мл-порции реакционной системы набирали в 5-мл пластиковые шприцы, которые герметизировали и погружали в охлажденный до -15, -20 или -25°C хладагент камеры криостата, где образцы замораживали и инкубировали в течение 20 ч при заданной температуре. Далее образцы размораживали в водяной бане при 25°C, осторожно извлекали из шприца каждый сформировавшийся в нем губчатый криогель, с помощью ножниц отрезали конический фрагмент, сформированный в объеме конического патрубка шприца, а цилиндрический блок криогеля вновь помещали в шприц и промывали от золь-фракции в проточном режиме, пропуская через каждый блок криогеля в шприце по 200 мл воды.

3.3.3.а. Формирование БСА-криоструктуратов 3-го типа.

Готовили растворы БСА в деионизованной воде с концентрацией белка 30, 40 и 50 мг/мл. Затем требуемый объем полученного раствора БСА вносили в стеклянные

плоскодонные пузырьки ($d_{\text{внутр}}=18$ мм), которые герметизировали и погружали в охлажденный до -15, -20 или -25°C хладагент камеры криостата, где образцы замораживали и инкубировали в течение 3 часов при заданной температуре. После этого проводили сублимационную сушку образцов в лиофильной установке в течение 18 часов. Полученные лиофилизаты БСА заливали 2-кратным объемным избытком раствора ЭДК в этаноле требуемой концентрации. Концентрацию ЭДК в спиртовом растворе варьировали от $2,9 \cdot 10^{-4}$ до 0,29 моль/л. Образец герметично закрывали и инкубировали реакционную систему в течение 24 ч при 5°C. Затем избыток раствора сшивающего агента удаляли и промывали сформировавшие губчатые БСА-криоструктураты 100-кратным избытком деионизованной воды (по 2 раза в течение 3 ч).

3.3.3.б. Формирование БСА-криоструктуратов 3-го типа, содержащих иммобилизованный фермент.

К водному раствору БСА известной концентрации добавляли при перемешивании рассчитанный объем водного раствора His₆-ОФГ (концентрация белка 1,6 мг/мл) в Na-карбонатном буфере (рН 10,5) таким образом, чтобы концентрации БСА и фермента в полученном растворе составляли 4 г/дл и 0,32 мг/мл, соответственно. Реакционную белковую смесь в количестве 150 мкл вносили в вертикально установленные пластиковые конические пробирки (ISOLAB, Германия; V=1,5 мл). Затем пробирки герметизировали и в том же положении погружали в охлажденный до -20°C хладагент камеры криостата, где образцы замораживали и инкубировали в течение 3 часов при заданной температуре, после чего образцы высушивали лиофильно. Полученные лиофилизаты белка заливали 2-кратным объемным избытком раствора ЭДК либо ГА в этаноле требуемой концентрации и инкубировали реакционную систему в холодильной камере в течение 24 часов при 14°C.. Концентрацию ЭДК в спиртовом растворе варьировали от $2,9 \cdot 10^{-4}$ до 0,29 моль/л, концентрацию ГА в спиртовом растворе варьировали от $8,7 \cdot 10^{-3}$ до 0,174 моль/л. Избыток раствора сшивающего агента удаляли и промывали сформировавшие БСА/ОФГ-криоструктураты чистым этиловым спиртом и затем 100-кратным избытком кипяченой деионизованной воды (по 2 раза в течение 3 ч). Промытые таким образом препараты замораживали при -20°C и высушивали лиофильно.

3.3.3.в. Формирование БСА-криоструктуратов 3-го типа на основе суммарного белка сыворотки крови.

Требуемый объем плазмы/сыворотки крови разбавляли рассчитанным количеством кипяченой деионизованной воды с получением раствора, концентрация суммарного белка в котором варьировали в интервале 30 – 60 мг/мл. Раствор порциями по 2 мл вносили в стеклянные плоскодонные пузырьки ($d_{\text{внутр}}=18$ мм), замораживали при -20°C и высушивали лиофильно. Затем в каждый полученный лиофилизат вносили по 2,5 мл раствора ЭДК либо ГА в этаноле с требуемой концентрацией кросс-агента, и данную систему инкубировали в холодильной камере в течение 24 часов при 14°C . Избыток раствора кросс-агента удаляли и промывали сформировавшие БСА/ОФГ-криоструктураты чистым этиловым спиртом и затем 100-кратным избытком кипяченой деионизованной воды (по 2 раза в течение 3 ч).

3.3.4. Определение выхода гель-фракции и степени набухания БСА-криогелей и БСА-криоструктуратов.

Выход гель-фракции образцов БСА-криогелей и БСА-криоструктуратов определяли гравиметрическим методом. Для этого из набухшего в воде губчатого образца под нагрузкой 145 г на стеклянном фильтре под вакуумом водоструйного насоса в течение 5 мин удаляли свободную жидкость. «Отжатый» таким образом препарат взвешивали и далее сушили при 105°C до постоянного веса.

Выход гель-фракции (Y – yield) рассчитывали из соотношения (1):

$$Y=(m_{\text{сух}} / m_{\text{теор}}) \times 100 \% \quad (1)$$

Величину степени набухания полимерной фазы (стенок макропор) широкопористых образцов (S – swelling) вычисляли по формуле (2):

$$S=(m_{\text{вл}} - m_{\text{сух}})/m_{\text{сух}} \text{ (г H}_2\text{O/г полимера)} \quad (2)$$

где $m_{\text{вл}}$ – масса «отжатого» влажного образца, $m_{\text{сух}}$ – масса сухого препарата.

где $m_{\text{теор}}$ – масса белка при условии 100%-ного встраивания макромолекул БСА в полимерную сетку криогеля.

3.3.5. Набухание альбуминовых криогелей и криоструктуратов в различных солюбилизирующих средах

Из образцов БСА-криогелей и БСА-криоструктуратов на стеклянном фильтре под

вакуумом удаляли несвязанную влагу. Отжатые образцы помещали или в 8М водный раствор мочевины, или 5М водный раствор гуанидилгидрохлорида, либо в 1 %-ный раствор ДДСNa. Через 24 часа после начала инкубирования в каждую систему вносили 1 мл водного раствора ДТТ с концентрацией 3,92 Моль/л с тем расчетом, чтобы конечная концентрация ДТТ в объеме каждой системы составляла 0,1 Моль/л. С помощью цифровой фотокамеры (Nikon, Япония) регистрировали внешний вид и размеры образцов через 5 мин, 30 мин, 12 ч и 24 ч с момента их внесения в солюбилизирующие растворы, а также через 24 часа после внесения в каждую систему ДТТ.

3.3.6. Высокочувствительная дифференциальная сканирующая калориметрия

Изучение конформационного состояния макромолекул БСА в составе криогелей и криоструктуратов проводили методом высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии (ВЧ-ДСК) в группе В.Я. Гринберга лаборатории Физической химии полимеров ИНЭОС РАН. Образцы измельчали в воде с помощью ручного гомогенизатора Поттера. Концентрацию белка в полученной суспензии определяли по сухому остатку после высушивания дисперсии до постоянного веса при 105°C (~20 часов). Рабочую суспензию с концентрацией полимера 5 мг/мл для калориметрических измерений готовили в буферном растворе (20 мМ имидазольный буфер, pH 7,4; 0,15М NaCl). Перед измерениями суспензию выдерживали в течение 20 ч при 5°C при постоянном перемешивании. Контрольные термограммы БСА получали с использованием растворов белка в том же буферном растворе. Калориметрические измерения проводили на дифференциальном микрокалориметре в интервале температур 10-110°C при избыточном давлении 0,25 МПа. Скорость нагревания составляла 2 град/мин. Сбор данных и первичную обработку термограмм проводили с помощью компьютерной программы COMPORT (ИНЭОС РАН), обработку термограмм и вычисление термодинамических параметров денатурации белка осуществляли с использованием компьютерной программы NAIRTA-2 (ИНЭОС РАН)

3.3.7. Оптическая микроскопия

Макропористую морфологию альбуминовых криогелей и криоструктуратов изучали с помощью оптического стереомикроскопа SMZ1000 (Nikon, Япония), оборудован-

ного системой цифровой записи изображения MMC-50C-M (MMCSOFT, РФ). Линейные размеры макропор измеряли с помощью программного обеспечения MMCatalog Multimeter v.2.2 того же производителя. Линейные размеры макропор БСА-криоструктуратов 3-го типа измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ, доступного в сети интернет по ссылке: <http://imagej.net/Downloads>. БСА-криогели и БСА-криоструктураты в форме дисков толщиной 1 мм формировали в пластиковых чашках Петри, реакционные растворы готовили в соответствии с описанием в пунктах **3.3.1а.**, **3.3.2.а.** и **3.3.3.а.** Замораживание исходных растворов осуществляли, помещая такие чашки на строго горизонтальную металлическую плиту, по внутреннему змеевику которой с помощью ультракриостата прокачивался охлажденный до необходимой температуры этанол. После формирования образцы промывали водой от золь-фракции и далее контрастировали обработкой водным раствором метиленового синего с концентрацией красителя 0,125 ммоль/л, для чего в каждую чашку с альбуминовым диском вносили по 1,5 мл раствора красителя, равномерно распределяли его по всей поверхности препарата, выдерживали в течении 1 мин и смывали остатки красителя 5-кратным избытком деионизованной воды.

Средне-кубическое численное и средне-кубическое взвешенное значения диаметра пор (D_n и D_w , соответственно) вычисляли по формулам:

$$D_n = \left(\frac{\sum (N_i \cdot D_i^3)}{\sum N_i} \right)^{1/3}, \quad (3)$$

$$D_w = \left(\frac{\sum (N_i \cdot D_i^6)}{\sum (N_i \cdot D_i^3)} \right)^{1/3}; \quad (4)$$

где $\sum N_i$ – суммарное количество измеренных объектов в поле зрения микрофотографии. Коэффициент полидисперсности вычислен как $k = D_w/D_n$.

3.3.8. Исследование сорбционных характеристик альбуминовых криогелей 1-го и 2-го типов.

Сорбционную активность альбуминовых криогелей первого и второго типов оценивали путем пропускания через блок таких образцов раствора модельного сорбата известной концентрации, в качестве которого использовали триптофан. Концентрацию сорбата в элюате на выходе из такой сорбционной колонки измеряли по величине УФ-

поглощения при характеристической длине волны (280 нм). По разности концентраций триптофана в растворах до и после их пропускания через образцы криогелей определяли количество сорбата, удерживаемого губчатыми БСА-криогелями, которое относили к сухому весу образца. При оценке сорбционной емкости альбуминовых криогелей использовали следующую последовательность операций:

1. Готовили растворы сорбата концентрацией 0,16 мг/мл либо в кипяченой деионизованной воде, либо в кипяченом 0,15-молярном растворе NaCl. Концентрацию триптофана уточняли спектрофотометрически, по данным измерений поглощения при длине волны 280 нм. Полученный раствор в стеклянной пробирке устанавливали на штативе на высоте 0,5 м. Пластиковые шприцы с цилиндрическими блоками губчатых БСА-криогелей устанавливали уровнем ниже таким образом, чтобы разница по высоте между элюентом и жидкостью в шприце, определяемая расстоянием между верхними менисками жидкости, составляла не более 150 мм.

2. В случае, если сорбцию триптофана проводили в физиологической среде, то сначала пропускали через каждый исследуемый образец 50-кратный объемный избыток кипяченого физиологического раствора. Затем каждый шприц герметично закрывали каучуковой пробкой с проходящей насквозь полиэтиленовой трубкой ($d_{\text{внутр}}=1$ мм) таким образом, чтобы входящий в шприц конец трубки не касался жидкости внутри него. Другой конец трубки погружали в раствор сорбата. Через каждый образец пропускали по 18 мл раствора триптофана со скоростью 1 капля в 20 секунд. Скорость подачи элюента в шприц регулировали за счет разницы в высоте расположения шприца и источника элюента, а объем элюируемого раствора подбирали с тем расчетом, чтобы общее количество молей триптофана в два раза превышало число молей макромолекул альбумина в составе пористого БСА-сорбента.

3. На выходе из колонки элюат собирали в мерный цилиндр. Спектрофотометрически определяли концентрацию триптофана, откуда рассчитывали на основании данных массу сорбированного триптофана $\Delta m_{\text{Трп}}$ по формуле (5), ϕ сорбционную емкость БСА-криогелей вычисляли по формул (6):

$$\Delta m_{\text{Трп}} = \frac{([A1 - A2] \times n)}{\varepsilon \times l} \times V_{\text{сор}} \times 0,001 \times Mw \quad (5)$$

$$\psi = \frac{\Delta m_{\text{Трп}}}{m_{\text{сух}}} \quad (6)$$

где A_1 и A_2 – регистрируемое оптическое поглощение исходного элюента и элюата, соответственно; n – коэффициент разбавления; $\epsilon = 5,600 \text{ Моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ – мольный коэффициент экстинкции триптофана при 280 нм [151]; V_{sor} – объем элюата; $M_w = 204,23 \text{ г/Моль}$ – молекулярная масса триптофана. После проведения сорбции каждый образец БСА-криогеля повторно промывали 100-кратным избытком деионизованной воды, «отжимали» от несвязанной влаги и высушивали до постоянного веса в соответствии с методикой, описанной ранее, чтобы определить значение $m_{\text{сух}}$.

3.3.9. Оценка каталитической активности органофосфатгидролазы, иммобилизованной в гелевой сетке альбуминовых криоструктуратов 3-го типа.

Ферментативную активность органофосфатгидролазы определяли в соответствии со стандартной методикой, разработанной группой проф. Е.Н. Ефременко. В основе метода лежит фотометрическое определение кинетики накопления п-нитрофенолят-аниона, являющегося продуктом реакции гидролиза модельного субстрата, в качестве которого в данной работе использовали параоксон.

Реакцию гидролиза параоксона проводили следующим образом. Небольшой фрагмент БСА-криоструктурата с иммобилизованным ферментом отжимали под вакуумом от несвязанной влаги и помещали в 1,8 мл Na-карбонатного буферного раствора (pH 10,5), затем запускали реакцию гидролиза добавлением в данную систему при перемешивании 0,2 мл раствора параоксона в воде с концентрацией 11 Моль/л. Перемешивая реакционную систему, через равные промежутки времени (40-45 с) отбирали аликвоты жидкости объемом 0,08 мл, которые быстро разбавляли в десять раз Na-карбонатным буфером в кварцевой кювете. Сразу же после разбавления с помощью спектрометра определяли величину поглощения раствора при 405 нм. Измерение концентрации п-нитрофенолят-аниона в реакции гидролиза параоксона проводили до достижения величиной поглощения значения 0,2. По экспериментальным данным в программе OriginPro 8 строили кривую зависимости величины оптического поглощения от времени реакции и затем проводили ее линейную аппроксимацию.

Скорость ферментативного гидролиза параоксона рассчитывали как тангенс угла наклона линейного участка полученной кинетической кривой к оси абсцисс. За единицу активности органофосфатгидролазы принимали такую концентрацию фермента, при которой происходит гидролиз 1 мкМоль параоксона в минуту при 25°C. Расчет проводили по формуле:

$$A = \frac{\text{tg}\alpha \times \frac{\varepsilon}{1000} \times l}{60 \times C_{\text{ОФГ}}} \times \frac{1}{C_{\text{ОФГ}}} \quad (7)$$

где $\text{tg}\alpha$ - тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой; $\varepsilon=18,500 \text{ мМоль}^{-1}\text{см}^{-1}$ – мольный коэффициент экстинкции п-нитрофенолят-аниона при 405 нм [200], $\text{pH}=10,5$; $C_{\text{ОФГ}}$ – концентрация фермента в кювете с учетом всех разбавлений; l – длина оптического пути, см; 60 – число секунд в 1 минуте.

Полученную величину активности относили к массе иммобилизованного фермента, содержащегося в составе фрагмента БСА-криоструктурата, использованного при проведении реакции гидролиза, либо к массе сухого суммарного белка. Для этого данный фрагмент криоструктурата отжимали от несвязанной влаги, высушивали лиофильно и досушивали при 105°C до постоянного веса. Используя найденный сухой вес, а также учитывая массовое соотношение БСА/ОФГ в исходной смеси, из которой формировали БСА-криоструктураты, вычисляли массу фермента в составе исследуемого фрагмента. При этом принималось допущение, что иммобилизация органофосфатгидролазы под действием кросс-агента в гелевой сетке БСА-криоструктуратов проходит полностью.

3.3.10. Микробиологическое тестирование, а также испытания на животных БСА-криогелей 1-го типа, нагруженных веществами антибиотического действия, проведено группой А.В. Цискарашвили (ЦИТО им. Н.Н. Приорова), а также группой Т.И. Шабатиной в Лаборатории химии низких температур (Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) по стандартным протоколам, принятым в данной области (см. раздел «ПРИЛОЖЕНИЯ»).

3.3.11. Трехмерное культивирование мезенхимных мультипотентных стволовых клеток в БСА-криогелях проведено группой М.П. Савченковой в Лаборатории стволовой клетки (ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко) по стандартным протоколам, принятым в данной области (см. раздел «ПРИЛОЖЕНИЯ»).

3.3.12. Трехмерное культивирование фибробластов человека в БСА-криогелях проведено группой Е.А. Воротеляк в Лаборатории клеточной биологии (Институт Биологии Развития им. Н.Н. Кольцова РАН) по стандартным протоколам, принятым в данной области (см. раздел «ПРИЛОЖЕНИЯ»).

ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

4.1. Предварительные замечания.

В главе 3 (литературный обзор) дана классификация гетерофазных криоструктурированных гелевых систем по принципу формирования их макропористой морфологии. В зависимости от того, в какой последовательности производят сшивку полимерного предшественника и его криоструктурирование могут быть получены криогели, либо криоструктураты. Объектом настоящей работы являлись как криогели, так и криоструктураты на основе химически сшитого сывороточного альбумина. При получении сшитых альбуминовых криогелей, гелевая сетка которых не содержит включений небелковой природы, было применено два подхода: согласно первому из них сшивку БСА в сильно денатурированном состоянии производили в отсутствии экзогенного (то есть привнесенного из-вне) сшивающего агента, в то время как согласно второму подходу химическую сшивку белка в неглубоко замороженной среде производили с помощью конденсирующего агента карбодиимидного типа. Полученные данными двумя способами широкопористые криогели далее в тексте обозначаются как **БСА-криогели первого и второго типа**, соответственно. Согласно третьему подходу, неглубоко замороженный раствор альбумина лиофилизировали и затем белок в стенках макропор полученного сухого текстурата сшивали действием карбодиимида, растворенного в среде, являющейся нерастворителем для белка. Криоструктурированные гелевые системы, полученные последним способом, обозначаются в тексте термином **БСА-криоструктураты**.

4.2. Получение, свойства и микроструктура альбуминовых криогелей первого типа.

Криогенная обработка водных растворов овальбумина в присутствии такого хаотропного агента, как мочевины, приводит к образованию белковых криогелей [5], пространственная сетка которых стабилизирована за счет гидрофобных взаимодействий. Индуцируемая мочевиной денатурация глобулы сывороточного альбумина не является достаточной для формирования стабильных межцепных гидрофобных контактов, поскольку замораживание-оттаивание при аналогичных условиях растворов такого белка, в частности БСА, не приводит к формированию криогелей. Более полное разворачивание глобул альбумина, возможно, требуемое для гелеобразования, может достигаться дополнительным действием низкомолекулярных тиолов, как, например, цистеин (**Цис**)

[24], способных расщеплять внутримолекулярные дисульфидные связи в макромолекулах сывороточного альбумина, повышая тем самым вероятность более полного разворачивания полипептидных цепей. Рост концентрации мочевины и Цис в исходных растворах альбумина в интервале 0,5-3,0 и 0,01-0,1 моль/л, соответственно, не приводил к гелеобразованию при комнатной температуре, что указывает на необходимость совокупного действия денатуранта и восстановителя, а также упоминаемого ранее эффекта криоконцентрирования веществ-предшественников в объеме НЖМФ неглубоко замороженной системы [98, 152, 153].

4.2.1. Влияние состава исходной реакционной системы на свойства БСА-криогелей 1-го типа.

Криогенная обработка при выбранной отрицательной температуре (Рисунок 14) водных растворов «БСА + мочевины + Цис» переменного состава приводила к формированию альбуминовых криогелей, представлявших собой губчатые гелевые матрицы белого цвета, способные выделять несвязанную влагу при несильном сжатии и повторно набухать с полным восстановлением первоначальной формы при погружении образцов в воду. Эти БСА-криогели 1-го типа не растворялись в избытке воды как при длительном хранении при комнатной температуре, так и при их продолжительном (в течение 2-3 часов) выдерживании в кипящей воде.

Для оценки степени влияния различных факторов на свойства формировавшихся таких криогелей сначала была изучена зависимость результатов криотропного гелеобразования от концентрации предшественников (белок, мочевины и Цис). Помимо оценки морфологии на качественном уровне для формировавшихся БСА-криогелей, были определены следующие характеристики эффективности криотропного гелеобразования:

(а) Выход гель-фракции (Y), указывающий на количество белкового предшественника, вошедшего в состав пространственной сетки данного БСА-криогеля.

(б) Степень набухания гелевой фазы гетерофазных широкопористых БСА-криогелей, косвенно характеризующая плотность сшивок в стенках пор данного образца криогеля. Степень набухания ($S_{w/w}$) отвечает отношению массы воды, специфически связанной с полимерной фазой БСА-криогеля, т.е. стенками макропор, к массе сухого вещества.

(в) Скорость потока воды при постоянном гидростатическом давлении через шприц с цилиндрическим блоком БСА-криогеля, которая также характеризовала плотность сшивки гелевой сетки и служила индикатором взаимосвязанности пористой структуры.

Результаты соответствующих экспериментов по влиянию состава исходной реакционной системы и различных условий замораживания на выход гель-фракции и степень набухания БСА-криогелей 1-го типа приведены, соответственно, в Таблицах 4 и 2, которые также включают качественное описание образцов криогелей. Иллюстрацией влияния состава исходных реакционных систем на внешний вид формировавшихся в результате их криогенной обработки БСА-криогелей служат фотографии образцов (Рисунок 15), полученных из растворов с различной концентрацией одного из предшественников при постоянном содержании двух других компонентов.

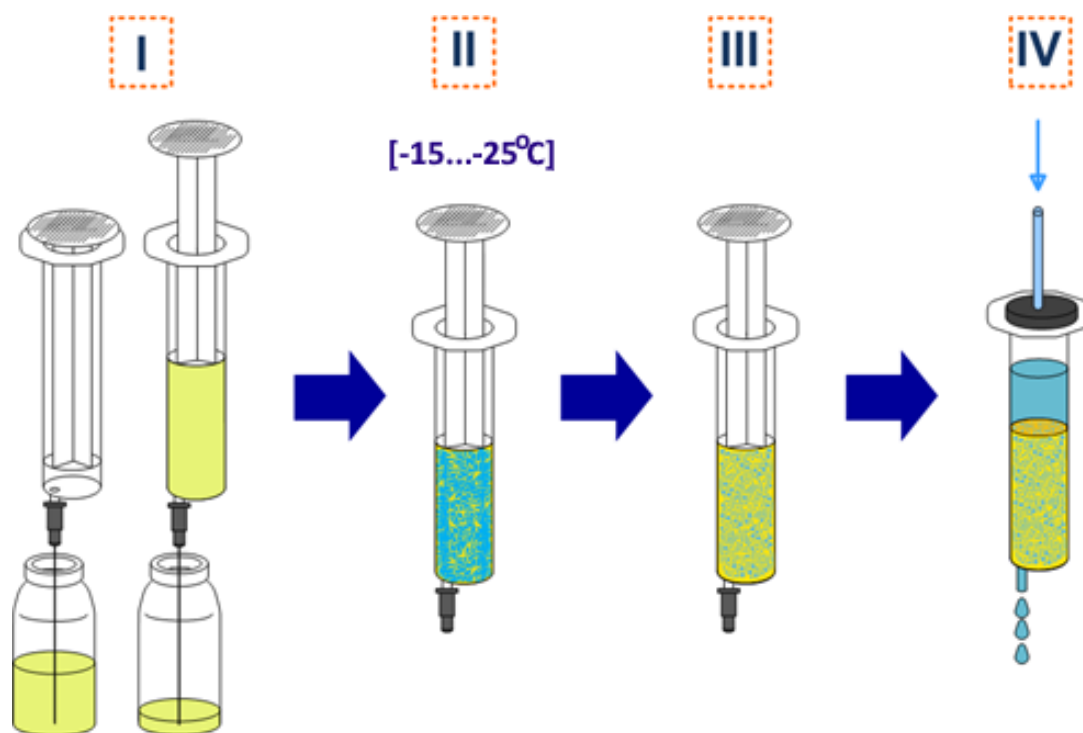


Рисунок 14. Схема процесса формирования БСА-криогелей 1-го типа в пластиковых шприцах в виде цилиндрических блоков:

- I. Приготовление водных растворов с требуемой концентрацией БСА, мочевины и Цис;
- II. Замораживание и инкубирование реакционного раствора при заданной отрицательной температуре;
- III. Оттаивание полученного образца;
- IV. Промывка полученного БСА-криогеля водой в проточном режиме.

Таблица 4. Влияние состава исходной реакционной системы на морфологию и физико-химические характеристики БСА-криогелей 1-го типа.

Пример №	Концентрация компонента в исходном растворе			Температура замораживания (°C)	Качественное описание морфологии образца после завершения цикла замораживания-оттаивания	Свойства полученных БСА-криогелей	
	[БСА] (мг/мл)	[Мочевина] (моль/л)	[Цис] (моль/л)			Выход гелевой фракции (%)	Степень набухания (S _{w/w} ; г H ₂ O/г сухого полимера)
I) влияние начальной концентрации БСА							
1 а	30,0	0	0	-15	Раствор	–	–
б		1,0	0,01		Слабый губчатый криогель	90,0 ± 0,9	1,92 ± 0,07
в	40,0	0	0		Раствор	–	–
г		1,0	0,01		Упругий губчатый криогель	89,8 ± 0,9	1.87 ± 0.10
д	50,0	0	0		Раствор	–	–
е		1,0	0,01		Упругий губчатый криогель	90,2 ± 0,7	1.79 ± 0,07
II) влияние начальной концентрации мочевины							
2 а	40,0	0,5	0,01	-15	Мягкий губчатый криогель	91,0 ± 0,6	1,58 ± 0,07
б		1,0			Упругий губчатый криогель	89.8 ± 0,9	1,87 ± 0.10
в		1,5			Упругий губчатый криогель	86.2 ± 2,0	1,88 ± 0.20
г		2,0			Губчатый криогель	82,0 ± 0,7	1,98 ± 0.19
д		2,5			Слабый губчатый криогель	78.7 ± 2,2	1,73 ± 0.16
III) влияние начальной концентрации Цис							
3 а	50,0	1,0	0,001	-15	Слабый губчатый криогель	85,9 ± 0,8	1,68 ± 0,06
б			0,010		Упругий губчатый криогель	90,2 ± 0,7	1,79 ± 0,07
в			0,100		Каучукоподобный губчатый криогель	77,4 ± 2,0	2,66 ± 0,03
г			0,700		Рыхлый хрупкий криогель	67,1 ± 11,9	2,25 ± 0,48

Предварительные опыты показали, что при начальной концентрации БСА менее 30 мг/мл конечный выход гель-фракции резко падал, а при концентрации белка в исходном растворе выше 50 мг/мл формировавшиеся в результате БСА-криогели были чрезмерно плотными, что вызывало трудности при промывке таких образцов в проточном режиме и при последующем изучении их свойств. Таким образом, в качестве «рабочего» диапазона начальных концентраций БСА были выбраны пределы от 30 до 50 мг/мл. Из количественных результатов в разделе «I» Таблицы 4, следует, что в диапазоне начальных концентраций БСА 30-40 мг/мл криотропное гелеобразование в присутствии мочевины и Цис протекало с высокой эффективностью, и выход гель-фракции достигал 90%, что было характерно не только для приводимого в качестве примера содержания мочевины и цистеина в 1 моль /л и 0,01 моль/л, соответственно (Таблица 4: **1б, 1г**). В отсутствии данных денатурантов реакционная система, как правило, оставалась жидкой после завершения цикла замораживания - оттаивания (Таблица 4: **1а, 1в и 1д**; Рисунок 15).

При повышении концентрации БСА в исходных растворах степень набухания (параметр $S_{w/w}$) пространственной полимерной сетки в стенках макропор образующихся гетерофазных губчатых криогелей несколько снижалась (Таблица 4: **1б, 1г**), что может указывать на большее число межцепных сшивок в гелевой фазе, сформированной из более концентрированных растворов полимерного предшественника. Данная тенденция, как правило, является общей и для других криогелей, получаемых химической сшивкой макромолекул белка в неглубоко замороженных средах [2, 3, 9]. Кроме того, чем выше была начальная концентрация БСА, тем «органолептически» прочнее были получаемые в результате БСА-криогели 1-го типа (Таблица 4: **1б, 1г**).

Другим ключевым фактором, существенным образом влиявшим как на возможность формирования, так и на свойства БСА-криогелей 1-го типа, являлась концентрация мочевины в исходных растворах (Таблица 4: раздел «II»; Рисунок 15: «Ряд б»), причем наблюдавшиеся тенденции мало зависели от начальной концентрации белка. Независимо от температуры последующей криогенной обработки повышение начальной концентрации мочевины от 0,5 до 2,5 моль/л приводило к систематическому падению выхода гель-фракции (Таблица 4: **2а-2д**). То есть, с ростом содержания денатурирующего агента в исходном белковом растворе в гелевую фазу соответствующего губчатого образца встраивалось меньшее количество макромолекул БСА.

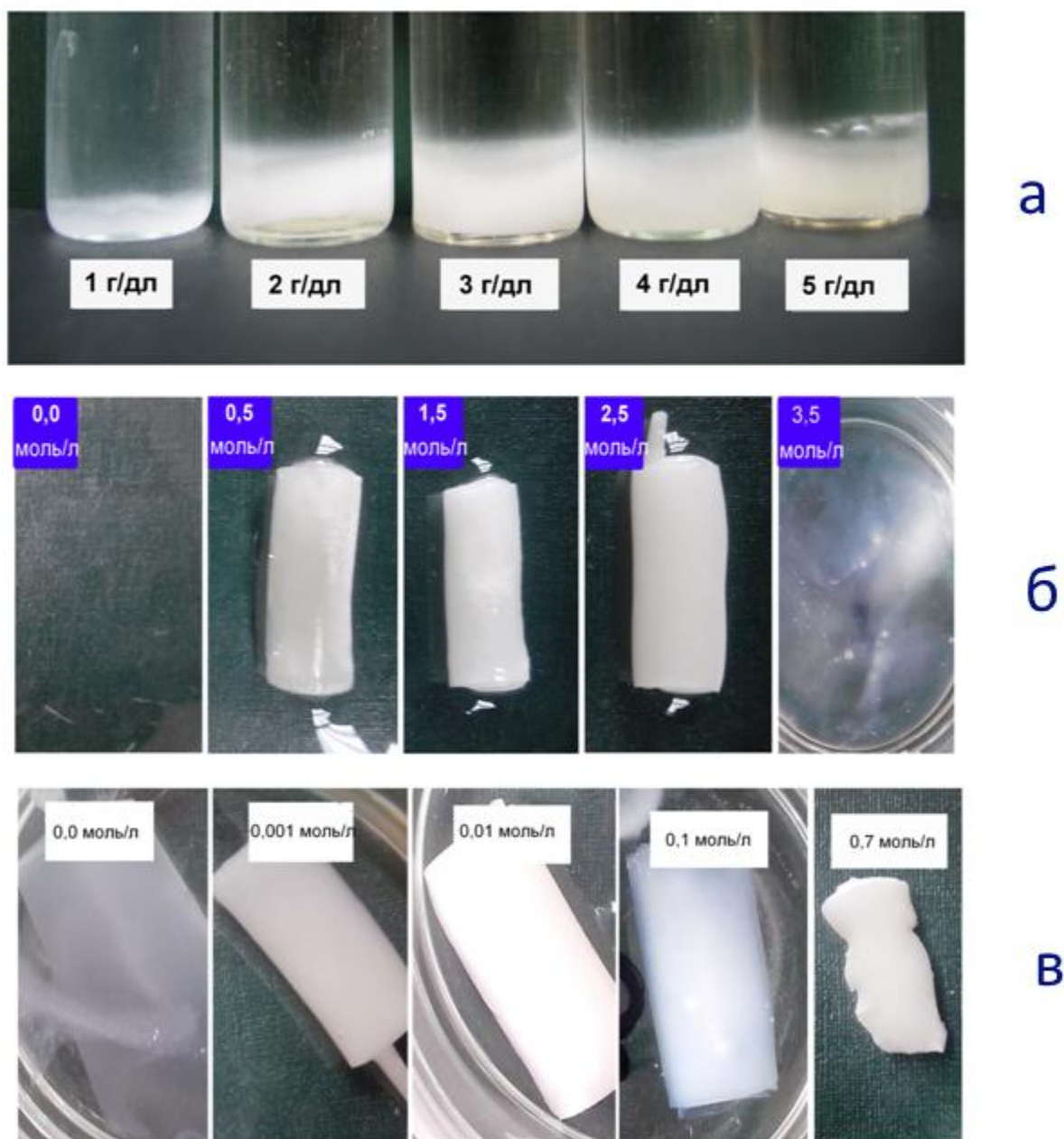


Рисунок 15. Внешний вид БСА-криогелей 1-го типа, полученных криогенной обработкой при -15°C водных растворов состава БСА + мочевины + Цис, в зависимости от концентрации предшественников:

Ряд **а**: [БСА]= var, [мочевина]=1,5 моль/л, [Цис]=0,01 моль/л;

Ряд **б**: [БСА]= 40 мг/мл, [мочевина]=var, [Цис]=0,01 моль/л;

Ряд **в**: [БСА]= 50 мг/мл, [мочевина]=1,5 моль/л, [Цис]=var.

Возможным объяснением подобного эффекта является то, что чем ниже выход гель-фракции, тем меньшее количество полимера встраивается в трехмерную полимерную сетку и, следовательно, тем больше способность такой относительно неплотной гелевой сетки к удерживанию воды. В то же время, зависимость значений $S_{w/w}$ БСА-криогелей 1-го типа от концентрации мочевины в этой серии проходит через слабо вы-

раженный максимум: с ростом начальной концентрации мочевины от 0,5 до 2,0 моль/л степень набухания возрастает (Таблица 4: **2а-2г**), но впоследствии резко падает при содержании мочевины 2,5 моль/л (Таблица 4: **2д**). Зависимость кажущейся прочности данных широкопористых БСА-криогелей от концентрации мочевины в реакционной системе (Таблица 4: **№2**), также имела экстремальный характер: из довольно мягких губчатых материалов (Таблица 4: **2а**) наблюдался переход к упругим губкам (Таблица 4: **2б** и **2в**), но далее – к слабым крупнопористым материалам (Таблица 4: **2г**). Вероятно, такое резкое снижения кажущейся прочности БСА-криогелей в результате незначительного (от 2,0 до 2,5 моль/л) повышения концентрации мочевины в исходных системах обусловлено различным содержанием биополимера в составе гелевой фазы: рост концентрации денатуранта в растворе приводит к увеличению объема НЖМФ при неглубоком замораживании и, как следствие, к снижению эффективности встраивания белка в формирующуюся пространственную сетку криогелей (по причине уменьшения концентрации БСА, растворенного в НЖМФ) и, соответственно, к понижению их прочностных качеств.

Свойства БСА-криогелей 1-го типа также зависели от содержания в исходном растворе цистеина, расщепляющего внутримолекулярные дисульфидные связи в макромолекулах белка, в особенности в присутствии денатурирующих агентов [68]. Исследование влияния различных концентраций Цис (от 0,001 до 0,7 моль/л) в исходных растворах БСА с концентрацией 50 мг/мл (Таблица 4: «**III**») позволило установить, что в отношении эффективности встраивания БСА в пространственную полимерную сетку характер действия Цис был практически аналогичным мочедине: с ростом начальной концентрации восстановителя выход гель-фракции понижался (Таблица 4: **3а-3г**). В случае максимальной концентрации Цис, близкой к пределу растворимости данного соединения в воде (0,91 моль/л), формировались крайне неоднородные по своей текстуре (Рисунок 15: ряд **в**), хрупкие и трудные в обращении образцы, поэтому экспериментальная ошибка при определении значений выхода гель-фракции была довольно существенной (Таблица 4: **3д**).

Аминокислотная последовательность БСА включает 35 остатков Цис, 34 из которых формируют 17 дисульфидных мостов, стабилизирующих глобулу сывороточного альбумина, и один остаток Цис несет свободную тиольную группу [153]. Молярная концентрация БСА в его растворе с концентрацией 50 мг/мл $\sim 0,72$ ммоль/л, а общая кон-

центрация остатков Цис в нем составляет порядка 25,2 ммоль/л, концентрация SS-мостов $\sim 12,6$ ммоль/л, а содержание свободных SH-групп составляет порядка 0,7 ммоль/л, соответственно. Следовательно, в диапазоне концентраций молекулярного цистеина (0,001 – 0,7 моль/л) в исходных растворах, использованных для приготовления БСА-криогелей, мольное соотношение SS-мостов и растворенного Цис было от 12,6:1 (более чем 10-кратный недостаток восстановителя) до 12,6:700 (более чем 55-кратный избыток восстановителя дисульфидных связей). Оказалось, что наиболее оптимальными в отношении морфологии криогелей, выхода гель-фракции и характеристик набухания являлись образцы, полученные из начальных систем с [Цис]=0,01 моль/л (Таблица 4: **3б**), т.е. в случае, когда это соотношение было близко к эквимолярному. В начальных растворах с концентрацией БСА 30 и 40 мг/мл это соотношение было больше в 1,67 и 1,25 раз, соответственно, в пользу Цис.

4.2.2. Влияние температуры криогенной обработки на свойства БСА-криогелей 1-го типа.

Изучение влияния условий замораживания на результаты криотропного гелеобразования БСА показало, что диапазон температур замораживания/инкубирования в замороженном состоянии, в котором могли быть сформированы «удовлетворительные по качеству» губчатые БСА-криогели 1-го типа, оказался довольно узким. В частности, при температуре выше -15°C исходные реакционные растворы, в особенности с высоким содержанием мочевины, часто не замерзали ввиду очевидного криоскопического эффекта. В свою очередь, криогенная обработка при -25°C или ниже приводила к получению либо крайне слабых по своей текстуре полупрозрачных криогелей, экспериментальная оценка с достаточной точностью характеристик которых представлялась затруднительной (Таблица 5: **3а** и **3б**), либо криотропное гелеобразование не проходило вовсе (Таблица 5: **3в-3д**). Таким образом, рабочий температурный диапазон для формирования данных систем лежал в пределах -15 - -25°C , и наилучшие по прочности криогели были получены при проведении замораживания/инкубирования в замерзшем состоянии в узком диапазоне температур от -15 до -20°C . Сравнение результатов криоструктурирования БСА при -15 и -20°C показало, что самые высокие значения выхода гель-фракции достигались криогенной обработкой растворов состава БСА + мочевина + Цис при -15°C (Таблица 5: **1а-1в**). Также полученные при данной отрицательной температуре криогели

обладали наиболее приемлемыми свойствами в отношении стабильности морфологии и механических свойств гелевых образцов (Таблица 5: **1а-1в** и **2а-2в**). При сопоставлении характеристик степени набухания БСА-криогелей, полученных замораживанием при -15 и -20°C эквиконцентрированных растворов предшественников (Таблица 5: № **1** и **2**) было найдено, что во всех случаях полимерная сетка стенок макропор криогелей, полученных при -15°C, набухала в меньшей степени, чем полимерная фаза криогелей, полученных при -20°C (Таблица 5), что указывало на менее плотную сшивку последних.

Таким образом, исследования влияния состава исходных реакционных систем и условий проведения процесса замораживания/инкубирования в замороженном состоянии на эффективность криотропного гелеобразования БСА, индуцированного добавкой мочевины и Цис, показал, что возможность формирования таких БСА-криогелей, а также свойства этих губчатых материалов обусловлены первоначальной концентрацией альбумина, обязательным присутствием как денатурирующего агента, так и восстановителя SS-связей, а также их концентрацией в реакционной системе и температурой проведения криогенной обработки.

Таблица 5. Влияние температуры замораживания/инкубирования в замороженном состоянии на морфологию и физико-химические характеристики БСА-криогелей 1-го типа.

Пример №	Концентрация компонента в исходном растворе			Температура замораживания (°C)	Качественное описание морфологии образца после завершения цикла замораживания-оттаивания	Свойства полученных БСА-криогелей	
	[БСА] (мг/мл)	[Мочевина] (моль/л)	[Цис] (моль/л)			Выход геле-фракции (%)	Степень набухания ($S_{w/w}$; г H ₂ O/г сухого полимера)
1 а	40,0	0,5	0,01	-15	Мягкий губчатый криогель	91,0 ± 0,6	1,58 ± 0,07
б		1,0			Упругий губчатый криогель	89,8 ± 0,9	1,87 ± 0,10
в		1,5			Упругий губчатый криогель	86,2 ± 2,0	1,88 ± 0,20
г		2,0			Губчатый криогель	82,0 ± 0,7	1,98 ± 0,19
д		2,5			Слабый губчатый криогель	78,7 ± 2,2	1,73 ± 0,16
2 а	40,0	0,5	0,01	-20	Слабый губчатый криогель	78,0 ± 1,5	1,95 ± 0,06
б		1,0			Губчатый криогель	83,5 ± 1,9	2,73 ± 0,29
в		1,5			Губчатый криогель	79,5 ± 2,9	3,23 ± 0,68
г		2,0			Слабый криогель, содержащий желеобразные включения	57,8 ± 8,9	3,89 ± 0,62
д		2,5			Слабый криогель, содержащий желеобразные включения	39,4 ± 5,4	2,87 ± 0,53
3 а	40,0	0,5	0,01	-25	Слабый криогель, плохо удерживающий свою форму	75,1 ± 4,3	3,13 ± 0,69
б		1,0			Желеобразный криогель	37,7 ± 7,2	7,84 ± 3,67
в		1,5			Подвижная жидкость	—	—
г		2,0			Подвижная жидкость	—	—
д		2,5			Подвижная жидкость	—	—

4.2.3. Устойчивость БСА-криогелей 1-го типа в различных солюбилизирующих средах.

В целях исследования устойчивости полученных гелевых материалов в различных средах образцы помещали в колбы, заполненные, соответственно, либо водным раствором мочевины с концентрацией 8 моль/л (Рисунок 16: **а**), или водным раствором гуанидлгидрохлорида с концентрацией 5 моль/л (Рисунок 16: **б**) или 1%-ным водным раствором додецилсульфата натрия (ДСNa, Рисунок 16: **в**), в которых БСА-криогели инкубировали в течение 48 часов при комнатной температуре. Оказалось, что такие гелевые образцы не растворялись в указанных растворах и только до определенной степени набухали с видимым изменением исходной формы (Рисунок 16: **Ряд 2**). В наименьшей степени набухал образец, погруженный в концентрированный раствор мочевины, которая, как известно, является агентом, эффективно разрушающим водородные связи [155]. Несколько больше БСА-криогели набухали в концентрированном растворе гуанидлгидрохлорида, способного дестабилизировать как водородные, так и ионные связи. Наконец, наиболее выраженное набухание наблюдалось в случае образца, который выдерживали в растворе ДСNa, что свидетельствует об участии в стабилизации трехмерной гелевой сетки БСА-криогелей 1-го типа межмолекулярных гидрофобных взаимодействий, нарушавшихся под действием поверхностно-активного вещества. После данной стадии набухания в каждую колбу с криогелем добавляли концентрированный водный раствор ДТТ, восстанавливающего дисульфидные связи [98], таким образом, что его конечная концентрация в каждой системе составляла 0,1 моль/л.

Добавление ДТТ вызывало полное растворение всех трех образцов (Рисунок 16: **Ряд 3**), что указывает на разрушение SS-мостов в узлах пространственной полимерной сетки в таких БСА-криогелях и позволяет сделать вывод о том, что в процессе криогенной обработки водных растворов БСА, также содержащих определенные количества денатурирующего агента (мочевина) и восстановителя (Цис), происходит образование ковалентно сшитых альбуминовых криогелей, при этом межмолекулярными ковалентными сшивками в таких криогелях являются SS-связи. Помимо образующихся межмолекулярных дисульфидных связей значительный вклад в стабилизацию пространственной структуры полимерной сетки БСА-криогелей 1-го типа вносят гидрофобные взаимодействия, а также, но в меньшей степени, в стабилизации участвуют ионные и водородные связи.

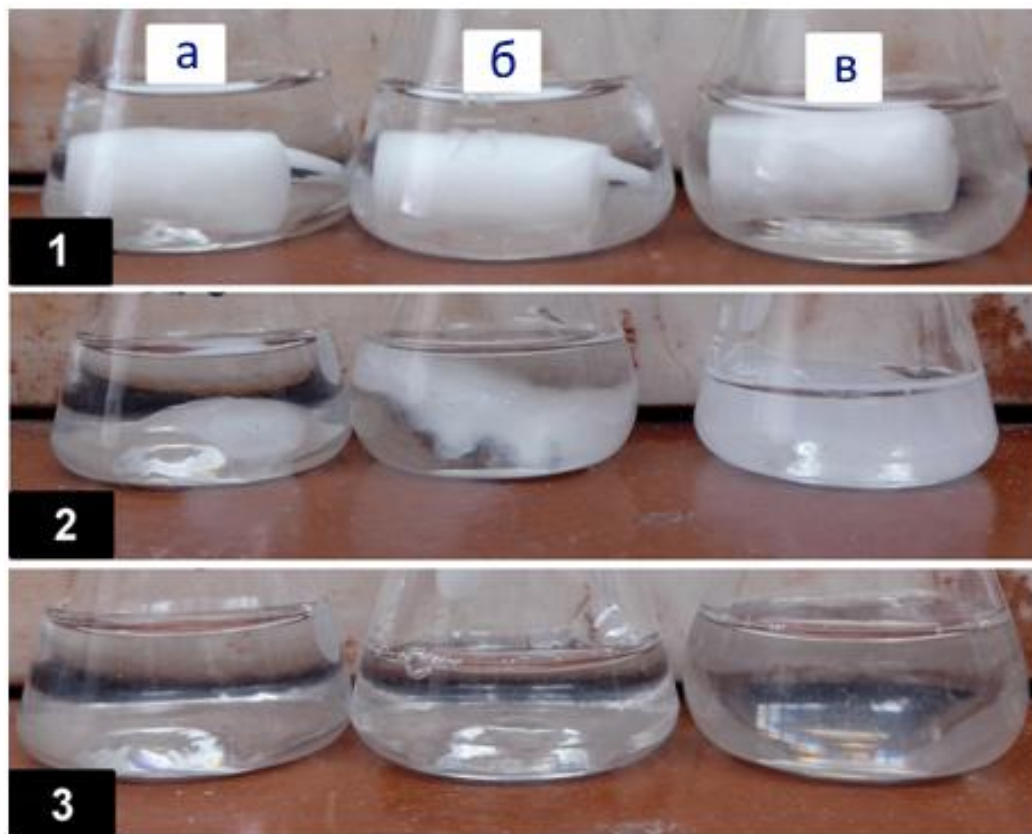


Рисунок 16. Фотографии БСА-криогелей 1-го типа, полученных замораживанием при -15°C водных систем с концентрацией БСА 3 г/дл, мочевины – 1,0 моль/л и Цис – 0,01 моль/л, через 5 минут (**Ряд 1**) и 24 часа (**Ряд 2**) после погружения образцов в 8-молярный водный раствор мочевины (**а**), 5-молярный водный раствор гуанидилгидрохлорида (**б**) и 1%-ный водный раствор ДСNa (**в**), а также через 24 часа после внесения в каждую систему ДТТ (0,1 моль/л, **Ряд 3**).

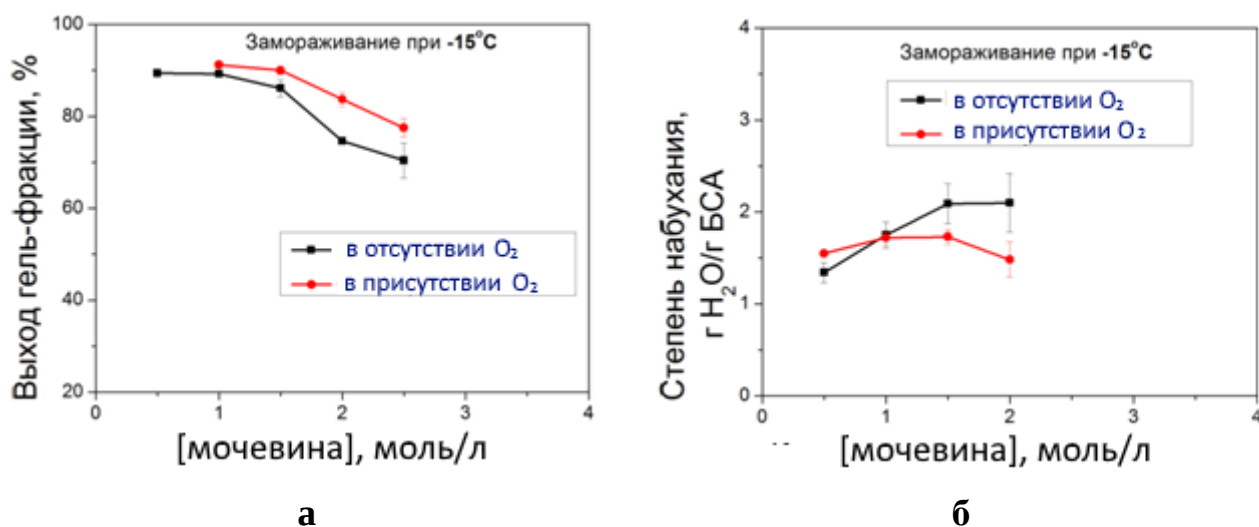


Рисунок 17. Зависимость выхода гель-фракции (**а**) и степени набухания (**б**) БСА-криогелей 1-го типа, полученных из растворов состава БСА + мочевина + Цис в воде, предварительно перегнанной в аргоне, либо без предварительной дегазации. O_2 .

Как правило, реакции образования дисульфидных связей чувствительны к присутствию в системе растворенного кислорода [68, 196]. Результаты дополнительных опытов (Рисунок 17) по синтезу альбуминовых криогелей из растворов, полученных с использованием деионизованной воды, предварительно дегазированной посредством перегонки в токе аргона, указывают на то, что наличие в исходном водном растворе предшественников некоторой фракции растворенного кислорода не приводит к существенному падению выхода гель-фракции, по сравнению с результатами, полученными в условиях дополнительной дегазации реакционного раствора.

4.2.4. Предполагаемый механизм формирования БСА-криогелей 1-го типа.

В случае концентрации Цис в начальных растворах, равной 0,001 и 0,01 моль/л (Таблица 4: **3а** и **3б**), соотношение числа внутримолекулярных SS-мостов белка и восстановителя было близким к эквимольному, таким образом, формирование межмолекулярных дисульфидных связей могло быть связано с механизмом тиол-дисульфидного обмена (Рисунок 18: **а**) [68]. Параллельно с протеканием такого рода химических реакций присутствие в системе денатурирующего агента, т.е. мочевины, способствует разворачиванию макромолекул БСА, таким образом, диффузия Цис к внутримолекулярным SS-мостам внутри глобулы БСА проходит легче.

С другой стороны, согласно вышеприведенной схеме реакций тиол-дисульфидного обмена в случае избытка восстановителя, то есть при [Цис]=0,1 и 0,7 моль/л *de novo* сформированные межцепные SS-мосты должны восстанавливаться, что должно было бы препятствовать образованию трехмерной альбуминовой гелевой сетки. Практика получения альбуминовых криогелей, однако, свидетельствует об обратном, что позволяет предположить, существование процессов, защищающих межмолекулярные дисульфидные мосты от восстановления в присутствии избытка тиола. Наблюдаемое поведение БСА-криогелей 1-го типа в различных солюбилизирующих средах позволяет предположить совместное действие как ковалентной сшивки цепей развернутого белка через реакции тиол-дисульфидного обмена, так и, по аналогии с овальбуминовыми криогелями [154], нековалентной ассоциации посредством гидрофобных взаимодействий разворачивающихся в присутствии денатурантов БСА-глобул.

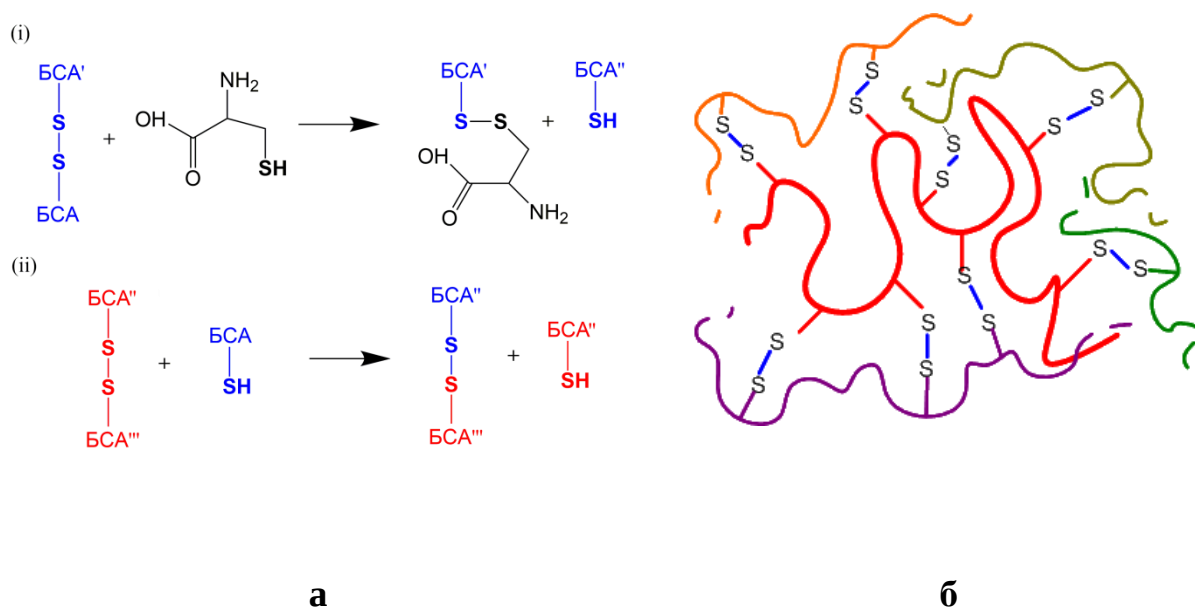


Рисунок 18. Схема реакций тиол-дисульфидного обмена [13] (**а**), в результате которых формируется пространственная гелевая сетка (**б**) БСА-криогелей 1-го типа. Синим и красным выделены сегменты отдельных полипептидных цепей альбумина.

В результате такого комбинированного механизма межмолекулярной сшивки должны формироваться узлы полимерной гелевой сетки, включающие внутримолекулярные SS-мосты, встроенные в участки микросреды, более гидрофобной относительно других сегментов сольватированных в водной среде полипептидных цепей. Вероятно, даже в случае избытка Цис такие гидрофобные домены способны стерически или по причине повышенной их гидрофобности препятствовать диффузии растворенного в воде восстановителя к расположенным в них ковалентно сшитым узлам гелевой сетки (Рисунок 18: **б**), защищая их от восстановления в высоковязкой среде незамерзшей жидкой микрофазы реакционной системы. Последующее оттаивание реакционной среды вследствие разбавления приводит к дополнительному резкому падению концентрации растворенных мочевины и Цис и, следовательно, к снижению вероятности восстановления ковалентно-сшитых узлов. Такое предположение основывается, во-первых, на известных данных о жестких условиях, требуемых для практически полной денатурации глобул БСА в растворах, когда концентрация мочевины превышает 5 моль/л, и восстановитель дисульфидных связей присутствует в значительном избытке [98, 153, 155], поскольку такие глобулы характеризуются достаточно «консервативной» третичной

структурой, большинство SS-мостов в которой расположены глубоко внутри глобулы БСА [148, 153]. Таким образом, при низкой концентрации тиол-содержащих восстановителей могут протекать только реакции тиолдисульфидного обмена, в результате приводящие к олигомеризации БСА-макромолекул [68, 163].

4.2.5. Изменение конформационного состояния БСА под влиянием мочевины и Цис в ходе криотропного гелеобразования в неглубоко замороженных средах.

В исследовании, посвященном криотропному гелеобразованию овальбумина в неглубоко замороженных средах в присутствии мочевины [6], установлено, что глобулярные макромолекулы овальбумина в среде НЖМФ претерпевают частичную денатурацию (разворачивание), что тем самым, приводит к «открытию вакантных сайтов» для межцепных гидрофобных взаимодействий, приводивших к формированию узлов пространственной сетки получаемых в результате криогелей. Таким образом, было важно изучить, в какой мере изменялась нативная конформация альбумина, встраивавшегося в пространственную сетку БСА-криогелей 1-го типа. Для этой цели был использован метод высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии (ВЧ-ДСК); исследования проведены в группе д.х.н. В.Я. Гринберга (ИНЭОС РАН). На Рисунке 19а приведены термограммы суспензий БСА-криогелей в буферном растворе, а также термограмма нативного БСА, растворенного в той же буферной среде. Асимметрия пика теплоемкости чистого альбумина, отвечающего его термической денатурации, объясняется содержанием в его макромолекулах связанных эндогенных лигандов (липидов) [153, 179, 180]: основной пик соответствует денатурации свободной от лигандов формы белка, а минорный высокотемпературный пик – денатурации белок-липидного комплекса. Для этого препарата БСА были найдены следующие значения параметров денатурации: температура денатурации $T_d = 71^\circ\text{C}$ (определена по основному пику теплоемкости); энтальпия денатурации $\Delta_d h = 15,8 \text{ Дж} \cdot \text{г}^{-1}$ и инкремент теплоемкости денатурации $\Delta_d c_p = 0,35 \text{ Дж} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. В дополнение к этому, термограмма иллюстрирует известную особенность денатурационного поведения БСА – его пост-денатурационную агрегацию, проявляющуюся в снижении теплоемкости при температурах опыта выше 90°C . Для оценки конформационного состояния макромолекул белка, встроенных в пространственную сетку БСА-криогеля, его образец сначала дезинтегрировали в буферном растворе до

частиц размером порядка 10 мкм и затем полученную суспензию исследовали методом ВЧ-ДСК. Термограммы БСА-криогелей 1-го типа заметно отличаются от термограмм

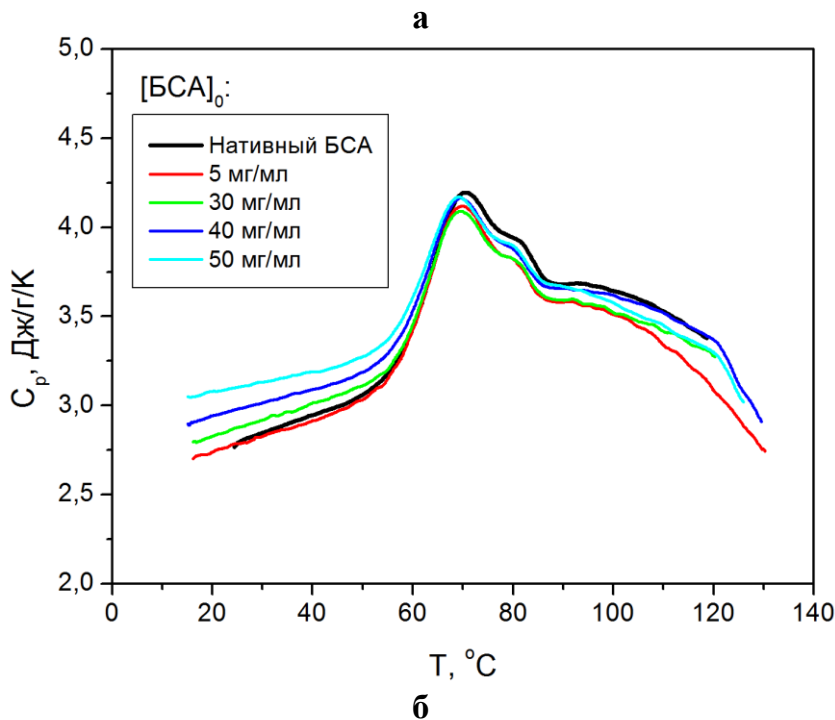
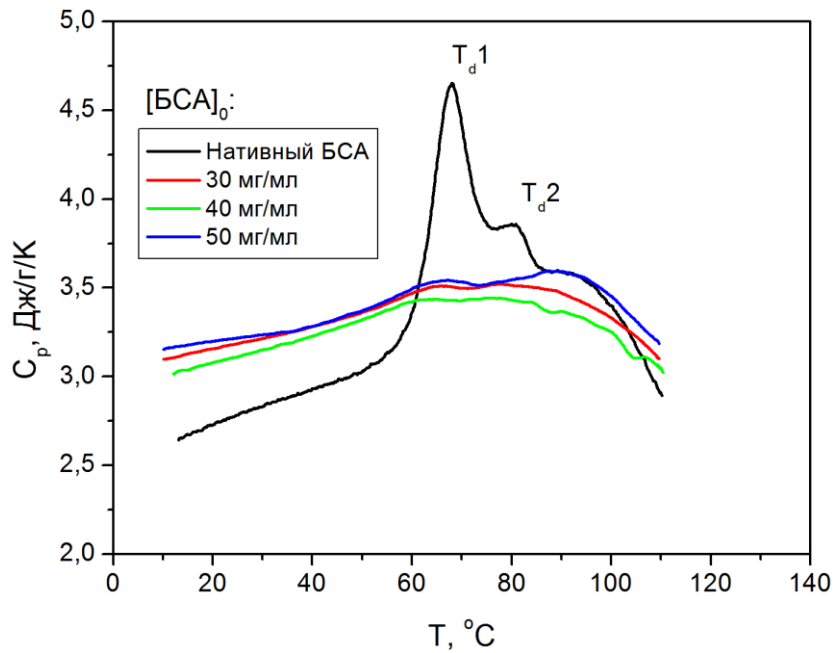


Рисунок 19. (а): Термограммы нативного БСА (1) и БСА-криогелей 1-го типа, сформированных замораживанием (при -20°C в течение 20 ч) реакционных смесей, концентрация белка в которых составляла 30, 40 и 50 мг/мл, в присутствии мочевины и цистеина (измеренные в 20 мМ Na-фосфатном буферном растворе, 0,15 М NaCl, pH 7,4). **(б):** Термограммы нативного БСА и растворов БСА, концентрация белка в которых составляла 5, 30, 40 и 50 мг/мл, подвергнутых замораживанию при -20°C в течение 20 ч (измеренные в воде, pH 6,5-6,6).

нативного белка, причем независимо от концентрации белка в исходной реакционной смеси вырождаются оба денатурационных пика БСА. Это доказывает существенное нарушение нативной конформации БСА, входящего в состав пространственной сетки криогеля, т.е. белок, по существу, встраивается в нее в денатурированном виде.

Однако пост-денатурационная агрегация БСА в составе криогелей аналогична нативному БСА. Это означает, что конформационное состояние БСА в составе криогеля не соответствует конформации полностью развернутого клубка и он сохраняет некоторые функциональные возможности и способен участвовать в формировании надмолекулярных структур. Возможны две причины, по которым белок теряет свою третичную структуру: в результате так называемой обратимой холодовой денатурации во время замораживания или по причине образования пространственной сетки криогеля. Для уточнения были проведены калориметрические измерения для растворов БСА в воде (без добавок мочевины и/или Цис), подвергнутых замораживанию-оттаиванию, а также для нативного БСА в воде (Рисунок 19: **b**). Профиль термограмм всех белковых растворов, подвергнутых замораживанию-оттаиванию независимо от концентрации белка были практически аналогичным для нативного БСА. Из этого следует, что в отсутствие мочевины и Цис обработка замораживанием и оттаиванием раствора БСА не приводит к существенному изменению третичной структуры белка. Иными словами, холодовая денатурация БСА в воде является обратимой. Таким образом, наблюдаемые конформационные изменения БСА в составе криогелей вызваны образованием гелевой сетки из уже существенно денатурированных в присутствии мочевины и Цис макромолекул альбумина.

4.2.6. Влияние условий формирования на широкопористую морфологию БСА-криогелей 1-го типа

Интегральные свойства различных криогелей зависят не только от характеристик собственно гелевой фазы, но и от широкопористой морфологии таких полимерных криогелей [15, 98, 152], что подчеркивает важность оценки влияния условий получения альбуминовых криогелей на особенности их микроструктуры. Приведенные на Рисунке 20 микрофотографии, полученные с помощью оптического стереомикроскопа, показывают широкопористую текстуру дисков БСА-криогелей толщиной 1 мм, окрашенных метиленовым синим. Данные образцы были изготовлены путем замораживания при -15 или -20°C растворов БСА с концентрацией 40 мг/мл с различным содержанием в них

мочевины и постоянной (0,01 моль/л) концентрацией цистеина. На изображениях Рисунка 20 гелевая фаза - это узкие темные элементы структуры, а большие поры губчатого материала - светлые области.

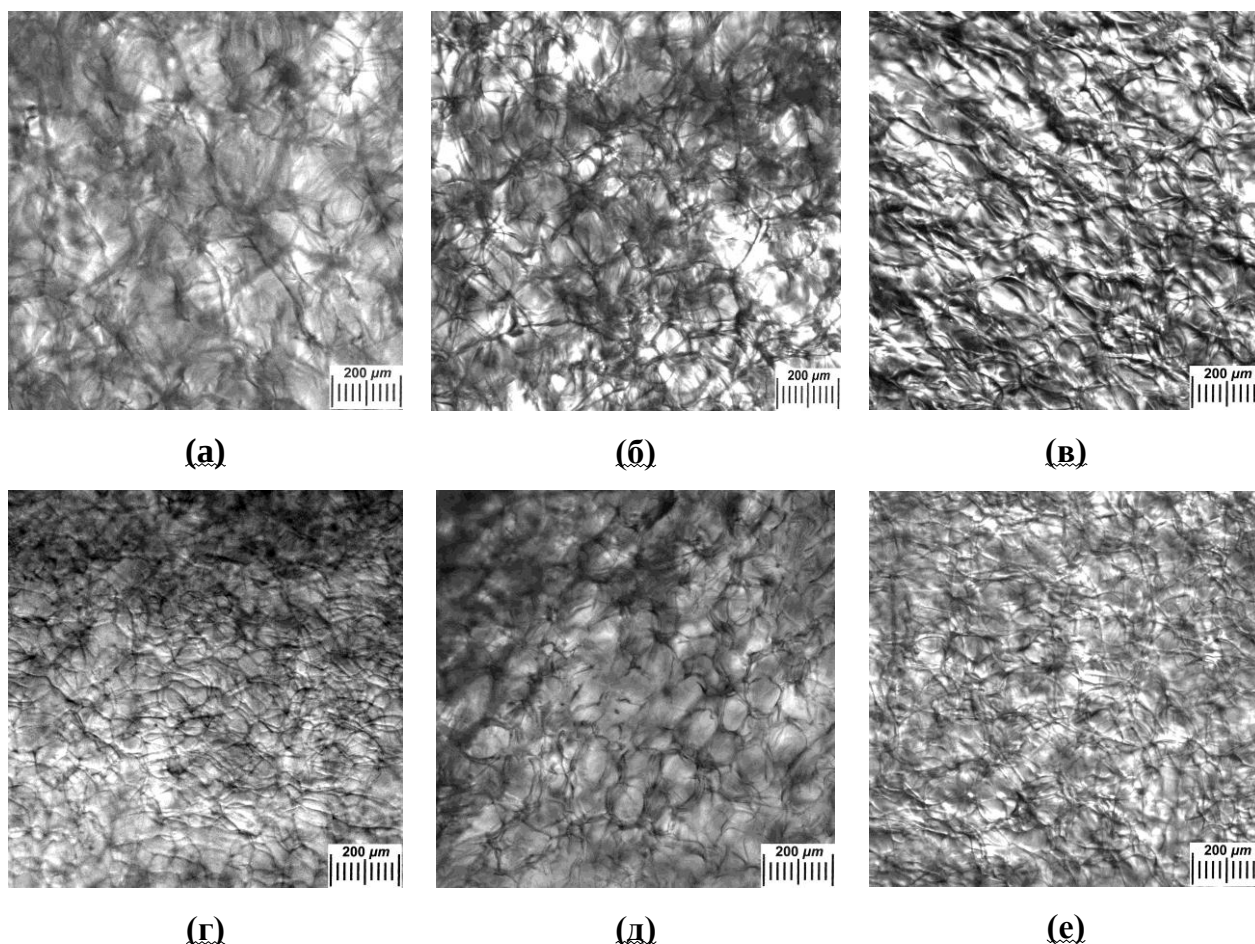


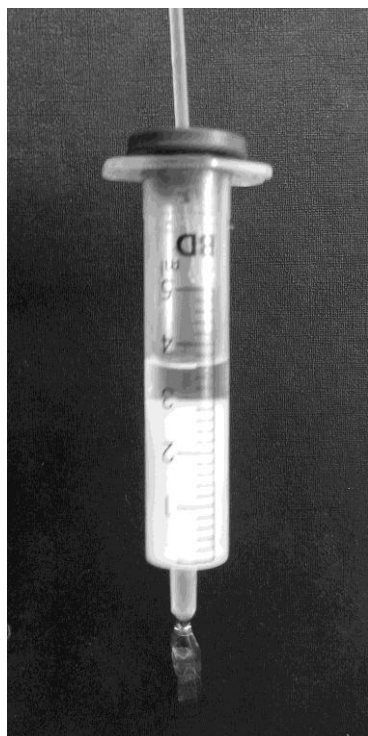
Рисунок 20. Полученные с помощью оптического стереомикроскопа изображения дисков БСА-криогелей 1-го типа толщиной 1 мм, окрашенных метиленовым синим, сформированных замораживанием при -15°C (а-в) или -20°C (г-е) растворов альбумина с концентрацией 40 мг/мл, содержавших 0,01 моль/л Цис и мочевины в следующих концентрациях: 0,5 моль/л (а, г), 1,0 моль/л (б, д) и 1,5 моль/л (в, е).

В дополнение к микрофотографиям в Таблице 6 суммированы данные о размерах пор полученных образцов и о гидродинамических характеристиках аналогичных БСА-криогелей, сформированных в виде цилиндрических блоков внутри пластиковых шприцов (Рисунок 21). Скорость протока является важным в прикладном аспекте показателем, который на качественном уровне может отражать степень пористости образцов [15]. Из данных, приведенных в Таблице 6, следует, что чем больше диаметр пор БСА-криогелей и, соответственно, площадь сечения пор, тем больший объем жидкости в еди-

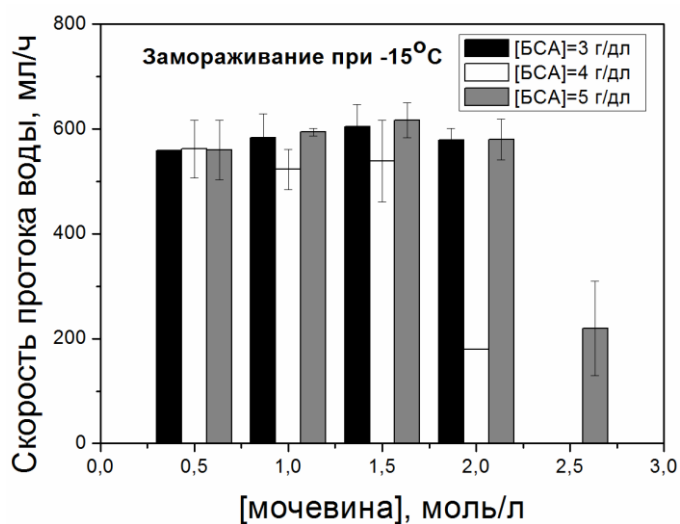
ницу времени может протекать через колонку, заполненную таким пористым материалом.

До замораживания исходной системы предшественники криогеля были равномерно распределены в объеме всего раствора, по завершении криотропного гелеобразования сшитый полимер сконцентрировался в тонких стенках макропор (Рисунок 20), на которые приходится лишь малая часть общего объема образца. Например, значение степени набухания порядка 2-3 мл воды на 1 г сухого БСА для большинства полученных образцов соответствует концентрации белка в стенках макропор таких альбуминовых криогелей порядка 500-333 мг/мл, что в почти в 10 раз больше, чем в исходном растворе и что наглядно демонстрирует эффект криокоцентрирования, когда содержание полимера в стенках макропор фактически на порядок превышает концентрацию белка в исходном растворе. Подобный эффект типичен для широкопористых криогелей в целом, как сформированных полимеризацией низкомолекулярных мономеров [15, 173], так и полученных на основе высокомолекулярных предшественников [158, 174].

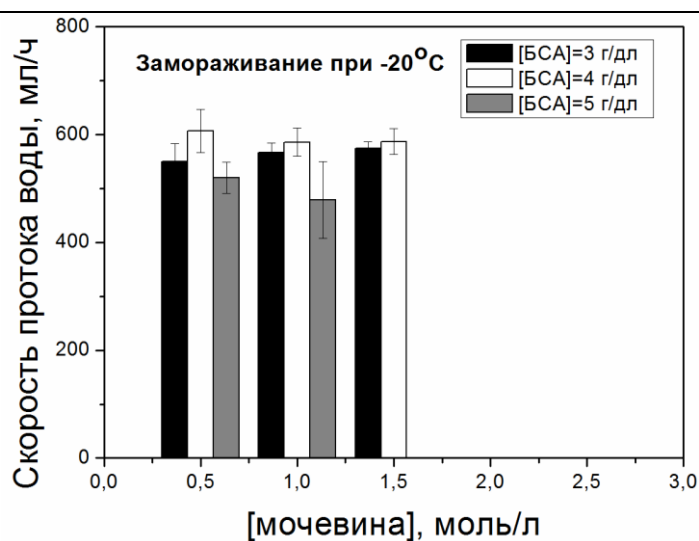
Как правило, размер и форма макропор в таких гетерофазных гелевых системах, а также толщина стенок пор, определяются множеством факторов, в том числе химической природой и начальной концентрацией растворенных веществ, типом используемого растворителя и режимом криогенной обработки [98, 131, 143]. В рассматриваемом случае наиболее очевидной тенденцией, наблюдавшейся для текстуры изученных БСА-криогелей, было уменьшение размера макропор образцов с понижением температуры криотропного гелеобразования от -15 до -20°C (Рисунок 20; Таблица 6: Примеры 1 и 2). Этот эффект описан для различных криогелей [15, 98, 152, 160, 161], поскольку чем ниже температура, при которой проводят криоструктурирование, тем, как правило, образуются более мелкие частицы порогена (т.е. поликристаллы растворителя) в том случае, если процессу замораживания не препятствует эффект переохлаждения [15, 152]. Помимо температуры криогенной обработки, также заметно некоторое воздействие на морфометрические параметры БСА-криогелей начальной концентрации хаотропного агента: с ростом содержания мочевины в начальной реакционной среде размер макропор образцов, сформированных при -15°C (Таблица 6: **1а-1г**), несколько уменьшался или проходил через максимум для криогелей, сформированных при более низкой температуре -20°C (Таблица 6: **2а-2в**). Та же тенденция была характерная для значений протока воды через цилиндрические блоки альбуминовых криогелей 1-го типа (Рисунок 21; Таблица



а



б



в

Рисунок 21. (а) Образец БСА-криогеля 1-го типа, помещенный в пластиковый шприц, через который пропускают жидкость при давлении гидростатического столба 900 мм; графические зависимости скорости потока воды через блок БСА-криогеля, полученного замораживанием при -15°C (б) и -20°C (в) водных растворов БСА (40 мг/мл), Цис (0,01 Моль/л) и различных количеств мочевины.

б). Подобные результаты свидетельствуют о том, что присутствие мочевины влияет не только на эффективность криотропного гелеобразования БСА (Таблицы 4 и 5), но и на геометрические особенности поликристаллов льда. Схожее влияние мочевины ранее наблюдалось для процесса гелеобразования овальбумина в умеренно замороженных системах, индуцированного добавкой этого денатуранта [24].

Таблица 6. Результаты количественного анализа изображений (оптическая микроскопия) БСА-криогелей 1-го типа и величины скорости потока воды через соответствующие цилиндрические образцы, сформированные замораживанием^{а)} растворов белка, содержавших различные количества денатуранта.

Пример №	Концентрация компонента в системе ^{б)}			Температура замораживания ^{б)} (°C)	Характеристики пористости полученных БСА-криогелей 1-го типа			Скорость потока воды через 3мл-блок БСА-криогеля 1-го типа
	[БСА] (мг/дл)	[Мочевина] ₀ (моль/л)	[Цис] (моль/л)		D _n , мкм	D _w , мкм	k=D _n /D _w	
1 а	40,0	0,5	0,01	-15	105,4 ± 31,7	148,0 ± 59,3	1,40	562 ± 55
б		1,0			102,0 ± 25,8	149,9 ± 61,1	1,47	539 ± 78
в		1,5			98,9 ± 26,1	127,3 ± 42,9	1,29	528 ± 38
г		2,0			92,2 ± 24,6	120,1 ± 40,9	1,30	с)
2 а	40,0	0,5	0,01	-20	68,2 ± 14,9	86,0 ± 25,4	1,26	580 ± 15
б		1,0			73,9 ± 17,3	95,5 ± 31,5	1,29	607 ± 40
в		1,5			57,7 ± 16,6	75,8 ± 29,0	1,31	587 ± 24
г		2,0			в)	в)	в)	в)

^{а)} Продолжительность замораживания и инкубирования в замороженном виде во всех случаях составляла 20 ч.

^{б)} Варьировавшиеся параметры выделены жирным курсивом.

^{в)} Измерения не проводились по причине недостаточной механической прочности образцов

Таким образом, при изучении альбуминовых криогелей 1-го типа, которые являлись первым объектом настоящего исследования, показано:

1. сформированные губчатые криогели являются широкопористыми, устойчивыми к высокотемпературной обработке, хорошо пропускающими воду гетерофазными гелевыми материалами, сшитая полимерная сетка которых полностью состоит из белка;

2. трехмерная полимерная сетка БСА-криогелей 1-го типа стабилизирована, главным образом, за счет межмолекулярных дисульфидных связей, образованных в результате реакций тиол-дисульфидного обмена;

3. такие свойства рассматриваемых альбуминовых криогелей, как выход гелевой фракции, степень набухания полимерной фазы в стенках макропор, скорость протока жидкости через широкопористый материал, а также его микроструктура зависят от соотношения предшественников в исходной системе и температурного режима ее последующей обработки.

4.3. Получение, свойства и структура БСА-криогелей 2-го типа.

Другой известный подход к образованию ковалентных узлов трехмерной сетки широкопористых белковых криогелей основан на использовании сшивающих агентов, например, карбонильных соединений типа формальдегида [9] и глутарового альдегида [26, 25, 27, 163], небелковые фрагменты которых в результате оказываются встроенными в ковалентно сшитую полимерную сетку соответствующего криогеля. Такого рода химическая модификация альбуминовой матрицы в принципе нежелательна для последующего биомедицинского применения из-за возможных токсических эффектов продуктов биodeградации белковой основы. Хотя сшитая за счет *de novo* образованных дисульфидных связей гелевая сетка БСА-криогелей 1-го типа не содержала привнесенных включений небелковой природы, глобулярная конформация самих макромолекул альбумина, входивших в ее состав, нарушалась действием мочевины и восстанавливающего тиола [164]. Для получения криогелей, построенных из преимущественно глобулярного сывороточного альбумина, полностью состоящих из веществ белковой природы, перспективным является подход, основанный на использовании в качестве сшивателей конденсирующих реагентов, например, ферментов типа транsgлутаминазы [167] или водорастворимых карбодимидов [165, 166], формирующих в мягких условиях межмолекулярные пептидные связи и не требующих разрушения нативной конформации белка. В

этих случаях получающаяся сшитая трехмерная полимерная сетка состоит только из белка и не содержит включений иной химической природы.

4.3.1. Влияние исходной концентрации предшественников на свойства БСА-криогелей 2-го типа.

Аминокислотная последовательность БСА наряду с 35 звеньями цистеина включает 99 остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также 60 звеньев лизина [153], наличие в структуре которых, соответственно, β - и γ -карбоксильных групп и ε -аминогрупп позволяет применять для сшивки альбумина водорастворимые карбодиимиды [165, 166], с образованием межцепных пептидных связей, играющих роль химических узлов пространственной сетки соответствующих гелевых матриц. В качестве сшивающего агента нами был использован N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид (ЭДК) (Рисунок 22: **б**), реагирующий с COOH-группой соответствующего аминокислотного остатка (**а**) с образованием производного O-ацилизомочевины (**в**), последующее взаимодействие которого с боковой первичной аминогруппой остатка лизина (**г**) приводит к замещенному амиду (**д**) (новообразованная пептидная связь в штриховой рамке на Рисунке 22), а присоединивший воду конденсирующий агент переходит в раствор в виде N,N'-замещенной мочевины (**е**) [168, 196].

Стерическая доступность различных карбоксильных и амино-групп в глобуле БСА неодинакова с точки зрения возможности их участия в образовании межмолекулярных сшивок, что делало необходимым определение на начальном этапе граничных концентраций гелеобразующего биополимера и сшивающего агента в исходном растворе с целью получения структурированных альбуминовых криогелей, хорошо сохраняющих свою целостность при манипуляциях и поэтому удобных для дальнейшего исследования их свойств и морфологии.

В ходе таких предварительных экспериментов было показано, что «рабочая» концентрация БСА в его исходных растворах составляла от 30 до 50 мг/мл, а для ЭДК интервал таких концентраций был 0,06-0,24 моль/л (или 5,5-22 мг/мл). Принимая во внимание эти диапазоны, молекулярную массу БСА и содержание в нем остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также то, что первой фазой химического взаимодействия конденсирующего агента с макромолекулами альбумина является «активация» карбоксильных групп белка, для исследованных нами вариантов диапазонов соотношений

$n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}:n_{\text{NH}_2}$ лежал в пределах от 1:0,8:0,6 до 1:5,5:0,6. При меньших, чем минимальные из указанных значений, формировались механически слабые образцы, иногда даже в виде отдельных фрагментов, а при более высоких концентрациях предшественников, чем верхняя граница рабочего диапазона, получались неоднородные по текстуре губки, плохо пропускавшие промывную жидкость.

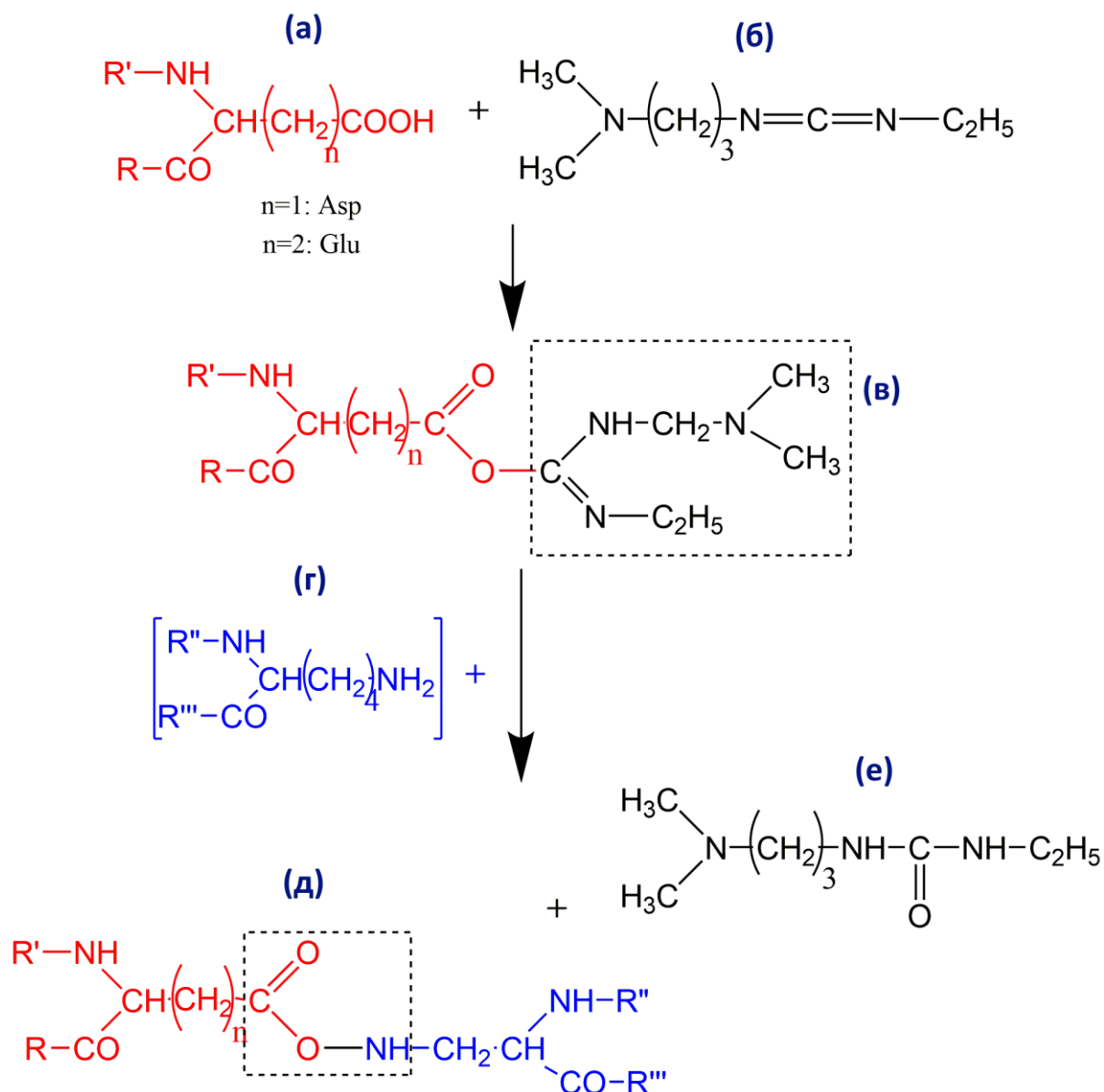


Рисунок 22. Общая схема реакций образования межмолекулярных пептидных связей с помощью ЭДК (R и R' – сегменты полипептидной цепи одной молекулы белка, R'' и R''' – сегменты полипептидной цепи другой молекулы белка).

При использованных нами условиях экспериментов образование ковалентно-сшитой пространственной сетки макропористых БСА-криогелей происходило с высокой эффективностью – практически во всех случаях выход гель-фракции превышал 80% (Таблица 7). При фиксированной исходной концентрации БСА увеличение количества вводимого в систему сшивающего агента обычно приводило к некоторому вполне ожидаемому росту выхода гель-фракции (Таблица 7: **а-г** для каждого из вариантов **1-9**), что часто наблюдается [170, 171] при формировании полимерных гелей и криогелей сшивкой высокомолекулярных предшественников в среде растворителя при условии отсутствия микрофазного расслоения в массе геля. В то же время, зависимость величины Y от концентрации альбумина в диапазоне 30-40-50 мг/мл (Таблица 7: варианты **1-3**, **4-6** и **7-9**) была слабо выражена и в большей степени определялась не концентрацией белка, а соотношением $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}:n_{\text{NH}_2}$. Дальнейшие исследования влияния условий гелеобразования на его эффективность, свойства получавшихся в результате криогелей и их микроструктуру были выполнены в найденных пределах концентраций предшественников.

4.3.2. Влияние температуры криотропного гелеобразования на свойства БСА-криогелей 2-го типа.

Такие же предварительные опыты, имевшие целью определение оптимального интервала температур криогенной обработки исходных растворов БСА+ЭДК, позволили установить, что по причинам, аналогичным БСА-криогелям 1-го типа, замораживание и последующую инкубацию образцов в замороженном состоянии целесообразнее всего проводить при одной из температур в диапазоне от -15 до -25°C. В целом, наиболее «прочными» на качественном уровне были препараты БСА-криогелей, сформированные при -20°C. Незначительное снижение величины Y имело место для образцов, полученных из растворов с $[БСА]=50$ мг/мл их замораживанием при самой низкой из применявшихся температур (т.е. при -25°C), особенно при наименьшей концентрации сшивающего агента (Таблица 7: **9а**).

Степень набухания химически-сшитых образцов в основном определяется числом узлов их гелевой сетки (т.е. числом межмолекулярных связей) [170, 171], и чем таковых меньше, тем сильнее сетка набухает. В этом аспекте довольно неоднозначными оказались зависимости степени набухания полимерной фазы крупнопористых БСА-криогелей 2-го типа от температуры криогенной обработки исходных растворов с различным соот-

ношением $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}:n_{\text{NH}_2}$. Так, для всех образцов, сформированных замораживанием растворов предшественников при -15°C (Таблица 7: №№ 1, 4, 7) и, частично, при -20°C (Таблица 7: №№ 2 и 5), наблюдалась неожиданная тенденция – степень набухания полимерной фазы, т.е. трехмерной сетки стенок макропор губчатого материала, в той или иной мере повышалась по мере роста концентрации вводимого в реакцию карбодиимида (Таблица 7). Для криогелей, приготовленных замораживанием при -20°C раствора с $[\text{БСА}]=50$ мг/мл (Таблица 7: № 8), зависимость величины $S_{w/w}$ от концентрации ЭДК имела слабо выраженный максимум (Таблица 7: № 8в), и только в случае образцов, сформированных при -25°C (Таблица 7: №№ 3, 6 и 9), эта зависимость была стандартной – с возрастанием количества кросс-агента в гелеобразующей системе степень набухания полученных губчатых препаратов понижалась (Таблица 7; отчетливо прослеживается для исходной концентрации ЭДК 0,06 моль/л).

Мы предположили, что такие необычные зависимости степени набухания полимерной сетки от количества вводимого в систему ЭДК могут быть обусловлены особенностями химической модификации БСА. При этом количество модифицированных группировок связано с соотношением реагентов в растворе предшественников, подвергаемом затем криогенной обработке. Поскольку в диапазоне исходных концентраций БСА 30-50 мг/мл и ЭДК 0,06-0,24 ммоль/мл водорастворимый карбодиимид в большинстве случаев был в избытке по отношению к COOH -группам белка (Таблица 7: №№ 4-9), а содержание первичных аминогрупп в сывороточном альбумине в 1,7 раз меньше, чем COOH -функций, то некоторая часть производных O -ацилизомочевины (Рисунок 22: **в**) оставалась «незадействованной» в пептидной конденсации из-за недостатка для нее аминных функций. Использование большего избытка ЭДК, очевидно, приводило к замещению в белке большего числа COOH -групп (Рисунок 22: **а**) с двумя координирующими воду (за счет водородного связывания) атомами кислорода на более объемные группировки, содержащие дополнительно еще три координирующих воду атома азота (Рисунок 22: **в**). Несомненно, это должно повышать водоудерживающую способность модифицированной более гидрофильной сетки, и, как следствие, ее степень набухания.

Как правило, температурные зависимости эффективности криотропного гелеобразования различных систем имеют экстремальный вид [143, 152] вследствие конкуренции ряда факторов, основными из которых являются, с одной стороны, способствующее гелеобразованию криоконцентрирование предшественников в НЖМФ [153], а, с другой

Таблица 7. Условия формирования, выход гель-фракции и степень набухания полимерной фазы БСА-криогелей 2-го типа.

№ п/п	Состав исходного раствора			Температура криогенной обработки (°C)	Результаты криотропного гелеобразования	
	[БСА] (мг/мл)	[ЭДК] (ммоль/мл)	Мольное соотношение * $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}:n_{\text{NH}_2}^*$		Y (%)	$S_{w/w}$ (г H ₂ O/г сух.полимера)
1	2	3	4	5	6	7
1а	30,0	0,06	1:1,4:0,6	-15	83,7 ± 3,6	1,96 ± 0,07
б		0,12	1:2,8:0,6		86,7 ± 6,8	1,96 ± 0,12
в		0,18	1:4,2:0,6		92,5 ± 2,2	2,17 ± 0,17
г		0,24	1:5,5:0,6		92,6 ± 2,8	2,38 ± 0,18
2а		0,06	1:1,4:0,6	-20	87,1 ± 8,2	2,03 ± 0,13
б		0,12	1:2,8:0,6		88,0 ± 4,9	2,10 ± 0,12
в		0,18	1:4,2:0,6		91,6 ± 2,6	2,12 ± 0,07
г		0,24	1:5,5:0,6		93,5 ± 1,8	2,36 ± 0,08
3а		0,06	1:1,4:0,6	-25	83,9 ± 0,8	2,43 ± 0,14
б		0,12	1:2,8:0,6		89,0 ± 2,6	2,35 ± 0,07
в		0,18	1:4,2:0,6		91,5 ± 3,5	2,17 ± 0,09
г		0,24	1:5,5:0,6		93,2 ± 0,7	2,13 ± 0,08
4а	40,0	0,06	1:1:0,6	-15	82,9 ± 2,4	2,01 ± 0,09
б		0,12	1:2:0,6		92,0 ± 2,0	2,06 ± 0,12
в		0,18	1:3:0,6		94,3 ± 0,5	2,09 ± 0,08
г		0,24	1:4:0,6		96,1 ± 0,7	2,34 ± 0,18

Таблица 7. (Продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
5a	40,0	0,06	1:1:0,6	-20	87,1 ± 5,7	1,96 ± 0,10
б		0,12	1:2:0,6		92,1 ± 3,3	2,07 ± 0,11
в		0,18	1:3:0,6		92,3 ± 2,5	2,09 ± 0,09
г		0,24	1:4:0,6		91,7 ± 3,2	2,17 ± 0,10
6a		0,06	1:1:0,6	-25	83,7 ± 1,9	3,25 ± 1,05
б		0,12	1:2:0,6		86,3 ± 3,1	2,64 ± 0,19
в		0,18	1:3:0,6		87,4 ± 5,0	2,44 ± 0,10
г		0,24	1:4:0,6		92,0 ± 2,8	2,34 ± 0,14
7a	50,0	0,06	1:0,8:0,6	-15	88,5 ± 0,8	1,91 ± 0,11
б		0,12	1:1,6:0,6		93,3 ± 0,6	2,10 ± 0,15
в		0,18	1:2,4:0,6		93,1 ± 2,5	2,20 ± 0,10
г		0,24	1:3,2:0,6		95,8 ± 1,9	2,32 ± 0,18
8a		0,06	1:0,8:0,6	-20	88,6 ± 0,9	1,86 ± 0,02
б		0,12	1:1,6:0,6		91,7 ± 0,5	2,00 ± 0,06
в		0,18	1:2,4:0,6		92,5 ± 4,1	2,05 ± 0,11
г		0,24	1:3,2:0,6		96,3 ± 0,9	1,97 ± 0,03
9a		0,06	1:0,8:0,6	-25	78,0 ± 2,6	6,42 ± 1,36
б		0,12	1:1,6:0,6		84,5 ± 3,0	3,01 ± 0,49
в		0,18	1:2,4:0,6		85,9 ± 1,7	2,78 ± 0,58
г		0,24	1:3,2:0,6		89,6 ± 1,8	2,39 ± 0,09

* С точностью до первого знака после запятой.

стороны, снижающие эффективность гелеобразования очень высокая вязкость этих областей и уменьшение тепловой подвижности растворенных компонентов [152]. Часто индивидуальные особенности конкретной гелеобразующей системы приносят свои специфические эффекты. Вероятно, в случае БСА-криогелей 2-го типа, формируемых при -25°C (Таблица 4: №№ 3, 6 и 9), наблюдается нисходящая ветвь подобной экстремальной зависимости. По сравнению с процессами при -15 или -20°C , это приводит к снижению выхода гель-фракции и, соответственно, препятствует введению в химическую структуру белка большого количества остатков О-ацелизомочевины, влияющих на склонность полимерной фазы таких альбуминовых губок к набуханию.

4.3.3. Микроструктура БСА-криогелей 2-го типа.

Помимо режимов криогенной обработки, особенности пористой морфологии криогелей зависят от природы предшественников и их концентрации в замораживаемых системах [98, 143, 160, 172]. На микроструктуру широкопористых губчатых БСА-криогелей 1-го типа, обсуждавшихся в разделах 4.2.1-4.2.6, наиболее заметно влияет температура криогенной обработки, определяющая размер и геометрию кристаллов замерзшего растворителя, выполняющих в этих процессах функцию порогена [98, 152]. Однако, в случае БСА-криогелей 2-го типа явного влияния температуры замораживания системы (в диапазоне $-15 \dots -25^{\circ}\text{C}$) на пористую морфологию соответствующих образцов выявить не удалось. Иллюстрацией этому могут служить микрофотографии альбуминовых криогелей (Рисунок 23), сформированных в виде тонких дисков при -15 , -20 и -25°C из раствора с концентрацией БСА 50 мг/мл и ЭДК 0,12 моль/мл (Таблица 7: соответственно, №№ 7b, 8b и 9b).

Гетерогенность микроструктуры этих гелевых препаратов как в отношении формы крупных пор (светлые области изображения), их стенок (окрашенная метиленовым синим гелевая фаза), так и размеров, вероятно, обусловлена рядом факторов. В частности, при замораживании тонкого слоя исходного раствора (экспериментальная часть) высокая однородность температурных полей в пределах каждого образца трудно достижима. Кроме того, существенная структурная неоднородность полученных в результате криогелей, часто выражавшаяся в наблюдаемом пересечении разнонаправленных по горизонтали фронтов кристаллизации, по-видимому, обусловлена вероятностным характером нуклеации льда [175, 176] в замерзающих растворах, содержащих БСА и ЭДК. При-

чем, после криогенной обработки при -25°C именно тонких слоев растворов с концентрацией БСА 30 и 40 мг/мл, когда скорость движения таких фронтов кристаллизации была высокой, в ряде случаев формировались не цельные диски, а фрагментированные препараты, что не наблюдалось при формировании образцов аналогичного состава в шприцах.

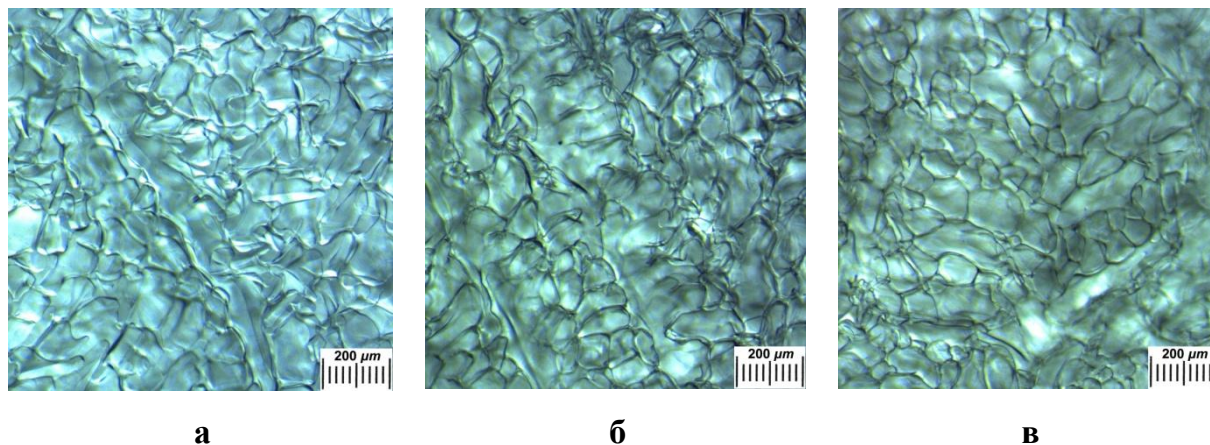


Рисунок 23. Микрофотографии дисков БСА-криогелей толщиной 1 мм, сформированных при -15 (а), -20 (б) и -25°C (в) из раствора предшественников с $[\text{БСА}]=50$ мг/мл и $[\text{ЭДК}]=0,12$ ммоль/мл (Таблица 4 и 5: №№ 7b, 8b и 9b).

Результаты количественного морфометрического анализа образцов, сформированных в температурном диапазоне $-15\dots-25^{\circ}\text{C}$, суммированы в Таблице 8 и позволяют выявить некоторые тенденции, свойственные именно БСА-криогелям 2-го типа. В частности, наблюдаемая на изображениях Рисунка 23 неоднородность микроструктуры тонких дисков альбуминовых криогелей существенным образом отражалась на разбросе измеряемых величин диаметров макропор, в ряде случаев достигая 35-45% от среднего значения (Таблица 8), причем с повышением концентрации полимера в исходном растворе, интервал такого разброса сокращался. Эта тенденция прослеживалась и в отношении коэффициента полидисперсности k . Аналогично БСА-криогелями 1-го типа, повышение исходной концентрации белка приводило к некоторому уменьшению усредненного диаметра макропор губчатых образцов: от примерно 84-193 мкм при $[\text{БСА}]=30$ мг/мл (Таблица 8: №№ 1-3) до 71-141 мкм при $[\text{БСА}]=40$ мг/мл (Таблица 8: №№ 4-6) и далее 45-134 мкм при $[\text{БСА}]=50$ мг/мл (Таблица 8: №№ 7-9). В отношении же зависимости морфометрических показателей БСА-криогелей от количества конденсирующего агента, т.е. ЭДК, вводимого в исходную систему, оказалось, что для образцов, полученных из растворов с $[\text{БСА}]=30$ и 40 мг/мл (№№ 1-6), какой-либо определенной тенденции проследить не удастся. Однако для более концентрированных систем ($[\text{БСА}] = 50$ мг/мл)

Таблица 8. Характеристики пористости БСА-криогелей, сформированных при разных температурах криотропного гелеобразования.

№ п/п	Состав исходного раствора*		Температура крио- генной обработки (°C)	Размер макропор		
	[БСА] (мг/мл)	[ЭДК] (ммоль/мл)		D_n (мкм)	D_w (мкм)	k
1	2	3	4	5	6	7
1а	30,0	0,06	-15	89 ± 30	128 ± 56	1,44
б		0,12		99 ± 22	119 ± 31	1,19
в		0,18		112 ± 29	154 ± 58	1,38
г		0,24		84 ± 17	103 ± 27	1,23
2а		0,06	-20	122 ± 36	193 ± 92	1,59
б		0,12		93 ± 19	107 ± 24	1,15
в		0,18		94 ± 23	119 ± 37	1,27
г		0,24		118 ± 30	160 ± 56	1,35
3а		0,06	-25	**	**	**
б		0,12		**	**	**
в		0,18		**	**	**
г		0,24		**	**	**
4а	40,0	0,06	-15	96 ± 23	118 ± 33	1,23
б		0,12		103 ± 28	141 ± 53	1,36
в		0,18		83 ± 26	140 ± 64	1,70
г		0,24		71 ± 21	93 ± 34	1,32

Таблица 8 (Продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
5a	40,0	0,06	-20	93 ± 26	124 ± 45	1,33
б		0,12		81 ± 20	102 ± 32	1,26
в				56 ± 14	82 ± 33	1,45
г		0,24		87 ± 24	119 ± 44	1,36
6a		0,06	-25	**	**	**
б		0,12		**	**	**
в		0,18		81 ± 13	90 ± 17	1,12
г		0,24		69 ± 22	94 ± 37	1,37
7a	50,0	0,06	-15	80 ± 22	106 ± 39	1,33
б		0,12		93 ± 25	119 ± 40	1,29
в		0,18		74 ± 20	96 ± 33	1,30
г		0,24		45 ± 10	59 ± 15	1,18
8a		0,06	-20	95 ± 25	132 ± 49	1,39
б		0,12		99 ± 21	125 ± 38	1,27
в		0,18		83 ± 21	106 ± 34	1,28
г		0,24		69 ± 19	91 ± 32	1,32
9a		0,06	-25	96 ± 27	134 ± 53	1,39
б		0,12		85 ± 23	115 ± 43	1,35
в		0,18		65 ± 19	86 ± 32	1,32
г		0,24		61 ± 15	79 ± 27	1,29

* Мольное соотношение $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}:n_{\text{NH}_2}$ см. Таблица 7.

** Неоднородные или фрагментированные тонкие диски БСА-криогелей.

(Таблица 8: №№ 7-9) по мере повышения исходной концентрации ЭДК при всех трех температурах криотропного гелеобразования происходило уменьшение сечения пор получаемых БСА-криогелей 2-го типа. Вероятно, это связано с уменьшением размеров поликристаллов льда по мере повышения концентрации низкомолекулярного электролита (хлоргидрат ЭДК) аналогично ранее наблюдавшемуся для криогелей поливинилового спирта уменьшению сечения макропор с ростом концентрации ряда солей, вводимых в исходный раствор полимера [177].

4.3.4. Конформационное состояние макромолекул альбумина, встроенных в пространственную сетку БСА-криогелей 2-го типа.

Глобула сывороточного альбумина стабилизирована 17-тью внутримолекулярными дисульфидными мостами, водородными и ионными связями, а также гидрофобными взаимодействиями [153, 155], и как указывалось ранее, изменения в ее структуре под действием различных физико-химических факторов могут быть количественно охарактеризованы методом высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии (ВЧ-ДСК) [43]. На Рисунке 24 приведены термограмма раствора исходного БСА (1), использованного в данной работе для получения криогелей, а также термограммы БСА-криогелей 2-го типа, сформированных из исходных растворов БСА (40 мг/мл) и кросс-агента, при мольном соотношении $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$: 2:1 (2), 10:1 (3) и 50:1 (4).

Кривая 4 на Рисунке 24, отвечает сшитому с помощью ЭДК альбуминовому криогелю и существенно отличается от термограммы раствора исходного альбумина: на ней отсутствуют какие-либо кооперативные переходы, сопряженные с теплопоглощением при разворачивании глобулы. Этот результат указывает на то, что БСА в составе криогеля либо находится в сильно денатурированном состоянии, как в случае БСА-криогелей 1-го типа, либо конформация глобул БСА настолько прочно зафиксирована многоточечными межмолекулярными ковалентными сшивками, что термоденатурация блокирована, по крайней мере, в диапазоне температур ДСК эксперимента.

Уже упоминавшаяся выше холодовая денатурация альбумина [181] также может быть одной из вероятных причин наблюдаемого изменения термограммы БСА после криотропного гелеобразования. Термодинамические параметры тепловой денатурации альбумина, а именно T_d , $\Delta_d h$ и $\Delta_d c_p$, позволяют рассчитать температурную зависимость свободной энергии денатурации белка $\Delta_d g(T)$ в широком интервале температур [182],

включая температуры ниже 0°C. На Рисунке 25 приведена такая зависимость для БСА при pH 7,4, полученная расчетным путем д.х.н. В.Я. Гринбергом. Она представляет собой кривую с максимумом в области физиологических значений температуры (область максимальной стабильности белка). Температура, при которой функция $\Delta_d g(T)$ обращается в ноль, соответствует температуре денатурации: правая точка на кривой при $T_d^h = 71^\circ\text{C}$ соответствует тепловой денатурации БСА, в то время как холодной денатурации БСА отвечает левая точка при $T_d^c = -12^\circ\text{C}$, что близко к температурам получения БСА-криогелей 2-го типа ($-15 \dots -25^\circ\text{C}$). Следовательно, криотропное гелеобразование идет в условиях, обеспечивающих частичное разворачивание альбуминовой глобулы. Параллельно с этим присутствующий в системе сшивающий агент фиксирует набор развернутых состояний белка в сетке геля. В отсутствие восстановителей или окислителей дисульфидные связи не затрагиваются, т.е. макромолекулы белка остаются сшитыми внутримолекулярно, а межмолекулярная химическая фиксация препятствует ренатурации БСА, т.е. восстановлению его третичной структуры при последующем возвращении образца к комнатной температуре.

Такой «сценарий» вполне может быть причиной отсутствия денатурационного пика на термограмме криогеля (Рисунок 24: 2), что подтверждают термограммы для криогелей, сшитых с помощью гораздо меньших количеств ЭДК. Понижение соотношения $n_{\text{БСА}}:n_{\text{ЭДК}}$ от 1:50 до 1:2 в исходной реакционной системе приводило к снижению плотности сшивки гелевой сетки формировавшихся в результате БСА-криогелей, о чем свидетельствуют соответствующие термограммы 4-2 на Рисунке 24: при соотношении $n_{\text{БСА}}:n_{\text{ЭДК}}=1:50$ профиль кривой практически не содержит денатурационного пика, в то время как при $n_{\text{БСА}}:n_{\text{ЭДК}}=1:2$ термограмма образца практически идентична нативному БСА. Таким образом, менее плотная внутри- и межмолекулярная сшивка альбумина с помощью ЭДК при прочих равных условиях не препятствует его термической денатурации.

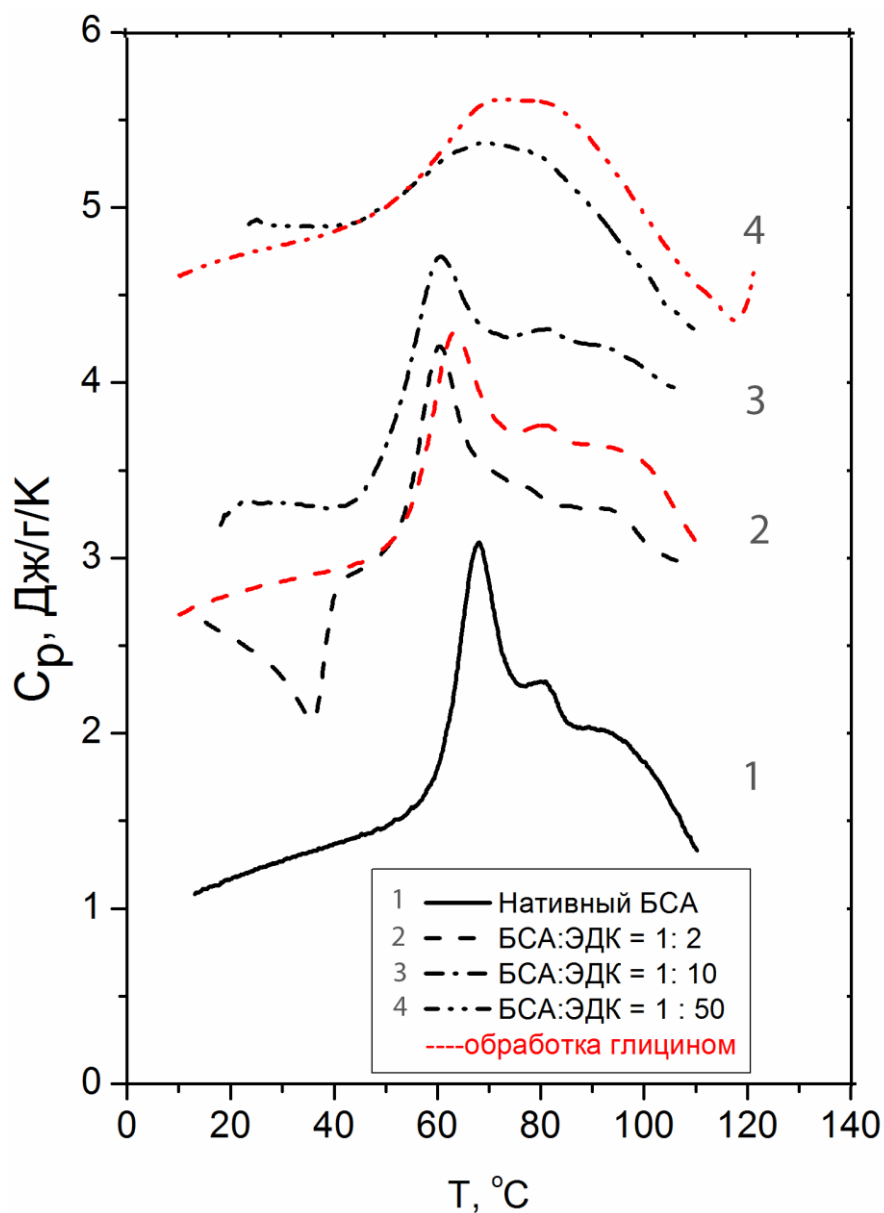


Рисунок 24. Термограммы раствора БСА и БСА-криогелей 2-го типа, полученных при различных соотношениях $n_{\text{БСА}}:n_{\text{ЭДК}}$ (20 мМ имидазольный буфер, 0,15 М NaCl, pH 7,4; концентрация белка 5 мг/мл; скорость нагревания 2 град мин⁻¹).

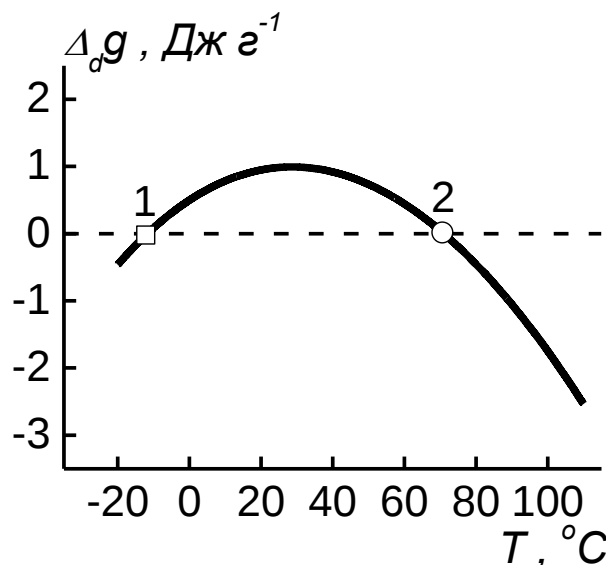


Рисунок 25. Температурная зависимость свободной энергии денатурации БСА при рН 7,4 (20 мМ имидазольный буфер, 0,15 М NaCl): 1 – точка холодной денатурации ($T_d^c = -12^\circ\text{C}$); 2 – точка тепловой денатурации ($T_d^h = 71^\circ\text{C}$).

4.3.5. Устойчивость БСА-криогелей 2-го типа к действию различных солюбилизирующих сред.

Для определения природы связей, стабилизирующих узлы пространственной полимерной сетки синтезированных альбуминовых криогелей, как и в случае БСА-криогелей 1-го типа, были проведены опыты, в которых исследуемые губчатые образцы инкубировали в различных солюбилизирующих водных растворах. Сильное набухание БСА-криогелей 2-го типа, не сопровождавшееся их растворением, после 24-часовой пребывания в указанных средах (Рисунок 26: г, д, е) свидетельствует, что собственно холодовая денатурация лишь в небольшой степени воздействовала на конформацию глобул БСА, тогда как хаотропные агенты, влияющие на нековалентные взаимодействия и разрушающие водородные, ионные и гидрофобные связи в таких прочно соединенных частично денатурированных глобулах, в существенной степени денатурировали сами белковые частицы. Введение в систему экзогенного восстановителя дисульфидных мостов, например ДТТ, приводило к дополнительному набуханию (Рисунок 26: к, л, м) исследуемых препаратов, что свидетельствует о расщеплении внутримолекулярных SS-связей, способствующему дальнейшему разворачиванию глобул и связанному с этим значительному возрастанию способности цепей к сольватации. Такое поведение БСА-

криогелей 2-го типа также служит (на качественном уровне) аргументом в пользу вывода, что полимерная фаза стенок макропор полученных нами криогелей построена из частично сохраняющих глобулярную конформацию макромолекул БСА, объединенных друг с другом в пространственной сетке боковыми пептидными (Рисунок 22: д) связями. Иными словами, одновременно протекающие в неглубоко замороженных системах БСА+ЭДК процессы холодовой денатурации белка и химического сшивания его макромолекул друг с другом приводят к тому, что образующаяся пространственная сетка полимерной фазы криогеля состоит из неполностью денатурированных глобул БСА, конформационная подвижность которых достаточно жестко блокирована большим числом «новых» пептидных связей в боковых цепях.

Таким образом, в ходе изучения БСА-криогелей 2-го типа, являвшихся вторым объектом данной работы, показано:

- Неглубокое ($-15\ldots-25^{\circ}\text{C}$) замораживание/оттаивание систем «вода – сывороточный альбумин – водорастворимый карбодиимид» приводит к получению химически-сшитых широкопористых (диаметр макропор от ~ 50 до ~ 200 мкм) белковых криогелей.
- Нативная структура глобул альбумина в ходе криотропного гелеобразования подвергается «холодовой денатурации», и одновременно с этим такая частично развернутая конформация белка жестко фиксируется межмолекулярными ковалентными сшивками, причем кросс-агент (ЭДК) не встраивается в пространственную сетку;
- Выход гель-фракции и степень набухания полимерной фазы образующихся губчатых матриц в основном зависят от исходной концентрации альбумина и количества вводимого в систему кросс-агента, а морфометрические характеристики пористой микроструктуры таких криогелей главным образом определяются температурой криогенной обработки.

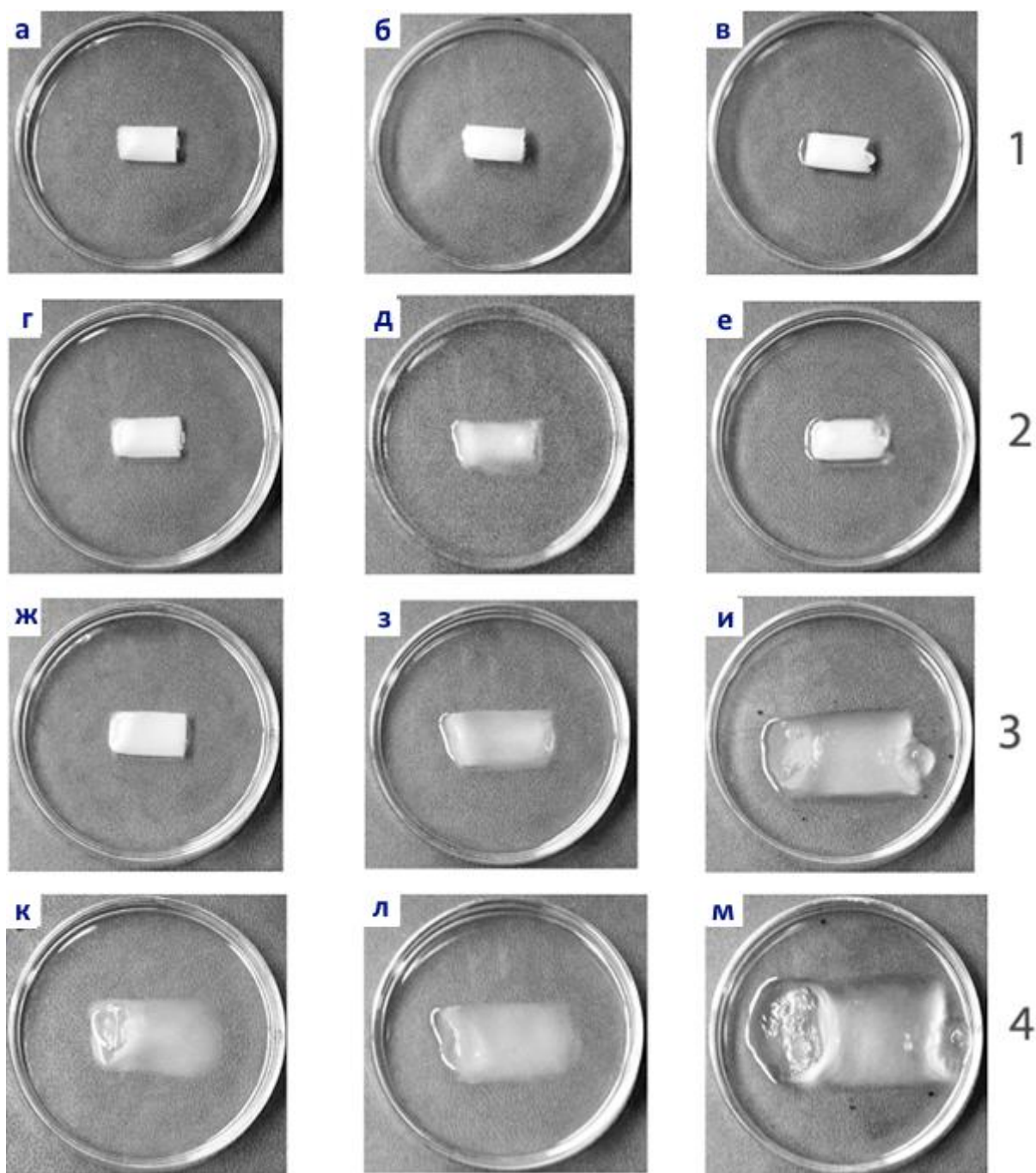


Рисунок 26. Фотографии БСА-криогелей 2-го типа, выполненные в форме цилиндрических блоков, через 1 минуту (1), 30 минут (2) и 24 часа (3) после погружения образцов в 8-молярный водный раствор мочевины (а, г, ж, к), 5-молярный водный раствор гуанидилгидрохлорида (б, д, з, л) и 1%-ный водный раствор ДСNa (в, е, и, м), а также через 24 часа после внесения в каждую систему добавки дитиотреита (4, 0,1 моль/л).

4.4. Получение, свойства и структура БСА-криоструктуратов

Как следует из литературного обзора, часто в практике гетерофазные гелевые материалы [183-189] могут быть сформированы различными способами [173, 190, 191], к которым также относится криотропное гелеобразование [98] и сублимационная сушка [192, 193]. Согласно классификации криоструктурированных пористых гелевых систем, приведенной в разделе 2.2.1.1., образование полимерной сетки криогелей, например, рассмотренных выше БСА-криогелей 1-го и 2-го типа, протекает непосредственно в объеме НЖМФ замороженной системы [153], ограниченной поликристаллами замерзшего растворителя, выполняющими роль порога. С другой стороны, в случае криоструктуратов формирование узлов их пространственной сетки происходит либо после (криоструктураты 1-го типа), либо до (криоструктураты 2-го типа) криогенной обработки системы. Здесь термин «криогенная обработка» обозначает замораживание исходного раствора (суспензии) предшественника и его сублимационную сушку, с последующей фиксацией широкопористой текстуры образующегося сухого белкового структурата ковалентной сшивкой полимера в растворе кросс-агента, где полимерная основа нерастворима [193]. Анализ литературы не дал четкого ответа на вопрос о том, насколько отличаются свойства белковых криогелей и криоструктуратов, сформированных из начальных систем, одинаковых по составу и типу предшественников. Поэтому представляло интерес создание альбуминовых криоструктуратов, используя в качестве начальных систем растворы белка с концентрацией в уже исследованном (в случае БСА-криогелей) диапазоне, а в качестве сшивающего агента – ЭДК при аналогичных соотношениях $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$ на стадии сшивки альбумина.

4.4.1. Влияние условий формирования на свойства БСА-криоструктуратов.

Широкопористые твердые лиофилизаты БСА являются водорастворимыми, и требуется последующая сшивка белка для получения нерастворимых в воде БСА-криоструктуратов. Химическую сшивку альбумина проводили обработкой белковых лиофилизатов раствором ЭДК в этаноле, в свою очередь, являющемся нерастворителем для БСА, но способном смачивать белковые материалы, что обеспечивает проникновение сшивающего агента во внутреннюю часть полимерной фазы. Целью данного раздела работы являлся поиск оптимальных условий формирования губчатых БСА-криоструктуратов, а также изучение их физико-химических свойств и широкопористой мор-

фологии в зависимости от концентрации предшественников и режимов криогенной обработки. Представляло также интерес сопоставление свойств ковалентно сшитых БСА-криоструктуратов с БСА-криогелями 2-го типа, сформированных замораживанием при аналогичных условиях эквиконцентрированных растворов БСА, содержащих добавку ЭДК. Схема приготовления широкопористых БСА-криоструктуратов приводится на Рисунке 27. Аналогично БСА-криогелям 2-го типа, готовые губчатые БСА-криоструктураты инкубировали в растворе глицина для дезактивации не вступивших в реакцию привитых производных ЭДК и обработанные таким способом образцы дополнительно промывали. Альбуминовые криоструктураты представляли собой мягкие белые губки, из которых при незначительной нагрузке могла быть легко отжата свободная жидкость (Рисунок 28: б), а при помещении в воду они быстро впитывали влагу с полным восстановлением их размеров и формы (Рисунок 28: а). Это свидетельствует о наличии в криоструктуратах открытых взаимосвязанных пор. В свою очередь взаимосвязанность пористой архитектуры криоструктуратов обусловлена причинами, аналогичными случаю БСА-криогелей: в процессе замораживания каждый порообразующий кристалл (лед) растет до тесного контакта с гранью соседнего кристалла [15, 98, 194].

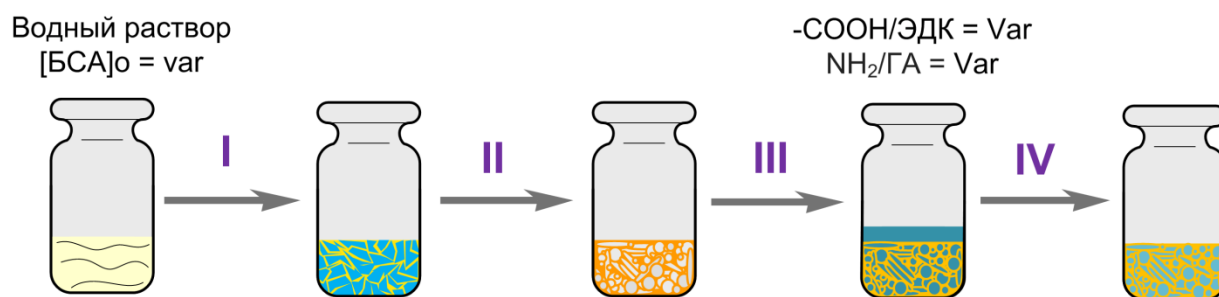


Рисунок 27. Последовательность стадий процесса формирования БСА-криоструктуратов

- (I) - заливка водных растворов БСА требуемой концентрации в стеклянные пузырьки и замораживание образцов при заданной отрицательной температуре;
- (II) - сублимационная сушка замороженных систем;
- (III) - химическая фиксация высушенных твердых широкопористых криоструктуратов их инкубированием в растворе ЭДК в этаноле;
- (IV) - отмывка сшитых губчатых криоструктуратов от водорастворимых примесей.

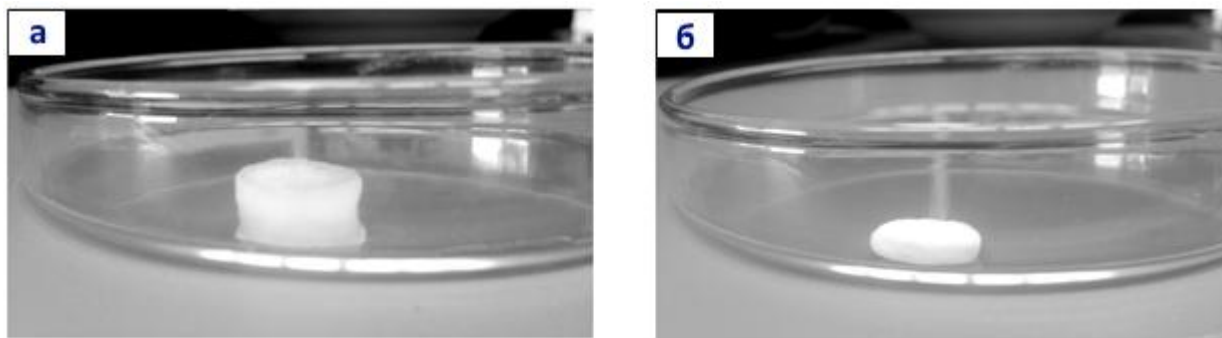


Рисунок 28. Внешний вид БСА-криоструктуратов, сформированных замораживанием при -15°C водного раствора БСА ($[\text{БСА}]_0=40$ мг/мл), последующим лиофильным высушиванием и сшивкой с помощью ЭДК в этаноле при соотношении $n_{\text{COOH}}/n_{\text{ЭДК}}=1:3$:

- а) набухший образец после промывки водой от спирта и золь-фракции;
 б) образец, из которого была отжата вода.

Представляло интерес оценить на качественном и количественном уровне влияние параметров стадий **(I)** - **(IV)** на характеристики и макропористую морфологию БСА-криоструктуратов. Переменными параметрами в этих экспериментах были начальная концентрация БСА в исходном водном растворе на стадии **(I)**, отношение $\text{COOH}/\text{ЭДК}$ на стадии сшивки белка **(IV)**, а также температура замораживания растворов БСА на стадии **(II)**, являющаяся основным фактором, влияющим на микроструктуру альбуминовых губок. Предварительные опыты позволили определить рабочие диапазоны варьирования концентрации биополимера в исходных растворах, из которых могли быть получены БСА криоструктураты с оптимальными физическими свойствами и текстурой, способные выдерживать (без разрушения) циклические нагрузки при отжиме и повторном набухании в ходе отмывки, отжима и последующих операциях, связанных с тестированием прикладного потенциала таких материалов.

Диапазоны концентраций белка в исходных растворах и температуры их криогенной обработки, которые позволяли получать наиболее стабильные для дальнейшего манипулирования губки, оказались близкими к описанным выше для БСА-криогелей. При концентрациях белка ниже 30 мг/мл получаемые криоструктураты имели низкую прочность и плохо сохраняли свою первоначальную форму после извлечения из воды, в то время как при начальной концентрации БСА выше 50 мг/мл образцы обладали неоднородной текстурой и были довольно хрупкими в высушенном виде. При температуре замораживания выше -15°C растворы БСА, особенно с концентрацией 50 мг/мл, зачастую не замерзали из-за эффектов переохлаждения, в то время как, замораживание при тем-

температуре ниже -25°C приводило к резкому уменьшению размера пор полученных криоструктуратов.

Аналогично рассмотренным выше БСА-криогелям, для оценки эффективности встраивания БСА в пространственную сетку формируемых криоструктуратов были определены величины выхода-гель-фракции, которые в определенной степени, но не очень заметно, зависели от таких факторов, как концентрация белка в исходных растворах на стадии (I), температура замораживания на стадии (II) и соотношение БСА/ЭДК на стадии сшивки криоструктурированного материала на стадии (IV). По сравнению с двумя предыдущими типами БСА-криогелей, эффективность ковалентной сшивки БСА в случае формирования криоструктуратов на его основе была наибольшей из всех трех рассмотренных до настоящего момента объектов и часто превышала 95% (Таблица 9), причем в случае использования большого избытка карбодиимида выход гель-фракции мог превышать 100% (Таблица 9: б). В целом выход гель-фракции несколько возрастал с увеличением количества сшивающего агента в спиртовом растворе, которым обрабатывали пористый белковый текстурат.

Причиной наблюдавшихся результатов может быть появление некоторой дополнительной массы на стадии обработки БСА-криоструктуратов раствором глицина в связи с прививкой остатков данной аминокислоты по остаткам О-ацил-изомочевины (Рисунок 22: в), не участвовавших в образовании межмолекулярных пептидных сшивок из-за меньшего количества $\omega\text{-NH}_2$ -групп лизина, по сравнению с количеством боковых СООН-групп аспартата и глутамата, а также по причине стерической недоступности некоторых реакционноспособных остатков внутри основной массы лиофилизата.

Степень набухания ковалентно сшитых полимерных сеток, как уже отмечалось выше, является чувствительным показателем плотности их сшивки [195]. Сшивка макромолекул БСА внутри концентрированной полимерной фазы в стенках макропор лиофилизата с помощью ЭДК в среде этанола приводила к формированию сильно сшитой пространственной сетки, о чем свидетельствует ее плохая способность к набуханию в воде. В общем случае, значения степени набухания ($S_{w/w}$) в воде полимерной фазы таких криоструктуратов (Таблица 10) были довольно низкими, порядка $\sim 0,9 \dots \sim 2$ г H_2O на 1 г сухого полимера, что в два раза меньше, чем в случае БСА-криогелей 2-го типа, полученных сшивкой альбумина с использованием в качестве кросс-агента такого же карбодиимида.

Таблица 9. Зависимость величины выхода гель-фракции БСА-криоструктуратов от исходной концентрации БСА в водных растворах, температуры криогенной обработки и соотношения белок/кросс-агент.

Концентрация БСА в исходном растворе (мг/мл)	$n_{\text{COOH}}:n_{\text{EDC}}$ (моль/моль) ^{а)}	Величина Y (%) для БСА-криоструктуратов, сформированных при различных температурах замораживания:		
		-15°C	-20°C	-25°C
30,0	1:0,5	96,1 ± 0,6	94,5 ± 0,5	93,3 ± 0,2
	1:1	98,0 ± 0,7	95,3 ± 0,1	94,7 ± 0,5
	1:2	99,2 ± 0,3	95,4 ± 0,2	95,7 ± 0,6
	1:3	100,0 ± 0,2 ^{б)}	95,9 ± 0,3	96,0 ± 0,8
	1:4	99,9 ± 1,3 ^{б)}	96,9 ± 1,1	95,7 ± 0,5
	1:6	101,0 ± 1,0 ^{б)}	98,4 ± 0,2	96,8 ± 1,5
40,0	1:0,5	95,3 ± 0,3	95,0 ± 2,0	94,9 ± 0,7
	1:1	96,3 ± 1,6	95,5 ± 0,7	95,3 ± 0,9
	1:2	97,1 ± 0,1	97,0 ± 0,7	97,9 ± 0,1
	1:3	99,1 ± 1,1	98,3 ± 0,3	96,8 ± 2,6 ^{б)}
	1:4	100,2 ± 0,2 ^{б)}	98,8 ± 0,6	100,5 ± 0,3 ^{б)}
	1:6	101,0 ± 0,2 ^{б)}	99,3 ± 0,9	103,9 ± 5,3 ^{б)}
50,0	1:0,5	93,9 ± 0,1	95,2 ± 0,6	95,7 ± 0,5
	1:1	94,8 ± 0,4	94,9 ± 1,9	96,8 ± 0,8
	1:2	95,6 ± 0,4	95,4 ± 0,8	98,3 ± 1,1
	1:3	96,5 ± 0,6	93,5 ± 3,9	97,9 ± 0,1
	1:4	98,7 ± 0,5	96,7 ± 1,7	97,7 ± 0,7
	1:6	99,4 ± 0,9	96,6 ± 2,9	98,0 ± 0,2

^{а)} $n_{\text{COOH}}:n_{\text{EDC}}$ представляет мольное отношение COOH-групп в составе БСА к количеству ЭДК на стадии (iv) ковалентной сшивки белка.

^{б)} Вероятной причиной превышения Y значения 100% может быть влияние на вес образца привитых глицильных остатков.

Таблица 10. Зависимость степени набухания полимерной фазы БСА-криоструктуратов от концентрации БСА в исходных растворах, температур криогенной обработки и соотношения белок/кросс-агент на стадии сшивки.

Концентрация БСА в исходном растворе (мг/мл)	$n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$ (моль/моль)	Величина $S_{w/w}$ (г H_2O /г БСА) для БСА-криоструктуратов, сформированных при различных температурах замораживания:		
		-15°C	-20°C	-25°C
30,0	1:0,5	$1,23 \pm 0,05$	$1,43 \pm 0,17$	$1,20 \pm 0,20$
	1:1	$1,24 \pm 0,06$	$1,38 \pm 0,13$	$1,37 \pm 0,16$
	1:2	$1,94 \pm 0,20$	$1,48 \pm 0,03$	$1,39 \pm 0,26$
	1:3	$1,48 \pm 0,18$	$1,66 \pm 0,09$	$1,67 \pm 0,28$
	1:4	$1,41 \pm 0,12$	$1,54 \pm 0,17$	$1,85 \pm 0,14$
	1:6	$1,36 \pm 0,08$	$1,39 \pm 0,10$	$1,46 \pm 0,18$
40,0	1:0,5	$1,34 \pm 0,08$	$1,34 \pm 0,11$	$1,45 \pm 0,03$
	1:1	$1,58 \pm 0,06$	$1,43 \pm 0,06$	$1,30 \pm 0,08$
	1:2	$1,53 \pm 0,08$	$1,56 \pm 0,19$	$1,19 \pm 0,06$
	1:3	$1,42 \pm 0,02$	$1,65 \pm 0,26$	$1,07 \pm 0,14$
	1:4	$1,24 \pm 0,16$	$1,96 \pm 0,36$	$1,01 \pm 0,03$
	1:6	$1,36 \pm 0,05$	$1,33 \pm 0,25$	$0,92 \pm 0,13$
50,0	1:0,5	$1,20 \pm 0,04$	$1,32 \pm 0,06$	$1,09 \pm 0,31$
	1:1	$1,27 \pm 0,13$	$1,30 \pm 0,22$	$1,43 \pm 0,11$
	1:2	$1,45 \pm 0,14$	$1,61 \pm 0,16$	$1,24 \pm 0,15$
	1:3	$1,45 \pm 0,03$	$1,47 \pm 0,21$	$1,11 \pm 0,10$
	1:4	$1,42 \pm 0,13$	$1,47 \pm 0,10$	$1,03 \pm 0,18$
	1:6	$1,41 \pm 0,05$	$1,39 \pm 0,08$	$0,94 \pm 0,06$

Наименьшими значениями $S_{w/w}$ (0,9-1,1 г/г) обладали образцы, полученные замораживанием растворов БСА с концентрацией 40-50 мг/мл при самой низкой из использованных нами температур, т.е. -25°C . Характер влияния концентрации ЭДК в растворе кросс-агента (Таблица 10: в виде соотношения $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$) на степень набухания полученных БСА-криоструктуратов был различным. Для всех образцов, замораживание которых проводили при -15 и -20°C , такая зависимость проходила через слабо выраженный максимум, положение которого зависело от соотношения $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$. Для образцов, полученных замораживанием растворов БСА с концентрацией 30 и 50 мг/мл при -25°C , тенденции были аналогичными, но в случае раствора альбумина с концентрацией 40 мг/мл величина $S_{w/w}$ систематически падала с ростом соотношения $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$ на стадии **(VI)**. Также в явном виде не выражена тенденция в отношении влияния температуры замораживания на степень набухания полученных БСА-криоструктуратов при условии одинаковой начальной концентрации предшественников. В некоторых случаях зависимости в температурном ряду -15 , -20 и -25°C оказывались нисходящими, в других случаях – возрастающими или же имели максимум (Таблица 10) несмотря на то, что все эквивалентированные образцы после их замораживания при различных температурах высушивали лиофильно в идентичных условиях. Это свидетельствует о разнонаправленном влиянии на свойства таких криоструктурированных губчатых материалов совокупности различных факторов, определяемых параметрами процесса их получения, включая температуру замораживания. К таким факторам можно отнести исходную концентрацию БСА, определяющую содержание белка в стенках макропор лиофилизованного белка и, очевидно, толщину их стенок; условия замораживания влияют на объем вымораживаемого растворителя и макропористую морфологию альбуминовых губок данного типа (рассмотрено далее), в то время как изменение концентрации ЭДК в спиртовом растворе на стадии обработки **(VI)** позволяет регулировать плотность сшивки, а также количество остатков О-ацил-изомочевины (Рисунок 22: **в**) и, как результат, глицильных заместителей, привитых впоследствии.

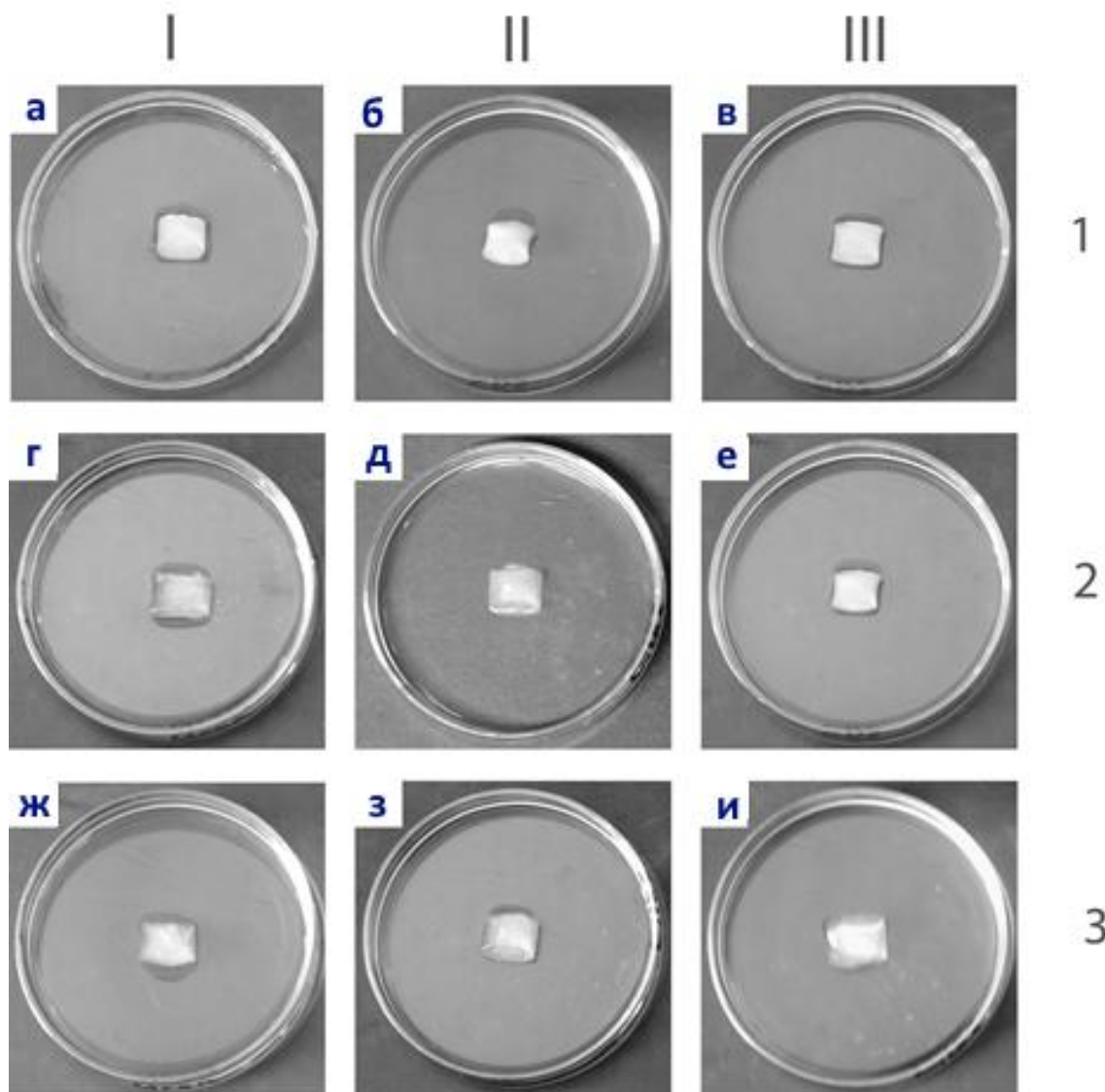


Рисунок 29. Фотографии БСА-криоструктуратов, сформированных замораживанием при -15°C водного раствора БСА (40 мг/мл) с последующим лиофильным высушиванием и сшивкой белка с помощью ЭДК в этаноле при соотношении $n_{\text{COOH}}/n_{\text{ЭДК}}=1:3$ через 30 минут - (Ряд 1) и (Ряд 2) - 24 часа после погружения образцов в 8-молярный водный раствор мочевины (Столбец I), 5-молярный водный раствор гуанидилгидрохлорида (Столбец II) и 1%-ный водный раствор ДСNa (Столбец III), а также через 24 часа (Ряд 3) после внесения в каждую систему добавки дитиотреита (0,1 моль/л).

4.4.2. Поведение БСА-криоструктуратов в солюбилизирующих средах.

Наличие частой ковалентной сшивки, стабилизирующей пространственную полимерную сетку полученных БСА-криоструктуратов подтверждают данные по набуханию образцов в жидких средах, способных селективно разрушать внутри- и межмолекулярные связи того или иного типа. Аналогично БСА-криогелям 1-го и 2-го типа мы исследовали влияние на набухание сшитых БСА криоструктуратов водных растворов мочевины (Рисунок 29: I), гуанидилгидрохлорида (Рисунок 29: II) и ДСNa (Рисунок 29: III) с последующим добавлением в каждую систему дитиотреита (ДТТ).

Образцы БСА-криогелей 1-го и 2-го типа заметно, но по-разному, набухали в различных средах, а в случае БСА-криогелей 1-го типа даже растворялись после введения в систему ДТТ. Напротив, инкубирование БСА-криоструктуратов в денатурирующих растворах (I), (II) и (III) в течение 24 часов приводило лишь к очень незначительному набуханию образцов. Их размер практически не изменялся в зависимости от типа испытательной среды даже в присутствии ДТТ (Рисунок 29: 3), расщепляющего внутримолекулярные SS-мосты в глобулах БСА, за исключением незначительного набухания БСА-криоструктурата в системе ДСNa + ДТТ (Рисунок 29: и). Эти результаты указывают на то, что макромолекулы альбумина в составе исследованных криоструктуратов по видимому крайне плотно сшиты друг с другом, а также, скорее всего, и внутримолекулярно множеством пептидных связей в боковых цепях, что препятствует заметному разворачиванию глобул белка.

4.4.3. Конформационные характеристики макромолекул альбумина в сшитой полимерной фазе широкопористых БСА-криоструктуратов.

Принимая во внимание довольно низкую степень набухания полимерной фазы (стенки макропор) БСА-криоструктуратов как в воде (Таблица 10), так и в сильных солюбилизирующих средах (Рисунок 29), высокую концентрацию белка и многоточечный характер его сшивки в составе пространственной сетки, представляла интерес оценка конформационной подвижности макромолекул БСА в полученных альбуминовых губках методом ВЧ-ДСК.

На термограммах на Рисунке 30 приведены температурные зависимости кажущейся парциальной теплоемкости БСА, приготовленного замораживанием при -15°C и

сублимационной сушкой раствора белка (40 мг/мл), с последующей обработкой лиофилизата чистым этанолом при условиях, использованных на стадии химической сшивки белка (1), а также БСА-криоструктурата, полученного замораживанием аналогично образцу (1) и затем ковалентной сшивкой с помощью ЭДК при соотношении $n_{\text{COOH}}/n_{\text{EDC}}=1:3$ (2).

Термограммы образца (1) содержат максимумы денатурации, которые свидетельствуют о вызываемом нагреванием разворачивании глобулы БСА. Денатурационная кривая образца (1) является мономодальной, в отличие от термограммы раствора коммерческого БСА (Рисунок 24: 1), имеющей бимодальный характер, обусловленный наличием в коммерческом образце белка определенного количества высших жирных кислот, которые обычно существуют в альбумине-реагенте вследствие их довольно высокой способности к гидрофобному взаимодействию с доменами сывороточного альбумина [148]. Связывание данных лигандов значительно увеличивает конформационную стабильность макромолекул БСА, которая выражается в относительно более высоких значениях температуры и энтальпии денатурации по сравнению с образцами альбумина, свободными от жирных кислот [180]. Обработка сухого белка этанолом приводила к удалению из его структуры жирных кислот и, вследствие этого, к снижению температуры (с 71,0°C до 66,4°C) и энтальпии (с 15,8 до 11,8 Дж/г) денатурации БСА, что следует из характера термограммы (1).

На ДСК-кривой (2) широкопористого БСА-криоструктурата, химически сшитого с помощью ЭДК, отсутствует пик поглощения, отвечающий денатурации белка, что вероятнее всего может указывать на «консервацию» основных элементов третичной структуры альбумина в диапазоне температур ДСК-эксперимента за счет многочисленных внутри- и межцепных ковалентных сшивок, образующихся при действии ЭДК на концентрированную биополимерную фазу в стенках пор лиофилизированного белка. Аналогично БСА-криогелям 2-го типа, подобная многоточечная сшивка блокирует конформационную подвижность БСА, прочно упакованного в пространственную полимерную сетку в стенках макропор таких криоструктуратов.

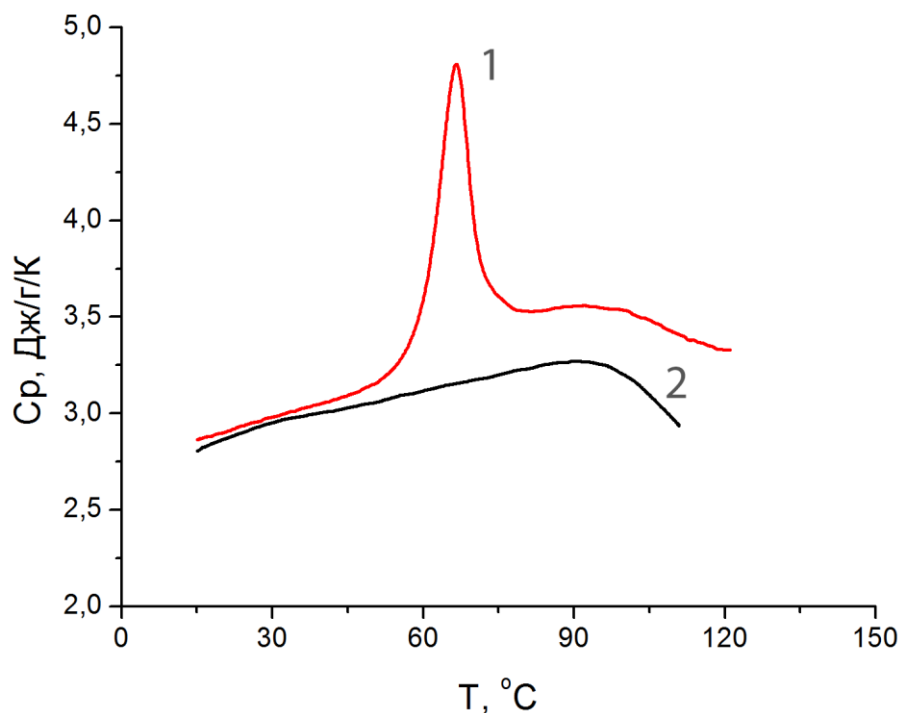


Рисунок 30. Изменение парциальной теплоемкости раствора БСА (красная кривая) и БСА-криоструктурата (черная кривая) в среде 20 ммольного имидазольного буфера, pH 7,4, 0,15 M NaCl:

1 – раствор чистого БСА, подвергнутый замораживанию при -20°C , лиофильному высушиванию и обработке этанолом;

2 – БСА-криоструктурат, полученный замораживанием при -15°C водного раствора БСА ($[\text{БСА}] = 40 \text{ мг/мл}$) с его последующей лиофилизацией и сшивкой полученного белка с помощью ЭДК в этаноле ($n_{\text{COOH}}/n_{\text{ЭДК}} = 1:3$).

4.4.4. Особенности широкопористой морфологии БСА-криоструктуратов.

Полученные с помощью стереомикроскопа микрофотографии на Рисунке 31 иллюстрируют губчатую структуру набухших в воде дисков таких альбуминовых криоструктуратов толщиной 1 мм, сформированных замораживанием раствора БСА с концентрацией 50 мг/мл при температуре в диапазоне $-15 \dots -25^{\circ}\text{C}$ с последующей лиофилизацией и обработкой кросс-агентом при соотношении $n_{\text{COOH}}/n_{\text{EDC}} = 1:3$. Эти образцы обладают гетерогенной широкопористой структурой, где темные структурные компоненты являются набухшей полимерной фазой стенок макропор, более светлые области – сами поры. Поперечное сечение пор в диапазоне от около 40 до 250 мкм, толщина стенок пор не превышает 5-15 мкм. Из морфометрических данных (D_n , D_w и коэффициент k), сопровождающих каждую микрографию, видно некоторое уменьшение размера пор с понижением температуры замораживания, что является общей тенденцией, неоднократно

описанной для ковалентно и нековалентно сшитых криоструктурированных матриц на основе синтетических и природных полимеров, полученных в замороженных водных, а также кристаллизующихся органических средах [15, 68, 98].

Морфология и размер пор лиофилизированных и затем сшитых с помощью ЭДК альбуминовых криоструктуратов весьма схожа с такими же характеристиками для эквиконцентрированных БСА-криогелей 2-го типа, что свидетельствует об определяющем влиянии режима замораживания/инкубирования в замороженном состоянии на макропористую морфологию как криогелей, так и криоструктуратов. Не смотря на близкие индексы полидисперсности, значения среднечисленного и средневзвешенного диаметров D_n и D_w БСА-криоструктуратов больше в 1,5-2 раза по сравнению с размером пор соответствующих БСА-криогелей 2-го типа (диаметр пор которых был в диапазоне от $\sim 50 \dots \sim 150$ мкм), формируемых из эквиконцентрированных растворов белка и ЭДК при тех же температурах криогенной обработки. Эти факты свидетельствуют о том, что сублимация льда приводит к дополнительному сильному уплотнению полимерной фазы и, таким образом, к расширению пор в биополимерном лиофилизате, впоследствии подвергаемого плотной химической сшивке, по сравнению с криотропным гелеобразованием, при котором сшивка БСА протекает в объеме НЖМФ умеренно замороженной реакционной системы.

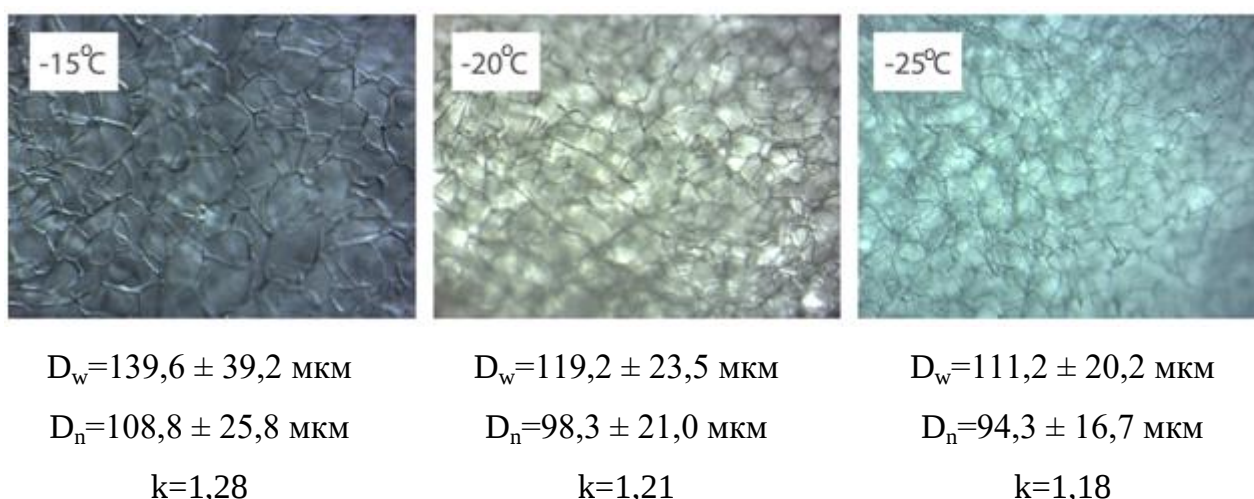


Рисунок 31. Микрофотографии набухших в воде дисков БСА-криоструктуратов толщиной 1 мм, сформированных замораживанием при -15, -20 и -25°C водного раствора БСА ($[БСА]_0 = 40$ мг/мл) с последующим лиофильным высушиванием и сшивкой белка с помощью ЭДК в этаноле при соотношении $n_{\text{COOH}}/n_{\text{ЭДК}} = 1:3$.

Таким образом, при исследовании БСА-криогелей, являвшихся третьим объектом данной работы, показано, что:

- Сшивка в безводной среде с помощью ЭДК сывороточного альбумина, подвергнутого предварительному криоструктурированию за счет лиофильного высушивания его неглубоко замороженных ($-15...-25^{\circ}\text{C}$) водных растворов, приводит к формированию нерастворимых в воде широкопористых альбуминовых криоструктуратов;
- Проводимая в среде нерастворителя белка химическая фиксация альбумина межмолекулярными амидными связями в стенках пор альбуминовых текстуратов, полученных на стадии лиофилизации, протекает с высокой эффективностью (большей, чем в случае БСА-криогелей);
- Согласно данным оптической микроскопии, в зависимости от температуры криогенной обработки и соотношения белок / кросс-агент размеры макропор БСА-криоструктуратов колеблются в широком диапазоне 60-160 мкм, что несколько меньше, в сравнении с альбуминовыми криогелями, сшитыми с помощью ЭДК;
- Содержание альбумина в начальных водных растворах, температура их криогенной обработки, а также соотношение кросс-агент/белок на стадии фиксации пористых альбуминовых текстуратов, определяют выход гель-фракции и степень набухания полимерной фазы, причем степень набухания БСА-криоструктуратов меньше, чем в случае альбуминовых криогелей 1-го и 2-го типа, что обусловлено частой многоточечной сшивкой белка в гелевой сетке криоструктуратов, что подтверждают данные ВЧ ДСК, а также испытанием БСА-криоструктуратов на растворимость в различных солубилизирующих.

4.5. Практическое применение альбуминовых криогелей и криоструктуратов.

Благодаря системе взаимосвязанных макропор, сравнительной простоте получения, возможности в широких пределах регулировать эксплуатационные характеристики и другие свойства криогели на основе белков могут служить основой для получения материалов со специфическими свойствами для ряда важных приложений в медицине и биотехнологии [36, 98, 131]. К наиболее часто упоминаемым в литературе вариантам практического приложения белковых криогелей относится их использование в качестве подложек для трехмерного культивирования различных клеток [9, 15, 32], носителей лекарственных субстанций [6, 36, 52], сорбентов и фильтрующих материалов [197], носителей иммобилизованных ферментов, клеток и клеточных органелл и т.д. [26, 119, 123]. В настоящей главе приведены результаты оценки прикладного потенциала изученных альбуминовых криогелей и криоструктуратов, с точки зрения возможности и перспектив их использования в качестве вышеуказанных материалов.

4.5.1. Использование альбуминовых криогелей 1-го типа в качестве губчатых депо-форм для химиотерапии инфицированных ран.

Наряду с гемостатическими пористыми губками на основе коллагена [198], в настоящее время известен ряд других материалов-носителей лекарственных веществ, называемых также «депо-формами», к которым можно отнести, например, ковалентные фиброиновые криогели, нагруженные гентамицином [46], или губчатые депо-формы хондроитинсульфата на основе желатиновых криогелей [187]. Криогели обладают выраженной способностью впитывать жидкий экссудат, выделяемый раной или ожогом [199], а растворимые вещества, предварительно введенные в состав таких губок, например, кровоостанавливающие агенты и другие лекарственные вещества, высвобождаются в раневую область. БСА-криогели 1-го типа, получаемые из нетоксичных и доступных предшественников, являются перспективной основой для применения в качестве основы депо-форм лекарственных веществ, так как их гелевая сетка полностью состоит из макромолекул альбумина (см. Раздел 4.2.), что является предпочтительным с точки зрения применения таких материалов *in vivo* [36].

На Рисунке 32 приведена схема процесса формирования альбуминовых губчатых депо-форм, включавшего в, непосредственно, получение широкопористого криогеля,

его отжим от воды и напикту в водном растворе антибиотика и пластификатора, в качестве которого был использован ПЭГ-400, и дальнейшую сублимационную сушку такого набухшего образца. Был получен ряд препаратов, содержащих такие антибиотические агенты, как ванкомицин, гентамицин, кларитромицин, тазоцин и эремомицин, активных в отношении патогенной микрофлоры, вызывающей гнойные заболевания. При этом в качестве белковой губчатой основы таких депо-форм были использованы криогели на основе как чистого сывороточного альбумина – БСА, либо человеческого (ЧСА), так и суммарный белок плазмы крови человека, либо КРС (см. Раздел 3.3.1.в.).

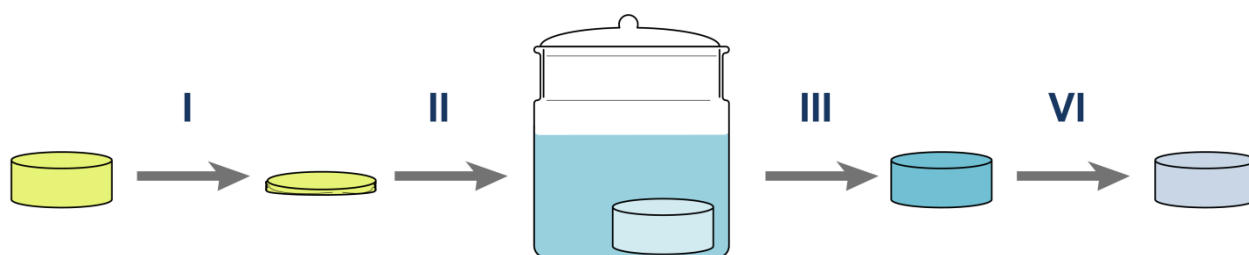
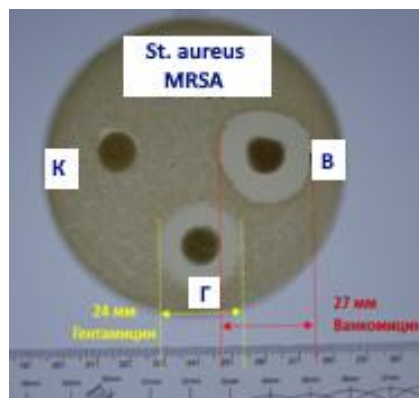


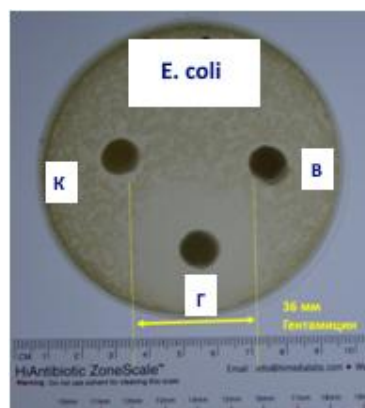
Рисунок 32. Последовательность стадий процесса получения губчатых депо-форм антибактериальных веществ на основе альбуминовых криогелей 1-го типа:

- I)** удаление несвязанной влаги из отмытого криогеля путем отжима;
- II)** набухание в течение 3 часов отжатого образца в водном растворе антибиотического препарата;
- III)** замораживание набухшего губчатого образца;
- IV)** сублимационная сушка препарата.

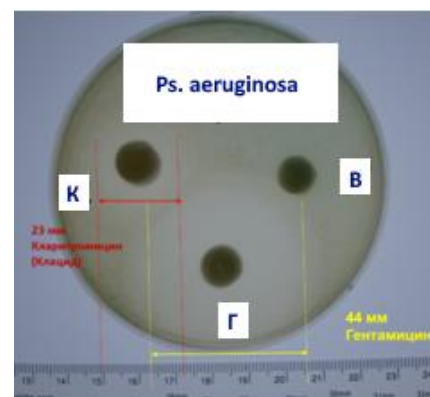
Эффективность десорбции антибиотического агента из губчатых альбуминовых депо-форм была оценена дискодиффузионным методом группой А.В. Цискарашвили в ЦИТО им. Приорова. Детали эксперимента изложены в разделе «ПРИЛОЖЕНИЯ». На Рисунке 33 приведены результаты микробиологического тестирования активности полученных губчатых альбуминовых препаратов, нагруженных ванкомицином, гентамицином, кларитромицином и эремомицином, по отношению к культурному слою таких патогенных микроорганизмов, как *Staphylococcus aureus* (Рисунок 33: а и г), *Escherichia coli* (Рисунок 33: б) и *Pseudomonas aeruginosa* (Рисунок 33: в). Из данных следует, что антибиотик, введенный в состав губчатого альбуминового носителя вышеописанным способом, сохранял свою антибактериальную активность и, набухая в физиологическом растворе, депо-форма обеспечивала его непрерывное высвобождение во внешнюю тест-среду.



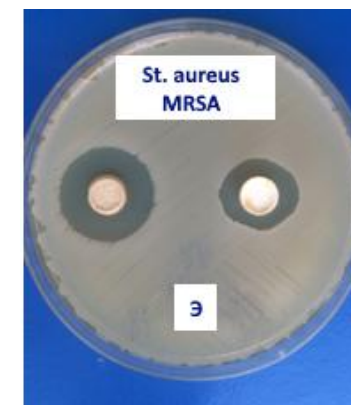
(а)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 33. Результаты оценки дискодиффузионным методом антибактериальной активности губчатых аотбуминовых депо-форм, содержащих кларитромицин (К), гентамицин (Г), ванкомицин (В) и эремомицин (Э) по отношению к тест-культурам *Staphylococcus aureus* MRSA (а, г) *Escherichia coli* (б) и *Pseudomonas aeruginosa* (в). Губчатые депо-формы эремомицина получены на основе ЧСА.

Результаты оценки терапевтического действия полученных антибактериальных альбуминовых губчатых депо-форм путем их имплантации подопытным животным (самцы крыс породы *Wistar*) приведены на Рисунке 34. Целью испытаний *in vivo*, выполненных в ЦИТО им. Приорова, являлась сравнительная оценка воздействия таких препаратов на основе БСА и ЧСА, содержавших гентамицин, кларитромицин и ванкомицин, на лечение раневого воспалительного процесса у лабораторных животных. Более подробное описание методики *in vivo* эксперимента приведено в разделе «ПРИЛОЖЕНИЯ».

Клиническое наблюдение за экспериментально смоделированными гнойными ранами, в которые имплантировали альбуминовые депо-формы ванкомицина, гентамицина или кларитромицина, не выявили развития в них воспалительных процессов, и после вживления губчатых препаратов раны без осложнений заживали. При вскрытии раны на 14-й день эксперимента визуально было установлено, что альбуминовые губчатые препараты либо существенно сокращались в размерах (в случае подкожной имплантации, Рисунок 34: г), либо практически полностью биodeградировали (Рисунок 34: и). По результатам микробиологических исследований, проведенных для каждого случая (Таблица 11), рост патологической микрофлоры в раневой области, в которую вживляли альбуминовый препарат, не обнаружен. Таким образом, экспериментально подтверждено, что депо-формы антибиотических препаратов, полученные на основе альбуминовых криогелей 1-го типа, являются полностью биосовместимыми, биodeградируемыми материалами, эффективными для химиотерапии инфицированных ран. Возможность получения таких депо форм из цельной плазмы/сыворотки крови позволяет рассматривать предложенный подход как перспективный способ получения аллогенных (из материала «заказчика») губчатых имплантов-носителей лекарственных средств, полностью биосовместимых и не требующих дальнейшего извлечения из организма.

Также для демонстрации прикладного потенциала БСА-криогелей данного типа в качестве депо-форм было проведено микробиологическое тестирование образцов, нагруженных двумя другими антибактериальными препаратами: наночастицами серебра и диоксидином. Более подробное описание методики *in vivo* эксперимента указано в разделе «ПРИЛОЖЕНИЯ». Данные по оценке диско-диффузионным методом активности таких губчатых препаратов по отношению к бактериальным культурам *Myco-bacterium suapeum* 98 и *S. aureus* 144 приведены на Рисунке 35, и из них следует, что

Подкожная имплантация депо-формы цилиндрической формы



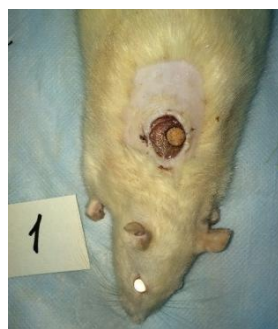
(a)



(б)



(в)



(г)

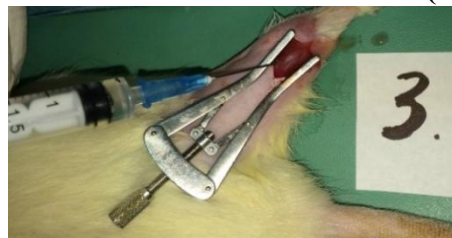


(д)

Внутримышечная имплантация депо- формы конусообразной формы



(е)



(ж)



(з-1)



(з-2)



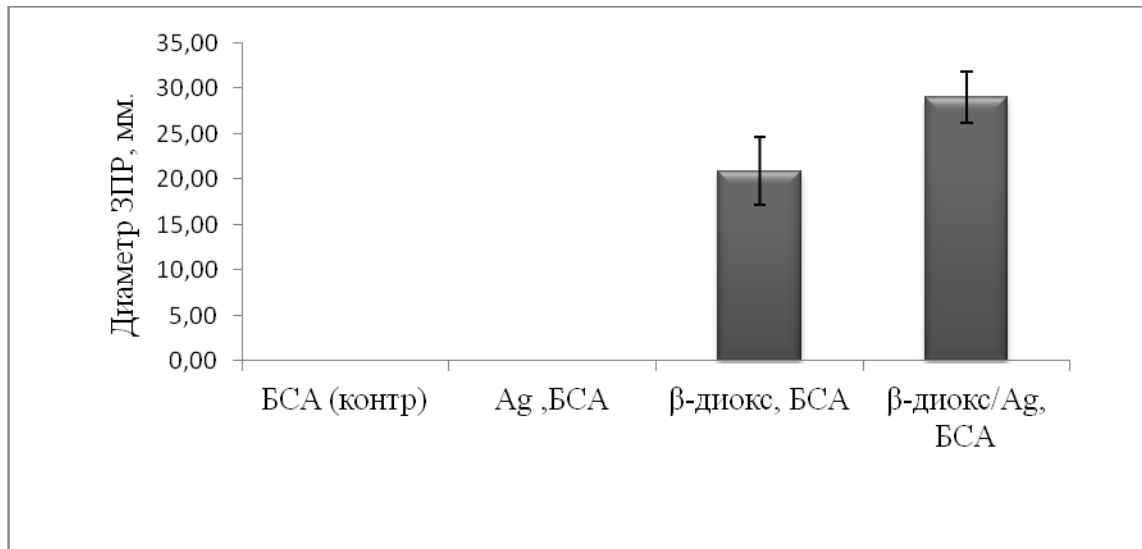
(и)



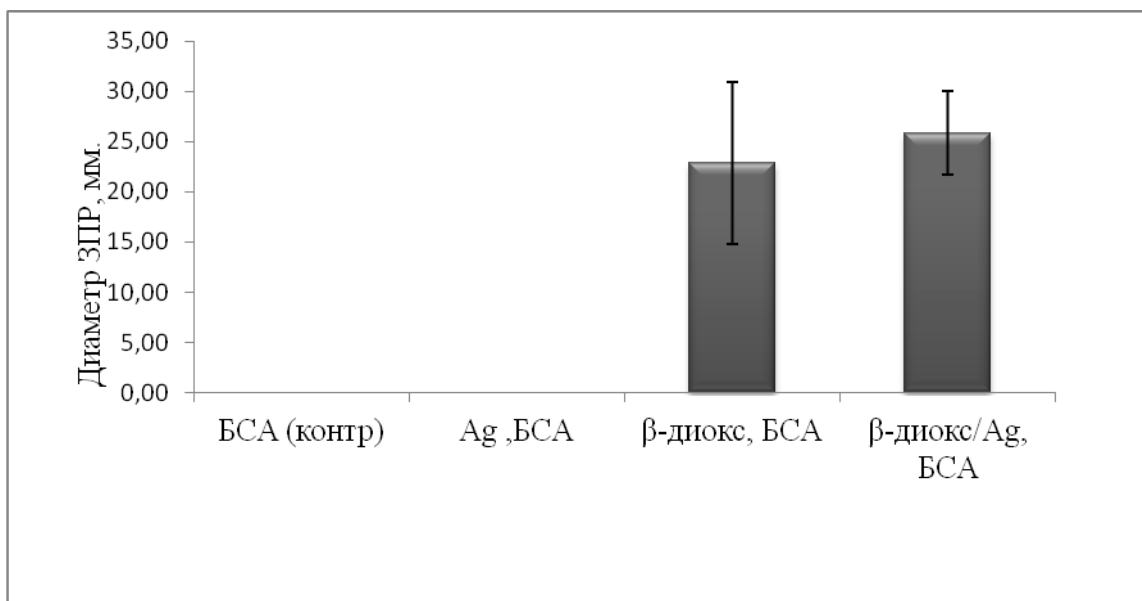
(к)

Рисунок 34. Изображение стадий опыта *in vivo* по оценке терапевтического потенциала альбуминовых депо-форм антибиотиков: (а, е) – подготовка раны; (б, ж) – контаминация раны суспензией *Staphylococcus aureus* MRSA; имплантация широкопористых сухих депо-форм, нагруженных гентамицином, на 5-й (в) и на 3-й (з-1, з-2) день после контаминации раны; (г, и) – внешний вид образцов после декапитации животных на 9-й день после имплантации депо-формы; (д, к) – отбор материала для микробиологических исследований.

губчатая морфология образцов обеспечивает высвобождение антибактериальных агентов во внешнюю среду.



(а)



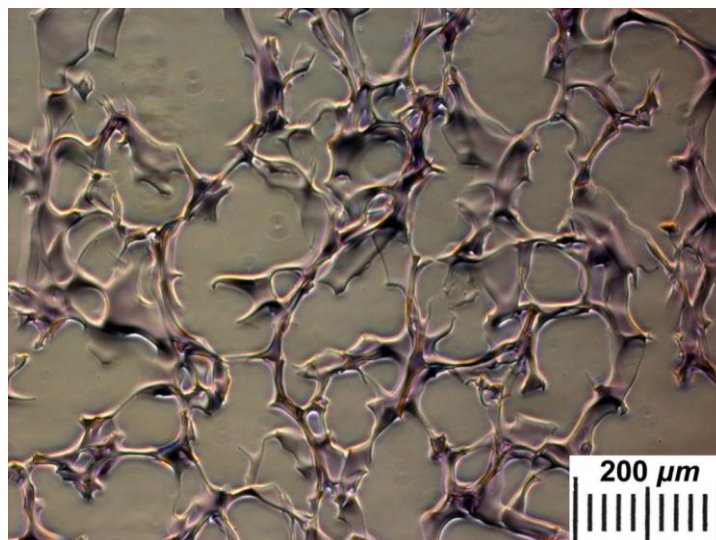
(б)

Рисунок 35. Оценка антибактериальной активности диско-диффузионным методом губчатых альбуминовых депо-форм диоксида и суспензии коллоидного серебра, по отношению к тест-культурам *Staphylococcus aureus* 144 (а) и *Mycobacterium cyaneum* 98 (б).

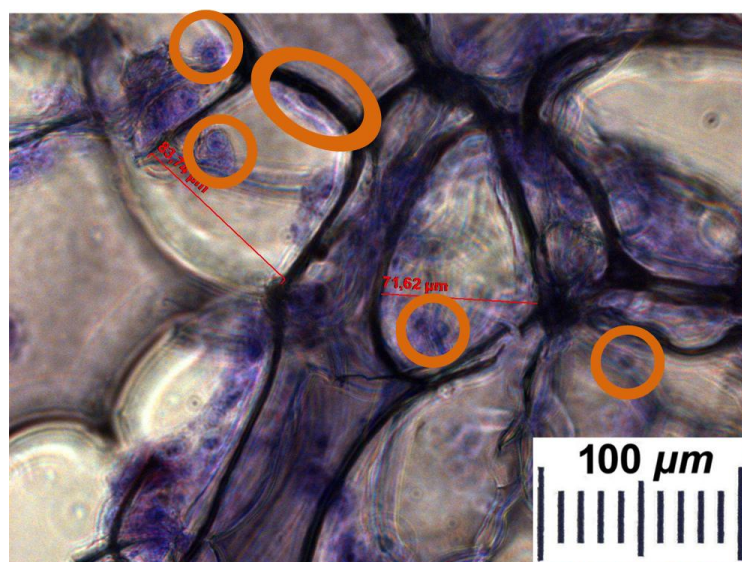
4.5.2. Использование белковых криогелей 1-го типа в качестве подложек для трехмерного культивирования мультипотентных стволовых клеток (ММСК).

Введение мезенхимных мультипотентных стволовых клеток (ММСК) в организм человека позволяет использовать их в дальнейших терапевтических целях, включая регенерацию поврежденных тканей [26, 27]. К различным способам введения клеток в организм относится имплантирование пористых клеточных препаратов на основе биоразлагаемых материалов. Благодаря макропористой морфологии и способности к биодеградации, криогели на белковой основе часто используют в качестве пористых подложек для трехмерного культивирования МСК и последующей имплантации полученных препаратов [38, 63]. Например, для этой цели применены криоструктураты на основе сывороточного альбумина [9], либо суммарного белка сыворотки крови КРС [58, 59]. Представляло интерес исследовать применимость для этой задачи криогелей на основе альбумина, а также суммарного белка сыворотки крови.

Для этого был получен ряд белковых криогелей 1-го типа на основе как чистого БСА, так и суммарного белка сыворотки, либо плазмы крови, которые были использованы в качестве подложек для объемного культивирования мезенхимных мультипотентных стволовых клеток, выделенных из костного мозга овцы. Более подробное описание методики культивирования клеток приведено в разделе «ПРИЛОЖЕНИЯ». На микрографиях срезов БСА-криогелей (Рисунок 36: а), сделанных через 7 суток после начала культивирования в их объеме ММСК, практически не видно стволовых клеток, прикрепившихся к стенкам. Напротив, клетки прикреплялись к стенкам макропор криогеля на основе цельной плазмы (Рисунок 36: б). В случае криогелей, полученных по аналогичной методике, но с использованием в качестве исходной системы сыворотки крови КРС, в отличие от плазмы крови, лишенной фибриногена, также была отмечено прикрепление и размножение ММСК на стенках макропор. Эти наблюдения позволяют предположить, что в сыворотке (плазме) крови КРС содержатся факторы, промотирующие адгезию и пролиферацию ММСК. В результате криотропного гелеобразования суммарного белка плазмы крови данные компоненты встраиваются в матрицу образующихся криогелей, которые, как следствие, являются более благоприятной средой для культивирования стволовых клеток в отличие от материалов на основе «чистого» альбумина.



(a)



(б)

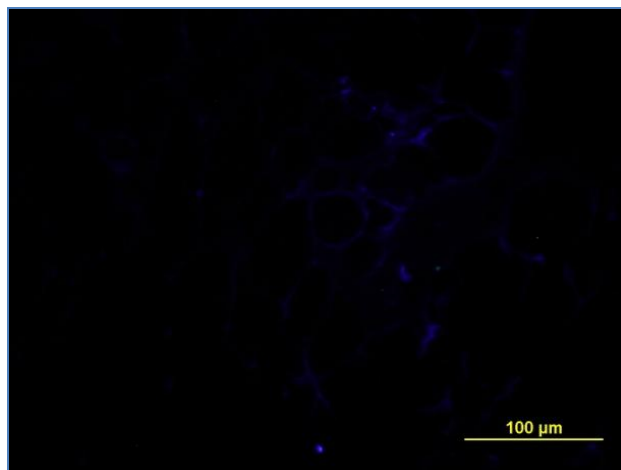
Рисунок 36. Микрофотографии среза широкопористой подложки на основе БСА (а), не содержащей клеток, а также среза подложки на основе плазмы крови (б), содержащей закрепленные на стенках макропор ММСК КРС (обведены оранжевыми кольцами, окрашены синим по Гимзе).

4.5.3. Использование белковых криогелей 1-го типа в качестве подложек для трехмерного культивирования фибробластов человека.

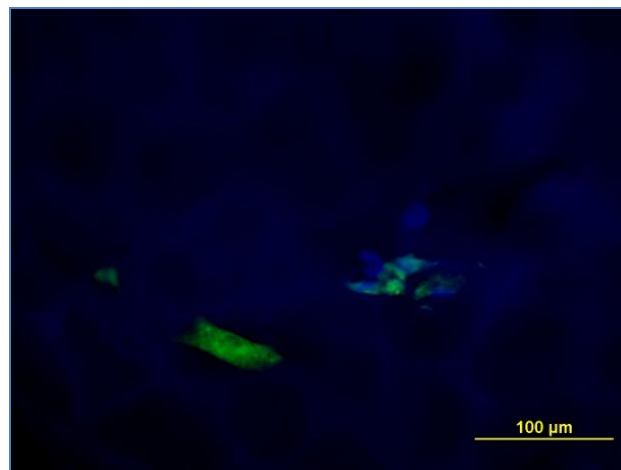
Помимо стволовых клеток, белковые криогели также часто применяют в качестве подложек для объемного культивирования других видов клеток [18, 64, 146]. Так, в литературе описаны примеры белковых криогелей и криоструктуратов в качестве матриц для культивирования фибробластов. Биосовместимые широкопористые подложки на основе, например, фиброина шелка, либо смеси декстран/кератин, содержавшие фибробласты, использованы в качестве аллогraftов для восстановления поврежденного эпителия [41, 46]. В литературе пока не имеется информации об испытании для этих целей альбуминовых криоструктурированных гелевых систем, поэтому представляло интерес исследовать цитотоксичность широкопористых альбуминовых криогелей по отношению к фибробластам человека, а также оценить адгезию данных клеток к поверхности стенок макропор белковых криогелей.

В качестве широкопористых подложек для трехмерного культивирования фибробластов человека было использовано 4 типа белковых криогелей 1-го типа: на основе чистого БСА, на основе ЧСА, а также сформированные из суммарного белка плазмы крови КРС либо человека, в которую перед замораживанием (-15°C) вводили мочевины и Цис. Все образцы широкопористых белковых криогелей были синтезированы по методике, аналогичной белковым криогелям для культивирования ММСК. Более детальное описание методики микробиологического тестирования полученных широкопористых альбуминовых подложек, проведенное группой Е.А. Воротеяк (Институт Биологии Развития им. Н.Н. Кольцова РАН) приведено в разделе «ПРИЛОЖЕНИЯ». В течение первых суток после посева фибробластов было выявлено, что материал белковых подложек не оказывал значительного цитотоксического эффекта на клетки. На 8 сутки культивирования фибробластов в образце из чистого БСА (Рисунок 37: (1)) клеток не обнаружено, на подложках, полученных из ЧСА, либо из суммарного белка плазмы крови КРС (Рисунок 37: (2) и (3), соответственно) были выявлены единичные клетки, равномерно распределенные по всей поверхности образца. Наилучшая адгезия фибробластов человека к белковым криогелям 1-го типа в данном эксперименте обладали образцы, сформированные из цельной плазмы крови человека, на поверхности и в более глубоких слоях которых (Рисунок 37: (4)) было выявлено значительное количество живых клеток, образующих монослой. Полученные результаты позволяют рассматривать

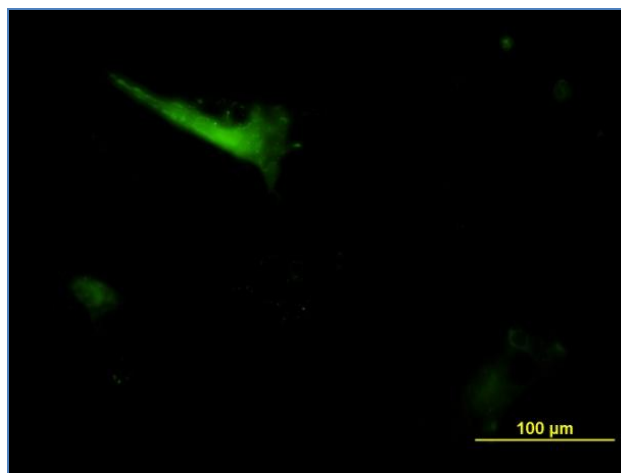
криогели на основе суммарного белка плазмы крови в качестве основы для создания аллогraftов для восстановления поврежденных кожных покровов, а также в качестве аллогенных повязок на раны и ожоги.



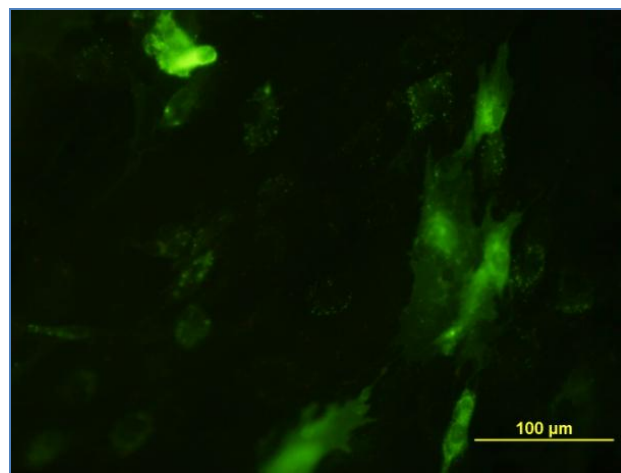
(1)



(2)



(3)



(4)

Рисунок 37. Культура фибробластов человека (окрашена зеленым), выращенная на образцах губок, прижизненная окраска с помощью мембранного трейсера DiO (зеленый), ядра докрашены с помощью DAPI (синий); номера фото соответствуют номерам образцов (см. «Приложение к Экспериментальной Части»): **1** - «BSA»; **2** - «HSA»; **3** - «Ser.Bov»; **4** - «Ser.H».

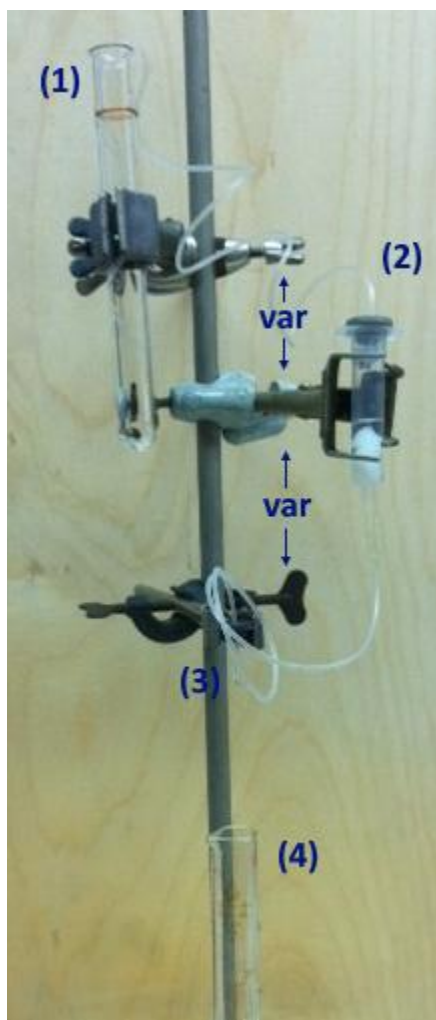
4.5.4. Альбуминовые криогели 2-го типа в качестве биосорбентов.

В литературе также часто можно встретить упоминания о применении широкопористых полимерных криогелей и криоструктуратов в качестве селективных сорбентов или фильтров [34, 126-128]. Учитывая, что одной из природных функций сывороточного альбумина является связывание и транспорт в организме различных лигандов, например, билирубина и жирных кислот [92, 107], представляло интерес исследовать сорбционные характеристики криогелей на основе данного белка. В разделе 4.3.4. показано, что гелевая сетка альбуминовых криогелей 2-го типа состоит из сшитых внутри- и межмолекулярно неполностью денатурированных глобул БСА. Это, в свою очередь, позволяет предположить, что макромолекулы альбумина в составе сшитой гелевой сетки БСА-криогелей способны частично сохранять свои нативные свойства, в том числе адсорбционные. По этой причине, БСА-криогели 2-го типа были выбраны в качестве объекта для оценки принципиальной способности альбуминовых криогелей сорбировать низкомолекулярные биологически-активные соединения.

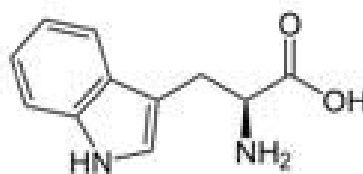
На Рисунке 38 приведена схема установки для проведения неравновесной сорбции модельного вещества, в качестве которого был использован L-триптофан (Трп), на колонке, в качестве сорбента содержащей цилиндрический блок БСА-криогеля 2-го типа. Раствор Трп в деионизованной воде или в 0,15-молярном растворе NaCl (Рисунок 38: (1)) пропускали с постоянной скоростью через шприц с неподвижной фазой альбуминового губчатого криогеля (Рисунок 38: (2)), и на выходе (Рисунок 38: (3)) из такой сорбционной колонки собирали элюат (Рисунок 38: (4)). По данным УФ-спектроскопических измерений элюента и элюата, определяли количество Трп, удержанное БСА-криогелями 2-го типа.

Как показано в разделе 4.3, физико-химические свойства БСА-криогелей 2-го типа зависят от соотношения белок:кросс-агент в исходной реакционной системе. Этот параметр процесса формирования также оказывал влияние на сорбционные свойства альбуминовых криогелей данного типа. Из результатов оценки сорбционной емкости альбуминовых криогелей, приведенных в Таблице 11, следует, что в целом, сорбционная емкость БСА-криогелей была тем выше, чем меньше было молярное соотношение $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$ в замораживаемой реакционной системе, варьируемое в диапазоне 1:1,4-1:8,3. При этом в случае проведения сорбции Трп на БСА-криогелях в физиологической среде, данная зависимость имела экстремальный характер: наибольшей сорбционной ак-

тивностью порядка 1,2 мг Трп / г БСА обладали губчатые образцы, полученные из растворов с соотношением $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}=1:5,5$. Согласно полученным результатам, БСА-криогели обладают сорбционной активностью и могут быть использованы в практике в качестве био-фильтров различных биологически-активных веществ.



(a)



(б)

Рисунок 38. Схема установки, использованной для определения сорбционной активности альбуминовых криогелей 2-го типа:

- (1) емкость с раствором триптофана (б) (в воде или в физрастворе) требуемой концентрации;
- (2) сорбционный элемент с цилиндрическим блоком альбуминового криогеля 2-го типа;
- (3) отвод пластиковой трубки, использованный для отбора элюата;
- (4) мерный цилиндр для сбора требуемого объема элюата.

Таблица 11. Количественные результаты измерений сорбционной емкости БСА-криогелей 2-го типа, синтезированных из водных растворов БСА (40,0 мг/мл) и ЭДК при различных соотношениях $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$.

Элюент=H ₂ O + Trp		Элюент=H ₂ O + 0,15 М NaCl + Trp	
$n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$	Сорбционная емкость, мг Trp / г БСА	$n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$	Сорбционная емкость, мг Trp / г БСА
1:1,4	0,72±0,21	1:1,4	0,06±0,03
1:2,8	0,51±0,19	1:2,8	0,45±0,19
1:4,2	0,2±0,1	1:4,2	0,86±0,83
1:5,5	0,5±0,39	1:5,5	1±0,4
1:6,9	0,4±0,14	1:6,9	0,25±0,06
1:8,3	0,29±0,17	1:8,3	0,46±0,18

4.5.5. Альбуминовые криоструктураты в качестве матриц для иммобилизации органофосфатгидролазы.

Другим распространенным вариантом практического приложения полимерных криогелей является использование их в качестве пористой основы для иммобилизации различных ферментов [121] или микроорганизмов [29], с получением биокатализаторов для различных областей [36, 98]. Органофосфатгидролаза (ОФГ) – это фермент, обладающий гидролитической активностью по отношению к ядовитым фосфорорганическим соединениям (ФОС), часто применяемым в сельском хозяйстве в качестве гербицидов и пестицидов. Фермент ОФГ способна дезактивировать данные токсичные агенты за счет гидролиза в них Р-О-связей. Разработаны различные варианты твердых подложек [36, 200], включая полимерные широкопористые криогели [36], а также способы иммобилизации данного фермента [201, 202], позволяющие формировать материалы для применения в качестве био-сенсоров, детектирующих ФОС в окружающей среде. БСА-криоструктураты могут представлять интерес как полимерные основы биосовместимых и биоразлагаемых препаратов, содержащих иммобилизованную ОФГ, для местной детоксикации ран, контаминированных ФОС.

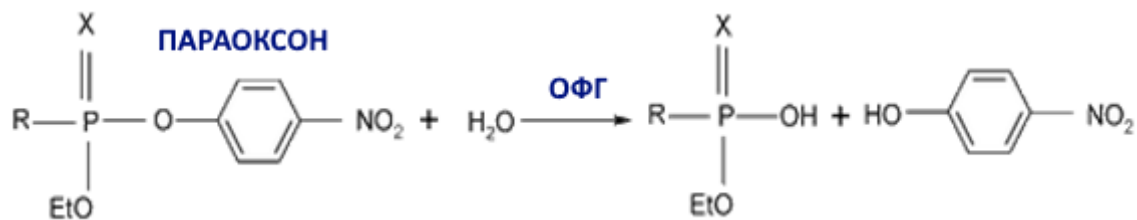
В разделе 4.4. указано, что обработка лиофилизованного БСА спиртом практически не сказывается на третичной структуре белка, и, учитывая это, мы предположили, что нативная структура ОФГ, отвечающая за каталитические функции данного фермента, также не будет претерпевать значительных изменений в ходе лиофильного высушивания и последующей обработки этанолом. ОФГ, выделенная группой Е.А. Ефременко по методике, описанной в работе [200], была иммобилизована в биополимерной матрице

широкопористых БСА-криоструктуратов (см. раздел 3.3.3.б.). Продemonстрировано, что полученные в результате губчатые био-катализаторы обладали ферментативной активностью (Рисунок 39) по отношению к модельному субстрату, в качестве которого был выбран параоксон (Рисунок 39: а). Для оценки степени влияния условий иммобилизации фермента в гелевой сетке белковых широкопористых криоструктуратов, межмолекулярную сшивку БСА и ОФГ в этаноле проводили с помощью различных концентраций ЭДК, либо ГА. На Рисунке 40 приведен график зависимости ферментативной активности ОФГ в составе губчатых альбуминовых криоструктуратов, сшитых с помощью ГА, либо карбодиимида. Из графиков, следует, что наибольшей удельной активностью по отношению к параоксону (порядка 4-7 единиц/мг ОФГ) обладали биокатализаторы, полученные с помощью минимального количества сшивающего агента, при этом несколько более эффективными были препараты, полученные сшивкой с помощью ЭДК (Рисунок 40: а). Было также обнаружено, что варьирование температуры замораживания исходных белковых растворов, содержавших БСА и ОФГ, в интервале $-15...-25^{\circ}\text{C}$ не приводило к значительному изменению активности ОФГ в составе формируемых композиционных криоструктуратов.

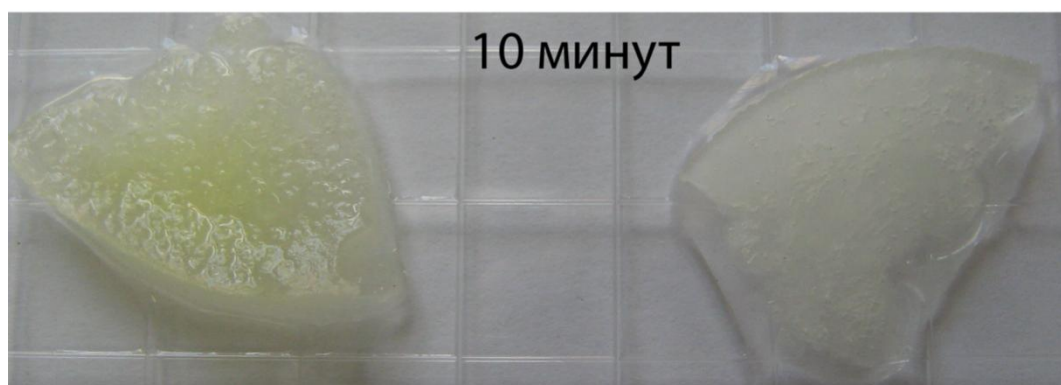
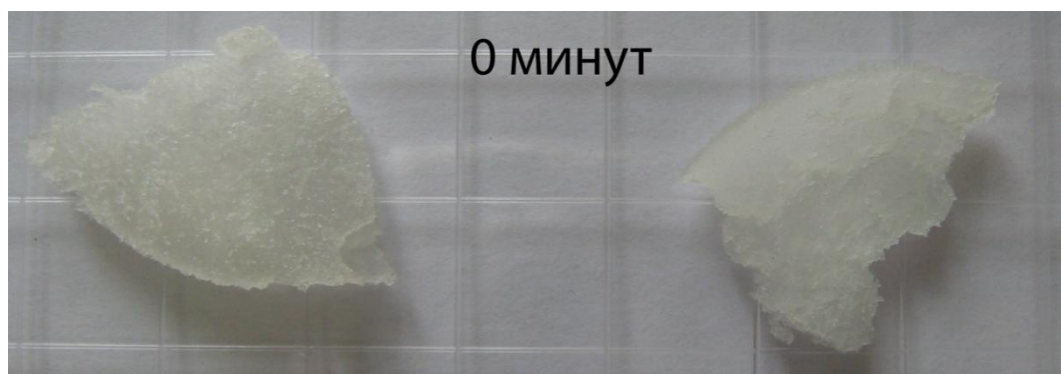
Показано, что активность фермента, встроенного в пространственную сетку БСА-криоструктуратов, зависит от способа и продолжительности хранения широкопористых альбуминовых биокатализаторов вне зависимости от типа кросс-агента, использованного при их получении. Уже через две недели хранения таких широкопористых биокатализаторов в деионизованной воде, активность фермента в их составе падает почти 5-кратно (Рисунок 41: а, б). Более предпочтительным в этом отношении является вариант хранения альбуминовых биокатализаторов в высушенном (лиофильно) виде, при котором фермент сохраняет порядка 50% от своей изначальной активности на сроках хранения более месяца (Рисунок 41: в, г).

Из полученных экспериментальных данных следует, что подход к формированию БСА-криоструктуратов может быть применен для получения на их основе биокатализаторов, содержащих иммобилизованные ферменты, в частности ОФГ. Такие широкопористые белковые биокатализаторы могут быть использованы в биотехнологии, например, в качестве повязок на раны с дополнительной функцией детоксикации ФОС. Для повышения эффективности функционирования рассматриваемых материалов требуется дальнейшая оптимизация процесса их формирования, которая может включать в себя

подбор подходящего соотношения БСА:ОФГ, введение в состав биокатализатора дополнительного компонента, стабилизирующего фермент, подбор растворителя для кросс-агента, а также других параметров.



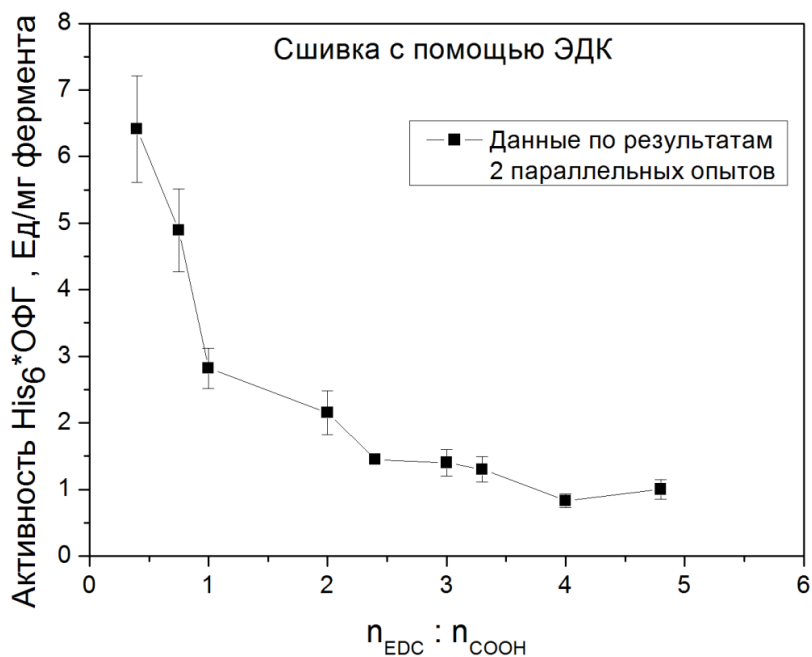
(a)



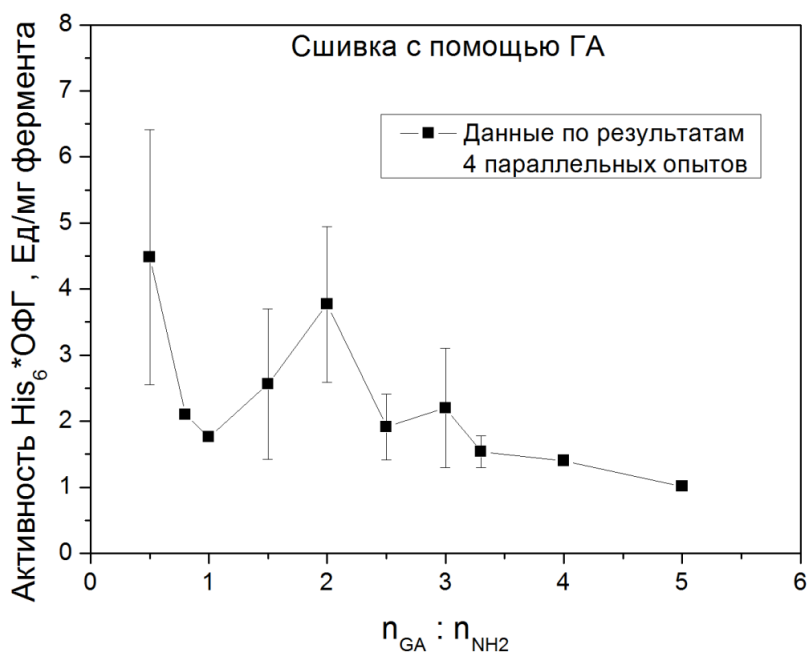
(б)

(в)

Рисунок 39. Нанесение раствора параоксона (11 моль/л; рН 10,5) на образец БСА-криоструктурата, содержащего иммобилизованную ОФГ, приводит к гидролизу параоксона в присутствии фермента (а), о чем свидетельствует выделение п-нитрофенола, окрашивающего испытуемый образец в желтый цвет (б), в отличие от образца, не содержащего в своем составе фермент (в), подвергнутого идентичной обработке.



(а)



(б)

Рисунок 40. Графики зависимости ферментативной активности ОФГ, иммобилизованной в матрице широкопористых БСА-криоструктуратов, от соотношения белок/кросс-агент, использованного при ковалентной сшивке лиофилизованного белка с помощью ЭДК (а) либо ГА (б).

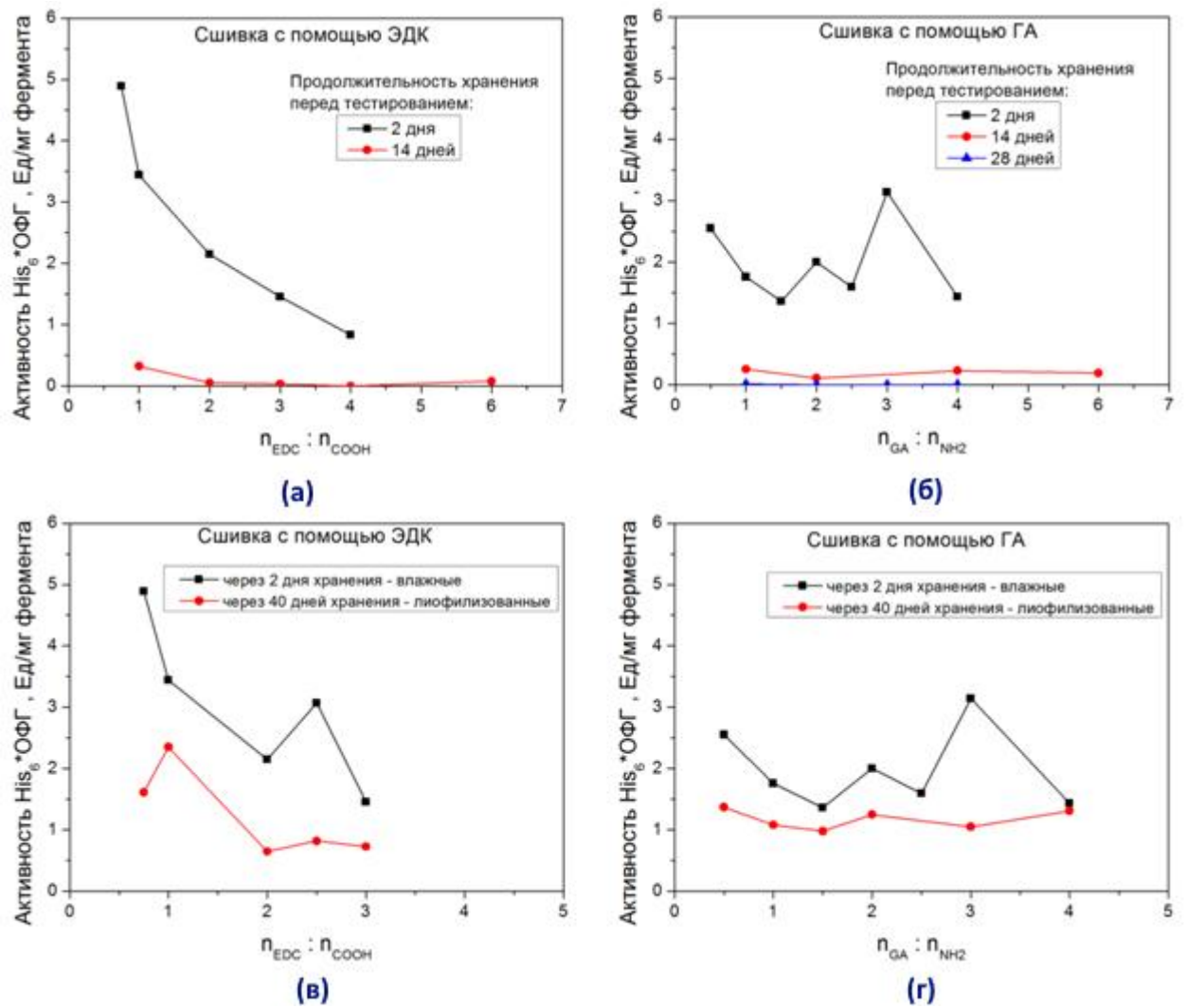


Рисунок 41. Влияние продолжительности хранения во влажном и лиофилизованном состоянии на активность фермента, иммобилизованного в составе широкопористых БСА-криоструктуратов с помощью карбодиимида (а, в) и глутарового альдегида (б, г).

ВЫВОДЫ.

1. Неглубокое замораживание при $-15...-25^{\circ}\text{C}$ /инкубирование в замороженном состоянии/оттаивание водных растворов альбумина, дополнительно содержащих денатурат и низкомолекулярный тиол, приводит к формированию губчатых криогелей, гелевая сетка которых стабилизирована межмолекулярными дисульфидными связями, образованными в результате реакций тиол-дисульфидного обмена, и гидрофобными взаимодействиями; криогенная обработка при идентичных условиях систем «вода + альбумин + карбодиимид» позволяет получать ковалентные криогели, пространственная сетка которых состоит из неполностью денатурированных глобул БСА, сшитых межмолекулярно боковыми пептидными связями.

2. Показано, что физико-химические характеристики ковалентных альбуминовых криогелей, полученных двумя разными способами, такие как выход гелефракции, степень набухания, а также особенности их широкопористой морфологии зависят от соотношения предшественников в гелеобразующих системах и температурой замораживания последних.

3. Изучены закономерности образования альбуминовых криоструктуратов методом замораживания/сублимационной сушки водных растворов белка с последующей ковалентной сшивкой образованных широкопористых лиофилизатов с помощью ЭДК в среде нерастворителя полимера; в большей мере на морфологию и физико-химические свойства альбуминовых криоструктуратов, сформированных таким способом, влияет режим криогенной обработки.

4. Показана практическая применимость полученных альбуминовых криогелей и криоструктуратов для различных областей медицины и биотехнологии; в частности, БСА-криогели 1-го типа прошли успешное биотестирование *in vitro* и *in vivo* в качестве основы биodeградирующих губчатых депо-форм для химиотерапии инфицированных ран, а также в качестве подложек для трехмерного культивирования стволовых клеток и фибробластов; значительный прикладной потенциал криогелей данного типа также продемонстрирован возможностью их получения из суммарного белка сыворотки / плазмы крови; показано, что БСА-криогели 2-го типа могут быть использованы в качестве сорбентов биологически активных веществ; а БСА-криоструктураты могут рассматриваться как перспективная основа для получения биокатализаторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. G. Albu, Z. Vuluga, D. M. Panaitescu, D. M. Vuluga, A. Cășărich, M. Ghiurea. Morphology and thermal stability of bacterial cellulose/collagen composites // Cent. Eur. J. Chem – 2014. – Vol. 12. - No. 9. – P. 968-975.
2. D. Berillo, N. Volkova. Preparation and physicochemical characteristics of cryogel based on gelatin and oxidised dextran // J. Mater. Sci. – 2014. – Vol. 49. – No. 14. - P. 4855–4868.
3. P. Chandika, S.-C. Ko, G.-W. Oh, S.-Y. Heo, V.-T. Nguyen, Y.-J. Jeon, B. Lee, C.H. Jang, G.H. Kim, W.S. Park, W. Chang, I.-W. Choi, W.-K. Jung. Fish collagen/alginate/chitooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application // Int. J. Biol. Macromolec. – 2015. - Vol. 81. – No. 1. - P. 504–513.
4. T.R. Cuadros, A.A. Erices, J.M. Aguilera. Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 2015. – Vol. – 46. - No. 1. - P. 331 – 342.
5. C. Ding M. Zhang, G. Li. Effect of cyclic freeze–thawing process on the structure and properties of collagen. // Int. J. Biol. Macromol. – 2015.- Vol. 80. – No. 1. - P.317–323.
6. S. Gorgieva, V. Kokol. Processing of gelatin-based cryogels with improved thermomechanical resistance, pore size gradient, and high potential for sustainable protein drug release // J. Biomed. Mater. Res. A – 2015. - Vol. 103A. - No 3. - P. 1119 – 1130.
7. B. Gyarmati, E.Z. Mészár, L. Kiss, M.A. Deli, K. László, A. Szilágyi. Supermacroporous chemically cross-linked poly(aspartic acid) hydrogels // Acta Biomater. – 2015. – Vol. 22. - No. 1. - P. 32–38.
8. S.T. Koshy T.C. Ferrante, S.A. Lewin, D.J. Mooney. Injectable, porous, and cell-responsive gelatin cryogels // Biomaterials. – 2014. - Vol. 35. – No. 8. - P. 2477-2487.
9. P.Li, I. Lee, W. Yu, J. Sun, W. Jane, H.Shen. A novel albumin-based tissue scaffold for autogenic tissue engineering applications // Sci. Rep. – 2014. – Vol. 4. – No. 5600. - Article # 5600.
10. C.-W Lou, S.-P Wen, J-H. Lin. Chitosan/gelatin porous bone scaffolds made by crosslinking treatment and freeze-drying technology: Effects of crosslinking durations on the porous structure, compressive strength, and in vitro cytotoxicity // J. Appl. Polym. Sci. – 2015. - Vol. 132. – No. 17. – 41851.

11. L. Elowsson, H. Kirsebom, V. Carmignac, M. Durbeej, B. Mattiasson. Porous protein-based scaffolds prepared through freezing as potential scaffolds for tissue engineering // *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* – 2012. – Vol. 23. – No. 10. - P. 2489–2498.
12. A. Fatih, Z. Oztoprak, I. Karakutuk and O. Okay. Macroporous silk fibroin cryogels // *Biomacromol.* - 2013. – Vol. 14. – No. 3. - P. 719–727.
13. D. Berillo, L. Elowsson, H. Kirsebom. Oxidized dextran as crosslinker for chitosan cryogel scaffolds and formation of polyelectrolyte complexes between chitosan and gelatin // *Macromol. Biosci.* – 2012. – Vol. 12. – No. 8. -P. 1090–1099.
14. K.B. Chien, R.N. Shah. Novel soy protein scaffolds for tissue regeneration: Material characterization and interaction with human mesenchymal stem cells // *Acta Biomater.* - 2012, Vol. – 8. – No. 2. - P. 694–703.
15. M.B. Dainiak, I.U. Allan, I.N. Savina, L. Cornelio, E.S. James, S.L. James, S.V. Mikhalovsky, H. Jungvid, I.Y. Galaev. Gelatin–fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimisation and in vitro study // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31. – No. 1. – P. 67–76.
16. M. Hedström., F. Plieva, I. Galaev, B. Mattiasson. Monolithic macroporous albumin/chitosan cryogel structure: a new matrix for enzyme immobilization // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – Vol. 390. – No. 3. - P. 907–912.
17. E. Jain, A. Srivastava, A. Kumar. Macroporous interpenetrating cryogel network of poly(acrylonitrile) and gelatin for biomedical applications // *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* – 2009. – Vol. 20. – No. 1. - P. 173–179.
18. M. Jurga, M.B. Dainiak, A. Sarnowska, A. Jablonska, A. Tripathi, F.M. Plieva, I.N. Savina, L. Strojek, H. Jungvid, A. Kumar, B. Lukomska, K. Domanska-Janik, N. Forraz, C.P. McGuckin. The performance of laminin-containing cryogel scaffolds in neural tissue regeneration // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32. – No. 13. - P. 3423 - 3434.
19. C. Mu. Collagen cryogel cross-linked by dialdehyde starch // *Macromol. Mater. Eng.* – 2010 – Vol. 295. – No. 2. - P. 100–107.
20. S.C. Rodrigues. Preparation and characterization of collagen-nanohydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for bone tissue engineering applications // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2013. - Vol 101A. – No. 4. - P. 1080-1094.
21. M. Yazdimamaghani, D. Vashae, S. Assefa, K.J. Walker, S.V. Madihally, G.A. Köhler, L. Tayebi. Hybrid macroporous gelatin/bioactive-glass/nanosilver scaffolds with

- controlled degradation behavior and antimicrobial activity for bone tissue engineering // J. Biomed. Nanotechnol. – 2014. - Vol. 10. - No. 6. - P. 911–931.
22. H. Tan, B. Wu, C. Li, C. Mu, H. Li, W. Lin. Collagen cryogel cross-linked by naturally derived dialdehydecaboxymethyl cellulose // Carbohydr. Polym. – 2015. – Vol. 129. – No. 1. - P. 17–24.
23. Qiang Lv. Preparation of 3-D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze drying/foaming technique // J. Mater. Sci.: Mater. Med. – 2006. – Vol. 17. – No. 12. - P. 1349–1356.
24. N.R. Konstantinova, V.I. Lozinsky. Cryotropic gelation of ovalbumin solutions // Food Hydrocoll. 1997. - Vol. 11. - No. 2, P. 113-123.
25. R. Carpentier, S. Lemieux. Immobilization of the photosystem ii submembrane fraction in a glutaraldehyde cross-linked matrix // App. Biochem. and Biotechnol. 1987. – Vol. 15. - No. 2. - P. 107 – 117.
26. G.C. Papageorgiou, T. Lagoyanni. Immobilization of photosynthetically active cyano-bacteria in glutaraldehyde cross-linked albumin matrix // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1986. – Vol. 23. – No. 6. - P. 417 – 423.
27. F. Estival, C. Burstein. Immobilized thermophilic bacteria as a source of respiratory chain for the recycling of NAD⁺ // Enzyme Microb. Technol. – 1985. - Vol. 7. – No. 1. - P. 29–33.
28. B. Thomasset, T. Thomasset, A. Vejux, J. Jeanfils, J.N. Barbotin, D. Thomas. Immobilized thylakoids in a cross-linked albumin matrix: effects of cations studied by electron microscopy, fluorescence emission, photoacoustic spectroscopy, and kinetic measurements // Plant Physiol. – 1982. – Vol. 70. – No. 3. - P. 714-722.
29. V.L. Garde, B. Thomasset, A. Tanaka, G. Gellf, D. Thomas. Comparative stabilization of biological photosystems by several immobilization procedures // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1981. – Vol. 11. – No. 3. - P. 133-138.
30. V.L. Garde. Immobilized thylakoids and chromatophores: hydrogen production and ATP regeneration // Biochimie. -1980. – Vol. 62. - No 8. – P. 615-21.
31. В.И. Лозинский, В.К. Кулакова, А.Ю. Петренко, Ю.А. Петренко, А.Г. Ершов, Ю.В. Суханов. Пат. РФ № 2594427 // Композиция для формирования макропористого носителя, используемого при трехмерном культивировании клеток животных или человека, и способ получения указанного носителя. – 2015. – 28 С.

32. P. Dubrue, R. Unger, S.V. Vlierberghe, V. Cnudde, P.J. Jacobs, E. Schacht, C.J. Kirkpatrick. Porous gelatin hydrogels: 2. in vitro cell interaction study // *Biomacromol.* – 2007. – Vol. 8. - No. 2. - P. 338-344.
33. X. Wu, Y. Liu, X. Li, P. Wen, Y. Zhang, Y. Long, X. Wang, Y. Guo, F. Xing, J. Gao. Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method // *Acta Biomater.* – 2010. – Vol. 6. – No. 3. - P. 1167–1177.
34. J.P. Chaudhary, S.K. Nataraj, A. Gogda, R. Meena. Bio-based superhydrophilic foam membranes for sustainable oil–water separation // *Green Chem.* – 2014. Vol. 16. - No. 1. - P. 4552–4558.
35. L. Fassina, E. Saino, L. Visai, J. Schelfhout, M. Dierick, L. Van Hoorebeke, P. Dubrue, F. Benazzo, G. Magenes, S. Van Vlierberghe. Electromagnetic stimulation to optimize the bone regeneration capacity of gelatin-based cryogels // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2012. Vol. 25. – No. 1. - P. 165-174.
36. E. Jain, A. Kumar. Disposable polymeric cryogel bioreactor matrix for therapeutic protein production // *Nat. Protoc.* – 2013. – Vol. 8. – No. 5. - P. 821 – 835.
37. H.-T. Liao, K.T. Shalumon, K.-H. Chang, C. Sheu, J.-P. Chen. Investigation of synergistic effects of inductive and conductive factors in gelatin-based cryogels for bone tissue engineering // *J. Mater. Chem. B.* – 2016. – Vol. 4. – No. 1. - P. 1827-1841.
38. G. Lu, S. Liu, S. Lin, D.L. Kaplan, Q. Lu. Silk porous scaffolds with nanofibrous microstructures and tunable properties // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2014. – Vol. 1. – No. 120. - P. 28–37.
39. K. Majia, S. Dasgupta, B. Kundu, A. Bissoyi. Development of gelatin-chitosanhydroxyapatite based bioactive bone scaffold with controlled pore size and mechanical strength // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2015. - Vol. 26. – No. 16. - P. 1190-1209.
40. N. Ninan, M. Muthiah, N.A.Bt. Yahaya, I.-K. Park, A. Elain, T.W.Wong, S. Thomas, Y. Grohens. Antibacterial and wound healing analysis of gelatin/zeolite scaffolds // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2014. – Vol. 1. – No. 115. - P. 244–252.
41. S. Balaji, R. Kumar, R. Sripriya, P. Kakkar, D.V. Ramesh, P.N.K. Reddy, P.K. Sehgal. Preparation and comparative characterization of keratin–chitosan and keratin–gelatin composite scaffolds for tissue engineering applications // *Mater. Sci. Eng. C: Mater. Biol. Appl.* – 2012. Vol. 32. - No. 4. - P. 975–982.

42. H. Olami, M. Zilberman. Microstructure and in vitro cellular response to novel soy protein-based porous structures for tissue regeneration applications // *J. Biomater. Appl.* – 2016. – Vol. 30. – No. 7. - P. 1004–1015.
43. K.M. Pawelec, A. Husmann, S.M. Best, E. Cameron. Altering crystal growth and annealing in ice-templated scaffolds // *J. Mater. Sci.* – 2015. - Vol. 50. - No. 23. - P. 7537–7543.
44. R. Say, O.Ö. Biceen, F. Yilmaz, D. Hurr, R. Ozic, A. Denizli, A. Ersoz. Novel protein photocrosslinking and cryopolymerization method for cryogel-based antibacterial material synthesis // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2012. – Vol. 125. - No. 1. - P. 145–151.
45. J. Zhang, A. Zhou, A. Deng, Y. Yang, L. Gao, Z. Zhong, S. Yang. Pore architecture and cell viability on freeze dried 3D recombinant human collagen-peptide (RHC)–chitosan scaffolds // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2015. – Vol. 49. - No. 1. - P. 174–182.
46. A. Vasconcelos, A.C. Gomes, A. Cavaco-Paulo. Novel silk fibroin/elastin wound dressings // *Acta Biomater.* - 2012. - Vol. 8. - No. 8. - P. 3049–3060.
47. R.V. Shevchenko, M. Eeman, B. Rowshanravan, I.U. Allan, I.N. Savina, M. Illsley, M. Salmon, S.L. James, S.V. Mikhlovsky, S.E. James. The in vitro characterization of a gelatin scaffold, prepared by cryogelation and assessed in vivo as a dermal replacement in wound repair // *Acta Biomater.* - 2014. – Vol. 10. - No. 7. - P. 3156–3166.
48. A. Gupta, S. Bhat, P.R. Jagdale, B.P. Chaudhari, L. Lidgren, K.C. Gupta, A. Kumar. Evaluation of three-dimensional chitosan-agarose-gelatin cryogel scaffold for the repair of subchondral cartilage defects: an in vivo study in a rabbit model // *Tissue Eng.* - 2014. - Vol. 20. – No. 23. – P. 3101–11.
49. C.-Y. Kuo, C.-H. Chen, C.-Y. Hsiao, J.-P. Chen. Incorporation of chitosan in biomimetic gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan cryogel for cartilage tissue engineering. // *Carbohydr. Polym.* – 2015. – Vol. 6. – No. 117. – P. 722–730.
50. A. Sharma, S. Bhat, V. Nayak, A. Kumar. Efficacy of supermacroporous poly(ethylene glycol)–gelatin cryogel matrix for soft tissue engineering applications // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2015. – Vol. 47. – No. 1. - P. 298–312.
51. D. Singh, A. Tripathi, S.M. Zoa, D. Singh, S.S. Han. Synthesis of composite gelatin-hyaluronic acid-alginate porous scaffold and evaluation for in vitro stem cell growth and in vivo tissue integration // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* - 2014. – Vol. 1. – No. 116. - P. 502–509.

52. P. Dwivedi, S. Bhat, V. Nayak, A. Kumar. Study of different delivery modes of chondroitin sulfate using microspheres and cryogel scaffold for application in cartilage tissue engineering // *Int. J. Polym. Mater.* 2014. – Vol. 63. – No. 16. - P. 859–872.
53. K.-H. Chang, H.-T. Liao, J.-P. Chen. Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: In vitro and in vivo studies // *Acta Biomater.* – 2013. – Vol. 9. - No. 11. - P. 9012–9026.
54. B.Y. Ozturk, I. Inci, S. Egri, A.M. Ozturk, H. Yetkin, G. Goktas, C. Elmas, E. Piskin, D. Erdogan. The treatment of segmental bone defects in rabbit tibiae with vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded gelatin/ hydroxyapatite cryogel scaffold // *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* – 2013. - Vol. 23. – No. 7. - P. 767-774.
55. D. Singh, S.M. Zo, A.Kumar, S.S. Han. Engineering three-dimensional macroporous hydroxyethyl methacrylatealginate-gelatin cryogel for growth and proliferation of lung epithelial cells // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2013. - Vol. 24. - No. 11. - P. 1343-1359.
56. Y. Liu, N.E. Vrana, P.A. Cahill. Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility // *J. Biomed. Mater. Res. B.* – 2009. - Vol. 90. - No. 2. - P. 492–502.
57. N.E. Vrana, K. Matsumura, S.-H. Hyon, L.M. Geever, J.E. Kennedy, J.G. Lyons, C.L. Higginbotham, P.A. Cahill, G.B. McGuinness. Cell encapsulation and cryostorage in PVA–gelatin cryogels: incorporation of carboxylated ϵ -poly-L-lysine as cryoprotectant // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* - 2012. – Vol. 6. - No 4. - P. 280–290.
58. L. Gallego, L. Junquera, E. Garcí'a, V. Garcí'a, M. Alvarez-Viejo, S. Costilla, M.F. Fresno, A. Meana. Repair of rat mandibular bone defects by alveolar osteoblasts in a novel plasma-derived albumin scaffold // *Tissue Eng.* – 2010. – Vol. 16. – No. 4. - P. 1179 – 1187.
59. L. Gallego, L. Junquera, M. Alvarez-Viejo, M.F. Fresno. Ectopic bone formation from mandibular osteoblasts cultured in a novel human serum-derived albumin scaffold // *J. Biomater. Appl.* – 2010. – Vol. 25. – No. 4. - P. 367 – 380.
60. T.A. Ahmed, E.V. Dare, M. Hincke. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications // *Tissue Eng. Part B Rev.* - 2008. – Vol. 14. – No. 2. - P. 199-215.
61. J. Sarkar, A. Kumar. Thermo-responsive polymer aided spheroid culture in cryogel based platform for high throughput drug screening // *Analyst.* - 2016. – Vol. 141. - No 8. - P. 2553-2567.

62. P.U. Kadakia, E. Jain, K.R. Hixon, C.T. Eberlin, S.A. Sell. Sonication induced silk fibroin cryogels for tissue engineering applications // *Mater. Res. Express.* – 2016. – Vol. 3. – No. 5. – 055401.
63. Yu. Zhang, W. Fan, Z. Ma, C. Wu, We. Fang, G. Liu, Y. Xiao. The effects of pore architecture in silk fibroin scaffolds on the growth and differentiation of mesenchymal stem cells expressing BMP7 // *Acta Biomater.* 2010. – Vol. 6. - No. 8. - P. 3021–3028.
64. Y. Wang, E. Bella, C.S.D. Lee, C. Migliaresi, L. Pelcastre, Z. Schwartz, B.D. Boyan, A. Motta. The synergistic effects of 3-D porous silk fibroin matrix scaffold properties and hydrodynamic environment in cartilage tissue regeneration // *Biomaterials.* – 2010. - Vol. 31. - No. 17. - P. 4672-4681.
65. R. Nazarov, H.-J. Jin, D.L. Kaplan. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin // *Biomacromol.* – 2004. – Vol. 5. – No. 3. - P. 718-726.
66. H. Li, B. Wu, C. Mu, W. Lin. Concomitant degradation in periodate oxidation of carboxymethyl cellulose // *Carbohydr. Polym.* - 2011. – Vol. 84. – No. 3. - P. 881–886.
67. P.B. Malafaya, T.C. Santos, M. van Griensven, R.L. Reis. Morphology, mechanical characterization and in vivo neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures // *Biomaterials.* – 2008. – Vol. 29. – No. 29. - P. 3914–3926.
68. V.M. Gun'ko, I.N. Savina, S.V. Mikhalovsky. Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation. // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2013. – Vol. 187-188. - No. 8. - P. 1-46.
69. T. Vo, C. Kong, S.K. Kim. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on degranulation and cytokine generation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells // *Carbohydr. Polym.* – 2011. – Vol. 84. – No. 1. - P. 649–655.
70. Q. Lu, X. Zhang, X. Hu, D.L. Kaplan. Green process to prepare silk fibroin/gelatin biomaterial scaffolds // *Macromol. Biosci.* – 2010. – Vol. 10. – No. 3. - P. 289–298.
71. Q. Lu, C.B. Cao, Y. Zhang, X.L. Ma, H.S. Zhu. Preparation and properties of insoluble fibroin films by novel method // *Chem. J. Chinese Univ.* - 2004. – Vol. 25. – No. 9. - P. 1752–1755.
72. H.J. Jin, D.L. Kaplan. Mechanism of silk processing in insects and spiders // *Nature.* – 2003. – Vol. 424. - No. 1. - P. 1057-1061.

73. K. Shimura, A. Kikuchi, K. Ohtomo, Y. Katagata, A. Hyodo. Studies on silk fibroin of bombyx mori. I. Fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland // J. Biochem. - 1976. – Vol. 80. – No. 4. - P. 693–702.
74. K. Tanaka, S. Inoue, S. Mizuno. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by Bombyx mori // Insect Biochem. Mol. Biol. - 1999. – Vol. 29. – No. 3. - P. 269–276.
75. F.G. Omenetto, D.L. Kaplan. New opportunities for an ancient material // Science. – 2010. – Vol. 329. – No. 5991. - P. 528–531.
76. S. Keten, Z. Xu, B. Ihle, M.J. Buehler. Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of [beta]-sheet crystals in silk // Nat. Mater. - 2010. – Vol. 9. - No. 1. - P. 359–367.
77. H. Zhu, D. Yao, S. Dong, Q. Lu, Hu, D.L Kaplan, B. Zhang. Salt-leached silk scaffolds with tunable mechanical properties // Biomacromol. – 2012. – Vol. 13. – No. 11. - P. 3723–3729.
78. C. Correia, S. Bhumiratana, L. Yan, A.L. Oliveira, J.M. Gimble, D. Rockwood, D.L. Kaplan, R.A. Sousa, R.L. Reis, G. Vunjak-Novakovic. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells // Acta Biomater. 2012. – Vol. 8. – No. 7. - P. 2483–2492.
79. Y. Wang, E. Bella, C.S.D. Lee, C. Migliaresi, L. Pelcastre, Z. Schwartz, B.D. Boyan, A. Motta. The synergistic effects of 3-D porous silk fibroin matrix scaffold properties and hydrodynamic environment in cartilage tissue regeneration // Biomaterials. - 2010. – Vol. 31. – No. 17. - P. 4672–4681.
80. L.A. Solchaga, V.M. Goldberg, A.I. Caplan. Cartilage regeneration using principles of tissue engineering // Clin. Orthop. Relat. Res. - 2001. – Vol. 391. - No. 1. - P. 161–170.
81. S. Fujikawa, S. Nakamura, K. Koga. Genipin, a new type of protein crosslinking reagent from gardenia fruits // Agric. Biol. Chem. - 1988. – Vol. 52. – No. 3. - P. 869–70.
82. C. Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, L. Chen, J. Chang, Y. Xiao. Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity Biomater. - 2013. – Vol. 34. – No. 2. - P. 422–433.

83. Z. Ma, W. He, T. Yong, S. Ramakrishna. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation // *Tissue Eng.* – 2005. – Vol. 11. – No. 7-8. - P. 1149-1158.
84. Y. Fang, R. Takahashi, K. Nishinari. Protein/polysaccharide cogel formation based on gelatin and chemically modified schizophyllan // *Biomacromol.* - 2005. – Vol. 6. – No. 6. – P. 3202–3208.
85. J. Maia, L. Ferreira, R. Carvalho, M.A. Ramos, M.H. Gil. Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels // *Polymer.* - 2005. – Vol. 46. – No. 23. - P. 9604–9614.
86. Y. Ito, H. Hasuda, H. Terai, T.J. Kitajima. Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor // *Biomed. Mater. Res., Part A.* – 2005. – Vol. 74. – No. 4. - P. 659-665.
87. S.H. Yang, P.Q. Chen, Y.F. Chen, F.H. Lin. An in-vitro study on regeneration of human nucleus pulposus by using gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan tri-copolymer scaffold // *Artif. Organs.* - 2005. – Vol. 29. – No. 10. - P. 806-814.
88. W. Zhang, C. Zhu, Y. Wu, D. Ye, S. Wang, D. Zou, X. Zhang, D. L. Kaplan, X. Jiang, Eur. Porous silk scaffolds for delivery of growth factors and stem cells to enhance bone regeneration // *Cells Mater.* – 2014. – Vol. 9. – No. 7. – P. 11–12.
89. G. Chen, C. Deng and Y.-P. Li. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation // *Int. J. Biol. Sci.* - 2012. – Vol. 8. – No. 2. – P. 272–288.
90. R.. Li, A.E. Clark, L.L. Hench. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing // *J. Appl. Biomater.* – 1991. – Vol. 2. – No. 4. - P. 231-239.
91. N. Laurens, P. Koolwijk, M.P.M. DeMaat. Fibrin structure and wound healing // *J. Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 4. – No. 5. - P. 932–939.
92. S. Sen, R. Jalan, R. Williams. Liver failure: basis of benefit of therapy with the molecular adsorbents recirculating system // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 35. – No. 9. - P. 1306-1311.
93. H. Nakae, Y. Eguchi, T. Saotome, T. Yoshioka, N. Yoshimura, Y. Kishi, T. Naka, T. Furuya, T. Yoshioka, N. Yoshimura, Y. Kishi, T. Naka, T. Furuya. Multicenter study of plasma diafiltration in patients with acute liver failure // *Ther. Apher. Dial.* – 2010. – Vol. 14. – No. 5. - P. 444–450.

94. C.A. Janeway. Other uses of plasma fractions with particular reference to serum albumin // *Ann. Intern. Med.* – 1947. – Vol. 26. – No. 3. - P. 368–376.
95. H.O. Conn. The use, misuse and abuse of albumin in fusions. // *Albumin structure, function and uses.* - eds.V.M. Rosenoer, M. Oratz, M.A. Rothschild. Pergamon Press, Oxford, UK. – 1977. P. 1 – 5.
96. A.P Delaney, A. Dan, J. McCaffrey, S. Finfer. The role of albumin as a resuscitation fluid for patients with sepsis. A systematic review and meta-analysis // *Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 39. – No. 2. - P. 386–391.
97. F. Bunn, D. Trivedi, S. Ashraf. Colloid solutions for fluid resuscitation // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2011. – Vol. 13. – No. 6. - CD001319.
doi: 10.1002/14651858.CD001319.pub4.
98. V.I.Loizinsky, O.Okay. Basic principles of cryotropic gelation. // *Adv.Polym.Sci.* – 2014. - Vol. 263. – P. 49-101.
99. R.L. Lundblad // *Biotechnology of Plasma Proteins.* CRC Press, Taylor & Francis Group. - 2013.
100. M.C. Gutiérrez, M.L. Ferrer, F. del Monte. Ice-templated materials: sophisticated structures exhibiting enhanced functionalities obtained after unidirectional freezing and ice-segregation-induced self-assembly // *Chem. Mater.* – 2008. – Vol. 20. – No. 3. – P. 634-648.
101. Е.С.Вайнерман, В.И.Лозинский, С.В.Рогожин, Л.П.Раскина, Л.А.Шапи-ро, В.С. Якубович, Б.Ю.Бронштейн. Способ получения пористого альгинатного материала. // *А.с. СССР № 1171474 (1983); Б.И. № 29 (1985).*
102. V.M. Gun'ko, I.N. Savina, S.V. Mikhalovsky. Cryogels: morphological, structural and adsorption characterisation // *Adv. Coll. Interface Sci.* - 2013. – Vol. 187-188. - No. 1. - P. 1-46.
103. T. Nakamura, S. Utsumi, T. Mori. Network structure formation in thermally-induced gelation of glycinin // *J. Agric. Food Chem.* 1984. – Vol. 32. – No. 2. - P. 349-352.
104. C.M. Vaz, L.A. de Graaf, R.L. Reis, A.M. Cunha. In vitro degradation behaviour of biodegradable soy plastics: effects of crosslinking with glyoxal and thermal treatment // *Polym. Degrad. Stabil.* – 2003. – Vol. 8. – No. 1. - P. 65–74.

- 105.** N. Reddy, Y. Yang. Soyprotein fibers with high strength and water stability for potential medical applications // *Biotechnol. Prog.* – 2009. – Vol. 25. – No. 6. - P. 1796–802.
- 106.** M. Santin, C. Morris, G. Standen, L. Nicolais, L. Ambrosio. A new class of bioactive and biodegradable soybean-based bone fillers // *Biomacromol.* – 2007. – Vol. 8. – No. 9. - P. 2706–2711.
- 107.** G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin // *Mol. Pharmacol.* – 1976. – Vol. 12. – No. 6. - P. 1052–1061.
- 108.** L. Fiume, C. Busi, G. DiStefano, A. Mattioli. Coupling of antiviral nucleoside analogs to lactosaminated human albumin by using the imidazolides of their phosphoric esters // *Anal. Biochem.* – 1993. – Vol. 212. – No. 2. - P. 407–411.
- 109.** A. Warnecke, I. Fichtner, D. Garmenn, U. Jaehde, F. Kratz. Synthesis and biological activity of water-soluble maleimide derivative of the anticancer drug carboplatin designed as albumin-binding prodrugs // *Bioconjug. Chem.* – 2004. – Vol. 15. – No. 6. - P. 1349–1359.
- 110.** C. Sung, B. Nardelli, D.W. LaFleur, E. Blatter, M. Corcoran, H.S. Olsen, C.E. Birse, O.K. Pickeral, J. Zhang, D. Shah, G. Moody, S. Gentz, L. Beebe, P.A. Moore. An IFN- β -albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in nonhuman primates // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2003. – Vol. 23. – No. 1. - P. 25–36.
- 111.** A. Malekpour, M. Khodadadi. Albumin-functionalized magnetic nanoparticles as an efficient sorbent for removal of Pb(II), Cd(II), Cu(II) and Cr(VI) ions from aqueous solutions // *RSC Adv.* 2016. – Vol. 6. – No. 18. - P. 14705-14711.
- 112.** D. Chow, M.L. Nunalee, D.W. Lim, A.J. Simnick, A. Chilkoti. Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology // *Mater. Sci. Eng. R. Rep.* – 2008. – Vol. 62. – No. 4. - P. 125-55.
- 113.** F.Z. Cui, Y. Li, J. Ge. Self-assembly of mineralized collagen composites // *Mater. Sci. Eng. R. Rep.* 2007. – Vol. 57. – No. 1-6. - P. 1-27.
- 114.** C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee. Biomedical applications of collagen // *Int. J. Pharm.* – 2001. – Vol. 221. – No. 1. - P. 1–22.

- 115.** V.I. Lozinsky, E.S. Vainerman, E.F. Titova, E.M. Belavtseva, S.V. Rogozhin. Study of cryostructurization of polymer systems. IV. Cryostructurization of the system: solvent – vinyl monomer – divinyl monomer – initiator of polymerization. // *Colloid & Polymer Sci.* – 1984. - Vol. 262. – No. 10. – P. 769-774.
- 116.** M.M. Ozmen, O. Okay. Superfast responsive ionic hydrogels with controllable pore size // *Polymer.* – 2005. - Vol. 46. – No. 19. - P. 8119-8127.
- 117.** R.V. Ivanov, V.I. Lozinsky, S.K. Noh, S.S. Han, W.S. Lyoo. Preparation and characterization of polyacrylamide cryogels produced from a high-molecular-weight precursor. I. Influence of the reaction temperature and concentration of the crosslinking agent // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2007. – Vol. 106. – No. 3. - P. 1470-1475.
- 118.** V.I. Lozinsky, N.G. Faleev, A.L. Zubov, S.B. Ruvinov, T.V. Antonova, E.S. Vainennan, V.M. Belikov, S.V. Rogozhin. Use of PVA-cryogel entrapped *Citrobacter* intermedius cells for continuous production of 3-fluoro-L-tyrosine // *Biotechnol. Lett.* – 1989. – Vol. 11. – No. 1. - P. 43—48.
- 119.** Tamahkar E, Bereli N, Say R, Denizli A. Molecularly imprinted supermacroporous cryogels for cytochrome c recognition // *J. Sep. Sci.* – 2011. – Vol. 34. – No. 23. – P. 3433-3440.
- 120.** S. Hajizadeh, C. Xu, H. Kirsebom, L. Ye, B. Mattiasson. Cryogelation of molecularly imprinted nanoparticles: A macroporous structure as affinity chromatography column for removal of (1-blockers from complex samples // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – Vol. 1274 – No. 1. - P. 6-12.
- 121.** S. Hajizadeh, H. Kirsebom, A. Leistner, B. Mattiasson. Composite cryogel with immobilized concanavalin A for affinity chromatography of glycoproteins // *J. Sep. Sci.* - 2012. – Vol. 35. – No. 21. – P. 2978-2985.
- 122.** M. Andac, F.M. Plieva, A. Denizli, I.Y. Galaev, B. Mattiasson. Poly(hydroxyethylmethacrylate)-based macroporous hydrogels with disulfide cross-linker // *Macromol. Chem. Phys.* - 2008 – Vol. 209. - No. 6. – P. 577-584.
- 123.** E. Jain, A. Kumar. Disposable polymeric cryogel bioreactor matrix for therapeutic protein production // *Nat. Protoc.* 2013 – Vol. 8. – No. 5. - P. 821-835.
- 124.** M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina, M.K. Serebrennikova, A.B. Krivorutchko, E.A. Podorozhko, R.V. Ivanov, V.I. Lozinsky. Petroleum-contaminated water treatment in a flu-

idized-bed bioreactor with immobilized *Rhodococcus* cells // *Int. Biodeterior. Biodegradation*. - 2009 – Vol. 63. – No. 4. – P. 427-432.

125. L. Onnby, C. Svensson, L. Mbundi, R. Busquets, A. Cundy, H. Kirsebom γ - Al_2O_3 -based nanocomposite adsorbents for arsenic (V) removal: Assessing performance, toxicity and particle leakage // *Sci. Total Environ.* – 2013. – Vol. 473. – No. 1. - P. 207-214.

126. A. Gupta, J. Sarkar, A. Kumar. High throughput analysis and capture of benzo [α]-pyrene using supermacroporous poly (4-vinyl pyridine- co-divinyl benzene) cryogel matrix // *J. Chromatogr. A*. - 2013 – Vol. 1278 – No. 1. - P. 16-21.

127. L. Onnby, V. Pakade, B. Mattiasson, H. Kirsebom. Polymer composite adsorbents using particles of molecularly imprinted polymers or aluminium oxide nanoparticles for treatment of arsenic contaminated waters // *Water Res.* - 2012 – Vol. 46. – No. 13. – P. 4111-4120.

128. L. Onnby, C. Giorgi, F.M. Plieva, B. Mattiasson Removal of heavy metals from water effluents using supermacroporous metal chelating cryogels // *Biotechnol. Prog.* - 2010 – Vol. 26. – No. 5. – P. 1295-1302.

129. A. Sharma, S. Bhat, T. Vishnoi, V. Nayak., A. Kumar. Three-dimensional supermacroporous carrageenan-gelatin cryogel matrix for tissue engineering applications // *Biomed. Res. Int.* - 2013 – Vol. 2013. - 478279.

130. S. Bhat, A. Iripathi, A. Kumar. Supermacroporous chitosan agarose genipin cryogels: In vitro characterization and in vivo assessment for cartilage tissue engineering // *J. R. Soc. Interface*. - 2011 – Vol. 8. – No. 57. – P. 540-554.

131. В.И.Лозинский. Новое семейство макропористых и сверхмакропористых материалов биотехнологического назначения – полимерные криогели. // *Известия РАН. - Сер. хим.* – 2008. - Т. 5. – С. 996-1013.

132. B. Han, J. Jauregui, B. Tang, M.E. Nimni. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices // *J. Biomed. Mater. Res. A*. - 2003 – Vol. 65. – No. 1. – P. 118-24.

133. B. Ma, X. Wang, C. Wu, J. Chang. Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds // *Regen. Biomater.* - 2014 – P. 81–89.

134. D. Uebelhart. Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis // *Osteoarthr. Cartil.* – 2008. – Vol. 16. – No. 3. – P. 19-21.

- 135.** T.M.A. Henderson, K. Ladewig, D.N. Haylock, K.M. McLean, A.J. O'Connor. Cryogels for biomedical applications // *Journal of Materials*. - 2013 – Vol. 1. – No. 21. – P. 2682-2695.
- 136.** I.N Savina, V.M. Gun'ko, V.V. Turov, M. Dainiak, G.J. Phillips, I.Y. Galaev, S.V. Mikhlovsky. Porous structure and water state in cross-linked polymer and protein cryo-hydrogels // *Soft Matter*. - 2011 – Vol. 7. – No. 9. – P. 4276-4283.
- 137.** V.R. Sherman, W. Yang, M.A. Meyers. The materials science of collagen // *J Mech Behav Biomed Mater*. – 2015 – Vol. 52. - No. 1. – P. 22-50.
- 138.** V.M. Gun'ko, L.I. Mikhlovska, I.N. Savina, R.V. Shevchenko, S.L. James, P.U. Tomlins S.V. Mikhlovsky Characterisation and performance of hydrogel tissue scaffolds // *Soft Matter*. - 2010 – Vol. 6. – No. 21. – P. 5351-5358.
- 139.** Srivastava, A., Jain, E., Kumar, A. The physical characterization of supermacro- porous poly(N-isopropylacrylamide) cryogel: Mechanical strength and swelling/deswelling kinetics // *Mater. Sci. Eng. A*. - 2007 – Vol. 464. – No. 1. – P. 93-100.
- 140.** B.-S. Kim, D.J. Mooney. Scaffolds for engineering smooth muscle under cyclic mechanical strain conditions // *J. Biomech. Eng.* 2000. – Vol. 122. – No. 3. – P. 210-215.
- 141.** S. Patachia, C. Florea, C. Friedrich, Y. Thomann. Tailoring of poly(vinylalcohol) cryogels properties by salts addition // *Express Polym. Lett.* - 2009 – Vol. 3. – No. 5. – P. 320-331.
- 142.** Walstra P. The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications // *J Dairy Res.* 1979. - Vol.46. - No. 2. – P. 317-23.
- 143.** Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения // *Усп. хим.* - 2002. - Т. 71. - № 6. - С. 559-585.
- 144.** J.Lai, Y.Li, T. Wang. In vitro. response of retinal pigment epithelial cells exposed to chitosan materials prepared with different cross-linkers // *Int. J. Mol. Sci.* – 2010. – Vol. 11. – No. 12. – P. 5256-5272.
- 145.** B. Kundu, R. Rajkhowa, S.C. Kundu, X. Wang. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2013. – Vol. 65. – No. 4. - P. 457–470.
- 146.** K. Belanger, T.M. Dinis, S.Taourirt, G. Vidal, D.L. Kaplan, C. Egles. Recent strategies in tissue engineering for guided peripheral nerve regeneration // *Macromol. Biosci.* – 2016. –Vol. 16. – No. 1. - P. 472–481.

147. K. Nishinari, Y. Fang, S. Guo, G.O. Phillips. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification // *Food Hydrocoll.* 2014. – Vol. 39. - No. 1. - P. 301-318
148. G.J. Quinlan, G.S. Martin, T.W. Evans. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential // *Hepatology.* – 2005. – Vol. 41. – No. 6. - P. 1211-1219.
149. Chen, X. Liu. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering in *Polymer Science // Prog. Polym. Sci.* – 2016. – Vol 1. – No. 53. – P. 86-168.
150. Финкельштейн А. В., Птицын О. Б // *Физика белка.*— М.: КДУ. - 2005.— С. 138—146.
151. H. Edelhoch. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins // *Biochemistry.* – 1967. - Vol. 6. - No. 7. – P.1948-1954.
152. Г.Б. Сергеев, В.А. Батюк. Реакции в многокомпонентных замороженных системах // *Усп. Химии.* – 1976. - Т. 45. – № 5. – С. 793-826.
153. T. Peters // *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Application.* - Academic Press, London. – 1995. - P. 432.
154. C. Tanford. Protein Denaturation // *Adv. Protein Chem.* – 1968. – Vol. 23. – P. 121-282.
155. W.W. Cleland. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH-groups // *Biochemistry.* – 1964. – Vol. 3. – No. 4. - P. 480–482.
156. V.I. Lozinsky, E.S. Vainerman, S.A. Ivanova, E.F. Titova, M.I. Shtil'man, E.M. Belavtseva, S.V. Rogozhin. Study of cryostructurization of polymer systems. VI. The influence of the process temperature on the dynamics of formation and structure of cross-linked polyacrylamide cryogels // *Acta Polym.* - 1986. – Vol. 37. – No. 3. - P. 142-146.
157. P. Arvidsson, F.M. Plieva, I.N. Savina, V.I. Lozinsky, S. Fexby, L. Bulow, I.Y. Galaev, B.J. Mattiasson. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns // *Chromatogr A.* – 2002. - Vol. 977. - No. 1. - P. 27-38.
158. В.В. Никоноров, Р.В. Иванов, Н.Р. Кильдеева, Л.Н. Булатникова, В.И. Лозинский // *Высокомолекул. соед. А.* – 2010. – Т. 52. - № 8. - С. 1436-1443.
159. Ю.М. Торчинский // *Сера в белках.* - М.: Наука. - 1977. С. 304.
160. A. Shrake, P.D. Ross. Ligand-induced biphasic protein denaturation. // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265. - No. 1. - P. 5055-5059.

- 161.** J.R. Brown. Structural origins of mammalian albumin // Fed. Proc. – 1976. - Vol. 35. - No. 10. - P. 2141 - 2144.
- 162.** N.A. Peppas, A.R. Khare. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release // Adv. Drug Deliv. Rev. - 1993. – Vol. 11. - No. 1–2. - P. 1-35.
- 163.** P. Dhulster, P. Parascandola, V. Scardi. Improved method for immobilizing invertase-active whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* in gelatin // Enzyme Microb. Technol. - 1983. – Vol. 5. – No. 1. - P. 65-69.
- 164.** I.A. Rodionov, N.V. Grinberg, T.V. Burova, V.Ya. Grinberg, V.I. Lozinsky. Cryostructuring of polymeric systems. Proteinaceous wide-pore cryogels generated by the action of denaturant/reductant mixtures on bovine serum albumin in moderately-frozen aqueous media // Soft Matter. – 2015. - Vol. 11. – No. 4. - P. 4921-4931.
- 165.** A. Tripathi, T. Vishnoi, D. Singh, A. Kumar. Modulated crosslinking of macroporous polymeric cryogel affects in vitro cell adhesion and growth // Macromol. Biosci. – 2013. - Vol. 13. - No. 7. – P. 838-850.
- 166.** N. Nakajima, Y. Ikada. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media // Bioconjugate Chem. - 1995. - Vol. 6. – No. 1. - P. 123-130.
- 167.** M. Nonaka, H. Sakamoto, S. Toiguchi, H. Kawajari, T. Soeda, M. Motoki. Sodium caseinate and skim milk gels formed by incubation with microbial transglutaminase // J. Food Sci. - 1992. - Vol. 57. - No. 5. - P. 1214-1217.
- 168.** Н.А. Преображенский, Р.П. Евстигнеева // Химия биологически активных природных соединений. - М.: Химия. - 1970. - С. 116.
- 169.** Ю.А. Овчинников // Биоорганическая химия. - М.: Просвещение. - 1987. - С. 142.
- 170.** А.А. Шиц. Гели. // Энциклопедия полимеров. М.: Советская энциклопедия. - 1972. - Т. 1. - С. 594-596.
- 171.** В.И. Иржак, Б.А. Розенберг, Н.С. Ениколопан // Сетчатые полимеры. - М.: Наука. - 1974. - С. 248.
- 172.** O. Okay. Macroporous copolymer networks // Progr. Polym. Sci. – 2000. - Vol. 25. - No. 6. - P. 711-779.
- 173.** F.M. Plieva, I.Y. Galaev, B. Mattiasson. Production and Properties of Cryogels by Radical Polymerization // Macroporous Polymers: Production, Properties and Biologi-

cal/Biomedical Applications. - Boca Raton: CRC Press. - 2010. - P. 23-48.

174. V.I. Lozinsky, L.G. Damshkaln, K.O. Bloch, P. Vardi, N.V. Grinberg, T.V. Burova, V.Ya. Grinberg. Cryostructuring of polymer systems. XXIX. Preparation and characterization of supermacroporous (spongy) agarose-based cryogels used as three-dimensional scaffolds for culturing insulin-producing cell aggregates // J. Appl. Polym. Sci. – 2008. – Vol. 108. – No. 5. - P. 3046-3062.

175. K.G. Libbrecht. The physics of snow crystals // Rep. Progr. Phys. – 2005. – Vol. 68. - No. 4. - P. 855-895.

176. N. Kimizuka, C. Viriyarattanasak, T. Suzuki. Ice nucleation and supercooling behavior of polymer aqueous solutions // Cryobiology. – 2008. – Vol. 56. – No. 1. - P. 80-87.

177. В.И. Лозинский, Н.Г. Сахно, Л.Г. Дамшкалн, И.В. Бакеева, В.П. Зубов, И.Н. Курочкин, И.И. Курочкин. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 31. Влияние добавок хлоридов щелочных металлов на физико-химические свойства и морфологию криогелей поливинилового спирта // Колл. ж. – 2011. – Т. 73. - № 2. - С. 225-234.

178. P.L. Privalov, S.A. Potekhin. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins // Methods Enzymol. – 1986. – Vol. 131. - P. 4-51.

179. S. Gumpen, P.O. Hegg, H. Martens. Thermal stability of fatty acid-serum albumin complexes studied by differential scanning calorimetry // Biochim. Biophys. Acta 1979, 574, 2, pp. 189-196.

180. A. Shrake, P.D. Ross. Biphasic denaturation of serum albumin due to ligand redistribution during unfolding // J. Biol. Chem. 1988. – 263. – No. 30. - P. 15392-15399.

181. P.L. Privalov. Cold denaturation of proteins // Crit. Rev. Biochem. Mol. – 1990. – Vol. 25. – No. 4. - P. 281-306.

182. Privalov P.L. Stability of proteins: small globular proteins // Adv. Protein Chem. – 1979. – Vol. 33. - P. 167-241.

183. N.A. Peppas. Hydrogels in Medicine and Pharmacy // CRC Press. Boca Raton, FL. - 1987.

184. A. Gutowska, J.S. Bark, I.C. Kwon, Y.H. Bae, Y. Cha, S.W. Kim. Squeezing hydrogels for controlled oral drug delivery // J. Contr. Release. - 1997. – Vol. 48. – No. 2-3. - P. 141-148.

- 185.** N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ishikawa. Hydrogels in pharmaceutical formulations // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2000. – Vol. 50. – No. 1. - P. 27-46.
- 186.** R. Langer, N.A. Peppas. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology // *AIChE J.* - 2003. – Vol. 49. – No. 12. - P. 2990-3006.
- 187.** J. Jagur-Grodzinski. Polymeric gels for biomedical and pharmaceutical applications // *Polym. Adv. Technol.* - 2010. - Vol. 21. – No. 1. - P. 27-47.
- 188.** S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, E. Lippens, B. Masschaele, L. Van Hoorebeke, M. Cornelis, R. Unger, C.J. Kirkpatrick, E. Schacht. Toward modulating the architecture of hydrogel scaffolds: curtains versus channels // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2008. – Vol. 19. – No. 4. - P. 1459-1466.
- 189.** M. Saboktakin, R.M. Tabatabaei. Supramolecular hydrogels as drug delivery systems // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2015. – Vol. 75. - No. 1. - P. 426-436.
- 190.** N. Soykeabkaew, C. Thanomsilp, O. Suwanton. Starch-based composite foams // *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* – 2015. – Vol. 78. - No. 1. - P. 246-263.
- 191.** C.J. Liao, C.F. Chen, J.H. Chen, S.F. Chiang, Y.J. Lin, K.Y. Chang. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – Vol. 59. – No. 4. - P. 676-681.
- 192.** L. Qian, H. Zhang. Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* - 2011. – Vol. 86. – No. 2. - P. 172-184.
- 193.** R. Geidobler, G. Winter. Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying: Fundamentals and technology review // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2013. – Vol. 85. – No. 2. - P. 214-222.
- 194.** V.I. Lozinsky, F.M. Plieva, I.Yu. Galaev, B. Mattiasson. The potential of polymeric cryogels in bioseparation // *Bioseparation.* – 2001. – Vol. 10. – No. 4-5. - P. 163-188.
- 195.** T. Tanaka // *Gels*, in *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering.* - Wiley & Sons Inc., New York. – 1987. - 268 P.
- 196.** V.I. Lozinsky, T.O. Golovina, D.G. Gusev. Study of cryostructuration of polymer systems: XIII. Some characteristic features of the behaviour of macromolecular thiols in frozen aqueous solutions // *Polymer.* - 2000. – Vol. 41. – No. 1. - P. 35–47.
- 197.** M Kavoshchian, R Uzek, SA Uyanik, S Senel, A Denizli. HSA immobilized novel polymeric matrix as an alternative sorbent in hemoperfusion columns for bilirubin re-

moval // *React. Funct. Polym.* - 2015. - Vol. 96. - No. 1. - P. 25-31.

198. P. Metharom, M.C. Berndt, R.I. Baker, R.K. Andrews. Current state and novel approaches of antiplatelet therapy // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 2015. - Vol. 35. - No. 6. - P. 1327-1338.

199. W.R. Wagner, J.M. Pachence, J. Ristich, P.C. Johnson. Comparative in vitro analysis of topical hemostatic agents // *J. Surg. Res.* - 1996. - Vol. 66. - No. 2. - P. 100-108.

200. N. Frančič, A. Košak, I. Lyagin, E.N. Efremenko, A. Lobnik. His₆-OPH enzyme-based bio-hybrid material for organophosphate detection // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2011. - Vol. 401. - No. 8. - P. 2631-2638.

201. E.N. Efremenko, I. Lyagin, D. Gudkov, S. Varfolomeyev. Immobilized biocatalysts for detoxification of neurotoxic organophosphorous compounds // *Biocat. and Biotransformation.* -2007. - Vol. 25. - No. 2-4. - P. 359-364.

202. N. Frančič, M.G. Bellino, G.J.A.A. Soler-Illia, A. Lobnik. Mesoporous titania thin films as efficient enzyme carriers for paraoxon determination/detoxification: effects of enzyme binding and pore hierarchy on the biocatalyst activity and reusability // *Analyst.* - 2014. - Vol. 139. - No. 12. - 3127-3136.

ПРИЛОЖЕНИЯ

1) Микробиологическое тестирование альбуминовых губчатых депо-форм, нагруженных ванкомицином, гентамицином, либо кларитромицином.

Для оценки антимикробной активности образцов альбуминовых губок, полученных согласно методике, указанной в разделах **3.3.1.б.** и **3.3.1.в.**, использовали тест-культуры микроорганизмов, относящихся к видам: *Staphylococcus aureus* MRSA, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Микробную взвесь готовили на физиологическом растворе в концентрации, соответствующий стандарту мутности 0,5 Мак Фарланд, а затем наносили на поверхность агар Мюллера–Хинтона в чашках Петри. Равномерно распределяли и подсушивали идентично способу определения антибиотикорезистентности микроорганизмов диско-диффузным методом. Исследуемые образцы альбуминовых губок (диаметр 10 мм, толщина 8 мм), нагруженных антибиотиками (ванкомицин, гентамицин, кларитромицин или эремомицин), наносили на поверхность агара. Чашки инкубировали в термостате при температуре 35°C в течении 18-24 часов. Результаты учитывали путем измерения (в мм) зоны задержки роста тест-культуры микроорганизма вокруг исследуемого образца.

2) Испытание in vivo альбуминовых губчатых депо-форм, нагруженных ванкомицином, гентамицином, либо кларитромицином, в условиях гнойной раны.

Эксперимент «А». Подкожная имплантация депо-форм.

Экспериментальные исследования выполнялись на нелинейных крысах – самцах породы Wistar, массой 250±10 г, у которых моделировалась гнойная рана для констатации и объективной оценки раневого процесса.

Под внутримышечным калипсоловым наркозом животное фиксировали на предметном столике, удаляли волосяной покров на участке размером 3х3 см. иссекали кожу и подкожно жировую клетчатку диаметром 2 см (314 мм²) и к месту кожного дефекта подшивали тефлоновое кольцо с бортиком 1 см такого же диаметра (Рисунок 34: а). После чего фасция и подлежащая мышечная ткань, внутри колпачка, раздавливали

кохером. В полость колпачка шприцом вводили около 1 мл раствора с патогенной флорой метициллин-резистентного золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus* MRSA) в количестве 10^7 клеток (Рисунок 34: б), после чего кольцо изолировали от внешней среды. На 5-е сутки с момента моделирования гнойной раны все животные были вялыми, заторможенными, со сниженной агрессией на внешние раздражители, аппетит понижен. Местно отмечался перифокальный отёк, гиперемия подлежащей кожи по краю раны. В области раны выраженное гнойное отделяемое, фибринозный налёт с участками некроза. При микробиологическом исследовании биоптатов из области раневого покрытия выявлено, что степень обсеменённости *Staphylococcus aureus* MRSA на грамм ткани было 10^9 клеток и соответствовало выраженному гнойному процессу. После этого у животных после обработки поверхности раны физиологическим раствором начато местное лечение гнойных ран губками из альбумина, нагруженными ванкомицином, гентамицином или кларитромицином (Рисунок 34: в).

Динамика развития раневого процесса:

При динамическом наблюдении за животными, на 4-е сутки от начала лечения выявлено, что у животных сохранялась контурная инфильтрация вокруг ран, умеренная гиперемия, незначительный отёк, незначительное гнойное отделяемое, наблюдались участки некроза по периметру раны. Но все эти симптомы были менее выражены по сравнению с периодом до нанесения губки. На 4-е, 10-е и 15-е сутки с момента начала лечения производили планиметрию ран. В эти же сроки забирали биопсийный материал для микробиологического исследования. Средние сроки очищения ран от гнойных и некротических масс при использовании раствора трипсина в первой фазе травматического воспаления (контрольная группа) составили $14 \pm 0,5$ суток, а сроки полного заживления - $17 \pm 0,3$ суток. В группе животных, при лечении которых использовались альбуминовые губки с гентамицином, раны очищались на $6 \pm 0,3$ сутки, а заживление происходило к $13 \pm 0,4$ дню. К $11 \pm 0,6$ суткам в группе животных, где для лечения использовались альбуминовые губки с ванкомицином, раны полностью очищались от гнойно-некротических масс. На $5 \pm 0,4$ сутки у животных этой группы на фоне очищения ран имели место появление мелкозернистой грануляционной ткани. Животные в эти сроки были более активны, в ответ на агрессию большинство крыс энергично сопротивлялись, потребление пищи возрастало. К $4,5 \pm 0,5$ суткам наблюдения гиперемия вокруг ран не от-

мечалась, кожа легко собиралась, т.е. было отмечено уменьшение диаметра. На 10 сутки стала отмечаться краевая эпителизация, при этом было выявлено значительное уменьшение размера губок почти на 70% как с гентамицином, (Рисунок 34: г, д), т.е. их постепенное рассасывание. При исследовании микробиологического материала рост патологической микрофлоры не был обнаружен. Таким образом, продемонстрирована эффективность применения альбуминовых губок, нагруженных антибиотиками, для химиотерапии инфицированных ран..

Эксперимент «Б». Внутримышечная имплантация депо-форм.

Экспериментальные исследования выполнялись на нелинейных крысах – самцах породы Wistar, массой 250 ± 10 г, у которых моделировалась гнойная рана для констатации и объективной оценки раневого процесса.

Под внутримышечным калипсоловым наркозом животное фиксировали на предметном столике и удаляли волосную покров на задней нижней конечности (бедро). Далее скальпелем выполняли продольный разрез кожи длиной 1 см. рассекали мышечную фасцию и осуществляли доступ к мышцам. Рану в открытом виде фиксировали ранорасширителем (Рисунок 34: е). В полость раны шприцом вводили около 1 мл. раствора патогенной микрофлорой метицилин-резистентного золотистого стафилококка *St. aureus* MRSA в количестве 10^7 клеток (Рисунок 34: ж) и выполняли перевязку инфицированной конечности. Через 72 ч повязку снимали и отбирали пробу на микробиологическое исследование, показавшее степень обсеменённости патогенной микрофлорой *St. aureus* MRSA на уровне 10^9 клеток на грамм ткани, что соответствовало выраженному гнойному процессу. Полость раны промывали 20 мл. физиологического раствора, после чего осуществляли имплантацию белковых губок с гентамицином, ванкомицином или кларитромицином (Рисунок 34: з) в раневую полость. Далее рану ушивали послойно хирургическим шовным материалом полигликолид-ко-лактид, плетенный фиолетовый, USP 1(4metric).

Динамика развития раневого процесса: При динамическом наблюдении за животными со следующего дня от начала лечения выявлено, что животные были активны, со 2-3 дня почти все животные в ответ на агрессию энергично сопротивлялись, потребление пищи возрастало. К $5 \pm 0,5$ суткам наблюдения гиперемия вокруг ран не отмечалась; через неделю, признаки воспаления уменьшились. Через 7 дней швы были сняты, поверхность кожи через день после снятия швов стала

гладкой. Через 12 суток все животные полностью восстановились, наблюдалась картина полного заживления, рубцы в области оперативного вмешательства были без признаков воспаления. Далее все животные были выведены из эксперимента, под эфирным наркозом произведена декапитация (Рисунок 34: и) для микробиологического контроля подвергнутой лечению модели гнойной раны. После 14 суток при микробиологическом исследовании материала рост патологической микрофлоры не обнаружен, а сама губка подверглась биodeградации почти на 95-100% (Рисунок 34: к).

Проведённые наблюдения за клиникой экспериментальных гнойных ран показали, что использованные в экспериментах белковые губки, нагруженные гентамицином и ванкомицином, а также другими антибиотиками или их смесями (таблица примеров), обладают большей клинической эффективностью. Таким образом, продемонстрирована применимость таких антибактериальных белковых губок, нагруженных антибиотиками, для химиотерапии инфицированных ран.

3) Трёхмерное культивирование мезенхимных мультипотентных стволовых клеток в альбуминовых криогелях.

В экспериментах были использованы ММСК, выделенные из костного мозга КРС, депонированные в Специализированную Коллекцию при ФГБНУ ВИЭВ. Для создания трёхмерных структур мышечной ткани в качестве твердых пористых подложек были использованы широкопористые криогели на основе сывороточного альбумина, полученные в результате неглубокого замораживания смесей «БСА + вода + мочеви́на + Цис», либо «плазма (сыворотка) крови КРС + вода + мочеви́на + Цис». Насыщение макропористых альбуминовых криогелей проводили, используя динамический метод заселения. Для этого клеточную суспензию с концентрацией 3×10^6 , 6×10^6 и 9×10^6 клеток наносили автоматическим дозатором на отжатую от капиллярной влаги подложку. В результате быстрого набухания губчатого материала суспензия клеток всасывалась капиллярными силами во внутреннее пространство макропор. Подложки с внесенными в них клетками выдерживали в CO_2 -инкубаторе в течение 2-х часов при 37°C , после чего переносили в 6-луночные планшеты, содержащие 3 мл питательной среды. Матрицы пропитывали криозащитной средой для тканей Neg-50, замораживали в течение 30 - 40 мин и далее при

помощи одноразовых лезвий Microm Sec35e снимали с каждого замороженного при -20°C образца криосрезы толщиной 20 мкм. Затем срезы наносили на предметные стекла с адгезивным покрытием Surgipath X-tra Adhesive, после фиксирования метиловым спиртом промывали и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартным методикам. Окрашенные препараты просветляли в ксилоле и заключали в монтирующую среду Sub-X (Leica, Германия).

Данные срезы обрабатывали статистически с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа (увеличение $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 60$) (Carl Zeiss, Германия) с программным обеспечением AxioVision Rel. 4.8. Микроскопирование и цифровое фотографирование нативных и окрашенных срезов подложек осуществляли также на прямом микроскопе AxioStar plus с фототрубкой (об.: $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 60$) (Carl Zeiss, Германия). Для миодифференцировки ММСК в макропорах альбуминовых криогелей, каждый образец в течение 4 недель инкубировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C растворе ретиноевой кислоты с концентрацией 12 мкМ.

4) Трехмерное культивирование фибробластов человека в БСА-криогелях.

На всех этапах эксперимента оценивали физические свойства тестируемых образцов: эластичность, хрупкость, способность растворяться в ростовой среде для клеток и способность менять pH среды. В качестве широкопористых белковых подложек для культивирования клеток были использованы образцы, обозначения которых соответствуют номерам на Рисунке 1, приведенном в разделе **4.4.3. Описание образцов** приведено в Таблице 12.

Носители были промыты в 70%-ном растворе этилового спирта, затем их замачивали в течение суток в растворе Хэнкса, содержащем гентамицин и пенициллин/стрептомицин, после чего образцы помещали в лунки 12-луночного планшета. Фибробласты человека на 5-м пассаже были сняты с поверхности культурального флакона по стандартной методике и перенесены в 12-луночный планшет с образцами носителей. Фибробласты высевали на подготовленных образцах в количестве 5×10^4 и культивировали в стандартной среде культивирования DMEM + glutamin + 10% ЭТС.

Таблица 12. Описание образцов белковых криогелей, использованных в качестве подложек для трехмерного культивирования фибробластов человека.

Название объекта	Описание
1	Широкопористая альбуминовая подложка, полученная замораживанием при -18°C /инкубированием в замороженном состоянии (20 ч)/оттаиванием системы «вода + бычий сывороточный альбумин (БСА; 50 мг/мл) + мочевины (1,3 моль/л) + Цис (0,01 моль/л)
2	Широкопористая альбуминовая подложка, полученная способом, аналогичным предыдущему, с использованием сывороточного альбумина человека (ЧСА), вместо БСА.
3	Широкопористая белковая подложка, полученная замораживанием при -18°C /инкубированием в замороженном состоянии (20 ч)/оттаиванием реакционной системы, в качестве которой использована плазма крови крупного рогатого скота (КРС; примерное исходное содержание суммарного белка 3,8%) с добавкой мочевины (1,3 моль/л) и Цис (0,01 моль/л).
4	Широкопористая альбуминовая подложка, полученная способом, аналогичным предыдущему, с использованием реакционной системы на основе плазмы крови человека (вместо плазмы КРС).

Клетки культивировали в присутствии образцов в течение 1 недели, с ежедневным наблюдением за изменением состояния культур с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus. На 3 сутки культивирования заменяли культуральную среду на свежую. На 8 сутки после посева образцы были исследованы на наличие живых клеток растущих непосредственно на стенках макропор альбуминовых криогелей. Для того, чтобы исключить артефакты (напр., просвечивание клеток, растущих на поверхности культуральной лунки) образцы были изъяты пинцетом из лунок, перенесены в новый культуральный планшет, после чего в культуральную среду добавляли мембранный трейсер DiO в концентрации $1 \times 10^{-3} \%$ и инкубировали образцы в течение 1 часа. Затем р-р удаляли и промывали кусочки р-ром PBS. Наличие окрашенных клеток, прикрепленных к стенкам макропор альбуминовых криогелей, выявляли с помощью флуоресцентного микроскопа.