

**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 БИМЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Специальность: 02.00.06 – высокомолекулярные соединения

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Лаборатории криохимии (био)полимеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН).

Научный руководитель: **Лозинский Владимир Иосифович**
доктор химических наук, профессор,
заведующий Лабораторией криохимии
(био)полимеров ИНЭОС РАН. г. Москва

Официальные оппоненты: **Кильдеева Наталия Рустемовна,**
доктор химических наук, профессор, заведующая
Кафедрой химии и технологии полимерных
материалов и нанокompозитов, Федеральное го-
сударственное бюджетное образовательное уч-
реждение высшего образования Московский го-
сударственный университет дизайна и техноло-
гии, г. Москва

Валуев Иван Львович,
доктор химических наук, ведущий научный со-
трудник Лаборатории химии полиэлектролитов
и медико-биологических полимеров, Федераль-
ное государственное бюджетное учреждение
науки Институт нефтехимического синтеза им.
А.В. Топчиева РАН, г. Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное уч-
реждение науки Институт биохимической фи-
зики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится 17 января 2017 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.250.02 по присуждению ученой степени кандидата химических наук при ИНЭОС РАН по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Вавилова, 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНЭОС РАН.
Автореферат разослан «__» ноября 2016 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.250.02
кандидат химических наук

Беломоина Н.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: Полимер природного происхождения - 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 до начала настоящей работы было изучено в недостаточной мере. Хотя первые работы, посвященные БСА-криогелям, сшитым с помощью глутарового альдегида, появились в середине 1980-х годов, эти публикации 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. Ранее в нашей лаборатории была показана возможность формирования ковалентных альбуминовых криогелей принципиально иным способом, не задействуя кросс-агент, а именно, замораживанием-оттаиванием систем «вода + БСА + низкомолекулярный восстановитель + денатурирующий агент». Данный тип криогелей, или альбуминовые криогели 1-го типа, являвшиеся первым объектом изучения в настоящей работе, представляли интерес для применения в медицине, что требовало более детального исследования механизмов их образования и зависимости характеристик от параметров процесса получения.

Криотропное гелеобразование растворов белков в присутствии карбодиимида, обеспечивающего сшивку «нулевой длины», позволяет формировать широкопористые криогели, пространственная сетка которых не включает фрагментов небелковой природы. В литературе не имеется упоминаний об использовании данного подхода к синтезу материалов на основе сывороточного альбумина, в связи с чем актуальны исследования по получению, а также оценке свойств и структуры данных альбуминовых криогелей, являвшихся вторым объектом настоящей диссертационной работы.

Изучение особенностей гелеобразования БСА в умеренно замороженных системах двух вышеописанных типов дает возможность выяснить влияние раз-

личных его параметров на эффективность встраивания белка в гелевую сетку образующихся белковых криогелей, получить информацию о некоторых особенностях процесса формирования узлов пространственной сетки, а также определить различные физико-химические характеристики таких биополимерных 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. Представляло интерес применить данную методику для формирования криоструктуратов на основе чистого сывороточного альбумина, сшитого с помощью карбодиимида. До настоящего исследования в литературе также не имелось примеров сравнительной оценки свойств белковых криогелей и криоструктуратов, полученных из эквиконцентрированных реакционных систем, содержащих одинаковые предшественники, но с помощью различных методов. Таким образом, сопоставление свойств БСА-криогелей и криоструктуратов, сшитых с помощью карбодиимида, представляло возможность определить, каким образом на свойства широкопористых криоструктурированных систем влияет способ их формирования. Наконец, необходимо было получить информацию о прикладном потенциале разрабатываемых альбуминовых матриц. Ответы на эти вопросы определяли актуальность исследований, представляющих предмет настоящей диссертационной работы.

Целью работы являлось изучение механизмов образования, свойств и особенностей структуры ковалентно сшитых криогелей и криоструктуратов на основе сывороточного альбумина, пространственная гелевая сетка которых не содержит включений, привнесенных извне действием на белок кросс-агента; исследование зависимости физико-химических свойств и пористой морфологии полученных биополимерных матриц от режимов криоструктурирования, а также оценка их применимости для ряда биомедицинских практических приложений.

Научная новизна результатов. Установлена природа узлов, стабилизирующих гелевую сетку альбуминовых криогелей, полученных криогенной обработкой водных растворов «сывроточный альбумин + цистеин + мочеви́на»; выяснены закономерности протекания криотропного гелеобразования, а также зависимости между физико-химическими свойствами, микроструктурой БСА-криогелей и условиями их формирования.

Методом замораживания/лиофильной сушки водных растворов белка с последующей его химической сшивкой с помощью карбодиимида в среде нерастворителя биополимера получены и охарактеризованы до этого неизвестные широкопористые БСА-криоструктураты.

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

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

Практическая значимость. Совместно со специалистами биомедицинского профиля продемонстрированы возможности применения сформированных 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, включающий замораживание/лиофилизацию замороженных растворов белка с последующей ковалентной сшивкой образованных пористых структуратов, может быть применен для получения широкопористых биокатализаторов, содержащих иммобилизованные ферменты.

Личный вклад автора состоит в обсуждении целей и задач исследований, проведении экспериментов, обобщении, анализе и трактовке получен-

ных экспериментальных данных, формулировки положений и выводов работы. Большинство полученных результатов получены автором лично.

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 работы были представлены на следующих конференциях: Международная научная конференция «Chemistry of Organoelement Compounds and Polymers» (Москва, 2014); VIII Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015); конференция-аттестация ИНЭОС РАН «Веснянка» (2014, 2015 и 2016), II Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 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 молодых ученых с международным участием «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокompозиты» (Химки, 2016).

Работа выполнена в соответствии с планами исследований Лаборатории криохимии (био)полимеров ИНЭОС РАН при 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 РФФ «Криохимические подходы к созданию новых гибридных наносистем и наноструктур для направленной доставки лекарственных веществ».

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 156 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литерату-

ры, 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 обоснована актуальность темы диссертационного исследования, сформулированы основная цель и задачи работы, а также изложена структура работы.

Вторая глава содержит аналитический обзор литературы по теме диссертационного исследования. В первом разделе литературного обзора даны общие сведения о криотропном гелеобразовании, приведена классификация полимерных криогелей, дано описание их характерных свойств, методов исследования и областей практического приложения. Во второй части обзора рассмотрены наиболее часто цитируемые и актуальные примеры криогелей на основе различных белков. Особое внимание уделено сравнительной оценке физико-химических свойств и особенностей широкопористой морфологии белковых криогелей в зависимости от типа исходной реакционной системы, используемых веществ-предшественников, режима криогенной обработки гелеобразующей системы. Обсуждены основные подходы к формированию широкопористых криогелей и криоструктуратов на белковой основе. В третьей части обзора рассмотрены свойства и практическое применение сывороточного альбумина, известные примеры синтеза на основе данного белка криогелей и криоструктуратов.

Третья глава посвящена описанию экспериментальных подходов и методов, примененных в работе. Подробно описаны методики формирования двух типов БСА-криогелей, а также БСА-криоструктуратов. Приведено описание методик изучения свойств и макропористой структуры полученных материалов. Дано описание методик оценки прикладного потенциала альбуминовых криогелей и криоструктуратов.

Четвертая глава посвящена обсуждению результатов, полученных в хо

де исследования физико-химических свойств БСА-криогелей и криоструктуратов.

При синтезе альбуминовых криогелей 1-го типа в качестве гелеобразующего компонента нами использован бычий сывороточный альбумин (БСА), в качестве денатурирующего агента – мочевины, в качестве восстановителя – низкомолекулярный тиол цистеин. Для удобства дальнейших манипуляций альбуминовые криогели формировали в виде проточных колонок, используя в качестве реакционного сосуда пластиковые шприцы (Рис. 1). Методика приготовления образцов включала: (I) приготовление исходного раствора, содержащего альбумин и денатуранты; (II) его замораживание и инкубирование в замороженном состоянии при заданной отрицательной температуре; (III) оттаивание и (IV) промывку полученного криогеля. При исследовании влияния температуры криоструктурирования на свойства альбуминовых криогелей гелеобразование проводили при температурах: -15 , -20 и -25°C в течение 20 ч, что было определено в предварительных экспериментах.

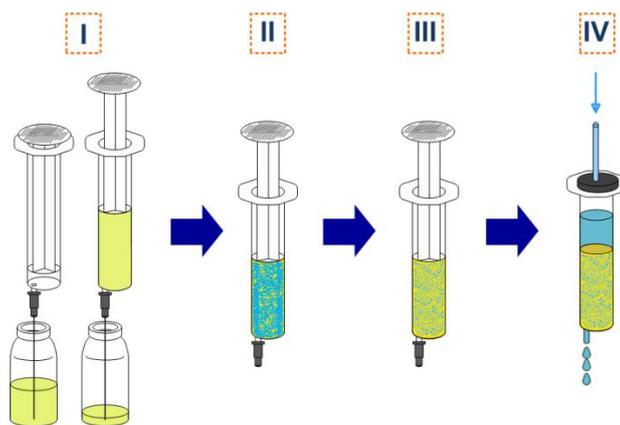


Рисунок 1. Схема процесса формирования БСА-криогелей 1-го типа в виде цилиндрических блоков в пластиковых шприцах.

Для оценки эффективности криотропного гелеобразования в зависимости от состава исходного раствора и температурного режима его криогенной обработки определена величина выхода гель-фракции. Рабочие концентрации мочевины находились в диапазоне от 0,5 до 3,0 моль/л. При содержании мочевины в исходной смеси выше 2,0 моль/л наблюдалось систематическое снижение выхода гель-фракции и, следовательно, снижение эффективности криотропного

гелеобразования (Рис. 2а). С понижением температуры криогенной обработки эффективность процесса также падала (Рис. 2б). Следует отметить, что температурный интервал, в котором могут быть получены относительно прочные альбуминовые криогели, довольно узок, при этом с понижением температуры замораживания наблюдается тенденция к ухудшению «качества» получаемых материалов.

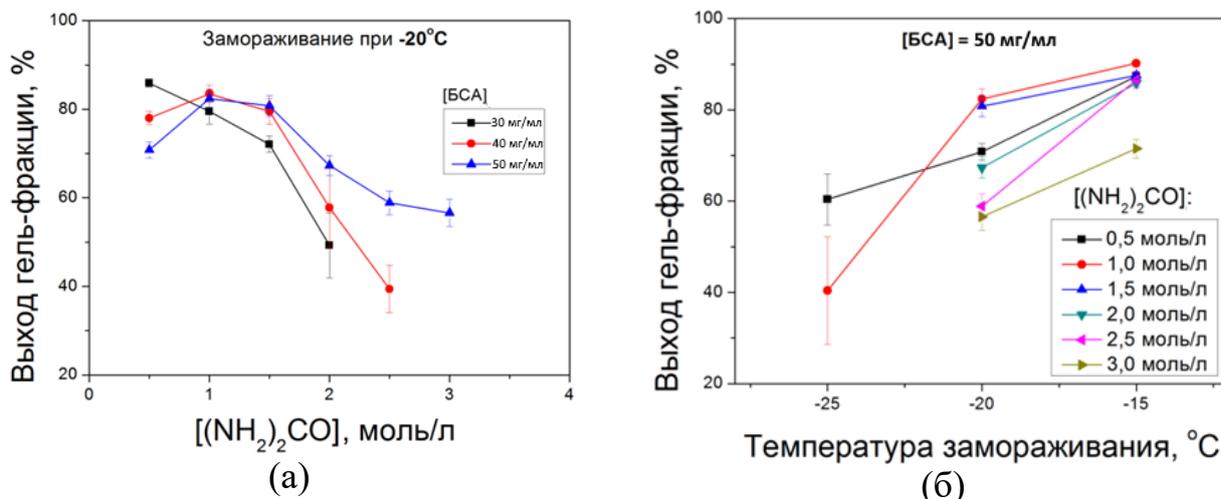


Рисунок 2. Зависимость выхода гель фракции БСА криогелей 1-го типа, полученных из различных по составу гелеобразующих систем, от исходной концентрации в ней мочевины (а), а также от температуры замораживания (б).

В качестве показателя плотности сшивки гелевой сетки была измерена степень набухания полимерной фазы губчатых криогелей. Зависимости этого параметра от содержания денатуранта в исходной системе имели слабо выраженный максимум (Рис. 3а). Степень набухания полимерной фазы БСА-криогелей росла с понижением температуры замораживания гелеобразующей системы (Рис. 3б), что говорит о снижении плотности ее сшивки.

Для определения природы сшивок в узлах гелевой сетки альбуминовые криогели 1-го типа были подвергнуты действию 8М раствора мочевины (разрушает водородные связи), 5М раствора гунидилгидрохлорида (разрушает водородные и ионные связи) и 1%-ного раствора додецилсульфата натрия (ДСNa, нарушает гидрофобные взаимодействия) (Рис. 4-1). Больше всего криогель набухал в растворе ДСNa (Рис. 4а «2в»), что говорит о вкладе гидрофобных

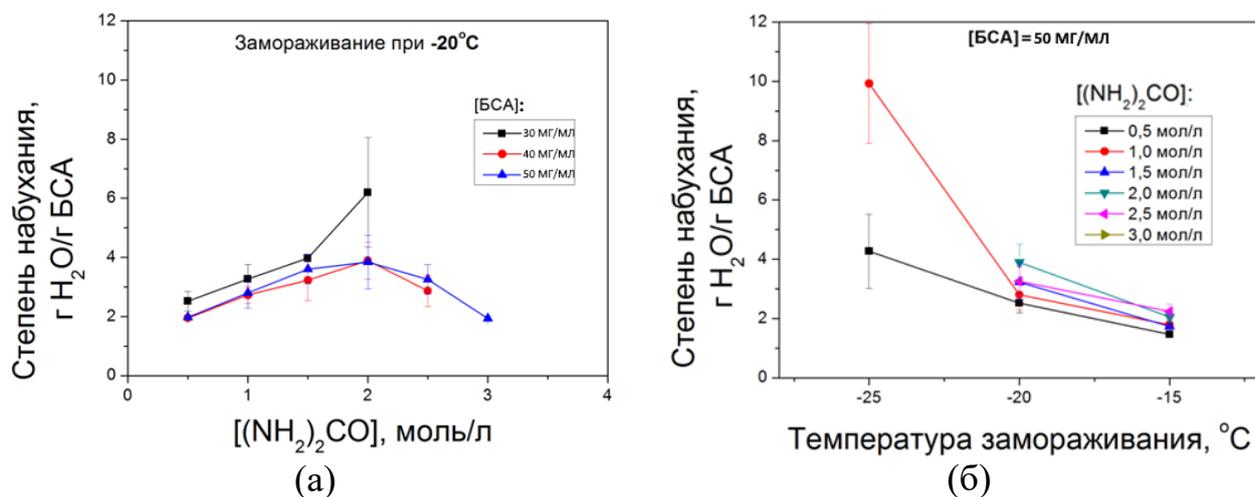


Рисунок 3. Зависимость степени набухания БСА криогелей 1-го типа, полученных из различных по составу гелеобразующих систем, от исходной концентрации мочевины (а), а также от температуры замораживания (б).

взаимодействий в стабилизацию трехмерной сетки. Введение в каждую систему небольшого количества дитиотреита (0,1 моль/л) приводило в результате к растворению всех образцов (Рис. 4а «3»), что говорит о ковалентном сшивании трехмерной гелевой сетки межмолекулярными дисульфидными связями (Рис. 4-II), образование которых через реакции тиол-дисульфидного обмена (Рис. 4-III) запускается присутствующим в исходной системе цистеином.

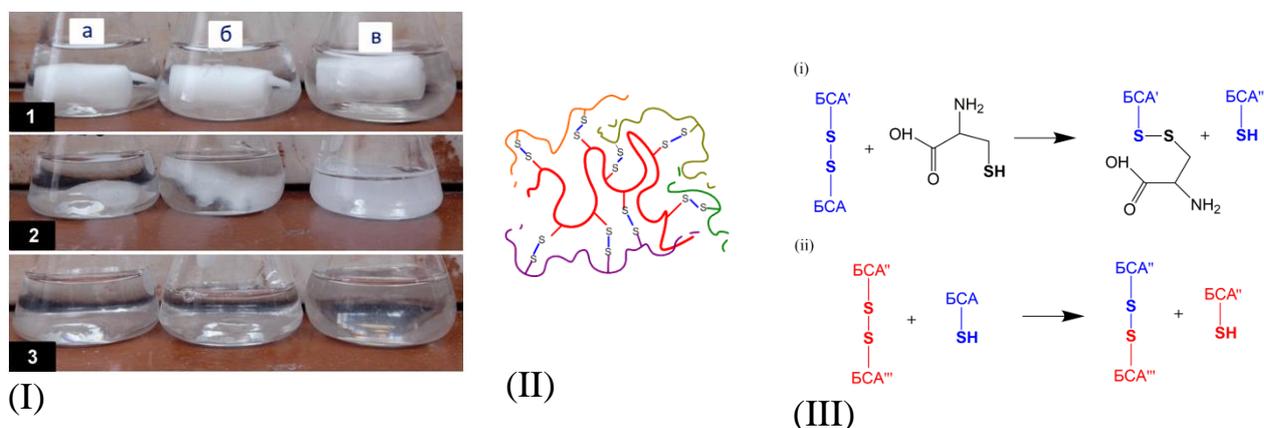


Рисунок 4. БСА-криогели 1-го типа, через 1 минуту (1) и 24 часа (2) инкубирования в 8М растворе мочевины (а), 5М растворе гуанидилгидрохлорида (б) и 1%-ном растворе ДСNa (в), а также через 24 часа после внесения в каждую систему дитиотреита (3); (II) – схематическое изображение гелевой сетки БСА-криогелей и механизма ее формирования (III).

Для исследования конформационного состояния белка в составе сшитой полимерной сетки совместно с группой д.х.н. В.Я.Гринберга (ИНЭОС РАН)

проведен анализ криогелей методом ВЧ ДСК. Сравнение термограмм нативного БСА и БСА-криогелей (Рис. 5а) показывает, что белок встраивается в полимерную сетку в сильно денатурированном состоянии. В то же время, сравнение термограмм нативного альбумина и растворов БСА без денатуранта (Рис. 5б), подвергнутых криогенной обработке (-15°C , 20 ч), показывает, что замораживание само по себе не приводит к денатурации БСА. Это говорит об определяющей роли мочевины для процесса разворачивания цепей альбумина в ходе криотропного гелеобразования с участием данного белка.

Для широкопористой морфологии альбуминовых криогелей выявлен гетерогенный характер их текстуры в отношении формы и размеров крупных пор и их стенок (Рис. 6). До замораживания исходной системы предшественники криогеля равномерно распределены в объеме раствора, по завершении криотро-

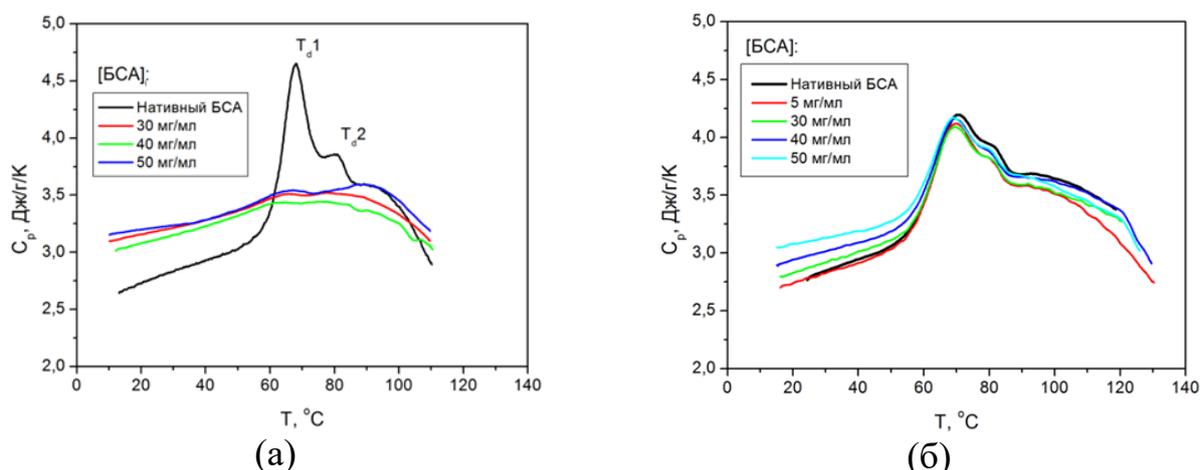


Рисунок 5. (а) Термограммы нативного БСА и БСА-криогелей 1-го типа; (б) термограммы растворов БСА, подвергнутых замораживанию при -20°C .

пного гелеобразования сшитый полимер сконцентрировался в тонких стенках макропор. На величину среднего диаметра пор (Табл. 1) влияет режим криогенной обработки и соотношение предшественников в исходной системе: с понижением температуры замораживания средний диаметр пор уменьшается; рост концентрации мочевины в исходной реакционной смеси тоже приводит к уменьшению сечения пор.

Альбуминовые криогели 1-го типа были испытаны в качестве полимерной основы депо-форм антибиотиков. Процесс получения таких препаратов

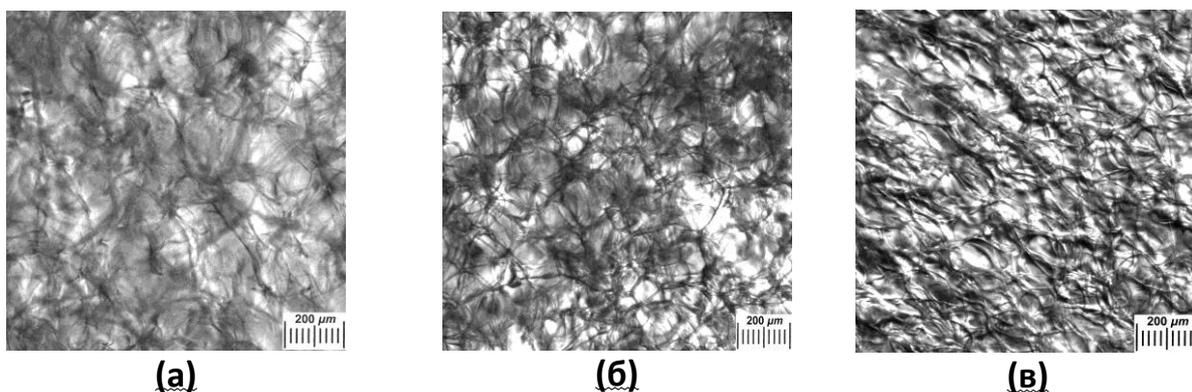


Рисунок 6. Микрографии окрашенных метиленовым синим БСА-криогелей 1-го типа, сформированных замораживанием при -15°C растворов БСА (4 г/дл), содержащих цистеин (0,01 моль/л), а также 0,5 моль/л (а), 1,0 моль/л (б) и 1,5 моль/л (в) мочевины.

(Рис. 7а) включал в себя формирование белковых криогелей (I), их насыщение водным раствором антибактериального препарата (II), замораживание набухшего образца (III) и его сублимационную сушку (IV). Препараты, содержавшие

Таблица 1. Влияние концентрации мочевины в растворе и температуры его замораживания на сечение макропор криогелей.

[Мочевина] (моль/л)	Температура замораживания ($^{\circ}\text{C}$)	D_n , мкм	D_w , мкм	$k=D_n/D_w$
0,5	-15	$105,4 \pm 31,7$	$148,0 \pm 59,3$	1,40
1,0		$102,0 \pm 25,8$	$149,9 \pm 61,1$	1,47
1,5		$98,9 \pm 26,1$	$127,3 \pm 42,9$	1,29
2,0		$92,2 \pm 24,6$	$120,1 \pm 40,9$	1,30
0,5	-20	$68,2 \pm 14,9$	$86,0 \pm 25,4$	1,26
1,0		$73,9 \pm 17,3$	$95,5 \pm 31,5$	1,29
1,5		$57,7 \pm 16,6$	$75,8 \pm 29,0$	1,31
2,0		***	***	***

***- недостаточная механическая прочность образцов.

такие антибиотики, как ванкомицин, гентамицин, кларитромицин, эремомицин и др., прошли тестирование в ЦИТО им. Приорова (группа к.м.н. А.В. Цискарашвили), которое показало эффективность полученных препаратов в отношении патогенных микроорганизмов-возбудителей гнойных воспалений (Рис. 7).

В ходе испытаний *in vivo* продемонстрирована применимость таких антибактериальных белковых губок, нагруженных антибиотиками, для химиотерапии инфицированных ран. Наблюдения на экспериментальных моделях гнойных ран показали, что использованные в экспериментах альбуминовые губки, нагруженные ванкомицином, а также другими антибиотиками, обладают вы-

сокой клинической эффективностью: раневая область, в которую вживляли препарат (Рис. 8а) (подкожно, либо внутримышечно), зарубцовывалась (Рис. 8б), при этом патогенная культура в ней со временем была подавлена, а сама белковая основа депо-формы полностью биодegradировала.

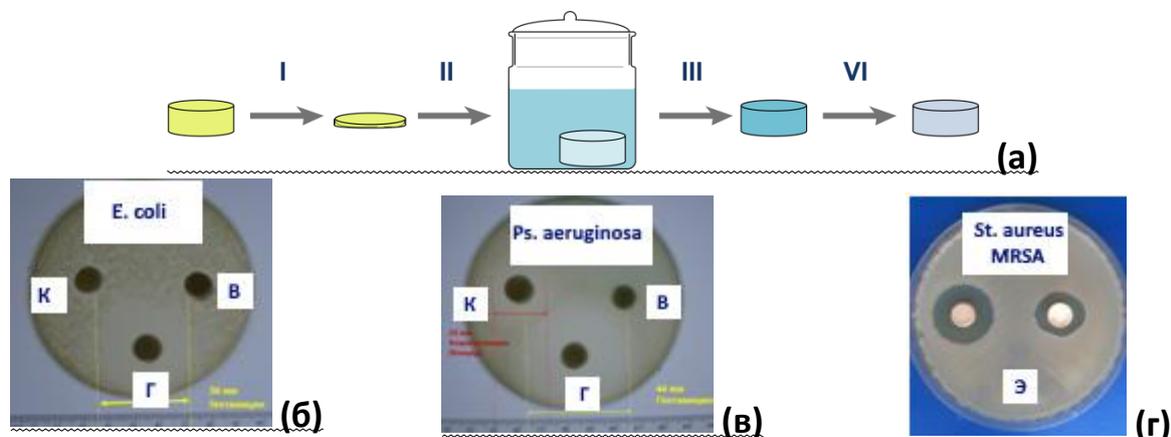


Рисунок 7. Схема формирования белковых депо-форм антибиотиков (а), и результаты оценки дискодиффузионным методом антибактериальной активности полученных препаратов, содержащих кларитромицин (К), гентамицин (Г), ванкомицин (В) и эремомицин (Э) по отношению к тест-культурам *Escherichia coli* (б), *Pseudomonas aeruginosa* (в), *Staphylococcus aureus* (г).

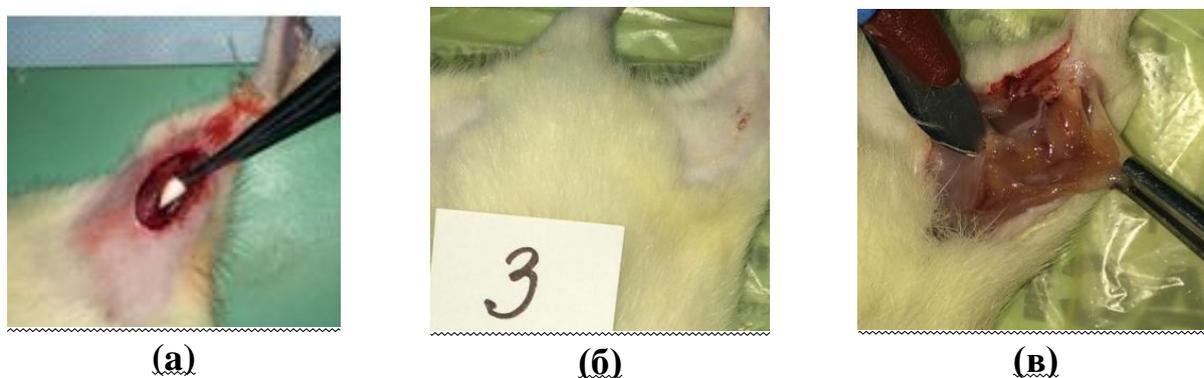


Рисунок 8. Губчатую альбуминовую депо-форму ванкомицина имплантируют в гнойную рану (а), которая полностью заживает на 10 суток эксперимента (б); по истечении 14 дней вскрытием показаны отсутствие нагноений и полная биодegradация препарата в организме животного (в).

Другой прикладной областью применения белковых криогелей 1-го типа является трехмерное культивирование различных клеток. Нами получены широкопористые криогели на основе суммарного белка плазмы крови крупного рогатого скота (КРС), протестированные в ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко (группа д.б.н. И.П.Савченкова) в качестве подложек для культивирования мезенхимных

мультипотентных стволовых клеток КРС. Показано, что такие клетки способны прикрепляться к стенкам данных широкопористых криоструктуратов и пролиферировать (Рис. 9а). Также было продемонстрировано, что криогели на основе суммарного белка плазмы крови могут быть использованы в качестве подложек для культивирования фибробластов человека (Рис. 9б).

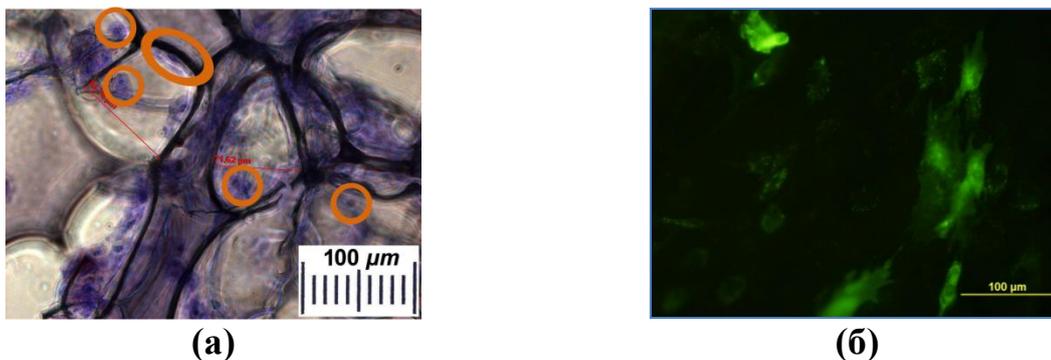


Рисунок 9. Микрофотографии криогелей 1-го типа на основе суммарного белка плазмы КРС со стволовыми клетками (а) и фибробластами (б).

Альбуминовые криогели 2-го типа, полученные в присутствии экзогенного сшивающего агента, в качестве которого использован 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид (ЭДК), являлись вторым объектом настоящей работы. Образцы криогелей данного типа синтезировали криогенной обработкой реакционной системы « $\text{H}_2\text{O} + \text{BCA} + \text{ЭДК}$ » по схеме, использованной для получения криогелей 1-го типа (Рис. 1) При межмолекулярной сшивке ЭДК реагирует с COOH -группой соответствующего аминокислотного остатка с образованием производного O -ацилизо мочевины, далее реагирующего с $\epsilon\text{-NH}_2$ -группой остатка лизина, что приводит к образованию пептидной связи, а присоединивший воду конденсирующий агент уходит в виде $\text{N,N}'$ -замещенной мочевины.

При использованных нами условиях синтеза пространственная сетка макропористых БСА-криогелей формировалась с высоким выходом, превышавшим 80%. Повышение количества вводимого в систему сшивающего агента обычно приводило к некоторому росту выхода гель-фракции (Рис. 10а). В то же время, зависимость величины выхода от концентрации альбумина выражена слабо. Гелеобразование при -15°C протекает более эффективно по сравнению с процессами при -20 и -25°C (Рис. 10б). При этом на качественном уровне, наиболее

«прочными» были препараты, сформированные в температурном интервале от -15 до -20°C.

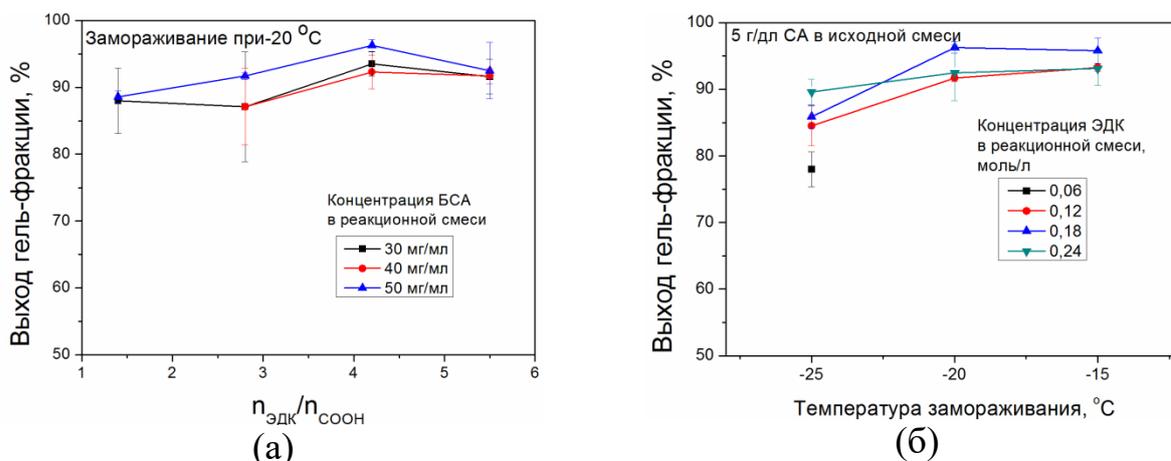


Рисунок 10. Зависимость выхода гель фракции БСА криогелей 2-го типа, полученных из различных по составу гелеобразующих систем, от мольного соотношения ЭДК и СООН-групп белка (а), а также от температуры замораживания (б).

Как правило, повышение концентрации кросс-агента в исходной системе должно приводить к росту плотности сшивки и, соответственно, к снижению степени набухания гелевой фазы полимерных криогелей. Данная зависимость наблюдалась для альбуминовых криогелей, полученных при -25°C (Рис. 11б). В случае криоструктурирования при -15°C характер такой зависимости оказался противоположным (Рис. 11а), а для образцов, сформированных при -20°C, наблюдалась переходная картина. Это может быть частично обусловлено особенностями модификации белка: с повышением концентрации ЭДК в исходной системе растет число встроенных в гелевую сетку способных координировать большее количество воды производных ЭДК, непрореагировавших с аминогруппами. В свою очередь, понижение температуры криогенной обработки, обычно, приводило к росту степени набухания за счет снижения эффективности сшивки макромолекул.

Отсутствие в реакционной системе хаотропного агента предполагает, что конформация альбумина в ходе криотропного гелеобразования изменяется незначительно. Поведение альбуминовых криогелей 2-го типа в тех же солюбилизирующих средах, что на Рис. 4, отчасти подтверждает это предположение.

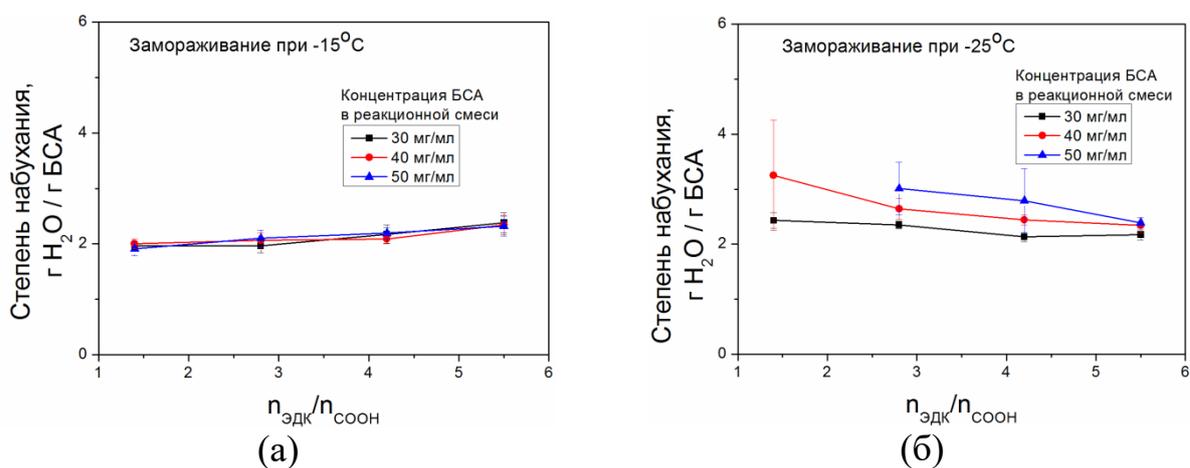


Рисунок 11. Зависимость степени набухания БСА криогелей 2-го типа, полученных замораживанием систем «H₂O + БСА + ЭДК» при -15°C (а) и при -25°C (б), от соотношения n_{ЭДК}/n_{СООН}.

Уже на начальном этапе наблюдалось увеличение объема криогелей, причем быстрее образец набухал в растворе гуанидилгидрохлорида (Рис. 12д). При более длительном инкубировании в наибольшей степени образец набухал в растворе ДСNa (Рис. 12е). Эти данные говорят о вкладе ионных и гидрофобных взаимодействий в стабилизацию гелевой сетки таких альбуминовых криогелей. После добавления восстановителя криогели дополнительно сильно набухали, но не растворялись (Рис. 12ж, з, и). Причиной являлось дальнейшее разворачивание глобул и дополнительная сольватация цепей вследствие разрыва внутримолекулярных дисульфидных мостов. Подобное поведение может свидетельствовать, что стенки макропор криогелей этого типа построены из в основном сохранивших глобулярную конформацию макромолекул БСА, объединенных в пространственной сетке боковыми пептидными связями.

В пользу такого вывода также свидетельствуют и данные ВЧ-ДСК (Рис. 12). Расчетным путем В.Я.Гринбергом установлено, что при -12°C альбумин подвергается холодной денатурации. Таким образом, криотропное гелеобразование сопровождается незначительным разворачиванием альбуминовой глобулы, которая под действием ЭДК фиксируется в таком состоянии в сетке геля. В результате, образующаяся пространственная сетка полимерной фазы данных криогелей состоит из частично денатурированных глобул альбумина, конформационная подвижность которых жестко фиксирована большим числом новых

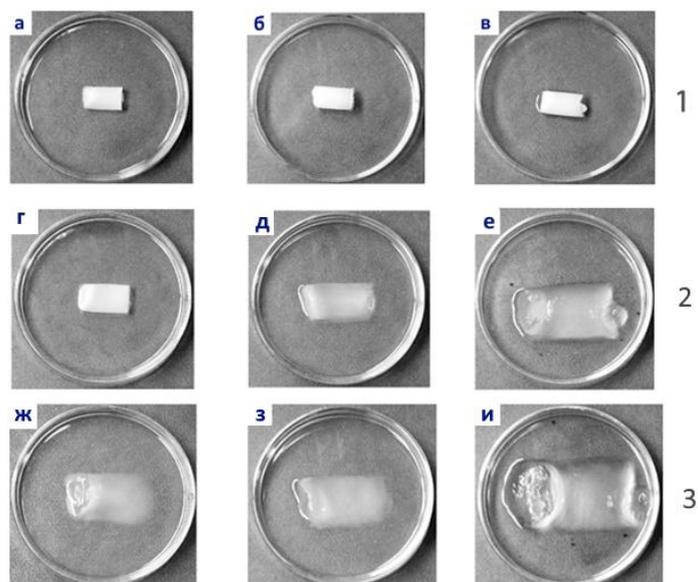


Рисунок 12. БСА-криогели 2-го типа через 1 минуту (1) и 24 часа (2) инкубирования в 8М растворе мочевины (а, г, ж), 5М растворе гуанидилгидрохлорида (б, д, з) и 1%-ном растворе ДСNa (в, е, и), а также через 24 часа после внесения в каждую систему дитиотреита (3).

ковалентных сшивок по боковым цепям, что объясняет отсутствие пиков, отвечающих термической денатурации альбумина, на термограммах БСА-криогелей данного типа (Рис. 13).

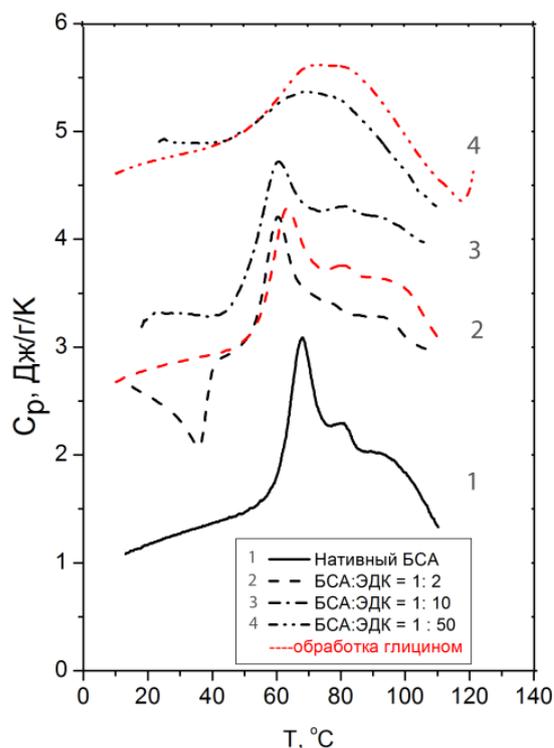


Рисунок 13. Термограммы раствора БСА и БСА-криогелей 2-го типа, полученных при различных соотношениях $n_{\text{БСА}}:n_{\text{ЭДК}}$ (20 мМ имидазольный буфер, 0,15 М NaCl, pH 7,4; концентрация белка 5 мг/мл; скорость нагревания 2 К/мин).

Микроструктура альбуминовых криогелей 2-го типа охарактеризована с помощью оптической микроскопии (Рис. 14). Средний диаметр макропор полу-

ченных БСА-криогелей был 60-120 мкм (Табл. 2) и явным образом не зависел от температуры замораживания системы при $-15...-25^{\circ}\text{C}$. По мере повышения концентрации ЭДК в исходной системе при всех трех температурах криотропного гелеобразования сечение пор получаемых альбуминовых криогелей лишь незначительно уменьшалось. Мы полагаем, это может быть связано с некоторым уменьшением размеров поликристаллов льда с ростом концентрации низкомолекулярного электролита (хлоридат ЭДК) аналогично известным эффектам других солей.

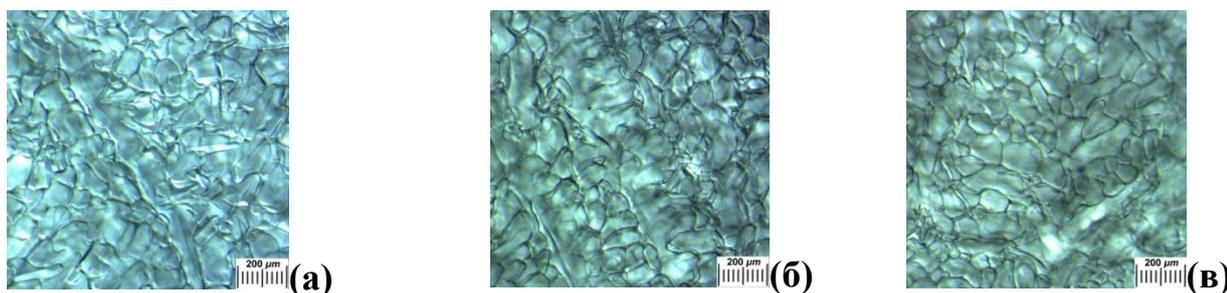


Рисунок 14. Микрофотографии дисков БСА-криогелей толщиной 1 мм, сформированных при -15 (а), -20 (б) и -25°C (в) из раствора предшественников с $[\text{БСА}]=50$ мг/мл и $[\text{ЭДК}]=0,12$ ммоль/мл

Таблица 2. Средний диаметр сечения макропор БСА-криогелей 2-го типа и его зависимость от температуры замораживания исходного раствора и мольного соотношения в нем $n_{\text{ЭДК}}/n_{\text{СООН}}$.

$n_{\text{ЭДК}}/n_{\text{СООН}}$	Температура замораживания ($^{\circ}\text{C}$)	D_n , мкм	D_w , мкм	$k=D_n/D_w$
2	-15	93 ± 25	119 ± 40	1,29
3		74 ± 20	96 ± 33	1,30
4		45 ± 10	59 ± 15	1,18
2	-20	99 ± 21	125 ± 38	1,27
3		83 ± 21	106 ± 34	1,28
4		69 ± 19	91 ± 32	1,32
2	-25	85 ± 23	115 ± 43	1,35
3		65 ± 19	86 ± 32	1,32
4		61 ± 15	79 ± 27	1,29

В составе крови альбумин служит для связывание и транспортировки различных лигандов, что предполагает возможность использования альбуминовых криогелей в качестве биосорбентов. Для оценки сорбционных свойств альбуминовых криоструктуратов были проведены опыты по сорбции модельного сорбата, в качестве которого использовали триптофан (Трп). Элюент, содер-

жавший растворенный сорбат, пропускали при постоянной скорости через цилиндрический блок БСА-криогеля, и по разности концентраций Трп в элюенте и в элюате, определенной спектрофотометрически, оценивали сорбционную емкость образцов. БСА-криогели 2-го типа обладают сорбционной активностью по отношению к Трп, и из зависимости сорбционной емкости от соотношения $n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$ в реакционной смеси (Табл. 3), использованной для синтеза губчатых образцов, могут быть выбраны оптимальные условия для формирования таких биосорбентов.

Формирование пространственной сетки обсуждавшихся выше альбуминовых криогелей протекает в замороженной гелеобразующей системе, однако

Таблица 3. Количественные результаты измерений сорбционной емкости БСА-криогелей 2-го типа.

Элюент: H ₂ O + Трп		Элюент: H ₂ O + 0,15 М NaCl + Трп	
$n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$	Сорбционная емкость, мг Трп / г БСА	$n_{\text{COOH}}:n_{\text{ЭДК}}$	Сорбционная емкость, мг Трп / 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

известен и иной способ формирования макропористых полимерных гелей, при котором сначала проводят криоструктурирование высокомолекулярного предшественника, а затем образованную широкопористую текстуру полимерного материала закрепляют действием каких-либо сшивателей. Мы использовали данный подход для получения и исследования ковалентно-сшитых белковых криоструктуратов. Для этого, на первой стадии раствор белковых предшественников, который мог быть как чистым альбумином, так и суммарным белком сыворотки/плазмы крови, замораживали (I, Рис. 15) и высушивали лиофильно (II, Рис. 15). Для сшивания макромолекул в полученном пористом белковом текстурате был использован спиртовой раствор ЭДК (III, Рис. 15). Зафиксированный таким образом пористый криоструктурат отмывали и далее исследовали (IV, Рис. 15).

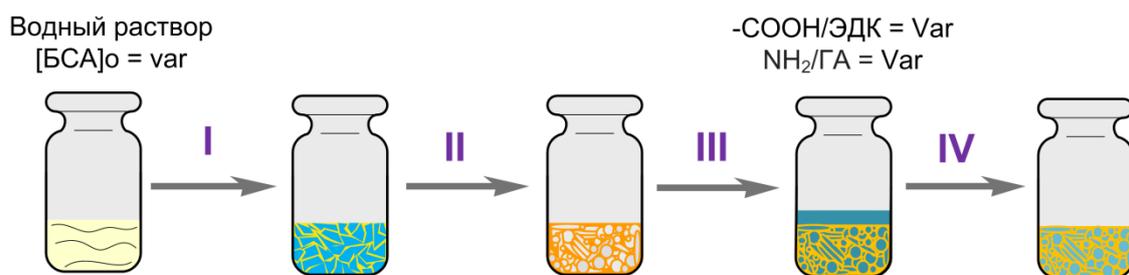


Рисунок 15. Схема процесса формирования БСА-криоструктуратов.

Оценка влияния температуры криогенной обработки и соотношения компонентов при сшивке на выход гель-фракции показала, что данный способ формирования альбуминовых криоструктуратов является эффективным, и образование сшитой полимерной сетки в данной системе протекает с выходом, практически всегда близким, либо превышающим 95%. Повышение концентрации сшивающего агента в спиртовом растворе, которым обрабатывали белковый криотекстурат, как правило, приводило к слабому росту эффективности сшивки. При этом несколько более эффективно происходила фиксация белка в пространственной сетке в случае криоструктуратов, сформированных замораживанием при более высокой температуре. Для криоструктуратов данного типа также были исследованы осмотические характеристики. Было найдено, что в той или иной мере на степень набухания альбуминовых криоструктуратов влияет и исходная концентрация белка, и концентрация сшивающего агента, а также, но не очень значительно, температура криогенной обработки.

Для микроструктуры полученных материалов, как и в случае альбуминовых криогелей, характерна выраженная гетерогенность (Рис. 16а). При этом средний диаметр пор широкопористых альбуминовых криоструктуратов, полученных данным способом, был несколько больше, чем для альбуминовых криогелей и мог превышать 200 мкм. Сечение макропор альбуминовых криоструктуратов несколько уменьшалось при понижении температуры замораживания белкового раствора, а также уменьшалось с увеличением содержания сшивающего агента в растворе (Рис. 16б), использованном на стадии сшивки.

Нами показано, что данный способ формирования криоструктуратов позволяет применять эту технику для иммобилизации ферментов в составе их ге-

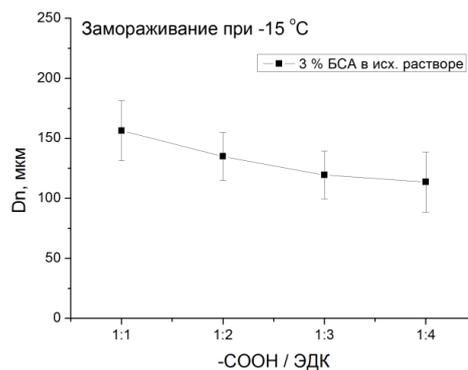
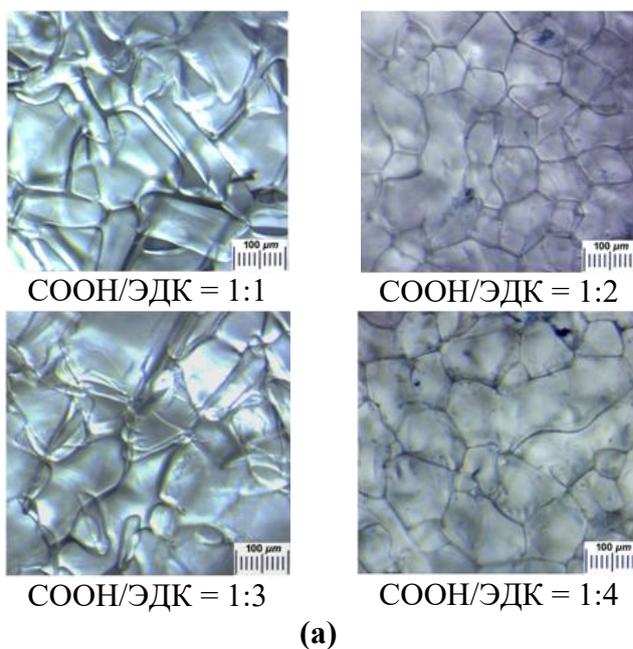


Рисунок 16. (а) Микрофотографии дисков БСА-криоструктуратов толщиной 1 мм, сформированных при -15°C при различных соотношениях SOOH/ЭДК; (б) зависимость среднего численного диаметра пор от соотношениях SOOH/ЭДК.

левой сетки. Органофосфатгидролаза (сокр. ОФГ) – металлофермент, способный гидролизовать широкий спектр фосфорорганических соединений, например пестицидов (параоксон, паратион и т.д.).

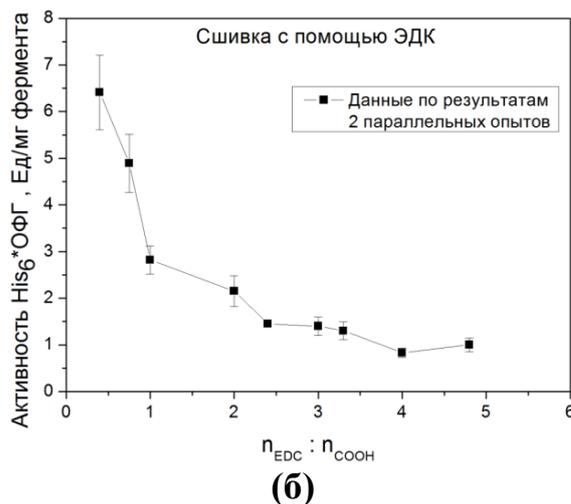
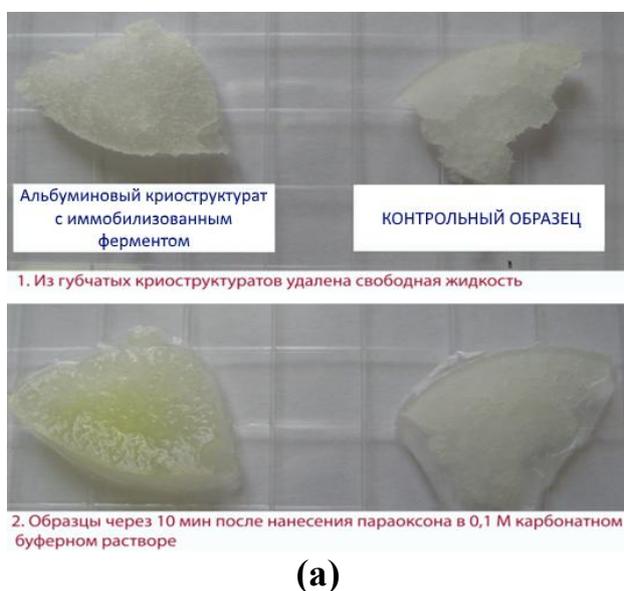


Рисунок 17. Качественная реакция параоксона с образцом криоструктурата, содержащего иммобилизованный фермент ОФГ (а); зависимость удельной активности фермента, иммобилизованного в составе БСА-криоструктурата, от количества кросс-агента, использованного на стадии сшивки белка (б).

Для практики представляют интерес биосовместимые материалы, содержащие в своем составе такой фермент, которые были бы способны обезврежи-

вать вредные фосфорсодержащие вещества *in vivo*. В совместных экспериментах с группой Е.Н. Ефременко (МГУ им. В.И. Ломоносова) было найдено, что полученные нами материалы обладают каталитической активностью по отношению к пестициду параоксону (Рис. 17а). Максимальной активностью обладает фермент, встроенный в матрицу альбуминового криоструктурата с помощью карбодиимида (Рис. 17б).

Основные результаты и выводы

- Разработаны основы различных подходов к синтезу широкопористых криогелей и криоструктуратов на основе сывороточного альбумина, суммарных белков плазмы и сыворотки крови.
- Эффективность криотропного гелеобразования определяется температурой замораживания исходной системы, а также концентрацией в ней собственно белкового предшественника и вспомогательных веществ, участвующих в формировании ковалентных узлов пространственной сетки альбуминовых криогелей и криоструктуратов.
- Изучена зависимость характеристик полученных криоструктуратов от режимов криогенной обработки начальных реакционных смесей, и найдены оптимальные условия для формирования таких белковых материалов.
- Реализованы различные варианты биотехнологического и биомедицинского применения полученных в работе альбуминовых криогелей: в качестве депо-форм лекарственных препаратов для химиотерапии инфицированных ран, биосорбентов, носителей иммобилизованных ферментов, а также подложек для культивирования стволовых клеток и фибробластов.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях

1. I.A.Rodionov. Cryostructuring of polymer systems. Proteinaceous wide-pore cryogels generated by the action of denaturant/reductant mixtures on bovine serum albumin in moderately frozen aqueous media / I.A.Rodionov, N.V.Grinberg, T.V. Burova, V.Ya.Grinberg, V.I.Loizinsky. // *Soft Matter*. – 2015. - V. 11. – P. 4921–4931.

2. И.А.Родионов. Изучение криоструктурирования полимерных систем 42. Физико-химические свойства и микроструктура широкопористых ковалентно-сшитых альбуминовых криогелей. / И.А. Родионов, Н.В.Гринберг, Т.В.Бурова, В.Я.Гринберг, В.И.Лозинский. // Колл. ж.- 2016. - Том 78. - № 4. - С. 465–478.

3. И.А.Родионов. Новые макропористые биосорбенты на основе криогелей, сформированных из сывороточного альбумина. / И.А.Родионов, В.И. Лозинский, А.Е.Александрова, И.В.Бакеева. // Тезисы докладов VIII Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, РФ. – 2015. - С. 306-307.

4. И.А.Родионов. Широкопористые криоструктураты на основе белков плазмы крови как матрицы для трехмерного культивирования стволовых клеток. / И.А.Родионов, Т.С.Герасимова, И.М.Волкова, Д.Г.Коровина, И.П.Савченкова, В.И.Лозинский. // Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Биотехнология в комплексном развитии регионов», Москва, РФ. – 2016. - С.8-9.

5. V.I.Loizinsky. Cryogels based on biopolymers are promising materials biomedical interest. / V.I.Loizinsky E.A.Podorozhko, R.V.Ivanov, I.A.Rodionov, V.K. Kulakova, A.N.Ryabev. // EMN Meeting on Hydrogel Materials, Singapore. - Book of abstracts. - 2016. – P. 32-33.

6. И.А.Родионов. Широкопористые криогели из сывороточного альбумина в качестве полимерной основы биосовместимых губчатых антибактериальные материалы. // Тезисы докладов II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века», Казань, РФ. – 2016. – С. 308.

7. И.А.Родионов. Нанокompозитные криоструктураты на основе сывороточного альбумина и органофосфатгидролазы. / И.А.Родионов, Т.С.Герасимова, И.В.Лягин, Е.Н.Ефременко, В.И.Лозинский // Тезисы докладов VI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокompозиты», Химки, РФ. – 2016. – С. 37.