

На правах рукописи

Сидорский Егор Владимирович

**СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ
НОСИТЕЛЕЙ ВЕЩЕСТВ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ ШИРОКОПОРИСТЫХ
КРИОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в лаборатории криохимии (био)полимеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института 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
Официальные оппоненты:	Варламов Валерий Петрович доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», заведующий лабораторией инженерии биополимеров Капустин Дмитрий Валерьевич доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории полимеров для биологии
Ведущая организация:	Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет»

Защита состоится «30» мая 2023 года в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале (ауд.443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ имени Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <http://diss/muctr.ru/>

Автореферат разослан «__» апреля 2023 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета 99.0.027.03,
кандидат технических наук, профессор



И.В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: Ранее в лаборатории криохимии (био)полимеров ИНЭОС РАН показана возможность использования альбуминовых криогелей в качестве носителей для депо-форм таких биологически активных веществ, как антибиотики. Однако, чистый сывороточный альбумин довольно дорогой биополимер и поэтому представлялось перспективным получить подобные носители на основе суммы белков сыворотки, т.е. без выделения индивидуального альбумина. Криогели на основе суммарных белков сыворотки крови не были ранее известны и, соответственно, их характеристики и возможность применения в качестве носителей физиологически активных агентов не исследовались.

Для формирования криогелей на основе суммы белков сыворотки крови необходимо было определить оптимальные условия процесса синтеза целевого продукта: температуры криогенной обработки, концентрации гелеобразующих компонентов и др. Возможность использования данных криогелей в качестве носителя для доставки биологически активных белково-пептидных биорегуляторов (**БПБ**) привлекательна, поскольку последние применяются для лечения различных заболеваний, среди которых рак, сахарный диабет, переломы костей, ортопедические проблемы и др. Первые исследования по использованию подобных биорегуляторов, загруженных в биополимерные криогели, для индукции регенерации костной ткани показали весьма многообещающий потенциал таких систем доставки. Поэтому важной и актуальной задачей являлось изучение возможности применения криогелей на основе суммы белков сыворотки крови в качестве носителей таких биорегуляторов, а также анализ состава полимерной фазы данных криогелей и выяснения влияния условий процесса криоструктурирования на физико-химические характеристики получаемых губчатых материалов.

Целью работы являлось: 1) получение криогелей на основе суммы белков сыворотки крови, изучение физико-химических свойств этих полимерных матриц, их макропористой морфологии, белкового состава полимерной фазы, а также исследование возможности применения данных криогелей в качестве носителей биорегулятора из ткани склеры; 2) выделение и очистка биорегулятора ткани склеры, исследование его состава, биологического действия, а также анализ вторичной и третичной структуры компонентов пептидно-белкового биорегулятора.

Научная новизна результатов. В результате выполненных исследований получены новые широкопористые криогели на основе суммы белков сыворотки крови, используя денатурирующий агент и тиол в качестве индукторов гелеобразования. Установлено, что при температуре криогенной обработки -15°C и концентрации суммарного белка около 50 мг/мл формируются криогели с наибольшим выходом гель-фракции и наименьшим значением степени набухания стенок макропор. Показано, что такие физико-химические характеристики полученных крио-

гелей, как выход гель-фракции, степень набухания полимерной фазы, а также особенности широкопористой морфологии полимерной матрицы, зависят от условий криоструктурирования. Найдено, что в состав полимерной сетки полученных криогелей помимо цепей сывороточного альбумина включаются полипептиды, относящиеся к иммуноглобулинам, трансферринам и глобулинам. Показана возможность использования криогелей на основе суммарных белков сыворотки крови в качестве носителей белково-пептидных биорегуляторов для их доставки к биологической мишени.

Практическая значимость работы заключается в определении оптимальных параметров процесса формирования криогелей на основе суммы белков сыворотки крови, которые могут применяться в качестве носителей биорегуляторов в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Личный вклад автора включает участие в постановке целей и задач исследования, планировании и проведении экспериментов по синтезу криогелей, получении биорегулятора и изучении его состава, физико-химических свойств и биологического действия, в обобщении, анализе и публикации экспериментальных данных, формулировании выводов диссертационной работы, а также в написании научных статей и выступлении с докладами по теме диссертации на научных конференциях.

Публикации. Основные результаты диссертации изложены в 13 печатных работах: 8 статьях в научных журналах, включенных в перечень ВАК, 1 патенте и 4 тезисах докладов.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях и конгрессах: молодежная конференция «Биохимическая физика ИБХФ РАН-ВУЗы» 2016, конгресс «Слабые поля и излучения в биологии и медицине» 2018, конгресс «Регенеративная биология и медицина» 2021 и «Национальный конгресс по регенеративной медицине» 2022.

Автор выражает особую благодарность к.х.н. А.П.Ильиной (ФГУП ГосНИИПП), к.б.н. М.С.Краснову (ЛКБ ИНЭОС РАН), д.б.н. Ямсковой Виктории Петровне за участие в обсуждении и организации экспериментальной работы на разных ее этапах.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, списка литературы (211 ссылок) и изложена на 139 страницах машинописного текста. Работа содержит 49 рисунков и 5 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В первой главе описано большое количество криогенно-структурированных гелелей на основе различных биополимеров, которые в настоящее время используются в медицине и биотехнологии. Отмечена эффективность применения криогелей в качестве носителей биологически активных веществ, в частности белково-пептидных биорегуляторов. Также рассмотрена биоактивность и некоторые физико-химические свойства биорегуляторов данной группы.

Экспериментальная часть

Во второй главе описаны объекты исследования, методики формирования и изучения характеристик криогелей на основе суммы белков сыворотки крови, а также условия получения и изучения свойств биорегулятора ткани склеры.

Обсуждение результатов

Криогели на основе белков сыворотки крови были синтезированы по схеме, где гелевая сетка образуется в результате разворачивания белковых глобул, вызванного действием денатуранта (мочевина) и параллельно протекающей реакции тиол-дисульфидного обмена между полипептидными цепями, которая инициируется небольшим количеством тиольного восстановителя – цистеина (**Цис**). Такой подход ранее применялся для синтеза альбуминовых криогелей. В настоящем же исследовании, когда исходный раствор содержал многокомпонентный предшественник – сыворотку крови, которая состоит из набора различных белков, необходимо было определить оптимальные условия процесса криотропного гелеобразования, а именно концентрацию белка и температуру криогенной обработки для получения криогелей, наиболее подходящих по своим свойствам для последующих биологических исследований.

Влияние исходной концентрации белка, а также условий процесса криоструктурирования, на физико-химические характеристики криогелей

В результате криогенной обработки в интервале от -15°C до -25°C системы «сыворотка крови + мочевина + Цис» с различной концентрацией белка образовывались криогели, представляющие собой губчатые гелевые матрицы. Концентрации мочевины и Цис в исходной реакционной смеси были выбраны на основании результатов предыдущих исследований¹ и были равны 1,5 моль/л и 0,01 моль/л, соответственно. Полученные полимерные материалы отделяли несвязанную влагу при несильном сжатии, а также были способны к повторному набуханию при погружении образцов в воду с полным восстановлением первоначальной формы.

Для того, чтобы оценить зависимость свойств получаемых криогелей от концентрации суммарного белка и температуры замораживания, было изучено влияние этих параметров на такие показатели, как выход гель-фракции² (Y), являющийся индикатором эффективности гелеобразования, а также на степень набухания (S) полимерной фазы³, зависящей от плотности сшивки трехмерной сетки в стенках макропор этих гетерофазных гелевых матриц.

Установлено, что наиболее эффективно гелеобразование протекало при -15°C , а снижение температуры криогенной обработки до -20°C или, тем более, до -25°C , приводило к уменьшению выхода гель-фракции от 81-93% до 78-80% и далее до 62-64%. Такая же тенденция на-

¹ Rodionov I.A., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya., Lozinsky V.I. 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 // Soft Matter. – 2015 – V. 24. – №. 11. – P. 4921–4931

² $Y = (m_{\text{сух}} / m_{\text{теор}}) \times 100 \%$

³ $S = (m_{\text{вл}} - m_{\text{сух}}) / m_{\text{сух}}$ (г H₂O/г полимера), где $m_{\text{вл}}$ – масса «отжатого» влажного образца, $m_{\text{сух}}$ – масса сухого образца, $m_{\text{теор}}$ – масса белка при условии 100%-ного протекания гелеобразования.

блюдалась и в случае белковых криогелей, приготовленных на основе только сывороточного альбумина, что демонстрирует общий характер эффекта для обеих этих систем – индивидуального альбумина и смеси сывороточных белков, где тенденции близки в отношении влияния исходной концентрации белка на значения Y . Для криогелей, сформированных при -20 и -25°C , выход гель-фракции был и несколько меньше, и отличался от значений Y для образцов, сформированных при -15°C (Рис. 1А). В последнем случае более низкие значения были характерны для образцов, приготовленных на основе раствора сыворотки крови с концентрацией общего белка $37,5$ мг/мл; следовательно, дальнейшее снижение концентрации макромолекулярных предшественников в исходном растворе было нецелесообразным.

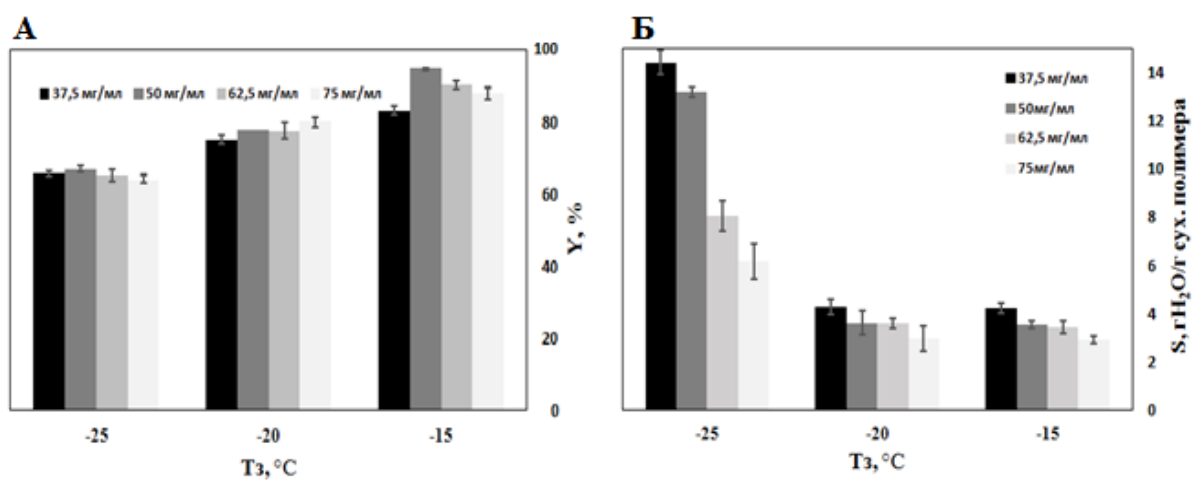


Рис. 1. Значения выхода гель-фракции (Y) и степени набухания (S) криогелей, приготовленных из исходных растворов с различной концентрацией белков сыворотки крови ($75,0$, $62,5$, $50,0$ и $37,5$ мг/мл) при температуре замораживания -15 , -20 и -25°C .

Что касается влияния начальной концентрации белка и условий криогенной обработки на характеристики набухания полимерной фазы в полученных широкопористых криогелях, найдено, что значения S для равноконцентрированных образцов, сформированных при -15 и -20°C , были очень близки. В свою очередь, стенки пор губчатых образцов, приготовленных при -25°C , набухали значительно сильнее по сравнению с предыдущими образцами (Рис. 1Б). Эти данные свидетельствуют о том, что трехмерная полимерная сетка белковых криогелей, сформированных при самой низкой температуре (-25°C), была сшита в гораздо меньшей степени по сравнению с образцами, синтезированными при -20 и -15°C . При этом плотность сшивки также зависела от исходной концентрации белка: чем выше был этот параметр, тем ниже были соответствующие значения S , т.е. плотность сшивки полимерной сетки была выше. Таким образом, оптимальный интервал температур для синтеза таких белковых криогелей (Рис. 1) находится в примерном диапазоне от -15 до -20°C . Повышение концентрации белка сыворотки крови в начальном растворе приводило к снижению степени набухания (параметр S) полимерной фазы стенок макропор получаемых криогелей (Рис. 1Б). Это объясняется более частой сшивкой цепей полимерной сетки в образцах, сформированных из более концентрированных растворов полимерного предшественника. В свою очередь, губчатые

криогели, полученные при -25°C из исходного раствора сыворотки крови с концентрацией белка 37,5 и 50,0 мг/мл, не могли быть использованы в дальнейшем в биологическом тестировании из-за недостаточной механической прочности гелевого материала.

Влияние условий формирования криогелей на их макропористую морфологию

Для белковых криогелей, сформированных при различных температурах замораживания, была изучена их макропористая морфология. На Рис. 2 приведены полученные с помощью оптического стереомикроскопа микрофотографии криогелевых дисков (толщина 1 мм) на основе суммы белков сыворотки крови. Микроструктура этих белковых губок была схожа с другими известными широкопористыми химически сшитыми криогелями¹, полученных в умеренно замороженных средах (как правило, водных). Тонкие элементы структуры на микрофотографиях на Рис. 2 – это окрашенные метиленовым синим полимерные стенки макропор, а округлые области – сами макропоры. Средний размер макропор, оцененный с помощью программы ImageJ, для этих образцов имел следующие значения: $108,3 \pm 13,8$ мкм (а), $101,4 \pm 13,2$ мкм (б) и $95,0 \pm 11,4$ мкм (в). Для криогелей, полученных при различной температуре замораживания, наблюдалось, что при более низкой температуре криогенной обработки внутри объема криогеля образовывались поры несколько меньшего размера, что характерно и для других криогелей вообще^{1,4}.

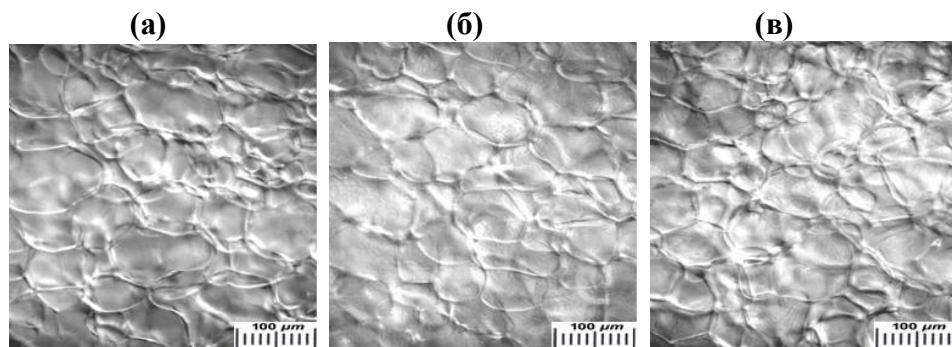


Рис. 2. Микрофотографии набухших в воде криогелей, сформированных при -15°C (а), -20°C (б) и -25°C (в) (концентрация белков во всех исходных растворах составляла 50 мг/мл).

Исходя из данных по выходу гель-фракции, характеристикам степени набухания (Рис. 1) и анализа макропористой структуры криогелей, полученных из суммы белков сыворотки крови (Рис. 2), можно сделать вывод, что оптимальными условиями для воспроизводимого приготовления таких гелевых материалов являются начальная концентрация белка около 50 мг/мл и температура замораживания в районе -20°C .

Белковый состав криогелей

Полученные результаты о влиянии исходных концентраций белка и условий процесса криоструктурирования на физико-химические характеристики получаемых криогелей и их макропористую структуру имеют практически такой же характер зависимостей, как и для криогелей на основе индивидуального сывороточного альбумина. Он является основным компо-

⁴ Dainiak M.B, Allan I.U., Savina I.N., Cornelio L., James E.S., James S.L., Mikhalovsky S.V., Jungvid H., Galaev I.Y. Gelatin–fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimisation and in vitro study // *Biomaterials*. – 2010. – V. 31. – №. 1. – P. 67–76.

нением по массе среди белков сыворотки, и поэтому можно предположить, что цепи альбумина также являются основным компонентом полимерной сетки криогелей, синтезированных в этом диссертационном исследовании.

Для того чтобы установить какие еще белковые компоненты исходной сыворотки крови входили в состав полимерной сетки соответствующих криогелей, мы проанализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) их состав после растворения криогеля в среде додецилсульфат натрия/дителиотреит (Рис. 3). Криогель был приготовлен замораживанием при -15°C разбавленной сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) с концентрацией белка 50 мг/мл. Обнаружено, что в пространственную сетку образующихся белковых криогелей встраиваются не только полипептидные цепи альбумина, но и цепи, принадлежащие некоторым другим белкам сыворотки крови, в частности, иммуноглобулинам, трансферрину, α -1 и α -2 глобулинам.

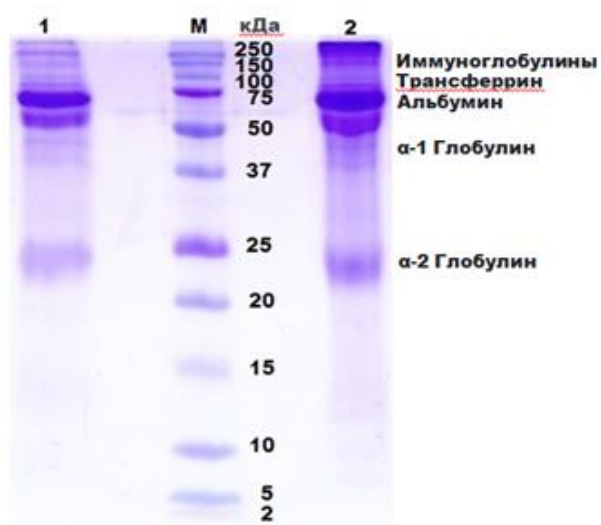


Рис. 3. Электрофореграмма препарата, полученного в результате растворения белкового криогеля в растворе ДДС-На и ДТТ (дорожка 1), сыворотки крови (дорожка 2) и молекулярных маркеров (дорожка М), внесённых в ПААГ. Образцы 1 и 2 содержали 10 мкг белков.

Конечно, на Рис. 3 представлены качественные данные, тем не менее, электрофореграмма свидетельствует об общем механизме участия глобулярных белков сыворотки в образовании полимерной сетки за счёт сшивания полипептидных цепей дисульфидными связями. Кроме того, эти результаты позволяют предположить, что белковые компоненты сыворотки крови, на основе которых получены данные полимерные материалы, могут оказывать благоприятное биологическое влияние на их свойства при использовании таких матриц в качестве носителей белково-пептидных биорегуляторов.

Выделение и очистка белково-пептидного биорегулятора ткани склеры КРС

Для выделения БПБ из ткани склеры глаза быка была применена методика, которая включала экстракцию ткани склеры раствором состава: 1 мМ CaCl_2 , 0,15 М NaCl , 1,0 мМ HEPES при 4°C , осаждение в насыщенном растворе сульфата аммония и разделение фракций на обращенной фазе ВЭЖХ. После хроматографического разделения в градиенте вода-ацетонитрил растворившегося осадка была получена фракция со временем удерживания 53 мин, которая, как предполагалось, является белково-пептидным биорегулятором (Рис. 4).

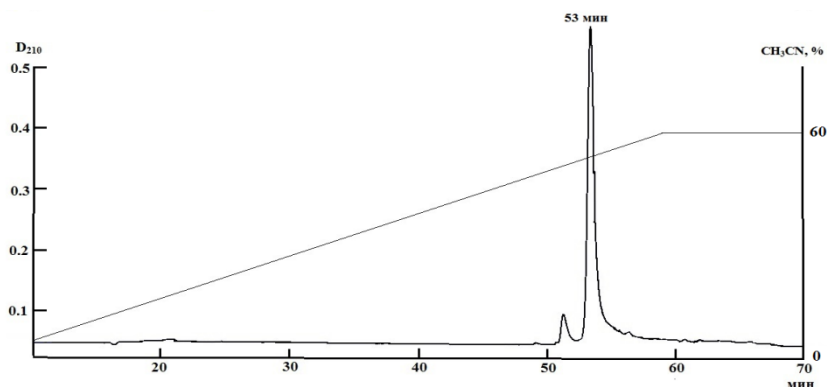


Рис. 4. Хроматограмма раствора осадка тканевого экстракта КРС. По оси абсцисс - время элюции (мин), по оси ординат - оптическая плотность при длине волны 210 нм.

Изучение состава БПБ, выделенного из ткани склеры КРС

Ранее было показано, что белково-пептидные биорегуляторы имеют сложный состав, основой является пептидно-белковый комплекс, в состав которого входят биологически активные пептиды и белок, модулирующий их биологическое действие⁵.

Полученная после ВЭЖХ фракция биорегулятора из склеры была исследована методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Согласно данным этого анализа изучаемая фракция включала белок, с молекулярной массой 66387 Да (Рис. 5). При секвенировании данного белка по методу Эдмана (совместно с сотрудниками лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН) была установлена *N*-концевая 15-членная аминокислотная последовательность этого белка: DTHKSEIAHRFKDLG-. Она была идентична *N*-концевой аминокислотной последовательности изоформы молекулы бычьего сывороточного альбумина.

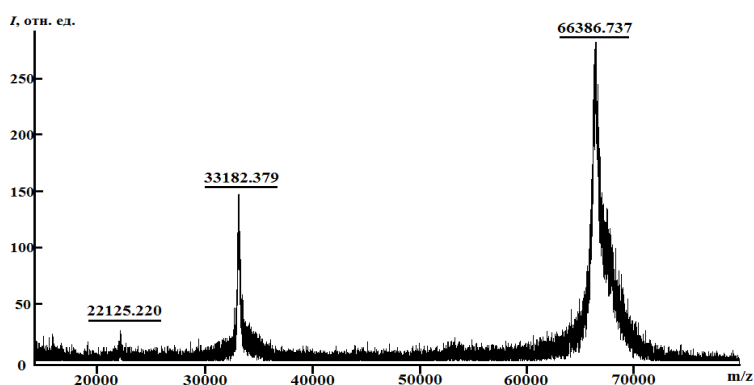


Рис. 5. MALDI-TOF масс-спектр фракции БПБ, полученного после проведения ВЭЖХ (Рис. 4).

Для изучения состава БПБ применялся метод электрофореза в ПААГ по Лэммли. Обнаружено наличие полосы, отвечающей белку с молекулярной массой ~66000 Да. Фрагмент полосы вырезали из геля и проводили *in situ* гидролиз белка трипсином. Продукты гидролиза экстрагировали и анализировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Установлено, что пептиды гидролизата являются фрагментами изоформы сывороточного альбумина *B. taurus* (под номером gi | 1351907 в базе данных Uniprot). Также для идентификации пептидов БПБ ВЭЖХ-очищенную фракцию биорегулятора (Рис. 4), обрабатывали денатурирующими агентами: гуанидин гидрохлоридом, этилендиаминтетрауксусной кислотой и этанолом. После хроматографического разделения в градиенте вода-ацетонитрил найдено, что в результате денатурирую-

⁵ Ямскава В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А., Вечеркин В.В., Ямсков И.А. Исследование белка-инактиватора адгезивного гликопротеина из сыворотки крови млекопитающих // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 401. – № 4. – С. 407–413.

щего воздействия от исследуемой фракции отделяется другие ее компоненты со временем удерживания 33 и 34 мин. Масс-спектрометрический анализ фракции со временем удерживания 33 мин показал наличие в её составе ряда пептидов с молекулярными массами 1300-5080 Да. Анализ этих данных свидетельствует, что в результате действия дезагрегирующих агентов на ВЭЖХ-фракцию биорегулятора произошло нарушение белково-пептидного комплекса с отделением фракции пептидов. Таким образом, полученные результаты показывают, что ВЭЖХ-фракция БПБ, представляет собой пептидно-белковый комплекс, который является основой биорегулятора, выделенного из ткани склеры глаза быка.

Некоторые физико-химические свойства белково-пептидного биорегулятора

Для определения содержания элементов вторичной структуры БПБ были использованы методы УФ- и КД-спектроскопии. Присутствие во второй производной УФ-спектра биорегулятора отрицательной полосы поглощения при 292 и положительной при 296 нм, характерных для остатков триптофана, указывало на наличие его остатков в составе БПБ. Отрицательные полосы при 283 нм и две положительные – 279 нм и 288 нм, свидетельствовали о наличии остатков тирозина. Также во второй производной спектра БПБ было обнаружено семь четко выраженных отрицательных и положительных полос в УФ-области 250-280 нм, относящихся к остаткам фенилаланина.

Согласно программным расчетным данным КД-спектров вторичной структуры БПБ, он содержит 47,3% α -спиралей, 14,6% β -листов, 10,5% β -изгибов и 27,6% участков статического клубка (Таблица 1). Обработка БПБ гуанидин гидрохлоридом с последующим разделением реакционной смеси на колонке с обращенной фазой позволило нам получить фракцию, содержащую пептиды с мол. массами 1300-5100 Да и фракцию, содержащую альбумин. Расчет элементов вторичной структуры обеих фракций показал уменьшение содержания α -спиралей и увеличение β -структуры и участков статического клубка (Таблица 1). Предполагается, что взаимодействие пептидов с изоформой альбумина в БПБ стабилизирует такой комплекс, что подтверждается более высоким содержанием α -спиралей во фракции БПБ. Аналогичная ситуация наблюдалась в работе⁶ при изучении вторичной структуры раствора сывороточного альбумина, то есть высокое содержание α -спиралей во вторичной структуре альбумина является критерием стабильности молекулы.

Таблица 1. Содержание элементов вторичной структуры БПБ

Название образца	α -спираль, %	β -структура, %	β -изгиб, %	Статистический клубок, %
БПБ	47,3±0,8	14,6±0,2	10,5±0,2	27,6±0,5
фракция пептидов	20,0±0,3	19,6±0,3	11,4±0,2	49,0±0,8
фракция изоформы альбумина	21,9±0,4	30,7±0,5	11,9±0,2	35,5±0,6

⁶ Abrosimova K.V., Shulenina O.V., Paston S.V. FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin. // J. Phys. Conf. Ser. – 2016. – №. 769. – P. e012016

Влияние температуры на вторичную и третичную структуру и межмолекулярную ассоциацию белково-пептидного биорегулятора

Структура БПБ ткани склеры характеризуется наличием α -спирализованной вторичной структуры (Рис. 6А) с точкой конформационного термомеханизма при 65°C (Рис. 6Б), что свидетельствует о значительной стабильности белка.

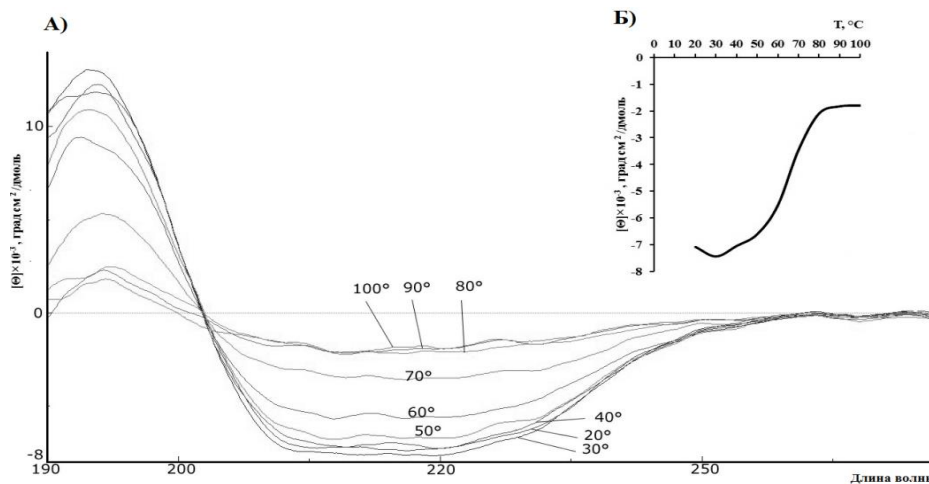


Рис. 6. А) КД-спектр БПБ (100 мкг/мл) в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2 в области 190-260 нм после термической обработки. Б) Зависимость эллиптичности при 222 нм БПБ ткани склеры от температуры.

Изоформа альбумина, входящего в состав БПБ, в водных растворах образует термостабильные наноразмерные частицы, участвующие в транспортировке активных пептидов, в то время как пептиды стабилизируют молекулу альбумина, сохраняя его способность к формированию лабильных/подвижных агрегатов (ассоциатов). Данное свойство характерно для молекулярных шаперонов, т.к. лабильность шаперонных олигомеров важна для распознавания и связывания субстратов.

Влияние белково-пептидного биорегулятора на тепловую ДТТ-индуцированную агрегацию БСА и лизоцима

Для изучения влияния белково-пептидного биорегулятора ткани склеры на агрегацию БСА *in vitro* была выбрана модель агрегации бычьего сывороточного альбумина (БСА) при 50°C в водном растворе 10 мМ дитиотреит (ДТТ). Исследование проводилось с помощью метода динамического светорассеяния, который позволяет регистрировать изменения интенсивности рассеянного света и гидродинамического радиуса (R_h) белковых агрегатов в ходе агрегации.

БПБ в концентрации 0,5 и 1 мкг/мл подавляет ДТТ-индуцированную агрегацию БСА. Установлено, что в инкубированном при 50°C в течении 75 мин водном растворе БСА в присутствии 10 мМ ДТТ образуются две группы частиц с размерами – $114,0 \pm 29,0$ нм и $517,0 \pm 132,5$ нм. При добавлении биорегулятора в концентрации 0,5 мкг/мл к раствору БСА с ДТТ происходит ингибирование ДТТ-индуцированной агрегации БСА, а значения R_h уменьшается до 10 ± 2 нм и 90 ± 45 нм. И только при добавлении в реакционную смесь 1 мкг/мл биорегулятора ткани склеры происходит 100%-ное ингибирование ДТТ-индуцированной агрегации БСА.

Влияние белково-пептидного биорегулятора ткани склеры на термическую агрегацию БСА, индуцированную ДТТ, также была изучена методом КД-спектроскопии. На рисунке 7А приведены КД-спектры БСА в УФ-области (190-250 нм) с и без 10 мМ ДТТ после нагревания

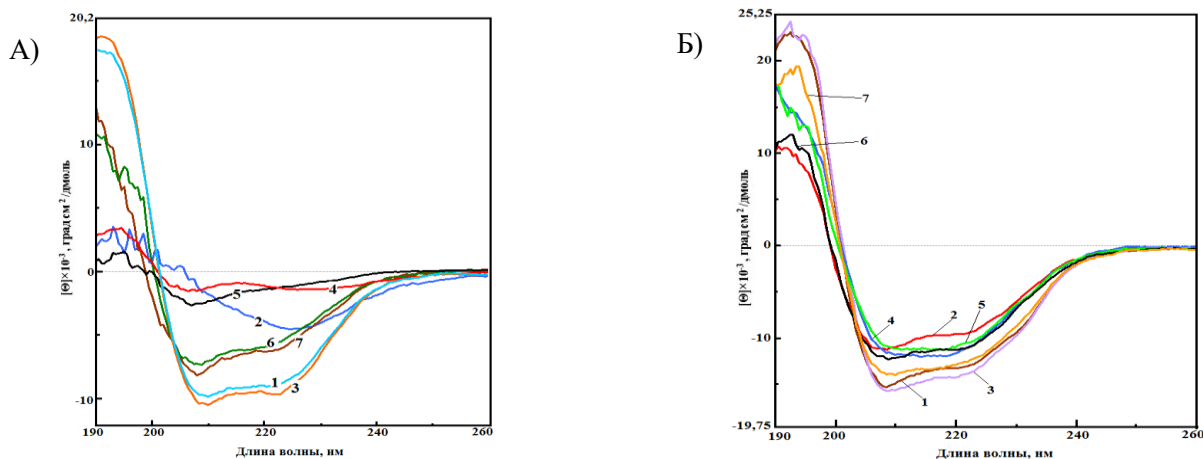


Рис. 7. Влияние биорегулятора ткани склеры на вторичную структуру БСА и лизоцима:

А) КД-спектр БСА (100 мкг/мл) (линия 1), инкубированного с 10 мМ ДТТ (линия 2), с 1 мкг/мл БПБ (линия 3) с 0,1, 0,25, 0,5, 1 мкг/мл БПБ и 10 мМ ДТТ (4 линия, 5 линия, 6 линия, линия 7).

Б) Влияние БПБ ткани склеры на вторичную структуру лизоцима. КД-спектр лизоцима (100 мкг/мл) (линия 1), инкубированного с 0,5 мМ ДТТ (линия 2) или с 10 мкг/мл БПБ (линия 3), или 0,1, 1, 5, 10 мкг/мл БПБ и 0,5 мМ ДТТ (линия 4, линия 5, линия 6, линия 7).

при 50°C в течение 75 мин. После инкубирования раствора КД-спектр БСА характеризуется наличием двух экстремумов при 208 и 222 нм и максимумом в области 190-195 нм (Рис. 7А, линия 1), что является характерным для белков, состоящих преимущественно из α -спиралей, в нативном состоянии. При концентрации БПБ 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл (Рис. 7А; линии 6 и 7, соответственно) в водном растворе БСА с 10 мМ ДТТ эллиптичность экстремума при 206 нм приближается к экстремуму при 208 нм КД-спектра нативной молекулы БСА, но эллиптичность при 222 нм полностью не восстанавливается, указывая на частичное разворачивание α -спиральной структуры. Эти спектры свидетельствуют о переходном состоянии между преобладающей α -спиралью и полностью развернутой конформацией белковой молекулы, что подтверждается расчетами элементов вторичной структуры (Таблица 2).

В результате было показано, что БПБ ткани склеры проявляет свойства шаперона – ингибитора ДТТ-индуцированной агрегации БСА.

Для более подробного изучения действия биорегулятора в качестве ингибитора агрегации был использован другой модельный белок – лизоцим.

Таблица 2. Содержание элементов вторичной структуры раствора БСА, инкубированного с/без добавления БПБ ткани склеры и/или 10 мМ ДТТ при 50°C в течение 75 минут

Образец	α -спираль, %	β -листы, %	β -изгиб, %	Статический клубок, %
БСА	44,8±0,8	15,2±0,2	11,2±0,2	28,8±0,5
БСА+ДТТ	5,2±0,1	38,7±0,6	10,5±0,2	45,6±0,8
БСА+1 мкг/мл БПБ	45,6±0,8	15,6±0,2	9,2±0,1	29,6±0,5
БСА+ДТТ+0,1 мкг/мл БПБ	10,6±0,2	33,3±0,6	13,9±0,2	42,2±0,7
БСА+ДТТ+0,25 мкг/мл БПБ	17,1±0,3	29,2±0,5	14,1±0,2	39,6±0,6
БСА+ДТТ+0,5 мкг/мл БПБ	20,2±0,5	33,5±0,6	12,6±0,2	33,7±0,6
БСА+ДТТ+1 мкг/мл БПБ	28,4±0,5	22,2±0,5	12,1±0,2	37,3±0,6

Была разработана оптимальная модель агрегации лизоцима при его концентрации 100 мкг/мл и 0,5 мМ ДТТ в боратном буфере с pH 9,0 при 50°C в течение 75 мин. При инкубации лизоцима в данных условиях образуются частицы с размером 876±159 нм. Были получены и

проанализированы зависимости интенсивности светорассеяния и величины R_h от времени агрегации лизоцима в присутствии БПБ ткани склеры в диапазоне его концентраций от 0 до 10 мкг/мл. Показано, что при добавлении в реакционную смесь 10 мкг/мл биорегулятора ткани склеры происходит 100%-ное ингибирование ДТТ-индуцированной агрегации лизоцима. Также влияние биорегулятора ткани склеры на тепловую агрегацию лизоцима, индуцированную ДТТ, было изучено методом КД-спектроскопии. Исследовали изменения вторичной структуры лизоцима в отсутствие и в присутствии БПБ. Спектр лизоцима после инкубации в боратном буфере pH 9,0 при 50°C в течение 75 мин содержит отрицательные экстремумы в области 208-222 нм с максимумом в области 190-195 нм (Рис. 7Б; линия 1) и в присутствии БПБ ткани склеры аналогичен КД-спектру нативного лизоцима, что свидетельствует о том, что добавление БПБ без агрегирующих агентов не влияет на структуру лизоцима (Рис. 7Б; линия 3). КД-спектр проинкубированного лизоцима с 0,5 мМ ДТТ в присутствии 10 мкг/мл БПБ ткани склеры в боратном буфере pH 9,0 (Рис. 7Б; линия 7) почти совпадает со спектром прогретого раствора лизоцима (Рис. 7Б; линия 1) лишь с незначительным уменьшением эллиптичности при 222 нм. КД-спектр проинкубированного лизоцима с 0,5 мМ ДТТ в присутствии 5 мкг/мл БПБ (Рис. 7Б; линия 6) приближен к КД-спектру агрегированного лизоцима, что свидетельствует о переходном этапе между агрегированными и нативными молекулами лизоцима под воздействием биорегулятора.

Расчёты элементов вторичной структуры показали, что ни образование ДТТ-инициированных агрегатов лизоцима, ни ингибирование агрегации лизоцима с помощью БПБ ткани склеры не приводит к каким-либо существенным изменениям в содержание элементов вторичной структуры молекулы лизоцима. Результаты, полученные с помощью КД-спектроскопии с использованием двух модельных белков, схожи между собой. Добавление белково-пептидного биорегулятора ткани склеры в присутствии ДТТ предотвращало разворачивание α -спиралей молекул БСА и лизоцима и трансформации их в β -структурированное состояние, что является предвестником агрегации белков. Таким образом, пептидно-белковый биорегулятор, выделенный из склеры глаз КРС, способствует сохранению нативной структуры модельных белков и предотвращает их ассоциацию при термической ДТТ-индуцированной агрегации. При этом 100%-ное ингибирование агрегации БСА достигается в 10 раз меньшим количеством БПБ ткани склеры, чем ингибирование агрегации лизоцима. Возможно, что стабилизация трехмерной структуры альбумина достигается быстрее за счет сродства со структурой белково-пептидного биорегулятора в результате взаимодействия с гидрофобными участками на поверхности развернутых молекул БСА.

Таким образом, можно предположить, что, обладая свойствами ингибитора агрегации белков, БПБ участвуют в восстановлении поврежденных белковых структур в качестве шаперонов.

Поэтому биологическое действие БПБ на травмированные и патологически измененные ткани можно объяснить, способностью контролировать и/или направлять процесс фолдинга белков.

In vitro биотестирование криогелей на основе сыворотки крови в качестве носителей белково-пептидных биорегуляторов ткани склеры

Ранее было показано, что широкопористые криогели на основе различных биополимеров могут использоваться в качестве биосовместимых носителей для доставки различных биологически активных веществ. В данной работе способность криогелей доставлять пептидный биорегулятор была изучена в экспериментах с биологической моделью – культивированием задней части глаза тритона (Рис. 8). Состояние тканей этого отдела были изучены гистологически.

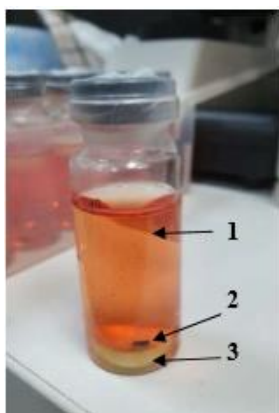


Рис. 8. Внешний вид флакона, в котором находится модельная система культивирования глазного сегмента (1 – среда культивирования; 2 – задний сектор глаза; 3 – криогель).

Так как одним из свойств биорегуляторов данной группы является тканеспецифичность, то в качестве препарата сравнения использовали биорегулятор, выделенный из сыворотки крови. Задние секторы глаза тритона использовали в шести экспериментальных группах: контрольных и опытных. Наилучшее состояние изучаемых тканей глаза наблюдалась в группе № 6, где задний сектор глаза был помещен на криогель, пропитанный биорегулятором из склеры.

В качестве количественной характеристики, отражающей влияние биорегулятора на состояние заднего сектора глаза, определяли количество фибробластов на 1 мм² среза (Рис. 9).

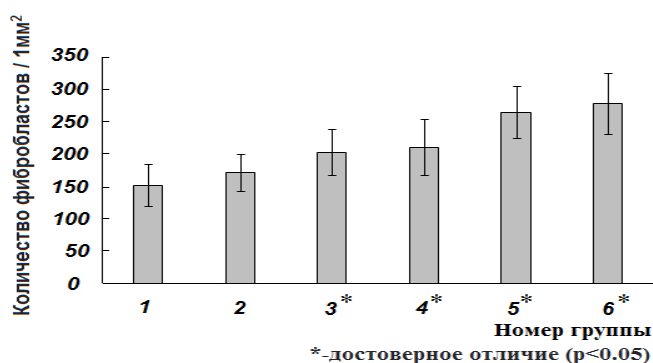


Рис. 9. Среднее количество фибробластов в ткани склеры глаза тритона после 72-часового органотипического культивирования, принадлежащих к разным контрольным и экспериментальным группам.

Таким образом, результаты *in vitro* биотестирования системы криогель+биорегулятор свидетельствуют о положительном эффекте применения данной системы в биологических целях. Это следует на основе количественного критерия, поскольку фибробласты в склере играют ключевую роль в поддержании метаболизма и синтеза коллагеновых волокон, которые придают прочность склеральной оболочке глаза. Полученные данные указывают на способность комбинированных систем на основе губчатого криогеля, нагруженного белково-пептидным биорегулято-

ром ткани склеры, предотвращать развитие дегенеративных процессов в ткани склеры и поддерживать адгезивные взаимодействия между склерой и прилегающими тканями.

In vivo биотестирование криогелей на основе сыворотки крови в качестве носителей белково-пептидных биорегуляторов

Учитывая положительные результаты применения полученных из суммы белков сыворотки крови криогелей в качестве носителей биорегулятора в экспериментах *in vitro*, далее совместно с к.б.н. Красновым М.С. и д.м.н. Шайхалиевым А.И. была оценена эффективность системы криогель+биорегулятор в экспериментах *in vivo*. В качестве действующего вещества был выбран биорегулятор, выделенный из сыворотки крови КРС, поскольку именно этот тип БПБ обладает способностью промотировать регенерацию костной ткани.

Основной задачей являлось проверка возможности индукции остеогенеза, вызываемого действием сывороточного биорегулятора в зоне искусственного дефекта костной ткани нижней челюсти кролика, когда такой биорегулятор вводился туда адсорбированным на криогенно-структурированном губчатом криогеле, приготовленном из суммы белков сыворотки крови.

Полученные в этих экспериментах результаты свидетельствовали об активном восстановлении костной ткани в области обширного дефекта при использовании такого 3Д-носителя. В частности, были зарегистрированы процессы остеоинтегративной и остеоиндуктивной активности, практически полное разложение криогеля в области дефекта с формированием на месте дефекта островков плотной костной ткани с небольшими очагами грубоволокнистой ткани, что говорит о хорошей динамике восстановительных процессов заживления дефекта. Это может свидетельствовать о том, что под действием сывороточного биорегулятора в составе криогеля на основе белков сыворотки крови процесс репарации приводит к полному восстановлению нормальной костной ткани без формирования костной мозоли и измененной костной ткани, отличной от нативной.

Полученные экспериментальные данные в исследованиях *in vitro* и *in vivo* системы, состоящей из криогеля на основе суммы белков сыворотки крови, напитаемого биорегулятором, показывали эффективное действие такого биополимерного носителя в качестве средства доставки биорегулятора к биологической мишени. Мы полагаем, что данный подход может найти применение в биомедицине.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Показано, что при неглубоком замораживании раствора, содержащего сумму белков сыворотки крови, денатурирующий агент и тиол, формируются губчатые криогели. Оценена возможность применения этих криогелей в качестве носителей белково-пептидных биорегуляторов. В частности, из ткани склеры глаза быка выделен биорегулятор, представляющий собой пептидно-белковый комплекс изоформы альбумина и пептидов с молекулярными массами от 1300 до 5000 Да.

Установлено, что биорегулятор ткани склеры в водных растворах образует термостабильные наноразмерные частицы. Показано, что данный биорегулятор проявляет свойства шаперона, а именно ингибирует ДТТ-индуцированную агрегацию альбумина и лизоцима, предотвращая разворачивание α -спиралей этих белков и перехода их в β -структурированное состояние.

Продемонстрировано, что такие физико-химические характеристики криогелей, полученных из суммарных белков сыворотки крови, как выход гель-фракции, степень набухания, а также особенности широкопористой морфологии полимерной матрицы, зависят от условий криоструктурирования.

Найдено, что в состав полимерной сетки полученных криогелей помимо цепей сывороточного альбумина включаются полипептиды, относящиеся к иммуноглобулинам, трансферринам и глобулинам.

Показана возможность использования криогелей на основе белков сыворотки крови в качестве носителя биорегулятора для его доставки к биологической мишени.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Сидорский Е.В. Физико-химические свойства и биологическая активность пептидно-белкового комплекса из ткани склеры глаза быка / Е.В.Сидорский, А.П.Ильина, М.С.Краснов, В.П.Ямскова, А.К.Буряк, И.А.Ямсков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – № 1. – С. 82–88.
2. Ильина А.П. Анализ изоформ альбумина сыворотки, входящих в состав мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов, выделенных из различных тканей млекопитающих / А.П.Ильина, Е.В.Сидорский, П.А.Елистратов, В.М.Чекова, В.П.Ямскова, И.А.Ямсков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – № 4. – С. 350–355.
3. Краснов М.С. Изменение состояния костной ткани крысы в зоне дефекта in vivo под действием криогенно-структурированной белковой губки, содержащей биорегулятор / М.С.Краснов, А.И.Шайхалиев, Е.В.Коршаков, Г.А.Гасбанов, Л.Д.Аразашвили, Т.Р.Давыдова, Е.С.Синицкая, Е.В.Сидорский, В.П.Ямскова, В.И.Лозинский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 170. – № 12. – С. 800–804.
4. Ilyina A.P. Peptide-protein complex from cattle sclera: Structural aspects and chaperone activity / A.P.Ilyina, E.V.Sidorsky, A.V.Tregubov, V.M.Chekova, P.A.Elistratov, V.P.Yamskova, I.A.Yamakov // Biochemistry and biophysics reports. – 2020. – V. 24. – # 100851.
5. Sidorski E.V. Cryostructuring of Polymeric Systems: 57. Spongy wide-porous cryogels based on the proteins of blood serum: preparation, properties and application as the carriers of peptide bioregulators / E.V.Sidorski, M.S.Krasnov, V.P.Yamskova, V.I.Loizinsky // Gels. – 2020. – V. 6. – №. 4 – # 50.
6. Шайхалиев А.И. Индукция остеогенеза костной ткани нижней челюсти кролика с использованием криогенно-структурированного губчатого белкового 3D-носителя, нагруженного биорегулятором / А.И.Шайхалиев, М.С.Краснов, Е.В.Сидорский, В.П.Ямскова, В.И.Лозинский // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. 24. – № 1. – С. 56–63.
7. Сидорский Е.В., Ильина А.П., Краснов М.С., Ямсков И.А., Ямскова В.П. Белково-пептидный комплекс, обладающий протекторным действием на состояние тканей заднего отдела глаза – склеральную оболочку, сетчатку, пигментный эпителий, хороид // Пат. РФ № 2701566 Заяв. 29.05.2018; рег. 30.09.2019.
8. Сидорский Е.В., Краснов М.С., Ямсков И.А., Ямскова В.П., Ильина А.П. Исследование свойств и активности в низких дозах пептидно-белкового комплекса выделенного из ткани склеры глаза быка // XVI Ежегодная международная молодежная конференция «Биохимическая физика ИБХФ РАН-ВУЗы», Москва, РФ, 2016, С. 43.
9. Сидорский Е.В., Ильина А.П., Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Активная в низких дозах супрамолекулярная структура, обнаруженная в ткани склеры глаза быка // VIII Международный конгресс «Слабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург, РФ, 2018, С. 80.

10. Сидорский Е.В. Влияние биорегулятора, выделенного из ткани склеры глаза быка, на 3D-носителе на состояние тканей заднего отдела глаза тритона *in vitro* // Всероссийская научная конференция с международным участием «Регенеративная биология и медицина», Москва, РФ, 2021, С. 190.

11. Краснов М.С. Исследование эффективности нового биополимерного материала, содержащего белково-пептидный комплекс из сыворотки крови, для челюстно-лицевой хирургии / А.И.Шайхалиев, В.П.Ямскова, Е.В.Сидорский, В.И.Лозинский // Сборник научных трудов «Всероссийской научн. конф. с международным участием, посвященной 60-летию НИИ Морфологии человека им. академика А.П.Авцына, 18-19.11.2021, С.106-108

12. Сидорский Е.В. Протекторное действие на ткани заднего отдела глаза *in vitro* при использовании 3d-носителя, содержащего биорегулятор, выделенный из склеры глаза / М.С. Краснов, В.П. Ямскова, В.И. Лозинский // Гены и клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 209–209.

13. Краснов М.С. Эпиморфная регенерация костной ткани при применении 3d-криогелей, содержащих биорегулятор, выделенный из сыворотки крови быка / А.П. Ильина, А.И. Шайхалиев, Е.В. Сидорский, В.П. Ямскова, В.И. Лозинский // Гены и клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 123–124.