

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

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н. Лозинский Владимир Иосифович

Москва – 2022

Работа выполнена в
Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте
элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии
наук (ИНЭОС РАН) в лаборатории криохимии (био)полимеров.

Научный руководитель доктор химических наук, профессор, заведующий
лабораторией криохимии (био)полимеров **Лозинский Владимир Иосифович.**

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ШИРОКОПОРИСТЫЕ КРИОГЕЛИ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ	10
1.1 Основные понятия о криогелях	11
1.1.1. Криотропное гелеобразование и типы криогелей.....	11
1.1.2. Основные характеристики криогелей	13
1.1.3. Области применения криогелей	15
1.2. Криогели на основе полисахаридов	18
1.2.1. Криогели на основе хитозана	18
1.2.2. Криогели на основе солей альгиновой кислоты	22
1.2.3. Криогели на основе гиалуроновой кислоты	25
1.3. Криогели на основе нуклеиновых кислот	28
1.4. Криогели на основе белков	33
1.4.1. Криогели на основе фибриллярных белков.....	34
1.4.1.1 Криогели на основе коллагена	34
1.4.1.2 Криогели на основе фиброина шелка.....	38
1.4.2. Криогели на основе глобулярных белков	41
1.5 Применение белковых криогелей как носителей веществ пептидно-белковой природы.....	46
1.6 Белково-пептидные биорегуляторы.....	47
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	50
2.1 Материалы и препараты.....	50
2.2 Оборудование	50
2.3 Методики проведения экспериментов.....	51
2.3.1. Получение криогелей на основе суммы белков сыворотки крови.....	51
2.3.2. Определение выхода гель фракции и параметров степени набухания полимерной фазы криогелей	52
2.3.3. Микроструктура криогелей	52

2.3.4. Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ).....	53
2.3.5. Выделение и очистка биорегулятора из ткани склеры глаза КРС	53
2.3.6. Содержание белка	54
2.3.7 Масс-спектрометрический анализ БПБ склеры	54
2.3.8 Определение N-концевой аминокислотной последовательности	55
2.3.9 Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле <i>in situ</i>	55
2.3.10 Идентификация белков по базам данных	56
2.3.11 Определение размеров частиц методом лазерного динамического рассеяния света (фотонная корреляционная спектроскопия).....	56
2.3.12 Определение вторичной и третичной структуры биорегулятора с помощью метода кругового дихроизма	56
2.3.13 Ингибирование ДТТ-индуцированной агрегации БСА и лизоцима	57
2.3.14 Нагружение белковых криогелей биорегулятором	58
2.3.15 Исследование биологической активности системы криогель+биорегулятор на моделях органного культивирования <i>in vitro</i>	58
2.3.16. <i>In vivo</i> тестирование криогелей, нагруженных биорегулятором	60
ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	62
3.1. Общие замечания	62
3.2. Получение, свойства и микроструктура криогелей на основе суммы белков сыворотки крови	62
3.2.1. Влияние исходных концентраций белка, а также условий процесса криоструктурирования, на физико-химические характеристики получаемых криогелей.....	63
3.2.2. Влияние условий формирования получаемых криогелей на их макропористую морфологию	66
3.2.3. Белковый состав криогелей.....	67
3.2.4. Выделение и очистка белково-пептидного биорегулятора ткани склеры КРС.....	69
3.2.5. Изучение специфической активности белково-пептидного биорегулятора, выделенного из ткани склеры КРС.....	71

3.2.6. Изучение состава белково-пептидного биорегулятора, выделенного из ткани склеры КРС.....	73
3.2.7. Некоторые физико-химические свойства белково-пептидного биорегулятора	76
3.2.8. Влияние температуры на вторичную и третичную структуру и межмолекулярную ассоциацию белково-пептидного биорегулятора.....	80
3.2.9. Влияние белково-пептидного биорегулятора на тепловую ДТТ-индуцированную агрегацию БСА.....	85
3.2.10. Влияние белково-пептидного биорегулятора на тепловую ДТТ-индуцированную агрегацию лизоцима	89
3.2.11. <i>In vitro</i> биотестирование криогелей на основе сыворотки крови в качестве носителя белково-пептидного биорегулятора ткани склеры.....	94
3.2.12. <i>In vivo</i> биотестирование криогелей на основе сыворотки крови в качестве носителей белково-пептидных биорегуляторов.....	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	137

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в биомедицине в качестве материалов, обладающих большим потенциалом для контролируемого высвобождения лекарств или способных к гемостатическому действию, а также функционирующих в качестве носителей клеток, находят применение различные макропористые криогели [1]. Благодаря биосовместимости и биоразлагаемости таких носителей, в сочетании с такими физико-химическими свойствами, как механическая прочность и эластичность, криогели обеспечивают структурную поддержку и благоприятную среду для адгезии клеток и дальнейшего развития тканей. Также в литературе появляется все больше данных, демонстрирующих возможность использования криогелей в качестве носителей биологически активных веществ [2]. В частности, сообщалось о применении биосовместимых криогелей для контролируемой доставки противомикробных, противовоспалительных препаратов, химиотерапевтических агентов и антибиотиков [3-5].

Актуальность темы. Ранее в нашей лаборатории была показана возможность использования альбуминовых криогелей в качестве депо-форм таких биологически активных веществ, как антибиотики [6]. Но 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, в том числе и биорегуляторов, не исследовались.

В основу схемы формирования широкопористых криогелей на основе суммарных белков сыворотки крови были положены результаты по исследованию образования альбуминовых губок [7]. Была выбрана система «вода + белки сыворотки крови + мочевины + цистеин». Для формирования соответствующих криогелей необходимо было определить оптимальные условия (температура замораживания, концентрация гелеобразующих компонентов). Возможность использования данных криогелей в качестве носителей 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 [8, 9]. Первые исследования по использованию подобных биорегуляторов, загруженных в криогели на основе сывороточного альбумина, для индукции регенерации костной ткани показали весьма многообещающий потенциал таких систем доставки [10].

Поэтому важной и актуальной задачей являлось изучение возможности применения криогелей на основе суммы белков сыворотки крови в качестве носителей различных пептидных биорегуляторов, а также анализ состава полимерной фазы данных криогелей и выяснения влияния условий процесса криоструктурирования на физико-химические характеристики получаемых губчатых материалов.

Таким образом, **целью диссертационной 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 криогелей, полученных из суммарных белков сыворотки крови, 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 носителя белково-пептидных биорегуляторов для их доставки к биологической мишени.

Теоретическая значимость работы заключается в определении оптимального концентрационного и температурного диапазона для синтеза криогелей на основе суммы белков сыворотки крови. Установлено, что снижение температуры криогенной обработки приводит к образованию пор несколько меньшего размера внутри объема губчатого криогеля. Установлен белковый состав полимерной сетки данных губок.

Практическая значимость работы заключается в экспериментальном подтверждении *in vivo* и *in vitro* возможности применения криогелей на основе суммы белков сыворотки крови, в качестве носителей биорегуляторов.

Методология исследования заключалась в синтезе криогелей при различных параметрах криоструктурирования. Последующий анализ сформированных губок методами оптической стереомикроскопии, электрофореза в полиакриламидном геле, гравиметрического определения выхода и степени набухания полимерной фазы позволил найти оптимальные условия формирования криогелей для использования их в качестве носителей для доставки биологически активных белково-пептидных биорегуляторов. Для выделения и очистки, исследования состава и биологического действия биорегулятора ткани склеры применялись методы: ВЭЖХ, МАЛДИ масс-спектрометрия, УФ-, КД-спектрологии. Биологическое действие системы «криогель+биорегулятор» исследовалось гистологически.

На защиту выносятся:

- Синтез криогелей на основе суммы белков сыворотки крови.

- Определение физико-химических свойств полученных полимерных матриц, их макропористой морфологии, белкового состава полимерной фазы, а также исследование возможности применения данных криогелей в качестве носителей белково-пептидного биорегулятора из ткани склеры.
- Выделение из ткани склеры и исследование свойств биорегулятора, который представляет собой пептидно-белковый комплекс изоформы альбумина и пептидов с молекулярными массами от 1300 до 5000 Да. Он 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.
- Результаты биотестирования системы «криогель+биорегулятор» в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Достоверность результатов исследования определяется использованием современных физико-химических методов исследования, воспроизводимостью данных, полученных с помощью независимых экспериментов.

Личный вклад автора заключается в участии в постановке целей и задач исследования, построении 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 международных конференциях: молодежная конференция «Биохимическая физика ИБХФ РАН-ВУЗы» 2016, конгресс «Слабые поля и излучения в биологии и медицине» 2018, конференция «Регенеративная биология и медицина» 2021.

Объём и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов и изложена на 139 страницах машинописного текста. Работа включает 49 рисунков, 5 таблиц. Список литературы содержит 211 наименований.

Автор выражает особую благодарность к.х.н. А.П. Ильиной (ФГУП ГосНИИПП), Ямсковой В.П., к.б.н. М.С. Краснову (ЛКБ ИНЭОС РАН), к.м.н. А.И. Шайхалиеву (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова) за участие в обсуждении и организации экспериментальной работы на разных ее этапах, а также сотрудникам лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии ИФХЭ им. А.Н. Фрумкина РАН за возможность регистрировать спектры на времяпролетном MALDI-TOF-масс-спектрометре.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ШИРОКОПОРИСТЫЕ КРИОГЕЛИ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ

1.1 Основные понятия о криогелях

1.1.1. Криотропное гелеобразование и типы криогелей

Термин криотропное гелеобразование происходит от греческих слов *kryos* (мороз) и *tropos* (причина). Сам процесс – это образование геля в результате криогенной обработки веществ-предшественников в растворителе. Чаще всего используют воду, но применяют и некоторые органические растворители (ДМСО, формаид). Обязательным условием образования криогелей является кристаллизация (замерзание) основной массы растворителя. При этом температура криогенной обработки реакционной системы обычно не ниже, чем на несколько десятков градусов от температуры кристаллизации растворителя. Криогели – это перспективные в биотехнологической и медицинской практике полимерные губчатые материалы [11]. В зависимости от типа системы, в которой протекает криотропное гелеобразование, криогели могут быть получены, исходя из следующих исходных систем [4]:

а) химически сшитые гели образуются в результате полимеризации растворов низкомолекулярных или высокомолекулярных мономеров в присутствии инициатора;

б) из растворов низкомолекулярных мономеров, способных образовывать ковалентно сшитые полимерные сетки с помощью реакции поликонденсации;

в) из растворов, содержащих систему полимер(ов) и сшивающего химического агента(ов) или формирование гелевой матрицы происходит под облучением (УФ-, гамма-излучение, фотолиз);

г) из растворов полиэлектролитов и сшивающих противоионов; в результате замораживания такой системы формируется трехмерная сетка, узлы которой образованы за счет труднодиссоциируемых ионных или ионно-координационных связей между цепями полиэлектrolита;

д) из растворов полимерных предшественников, способных к золь-гель переходу, вызванному охлаждением, с образованием физически-сшитой трехмерной полимерной сетки;

е) из коллоидных дисперсий, замораживание которых приводит к гелеобразованию.

Схема криотропного гелеобразования изображена на Рисунке 1. После растворения в воде (или в другом растворителе) исходных компонентов реакцию систему охлаждают для того, чтобы снизить скорость реакции между начальными компонентами, далее в реакцию среду добавляют сшивающий агент или инициатор, необходимые для старта процесса гелеобразования. Затем исходную жидкую систему замораживают и инкубируют заданный промежуток времени при необходимой отрицательной температуре.



Рисунок 1. Схема процесса криотропного гелеобразования: **1** – высокомолекулярный предшественник; **2** – растворитель; **3** – низкомолекулярный предшественник; **4** – кристаллы замерзшего растворителя; **5** – незамерзшая жидкая микрофаза; **6** – полимерная фаза криогеля; **7** – макропоры; **8** – оттаявший растворитель [12].

Такая замороженная система является двухфазной: одна фаза это – кристаллы замерзшего растворителя, которые выступают в роли порогена, другая фаза – это незамерзшая жидкая микрофаза (НЖМФ), в которой протекают реакции между предшественниками с образованием полимерной фазы криогеля [13]. Гелеобразование в умеренно замороженной системе в определённом интервале отрицательных температур происходит быстрее, чем в незамороженной системе.

Объем НЖМФ, который она занимает в образце, значительно меньше по сравнению с фазой вымороженного растворителя. Свободный растворитель замерзает, образуя кристаллы льда, которые растут и формируют с другими кристаллами взаимосвязанную систему. В зависимости от условий криогенной обработки можно получить материалы с различным диаметром пор и степенью их взаимосвязанности [14, 15].

После завершения процесса криотропного гелеобразования замороженную систему оттаивают, в результате внутри объема криогеля образуются макропоры, которые имеют округлую форму. Форма и размер пор зависят от многих факторов, таких как концентрация предшественников и температура, при которой происходит гелеобразование. В литературных обзорах [11, 16] описано, что в зависимости от характера образования межмолекулярных связей в пространственной сетке криогели классифицируют на группы:

а) ковалентно-сшитые криогели, где трехмерная полимерная сетка формируется за счет химической или радиационной сшивки между предшественниками в неглубоко замороженных средах;

б) криогели, в которых узлы полимерной сетки стабилизированы за счет водородных связей и/или межмолекулярных гидрофобных взаимодействий, относятся к нековалентным (физическим) полимерным криогелям;

в) ионные криогели образуются в системе полиэлектролит – сшивающие противоионы, гелевая сетка образуется благодаря слабодиссоциирующим ионным связям между цепями полиэлектролита.

1.1.2. Основные характеристики криогелей

Благодаря своей макропористой морфологии криогели имеют существенный практический потенциал. Сами макропоры взаимосвязаны между собой, а сечение пор находится в диапазоне от единиц до сотен микрон. Другими параметрами, которыми можно охарактеризовать макропористую морфологию, являются форма макропор, а также толщина их стенок. При этом первостепенное значение имеет изучение механизма процессов, участвующих в образовании

различных криогелей, а также выявление ключевых факторов, влияющих на свойства и макропористую морфологию этих полимерных материалов. В зависимости от химической природы и криоскопических свойств растворителя и гелеобразующих предшественников в результате замораживания образуются разные, с точки зрения геометрии, поликристаллы растворителя, которые и определяют форму и размер макропор. Условия криогенной обработки изменяют долю фазы вымороженного растворителя внутри объёма системы, что позволяет формировать криогели с определенным размером пор и степенью их взаимосвязанности. Так, например, была показана зависимость размера пор от температуры замораживания [17] и природы гелеобразующих компонентов [18, 19].

Микроструктуру полимерных криогелей изучают с помощью таких методов, как оптическая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), конфокальная лазерная сканирующая микроскопия и микрокомпьютерная томография (мКМ). В работе [20] содержание жидкости внутри макропор набухшего криогеля и общий объем пор измеряли методом криопорометрии с использованием спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Для изучения механических свойств криогелей, применяемых для конкретных биомедицинских задач, существует несколько подходов для установления определенных характеристик материала. Например, исследование объемного напряжённо-деформированного состояния полимера и измерение его жёсткости на сжатие необходимо, когда криогели применяются в тканевой инженерии [21, 22]. Другие параметры, такие как модуль сжатия и сдвига, должны быть определены для криогелей, получаемых в трехмерной биопечати и инженерии сосудистой ткани, где важны эластичные свойства материалов [23].

Данные по выходу гелевой фазы показывают количество предшественника, вошедшего в состав гелевой фазы после завершения процесса криотропного гелеобразования. Достаточно сложно экспериментально измерить с высокой точностью реальное содержание гелевой фазы, то есть количество сшитого полимера и иммобилизованного им растворителя во всем объеме образца.

Поэтому понятие «выход гелевой фракции» подразумевает содержание или выход сухого сшитого полимера по отношению к сухой массе соответствующих предшественников. Такая фракция легко определяется гравиметрически и не зависит от степени набухания конкретных образцов криогеля.

Степень набухания описывает частичное повышение веса криогеля при абсорбции растворителя (например, воды). Когда криогели набухают, поры в полимерной сетке криогеля заполняются растворителем. Кроме того, через полимерные стенки диффундирует часть растворителя. Таким образом, набухание криогеля состоит из двух различных процессов: заполнение пор растворителем и набухание полимерных стенок [24]. Частота сшивки полимерной сетки влияет на плотность полимерных стенок внутри криогеля, что, в свою очередь, влияет на способность губки поглощать определенное количество растворителя [21].

Макропористые криогели применяются в различных областях медицины и биотехнологии. Такие полимерные материалы используют в качестве носителей биологически активных веществ, в качестве матрицы для культивирования клеточных культур. Для практического применения криогелей во многих исследованиях проводят тесты на биосовместимость *in vivo* [25] и нетоксичность полимерной матрицы [26]. Успешное прохождение таких испытаний позволяет избежать нежелательной реакции организма на имплантируемый в него криогель.

1.1.3. Области применения криогелей

Большой практический интерес к криогелям объясняется их макропористой структурой. Возможность управлять характеристиками гелевой матрицы позволяет использовать криогели в различных областях в зависимости от прикладных задач. Криогели на основе крахмала применялись в качестве носителей пищевых запахов, например, ароматических соединений, входящих в состав некоторых натуральных масел [27-29]. Такие полисахаридные матрицы, сформированные в криогенных условиях, биосовместимы и способны к эффективному удержанию и постепенному высвобождению различных ароматических соединений.

Наряду с использованием криогелей в пищевой отрасли активно развивалось направление, где изучалась возможность применения таких макропористых систем в биотехнологической области. Поскольку область биотехнологического применения губчатых матриц обширна, то возможно использование таких материалов в зависимости от решаемой задачи. Такие полимерные системы должны обладать химической и биологической стабильностью, достаточно хорошими физико-механическими характеристиками, обеспечивающими длительный срок эксплуатации соответствующих материалов. Макропористая морфология носителя позволяет осуществлять свободный массоперенос, а свойства многих полимерных криогелей хорошо отвечают этим требованиям. Так, криогели на основе поливинилового спирта (ПВС) благодаря своей высокой механической прочности (до 50-100 кПа) и теплостойкости (до 85°C), а также наличию в химической структуре большого количества гидроксильных групп, применяются в качестве носителей иммобилизованных молекул [30]. В частности, были получены биокатализаторы иммобилизацией трипсина [31], термолизина [32, 33].

В настоящее время для биотехнологии и медицины большой интерес представляют губчатые криогели. Полученные в криогенных условиях биосовместимые 3Д-материалы показали хорошие результаты в экспериментах *in vivo*, в которых соответствующие конструкции были имплантированы в организмы лабораторных животных. Так, имплантация заселенных криоконсервированными клетками фетальной печени макропористых альгинат-желатиновых матриц животным с печеночной недостаточностью приводила к значительному улучшению гепатоспецифических показателей крови в печени крыс и сопровождалась позитивными изменениями морфологии печени [34]. Большим достоинством губчатых криогелей, помимо их макропористой морфологии, является то, что они могут быть сформированы из биосовместимых и биоразлагаемых предшественников, что позволяет использовать такие материалы в качестве покрытий для ран и ожогов [35, 36], а также в системах доставки лекарств [6, 37, 38]. Криогели на основе хитозана [39, 40], альгината [40-

42], глобулярных и фибриллярных белков [7, 43-45] применялись в качестве носителей для доставки лекарств, например, пептидно-белковых биорегуляторов [10], а альбуминовые криогели также применялись в качестве носителей таких биологически активных веществ, как антибиотики [6].

Широко развиты направления, связанные с использованием криогенно-структурированных полимерных матриц в качестве высокопористых сорбентов в аналитических системах, фильтрах, а также для других инженерных целей. Так, например, в исследованиях [46-50] показана возможность применения криогелей в качестве сорбентов для очистки и выделения целевых веществ, клеток, вирусов. Такие 3D-материалы должны обладать химической и биологической стабильностью, обеспечивающей длительный срок эксплуатации. Криогели на основе полиэлектролитов, сформированные из полимерных кислот или оснований [51, 52], способны эффективно адсорбировать пары летучих щелочных и кислотных веществ, соответственно.

Кроме того, пористая структура криогелей позволяет использовать такие матрицы в качестве подложек для культивирования клеток. Носители на основе биополимеров более предпочтительны, чем синтетические матрицы, из-за возможного образования токсичных веществ при постепенном разложении последних. Пространственная архитектура, химическая природа, физико-химические свойства полимерной основы криогелей, в сочетании с наличием участков узнавания клетками на внутренней поверхности стенок пор необходимы для правильной адгезии, пролиферации, нормального роста и функционирования клеток [53-56]. Например, желатиновые криогели использовались в качестве подложек для трехмерного культивирования стволовых клеток [57, 58]. Полимерная матрица на основе агарозы может служить подходящей основой для имплантации устойчивых к гипоксии таких клеток, как INS-1E [19].

Далее приводится обзор работ, посвященных синтезу и исследованию свойств криогелей на основе полисахаридов, белков и нуклеиновых кислот. В нем отражены особенности процесса криотропного гелеобразования, а также проанализировано влияние различных факторов на эффективность его протекания

и рассмотрены физико-химические свойства и прикладной потенциал таких полимерных материалов, как криогели.

1.2. Криогели на основе полисахаридов

В зависимости от природы биополимеров, применяемых для формирования полимерной сетки криогеля, в качестве предшественников могут использоваться полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты. Среди большого разнообразия биосовместимых материалов криогели на основе полисахаридов обладают мукоадгезивными, антимикробными и противовоспалительными свойствами, что вызывает большой научный интерес к ним в области биотехнологии и медицины [59]. Наиболее часто используемыми полисахаридами для создания криогелей на их основе являются: хитозан, альгинат, декстран, целлюлоза, гиалуроновая кислота, крахмал.

1.2.1. Криогели на основе хитозана

Хитозан – это единственный получаемый из биоресурсов катионный полисахарид, обладающий такими свойствами, как биосовместимость, биоразлагаемость, невысокая стоимость и антимикробная активность [60]. Хитозан представляет собой сополимер звеньев глюкозамина и N-ацетилглюкозамина, связанных β -1,4-гликозидными связями, полученный в результате щелочного деацетилирования хитина [61]. Гели, волокна и пленки из хитозана используются в тканевой инженерии в качестве биоматериала для заживления ран [60]. Хитозановые криогели могут быть сформированы путем ковалентного сшивания (химическое сшивание), либо путем повторных циклов замораживания/оттаивания (физические криогели) макромолекул хитозана, конъюгированных с другими молекулами [62]. Наличие большого количества реакционноспособных амино- и гидроксильных групп делает хитозан высокореакционной макромолекулой, способной к химическим модификациям и сшивке [63-66]. Такие свойства хитозана особенно привлекательны для разработки новых биосовместимых систем доставки лекарств [67, 68].

При формировании криогелей на основе данного полисахарида чаще используют хитозан, полученный из хитина краба и других ракообразных. Высокомолекулярный хитозан не растворим в воде, и для его растворения используют водные растворы кислот. В качестве кросс-агента обычно используют глутаровый альдегид (ГА) [69, 70], который добавляют к подкисленному водному раствору хитозана и далее эту реакционную смесь подвергают криогенной обработке. Межмолекулярная сшивка происходит с образованием альдиминных связей между молекулами хитозана и ГА (Рисунок 2).

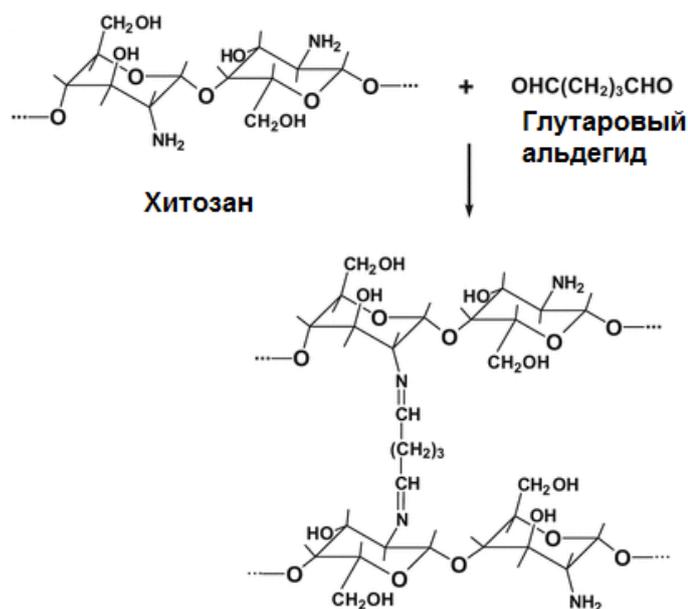


Рисунок 2. Схема реакции межмолекулярной сшивки цепей хитозана с помощью глутарового альдегида [69].

В работе Никонорова В.В. с соавторами было изучено влияние концентрации сшивающего агента на степень набухания полимерной фазы хитозановых криогелей. Изменение мольного соотношения $\text{NH}_2:\text{CHO}$ групп в реакционной смеси с 2,5:1 до 25:1 приводило к более редкой сшивке и, соответственно, повышению степени набухания полимерной фазы. Изучение влияния температуры криогенной обработки на макропористую морфологию показало, что образование криогелей с наибольшим сечением пор происходит при -15°C [69].

Наличие реакционноспособных функциональных групп в структуре хитозана позволяет проводить его модификацию с улучшением сорбционных

свойств материала. Например, Велешко И.Е. с соавторами синтезировали криогели на основе хитозана, сшитые ГА, с последующей модификацией пиридоксаль-5'-фосфатом (Рисунок 3). Такая прививка к хитозановой полимерной цепи позволяет применять данные материалы в качестве сорбентов радионуклидов, а конкретно европия (Eu). На сорбцию европия влияет значение рН раствора, когда рН ниже рК аминогрупп хитозана сорбция заметно ухудшается [71].

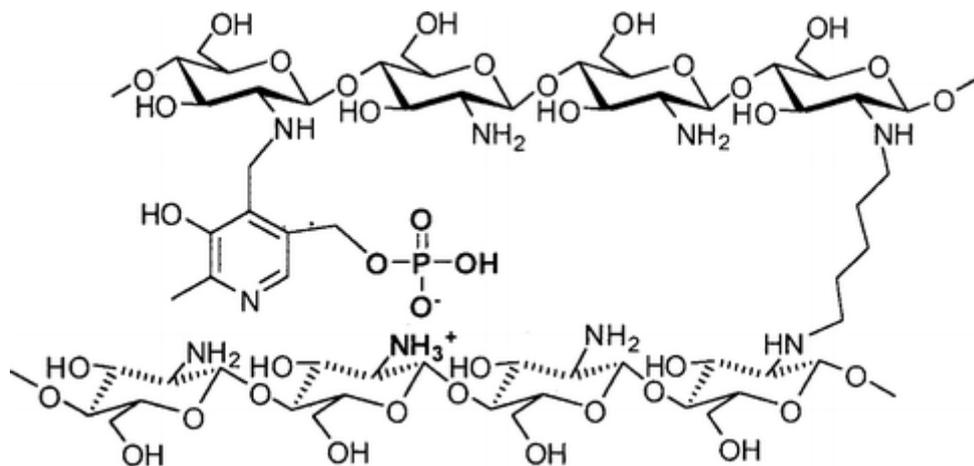


Рисунок 3. Модифицированный пиридоксаль-5'-фосфатом хитозан, который улучшает сорбционные свойства криогеля на основе хитозана по отношению к Eu (III) [71].

Интегрирование свойств хитозана в трехмерную полимерную структуру позволяет разрабатывать новые биосовместимые и чувствительные к различным факторам системы доставки лекарственных средств. Такие материалы, как правило, получают комбинацией полимерных сеток, одна из которых чувствительна к рН или температуре. Однако важно, чтобы материалы обладали механической прочностью и невысокой степенью набухания для более эффективного высвобождения лекарственных средств [67, 68]. Для решения этой задачи в поперечно-сшитую структуру хитозановых криогелей встраивают алюмосиликаты, например клиноптиолит, который обладает противовирусными и антимикробными свойствами [72, 73]. Повышение доли клиноптиолита в композитных криогелях с 30% масс. до 80% масс. приводит к уменьшению среднего диаметра пор и утолщению стенок самих макропор. И при доле

клиноптиолита в 50% внутри объёма биокомпозита образуются параллельно-ориентированные каналы.

В работе [74] на основе хитозана, модифицированного глюконовой кислотой, были получены физически сшитые криогели, которые были приготовлены методом замораживания-оттаивания. Полученные губки показали свою эффективность при заживлении кожных ран. В исследовании [75] такие криогели дезинфицировали погружением в 70% этанол перед нанесением на рану, а в работе [74] было изучено влияние стерилизации в автоклаве (121°C, 20 мин) на характеристики криогеля. Отличие между немодифицированным хитозаном и системой хитозан-глюконовая кислота в том, что конъюгат растворим при pH 7,0, тогда как хитозан, растворенный в кислой среде, образует осадок при pH 7,0. При замораживании нейтрального водного раствора модифицированного хитозана образуется фаза замерзшего растворителя. Рост кристаллов льда уменьшает объем НЖМФ, что приводит к увеличению концентрации полимера в незамерзшей жидкой микрофазе, что способствует образованию физической полимерной сетки.

Устойчивость криогелей с различным соотношением гелеобразующих компонентов (11, 20, 42 включенных единиц глюконовой кислоты на 100 единиц глюкозамина хитозана) к автоклавированию показало, что пониженное содержание глюконовой кислоты приводит к формированию криогеля с более высокими значениями термостойкости. Физически-сшитый криогель хитозана с 11 остатками глюконовой кислоты на 100 единиц глюкозамина хитозана оказался единственным, кто выдержал автоклавирование с потерей веса около 40%. Это объясняется более плотной физической сшивкой, что было подтверждено экспериментом на устойчивость данного криогеля к воздействию лизоцима, являющимся гидролитическим ферментом для хитозана. Кроме того, автоклавированные физические криогели хитозана, модифицированного глюконовой кислотой, проявляли биологические свойства, а именно гемостатическую активность и эффективность при заживлении кожных ран.

1.2.2. Криогели на основе солей альгиновой кислоты

Альгиновая кислота – нерастворимый в воде полисахарид, извлекаемый из бурых и красных водорослей. Альгиновые кислоты и соли альгиновой кислоты представляют собой семейство линейных сополимеров с гомополимерными блоками остатков D-маннуровой и L-гулуруновой кислот, связанных между собой в разных последовательностях гликозидными связями [76]. Благодаря биосовместимости, биоразлагаемости и нетоксичности, альгинаты особенно подходят для пищевых, фармацевтических и биомедицинских применений: доставки лекарств и клеток [77], инкапсуляции клеток и культивирования клеток [78, 79], тканевой инженерии [80]. Помимо биосовместимости и низкой стоимости, альгинаты не подвергается ферментативной деградации в организме человека [81]. Растворы солей альгиновых кислот с одновалентными катионами при добавлении в реакцию систему двухвалентных или трехвалентных катионов превращаются в ионотропные гели. Криогели на основе альгината получают путем снижения pH ниже значений pKa [82].

Криогели на основе альгината можно получить путем добавления к раствору полиэлектrolита измельченной соли, которая имеет отрицательный температурный коэффициент растворимости и поэтому является источником сшивающих противоионов при отрицательных температурах. Особенностью такого подхода является использование солей кальция, растворимость в воде которых повышается с понижением температуры, например бутирата, пентаноата, сукцината или глицерофосфата кальция [11]. Водный раствор альгината сшивают глицерофосфатом кальция при температуре криогенной обработки -10°C в течение 1,5 часов. Увеличение времени до 24 часов приводит к более прочной сшивке, что свидетельствует о зависимости кинетики гелеобразования от времени растворения соли и степени диффузии ионов кальция.

Получение криогелей на основе альгината описано в работе [83], где для поперечной сшивки альгинатных групп использовался 25% масс. CaCl_2 . В результате были получены гранулы криогеля, с трещиноподобными порами

шириной от 1 до 3 мкм и длиной до 30 мкм и пористостью от 74,9% до 92,2% в зависимости от температуры криогенной обработки и концентрации CaCl_2 .

Известны примеры синтеза альгинатных криогелей с использованием метакрированного альгината (МА) при создании матриц для последующего их нагружения терапевтическими агентами. Для этого боковые метакрилоильные группы были сначала введены в основные цепи альгината в результате реакции с 2-аминоэтилметакрилатом. Полученный МА-альгинатный макромономер имел приблизительную степень метакрирования 50%. Макропористые трехмерные альгинатные криогели были приготовлены с использованием МА-альгината в процессе криотропного гелеобразования при -20°C по свободнорадикальному механизму [21]. Сформированные МА-альгинатные криогели представляли собой эластичные, мягкие, губчатые материалы (Рисунок 4).

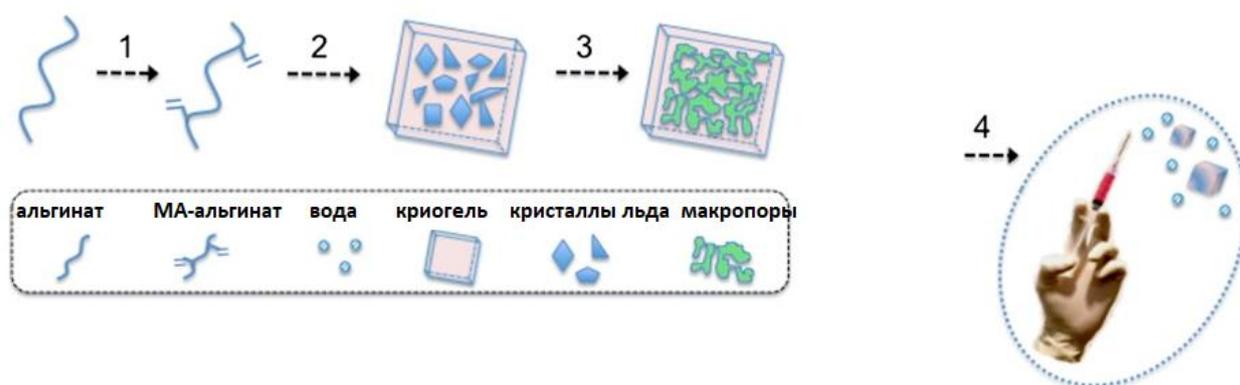


Рисунок 4. Схема получения МА-альгинатных криогелей: **1** – химическая модификация альгината; **2** – замораживание реакционной смеси; **3** – оттаивание системы с образованием взаимосвязанной пористой сетки криогеля; **4** – инъекция криогеля через иглу [21].

Наличие системы взаимосвязанных пор со средним размером от 150 до 200 мкм позволяет применять МА-альгинатные криогели для контролируемой доставки биомолекул: БСА, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и загрузки клетками для трансплатации, обеспечивая им благоприятную микросреду. Во время шприцевой инъекции криогелей с засеянными клетками через иглу 16G более 80% клеток сохраняли жизнеспособность, но применяемые гелевые матрицы не были механически прочными. Несмотря на то, что разрушение каркаса не сказывалось негативно на

действию терапевтического вещества, но влияло на точность и эффективность доставки колониестимулирующего фактора [21]. Для повышения механической устойчивости и возможности вводить криогель через иглу с меньшим диаметром была применена методика с использованием комбинации ковалентного и ионного сшивания альгината. Водный раствор МА-альгината смешивали с инициаторами полимеризации (ТЕМЕД + персульфат аммония) и при температуре криоструктурирования -20°C получали криогели, которые оттаивали и затем пропитывали хлоридом кальция для образования сшивки с ионами кальция, которые связываются только с карбоксильными группами гулуронатных блоков соседних альгинатных полимерных цепей с образованием поперечных связей [84, 85]. Сформированные таким способом криогели имели значительно меньший коэффициент набухания по сравнению с криогелями, имеющими только ковалентные сшивки, что объясняется образованию ионных поперечных связей в криогелях на основе МА-альгината. Приблизительная пористость полимерных материалов была 80% со средним размером пор около 100 мкм для обоих типов криогелей. Стоит отметить, что ионы кальция стимулируют активацию дендритных клеток [86] и могут усилить противоопухолевый эффект агентов, помещенных в криогель.

Аналогично с методами химического сшивания для приготовления полимерных гелей на основе альгината может применяться метод замораживания-оттаивания, который является чисто физическим и который не влияет на биосовместимость, биоразлагаемость и нетоксичность полимерных гелей, таким образом, делает также криогели более подходящими кандидатами, особенно для биомедицинских применений. В исследовании [87] водный раствор альгиновой кислоты при рН 4,0, 3,5, 3,0, 2,5 и 2,0 подвергали замораживанию при -25°C в течение 24 часов и оттаиванию при 4°C в течение суток. Образование криогелей происходило при исходных значениях рН от 2 до 4 после одного или нескольких циклов замораживания-оттаивания. Подкисление раствора альгината до рН 2-2,5 привело к формированию «текучих» гелей. В диапазоне рН 4,5-5 исходного

раствора криогели не удалось получить даже после повторения замораживания-оттаивания.

1.2.3. Криогели на основе гиалуроновой кислоты

Другим важным биополимером является гиалуроновая кислота (ГК), которая содержится в каждой части тела млекопитающих и отвечает за выполнение определенных жизненно важных функций [88]. ГК является основным компонентом стекловидного тела глаза, а также играет важную роль в поддержании смазки суставов, а также при гидратации и увлажнении тканей, дифференцировке и делении клеток [89, 90]. По сравнению с другими природными и синтетическими полимерами ГК обладает гораздо большей водоудерживающей способностью. Например, ГК поглощает воду в тысячи раз больше, чем собственный объем полимера. Было показано, что гиалуроновая кислота играет роль в реализации важных биологических функций, таких как способность удерживать воду, обеспечение клеток питательными веществами и удаление отходов из клеток, особенно для клеток без прямого кровоснабжения, таких как хрящевые клетки [91]. Это также наиболее предпочтительный пломбирочный материал, поскольку в месте инъекции в течение длительного времени не происходит деформация структуры и формы криогеля [92]. ГК состоит из повторяющихся единиц β -1,4-D-глюкуроновой кислоты и β -1,3-N-ацетил-D-глюкозамина (Рисунок 5).

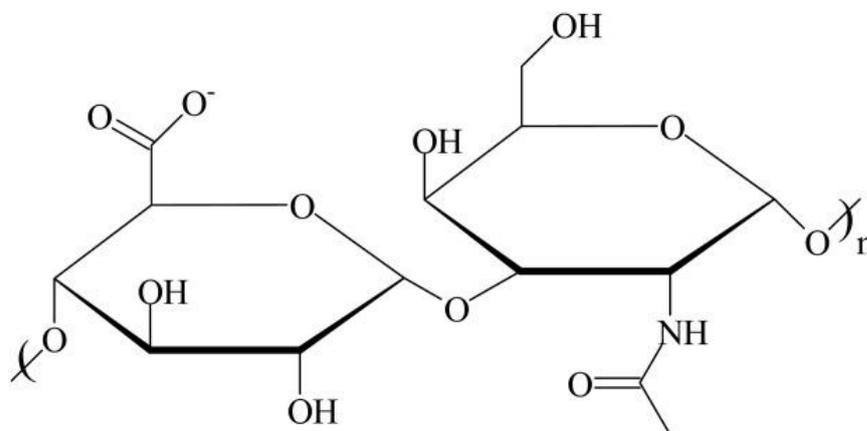


Рисунок 5. Химическая структура ГК [93].

В зависимости от значений рН, ГК может нести отрицательный заряд на каждом втором мономерном звене. В растворе конформация гиалуроновой кислоты стабилизируется внутримолекулярными водородными связями [93]. Внутримолекулярные Н-связи разрушаются в присутствии NaOH и/или при нагревании, что приводит к более гибкой конформации ГК. При значении рН 2,5, ГК образует гель из-за недостаточной диссоциации карбоксилата. Однако при более низких значениях рН происходит переход от геля к раствору, связанный с протонированием ацетамидогрупп. Аналогично, повышение рН > 3 превращает слабый гель, образовавшийся при рН 2,5, обратно в раствор [94]. ГК растворима в относительно ограниченном диапазоне рН и для образования более устойчивого геля для использования в биомедицинских целях её химически модифицируют, либо ковалентно сшивают [95]. Функциональные группы, доступные для сшивки, представляют собой гидроксильные и карбоксильные группы. Гидроксильные группы могут быть сшиты через эфирную связь, а карбоксильные группы через сложноэфирную связь.

Для изготовления полимерных каркасов методом криотропного гелеобразования на основе гиалуроновой кислоты в качестве сшивающих агентов используют диглицидиловый эфир этиленгликоля (ДГЭЭ) [96, 97].

В работе [96] с выходом около 90% были получены криогели на основе гиалуроновой кислоты с использованием диглицидилового эфира этиленгликоля в качестве сшивающего агента. Такие гелевые материалы, сформированные при температуре от -10°C до -18°C, могут быть сжаты примерно до 80% без образования трещин. Анализ полученных криогелей с различной концентрацией гиалуроновой кислоты показал влияние концентрации гелеобразователя на размер и форму пор. Макропоры в криогеле, образованном с 3% ГК, более округлые и более однородные по размеру, с сечением пор около 100 мкм по всему образцу. Напротив, криогель, сформированный с 7% ГА, имеет поры размером около 200 мкм, чередующиеся с более мелкими порами размером менее 100 мкм. Снижение температуры криотропного гелеобразования с -10 до -24°C приводит к уменьшению среднего размера пор из-за образования более мелких сферических

пор от 20 до 40 мкм в диаметре в дополнение к большим порам размером около 100 мкм.

Изучение зависимости размера пор от концентрации сшивающего агента на набухание и микро/макромеханические свойства полимерного материала представлено в работе [97]. В криогелях, полученных при инкубировании в течение 10 дней при -18°C , в которых содержание ГК равно 3% масс., а диглицидилового эфира этиленгликоля 0,35 и 0,15% масс., наблюдалась увеличение размера пор с 135 ± 35 до 260 ± 86 мкм, а толщина стенок макропор изменялась от 5 мкм до ~ 30 мкм, когда концентрация сшивающего агента снижалась с 0,7 до 0,15% масс., соответственно. Кроме того, криогель был менее упругим со снижением модуля Юнга с $6,3\pm 1,26$ кПа до $0,25\pm 0,13$ кПа, а способность к набуханию увеличивалась вдвое.

Большинство сшивающих агентов и особенно их непрореагировавшие остатки цитотоксичны [98, 99]. Поэтому, желательно использовать нецитотоксические сшивающие агенты для образования стабильных и биосовместимых криогелей на основе гиалуроновой кислоты. Дженипин – это природное вещество, извлеченное из плодов гардении, и было показано, что его цитотоксичность значительно ниже, чем у обычных сшивающих агентов [100]. У гиалуроновой кислоты имеются высокореакционные гидроксильные группы, которые способны образовывать ковалентные связи с дженипином [101]. Хотя механизм сшивания не был раскрыт авторами, но криотропное гелеобразование смеси ГК и дженипина приводит к стабильным межмолекулярным связям, которые достаточно устойчивы, чтобы обеспечить набухание полимерной матрицы, а не растворение в воде. В сравнении с криогелями ГК, где в качестве кросс-агента использовался диглицидиловый эфир этиленгликоля, у которых значение степени набухания равно $S_R \geq 7,5$ г H_2O /г полимера, у криогелей ГК, полученных с применением в качестве сшивающего агента дженипина, значение степени набухания было $S_R \approx 2,5$ г H_2O /г полимера. Они также имели высокое значением модуля упругости $G_0 \sim 2000$ Па по сравнению с системой ГК/ДГЭЭ, где

$G_0 \sim 200$ Па. Независимо от используемого сшивающего агента криогели были губчатыми, эластичными и с почти одинаковым размером пор.

1.3. Криогели на основе нуклеиновых кислот

Все живые клетки содержат молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), несущие генетическую информацию. В своей нативной форме ДНК представляет собой полугибкий полимер, состоящий из повторяющихся блоков – нуклеотидов [102]. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, дезоксирибозы и фосфатной группы. Связи между нуклеотидами в цепи образуются за счёт фосфодиэфирных связей между дезоксирибозой и фосфатной группой. Макромолекула ДНК имеет двухспиральную структуру, которая стабилизирована водородными связями между азотистыми основаниями [103]. Когда раствор ДНК подвергается воздействию высокой температуры, водородные связи, удерживающие две цепи вместе, разрываются, и двойная спираль диссоциирует на две одиночные гибкие нити, имеющие конформацию случайного клубка [104]. Из-за уникальной структуры ДНК химические соединения, содержащие ароматические группы, например, бензопирин и фенантрен, встраиваются между соседними парами оснований в двухцепочечной молекуле ДНК, приводят к мутациям и эндокринным нарушениям [105]. Этот факт также предполагает, что после перевода ДНК в нерастворимую форму ее можно использовать в качестве адсорбента для таких токсичных материалов из воды [106-108].

Получение криогелей ДНК с макропористой и взаимосвязанной структурой пор позволяет изготавливать материалы с быстрым ответом. В исследовании [102] описано получение макропористых криогелей ДНК в форме гранул миллиметрового размера, подходящих в качестве специфического адсорбента для канцерогенных соединений. Приготовление таких гелевых шариков заключалось в проведении реакций сшивания молекул ДНК (длиной около 2000 пар оснований) при -18°C с использованием в качестве сшивающего агента диглицидилового эфира этиленгликоля (Рисунок 6). Для приготовления гелевых шариков ДНК использовались два метода. Согласно первому способу, водный

раствор, содержащий ДНК, ДГЭЭ и ТЕМЕД, закапывался в жидкий азот для создания небольших гранул при -196°C . Затем гранулы переносили в парафиновое масло при -18°C в качестве непрерывной фазы, и реакции проводили в течение 3 дней. Замораживание раствора ДНК в жидком азоте приводит к образованию однородных замороженных частиц, сферическая форма которых оставалась неизменной после реакций сшивания, а также после набухания в водных растворах. Второй метод приготовления гранул ДНК включал добавление по каплям водного раствора ДНК, содержащего ДГЭЭ и ТЕМЕД, в парафиновое масло в качестве непрерывной фазы и сшивание при -18°C в течение 3 дней. Оба метода обеспечивали формирование шариков диаметром 2-3 мм в сухом состоянии и 8-14 мм в набухом состоянии при концентрации ДНК от 3% до 5%. Размер шариков можно регулировать, изменив диаметр наконечника пипеток, из которых водный раствор закапывали в жидкий азот или в парафиновое масло.

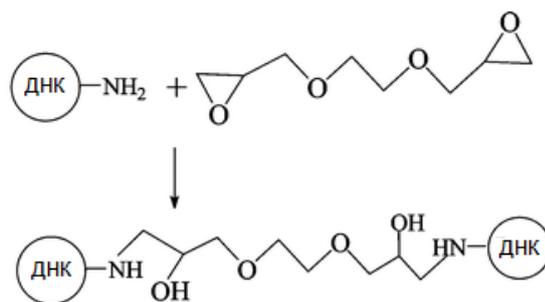


Рисунок 6. Схема реакция сшивки между аминогруппами нуклеотидных оснований ДНК с помощью ДГЭЭ [102].

Механическая устойчивость гелевых шариков возрастала с повышением концентрации ДНК, и шарики, сформированные вторым методом, были более стабильными, чем шарики, полученные методом с применением жидкого азота. В сухом состоянии гранулы криогеля содержали поры неправильной формы размером до 100 мкм. Криогели набухали в растворе NaBr, превышающем их сухой вес в 74–212 раз, и имели модуль упругости около 0,5 кПа. Криогели на основе ДНК могут быть сжаты примерно до 80% без образования трещин. Полученные таким способом криогели на основе ДНК способны удалять

канцерогенные вещества, а конкретно фенантрен, из водных растворов. Сорбционная емкость гранул составляла 420 мкг фенантрена/г ДНК [102].

Применение в качестве сшивающего агента бутандиолдиглицидилового эфира (БДДЭ) описано в работе [109]. К водному раствору ДНК добавляли кросс-агент БДДЭ, а также NaBr для предотвращения раскручивания двуцепочечной молекулы ДНК на одиночные цепи [110]. После замораживания реакционного раствора при -18°C в течение 3 суток и последующего оттаивания были получены криогели с различными свойствами в зависимости от параметров синтеза. Концентрации ДНК и БДДЭ варьировали для оптимизации свойств криогеля. Концентрация ТЕМЕД в реакционных растворах была постоянна и равна 0,33% масс. Влияние концентраций ДНК и БДДЭ на выход гель-фракции криогеля показало, что для почти полного протекания гелеобразования (выход от 92 до 96%) требуется 3% масс. ДНК и 0,39% масс. БДДЭ. Такая высокая концентрация сшивающего агента необходима, потому что реакция сшивки между аминогруппами нуклеотидов и эпоксидными группами БДДЭ очень медленная. Сокращение времени криотропного гелеобразования с 3 до 2 дней, привело к более низким значениям выхода гель-фракции и модуля упругости.

Весовые коэффициенты набухания криогелей, сформированных при различных концентрациях ДНК и БДДЭ, лежали в диапазоне от 40 до 130 (г криогеля в набухом состоянии/ г сухого полимера), что указывает на то, что гели находятся в сильно набухом состоянии с содержанием воды 98-99%. Общая пористость при этом составляет 93-99%. Все образцы в сухом состоянии имели пористую структуру с крупными пораами неправильной формы сечением 10-100 мкм. Криогели с концентрацией 5% масс. ДНК могут быть сжаты примерно до 80% без образования трещин, тогда как криогели, сформированные при более низкой концентрации ДНК или БДДЭ, при сжатии разрушались. При концентрации БДДЭ равной 0,75% масс. для криогелей достигаются самые высокие значения жесткости (50 кПа). Криогели, с содержанием 5% ДНК и 0,75% БДДЭ, обладают высокой механической прочностью, что позволяет использовать их для связывания бромида этидия, встраивание которого в ДНК изменяет угол

поворота между соседними парами нуклеотидных оснований и раскручивает спираль, что приводит к удлинению ДНК [107]. При помещении в водный раствор бромида этидия в отличие от ДНК-гидрогелей ДНК-криогели остаются стабильными в этих растворах даже после полного насыщения. Авторы работы объясняют растворение гидрогелей ДНК в растворе бромида этидия удлинением и повышением жесткости спирали за счет интеркалированной ДНК, что способствует разрыву поперечных связей БДДЭ [109], но экспериментально такой механизм не был доказан. Это подчеркивает стабильность цепей ДНК в криогелях и, таким образом, демонстрирует, что криогели ДНК являются эффективными сорбентами по сравнению с гидрогелями ДНК. Общая связывающая способность криогелей составила $0,6 \pm 0,1$ молекулы бромида этидия на нуклеотид. Даже в очень разбавленных растворах (вплоть до концентраций до 3 мкМ) ДНК-криогели сорбируют бромид этидия из водных растворов с эффективностью 90%.

Известно, что одним из возможных применений ПВС – это матрица для включения биополимеров, таких как дезоксирибонуклеиновая кислота. Так, в работе [111] получены криогелевые мембраны ПВС-ДНК (натриевая соль из семенников лосося) при температуре криогенной обработки -20°C с последующим оттаиванием образцов в течение 12 часов при 25°C . По анализу такой макропористой морфологии мембраны на основе смеси ПВС-ДНК можно сделать вывод о довольно плотном полимерном каркасе со средним сечением пор около 50 мкм. Однако, когда к гелеобразующим компонентам ДНК и ПВС добавляли NaBr, то диаметр пор увеличивался до 100 мкм. При этом увеличение диаметра пор не сопровождалось увеличением объема пор. Пористость мембраны из смеси ДНК-ПВС примерно на 17% меньше пористости криогелей ПВС. Этот факт свидетельствует о наличии взаимодействия между ПВС и ДНК.

Несмотря на то, что криогели на основе дезоксирибонуклеиновой кислоты обладают необходимой для биомедицинского и биотехнологического применения пористостью с высокой степенью взаимосвязанности, их механические свойства не всегда подходят для решения прикладных задач. Поэтому для дальнейшего расширения потенциала их применения в биотехнологии и биомедицине было

проведено исследование, направленное на повышение жесткости криогелей без изменения их макропористой структуры. Такой способ должен учитывать токсичность матрицы, а также способность к разложению материала, используемого для синтеза криогеля. В работе [112] применен подход, который позволил сочетать макропористую структуру криогелей ДНК с биосовместимой второй полимерной сеткой альгината для улучшения механических свойств первой (Рисунок 7). Криогель на основе ДНК был синтезирован путем химической реакции между аминогруппами, присутствующими в азотистых основаниях ДНК, с концевыми эпоксидными группами диэпоксида полиэтиленгликоля (ПЭГДЭ). Водный раствор ДНК смешивали со сшивающим агентом ПЭГДЭ и реакцию проводили при -20°C с образованием макропористого криогеля. Далее в полученный криогель была введена вторая сетка из альгинатных цепей с ионными поперечными связями через двухвалентные ионы кальция.

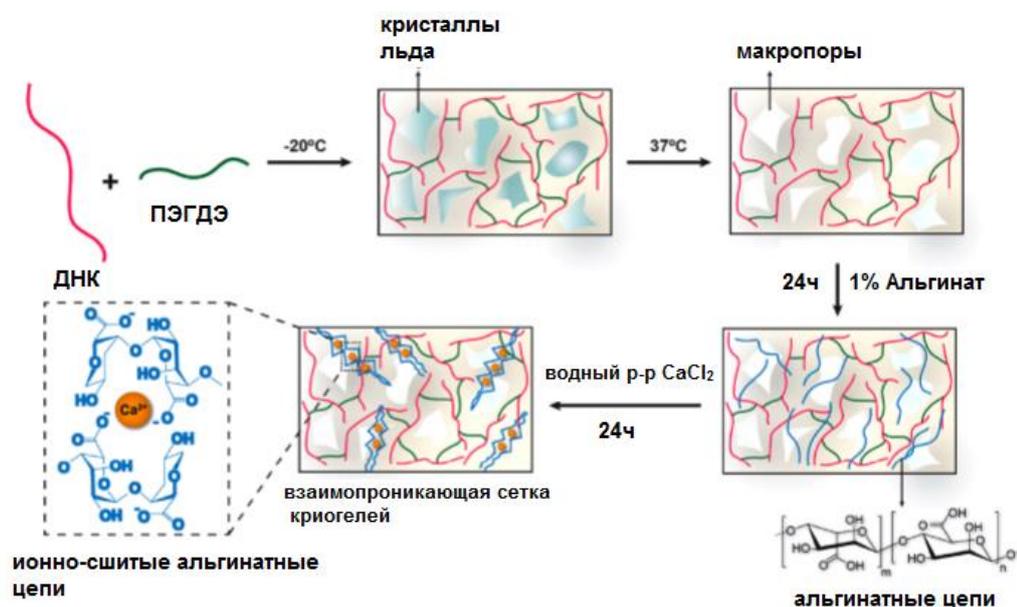


Рисунок 7. Последовательная схема получения криогелей ДНК с взаимопроникающей полимерной сеткой альгината. На первой стадии водный раствор ДНК и сшивающего диэпоксида полиэтиленгликоля (ПЭГДЭ) замораживали при -20°C с образованием макропористых криогелей. Следующий шаг - встраивание альгината в конструкцию криогеля на основе ДНК с последующим поперечным сшиванием альгинатных цепей через ионы Ca^{2+} [112].

При формировании первой полимерной сетки из цепей ДНК со сшивающим агентом ПЭГДЭ средний диаметр пор равен $60,3 \pm 14,5$ мкм. Для получения взаимопроникающей сетки ионно-сшитых альгинатных цепей альгинат абсорбировали на стенках сетки макропор криогеля, после чего криогели погружали в водный раствор хлорида кальция. Концентрация ионов Ca^{2+} влияла на плотность сшивки второй сетки и на механическую прочность и морфологию криогеля на основе ДНК. Повышение концентрации ионов кальция привело к увеличению плотности сшивки альгинатной сетки, тем самым улучшив механические характеристики криогелей при сжатии [113]. Исследование на цитосовместимость показало, что при концентрации хлорида кальция 0,05 М не наблюдается каких-либо значительных цитотоксических эффектов на клетках, выросших на данных криогелях. Введение альгинатной сетки, сшитой ионными связями, не сильно изменило макропористую структуру полимерной сетки ДНК. Средний диаметр пор взаимопроникающей сетки криогелей на основе нуклеиновой кислоты и альгината был $62,1 \pm 10$ мкм. Криогели с полимерной сеткой на основе ДНК набухали сильнее, чем криогели с взаимопроникающей сеткой, что объясняется возросшей плотностью сшивки. Также к снижению степени набухания приводило повышение концентрации CaCl_2 . Полученные в этой работе криогели успешно прошли тест на биосовместимость со стволовыми клетками человека и могут использоваться в качестве биополимерной матрицы в тканевой инженерии.

1.4. Криогели на основе белков

В зависимости от конформации макромолекул белковых предшественников и, как следствие, свойств, получаемых на их основе криогелей, выделяют две группы белков, в соответствии с их структурной особенностью:

- 1) фибриллярные белки;
- 2) глобулярные белки.

Так как различная конформация белковых предшественников влияет на свойства получаемых на их основе полимерных материалов, то рассмотрим криогели, полученные из каждой группы белков, в отдельности.

1.4.1. Криогели на основе фибриллярных белков

Для макромолекул фибриллярных белков характерна вытянутая нитевидная структура, состоящая из параллельно расположенных полипептидных цепей. В живых организмах фибриллярные белки входят в состав соединительных и мышечных тканей и выполняют структурную, опорную и защитную функцию. Такие свойства позволяют создать на их основе широкопористые биосовместимые полимерные материалы, которые по механическим свойствам сопоставимы с хрящевой тканью [114, 115].

1.4.1.1. Криогели на основе коллагена

Коллаген – это белок, составляющий основу соединительной ткани организма (кожа, сухожилие, кости), а также в большом количестве присутствующий во внеклеточном матриксе. Он формирует структурную основу внеклеточного матрикса и обеспечивает физическую стабильность тканей [115]. Коллаген представляет собой наиболее широко применяемую биомacroмолекулу тканевого происхождения, которая обладает привлекательными для практического применения свойствами: биоразлагаемостью, биосовместимостью и способностью образовывать волокна [117-119]. В зависимости от молекулярной массы, аминокислотной последовательности и степени гликозилирования известны 28 типов коллагена [120]. Поскольку коллаген не растворим в воде, то криогели на его основе получают из водных суспензий, содержащих волокна коллагена и растворенного сшивающего агента. Для синтеза коллагеновых криогелей обычно используют белок, выделенный из сухожилий крупного рогатого скота (КРС), свиней, крыс и др. Физически сформированный криогель на основе коллагена обладает плохими механическими свойствами, поэтому для получения более прочных образцов применяют сшивку ультрафиолетовым светом, ионами многовалентных металлов, формальдегидом или

глутаральдегидом [121, 122]. Химические сшивающие агенты, такие как альдегиды, не изменяют конформацию тропоколлагена в виде тройной спирали и не оказывают влияние на его биологическую функцию, но сшитый таким образом коллаген часто подавляет рост клеток и усиливает воспалительную реакцию [123-125].

Сшивающие агенты природного происхождения, которые биоразлагаемы и имеют низкую токсичность, все более востребованы как в фундаментальных исследованиях, так и в прикладных целях. В частности, недорогие и доступные функционализированные полисахариды, такие как крахмал и целлюлоза, могут быть использованы в качестве сшивающих агентов для получения биоматериалов. В работе [126] коллагеновый криогель был синтезирован с использованием диальдегидного производного крахмала (ДАК) в качестве сшивающего агента. Данный кросс-агент ранее уже применялся для сшивки изолята соевого белка [127]. Коллаген, используемый в этом исследовании, был выделен из ахиллова сухожилия взрослого крупного рогатого скота. Раствор ДАК смешивали с коллойдным водным раствором коллагена при 4°C в течение 1 часа и замораживали при -15°C в течение 72 часов. Затем замороженный образец оттаивали при 25°C и получали криогель. Межмолекулярная сшивка в криогеле происходит за счет реакции альдегидных групп ДАКа с аминогруппами коллагена, тройная спираль коллагена при этом не разрушается (Рисунок 8). По сравнению с чистым коллагеном криогель обладает большей термостабильностью. После оттаивания в объеме криогеля образуются поры различного размера и геометрии. Морфология пор зависит от соотношения ДАК и коллагена. Толщина стенок макропор увеличивается с возрастанием количества ДАК, и криогель становится более механически прочным за счет увеличения количества сшивок. Размер пор находится в диапазоне от 20 до 200 мкм, и синтезированные криогели потенциально могут использоваться в качестве биоматериалов для тканевой инженерии [128].

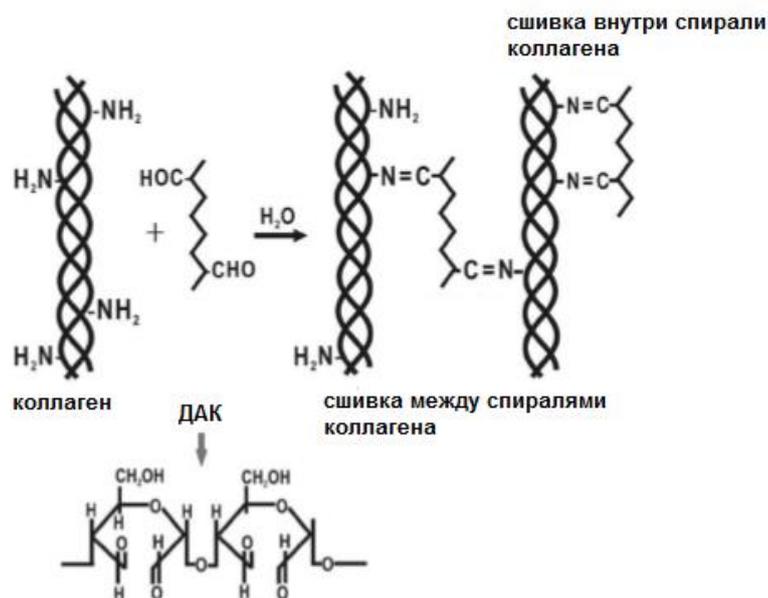


Рисунок 8. Схема образования сшивки между/внутри спиралей коллагена с помощью диальдегидного производного крахмала [126].

Такие криогели были способны к быстрому набуханию и могли удерживать более 60% воды даже через 12 часов, что означает их способность создавать влажную среду для раневой поверхности, которая благоприятна при заживлении ран.

Другим биосовместимым сшивающим агентом, подходящим для синтеза криогелей на основе коллагена, является диальдегидное производное карбоксиметилцеллюлозы (ДКМЦ). Синтез губчатых коллагеновых криогелей с использованием данного кросс-агента описан в работе [121]. Криогели коллаген/ДКМЦ получали путем сшивания коллагена с небольшим количеством ДКМЦ в криогенных условиях в результате реакции альдегидных групп ДКМЦ со свободными аминогруппами коллагена. Далее смесь центрифугировали и замораживали при -20°C в течение 5 дней с последующим оттаиванием образцов при комнатной температуре. Криогели представляли собой губчатые непрозрачные материалы с соединенными между собой макропорами от 10 до 200 мкм в диаметре. Эти губки обладали хорошей способностью к набуханию, зависимую от соотношения коллаген/ДКМЦ, а также значения pH. При увеличении содержания ДКМЦ в криогеле наблюдалось снижение степени

набухания, что объясняется более плотной сшивкой. Тесты на гемолиз и свертываемость крови показывали хорошую совместимость таких криогелей с кровью.

В исследовании [123] были получены сверхмакропористые криогели коллагена с использованием аминоксодержащего производного графена, чтобы обеспечить передачу биофизических и электрических сигналов для клеток и тканей после имплантации. Коллаген был выделен из крысиных хвостов и очищен, далее очищенный коллаген растворяли в водном растворе уксусной кислоты при 4°C. Полученный раствор нейтрализовали до pH 7,4, используя раствор NaOH. Графен, функционализированный амином, добавляли к нейтрализованному раствору коллагена, вводили карбодиимид и затем инкубировали при -12°C в течение 15 часов, что приводило к образованию сверхмакропористого криогеля с размером пор от 60-200 мкм. Синтезированные коллагеновые криогели имели хорошую способность к набуханию, соотносящуюся с данными о набухании криогелей коллагена, сшитыми различными сшивающими агентами. Общая пористость составила 88-94 % в зависимости от доли графена в образце. Методом рамановской спектроскопии было показано, что включение аминоксодержащего производного графена увеличивает упорядоченность молекул коллагена, что приводит к повышению механической прочности полимерных материалов. Авторами было установлено, что полученные криогели поддерживали рост и пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга. Клетки макрофагов, выращенные на криогелях, сшитых аминоксодержащим производным графена, показали высокую экспрессию генов CD206 (маркер поляризации M2) и CD163 (маркер поляризации M2) и низкую экспрессию гена CD86 (маркер поляризации M1), демонстрируя поляризацию макрофагов M2, что может способствовать восстановлению тканей. При органотипическом культивировании клеток спинного мозга крысы на подложке в виде коллагенового криогеля с графеном показано, что криогель поддерживает рост и миграцию клеток спинного мозга.

Описанные в этой работе криогели обладают потенциалом для подавления нейровоспаления и стимулирования миграции и пролиферации нейронных клеток.

1.4.1.2. Криогели на основе фиброина шелка

Фиброин шёлка (ФШ) – фибриллярный белок, уникальные физико-химические и механические свойства которого позволяют на его основе получать биосовместимые, биоразлагаемые криогели. ФШ получают из коконов шёлка тутового шелкопряда *Bombyx mori* [129]. Фиброин – это белок, состоящий из 18 аминокислот, таких как глицин, аланин, серин и др. [130, 131], а также легко активируемые химические группы, такие как гидроксильные, аминные, сульфгидрильные и имидазольные группы [132, 133]. Фиброин состоит из тяжелой цепи 390 кДа и легкой цепи 26 кДа, соединенных дисульфидной связью, а также гликопротеина Р25 (30 кДа) [134]. Благодаря своей уникальной аминокислотной последовательности возможен конформационный переход от водорастворимой структуры фиброина шёлка I к водонерастворимой структуре ФШ II. Макромолекула фиброина имеет вытянутую конформацию и структуру, состоящую из гидрофобных доменов (самоорганизующихся кристаллических β -складок) и гибких гидрофильных участков. Свойства белка зависят от размера, числа, ориентации и взаимного расположения гидрофобных и гидрофильных доменов. [135, 136] Благодаря механической прочности, эластичности, биосовместимости и контролируемой биоразлагаемости фиброина он является перспективным материалом для создания на его основе криогелей для биомедицинских целей и тканевой инженерии [137].

Гелеобразование водного раствора фиброина в основном происходит за счёт саможелирования системы, индуцированное гидрофобными взаимодействиями, с образованием β -складок между доменами макромолекул белка [138, 139]. Увеличение содержания β -складок во вторичной структуре молекулы фиброина приводит к гелеобразованию ФШ и может быть вызвано изменениями pH [140, 141], температуры [142], концентрации фиброина [143] и внесения в исходный

раствор фиброина добавок, таких как катионы [144, 145], диэпоксидных сшивающих агентов [146].

В результате криотропного гелеобразования растворов фиброина в присутствии диглицидилового эфира этиленгликоля образуются криогели с широким диапазоном свойств. Молекула ДГЭЭ содержит две эпоксидные группы, которые могут реагировать с нуклеофилами, включая аминогруппы, тиоловые группы и гидроксилы. В работе [146] было показано, что поперечная сшивка ДГЭЭ между молекулами фиброина (Рисунок 9) приводит к снижению подвижность цепей и приводит к образованию новых поперечных водородных связей между цепями ФШ, что инициирует конформационный переход к β -слоистой структуре и, следовательно, гелеобразование фиброина. В исследовании [147] криогели на основе фиброина шёлка были получены при температуре криогенной обработки от -5 до -22°C в течение 24 часов с содержанием ФШ 5, 12 и 18% масс. В качестве сшивающего агента использовался ДГЭЭ, а роль основания выполнял ТЕМЕД. С повышением концентрации эпоксидных групп ДГЭЭ от 10 до 30 ммоль эпокси-групп/г ФШ диаметр пор в губчатых криогелях уменьшился с 60 до 24 мкм. Снижение температуры криогенной обработки реакционной смеси с -5 до -22°C также приводило к уменьшению размера пор. Исследованные криогели имели высокую пористость порядка 90% и характеризовались высоким значением модуля упругости. Механическая прочность каркасов увеличивается с уменьшением диаметра пор, то есть со снижением температуры криотропного гелеобразования или с повышением концентрации фиброина и ДГЭЭ. Материалы, полученные с содержанием фиброина 12,6%, обладают очень высоким модулем упругости (50 МПа).

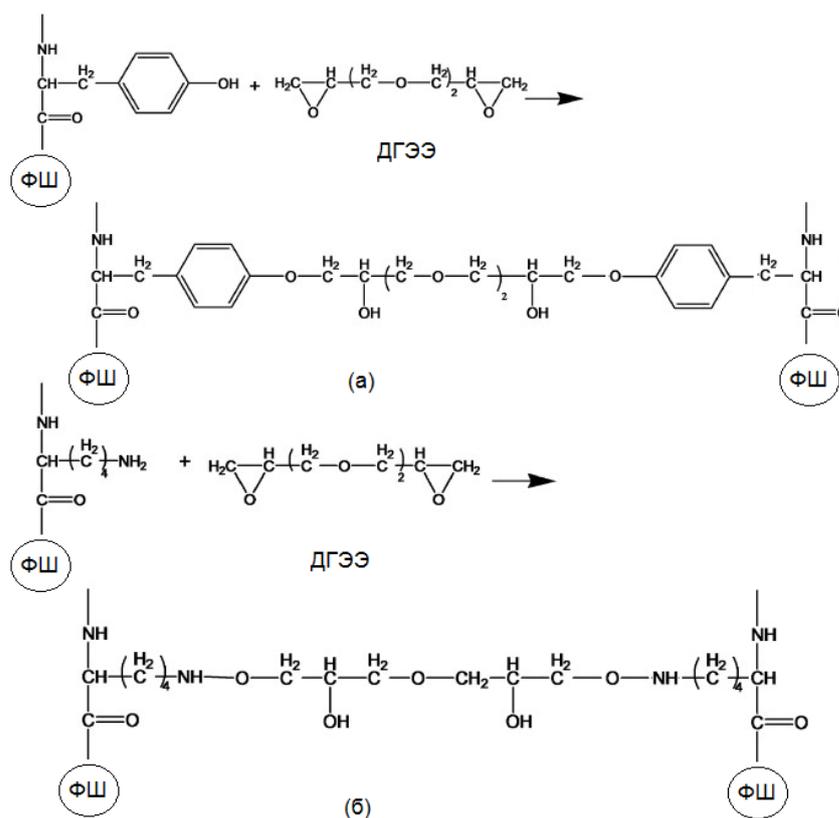


Рисунок 9. Образование межмолекулярных сшивок за счёт реакции диглицидилового эфира этиленгликоля с боковыми гидроксильными (а) и аминогруппами (б) макромолекулы фиброина шелка [146].

Для создания еще более механически прочных криогелей фиброина с двумя разными размерами пор было предложено проведение криотропного гелеобразования в уже сформированной полимерной сетке криогеля фиброина. Таким образом, криогели с взаимопроникающими двойными и тройными сетками были получены из растворов фиброина, замороженных при -18°C в присутствии сшивающего агента бутандиол диглицидилового эфира и ТЕМЕД в качестве регулятора рН. Материалы, сформированные при концентрациях фиброина выше 25% масс., имели модуль Юнга от 66 до 126 МПа и выдерживали около 90% сжатия при напряжениях 87-240 МПа. Независимо от типа полимерной сетки, все каркасы, имеющие одинаковую концентрацию фиброина, имеют одинаковые диаметры крупных пор, которые уменьшались с ~ 30 мкм до ~ 10 мкм при повышении концентрации фиброина от 4 до 61% масс. Криогели с двойными и тройными взаимопроникающими сетками имели два вида макропор диаметром

20-30 мкм и 3-9 мкм. Размер как больших, так и малых пор, можно регулировать количеством фиброина в полимерной фазе. Сравнение характеристик набухания и механических свойств криогелей с одной полимерной сеткой с криогелями с двумя и тремя взаимопроникающими сетками показал схожие значения степени набухания и механических характеристик, если концентрация фиброина в них была одинакова. Множественная сетка создает небольшие поры в криогелях фиброина в дополнение к более крупным порам без ухудшения механических свойств материала. Такие механически прочные криогели на основе ФШ могут использоваться в качестве каркасов для костных материалов.

1.4.2. Криогели на основе глобулярных белков

Макропористые криогели, полученные из смеси белков, в состав которой входят глобулярные белки, известны своим прикладным потенциалом в качестве материалов для тканевой инженерии. Так, в работе [148] криогели, синтезированные из смеси фибриногена и желатина, были оценены для возможного их применения в качестве каркасов для регенерации дермальной ткани. Фибриноген из плазмы крови человека с концентрацией 0,06; 0,84; 1,67% масс. смешивали с раствором желатина, выделенного из холодноводных рыб. Концентрация желатина в полученном растворе была 4,3; 3,5; 2,5% масс., соответственно. Для поперечной сшивки между макромолекулами белка использовали глутаровый альдегид (Рисунок 10). Затем реакционную смесь замораживали при -12°C в течение 24 часов и оттаивали при комнатной температуре. Анализ макропористой структуры полученных криогелей показал, что средний размер пор слабо зависит от концентрации предшественников и сшивающего агента и был равен 70-80 мкм. Напротив, степень набухания полимерной фазы снижалась (от 30 до 5 г $\text{H}_2\text{O}/\text{г}$ полимера) при повышении концентрации ГА. Авторы исследования предложили применять полученные биоразлагаемые криогели в качестве матрицы для культивирования фибробластов.

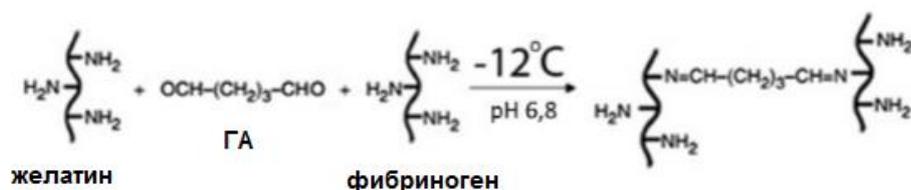


Рисунок 10. Схема реакции межмолекулярной сшивки с помощью глутарового альдегида смеси желатина и фибриногена [148].

Формирование губчатых матриц на основе глобулярных белков посредством ферментативного сшивания может быть более привлекательным способом получения биосовместимых материалов. В исследовании [149] криотропное гелеобразование казеина проводили с использованием ферментативной сшивки. Это позволяет получать высокопористые биосовместимые белковые материалы без применения каких-либо химических сшивающих агентов. Ферменты сохраняли свою активность при отрицательных температурах [150, 151]. Фермент трансглутаминаза (ТГЗ) катализирует образование поперечных связей между γ -карбоксамидной группой глутамина и ϵ -аминогруппой лизина (Рисунок 11) [152]. К раствору казеина с концентрацией 3, 5, 10% масс. добавляли раствор трансглутаминазы, замораживали при -12°C в течение суток и оттаивали при комнатной температуре. Ферментативная сшивка в неглубоко замороженных средах является медленным процессом для образования достаточно стабильных криогелей необходимо 24 часа при концентрации казеина не менее 5%. Механические свойства криогелей казеина улучшались с повышением количества белка. Кроме того, увеличение концентрации белка приводило к снижению степени набухания криогеля в воде. Размер пор полученных казеиновых криогелей был более 10 мкм. Применение криогелей на основе казеина в качестве подложки для культивирования фибробластов показало, что такие губки поддерживали пролиферацию и миграцию клеток внутри полимерной матрицы.

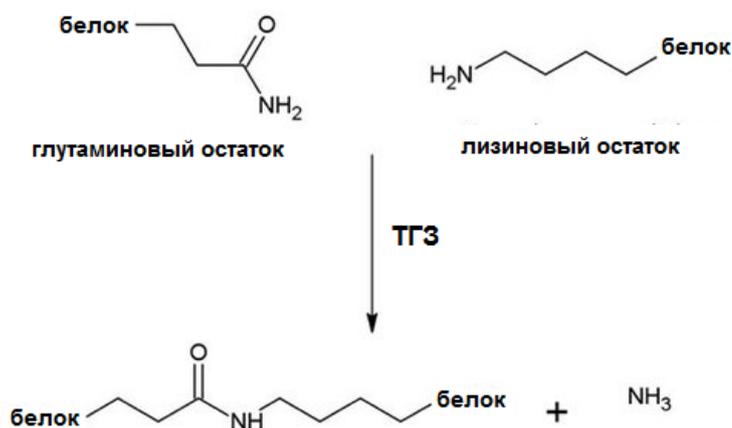


Рисунок 11. Схема реакции сшивки между глютамильными и лизильными звеньями в составе макромолекул белка под действием трансглутаминазы [152].

Другим случаем использования трансглутаминазы для синтеза криогелей являются губчатые материалы на основе водной суспензии суммарного белка, выделенного из семян соевых бобов. Глобулярная структура соевого белка состоит из 7S конглицинина и 11S глицинина [153]. Биосовместимость и биоразлагаемость соевого белка позволяют использовать данный материал для доставки лекарств и в тканевой инженерии [154, 155]. В работе [156] были получены широкопористые криогели из суммарного белка сои, где белковую суспензию (3-5% масс.) нагревали при 90°C в течение часа для термоденатурации глобул, затем охлаждали до комнатной температуры с последующей добавкой трансглутаминазы, далее полученную систему инкубировали в течение 1 часа при 40°C и далее замораживали при -15°C. Размер пор синтезированных криогелей находился в диапазоне 10-125 мкм, а общая пористость была выше 80%. Полученные в этой работе биосовместимые криогели были пригодны для культивирования мезенхимальных стромальных клеток.

Другим примером криогелей на основе глобулярных белков являются глобулярные белки семейства альбуминов, а конкретно – альбумины сыворотки крови. Бычий сывороточный альбумин (БСА) представляет собой белок, первичная структура которого состоит из 583 аминокислотных остатков. 35 остатков цистеина (Цис) образуют 17 дисульфидных мостиков, которые стабилизируют структуру, а Цис-34, имеющий свободную сульфгидрильную

группу, способен образовывать дисульфидный мост с таким же свободным цистеином другой макромолекулы альбумина [157]. Молекулярная масса БСА составляет приблизительно 66,8 кДа, а пространственная структура имеет три гомологичных домена I, II, III, каждый домен состоит из двух субдоменов – А и Б. В субдоме ИБ и субдоме ПА бычьего сывороточного альбумина содержится два аминокислотных остатка триптофана (Трп) Трп-134 и Трп-212, соответственно [158]. Благодаря своей доступности, биосовместимости и наличию в его полипептидной цепи большого количества боковых амина, карбоксильных, амидных функциональных групп данный белок является удобным объектом для получения на его основе различных носителей лекарственных препаратов [159, 160].

В работе [7] были получены макропористые криогели на основе альбумина. Формирование трехмерной полимерной сетки этих криогелей происходило за счет частичной денатурации белковых глобул, вызванной добавлением к раствору белка хаотропного агента – мочевины, а также цистеина, способного восстанавливать внутримолекулярные дисульфидные мостики этого белка. Полимерная трехмерная сетка образуется за счет ковалентных сшивок между денатурированными полипептидными цепями и стабилизирована межмолекулярными гидрофобными взаимодействиями (Рисунок 12). Полученные БСА-криогели имеют широкопористую морфологию с размером пор от 50 до 150 нм. Оптимальными условиями для приготовления таких криогелей на основе БСА оказались следующими: [БСА]=30–50 г/л, [мочевина]=0,5–2,0 моль/л, [Цис]=0,01 моль/л и при температуре замораживания от -15°C до -20°C. Такие губчатые материалы использовались как носители пептидно-белковых биорегуляторов [10] и антибиотиков [6].

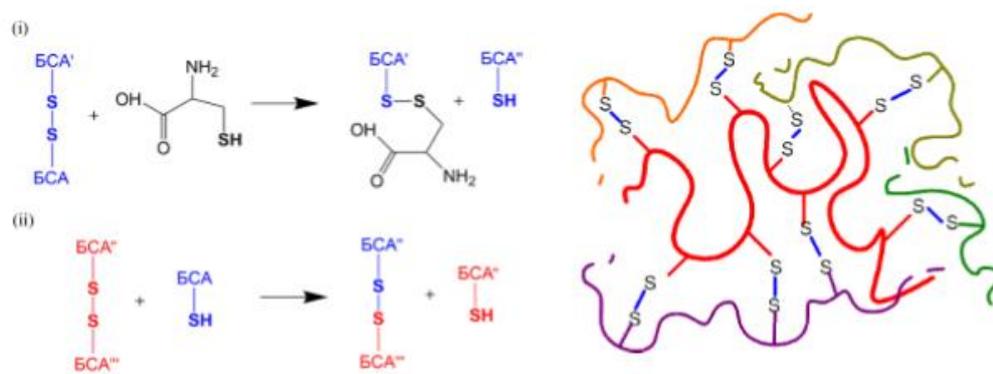


Рисунок 12. Схема реакций тиол-дисульфидного обмена, в результате которых формируется пространственная гелевая сетка в альбуминовых криогелях [7].

Использование аутологичных материалов в медицине – привлекательная идея, позволяющая избежать иммунного отторжения трансплантированной тканевой конструкции. Кровь и плазма – это препараты, которые легко получить у большинства пациентов. Кровь состоит из клеток крови (45%) и плазмы (55%). Клетки крови в основном представлены эритроцитами (99%), тогда как плазма – это водный раствор (91% воды), в основном содержащий белки, такие как альбумины, глобулины и фибриноген [161]. Широкопористые криогели на основе белков крови и плазмы КРС были сформированы в работе [162] с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента. Добавление ГА к раствору предшественника и последующее замораживание при -12°C приводило к сшивке в незамороженной фазе, и таким образом была сформирована пространственная гелевая сетка. Криогели на основе белков плазмы крови получали из неразбавленной плазмы или разбавляли её в соотношении 1:1(об./об.) фосфатно-солевым буфером. Такие губки имели вдвое больший модуль упругости и более высокое содержание гелевой фракции по сравнению с криогелями, сформированными из разбавленной плазмы. Анализ макропористой морфологии показал, что у криогелей, образованных из белков плазмы крови, размер пор находится в диапазоне от 10 до 80 мкм. Полученные широкопористые губчатые материалы применяли в качестве матриц для культивирования миобластов.

1.5 Применение белковых криогелей как носителей веществ пептидно-белковой природы

Как уже ранее отмечалось в литературном обзоре, благодаря своей макропористой губчатой структуре криогели, полученные из биополимеров, разрешенных для медицинского применения, могут использоваться в системах доставки лекарств. К таким гелевым матрицам, представляющим определенный прикладной интерес, относятся биоразлагаемые широкопористые криогели на основе индивидуальных белков или их смесей [7, 162-164].

Такие криогели можно приготовить двумя способами:

- 1) путем связывания макромолекул белка с помощью вспомогательных сшивающих реагентов, добавляемых к раствору предшественника непосредственно перед его криогенной обработкой [7, 44];
- 2) индуцируя разворачивание белковых глобул с одновременным межцепочечным сшиванием через реакции тиол-дисульфидного обмена; этот процесс вызывается денатурами, введенными в систему перед ее замораживанием [7, 45].

Во втором случае химическая структура полученных криогелей состоит только из мономерных единиц-аминокислот, а ковалентные узлы в трехмерной сетке представляют собой дисульфидные мостики, то есть структуры, принадлежащие цистину [7]. Такие белковые криогели нетоксичны, при биодegradации они разлагаются до аминокислот, а широкопористая морфология криогелей предоставляет возможность для загрузки подобных губок необходимыми лекарствами, в том числе и пептидно-белковой природы, и использования в дальнейшем таких биополимерных матриц в качестве систем доставки. Возможность применения белковых криогелей в качестве имплантируемых носителей для доставки специальных биологически активных белков и пептидов актуальна в медицине, поскольку белковые соединения применяются для лечения различных заболеваний, среди которых онкология, диабет, переломы костей, ортопедические проблемы и т.д. [8]. Использование в качестве биологически активного вещества пептидно-белковых биорегуляторов

[165], загруженных в криогели на основе сывороточного альбумина, для индукции регенерации костной ткани показали эффективность таких систем доставки [10]. Губка, напитанная биорегулятором, была имплантирована в модельные дефекты кости у крысы, что приводило к восстановлению плотной костной ткани, образованию костного мозга и восстановлению остеонов.

1.6 Белково-пептидные биорегуляторы

Белково-пептидные биорегуляторы (БПБ) – группа биологически активных веществ, локализованных в межклеточном пространстве и обеспечивающих поддержание адгезионных межклеточных взаимодействий. БПБ способны влиять на миграцию, пролиферацию, дифференцировку, а также повышать жизнеспособность клеток *in vitro*. Кроме того, было обнаружено важнейшее свойство таких биорегуляторов – они стимулируют восстановительные и репаративные процессы в травмированных и патологически измененных тканях [166, 167]. Активность БПБ характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. Важным свойством биорегуляторов данной группы является их способность в низких концентрациях влиять на вязкоупругие свойства плазматической мембраны клеток [167]. Данные биорегуляторы проявляют устойчивость к воздействию различных физико-химических факторов: изменению pH, температуры, действию хелатирующих агентов и т.д. Также отмечена их тенденция к межмолекулярной ассоциации с образованием наночастиц размером 50-300 нм, причем наноразмерное состояние определяет характер их активности [165].

Первое упоминание в литературе о биологической активности подобных биорегуляторов изложено в работе [168], в которой было показано действие БПБ, выделенного из сыворотки крови КРС, на повышение жизнеспособности фибробластов при культивировании *in vitro*, а также на повышение клоногенной активности этих клеток. Для исследования специфической активности биорегуляторов в условиях органного или органотипического культивирования необходимо сохранить в тканях адгезивные контакты между клетками, а также

целостность межклеточного пространства [169, 170]. На экспериментальной модели культивирования заднего отдела глаза позвоночных животных было показано биологическое действие некоторых БПБ [171]. Например, биорегуляторы, выделенные из сетчатки и пигментного эпителия, оказывали влияние на поддержание жизнеспособности нейральной сетчатки и дифференцировку ее клеток [171, 172]. БПБ хрусталика препятствует развитию катарактогенеза [173, 174], а биорегулятор роговицы влияет на пролиферацию, поддерживает и стимулирует жизнеспособность клеточных источников регенерации в этой ткани [175, 176].

В работе [177] было показано, что биорегулятор, выделенный из ткани склеры КРС, оказывал протекторное действие на ткани заднего отдела глаза – склеральную оболочку, пигментный эпителий, хороид, т.е. способствовал поддержанию адгезии между данными тканями, сохранению межклеточных взаимодействий в пределах каждой ткани и целостности коллагеновых волокон, а также увеличению жизнеспособности фибробластов и сохранению пространственной организации тканевой структуры склеральной оболочки.

Белково-пептидные биорегуляторы имеют сложный состав. Их основой является пептидно-белковый комплекс, в состав которого входят биологически активные пептиды (мол. массой 1-8 кДа) и белок, модулирующий их биологическое действие – белок-модулятор [178, 179], взаимодействующий с пептидами по кальций-связывающему механизму [167, 179]. Для пептидов, входящих в состав некоторых БПБ, была установлена их первичная аминокислотная последовательность. Например, полипептид, выделенный из головного мозга крысы, с молекулярной массой 4749 ± 2 Да гомологичен *N*-концевому участку гуанин-нуклеотидсвязывающему G_0 -белку мозга крысы [180]. Первичная структура пептида, входящего в состав биорегулятора, выделенного из пигментного эпителия глаза КРС, была идентична *N*-концевому фрагменту фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата сетчатки КРС. С помощью ферментативного метода – секвенирования карбоксипептидазой полипептида БПБ сыворотки крови были определены *C*-концевые аминокислотные

последовательности двух пептидов с молекулярной массой 1448 ± 2 и 1151 ± 2 Да, которые гомологичны, соответственно *N*-концевым фрагментам Р-кадгерина эндотелия бычьей аорты и киназного домена регуляторного белка TRB-2 гранулоцитов КРС, соответственно [181]. Полученные данные указывают на то, что пептиды, входящие в состав биорегуляторов, являются продуктами протеолиза различных мембранных белков. Для БПБ, выделенных из склеры, пигментного эпителия и сыворотки крови КРС, было установлено, что белок-модулятор представляет собой сывороточный альбумин определенной изоформы [178, 179]. Следует отметить, что в составе пептидно-белкового комплекса были обнаружены углеводы и липиды, однако, остается неизвестна их функциональная значимость в составе биорегуляторов [165, 182].

Таким образом, белково-пептидные биорегуляторы – это биологически активные вещества, локализованные во внеклеточном пространстве и оказывающие влияние в низких дозах на важные биологические процессы – адгезию, миграцию, дифференцировку и пролиферацию клеток.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы и препараты

В работе без дополнительной очистки использовали следующие вещества: хлорид кальция (Serva, Германия), сульфат аммония, хлорид натрия (все – Helicon, РФ), персульфат аммония (Sigma, США), этиловый спирт (Химмед, РФ), изопропанол, уксусную кислоту, ксилол, ацетон, трифторуксусную кислоту (ТФУ), ацетонитрил (все - Panreac, Испания), мочевины (Sigma, США), 1,4-дителиотреит (ДТТ) (Panreac, Испания), гуанидин гидрохлорид, глицин (все – Helicon, РФ), акриламид, N,N'-метилден-бис-акриламид, N,N,N',N'-тетрамилэтилендиамин (ТЕМЕД), йодацетамид, α-циано-4-гидроксикоричную кислоту (все – Sigma, США), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид (Трис-НСl) (все - ДИАМ, РФ), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), (Helicon, РФ), додецилсульфат натрия (ДДС-Na), краситель Кумасси R250 (все – Serva, Германия), эозин, гематоксилин (все - ДИАМ, РФ), метиленовый синий (Merck GmbH, Германия), бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, США), трипсин (Promega, США), Среда 199 (Gibco, Великобритания), сыворотку крови крупного рогатого скота (лот № 015BS247; Biosera, Франция). Все водные растворы были приготовлены с использованием воды качества Milli-Q.

2.2 Оборудование

Замораживание растворов для формирования губчатых криогелей на основе суммы белков сыворотки крови проводили в криостате F-32 (Julabo, Германия). Для высушивания полученных материалов использовали лиофильную установку ALPHA 1-2 LD plus (Martin Christ, Германия). Досушивание до постоянного веса криогелей на основе суммарных белков сыворотки крови проводили в термостате SNOL 24/200 (AB Utenos Elektrotechnika, Литва). Макропористую морфологию полученных образцов изучали с помощью оптического стереомикроскопа SMZ1000 (Nikon, Япония), оснащенного системой цифровой записи изображений

MMC-50C-M (MMCSoft, РФ). Электрофоретический анализ белковых компонентов криогеля и биорегулятора осуществляли на установке для электрофореза Mini vertical gel system EC120 с источником тока PowerPac Basic (BioRad, США). Пептидно-белковый биорегулятор очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе высокого давления Agilent 1260 (Agilent, США) с колонкой Kromasil C4 (4.6×250 мм) (AkzoNobel, Швеция). Масс-спектрометрический анализ белков и пептидов осуществляли на времяпролетном MALDI-TOF-масс-спектрометре UltraFlex 2 (Bruker Daltonics, Германия). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Jasco V-780 (Jasco, Япония), а спектры кругового дихроизма регистрировали на КД-спектрометре Jasco 1500 (Jasco, Япония). Для определения гидродинамического радиуса частиц биорегулятора использовали анализатор Photocor Compact-Z (Photocor, Россия). Для просмотра гистологических срезов использовали оптический микроскоп Jenaval (Carl Zeiss, Jena, Germany). Оценку количества жизнеспособных фибробластов на гистологических срезах проводили с помощью программы ImageJ (США).

2.3. Методики проведения экспериментов

2.3.1. Получение криогелей на основе суммы белков сыворотки крови

Сыворотку крови КРС с общей концентрацией белка 75 мг/мл разбавляли водой для получения растворов с конечной концентрацией белка 37,5, 50, 62,5 и 75 мг/мл. Далее необходимое количество мочевины быстро растворяли в растворе сыворотки. Концентрация мочевины в исследуемых образцах была постоянной – 1,5 М. Полученные растворы охлаждали на ледяной бане с последующим добавлением необходимого объема водного раствора цистеина до конечной концентрации 0,01 М. Затем полученную реакционную смесь объемом 1,5 мл вносили в пенициллиновые флаконы с внутренним диаметром 22 мм и помещали в камеру программируемого криостата с предварительно установленной температурой (-15, -20 или -25°C) и выдерживали 24 часа. Далее образцы

извлекали из криостата, оттаивали в течение 30 минут, промывали от золь-фракции в воде (200 мл на образец).

2.3.2. Определение выхода гель фракции и параметров степени набухания полимерной фазы криогелей

Степень набухания полимерной фазы губчатых криогелей на основе белков сыворотки крови измеряли гравиметрически следующим образом. Для этого набухший в воде губчатый образец помещали на стеклянный фильтр и удаляли свободный растворитель под вакуумом (водяной насос) в течение 1 минуты под нагрузкой 170 г, а затем выдерживали криогель в течение 4 минут также под вакуумом, но уже без нагрузки. Образец, отжатый таким образом, взвешивали и высушивали до постоянного веса при 105°C. Выход гель-фракции (Y) рассчитывали из соотношения:

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

Величину степени набухания (S) полимерной фазы (стенки макропор) широкопористых образцов вычисляли по формуле:

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

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.

2.3.3. Микроструктура криогелей

Образцы криогелей для микроскопических исследований были сформированы в форме дисков толщиной 1 мм. Реакционные растворы с концентрацией белка 50 мг/мл, конечной концентрацией мочевины 1,5 М и цистеина 0,01 М вносили в пластиковую чашку Петри (Медполимер, РФ) с внутренним диаметром 38 мм, которую сразу ставили на плоский поддон, погруженный в охлаждающую жидкость криостата. Полученные при -15°C, -20°C, -25°C диски многократно промывали водой и затем в течение 1 минуты окрашивали 0,125 мМ водным раствором метиленового синего с последующим тщательным промыванием водой. Пористую морфологию криогелей исследовали

с использованием оптического стереомикроскопа, оснащенного системой для цифровой записи изображений.

2.3.4. Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ)

Белковый состав сформированных криогелей и биорегулятора изучали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Перед внесением исследуемых образцов в ПААГ криогель солубилизировали в течение ночи в 1%-ном водном растворе додецил сульфате натрия, содержащем ДТТ (0,05 моль/л), а водный раствор биорегулятора денатурировали при 95°C в течении 5 минут в рабочем буфере с ДТТ. Электрофорез по методике Лэммли [183] проводили с использованием пластин ПААГ толщиной 1 мм; 12,5% и 4% составляли концентрирующий и разделяющий гели соответственно. Для определения молекулярной массы использовали набор маркерных белков 2-250 кДа (BioRad, США). Электрофоретическое разделение проводили при постоянном токе 20-30 мА в течение 1 часа с последующей стандартной фиксацией раствором изопропанол/уксусная кислота и окрашиванием красителем Кумасси R250.

2.3.5. Выделение и очистка биорегулятора из ткани склеры глаза КРС

Пептидно-белковый комплекс, входящий в состав биорегулятора склеры, был выделен из свежезнуклеированных глаз молодых быков, полученных на мясоперерабатывающих заводах г. Москвы и Московской области. По методике, ранее разработанной для исследования биорегуляторов из различных тканей млекопитающих [167], склеру отделяли и очищали от других тканей глаза и помещали на 3 часа при 4°C в экстрагирующий раствор состава: 1 мМ CaCl₂, 0,15 М NaCl, 1,0 мМ HEPES, pH 7,0-7,2. Полученный тканевой экстракт фильтровали через четыре слоя марли и центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость собирали и осаждали белки сернокислым аммонием (~70% насыщения) в течение 96 часов при 4°C. Образовавшуюся суспензию белков центрифугировали 45 мин при 15000 g, супернатант и осадок собирали отдельно. Супернатант диализовали против дистиллированной воды, осадок диализовали против 0,01 М трис-буфера до удаления следов аммонийной соли,

наличие в растворе ионов аммония детектировали с помощью реактива Несслера. Фракцию, содержащую осадок, растворяли в воде, наносили на колонку Kromasil C4 (4.6×250 мм) (AkzoNobel, Швеция), уравновешенную водным раствором 0,1%-ной трифторуксусной кислотой с pH 2,2 и разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе высокого давления Agilent 1260 (Agilent, США). Связавшиеся с сорбентом компоненты элюировали градиентом концентрации ацетонитрила 0-60% в 0,1%-ной ТФУ, pH 2,2, в течение 60 мин. Скорость элюции – 1 мл/мин. Детекцию проводили спектрофотометрически при 210 нм.

Для разделения белково-пептидного комплекса на фракцию пептидов и альбумина к водному раствору биорегулятора добавляли гуанидин гидрохлорид, ЭДТА и NaCl, чтобы их конечная концентрация в растворе была 7,0 М, 3,0 мМ и 0,3 М соответственно, далее инкубировали при 45°C в течение 24 часов. Затем к полученному раствору добавляли пять объемов 95%-ного этанола и оставляли на 72 часа при 4°C. Полученный после осаждения спиртом осадок растворяли в воде, разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ и получали фракции, содержащие пептиды и альбумин.

2.3.6. Содержание белка

На всех стадиях исследования количественное содержание белка во всех изучаемых фракциях определяли спектрофотометрически по методу Варбурга и Кристиана [184] с использованием спектрофотометра Jasco V-780 (Jasco, Япония).

2.3.7. Масс-спектрометрический анализ БПБ склеры

Анализ осуществляли в лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии ИФХЭ им. А.Н. Фрумкина РАН на времяпролетном MALDI-TOF-масс-спектрометре, оснащенным азотным лазером (337 нм) с частотой импульса до 20 Гц. Все измерения проводили в линейном и рефлекторном режиме, определяя положительные ионы. Для накопления масс-спектров мощность лазерного излучения устанавливали на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца. Внешнюю

калибровку проводили с использованием точных значений молекулярных масс известных белков. Образец наносили на три ячейки планшета, для каждой из которых записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 серий спектров по 50 импульсов лазера для каждой. Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11) (Bruker Daltonics, Германия). Точность измерения масс составляла ± 2 Да. В качестве матрицы использовали насыщенный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в смеси 70%-ного ацетонитрила и 0,1%-ной трифторуксусной кислоты.

2.3.8. Определение N-концевой аминокислотной последовательности

Аминокислотную последовательность определяли в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН на автоматическом секвенаторе белков Shimadzu PPSQ-33A (Shimadzu, Япония) по методу Эдмана [185] с использованием программы производителя.

2.3.9. Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле *in situ*

Полученные в результате электрофореза в ПААГ белковые полосы вырезали из геля (площадью 3 мм²), промывали 100 мкл 50%-ного метанола и дегидратировали в 400 мкл ацетонитрила. Восстановление дисульфидных связей белка проводили действием 100 мкл 10 мМ ДТТ с последующим алкилированием тиольных групп 100 мкл 55 мМ йодацетамида. Затем модифицированный белок подвергали гидролизу в геле, добавляя 20 мкл (1,0 мг/мл) раствор трипсина в 25 мМ NH₄НСО₃ и инкубировали в течение ночи при 37°C. Полученные пептиды экстрагировали из геля добавлением 10 мкл 50%-ного ацетонитрила в 1%-ной трифторуксусной кислоте. После экстракции супернатант (1 мкл) смешивали на стальной мишени с 0,5 мкл (20 мг/мл) раствора α -циано-4-гидроксикоричной в смеси 50%-ного ацетонитрила и 2,5%-ной ТФУ и подвергали масс-спектрометрическому анализу.

2.3.10. Идентификация белков по базам данных

Белковый компонент биорегулятора идентифицировали с помощью программного пакета Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). Поиск проводили по данным масс-спектров в базе данных Swiss-Prot и NCBI (Национальный центр США по биотехнологической информации) белков всех организмов и, в частности белков, обнаруженных у быка *Bos taurus*, с указанием типа гидролиза – трипсин.

2.3.11. Определение размеров частиц методом лазерного динамического рассеяния света (фотонная корреляционная спектроскопия)

Для определения гидродинамического радиуса частиц пептидно-белкового комплекса, использовали его водный раствор в концентрации 100 мкг/мл. Измерение проводили на анализаторе Photocor Compact-Z (Photocor, Россия) в лаборатории ООО «Институт проблем биорегуляции», оснащенным термостабилизированным AlGaInP диодным лазером с длиной волны $\lambda=637.4$ нм и мощностью 30 мВт, со встроенным многоканальным коррелятором "Photocor-FC", получая корреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света и интегральной интенсивности рассеяния. Обработку корреляционной функции проводили при помощи программного обеспечения DynaLS (Alango Ltd, Израиль) [186, 187]. Диапазон допустимых измеряемых размеров наночастиц находился в пределах от долей нм до 5-10 мкм. Измерения проводили при величине угла рассеивания в 90° в диапазоне температур от 20 до 100°C . Водный раствор пептидно-белкового комплекса предварительно очищали от пыли фильтрованием через мембраны Durapore (Milipore, США) с диаметром пор 0,22 мкм.

2.3.12. Определение вторичной и третичной структуры биорегулятора с помощью метода кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма регистрировали на КД-спектрометре Jasco 1500 (Jasco, Япония) совместно с лабораторией ООО «Институт проблем

биорегуляции» в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0,1 см для пептидной области спектра (190-260 нм) и 1 см для ароматической области (240-340 нм). Кювету с раствором пептидно-белкового комплекса (100 мкг/мл) в 10 мМ натрий-фосфатном буферном растворе термостатировали при температурах 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C в течение 15 минут. Скорость сканирования составляла 100 нм/мин, шаг 0,1 нм в непрерывном режиме. Итоговый спектр получали по результатам усреднения данных трех сканирований и вычитания спектра базовой линии (контроля) [188]. Содержание элементов вторичной структуры оценивали с помощью программы производителя CD Multivariate SSE (Jasco, Япония).

2.3.13. Ингибирование ДТТ-индуцированной агрегации БСА и лизоцима

ДТТ-индуцированную агрегацию БСА изучали в воде при 50°C, а лизоцима в 1 мМ боратном буфере pH 9,0 при 50°C. Буфер помещали в цилиндрическую пробирку с внутренним диаметром 6,3 мм и предварительно инкубировали в течение 5 мин при 50°C. Пробирки закрывали пробками для предотвращения испарения. Процесс агрегации инициировали добавлением 10 мМ и 0,5 мМ ДТТ к раствору БСА и лизоцима соответственно до конечного объема 0,5 мл. Измерение проводили на анализаторе Photocor Compact-Z (Photocor, Россия), оснащенным термостабилизированным AlGaInP диодным лазером с длиной волны $\lambda=637,4$ нм и мощностью 30 мВт, со встроенным многоканальным коррелятором "Photocor-FC", получая корреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света и интегральной интенсивности рассеяния. Обработку корреляционной функции проводили при помощи программного обеспечения DynaLS (Alango Ltd, Израиль) [186, 187]. Диапазон допустимых измеряемых размеров наночастиц находится в пределах от долей нм до 5-10 мкм. Измерения проводили при величине угла рассеивания в 90°. Для изучения влияния пептидно-белкового биорегулятора на ДТТ-индуцированную агрегацию БСА и лизоцима, добавляли

БПБ в широком диапазоне концентраций к предварительно прогретому раствору модельного белка перед внесением ДТТ.

Влияние биорегулятора на вторичную структуру БСА и лизоцима изучали с помощью КД-спектроскопии в длинноволновой УФ-области (190-260 нм) на КД-спектрометре. Образцы предварительно готовили в соответствующем буфере, для агрегации добавляли ДТТ и/или биорегулятор, после инкубации при 50°C в течение 75 мин измерение проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0,1 см. Спектры снимали от 3-х до 10-ти раз, усредняли и вычитали спектр буфера.

2.3.14. Нагружение белковых криогелей биорегулятором

Нагрузку криогелей на основе белков сыворотки крови биорегулятором проводили следующим образом: набухшие в воде губчатые образцы криогелей замораживали при -20°C и лиофилизовали, далее их помещали в водный раствор биорегулятора, с концентрацией белка 10^{-7} мг/мл, чтобы пропитать им губку-носитель. Образцы набухших криогелей инкубировали в данном растворе в течение 4 часов при 20°C, после чего замораживали при -20°C и высушивали лиофильно. Контрольные губки, не содержащие биорегуляторов, после стадии отмывки водой также замораживали и лиофилизовали.

2.3.15. Исследование биологической активности системы криогель+биорегулятор на моделях органного культивирования *in vitro*

Исследования проводили совместно с н.с. ИНЭОС РАН к.б.н. Красновым М.С. с использованием извлечённых глаз взрослых половозрелых тритонов *Pleurodeles waltl* обоего пола, взятых из аквариальной ИБР им. Н.К. Кольцова РАН. В каждом эксперименте использовали не менее 9 животных (18 глаз). Тритоны были наркотизированы в 2%-ном растворе этилуретана в физиологическом растворе для амфибий (0,65% NaCl). После наркотизации головы животных ополаскивали 70%-ным этиловым спиртом и проводили энуклеацию глаз при стандартном лабораторном освещении. Изолированные

глаза помещали в стерильные 3,5 см чашки Петри с питательной средой для амфибий (среда 199 – 70%, вода дистиллированная – 30%) [189]. Среда для культивирования тканей глаза содержала: 350 мл 199 среды, 150 мл воды, 0,15 мл 1,0 М буфера HEPES, 1 мл 1%-ного гентамицина, 0,5 мл антибиотик/антимикотик. Перед внесением во флаконы среду стерилизовали холодным способом, пропуская через мембранные фильтры типа “CA” (Nalgene, США) с размером пор 0,22 мкм. Под бинокулярной линзой изолировали ткани глаз в следующей последовательности: освобождали глаза от кожных покровов, затем разрезали по окружности проксимальнее лимба. Ростовую область сетчатки вместе с радужкой, роговицей и хрусталиком отбрасывали. Задний сектор каждого глаза, в состав которого входили сетчатка, пигментный эпителий, сосудистая оболочка и склера, использовали для последующего культивирования.

Готовили 6 экспериментальных серий, по 2 культуры в каждой, экспериментальные серии повторяли 3 раза.

1. Контроль.
2. Контроль + криогель.
3. Биорегулятор из сыворотки крови.
4. Криогель, нагруженный биорегулятором из сыворотки крови.
5. Биорегулятор из склеры.
6. Криогель, нагруженный биорегулятором из склеры.

В контрольной серии в культуральную среду добавляли 100 мкл физиологического раствора. В 4, 6 экспериментальных группах полученные задние отделы глаз помещали на губчатый образец (напитанный соответствующим биорегулятором) в пенициллиновые флаконы, промытые в стерильной культуральной среде, заполненные бессывороточной средой (среда 199 без добавления сыворотки). В 3, 5 экспериментальных группах перед началом культивирования добавляли 100 мкл исследуемого биорегулятора с концентрацией белка 10^{-7} мг/мл. Все флаконы закрывали стерильными крышками, затем пленкой (ParafilmM, США) и помещали в термостат. Культивирование

проводили стационарно в темноте при температуре 20-22°C в течение 72 часов, без смены культуральной среды.

Изучение состояния эксплантатов после культивирования проводили на сериях парафиновых срезов. Ткани заднего отдела глаза фиксировали в 10%-ном растворе формалина, после фиксации в течение 12 часов отмывали проточной водой, далее обезживали спиртом, повышая концентрацию этанола, затем промывали ксилолом и заливали в парафин. Приготавливали парафиновые срезы толщиной 7 мкм, используя микротом “ERM 4000” (Hestion, Австралия), которые после депарафинирования и гидратирования окрашивали гематоксилином и эозином и заключали под покровное стекло с добавлением адгезирующей жидкости. Для просмотра гистологических срезов использовали микроскоп “Jenaval” (CarlZeiss, Германия). Оценку количества жизнеспособных фибробластов на гистологических срезах осуществляли по программе ImageJ (США), анализируя количество фибробластов ткани склеры относительно площади всего среза. Для каждой экспериментальной точки было исследовано не менее 50 срезов. Полученные результаты обрабатывали по критерию Манна-Уитни.

2.3.16. *In vivo* тестирование криогелей, нагруженных биорегулятором

Исследования проводили совместно с н.с. ИНЭОС РАН к.б.н. Красновым М.С. и доцентом Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России к.м.н. Шайхалиевым А.И. В эксперименте использовались криогенно-структурированные губчатые носители в виде цилиндрических образцов диаметром 5 мм и высотой также 5 мм, приготовленные из суммы белков сыворотки крови, как описано в разделе 2.3.1. Далее полученные губчатые носители инкубировали в водном растворе биорегулятора, замораживали и высушивали лиофильно. Контрольные образцы – носители, не содержащие биорегулятор, также высушивали лиофильно.

Биорегулятор выделяли из сыворотки крови крупного рогатого скота, по методике, включающей высаливание белков сернокислым аммонием, диализ,

концентрирование [167]. Высокая степень очистки биорегулятора была показана электрофорезом в ПААГ и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Эксперименты с лабораторными животными проводили на кроликах породы Шиншилла весом 2-2,5 кг, самцах. Под наркозом (внутримышечный наркоз Zoletil 100) разрезом до 3 см в области угла нижней челюсти скелетировали костную ткань и фрезой диаметром 5 мм создавали дефект глубиной 2-3 мм для установки губки, соответствующего размера. В образовавшиеся дефекты помещали исследуемые материалы – 3Д-носители, содержащие и не содержащие БПБ из сыворотки крови. После заполнения дефектов зашивали мягкие ткани и кожу. Животные содержались в стандартных условиях вивария.

Ушивание раны производили послойно после обработки 3% раствором перекиси водорода. Рана послойно ушита узловыми швами с полным укрыванием имплантата. Гемостаз произведен по ходу операции. Кожная рана ушита узловыми швами полигликолид 4/0. Каждому кролику устанавливали по одному испытываемому образцу губки, содержащему биорегулятор из сыворотки крови, либо без такого биорегулятора. В отрицательном контроле в область дефекта ничего не вставляли и ушивали рану.

На 30-ый день после операции животных выводили из эксперимента, костный материал извлекали из области дефекта, фиксировали в формалине, декальцинировали, заключали в парафин для приготовления гистологических срезов толщиной 10 мкм. Окраску гистологических срезов производили гематоксилином-эозином и изучали их с помощью световой микроскопии.

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Общие замечания

В литературном обзоре было описано большое количество уникальных криогенно-структурированных гелевых материалов на основе различных биополимеров, которые в настоящее время используются в биомедицине и биотехнологии [4]. В частности, альбуминовые криогели использовались в качестве носителей антибиотиков [6]. Но чистый сывороточный альбумин довольно дорогой биополимер и поэтому представлялось перспективным получить подобные носители без выделения индивидуального альбумина. К таким гелевым матрицам, представляющим определенный прикладной интерес, относится объект диссертационного исследования – биоразлагаемые широкопористые криогели на основе суммарного белка сыворотки крови.

3.2. Получение, свойства и микроструктура криогелей на основе суммы белков сыворотки крови

Криогели на основе белков сыворотки крови были синтезированы по механизму, в котором гелевая сетка образуется в результате разворачивания белковых глобул, вызванного добавлением денатуранта (мочевина) и параллельно протекающей реакции тиол-дисульфидного обмена между полипептидными цепями, которая инициируется небольшим количеством тиолсодержащего восстановителя (цистеина). Такой подход для получения губчатых материалов применялся ранее для синтеза альбуминовых криогелей [7]. Однако, в настоящем исследовании, когда исходный раствор содержит многокомпонентный предшественник – сыворотку крови, которая состоит из набора различных белков, необходимо было определить оптимальные условия процесса криотропного гелеобразования, а именно исходную концентрацию белка и температуру криогенной обработки для получения криогелей, наиболее подходящих по своим свойствам для последующих биологических исследований.

3.2.1. Влияние исходных концентраций белка, а также условий процесса криоструктурирования, на физико-химические характеристики получаемых криогелей

В результате криогенной обработки в температурном интервале от -15°C до -25°C , системы «сыворотка крови + мочевины + Цис» с различной концентрацией белка образовывались криогели, представляющие собой губчатые гелевые матрицы кремового цвета. Концентрации мочевины и цистеина в исходной реакционной смеси были выбраны на основании результатов ранее проведённых исследований [7] 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 влияние концентрации суммарного белка сыворотки крови и температуры замораживания на свойства сформировавшихся криогелей, сначала была изучена зависимость этих параметров на такие показатели, как выход гель-фракции (Y), являющийся индикатором эффективности гелеобразования, а также на степень набухания (S), зависящая от плотности сшивки трехмерной сетки в полимерной фазе (стенках макропор) этих гетерофазных гелевых матриц. Как правило, чем меньше значение параметра степени набухания, тем более плотная сшивка внутри этой фазы [11]. Выбор температурного интервала криогенной обработки был обусловлен следующими причинами. При отрицательных температурах от -5°C до -15°C исходные растворы очень часто вообще не замерзали из-за эффектов переохлаждения. В свою очередь, когда процесс проводился при температурах ниже -25°C , значения Y были очень малыми, особенно для систем с концентрацией белка 50,0 и 32,5 мг/мл.

Было установлено, что наиболее эффективно гелеобразование протекает 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 наблюдалась и в случае белковых

криогелей, приготовленных на основе только сывороточного альбумина [7], что демонстрирует общий характер эффекта для обеих этих систем предшественников – индивидуального альбумина и смеси сывороточных белков. В обоих случаях наблюдалась аналогичная картина в отношении влияния исходной концентрации белка на значение выхода гель фракции (Y). Разница параметра, отражающего эффективность криотропного гелеобразования в диапазоне начальной концентрации белка сыворотки крови 37,5-75,0 мг/мл, используемом в данном исследовании и в диапазоне концентраций для индивидуального сывороточного альбумина 30-50 мг/мл в работе [7], была небольшой. Для криогелей, сформированных при -20 и -25°C, значения выхода гель-фракции были несколько меньше, и отличались от значений для образцов, сформированных при -15°C (Рисунок 13). 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.

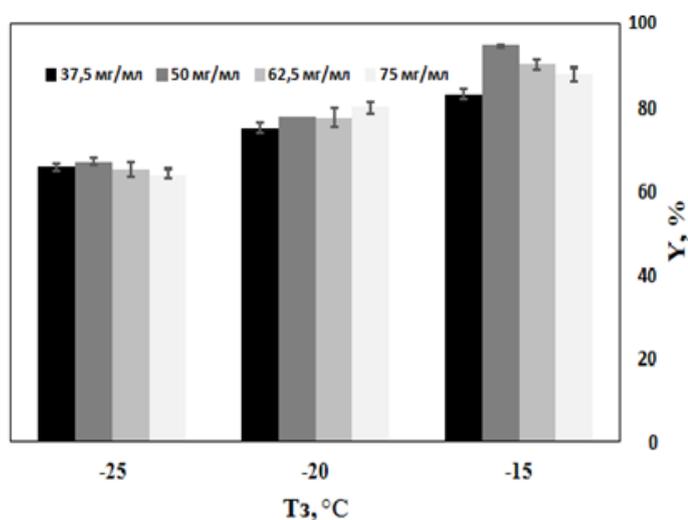


Рисунок 13. Значения выхода гель-фракции (Y) для криогелей, приготовленных из исходных растворов с различной концентрацией белков сыворотки крови (75,0, 62,5, 50,0 и 37,5 мг/мл) при температуре замораживания -15, -20 и -25°C.

Что касается влияния начальной концентрации белка и условий криогенной обработки на характеристики набухания полимерной фазы в полученных

широкопористых криогелях, было найдено, что значения S для равноконцентрированных образцов, сформированных при -15 и -20°C , были очень близки. В свою очередь, стенки пор в губчатых образцах, приготовленных при -25°C , набухали значительно сильнее по сравнению с предыдущими образцами (Рисунок 14). Эти данные свидетельствуют о том, что трехмерная полимерная сетка белковых криогелей, сформированная при самой низкой температуре (-25°C), была в гораздо меньшей степени сшитая 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 сшивания полимерной сетки была выше. Таким образом, оптимальный интервал температур для синтеза криогелей на основе суммы белков сыворотки крови (Рисунок 13 и 14) находится примерно в диапазоне от -15 до -20°C .

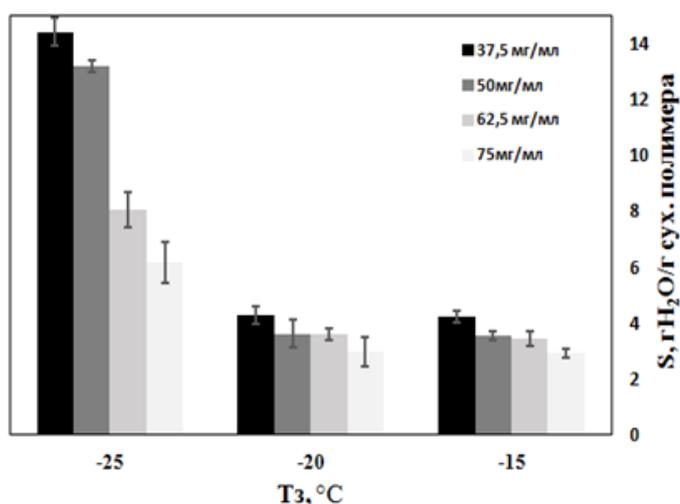


Рисунок 14. Степень набухания (S) криогелей, приготовленных из исходных растворов с различной концентрацией белков сыворотки крови (75,0, 62,5, 50,0 и 37,5 мг/мл) при температуре замораживания -15 , -20 и -25°C .

Повышение концентрации белка сыворотки крови в начальном растворе приводит к снижению степени набухания (параметр S) полимерной фазы в стенках макропор сформированных криогелей (Рисунок 14). Это объясняется более частой межцепочной сшивкой полимерной сетки в образцах, сформированных из более концентрированных растворов полимерного предшественника. Полученные результаты согласуются с литературными

данными для белковых криогелей, полимерная сетка которых стабилизируется за счёт образования химической сшивки между макромолекулами белка в неглубоко замороженных средах [7, 152, 190]. В свою очередь, губчатые криогели, полученные из исходного раствора сыворотки крови с концентрацией белка 37,5 и 50,0 мг/мл и при температуре криогенной обработки -25°C , не могли быть использованы в дальнейшем в биологическом тестировании в качестве носителя из-за низкой механической прочности.

3.2.2. Влияние условий формирования получаемых криогелей на их макропористую морфологию

Из литературных данных известно, что температура замораживания является ключевым параметром, который в значительной степени определяет размер, форму и количество пор в различных полимерных криогелях [11, 12, 163]. Чем ниже температура криогенной обработки, тем меньший размер пор образующихся в криогелях, т.к. размер поликристаллов замороженного растворителя уменьшается. Поскольку интегральные свойства криогелей зависят не только от особенностей гелевой фазы, но и от характеристик макропористой морфологии, то изучение её зависимости от условий процесса криоструктурирования является важным для оценки прикладного потенциала криогелей на основе суммы белков сыворотки крови.

На Рисунке 15 приведены полученные с помощью оптического стереомикроскопа микрофотографии криогелей на основе суммы белков сыворотки крови, сформированных в виде дисков толщиной 1 мм и окрашенных метиленовым синим. Образцы были синтезированы при концентрации белка 50 мг/мл, мочевины – 1,5 моль/л и цистеина – 0,01 моль/л, но при различных температурах замораживания: -15 , -20 и -25°C . Микроструктура исследуемых губчатых криогелей схожа с другими известными широкопористыми химически сшитыми криогелями, образованных в умеренно замороженных средах (как правило, водных) [4, 7, 11, 12].

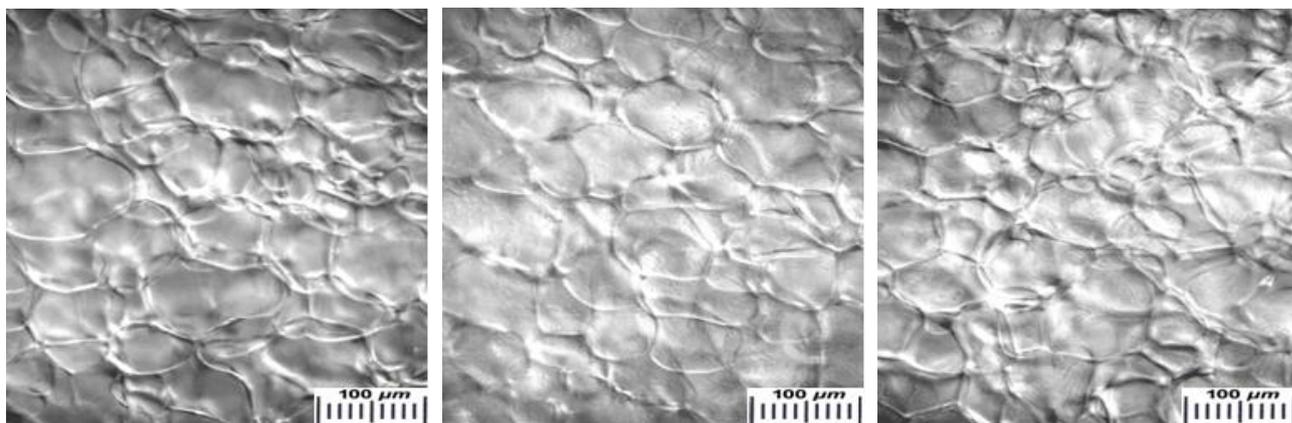


Рисунок 15. Микрофотографии набухших в воде криогелей, сформированных при -15°C (а), -20°C (б) и -25°C (в) (концентрация белков в исходных растворах составляла 50 мг/мл для всех образцов).

Тонкие элементы структуры на микрофотографиях на Рисунке 15 – 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 полученных при различной температуре замораживания криогелей наблюдалась тенденция, что при более низкой температуре криогенной обработки внутри объема криогеля образовывались поры несколько меньшего размера. Эта закономерность известна и для других криогелей [7, 12, 191].

Исходя из данных по выходу гель-фракции (Рисунок 13), характеристикам степени набухания (Рисунок 14) и анализу макропористой структуры криогелей, полученных из белков сыворотки крови (Рисунок 15), 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 .

3.2.3. Белковый состав криогелей

Полученные результаты (разделы 3.2.1–3.2.3) 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 [7]. Он является основным компонентом по массе среди белков сыворотки [192], 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 входят в состав полимерной сетки соответствующих криогелей, мы проанализировали с помощью метода гель-электрофореза их состав после растворения в среде додецилсульфат/натрия дитиотреит. Полученные результаты показаны на Рисунке 16 в виде электрофореграммы в полиакриламидном геле.

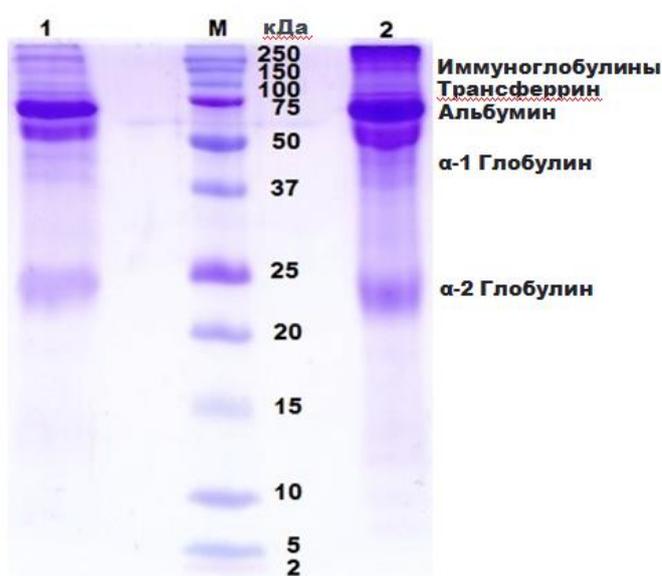


Рисунок 16. Электрофореграмма препарата, полученного в результате растворения белкового криогеля в растворе ДДС-На и ДТТ (дорожка 1), сыворотки крови (дорожка 2) и молекулярных маркеров (дорожка М), внесённых в ПААГ гель. Образцы 1 и 2 содержали 10 мкг белков.

Криогель был приготовлен на основе разбавленной сыворотки крови КРС с концентрацией белка 50 мг/мл, с использованием мочевины (1,5 моль/л) и цистеина (0,01 моль/л) при температуре замораживания -15°C . Известно, что в составе сыворотки крови содержится много различных белков, основная часть которых – альбумины; в несколько раз меньше различных глобулинов; остальные белковые компоненты присутствуют в минорных фракциях [193-195]. В зависимости от источника сыворотки, т.е. типа организма донора, его возраста и

состояния здоровья, соотношение фракций варьируется. Это касается также и количества изоформ конкретных белков. Например, на Рисунке 15 на дорожках 1 и 2, присутствуют две фракции сывороточного альбумина. Такая электрофореграмма характерна для крови млекопитающих, страдающих бисальбуминемическим расстройством [196]. Было 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. Конечно, на Рисунке 15 представлены качественные данные, тем не менее, эта электрофореграмма свидетельствует об общем механизме участия глобулярных белков сыворотки в образовании полимерных сетей за счёт сшивания дисульфидными связями в белковых криогелях. 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.

3.2.4. Выделение и очистка белково-пептидного биорегулятора ткани склеры КРС

Для выделения БПБ из ткани склеры глаза быка была применена методика, ранее разработанная для исследования биорегуляторов данной группы из различных тканей млекопитающих [167], которая включает экстракцию ткани склеры раствором состава: 1 мМ CaCl_2 , 0,15 М NaCl , 1,0 мМ HEPES при 4°C , осаждение в насыщенном растворе сернокислого аммония и разделение фракций на обращенной фазе ВЭЖХ.

После разделения фракции супернатанта на хроматографической колонке в градиенте вода-ацетонитрил была получена фракция со временем удерживания 44 мин (Рисунок 17).

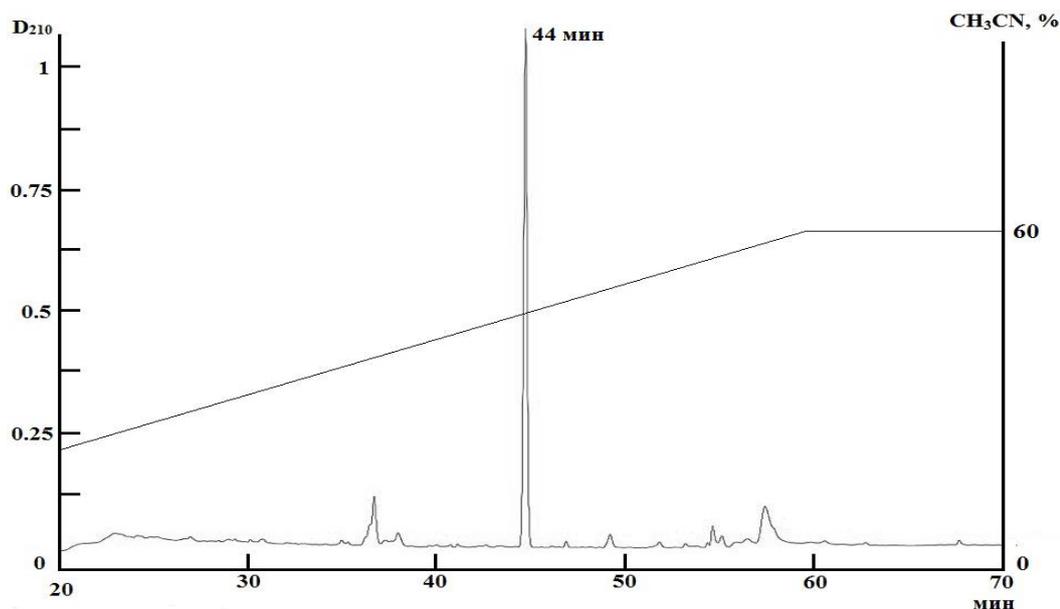


Рисунок 17. Хроматограмма фракции супернатанта тканевого экстракта склеры КРС. По оси абсцисс – время элюции (мин), по оси ординат – оптическая плотность при длине волны 210 нм.

Анализ методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в тех же условиях растворившегося осадка показал присутствие фракции со временем удерживания 53 мин, которая, как предполагалось, является белково-пептидным биорегулятором (Рисунок 18).

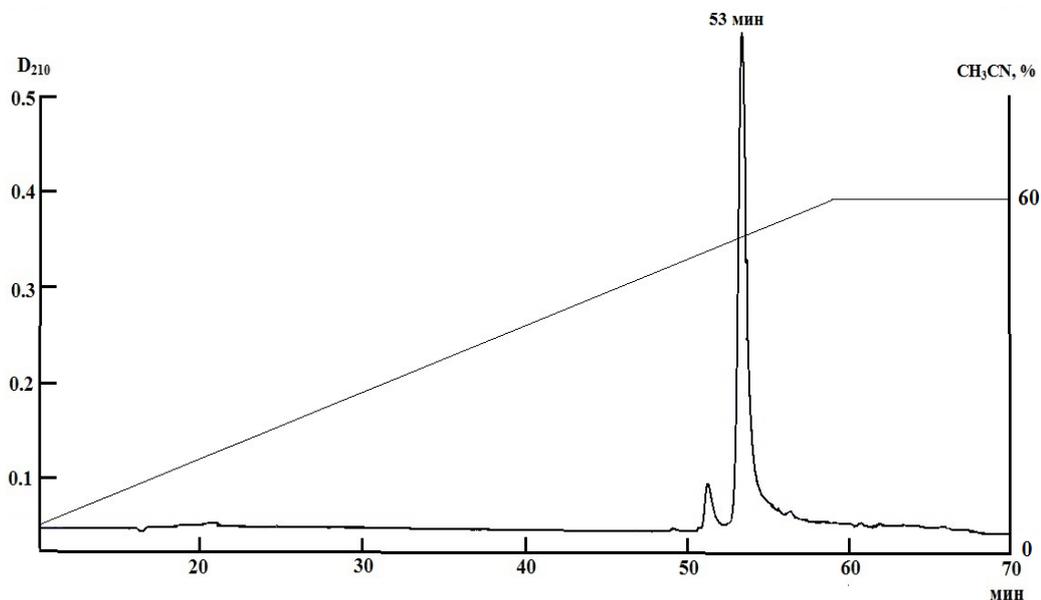


Рисунок 18. Хроматограмма растворившегося осадка тканевого экстракта КРС. По оси абсцисс - время элюции (мин), по оси ординат - оптическая плотность при длине волны 210 нм.

Таким образом, нами были получены высокоочищенные фракции, которые далее были протестированы биологически.

3.2.5. Изучение специфической активности белково-пептидного биорегулятора, выделенного из ткани склеры КРС

Известно, что БПБ оказывают протекторное действие на ткань в условиях культивирования *in vitro*, которая выражается в поддержании адгезионных межклеточных взаимодействий, а также увеличения жизнеспособности клеток [166, 167]. Специфическая биологическая активность обеих ВЭЖХ-фракций была изучена совместно с н.с. ИНЭОС РАН к.б.н. Красновым М.С. на ранее разработанной модели культивирования заднего отдела глаза тритона *P. waltl* [171].

Добавление в среду культивирования раствора биорегулятора (Рисунок 18) с концентрацией белка 10^{-7} мг/мл способствовало сохранению пространственной организации тканей заднего отдела глаза (Рисунок 19). Это выражалось в поддержании взаимодействия между сосудистой и склеральной оболочками, причем в пределах хороида можно отметить сохранение компактных адгезивных взаимодействий. Монослой пигментного эпителия также находился в лучшем состоянии по сравнению с контролем: пигмент распределен равномерно в клетках, между клетками сохранялись адгезивные взаимодействия. В склере наблюдали более компактное и плотное расположение волокон с менее заметными расслоениями, чем в контроле. Фибробласты в склере также выглядели более жизнеспособными, судя по морфологии их ядер (Рисунок 19б).

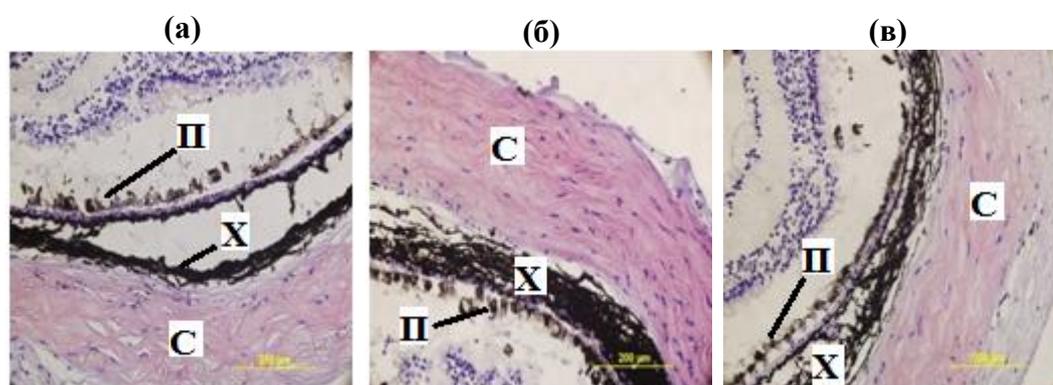


Рисунок 19. Влияние ВЭЖХ-фракций, выделенных из тканевого экстракта склеры глаза быка, на состояние тканей заднего отдела глаза тритона *Pl. waltl* при органотипическом культивировании: **а** – контроль; **б** – с добавлением в среду

фракции БПБ (Рисунок 18); **в** – с добавлением ВЭЖХ-фракции с временем удерживания 44 мин (Рисунок 17). С – склера; Х – хороид; П – пигментный эпителий. Увеличение $\sim \times 10, \times 20$.

Подсчет фибробластов в ткани склеры культур опытной и контрольной серий показал, что при воздействии биорегулятора количество жизнеспособных фибробластов приблизительно в 2,5 раза больше, чем в контроле (Рисунок 20). В этом исследовании ВЭЖХ-фракция с временем удерживания 44 мин не оказывала влияние на ткани заднего сектора глаза тритона в условиях органотипического культивирования *in vitro* (Рисунок 19в). Это подтверждается показателем, отражающим количество жизнеспособных фибробластов в ткани склеры при воздействии данной фракции, он был существенно ниже значения параметра, оцениваемого при воздействии биорегулятора, хотя и статистически достоверно отличался от значения такового в контрольной серии (Рисунок 20). Следует также отметить, что при воздействии данной фракции в тканях наблюдали нарушение адгезивных взаимодействий между склерой, хороидом и пигментного эпителия, что также свидетельствует о её менее выраженном протекторном действии.

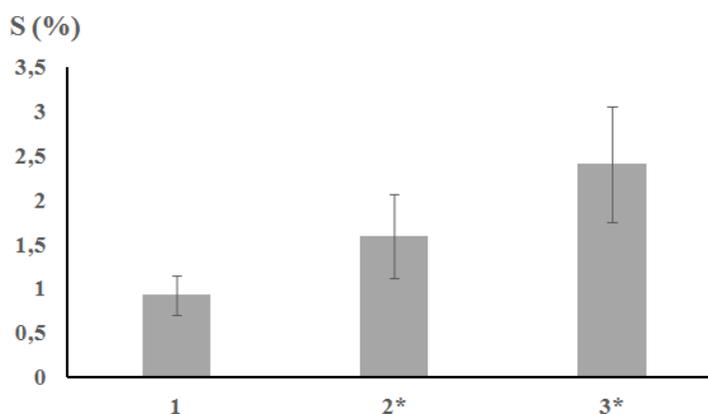


Рисунок 20. Количество фибробластов в ткани склеры глаза тритона *Pl. walatl.* при органотипическом культивировании заднего сектора глаза *in vitro*. На оси абсцисс – название экспериментальных серий: 1 – контроль; 2 – с добавлением в среду белково-пептидного биорегулятора (Рисунок 18); 3 – с добавлением ВЭЖХ-фракции с временем удерживания 44 мин. (Рисунок 17). На оси ординат – S-параметр, отражающий площадь фибробластов в ткани склеры относительно общей площади гистологического среза в %. *-достоверное отличие ($p < 0,05$).

Полученные результаты хорошо согласуются с результатами исследования биорегуляторов, выделенных из других тканей животных [178, 179], а конкретно

БПБ, выделенный из ткани склеры сохранял между клетками адгезивные взаимодействия и препятствовал развитию дегенеративных процессов в склеральной оболочке.

3.2.6. Изучение состава белково-пептидного биорегулятора, выделенного из ткани склеры КРС

Как было показано ранее, белково-пептидные биорегуляторы имеют сложный состав, основой является пептидно-белковый комплекс, в состав которого входят биологически активные пептиды и белок, модулирующий их биологическое действие [178, 179].

Полученная после ВЭЖХ фракция биорегулятора была исследована методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Согласно данным масс-спектрометрического анализа изучаемая фракция включала белок, с молекулярной массой 66387 Да (Рисунок 21).

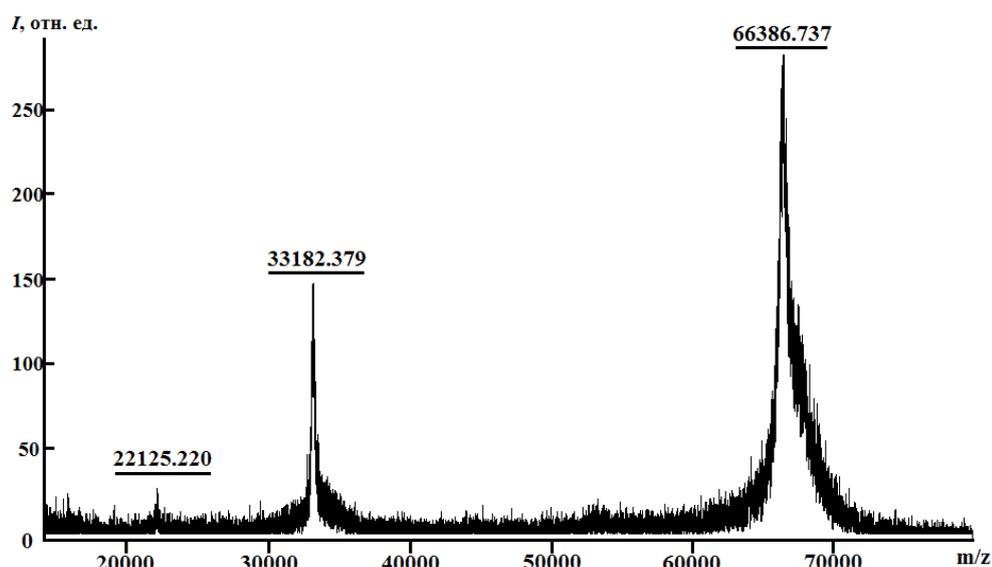


Рисунок 21. MALDI-TOF масс-спектр фракции БПБ, полученного после проведения ВЭЖХ (Рисунок 18).

При секвенировании данного белка по методу Эдмана (совместно с сотрудниками лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) была установлена *N*-концевая аминокислотная последовательность этого белка (15 а.о.): DTHKSEIAHRFKDLG-. Она была идентична *N*-концевой аминокислотной

последовательности изоформы молекулы бычьего сывороточного альбумина, входящим, как было показано ранее, в состав биорегулятора и являющимся белком-модулятором [178, 179].

Далее для изучения состава БПБ применялся метод электрофореза в ПААГ по Лэммли. Окрашивание геля с помощью Кумасси показало наличие полосы, содержащей белок с молекулярной массой около 66000 Да (Рисунок 22). Фрагмент полосы вырезали из геля и проводили *in situ* гидролиз белка трипсином. Продукты гидролиза экстрагировали из геля и анализировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Полученные значения молекулярных масс ионов пептидов идентифицировали при помощи программного пакета Mascot. Поиск проводили по данным масс-спектров в базе данных NCBI среди белков всех организмов и, в частности, белков, обнаруженных у *B. taurus* с указанием типа гидролиза – трипсин. Было установлено, что пептиды, полученные в результате триптического гидролиза, являются фрагментами изоформы сывороточного альбумина *B. taurus* (под номером gi | 1351907 в базе данных Uniprot).

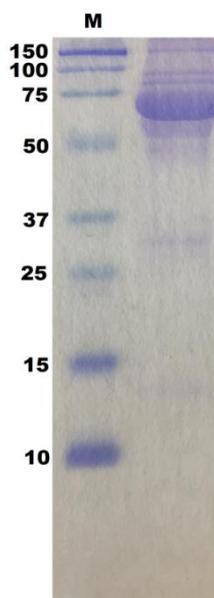


Рисунок 22. Электрофореграмма фракции БПБ и молекулярных маркеров (дорожка М), внесённых в ПААГ гель. Образец содержал 10 мкг белка.

Для идентификации пептидов БПБ ВЭЖХ-очищенную фракцию биорегулятора (Рисунок 18), обрабатывали денатурирующими агентами: гуанидин гидрохлоридом, этилендиаминтетрауксусной кислотой и этанолом.

После хроматографического разделения в градиенте вода-ацетонитрил показано, что в результате денатурирующего воздействия от исследуемой фракции отделяются другие ее компоненты со временем удерживания 33 и 34 мин (Рисунок 23).

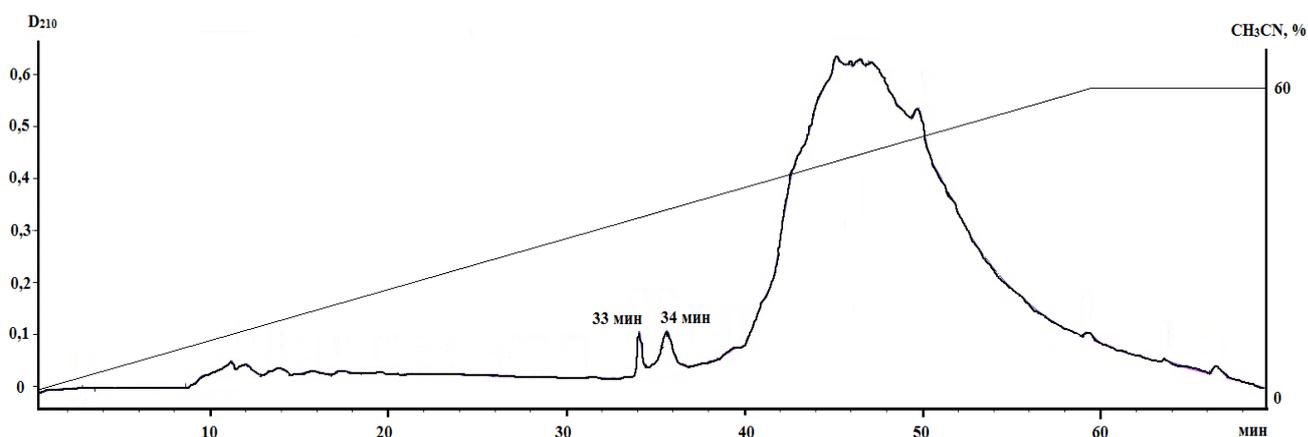


Рисунок 23. Хроматограмма БПБ, после обработки его денатурирующими агентами. По оси абсцисс - время элюции (мин), по оси ординат - оптическая плотность при длине волны 210 нм.

Масс-спектрометрический анализ фракции со временем удержания 33 мин показал наличие в её составе ряда пептидов с молекулярными массами 1300-5080 Да (Рисунок 24).

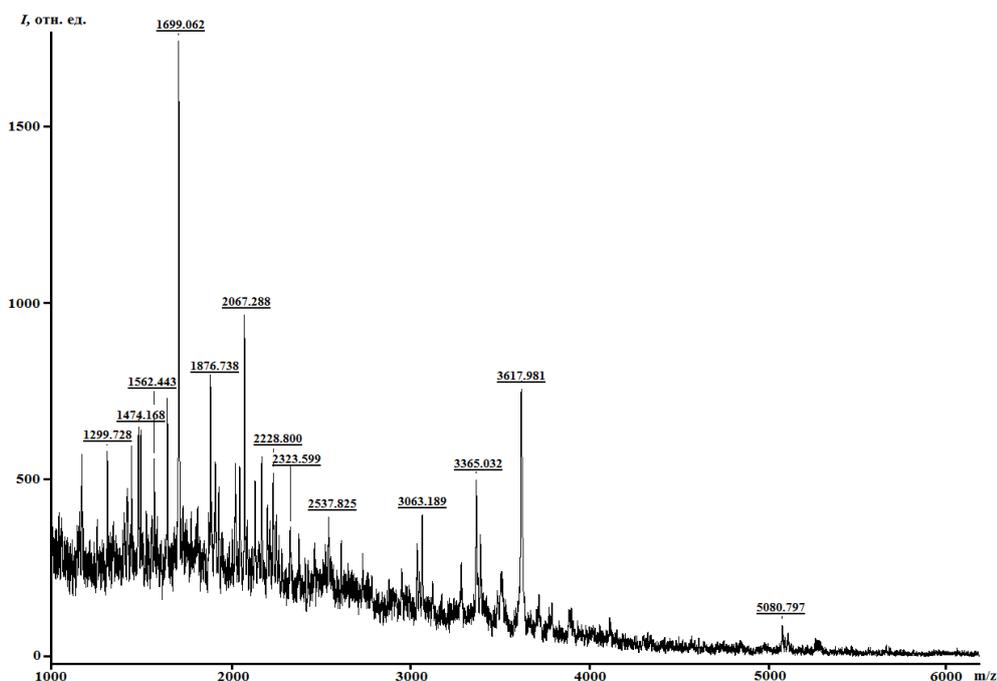


Рисунок 24. MALDI-TOF масс-спектр фракции пептидов, входящих в состав БПБ.

Анализ полученных результатов свидетельствует, что в результате действия на ВЭЖХ-фракцию белково-пептидного биорегулятора дезагрегирующих агентов произошло нарушение белково-пептидного комплекса с отделением фракции пептидов. Восстановить данный комплекс оказалось невозможным из-за денатурации сывороточного альбумина, произошедшей после воздействия дезагрегирующих агентов. Таким образом, полученные результаты показывают, что ВЭЖХ-фракция БПБ, проявляющая свойства и активность, характерные для биорегуляторов данной группы, представляет собой пептидно-белковый комплекс, который является основой биорегулятора, выделенного из ткани склеры глаза быка.

3.2.7. Некоторые физико-химические свойства белково-пептидного биорегулятора

Для определения содержания элементов вторичной структуры БПБ были использованы методы УФ- и КД-спектроскопии. На рисунке 25 приведен УФ-спектр поглощения белково-пептидного биорегулятора в области длин волн 240-320 нм. Он характеризуется минимумом при 225 и максимумом при 276 нм, а также четко выраженным перегибом в области 290 нм.

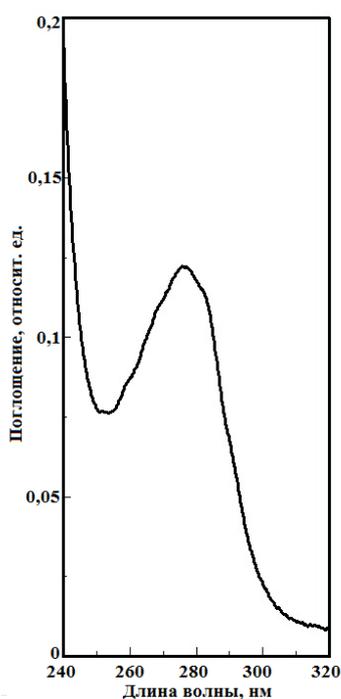


Рисунок 25. УФ-спектр поглощения БПБ (100 мкг/мл) в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2 в области 240-320 нм.

Эти данные, а также присутствие во второй производной УФ-спектра биорегулятора (Рисунок 26) отрицательной полосы поглощения при 292 и положительной при 296 нм, характерных для остатков триптофана [197], указывает на наличие остатков этой аминокислоты в составе БПБ. Отрицательные полосы при 283 нм и две положительные – 279 нм и 288 нм, свидетельствует о наличии в структуре биорегулятора 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 [197]. Эти полосы соответствуют второй производной УФ-спектра поглощения раствора альбумина [198].

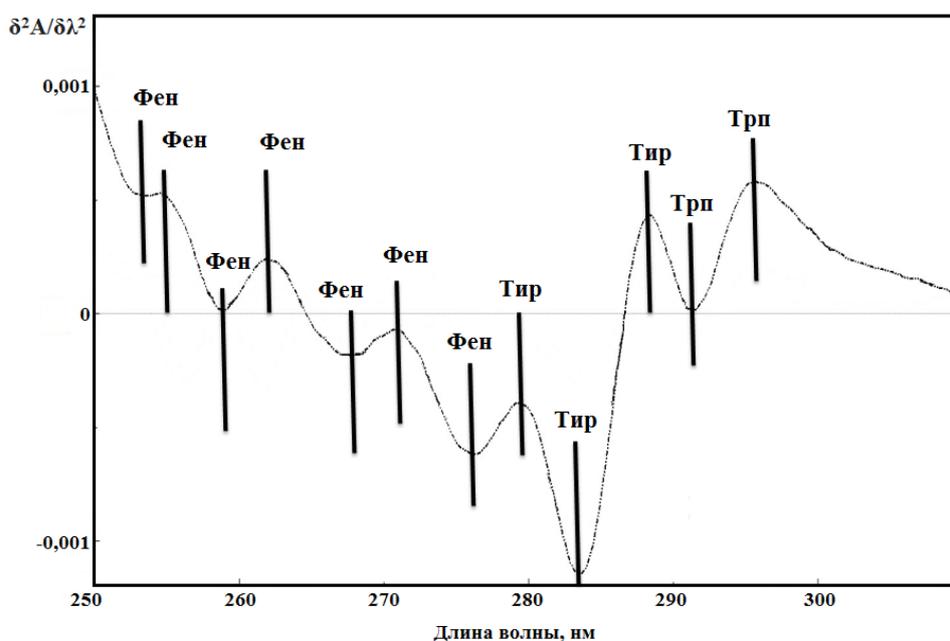


Рисунок 26. Вторая производная УФ-спектра поглощения БПБ в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2. Концентрация раствора 100 мкг/мл

КД-спектр в УФ-области 240-340 нм – то есть, в области поглощения ароматических хромофоров и дисульфидных связей (Рисунок 27), является также характерным для молекулы альбумина и имеет тонкую структуру с двумя полосами при 262 и 269 нм, относящихся к остаткам фенилаланина, и с полосами при 282 и 288 нм, относящимся к остаткам тирозина и триптофана, соответственно. В КД-спектре биорегулятора присутствует отрицательная полоса

высокой эллиптичности при 242 нм, которая относится к боковым ароматическим группам аминокислотных звеньев белковой молекулы [199].

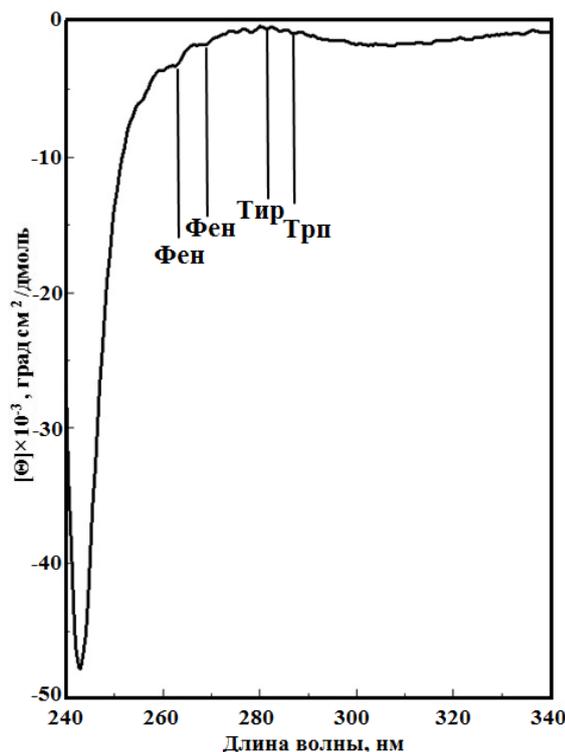


Рисунок 27. КД-спектр БПБ (100 мкг/мл) в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2 в области 240-340 нм.

КД-спектр БПБ в УФ-области от 190 до 260 нм – области поглощения пептидных связей (Рисунок 28, тонкая линия), характеризуется наличием двух экстремумов при 208 и 222 нм и максимумом в области 190-195 нм и что является характерным для α -спиралей белков [200].

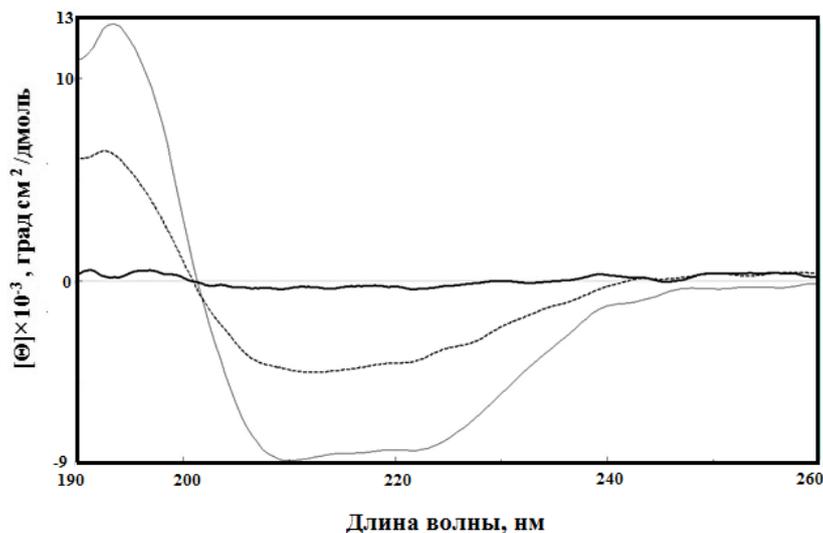


Рисунок 28. КД-спектры БПБ 100 мкг/мл в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2 (тонкая линия) и БПБ после обработки гуанидин гидрохлоридом и разделения

на ВЭЖХ – фракция, содержащая пептиды (толстая линия) и фракция содержащая альбумин (пунктирная линия) в области 240-340 нм.

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). Эти данные согласуются с результатами исследования белка-инактиватора, полученного ранее из сыворотки крови КРС (48% α -спиралей и 21% β -структуры) [179].

Таблица 1. Содержание элементов вторичной структуры белково-пептидного биорегулятора

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

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 (Рисунок 23). 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 (Таблица 1). Аналогичная ситуация наблюдалась при изучении вторичной структуры раствора сывороточного альбумина в работе [201], то есть

высокое содержание α -спиралей во вторичной структуре альбумина является критерием стабильности молекулы.

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

Изменения во вторичной и третичной структуре белков непосредственно связаны с их биологической активностью и функциями [211]. Это обуславливает актуальность исследования фазовых превращений в биополимерах, которые позволяют понять механизм их активности. Характерным примером фазовых превращений в белках является денатурация, то есть утрата нативного состояния молекулы белка при воздействии на нее таких факторов, как температура, давление и тд. Для выяснения особенностей температурной денатурацией БПБ, выделенного из ткани склеры были использованы методы оптические спектроскопии и динамического светорассеивания.

При нагревании раствора биорегулятора от 20°C до 60°C эллиптичность отрицательных полос в КД-спектрах в области 240-290 нм снижалась незначительно. Повышение температуры до 70°C приводило к «сглаживанию» тонкой структуры спектра в области поглощения ароматических аминокислотных остатков. Процесс «плавления» третичной структуры комплекса начинается только при температуре 80°C. Нагревание раствора до 100°C приводит почти к полному сглаживанию полосы при 242 нм, относящейся к боковым ароматическим аминокислотным остаткам (Рисунок 29). То есть при нагревании происходит изменение окружающей среды ароматических аминокислотных остатков БПБ.

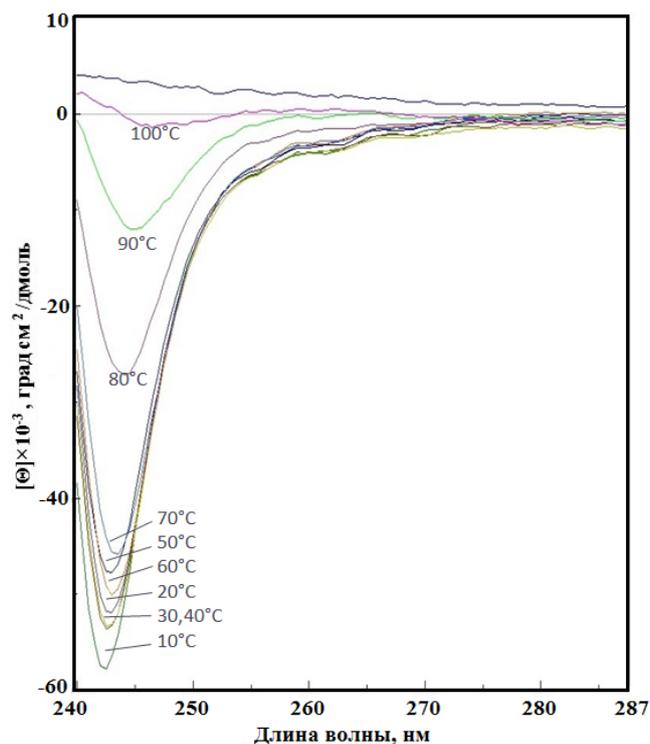


Рисунок 29. КД-спектр БПБ (100 мкг/мл) в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2 в области 240-290 нм после термической обработки.

Одновременно с «плавлением» третичной структуры белково-пептидного биорегулятора ткани склеры при повышении температуры происходило изменение вторичной структуры молекулы, что подтверждается КД-спектрами в области поглощения пептидных связей (Рисунок 30). При нагревании раствора биорегулятора в диапазоне температур 20-60°C особых изменений не наблюдается и только после 70°C происходит конформационный переход исследуемой фракции, а при 80°C и выше приобретает денатурированное устойчивое конформационное состояние.

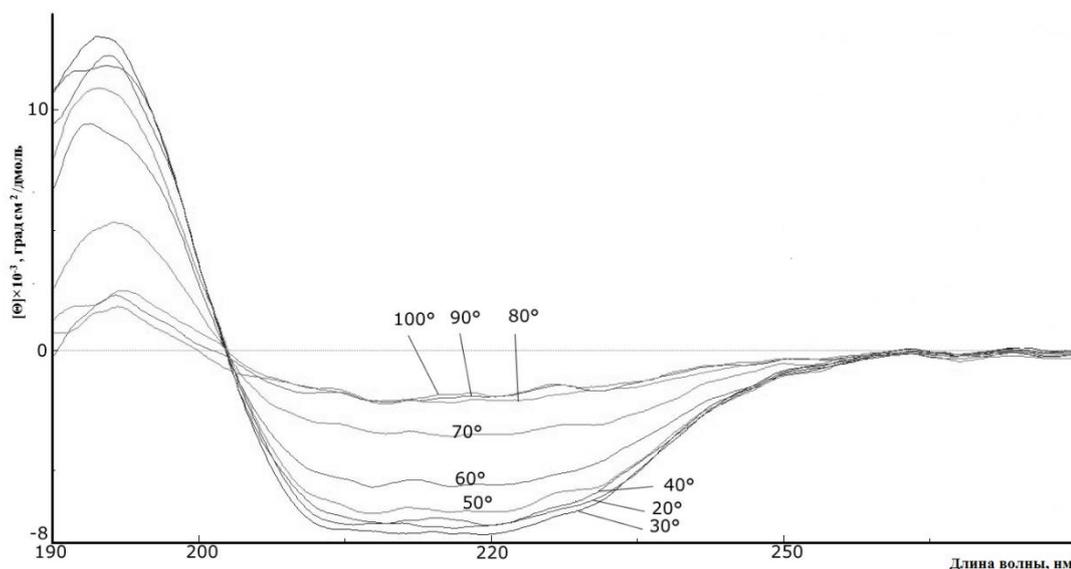


Рисунок 30. КД-спектр БПБ (100 мкг/мл) в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2 в области 190-260 нм после термической обработки.

Для оценки термостабильности биорегулятора была определена точка конформационного перехода при 222 нм (Рисунок 31). Установлено, что точка температурного перехода для белково-пептидного биорегулятора из ткани склеры находится около 65°C. Полученные результаты согласуются с данными, полученными по изучению термической агрегации нативного БСА [202, 203].

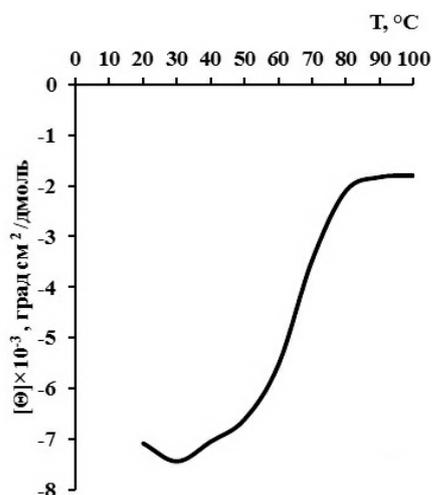


Рисунок 31. Зависимость эллиптичности при 222 нм БПБ ткани склеры от температуры.

Также для биорегулятора ткани склеры были рассчитаны элементы вторичной структуры при различной температуре (Таблица 2). Из данных таблицы следует, что вторичная структура БПБ при 70-100°C отличается от

нативной структуры молекулы меньшим содержанием α -спиралей и большим – статического клубка и β -структур.

Таблица 2. Содержание элементов вторичной структуры белково-пептидного биорегулятора при различных температурах

Температура	α -спирали, %	β -листы, %	β -изгиб, %	Статический клубок, %
20°C	47,3±0,8	14,6±0,2	10,5±0,2	27,6±0,5
30°C	48,7±0,8	13,8±0,2	10,5±0,2	27,0±0,5
40°C	46,7±0,8	14,8±0,3	10,6±0,2	27,9±0,5
50°C	44,8±0,8	15,7±0,3	10,7±0,2	28,8±0,5
60°C	40,1±0,7	18,5±0,3	11,0±0,2	30,4±0,5
70°C	30,8±0,5	24,0±0,4	11,6±0,2	33,6±0,6
80°C	22,2±0,4	29,7±0,5	12,0±0,2	36,1±0,6
90°C	21,4±0,4	30,1±0,5	12,2±0,2	36,3±0,6
100°C	19,3±0,3	30,7±0,5	12,2±0,2	37,8±0,6

Согласно расчетным данным, вторичная структура обработанного химическими реагентами и отделенного от пептидов изоформы альбумина БПБ (Таблица 1) практически идентична по содержанию элементов в структуре биорегулятора, прогретого до 80°C и выше (Таблица 2). Это подтверждает наше предположение, что входящие в состав БПБ пептиды являются своего рода природным стабилизатором конформационной структуры изоформы альбумина в белково-пептидном биорегуляторе ткани склеры.

Наряду с конформационной термостабильностью белково-пептидного биорегулятора ткани склеры была изучена его межмолекулярная ассоциация с помощью метода динамического светорассеяния. Данные, полученные при измерении гидродинамического радиуса (R_h) частиц, присутствующих в растворе биорегулятора, приведены в таблице 3. Была проанализирована агрегация БПБ в интервале температур от 20°C до 100°C. Установлено, что в водном растворе биорегулятора присутствуют две группы частиц с размерами – 33,3±9,0 нм и 129,9±32,5 нм. Анализ размера частиц БПБ при разной температуре показал, что они также являются полидисперсными, но их размер при повышении температуры незначительно уменьшается, оставаясь в диапазоне стандартного

отклонения, при том, что интенсивность незначительно, но необратимо падала при каждой температурной точке. В итоге при 100°C интенсивность упала в два раза, а размер гидродинамического радиуса наночастиц был равен $23,8 \pm 2,9$ нм и $108,1 \pm 17,6$ нм.

Таблица 3. Гидродинамический радиус комплекса белково-пептидного биорегулятора ткани склеры при различных температурах

Температура	Интенсивность при нагревании, кГц	Гидродинамический радиус (R_h), нм	Интенсивность после нагревания и охлаждения до 20°C, кГц	Гидродинамический радиус (R_h) после нагревания и охлаждения до 20°C, нм
20°C	179	$33,3 \pm 9,0$ $129,9 \pm 32,5$		
30°C	174	$27,5 \pm 6,9$ $145,4 \pm 33,8$	177	$28,6 \pm 8,9$ $111,8 \pm 36,2$
40°C	168	$21,9 \pm 5,5$ $116,0 \pm 33,5$	176	$33,3 \pm 11,4$ $130,0 \pm 38,8$
50°C	161	$23,2 \pm 5,5$ $122,6 \pm 32,2$	170	$28,6 \pm 7,6$ $111,7 \pm 35,8$
60°C	147	$18,2 \pm 5,3$ $130,2 \pm 37,1$	159	$38,8 \pm 10,4$ $130,2 \pm 34,6$
70°C	137	$21,1 \pm 4,7$ $111,8 \pm 26,5$	145	$28,6 \pm 6,5$ $111,9 \pm 27,3$
80°C	121	$24,8 \pm 5,3$ $131,2 \pm 27,0$	135	$24,6 \pm 5,8$ $96,1 \pm 34,8$
90°C	109	$21,2 \pm 5,1$ $112,2 \pm 28,3$	125	$21,1 \pm 4,3$ $96,0 \pm 20,5$
100°C	77	$23,8 \pm 2,9$ $108,1 \pm 17,6$	98	$13,4 \pm 3,6$ $95,9 \pm 27,9$

Таким образом структура белково-пептидного биорегулятора ткани склеры характеризуется наличием α -спирализованной вторичной структуры с точкой конформационного термоперехода при 65°C. Изоформа молекулы 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).

3.2.9. Влияние белково-пептидного биорегулятора на тепловую ДТТ-индуцированную агрегацию БСА

В процессе фолдинга все белки приобретают уникальную пространственную структуру, определяющую их биологическую активность. Однако под воздействием различных внешних и стрессовых факторов, вызывающих повреждение трехмерной структуры белка и образование развернутых или неправильно свернутых ненативных форм белка, склонных к агрегации, происходит самоассоциация и формирование различных надмолекулярных структур: аморфных агрегатов и фибрилл. Что приводит к патогенному образованию в тканях. Поэтому для поиска, подтверждения и оценки эффективности антиагрегационных препаратов применяются тест-системы на основе агрегации модельных белков. В обзоре [204] авторами сообщалось, что сывороточный альбумин проявляет шапероноподобную активность, а так как одним из компонентов БПБ является изоформа сывороточного альбумина, то нами была изучена способность БПБ ткани склеры ингибировать агрегацию некоторых модельных белков *in vitro*.

Хорошо известно, что дитиотреит восстанавливает S–S-связи до –SH в молекуле БСА вследствие расщепления дисульфидных мостов в глобулах белка [205]. В результате разворачивания α -спиральная структура молекулы БСА переходит в β -структуру [206]. При повышении температуры от 35 до 55°C, число восстановленных дисульфидных связей также возрастает [207]. Для изучения влияния белково-пептидного биорегулятора ткани склеры на агрегацию БСА *in vitro* была выбрана модель агрегации БСА при 50°C в водном растворе 10 мМ ДТТ. Исследование проводилось с помощью метода динамического светорассеяния, который позволяет регистрировать изменения интенсивности рассеянного света и гидродинамического радиуса белковых агрегатов в ходе агрегации. Нами были получены и проанализированы зависимости интенсивности

светорассеяния (Рисунок 32) и гидродинамического радиуса частиц (R_h) от времени агрегации БСА в присутствии БПБ ткани склеры в диапазоне концентраций от 0 до 1 мкг/мл (Рисунок 33).

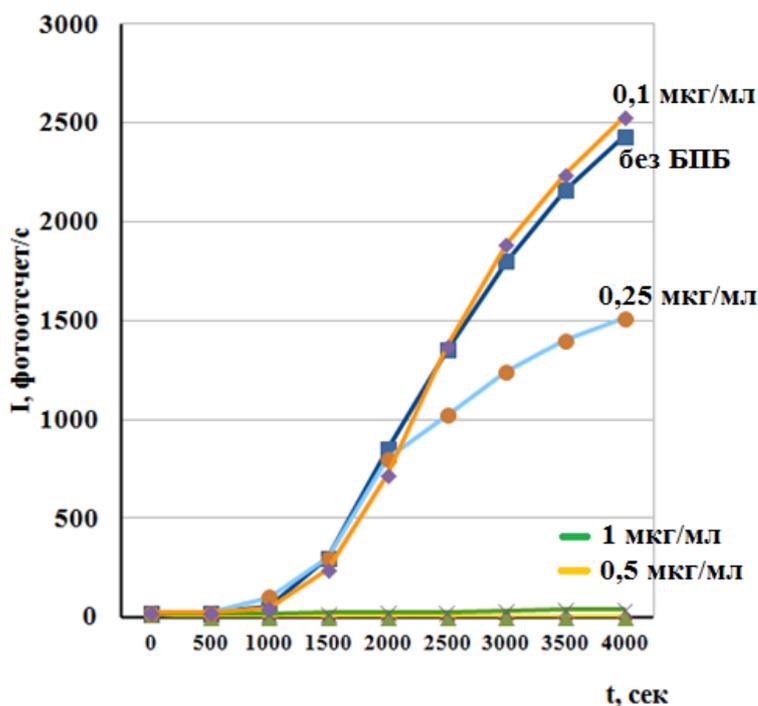


Рисунок 32. Зависимость интенсивности светорассеяния (I) от времени инкубации БСА (100 мкг/мл) в присутствии 10 мМ ДТТ и БПБ ткани склеры в концентрациях 0,1, 0,25, 0,5, 1 мкг/мл.

Как видно, биорегулятор 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. После добавления 0,1 и 0,25 мкг/мл биорегулятора частицы также остаются полидисперсными и значение их гидродинамического радиуса (R_h) остается в диапазоне погрешности относительно раствора БСА без добавления БПБ ткани склеры. При добавлении биорегулятора в концентрации 0,5 мкг/мл к раствору БСА с ДТТ, происходит ингибирование ДТТ-индуцированной агрегации БСА, а значения R_h уменьшаются до 10 ± 2 нм и 90 ± 45 нм (Рисунок 33). И только при добавлении в реакцию смесь 1 мкг/мл биорегулятора ткани склеры происходит 100%-ное ингибирование ДТТ-индуцированной агрегации БСА (Рисунок 32 и 33).

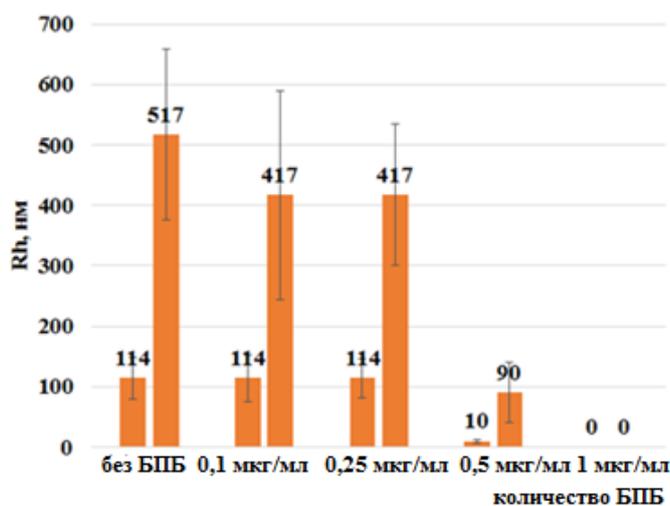


Рисунок 33. Зависимость гидродинамического радиуса (R_h) БСА (100 мкг/мл) в присутствии 10 мМ ДТТ и БПБ ткани склеры в концентрациях 0,1, 0,25, 0,5, 1 мкг/мл.

Влияние белково-пептидного биорегулятора ткани склеры на термическую агрегацию БСА, индуцированную ДТТ, также была изучена методом КД-спектроскопии. На рисунке 34 представлен КД-спектр БСА в УФ-области (190-250 нм) с и без 10 мМ ДТТ после нагревания при 50°C в течение 75 мин. После инкубирования раствора без ДТТ КД-спектр БСА характеризуется наличием двух экстремумов при 208 и 222 нм и максимумом в области 190-195 нм (Рисунок 34, линия 1), что является характерным для белков, состоящих преимущественно из α -спиралей, в нативном состоянии [200]. После нагревания в присутствии ДТТ КД-спектр альбумина характеризуется наличием одного экстремума при 225 нм и незначительным максимумом 190-200 нм (Рисунок 34, 2 линия), что типично для β -структурированных белков и подтверждается расчетами элементов вторичной структуры агрегированной и неагрегированной молекулы БСА (Таблица 4). Спектр раствора БСА без ДТТ, инкубированного в присутствии БПБ (Рисунок 34, 3 линия), практически не отличается от спектра молекулы БСА. Можно предположить, что добавление биорегулятора не изменяет вторичную структуру БСА, что подтверждается расчетами элементов вторичной структуры белка (Таблица 4).

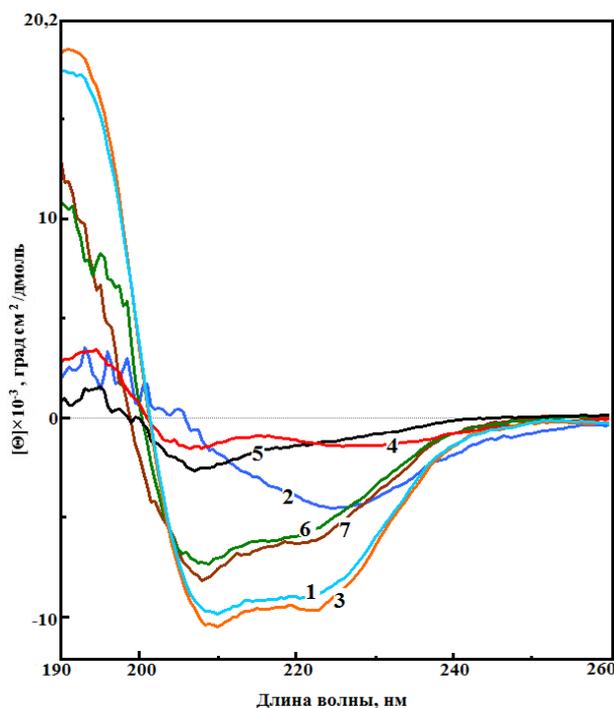


Рисунок 34 Влияние биорегулятора ткани склеры на вторичную структуру БСА. КД-спектр БСА (100 мкг/мл) (линия 1), инкубированного с 10 мМ ДТТ (линия 2), с 1 мкг/мл АСК-53 (линия 3) с 0,1, 0,25, 0,5, 1 мкг/мл БПБ и 10 мМ ДТТ (4 линия, 5 линия, 6 линия, 7 линия).

Инкубация БСА с 10 мМ ДТТ в присутствии 0,1 и 0,25 мкг/мл БПБ ткани склеры оказывают незначительное влияние на вторичную структуру агрегированной молекулы БСА. В КД-спектре БСА в присутствии 0,1 мкг/мл БПБ помимо экстремума при 225 нм появляется экстремум при 206 нм (Рисунок 34, 4 линия), эллиптичность которого увеличивается в присутствии 0,25 мкг/мл БПБ (Рисунок 34, 5 линия). С увеличением концентрации БПБ до 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл (Рисунок 34, 6 и 7 линии, 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, свидетельствуя о частичном разворачивании α -спиральной структуры на начальной стадии белковой денатурации. Эти спектры свидетельствуют о переходном состоянии между преобладающей α -спиралью и полностью развернутой конформацией белковой молекулы. Данное предположение подтверждается расчетами элементов вторичной структуры (Таблица 4).

Таблица 4. Содержание элементов вторичной структуры раствора БСА, инкубированного с/без добавления БПБ ткани склеры и/или 10 мМ ДТТ при 50°С 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

Таким образом, нами 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.

3.2.10. Влияние белково-пептидного биорегулятора на тепловую ДТТ-индуцированную агрегацию лизоцима

В литературе приведено много данных о процессах индукции/ингибирования агрегации лизоцима в различных условиях *in vitro*, что делает лизоцим идеальным модельным белком для исследования механизмов агрегации и фибриллообразования [208], а также для тестирования новых фармакологических препаратов для борьбы с амилоидозами [209]. При изучении влияния pH и температуры на фибриллогенез лизоцима установлено, что для образования фибрилл лизоцима человека и куриного яйца необходимо

повышение температуры до 55–65°C и снижение pH до 2,0–2,5 [210]. Базируясь на этих данных, нами 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 (Рисунок 35) и величины гидродинамического радиуса (R_h) от времени агрегации лизоцима в присутствии белково-пептидного биорегулятора ткани склеры в диапазоне его концентраций от 0 до 10 мкг/мл (Рисунок 36). После добавления к реакционному раствору 0,1 мкг/мл БПБ ткани склеры размер частиц агрегированного лизоцима остается без изменений, а в присутствии 1 мкг/мл и 5 мкг/мл БПБ гидродинамический радиус частиц уменьшается в два раза. И только при добавлении в реакционную смесь 10 мкг/мл биорегулятора ткани склеры происходит 100%-ное ингибирование ДТТ-индуцированной агрегации лизоцима (Рисунок 35, 36).

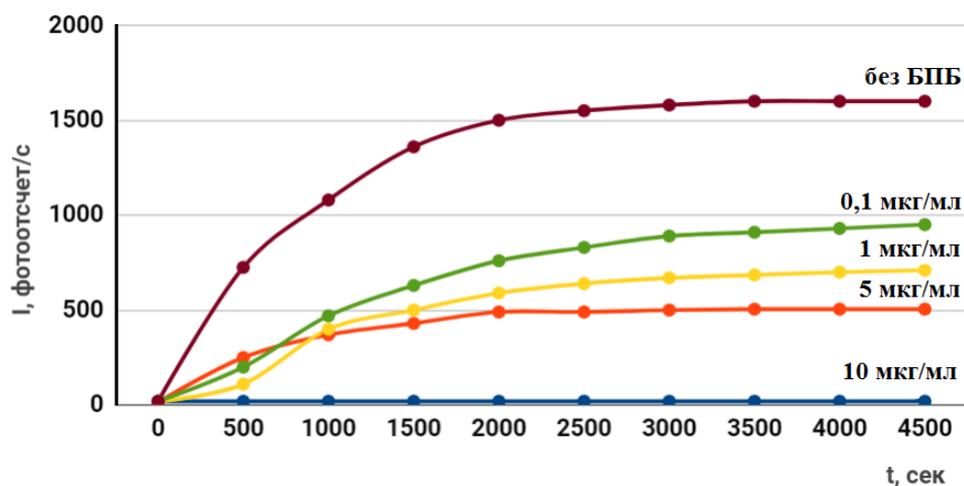


Рисунок 35. Зависимость интенсивности светорассеяния (I) от времени инкубации лизоцима (100 мкг/мл) в присутствии 0,5 мМ ДТТ и БПБ ткани склеры в концентрациях 0,1, 1, 5, 10 мкг/мл.

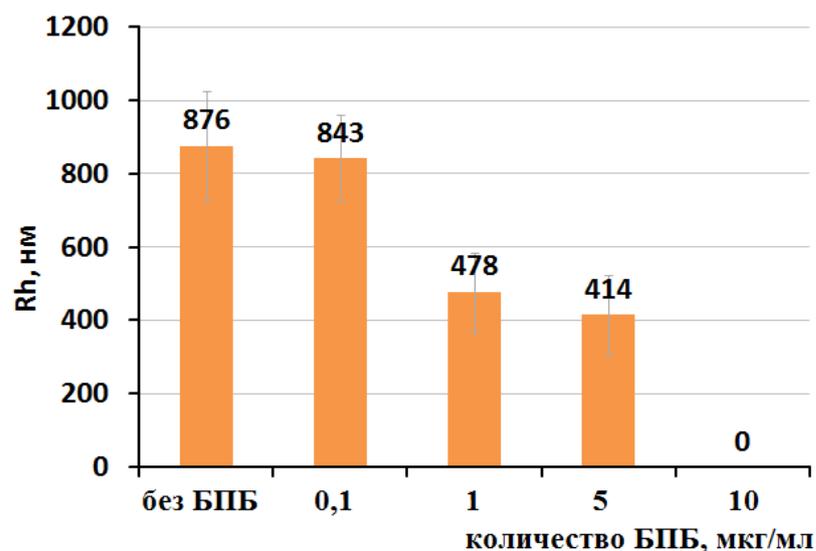


Рисунок 36. Зависимость гидродинамического радиуса (R_h) частиц лизоцима (100 мкг/мл) в присутствии 0,5 мМ ДТТ и БПБ ткани склеры в концентрациях 0,1, 1, 5, 10 мкг/мл.

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 (Рисунок 37, 1 линия). Нагревание лизоцима в присутствии ДТТ в боратном буфере pH 9,0 приводит к уменьшению в полтора раза показателей отрицательной эллиптичности в области 208-222 нм и более чем в два раза – в области 190-195 нм (Рисунок 37, 2 линия). Спектр лизоцима без ДТТ в присутствии БПБ ткани склеры в боратном буфере pH 9,0 аналогичен КД-спектру нативного лизоцима, что свидетельствует о том, что добавление БПБ без агрегирующих агентов не влияет на структуру лизоцима (Рисунок 37, 3 линия).

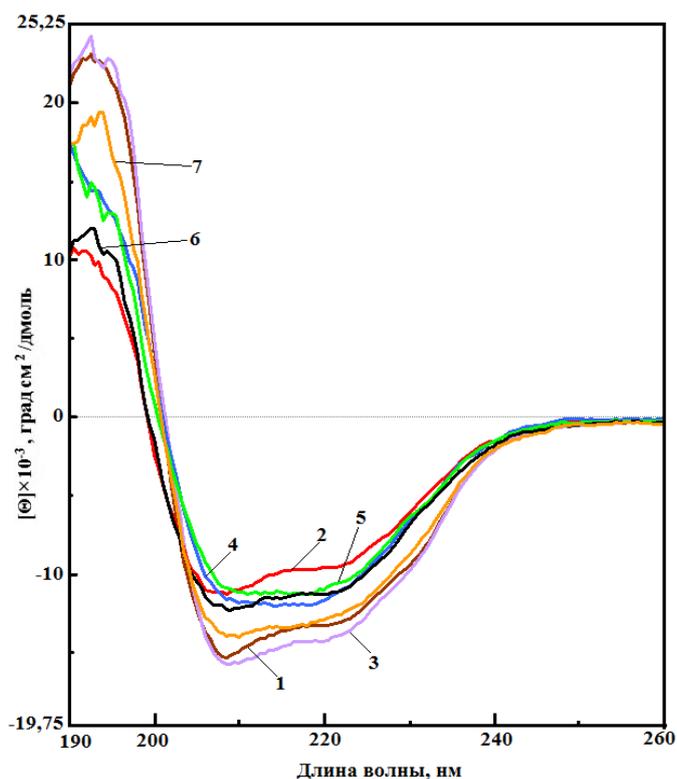


Рисунок 37. Влияние БПБ ткани склеры на вторичную структуру лизоцима. КД-спектр лизоцима (100 мкг/мл) (1 линия), инкубированного с 0,5 мМ ДТТ (2 линия) или с 10 мкг/мл БПБ (3 линия), или 0,1, 1, 5, 10 мкг/мл БПБ и 0,5 мМ ДТТ (4 линия, 5 линия, 6 линия, 7 линия).

КД-спектр проинкубированного лизоцима с 0,5 мМ ДТТ в присутствии 10 мкг/мл БПБ ткани склеры в боратном буфере рН 9,0 (Рисунок 37, 7 линия) почти совпадает со спектром прогретого лизоцима в боратном буфере (Рисунок 37, 1 линия) лишь с незначительным уменьшением эллиптичности при 222 нм. Тогда как КД-спектр проинкубированного лизоцима с 0,5 мМ ДТТ в присутствии 5 мкг/мл БПБ (Рисунок 37, 6 линия) приближен по значениям к КД-спектру агрегированного лизоцима. КД-спектры инкубированного лизоцима с 0,5 мМ ДТТ с добавлением 0,1 и 1 мкг/мл БПБ ткани склеры (Рисунок 37, 4 и 5 линии, соответственно) приобретают «сглаженный» вид в области 208-222 нм, хотя значения эллиптичности в этой области приближены к КД-спектру проинкубированного лизоцима с 0,5 мМ ДТТ в присутствии 5 мкг/мл БПБ (Рисунок 37, 6 линия), что свидетельствует о переходном этапе между агрегированными и нативными молекулами лизоцима под воздействием биорегулятора. Расчёты элементов вторичной структуры (Таблица 5) показывают,

что ни образование ДТТ-инициированных агрегатов лизоцима, ни ингибирование агрегации лизоцима с помощью белково-пептидного биорегулятора ткани склеры не приводит к каким-либо существенным изменениям в содержание элементов вторичной структуры молекулы лизоцима.

Таблица 5. Содержание элементов вторичной структуры раствора лизоцима, инкубированного с/без БПБ ткани склеры и/или 0,5 мМ ДТТ в боратном буфере рН 9,0 при 50 °С в течение 75 минут.

Образец	α -спирали, %	β -листы, %	β -изгиб, %	Статический клубок, %
Лизоцим	19,5±0,4	31,9±0,6	12,5±0,2	36,1±0,6
Лизоцим +ДТТ	16,9±0,4	33,2±0,6	12,6±0,2	37,3±0,6
Лизоцим +1.5 нМ БПБ	19,4±0,4	32,1±0,6	12,4±0,2	36,1±0,6
Лизоцим+ДТТ +0,1 мкг/мл БПБ	17,1±0,4	33,6±0,6	12,5±0,2	36,8±0,6
Лизоцим+ДТТ +1 мкг/мл БПБ	16,7±0,4	33,7±0,6	12,5±0,2	37,1±0,6
Лизоцим+ДТТ +5 мкг/мл БПБ	17,1±0,4	33,0±0,6	12,5±0,2	37,4±0,6
Лизоцим+ДТТ +10 мкг/мл БПБ	18,9±0,4	32,2±0,6	12,5±0,2	36,4±0,6

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 БСА достигается быстрее за счет сродства со структурой БПБ 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 и репарации поврежденных белковых структур в качестве шаперонов. Поэтому биологическое действие БПБ на травмированные и патологически изменённые ткани можно объяснить, способностью контролировать и/или направлять процесс фолдинга белков.

3.2.11. *In vitro* биотестирование криогелей на основе сыворотки крови в качестве носителя белково-пептидного биорегулятора ткани склеры

В литературном обзоре было описано, что широкопористые белковые криогели могут представлять прикладной биомедицинский интерес в качестве биосовместимых носителей для доставки различных пептидных/белковых биорегуляторов. Для проверки этого положения в отношении криогелей, сформированных из суммы сывороточных белков, мы провели эксперименты по биотестированию, в которых эти губки крови применялись в качестве таких носителей, в качестве биологически-активного вещества был использован белково-пептидный биорегулятор ткани склеры, а в качестве препарата сравнения использовался белково-пептидный биорегулятор сыворотки крови. Способность криогелей доставлять биорегулятор была изучена совместно с н.с. ИНЭОС РАН к.б.н. Красновым М.С. в экспериментах с биологической моделью – культивированием задней части глаза тритона (Рисунок 38). Состояние тканей этого отдела были изучены гистологически.

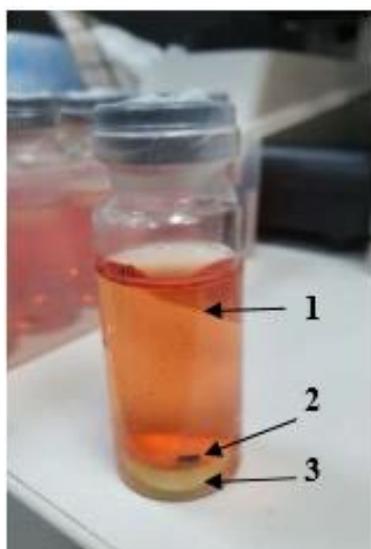
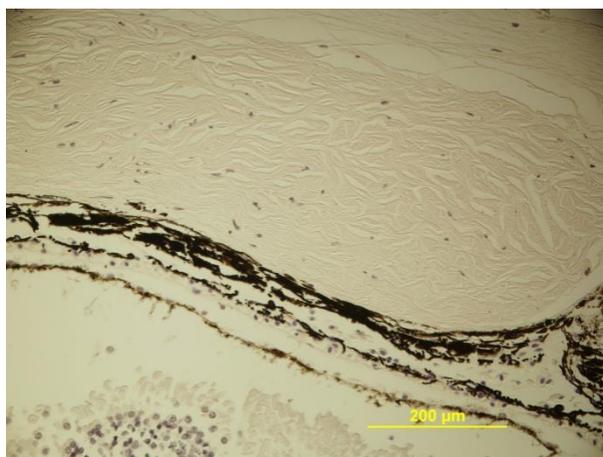


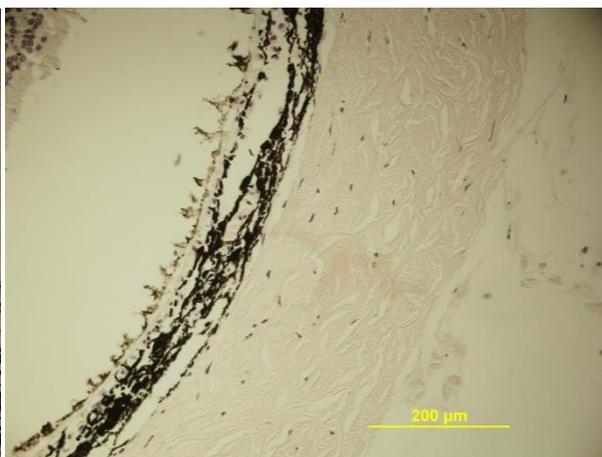
Рисунок 38. Внешний вид флакона, в котором находится модельная система культивирования глазного сегмента (**1** – среда культивирования; **2** – задний сектор глаза; **3** – криогель).

Задние секторы глаз тритона использовали в шести экспериментальных группах, указанных в разделе 3.3.15. После проведения культивирования для каждой группы состояние тканей заднего отдела глаза было проанализировано отдельно.

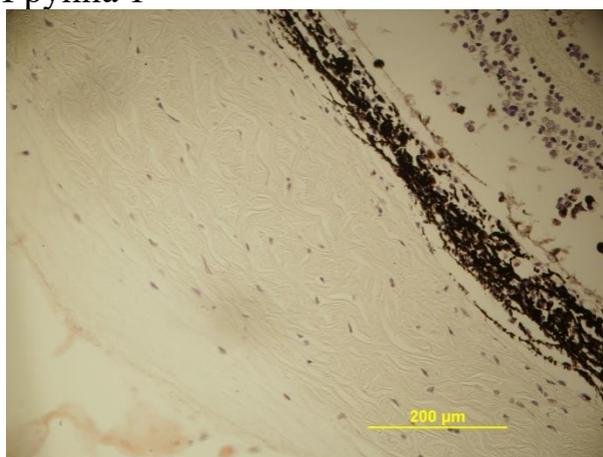
Контрольные образцы в 1 группе, в которой задние секторы глаза тритона инкубировали в бессывороточной культуральной среде без добавления биорегулятора и без подложки в виде криогеля. В этой группе наблюдали отслоение сетчатки от слоя пигментного эпителия, а также отслоение слоя пигментного эпителия от сосудистой оболочки. В самом слое пигментного эпителия пигмент смещался на апикальную сторону, что говорит о нестабильности клеток данного слоя и их дедифференцировке. Также наблюдалась деградация и повреждение нейронов сетчатки. В склеральной оболочке выявлены признаки начала деградации ткани, которые выражаются в расслоении коллагеновых волокон с образованием крупных полостей между ними, а также в уменьшении количества фибробластов на единицу площади (Рисунок 39, 40). Эти данные указывают на процесс начала деградации тканей и клеток заднего отдела глаза при 72-часовом культивировании.



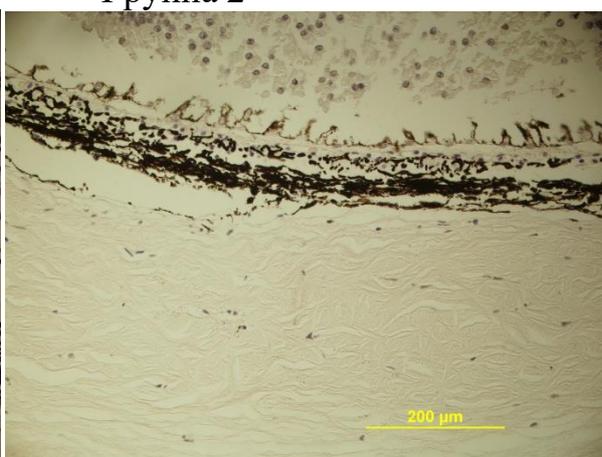
Группа 1



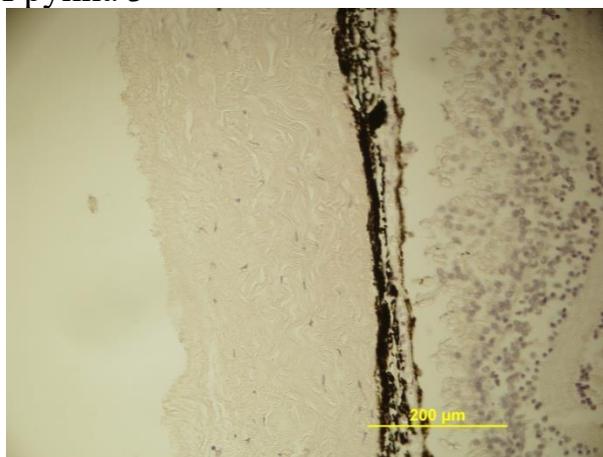
Группа 2



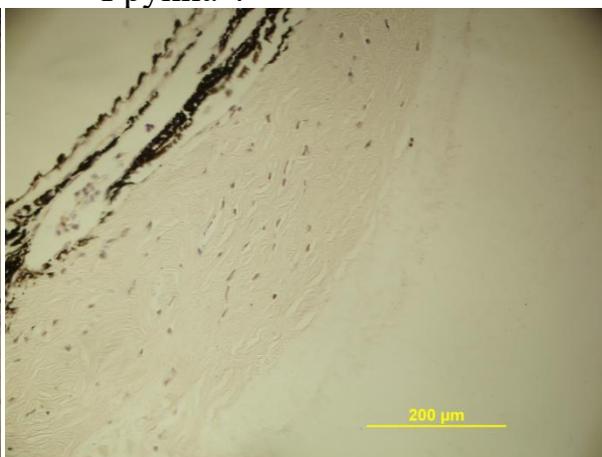
Группа 3



Группа 4



Группа 5



Группа 6.

Рисунок 39. Гистологические микрофотографии поперечных срезов заднего сектора глаза тритона *Pl. waltl* после 72-часового органотипического культивирования, принадлежащие к разным контрольным и экспериментальным группам.

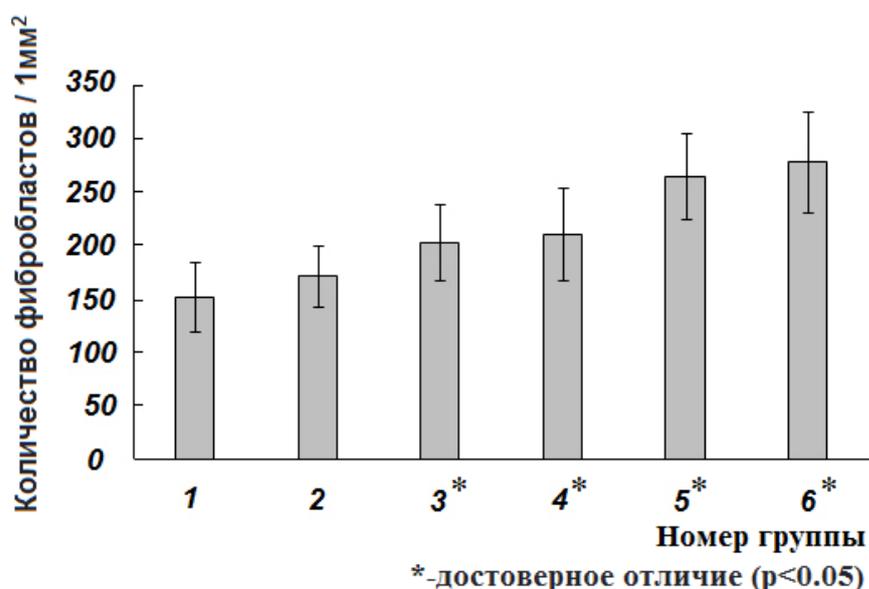


Рисунок 40. Среднее количество фибробластов в ткани склеры глаза тритона после 72-часового органотипического культивирования, принадлежащих к разным контрольным и экспериментальным группам.

При культивировании задних отделов глаза на ненагруженных криогелях без добавления каких-либо факторов (группа 2) наблюдали несколько лучшую картину, чем в группе 1. Хотя происходило отслоение сетчатки от пигментного эпителия, но отростки фоторецепторных клеток и другие нейроны сетчатки были менее повреждены, чем в первом контроле. Пигмент в слое пигментного эпителия также имел тенденцию к смещению на апикальную сторону, но не так выражено, как в группе 1. Сосудистая оболочка плотная. В склеральной оболочке наблюдались элементы деградации ткани, выражающиеся в расслоении коллагеновых волокон и образования полостей, а также в уменьшении количества фибробластов на единицу площади (Рисунок 39, 40).

В том случае, когда задние сектора глаза тритона инкубировали в культуральной среде с добавлением в среду белково-пептидного биорегулятора из сыворотки крови (группа 3) также наблюдалось отслоение сетчатки от пигментного эпителия и смещение пигмента в слое пигментного эпителия на апикальную сторону. Сосудистая оболочка плотная, без признаков повреждения. Деградация ткани склеры выявлена в меньшей степени, чем в контрольных группах 1 и 2. Это выражалось в меньшем размере полостей между

коллагеновыми волокнами, а также в большем количестве фибробластов на единицу площади (Рисунок 39, 40).

В группе 4, где задний сектор глаза был помещён на губчатую криогелевую подложку, загруженную биорегулятором, но не из склеры, а из сыворотки крови, наблюдали также отслойку сетчатки от пигментного эпителия. Пигмент также смещен на апикальную сторону, как в предыдущих группах. Сосудистая оболочка в хорошем состоянии, плотная, без признаков деградации. В склере наблюдались элементы деградации ткани, выражающиеся в расслоении коллагеновых волокон и образования полостей. Количество фибробластов оказалось выше (примерно в 1,5 раза) по сравнению с контрольными образцами 1 и 2 (Рисунок 40).

Когда задние секторы глаза тритона инкубировали без губчатых криогелевых подложек в культуральной среде, но с добавлением в среду культивирования белково-пептидного биорегулятора ткани склеры (группа 5) наблюдалась лучшая визуальная картина гистологического состояния тканей после культивирования в выбранных условиях. Это заключалось в том, что отслойки сетчатки от слоя пигментного эпителия практически не наблюдалось на всем протяжении заднего отдела глаза, были видны лишь незначительные отслоения в некоторых участках. Пигмент в слое пигментного эпителия не смещен на апикальную сторону клеток и распределен равномерно и компактно в клетках пигментного эпителия, что говорит о стабильном состоянии клеточной дифференцировки данных клеток. Сосудистая оболочка сохранилась плотная, без признаков деградации. В склеральной оболочке нет выраженных изменений деградации ткани, как в 1-4 группах, волокна коллагена компактно расположены без образования крупных полостей. Количество фибробластов оказалось значительно выше, чем в образцах контрольных групп 1 и 2. Сравнение результатов состояния тканей заднего сектора в группах 3 и 5 (без применения губчатых криогелевых подложек), но содержащих пептидные биорегуляторы из разных биологических источников (сыворотка крови и склера глаза), свидетельствует о выраженной тканевой специфичности БПБ ткани склеры.

В группе 6, когда задний сектор глаза тритона культивировали на губчатой криогелевой подложке, нагруженной белково-пептидным биорегулятором ткани склеры наблюдалось отслоение сетчатки от слоя пигментного эпителия, при этом сам слой пигментного эпителия не отслоен от сосудистой оболочки. Смещение пигмента в слое пигментного эпителия практически не наблюдали, что говорит о стабилизации дифференцированного состояния клеток в данном слое. Склеральная оболочка содержала незначительные элементы дегградации, а именно незначительные полости и расслоение коллагеновых волокон. Эти эффекты были менее выражены, чем в контрольных группах (1 и 2) и группах 3-4, которые содержали БПБ сыворотки крови. При этом эффект более выраженный, чем для образцов группы 5. Сосудистая оболочка плотная, без выраженных элементов дегградации тканей. Количество фибробластов было выше, чем во всех других группах, и примерно вдвое больше по сравнению с контрольной группой 1. Количество фибробластов не сильно различались в группах 5 и 6, но было значительно лучше, чем во всех остальных группах, т.е. макропористая морфология криогеля обеспечивала улучшенную доставку биорегулятора к биологической мишени, в данном конкретном случае к заднему сектору глаза взрослого тритона.

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 композитных систем губчатого криогеля на основе суммы белков сыворотки крови, нагруженного белково-пептидным биорегулятором ткани склеры, предотвращать развитие дегенеративных процессов в ткани склеры и поддерживать адгезивные взаимодействия между склерой и прилегающими тканями.

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

В разделе 3.2.10 приведены положительные результаты применения криогелей, полученных из суммы белков сыворотки крови, в качестве носителей биорегулятора в экспериментах *in vitro*. Следующим шагом была оценена, совместно с н.с. ИНЭОС РАН к.б.н. Красновым М.С. и доцентом Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России к.м.н. Шайхалиевым А.И., эффективность действия 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.

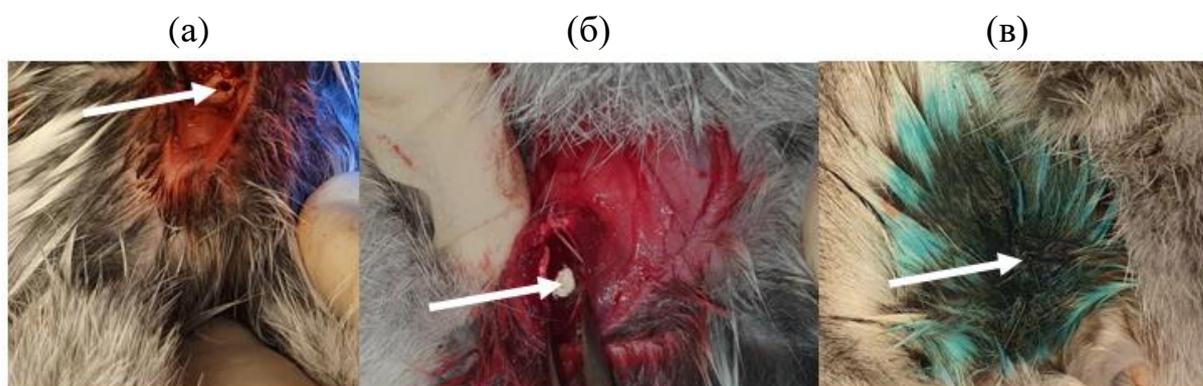


Рисунок 41. Ход операции: **а** – дефект в нижней челюсти кролика, осуществленный с помощью бормашины; **б** – введение губки в область дефекта нижней челюсти кролика; **в** – зашивание мышечных элементов и кожи в области дефекта нижней челюсти кролика.

На ранних сроках после нанесения дефекта (14 суток) состояние костной ткани исследовали *in vivo* рентгенологически.

Были сформированы следующие группы по 6 кроликов в каждой:

1. Нативный контроль – кролики без дефекта.
2. Отрицательный контроль – в область дефекта не вставляли криогели.
3. Контрольная группа – в область дефекта вставляли криогели без сывороточного биорегулятора.
4. Опытная группа 1 – в область дефекта вставляли криогели, содержащие сывороточный биорегулятор в конечной концентрации 10^{-9} мг/мл.
5. Опытная группа 2 – в область дефекта вставляли губки, содержащие сывороточный биорегулятор в конечной концентрации 10^{-7} мг/мл, при этом кроликов поили ежедневно водным раствором сывороточного биорегулятора в конечной концентрации 10^{-9} мг/мл.

Всего в эксперименте присутствовало 24 животных.

Проводили рентгенологический контроль области дефекта на 14 сутки прижизненно на аппарате PanExam+ (Kavo), (20мРентген).

Мы разделили состояние костной ткани на рентгенограммах на 3 балла.

1 балл – полное отсутствие элементов остеоидной ткани. Дефект костной ткани определялся рентгенологически, и зона дефекта была больше заполнена фиброзной соединительной тканью.

2 балла – зона дефекта на 30-40% заполнена островками остеоидной ткани и частично грубоволокнистой соединительной тканью, которая предположительно должна реструктурироваться в молодую костную ткань с трабекулярным строением.

3 балла – в зоне дефекта плотность костной ткани практически выравнивалась с плотностью материнской ткани. На фоне активного роста нормально структурированной костной ткани наблюдались небольшие островки соединительной ткани. В целом сложно определить зону дефекта.

Состояние дефектов кости изучали на 14-ые сутки с помощью рентгена, поскольку именно на ранних сроках происходят основные процессы регенерации, которые в дальнейшем определяют качество сформированной в области дефекта костной ткани.

Показано, что в отрицательном контроле (Рисунок 42) на нижней челюсти определяется зона дефекта без четких контуров, есть тенденция к заполнению сформированного дефекта. В центре определяются островки плотного вещества, скорее всего зоны формирования костной массы. (1,5-2 балла по вышеописанной шкале). В зоне дефекта по периферии по направлению центра дефекта от края костной ткани структурно появлялись островки костного вещества, имеющие более дифференцированный характер. На рентгенограммах наблюдалась располагающаяся недалеко от края дефекта рыхлая соединительная ткань, которая состоит из сплетенных пучков коллагеновых фибрилл.



Рисунок 42. Рентгенограмма нижней челюсти кролика в области дефекта (указано стрелкой) на 14 сутки в контрольной группе: а – малое увеличение, б – большое увеличение.

В контроле с криогелем без биорегулятора (Рисунок 43) дефекты заполнены соединительной тканью (грубоволокнистая коллагеновая ткань). В некоторых зонах ближе к краю материнской кости определяются островки напластования нового костного вещества (1 балл по вышеописанной шкале).



Рисунок 43. Рентгенограмма нижней челюсти кролика в области дефекта (указано стрелкой) на 14 сутки в группе с губкой на основе суммы белков сыворотки крови.

В опытных группах 4 и 5 в зоне дефекта определяется экзофитный рост новообразованной костной ткани, имеющий трабекулярное строение, перемежающийся с фиброзным матриксом (Рисунок 44). Очаги остеогенеза наблюдаются в виде отложения остеоида в соединительно-тканной прослойке (2,5-3 балла по вышеописанной шкале).

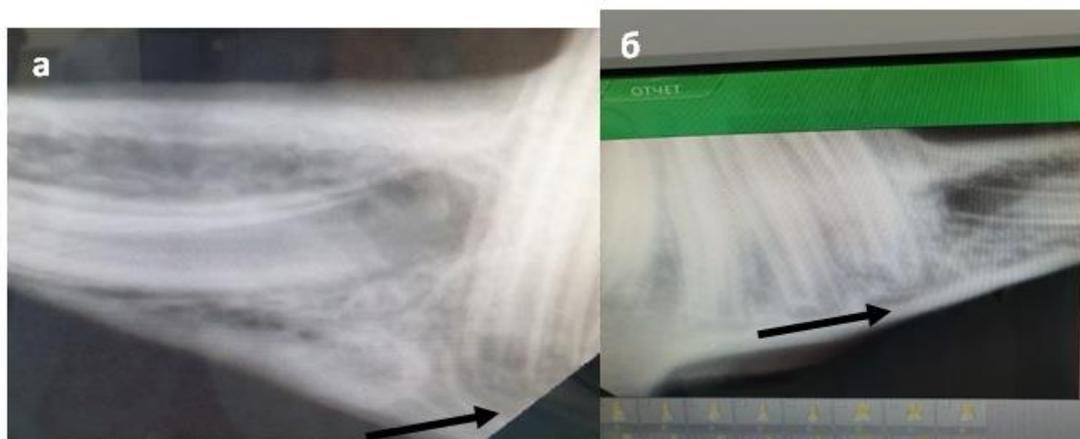


Рисунок 44. Рентгенограмма нижней челюсти кролика в области дефекта (указана стрелкой) на 14 сутки в группе: **а** – с криогелем, содержащим сывороточный биорегулятор; **б** – с криогелем, содержащим сывороточный биорегулятор, кролики дополнительно принимали питьевой раствор сывороточного биорегулятора.

При гистологическом описании состояния костной ткани в области дефекта на 30 сутки после его нанесения в различных группах, получили следующую картину.

В 1 группе (контроль нативный) (Рисунок 45) наблюдалась плотная костная ткань, внутри полостей костных балок виден костный мозг (в основном желтый – жировая ткань, но также представлен красный костный мозг). Хорошо выражены элементы зубов с дентином, эмалью и незрелыми мезенхимными клетками. Хорошо выражена плотная костная ткань, есть сосуды, которые просматриваются. Остеоны хорошо выражены, между остеócитами небольшие лакуны. Ядра остеócитов крупные, овальной формы. Представлена зрелая остеοидная кость, пластинчатого строения.

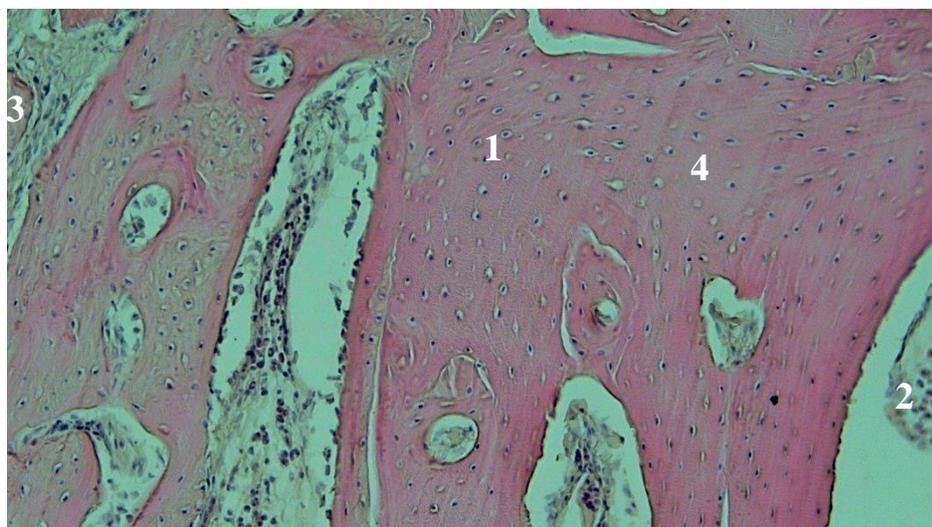


Рисунок 45. Нативная костная ткань нижней челюсти кролика: увеличение x200. **1** – остеоны; **2** – костный мозг; **3** – губчатая костная ткань; **4** – плотная костная ткань.

В группе – контроль отрицательный (без заполнения области дефекта какими-либо материалами) (Рисунок 46) не происходило полного зарастания дефекта. Плотность раны заполнена тканевым детритом, между ним идет формирование новой кости, не выражен костный мозг. Наблюдается незрелая остеοидная ткань, лакуны не выражены. Волокнистая костная ткань, сосуды плохо представлены.

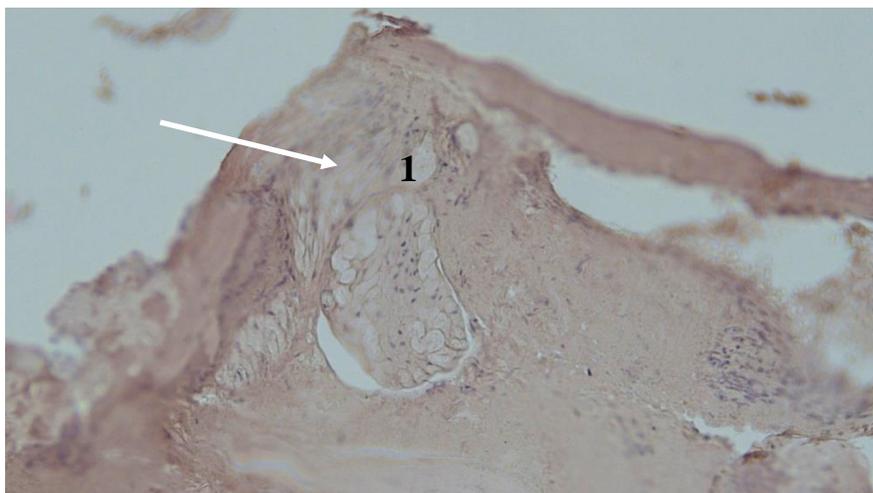


Рисунок 46. Костная ткань нижней челюсти кролика через 30 суток после нанесения дефекта (негативный контроль, без внесения в область дефекта каких-либо материалов). увеличение $\times 200$. **1** – грубоволокнистая костная ткань. Стрелкой указана область дефекта.

В контрольной группе с заполнением дефекта криогелем на основе суммы белков сыворотки крови, не содержащим сывороточный биорегулятор (Рисунок 47), идет заращание раны без формирования костного мозга. Видно активное формирование костной ткани, остеоинтеграция губки в состав кости, образование в ней полостей и частичное заселение клетками. Также на границе видна активная грануляция клеток с формированием незрелой остеоидной ткани.

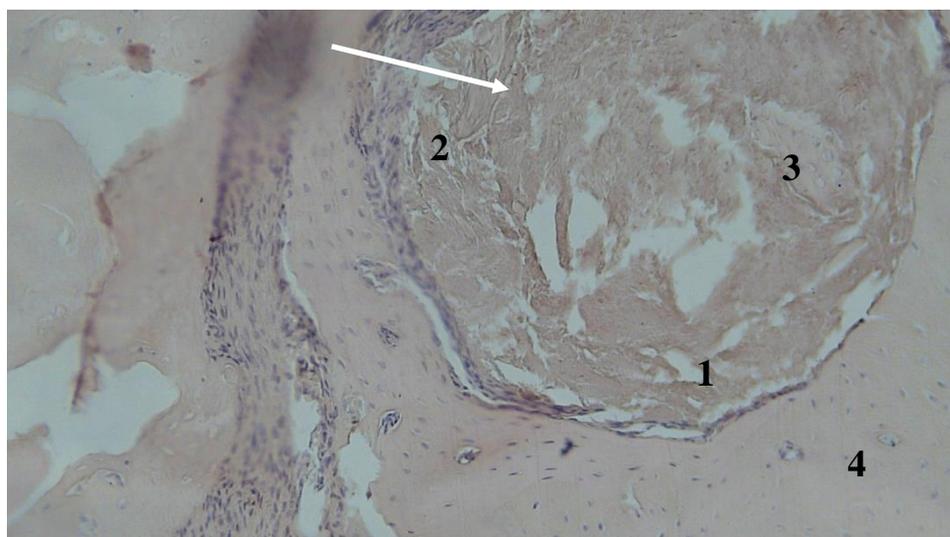


Рисунок 47. Костная ткань нижней челюсти кролика через 30 суток после нанесения дефекта (контроль, с внесением в область дефекта криогелем, не содержащей сывороточный биорегулятор); увеличение $\times 200$. **1** – остеоны; **2** – остатки криогеля; **3** – незрелая остеоидная ткань; **4** – плотная костная ткань. Стрелкой указана область дефекта.

В опытной группе с заполнением дефекта криогелем, содержащим сывороточный биорегулятор (Рисунок 48), в области повреждения видны остатки биодеградируемой губки, вновь образованная кость плотная, с маленькими лакунами. Внутри в полости кости виден костный мозг. Идет формирование плотной зрелой остеонидной ткани с формированием остеонов гаверсовых каналов и костного мозга и восстановление костной альвеолярной ткани и пластинчатой плотной кости.

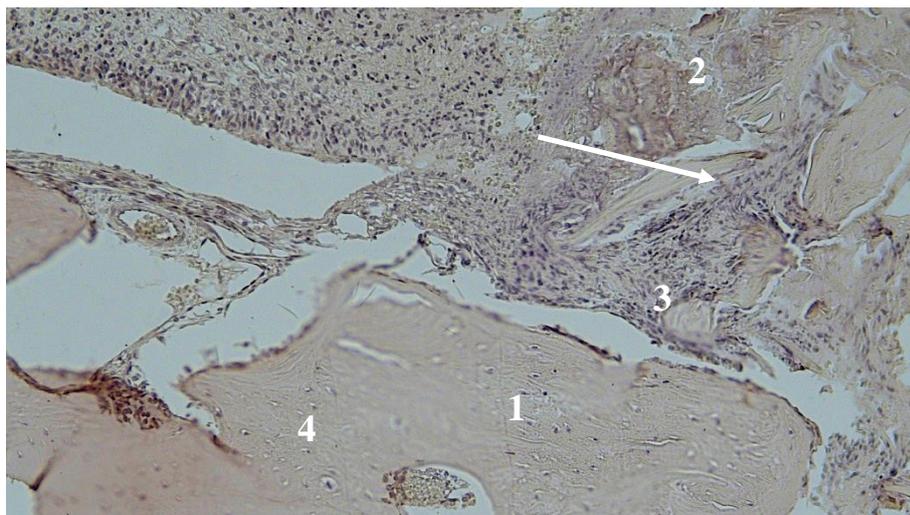


Рисунок 48. Костная ткань нижней челюсти кролика через 30 суток после нанесения дефекта (опытная группа, с внесением в область дефекта криогеля, содержащий сывороточный биорегулятор); увеличение x200. **1** – остеоны; **2** – остатки губки; **3** – грубоволокнистая костная ткань; **4** – плотная костная ткань. Стрелкой указана область дефекта.

В опытной группе у кроликов с заполнением дефекта криогелем, содержащим сывороточный биорегулятор, и принимавших питьевой раствор сывороточного биорегулятора, в области дефекта в отличие от предыдущей группы менее выражен костный мозг, в основном представлена жировая ткань в области дефекта (Рисунок 49). Видны остатки резорбирующейся губки, вновь сформированная кость плотная, лакуны в остеонах маленькие. Идет восстановление плотной пластинчатой кости.

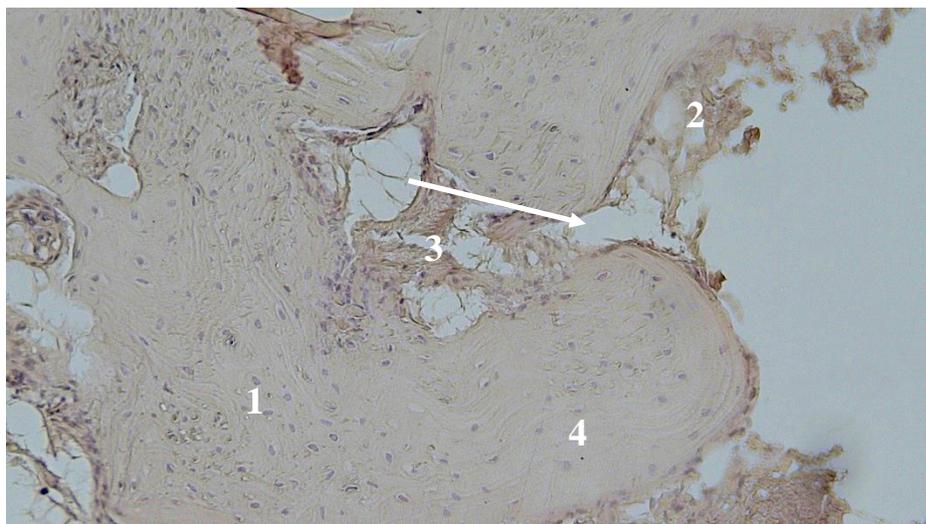


Рисунок 49. Костная ткань нижней челюсти кролика через 30 суток после нанесения дефекта (опытная группа, с внесением в область дефекта криогеля, содержащего сывороточный биорегулятор, а также принимавшей биорегулятор в виде водного раствора); увеличение x200. **1** – остеоны; **2** – остатки губки; **3** – грубоволокнистая\ костная ткань; **4** – плотная костная ткань. Стрелкой указана область дефекта.

Любая соединительная ткань является предшественником костной ткани. Она необходима для роста интеграционных процессов и заполнения дефектов костной тканью. В группе отрицательного контроля с криогелем на основе суммы белков сыворотки крови без биорегулятора мы наблюдали начало процесса восстановления костной ткани с формированием незрелой кости, в отличие от групп, в которых в область дефекта была внесена губка с включенным в нее биорегулятором из сыворотки крови. Таким образом, белковый криогель является носителем, который необходим для заселения в него вновь образующихся клеток в качестве остеокондуктора, а остеоиндуктором, ускоряющим процесс восстановления зрелой костной ткани, является сывороточный биорегулятор, включенный в губку.

В отрицательном контроле картина восстановления плотной костной ткани нижней челюсти кролика не выражена, в основном восстановленная ткань является грубоволокнистой. В контрольной группе с криогелем видна неполная биодеградация данной губки и только начало остеointegrативных процессов. Полученные результаты свидетельствуют об активном восстановлении костной ткани в области обширного дефекта при использовании 3Д-носителя на основе

суммы белков сыворотки крови с включением биорегулятора, выделенного из сыворотки крови. Видны процессы остеointегративной и остеиндуктивной 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 на данном сроке 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, напитанного 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время использование различных гелевых материалов на белковой основе в биомедицинских целях широко распространено. Главным преимуществом таких гелей является их биосовместимость и биоразлагаемость. Благодаря своей макропористой структуре криогели на основе суммы белков сыворотки крови являются перспективными носителями для доставки биологически активных веществ, в частности, белково-пептидных биорегуляторов. Для создания таких депо-форм и дальнейшего применения их в медицине нами были детально изучены зависимости таких белковых криогелей характеристик от параметров процесса их формирования. Установлено, что выход гель-фракций снижался, и степень набухания стенок макропор в приготовленных криогелях возрастала с уменьшением концентрации белка в исходном растворе, а средний размер макропор в полученных криогелях составлял 90–110 мкм.

Способность криогелей доставлять биологически активные вещества белковой природы была изучена в биологических экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В качестве действующего вещества использованы биорегуляторы, выделенные из ткани склеры глаза быка и из сыворотки крови КРС, соответственно. Был установлен его состав, а также некоторые физико-химические свойства.

Последующие эксперименты по применению таких широкопористых криогелей на основе суммы белков сыворотки крови в качестве носителей пептидных биорегуляторов продемонстрировали перспективность данного подхода с точки зрения прикладного биомедицинского потенциала подобных систем доставки лекарственных средств.

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 гелевой 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 в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БДДЭ - диглицидиловый эфир бутандиола-1,4
- БПБ - белково-пептидные биорегуляторы
- БСА - бычий сывороточный альбумин
- ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГА - глутаровый альдегид
- ГК - гиалуроновая кислота
- ДАК - диальдегид крахмала
- ДГЭЭ - диглицидиловый эфир этиленгликоля
- ДДС-Na - додецилсульфат натрия
- ДКМЦ - диальдегидное производное карбоксиметилцеллюлозы
- ДМСО - диметилсульфоксид
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДТТ - дитиотреит
- КД - круговой дихроизм
- КРС - крупный рогатый скот
- МА - метакрилированный альгинат
- МКМ - микрокомпьютерная томография
- НЖМФ - незамерзшая жидкая микрофаза
- ПААГ - полиакриламидный гель
- ПВС - поливиниловый спирт
- ПЭГДЭ - диэпоксид полиэтиленгликоля
- СЭМ - сканирующая электронная микроскопия
- ТЕМЕД - N,N,N',N'-Тетраметилэтилендиамин
- Трп – триптофан
- ТФУ - трифторуксусная кислота
- УФ - ультрафиолетовый
- ФШ - фиброин шёлка
- Цис - цистеин
- ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

INS-1E – клеточная линия инсулиномы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saylan Y. Denizli A. Supramacroporous Composite Cryogels in Biomedical Applications / Y. Saylan A. Denizli // *Gels*. – 2019. – V. 5. – № 3. – P. 20.
2. Çimen D. Injectable Cryogels in Biomedicine / D. Çimen, M.A. Özbek, N. Bereli, B. Mattiasson, A. Denizli // *Gels*. – 2021. – V. 7. – № 2. – P. 38.
3. Memic A. Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Applications / A. Memic, T. Colombani, L. J. Eggermont, M. Rezaeeyazdi, J. Steingold, Z. J. Rogers, S. A. Bencherif // *Adv. Therap.* – 2020. – P. 1800114.
4. Lozinsky V. I. Cryostructuring of Polymeric Systems. 55. Retrospective View on the More than 40 Years of Studies Performed in the A.N.Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds with Respect of the Cryostructuring Processes in Polymeric Systems // *Gels*. – 2020. – V. 6. – №3. – P. 29.
5. Shiekh P. A. Designing cryogels through cryostructuring of polymeric matrices for biomedical applications / P.A. Shiekh, S.M. Andrabi, A. Singh, S. Majumder, A.Kumar // *European Polymer Journal*. – 2021. – V. 144. – P. 110234.
6. Лозинский В.И., Родионов И.А., Цискарашвили А.В., Еськин Н.А. Антибактериальная белковая губка для химиотерапии инфицированных ран и способ ее получения // Пат. РФ № 2637634 (2016); Б.И. № 34 (2017).
7. Rodionov I.A. 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.Y. Grinberg, V.I. Lozinsky // *Soft Matter*. – 2015 – V. 24. – №. 11. – P. 4921–4931.
8. Anisimov V.N. Peptide bioregulation of aging: Results and prospects / V.N. Anisimov, V.K. Khavinson // *Biogerontology*. – 2009. –V. 11. – P. 139–149.
9. Кузник Б.И. Эпигенетические механизмы пептидной регуляции и нейропротекторный белок FKBP1b / Б.И. Кузник, С.О. Давыдов, Е.С. Поправка, Н.С. Линькова, Л.С. Козина, В.Х. Хавинсон // *Молекулярная биология*. – 2019. – Т. 53. – № 2. – С. 339–348.

10. Краснов М.С. Индукция остеогенеза костной ткани крысы с использованием криогенно-структурированных пористых 3D-материалов с содержанием биорегулятора / М.С. Краснов, А.И. Шайхалиев, Е.В. Коршаков, М.В. Ефименко, П.П. Солошенко, Т.Р. Давыдова, Н.Д. Звукова, Е.С. Синицкая, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков, В.И. Лозинский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168. – № 7. – С. 113–117.
11. Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения // Усп. хим. – 2002. – Т. 71. – № 6. – С. 559-585.
12. Lozinsky V.I. Basic principles of cryotropic gelation / V.I. Lozinsky, O. Okay // Adv.Polym.Sci. – 2014. – V. 263. – P. 49–101.
13. В.И.Лозинский. Новое семейство макропористых и сверхмакропористых материалов биотехнологического назначения – полимерные криогели // Известия РАН, Сер. хим. – 2008. – Т. 5. – С. 996-1013.
14. Singh A. Aligned Chitosan-Gelatin Cryogel Filled Polyurethane Nerve Guidance Channel for Neural Tissue Engineering: Fabrication, Characterization and In-Vitro Evaluation / A. Singh, P.A. Shiekh., M. Das, J.V. Seppälä, A. Kumar // Biomacromolecules. –2019. – V. 20. – № 2. – P. 662–673.
15. Wu X. Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen–chitosan hydrogels for adipose tissue engineering / X. Wu, L. Black, G. Santacana-Laffitte, C.W. Patrick // Journal of Biomedical Materials Research. – 2007. – V. 81. – №1. – P. 59–65.
16. Gutiérrez M.C. Ice-templated materials: sophisticated structures exhibiting enhanced functionalities obtained after unidirectional freezing and ice-segregation-induced self-assembly / M.C. Gutiérrez, M.L. Ferrer, F. del Monte // Chem. Mater. – 2008. – V. 20. – № 3. – P. 634–648.
17. Rodionov I.A. 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 / I.A. Rodionov, R.V.

- Ivanov, V.I. Lozinsky, S.K. Noh, S.S. Han, W.S. Lyoo // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2007. – V. 106. – № 3. – P. 1470–1475.
18. Лозинский В.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 27. Физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии / В.И. Лозинский, Л.Г. Дамшкалн, Б.Л. Шаскольский, Т.А. Бабушкина, И.Н. Курочкин, И.И. Курочкин // *Колоидн. журн.* – 2007. – Т. 69. – № 6. – С. 798–816.
19. Bloch K. Functional activity of insulinoma cells (INS-1E) and pancreatic islets cultured in agarose cryogel sponges / K. Bloch, V.I. Lozinsky, I.Y. Galaev, K. Yavriyanz, M. Vorobeychik, D. Azarov, L.G. Damshkaln, B. Mattiasson, P. Vardi // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2005. – V. 75. – P. 802–809.
20. Gun'ko V.M. Characterisation and performance of hydrogel tissue scaffolds / V.M. Gun'ko, L.I. Mikhalovska, I.N. Savina, R.V. Shevchenko, S.L. James, P.U. Tomlins, S.V. Mikhalovsky // *Soft Matter.* – 2010. – V. 6. – № 21. – P. 5351–5358.
21. Bencherif S.A. Injectable preformed scaffolds with shape-memory properties / S.A. Bencherif, R.W. Sands, D. Bhatta, P. Arany, C.S. Verbeke, D.A. Edwards // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2012. – V. 109. – № 48. – P. 19590–19595.
22. Rezaeeyazdi M. Injectable hyaluronic acid-co-gelatin cryogels for tissue-engineering applications / M. Rezaeeyazdi, T. Colombani, A. Memic, S. A. Bencherif // *Materials.* – 2018. – V. 11. – № 8. – P. 1374.
23. Okay O. Synthesis, structure-property relationships of cryogels / O. Okay, V.I. Lozinsky // *Adv. Polym.Sci.* – 2014. – V. 263. – P. 103–157.
24. Henderson T. M. A. Cryogels for biomedical applications / T. M. A. Henderson, K. Ladewig, D. N. Haylock, K. M. McLean, A. J. O'Connor // *J. Mater. Chem.* – 2013. – V. 1. – P. 2682.
25. Gupta A. Evaluation of three-dimensional chitosan-agarose-gelatin cryogel scaffold for the repair of subchondral cartilage defects: an in vivo study in a rabbit model / A. Gupta, S. Bhat, P.R. Jagdale, B.P. Chaudhari, L. Lidgren, K.C. Gupta, A. Kumar // *Tissue Eng.* – 2014. – V. 20. – № 23. – P. 3101–3111.

26. Singh D. Synthesis of composite gelatin-hyaluronic acid-alginate porous scaffold and evaluation for in vitro stem cell growth and in vivo tissue integration / D. Singh, A. Tripathi, S.M. Zoa, D. Singh, S.S. Han // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. – 2014. – V. 1. – №. 116. – P. 502–509.
27. Golovnya R.V. GC evaluation of flavour compound sorption from water solutions by corn starch cryotextures obtained by freezing / R.V. Golovnya, T.A. Misharina, M.B. Terenina // *Nahrung/Food*. – 1998. – V. 42. – P. 380–384.
28. Теренина М.Б. Сорбция алифатических спиртов из водных растворов криоструктурами крахмала / М.Б. Теренина, Т.А. Мишарина, Р.В. Головная // *Известия РАН, Сер. хим.* – 1999. – №. 4. – С. 734–737.
29. Golovnya R.V. Formation of supramolecular structures of aroma compounds with polysaccharides of corn starch cryotextures / R.V. Golovnya, M.B. Terenina, N.I. Krikunova, V.P. Yuryev, T.A. Misharina // *Starch/Stärke*. – 2001. – V. 53. – P. 269–277.
30. Kuyukina M.S. Petroleum-contaminated water treatment in a flu-144 idized-bed bioreactor with immobilized Rhodococcus cells / M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina, M.K. Serebrennikova, A.B. Krivorutchko, E.A. Podorozhko, R.V. Ivanov, V.I. Lozinsky // *Int. Biodeterior. Biodegradation*. – 2009 – V. 63. – №. 4. – P. 427–432.
31. Лысогорская Е.Н. Трипсин, иммобилизованный на криогеле поливинилового спирта. Получение и биокаталитические свойства / Е.Н Лысогорская., Т.В. Рослякова, А.В. Беяева, А.В. Бачева, В.И. Лозинский, И.Ю. Филиппова // *Прикл. биохим. микробиол.* – 2008. – Т. 44. – № 3. – С. 270–275.
32. Филиппова И.Ю. Новые биокатализаторы для синтеза пептидов в органической среде – протеиназы, иммобилизованные на криогеле поливинилового спирта / И.Ю Филиппова., А.В. Бачева, О.В. Байбак, Ф.М. Плиева, Е.Н. Лысогорская, Е.С. Оксенойт, В.И. Лозинский // *Известия РАН, Сер. хим.* – 2001. – Т. 10. – С. 1811–1816.
33. Беяева А.В. Биокаталитические свойства термолизина, иммобилизованного на криогеле поливинилового спирта / А.В. Беяева, Ю.А. Смирнова, Е.Н.

- Лысогорская, Е.С. Оксенойт, А.В. Тимофеева, В.И. Лозинский, И.Ю. Филиппова // *Биоорганическая химия*. – 2008. – Т. 34. – № 4. – С. 487–494.
34. Грицай Д.В. Трансплантация криоконсервированных клеток фетальной печени, засеянных в макропористые альгинат-желатиновые матрицы, крысам с печеночной недостаточностью / Д.В. Грицай, А.С. Лебединский, О.В. Оченашко, Е.Ю. Рогольская, Ю.А. Петренко, В.И. Лозинский, Р.В. Иванов, А.Ю. Петренко // *Вестник трансплантологии и искусственных органов XVII*. – 2015. – № 3. – С. 50–57.
35. Xu F. Rational design and latest advances of polysaccharide-based hydrogels for wound healing / F. Xu, H. Hu // *Biomater Sci.* – 2020 – V. 8. – №. 8. – P. 2084–2101.
36. Xiang J. Status and future scope of hydrogels in wound healing: Synthesis, materials and evaluation / J. Xiang, L. Shen, Y. Hong // *Eur. Polym. J.* – 2020. – V. 130. – P. 109609.
37. Лозинский В.И. Криоструктурирование полимерных систем как инструмент создания инновационных материалов биомедицинского назначения // в кн. «Синтез и функциональные свойства гибридных наночастиц биоактивных и лекарственных веществ». Под. ред. Мельникова М.Я. и Трахтенберга Л.И., М.: изд-во «Техносфера», 2019, глава 3, С. 68–100.
38. Шабатина Т.И., Верная О.И., Нуждина А.В., Шабатин В.П., Семенов А.М., Лозинский В.И., Мельников М.Я. Гибридные наночастицы антибактериальных веществ с наночастицами металлов, включенные в криоструктурированные биополимерные матрицы, для адресной доставки // в кн. «Синтез и функциональные свойства гибридных наночастиц биоактивных и лекарственных веществ». Под. ред. Мельникова М.Я. и Трахтенберга Л.И., М.: изд-во «Техносфера», 2019, глава 5, С. 136–159.
39. Zvukova N.D. Cryostructuring of polymeric systems. 52. Properties, microstructure and an example of a potential biomedical use of the wide-pore alginate cryostructures / N.D. Zvukova, T.P. Klimova, R.V. Ivanov, A.N. Ryabev, A.V. Tsiskarashvili, V.I. Lozinsky // *Gels*. – 2019. – V. 5. – № 2.

40. Shabatina T.I. Metal nanoparticle containing nanocomposites of drug substances and their potential biomedical applications / T.I. Shabatina, O.I. Vernaya, V.P. Shabatin, A.M. Semenov, M.Y. Melnikov, V.I. Lozinsky // *Appl. Sci.* – 2020. – № 170.
41. Вайнерман Е.С. Способ получения пористого альгинатного материала / Е.С. Вайнерман, В.И. Лозинский, С.В. Рогожин, Л.П. Раскина, Л.А. Шапиро, В.С. Якубович, Б.Ю. Бронштейн // *А.с. СССР.* – 1983. – №1171474.
42. Вайнерман Е.С. Способ получения пористого материала, обладающего ранозаживляющим действием / Е.С. Вайнерман, В.И. Лозинский, С.В. Рогожин, Л.П. Раскина, Л.А. Шапиро, В.С. Якубович, М.Б. Шенкер, А.Л. Комиссарова, В.Д. Потапов, В.М. Гудочкова, Н.М. Атясова, Г.А. Иванова // *А.с. СССР.* – 1983. – № 1171476.
43. Rodionov I.A. Cryostructuring of polymer systems. 44. Freeze-dried and then chemically cross-linked wide porous cryostructures based on serum albumin / I.A. Rodionov, N.V. Grinberg, T.V. Burova, V.Y. Grinberg, T.I. Shabatina, V.I. Lozinsky // *e-Polymers.* – 2017. – V. 17. – P. 263–274
44. Родионов И.А. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 42. Физико-химические свойства и микроструктура широкопористых ковалентно-сшитых альбуминовых криогелей / И.А. Родионов, Н.В. Гринберг, Т.В. Булова, В.Я. Гринберг, В.И. Лозинский // *Коллоидн. журн.* – 2016. – Т. 78. – № 4. – С. 465–478.
45. Lozinsky V.I. Influence of succinylation of a wide-pore albumin cryogels on their properties, structure, biodegradability, and release dynamics of dioxidine loaded in such spongy carriers / V.I. Lozinsky, A.O. Shchekoltsova, E.S. Sinitskaya, O.I. Vernaya, A.V. Nuzhdina, I.V. Bakeeva, M.G. Ezernitskaya, A.M. Semenov, T.I. Shabatina, M.Y. Melnikov // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – V.160. – P. 583–592.
46. Plieva F.M. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications /

- F.M. Plieva, I.Y. Galaev, B. Mattiasson // *J. Separ. Sci.* – 2007. – V.30. – P. 1657–1671.
47. Stolarzewicz I. Immobilization of yeast on polymeric supports / I. Stolarzewicz, E. Bialecka-Florjańczyk, E. Majewska, J. Krzyczkowska // *Chem. Biochem. Eng. Q.* – 2011. – V.25. – P. 135–144.
48. Carvalho B.M.A. Cryogel poly(acrylamide): Synthesis, structure and applications / B.M.A. Carvalho, S.L. Da Silva, L.H.M. Da Silva, V.P.R. Minim, M.C.H. Da Silva, L.M. Carvalho, L.A. Minim // *Sep. Purif. Rev.* – 2014. – V.43. – P. 241–262.
49. Okay O. *Polymeric Cryogels: Macroporous Gels with Remarkable Properties.* – Switzerland: Springer: Cham, 2014. – P. 330.
50. Kumar A. *Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications.* – UK: Boca Raton CRC Press, 2016. – P. 480.
51. В.И.Лозинский, И.А.Сименел, А.В.Чебышев. Способ получения пористого материала // Пат. РФ № 2035476 (1994); Б.И. № 14 (1995).
52. В.И.Лозинский, А.Л.Зубов. Способ получения макропористого полимерного материала // Пат. РФ № 2078099 (1994); Б.И. № 12 (1997).
53. Lozinsky V.I. Cryostructuring of polymer systems. 29. Preparation and characterization of supermacroporous (spongy) agarose-based cryogels used as three-dimensional scaffolds for culturing insulin-producing cell aggregates / V.I. Lozinsky, L.G. Damshkaln, K.O. Bloch, P. Vardi, N.V. Grinberg, T.V. Burova, V.Y. Grinberg // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2008. – V.108. – P. 3046–3062.
54. Bloch K. Functional activity of insulinoma cells (INS-1E) and pancreatic islets cultured in agarose cryogel sponges / K. Bloch, V.I. Lozinsky, I.Y. Galaev, K. Yavriyanz, M. Vorobeychik, D. Azarov, L.G. Damshkaln, B. Mattiasson, P. Vardi // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2005. – V.75. – P. 802–809.
55. Petrenko Y.A. Culturing of stromal cells-precursors in the 3D carriers / Y.A. Petrenko, A.Y. Petrenko, V.I. Lozinsky, I.V. Gurin, N.A. Gorokhova, N.A. Volkova, B.P. Sandomirskii // *Transplantologiya.* – 2007. – V.9. – P. 221–223.
56. Bloch K. Vascularization of wide pore agarose-gelatin cryogel scaffolds implanted subcutaneously in diabetic and non diabetic mice / K. Bloch, A. Vanichkin, L.G.

- Damshkaln, V.I. Lozinsky, P.Vardi // *Acta Biomater.* – 2010. – V.6. – P. 1200–1205.
57. Lozinsky V.I. Cryostructuring of polymer systems. 47. Preparation of wide porous gelatin-based cryostructurates in sterilizing organic media and assessment of the suitability of thus formed matrices as spongy scaffolds for 3D cell culturing / V.I. Lozinsky, V.K. Kulakova, R.V. Ivanov, A.Y. Petrenko, O.Y. Rogulska, Y.A. Petrenko // *e-Polymers.* – 2018. – V.18. – P. 175–186.
58. Коровина Д.Г. Поддержание мультипотентных мезенхимных стволовых клеток сельскохозяйственных животных в криогелях на основе полимеров природного происхождения / Д.Г. Коровина, В.В. Стаффорд, А.М. Гулюкин, И.А. Родионов, В.К. Кулакова, В.И. Лозинский, А.М. Гулюкин, И.П. Савченкова // *Сельскохозяйственная биология.* – 2019. – Т. 54. – № 6. – С. 1214–1224.
59. Blount R.P., N. Bhattarai.; natural polysaccharide-based hydrogels for controlled localized drug delivery // *Gel handbook.* – 2016. – Ch. 2. – P. 35-59.
60. Croisier F. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering / F. Croisier, C. Jérôme // *European Polymer Journal.* – 2013. – V.49. – №. 4. – P. 780–792.
61. R. Muzzarelli. Chitosan. Natural Chelating Polymers. – Oxford: Pergamon Press, 1973. – P. 144-176.
62. Dragan E.S. Designing novel macroporous composite hydrogels based on methacrylic acid copolymers and chitosan and in vitro assessment of lysozyme controlled delivery / E.S Dragan., A.I Cocarta., M. Gierszewska // *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces.* – 2016. – V.139. – P. 33–41.
63. Bai X. Chitosan-based thermo/pH double sensitive hydrogel for controlled drug delivery / X. Bai, Z. Bao, S. Bi, Y. Li, X. Yu, S. Hu // *Macromolecular Bioscience.* – 2018. – V.18. – P. 1700305.
64. Mahdavinia G.R. Model protein BSA adsorption onto novel magnetic chitosan/PVA/laponite RD hydrogel nanocomposite beads / G.R. Mahdavinia, M. Soleymani, H. Etemadi, M. Sabzi, Z. Atlasi // *International Journal of Biological macromolecules.* – 2018. – V.107. – P. 719–729.

65. Pella M.C.G. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications / M.C.G. Pella, K. Michele, M.K. Lima-Tenório, E.T. Tenório-Neto, M.R. Guilherme, E.C. Muniza // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – V.196. – P. 233–245.
66. Racine L. Chitosan-based hydrogels: recent design concepts to tailor properties and functions / L. Racine, I. Texier, R. Auzély-Velty // *Polymer International*. – 2017. – V.66. – P. 981–998.
67. Alvarez-Lorenzo C. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery / C. Alvarez-Lorenzo, B. Blanco-Fernandez, A.M. Puga, A. Concheiro // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – V. 65. – P. 1148-1171.
68. Berger J. Structure and interactions of covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications / J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2004. – V.57. – P. 19–34.
69. Никоноров В.В. Синтез криогелей хитозана, сшитого глутаровым альдегидом, и изучение их свойств / В.В. Никоноров, Р.В. Иванов, Н.Р. Кильдеева, Л.Н. Булатникова, В.И. Лозинский // *Высокомолекул. соед.* – 2010. – Т. 52. – № 8. – С. 1436–1443.
70. Dinu M. V. Synthesis, characterization and drug release properties of 3D chitosan/clinoptilolite biocomposite cryogels / M.V. Dinu, A.I. Cocarta, E.S. Dragan // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – V.153. – P. 203–211.
71. Велешко И.Е. Сорбция Eu (III) из растворов ковалентно-сшитыми криогелями хитозана / И.Е. Велешко, В.В. Никоноров, А.Н. Велешко, Е.В. Румянцева, С.Н. Михайлов, В.И. Лозинский, Р.В. Иванов, Л.С. Гальбрайх, Н.Р. Кильдеева // *Химические волокна*. – 2010. – № 6. – С. 22–26.
72. Grce M. Antiviral properties of clinoptilolite / M. Grce, K. Pavelic // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2005. – V.79. – P. 165–169.
73. Jevtic S. Surfactant-modified clinoptilolite as a salicylate carrier, salicylate kinetic release and its antibacterial activity / S. Jevtic, S. Grujic, J. Hrenovic, N. Rajic // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2012. – V.159. – P. 30–35.

74. Takei T. Autoclavable physically-crosslinked chitosan cryogel as a wound dressing / T. Takei, S. Danjo, S. Sakoguchi, S. Tanaka, T. Yoshinaga, H. Nishimata, M. Yoshida // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2018. – V.125. – № 4. – P. 490–495.
75. Meena L.K. Study of locust bean gum reinforced cyst-chitosan and oxidized dextran based semi-IPN cryogel dressing for hemostatic application / L.K. Meena, P. Raval, D. Kedaria, R. Vasita // *Bioactive Materials*. – 2018. – №3. – P. 370–384.
76. Liew C.V. Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets / C.V. Liew, L.W. Chan, A.L. Ching, P.W.S. Heng // *Int. J. Pharm.* – 2006. – V.309. – P. 25–37.
77. Jain D. Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research / D. Jain, D. Bar-Shalom // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2014. – V.40. – № 12. – P. 1576–1584.
78. Chen C.Y. 3D porous calcium-alginate scaffolds cell culture system improved human osteoblast cell clusters for cell therapy / C.Y. Chen, C.J. Ke, K.C. Yen, H.C. Hsieh, J.S. Sun, F.H. Lin // *Theranostics*. – 2015. – V.5. – № 6. – P. 643–655.
79. Park M. Nanocellulose-alginate hydrogel for cell encapsulation / M. Park, D. Lee, J. Hyun // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – V.116. – P. 223–228.
80. Tan R. Thermo-sensitive alginate-based injectable hydrogel for tissue engineering / R.Tan, Z. She, M. Wang, Z. Fang, Y. Liu, Q. Feng // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – V.87. – № 2. – P. 1515–1521.
81. Lima D.S. pH-responsive alginate-based hydrogels for protein delivery / D.S. Lima, E.T. Tenório-Neto, M.K. Lima-Tenório, M.R. Guilherme, D.B. Scariot, C.V. Nakamura // *Journal of Molecular Liquids*. – 2018. – V.262. – P. 29–36.
82. Smidsrød O., Draget K.I. *Alginate Gelation Technologies. Food Colloids*. – UK: Woodhead Publishing; Cambridge, 2004. – P. 279–293.
83. Shan L. Fabrication and Use of Alginate-Based Cryogel Delivery Beads Loaded with Urea and Phosphates as Potential Carriers for Bioremediation / L. Shan, Y. Gao, Y. Zhang, W. Yu, Y. Yang, S. Shen, S. Zhang, L. Zhu, L. Xu, B. Tian // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2016. – V.55. – P. 7655–7660.

84. Lee K.Y. Alginate: Properties and biomedical applications / K.Y. Lee, D.J. Mooney // *Progress in Polymer Science*. – 2012. – V. 37. – № 1. – P. 106–126.
85. Augst A. D. Alginate Hydrogels as Biomaterials / A.D. Augst, H.J. Kong, D.J. Mooney // *Macromolecular Bioscience*. – 2006. – V. 6. – № 8. – P. 623–633.
86. Baroja-Mazo A. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response / A. Baroja-Mazo, F. Martín-Sánchez, A.I. Gomez, C.M. Martínez, J. Amores-Iniesta, V. Compan, M. Barberà-Cremades, J. Yagüe, E. Ruiz-Ortiz, J. Antón, S. Buján, I. Couillin, D. Brough, J.I. Arostegui, P. Pelegrín // *Nat Immunol*. – 2014. – V. 15. – № 8. – P. 738–748.
87. Zhao Y. Freeze-thaw induced gelation of alginates / Y. Zhao, W. Shen, Z. Chen, T. Wu // *Carbohydr. Polym*. – 2016. – V. 148. – P. 45–51.
88. Uppal R. Hyaluronic Acid Nanofiber Wound Dressing-Production, Characterization, and In Vivo Behavior / R. Uppal, G.N. Ramaswamy, C. Arnold, R. Goodband, Y.J. Wang // *Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater*. – 2011. – V. 97. – P. 20–29.
89. Shu X.Z. In Situ Crosslinkable Hyaluron Hydrogels for Tissue Engineering / X.Z. Shu, Y. Liu, F.S. Palumbo, Y. Luo, G.D. Prestwich // *Biomaterials*. – 2004. – V. 25. – № 7. – P. 1339–1348.
90. Yun Y. H. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting / Y.H. Yun, D.J. Goetz, P. Yellen, W. Chen // *Biomaterials*. – 2004. – V. 25. – P. 147–157.
91. Carvalho M. P. Tumor spheroid assembly on hyaluronic acid-based structures: A review / M.P. Carvalho, E.C. Costa, S.P. Miguel., I.J. Correia // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – V. 150. – P. 139–148.
92. Collins M.N. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering – A review / M.N. Collins, C. Birkinshaw // *Carbohydrate Polymers*. – 2013. – V. 92. – № 2. – P. 1262–1279.
93. Scott J.E. Secondary structure of hyaluronate in solution. A¹H-n.m.r. investigation at 300 and 500 MHz in [2H₆]dimethyl sulphoxide solution / J.E. Scott, F. Heatley, W.E. Hull // *Biochemical Journal*. – 1984. – V. 220. – № 1. – P. 197–205.

94. Milas M., Rinaudo M. In Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. – New York: CRC Press, 2004. – P. 535.
95. Luan T. A study on the nature of intermolecular links in the cryotropic weak gels of hyaluronan / T. Luan, L. Wu, H. Zhang, Y. Wang // Carbohydrate Polymers. – 2012. – V. 87. – № 3. – P. 2076–2085.
96. Ström A. Preparation and physical properties of hyaluronic acid-based cryogels / A. Ström, A. Larsson, O. Okay // Journal of Applied Polymer Science. – 2015. – V. 132. – № 29. – P. 42194.
97. Oelschlaeger C. Synthesis, Structural and Micromechanical Properties of 3D Hyaluronic Acid-Based Cryogel Scaffolds / C. Oelschlaeger, F. Bossler, N. Willenbacher // Biomacromolecules. – 2016. – V. 17. – № 2. – P. 580–589.
98. Lohre J.M. Evaluation of epoxy ether fixed bovine arterial grafts for mutagenic potential / J.M. Lohre, L. Baclig, E. Wickham, S. Guida, J. Farley, K. Thyagarajan, R. Tu, R.C. Quijano // Am. Soc. Artif. Intern. Org. J. – 1993. – V. 39. – P. 106–113.
99. Nishi C. In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification / C. Nishi, N. Nakajima, Y. Ikada // Journal of Biomedical Materials Research. – 1995. – V. 29. – № 7. – P. 829–834.
100. Sung H.W. Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation / H.W. Sung, R.N. Huang, L.L.H. Huang, C.C. Tsai, C.T.J. Chiu // Biomed. Mat. Res. – 1998. – V. 42. – P. 560–567.
101. Selyanin M.A., Boykov P.Y., Khabarov V.N. Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine. – New York: John Wiley, 2015. – P. 97-115.
102. Orakdogan N. Macroporous, responsive DNA cryogel beads / N. Orakdogan, P. Karacan, O. Okay // Reactive and Functional Polymers. – 2011. – V. 71. – № 8. – P. 782–790.
103. Xu J., Labin T.H., Craig S.L. Chiferry A. Supramolecular Polymers. – Boca Raton: CRC Press, 2004. – Ch. 12. – P. 445.

104. Bloomfield V.A., Crothers D.M., Tinoco I. Jr. *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions* University. – Sausalito: University Science Books, 2000.
105. Dandliker P. J. Oxidative Thymine Dimer Repair in the DNA Helix // *Science*. – 1997. – V. 5305. – № 275. – P. 1465–1468.
106. Yamada M. UV-Irradiated DNA Matrixes Selectively Bind Endocrine Disruptors with a Planar Structure / M. Yamada, K. Kato, M. Nomizu, K. Ohkawa, H. Yamamoto, N. Nishi // *Environmental Science & Technology*. – 2016. – V. 36. – № 5. – P. 949–954.
107. Dobashi T. DNA Liquid-Crystalline Gel as Adsorbent of Carcinogenic Agent / T. Dobashi, K. Furusawa, E. Kita, Y. Minamisawa, T. Yamamoto // *Langmuir*. – 2007. – V. 23. – P. 1303.
108. Okay O. DNA hydrogels: New functional soft materials // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. – 2011. – V. 49. – № 8. – P. 551–556.
109. Karacan P. Ethidium bromide binding to DNA cryogels / P. Karacan, O. Okay // *Reactive and Functional Polymers*. – 2011. – V. 73. – № 3. – P. 442–450.
110. Rosa M. DNA–Cationic Surfactant Interactions Are Different for Double- and Single-Stranded DNA / M. Rosa, R. Dias, M. da Graça Miguel, B. Lindman // *Biomacromolecules*. – 2005. – V. 6. – № 4. – P. 2164–2171.
111. Kimura T.T. PVA–DNA Cryogel Membranes: Characterization, Swelling, and Transport Studies / T.T Kimura., A. Okuno, K. Miyazaki, T. Furuzono, Y. Ohya, T. Ouchi, S. Mutsuo, H. Yoshizawa, Y. Kitamura, T. Fujisato, A. Kishida // *Mater. Sci. Eng.* – 2004. – V. 24. – P. 797–801.
112. Basu S. Fabricating Tough Interpenetrating Network Cryogels with DNA as the Primary Network for Biomedical Applications / S. Basu, R. Johl, S. Pacelli, S. Gehrke, A. Paul // *ACS Macro Letters*. – V. 9. – P. 1230–1236.
113. Russo R. Effect of Cross-Linking with Calcium Ions on the Physical Properties of Alginate Films / R. Russo, M. Malinconico, G. Santagata // *Biomacromolecules*. – 2007. – V. 8. – № 10. – P. 3193–3197.
114. Fatih A. Macroporous silk fibroin cryogels / A. Fatih, Z. Oztoprak, I. Karakutuk, O. Okay // *Biomacromol.* – 2013. – V. 14. – P. 719.

115. Zhu H. Salt-leached silk scaffolds with tunable mechanical properties / H. Zhu, D. Yao, S. Dong, Q. Lu, D.L. Kaplan, B. Zhang // *Biomacromol.* – 2012. – V. 13. – P. 3723.
116. Chevally B. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy / B. Chevally, D. Herbage // *Medical & Biological Engineering & Computing.* – 2000. – V. 38. – № 2. – P. 211–218.
117. Engel J., Bächinger H.P. Structure, stability and folding of the collagen triple helix. – Netherlands : Springer, 2005. – P. 7-33.
118. Lee C.H. Biomedical applications of collagen International / C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee // *Journal of Pharmaceutics.* – 2001. – V. 221. – P. 1–222.
119. Madhan B. Study on the stabilisation of collagen with vegetable tannins in the presence of acrylic polymer / B. Madhan, C. Muralidharan, R. Jayakumar // *Biomaterials.* – 2002. – V. 23. – P. 2841–2847.
120. Sherman V.R. The materials science of collagen / V.R. Sherman, W. Yang, M.A. Meyers // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* – 2015. – V. 52. – P. 22.
121. Gayatri R. Chromium(III)-Induced Structural Changes and Self-Assembly of Collagen / R. Gayatri, A.K. Sharma, R. Rajaram, T. Ramasami // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2001. – V. 283. – № 1. – P. 229–235.
122. Sheu M.T. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture / M.T. Sheu, J.C. Huang, G.C. Yeh, H.O. Ho // *Biomaterials.* – 2001. – V. 22. – № 13. – P. 1713–1719.
123. Fathima N.N. Interaction of aldehydes with collagen: effect on thermal, enzymatic and conformational stability / N.N. Fathima, B. Madhan, J.R. Rao, B.U. Nair, T. Ramasami // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2004. – V. 34. – № 4. – P. 241–247.
124. Dunn M.W. Collagen Implants in the Vitreous / M.W. Dunn, K.H. Stenzel, A.L. Rubin // *Archives of Ophthalmology.* – 1969. – V. 82. – № 6. – P. 840–844.

125. Wu K.J. Effect of glutaraldehyde on the humoral immunogenicity and structure of porcine dermal collagen membranes / K.J. Wu, C.Y. Wang, H.K. Lu // Arch. Oral Biol. – 2004. – V. 49. – P. 305–311.
126. Mu C. Collagen cryogel cross-linked by dialdehyde starch Macromol / C. Mu, F. Liu, Q. Cheng, H. Li, B. Wu, G. Zhang, W. Lin // Mater. Eng. – 2010. – V. 295. – № 2. – P. 100–107.
127. Rhim J.W. Soy Protein Isolate–Dialdehyde Starch Films / J.W. Rhim, A. Gennadios, C.L. Weller, C. Cezeirat, M.A. Hanna // Ind. Crops Prod. – 1998. – V. 8. – № 3. – P. 195–203.
128. Skopinska-Wisniewska J. Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration / J. Skopinska-Wisniewska, A. Sionkowska, A. Kaminska, A. Kaznica, R. Joachimiak, T. Drewna // Appl Surf Sci. – 2009. – V. 255. – P. 8286–8292.
129. Mita K. Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene / K. Mita, S. Ichimura, T.C. James // J. Mol. Evol. – 1994. – V. 38. – P. 583–592.
130. Takahashi Y. Crystal structure of silk (*Bombyx mori*) / Y. Takahashi, M. Gehoh, K. Yuzuriha // J. Polym. Sci. – 2010. – V. 29. – P. 889–891.
131. Lotz B. The chemical structure and the crystalline structures of *Bombyx mori* silk fibroin / B. Lotz, F. Colonna Cesari // Biochimie. – 1979. – V. 61. – P. 205–214.
132. Grasset L. Woven silk as a carrier for the immobilization of enzymes / L. Grasset, D. Cordier, A. Ville // Biotechnol. Bioeng. – 1977. – V. 19. – P. 611–618.
133. Grasset L. Immobilization of alkaline phosphatase on silk using diazo, adsorption, glutaraldehyde, and azide method: Optimum pH and properties of the conjugates / L. Grasset, D. Cordier, R. Couturier, A. Ville // Biotechnol. Bioeng. – 1983. – V. 25. – P. 1423–1434.
134. Inoue S. Silk Fibroin of *Bombyx mori* is Secreted, Assembling a High Molecular Mass Elementary Unit Consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 Molar Ratio / S. Inoue, K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo, S. Mizuno // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275. – P. 40517–40528.

135. Omenetto F.G. New opportunities for an ancient material / F.G. Omenetto, D.L. Kaplan // *Science*. – 2010. – V. 329. – №. 5991. – P. 528–531.
136. Keten S. Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of [beta]-sheet crystals in silk / S. Keten, Z. Xu, B. Ihle., r M.J. Buehle // *Nat. Mater.* – 2010. – V. 9. – №. 1. – P. 359–367.
137. Omenetto F.G. New opportunities for an ancient material / F.G. Omenetto, D.L. Kaplan // *Science*. – 2010. – V. 329. – P. 528–531.
138. Zhou C.Z. Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene / C.Z. Zhou, F. Confalonieri, N. Medina, c Y. Zivanovi, C. Esnault, T. Yang, M. Jacquet, J. Janin, M. Duguet, R. Perasso, Z.G. Li // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28. – P. 2413–2419.
139. Jin H.J. Mechanism of silk processing in insects and spiders / H.J. Jin, D.L. Kaplan // *Nature*. – 2003. – V. 424. – P. 1057–1061.
140. Jin H.J. Transition to a beta-sheet-rich structure in spidroin in vitro: the effects of pH and cations / H.J. Jin, J.M. Kenney, D. Knight, F. Vollrath // *Biochemistry*. – 2003. – V. 43. – P. 14080–14087.
141. Zong X.H. Effect of pH and copper(II) on the conformation transitions of silk fibroin based on EPR, NMR, and Raman spectroscopy / X.H. Zong, P. Zhou, Z.Z. Shao, S.M. Chen, X. Chen, B.W. Hu, F. Deng, W.H. Yao // *Biochemistry*. – 2003. – V. 43. – P. 11932–11941.
142. Kim U.J. Structure and properties of silk hydrogels / U.J. Kim, J. Park, i C. L, H.J. Jin, R. Valluzzi, D.L. Kaplan // *Biomacromolecules*. – 2003. – V. 5. – P. 786–792.
143. Matsumoto A. Silk fibroin solution properties related to assembly and structure / A. Matsumoto, A. Lindsay, B. Abedian, D.L. Kaplan // *Macromol. Biosci.* – 2008. – V. 8. – P. 1006–1018.
144. Hossain K.S. Dynamic light scattering of native silk fibroin solution extracted from different parts of the middle division of the silk gland of the *Bombyx mori* silkworm / K.S. Hossain, A. Ochi, J. Magoshi, N. Nemoto // *Biomacromolecules*. – 2003. – V. 4. – P. 350–359.

145. Chen X. Conformation transition in silk protein films monitored by time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy: effect of potassium ions on *Nephila spidroin* films / X. Chen, D.P. Knight, Z.Z. Shao, F. Vollrath // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – P. 14944–14950.
146. Karakutuk I. Diepoxide-Triggered Conformational Transition of Silk Fibroin: Formation of Hydrogels / I. Karakutuk, F. Ak, O. Okay // *Biomacromolecules*. – 2012. – V. 13. – № 4. – P. 1122–1128.
147. Ak F. Macroporous silk fibroin cryogels / F. Ak, Z. Oztoprak, I. Karakutuk, O. Okay // *Biomacromolecules*. – 2013. – V. 14. – № 3. – P. 719–727.
148. Allan I. U. An in vitro evaluation of fibrinogen and gelatin containing cryogels as dermal regeneration scaffolds / I. U. Allan, B. A. Tolhurst, o R. VShevchenk., M. B. Dainiak, M. Illsley, A. Ivanov, S. E. James // *Biomaterials Science*. – 2016. – V. 4. – № 6. – P. 1007–1014.
149. Kirsebom H. Enzyme-Catalyzed Crosslinking in a Partly Frozen State: A New Way to Produce Supermacroporous Protein Structures / H. Kirsebom, L. Elowsson, D. Berillo, S. Cozzi, I. Inci, E. Piskin, B. Mattiasson // *Macromolecular Bioscience*. – 2012. – V. 13. – № 1. – P. 67–76.
150. Butler A.R. Catalysis in Water and Ice. A Comparison of the Kinetics of Hydrolysis of Acetic Anhydride, β -Propiolactone, and p-Nitrophenyl Acetate and the Dehydration of 5-Hydro-6-hydroxy-deoxyuridine in Water and in Ice / A.R. Butler, T.C. Bruice // *J. Am. Chem. Soc.* – 1964. – V. 86. – P. 313.
151. Tong M.M. Denaturation and reactivity of invertase in frozen solutions / M.M. Tong, R.E. Pincock // *Biochemistry*. – 1969. – V. 8. – № 3. – P. 908–913.
152. McDermott M.K. Mechanical Properties of Biomimetic Tissue Adhesive Based on the Microbial Transglutaminase-Catalyzed Crosslinking of Gelatin / M.K. McDermott, T. Chen, C.M. Williams, K.M. Markley, G.F. Payne // *Biomacromolecules*. – 2004. – V. 5. – № 4. – P. 1270–1279.
153. Wool R.P., Sun X.S. *Bio-based polymers and composites*. Boston: Elsevier Academic Press, 2005.

154. Santos T.C. Chitosan Improves the Biological Performance of Soy-Based Biomaterials / T.C. Santos, A.P. Marques, S.S. Silva, J.M. Oliveira, J.F. Mano, A.G. Castro, R.L. Reis // *Tissue Engineering*. – 2010. – V. 16. – № 9. – P. 28830–2890.
155. Vaz C.M. Soy matrix drug delivery systems obtained by melt-processing techniques / C.M. Vaz, P.F.N.M. Van Doeveren, R.L. Reis, A.M. Cunha // *Biomacromolecules*. – 2003. – V. 4. – № 6. – P. 1520–1529.
156. Chien K.B. Novel soy protein scaffolds for tissue regeneration: Material characterization and interaction with human mesenchymal stem cells / K.B. Chien, R.N. Shah // *Acta Biomater.* – 2012, V. – 8. – №. 2. – P. 694–703.
157. Peters T. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Application. London: Academic Press, 1995.
158. Roufegarinejad L. Molecular interactions of thymol with bovine serum albumin: spectroscopic and molecular docking studies / L. Roufegarinejad, A. Jahanban-Esfahlan, S. Sajed-Amin, V. Panahi-Azar, M. Tabibiazar // *J. Mol. Recognit.* – 2018, V. – 31. – №. 7. – P. e2704.
159. Warnecke A. Synthesis and biological activity of water-soluble maleimide derivative of the anticancer drug carboplatin de-signed as albumin-binding prodrugs / A. Warnecke, I. Fichtner, D. Garmenn, U. Jaehde, F. Kratz // *Bioconjug. Chem.* – 2004. – V. 15. – №. 6. – P. 1349–1359.
160. Sung C. An IFN- β -albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in nonhuman primates / 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 // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2003. – V. 23. – №. 1. – P. 25–36.
161. Faller A., Schünke M., Schünke G. *The Human Body*. – New York: Thieme Medical Publishers Inc., 2004. – P. 259–306.
162. Elowsson L. Evaluation of macroporous blood and plasma scaffolds for skeletal muscle tissue engineering / L. Elowsson, H. Kirsebom, V. Carmignac, n B. Mattiasso, M. Durbeej // *Biomaterials Science*. – 2003. – V. 1. – №. 4. – P. 402–410.

163. Papageorgiou G.C. Immobilization of photosynthetically active cyanobacteria in glutaraldehyde-crosslinked albumin matrix / G.C. Papageorgiou, T. Lagoyanni // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1986. – V. 23. – №. 6. – P. 417–423.
164. Şeker Ş. Macroporous elastic cryogels based on platelet lysate and oxidized dextran as tissue engineering scaffold: *In vitro* and *in vivo* evaluations / Ş. Şeker, A.E. Elçin, Y.M. Elçin // *Materials Science and Engineering*. – 2003. – V. 110. – P.110703.
165. Ямсков И.А. Физико-химические свойства новой группы регуляторных белков, выделенных из различных тканей млекопитающих / И.А. Ямсков, И.В. Благодатских, М.С. Краснов, о А.В. Борисенк, Д.В. Маргасюк, В.В. Вечеркин, В.С. Скрипников, П.А. Назаров, С.А. Битко, Б.Б. Березин, И.В. Яминский, Г.Б. Мешков, С.А. Грачев, М.В. Серебрякова, Е.Ю. Рыбакова, В.П. Ямскова // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2009. – №. 3. – С. 623–628.
166. Ямскова В.П. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения / В.П. Ямскова, М.С. Краснов, И.А. Ямсков – М.: МАКС Пресс, 2009. – С. 84.
167. Ямскова В.П. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов / В.П. Ямскова, М.С. Краснов, И.А. Ямсков И.А. – Saarbrucken: Lambert Academic Publishing, 2012. – С. 136.
168. Буеверова Э.И. Действие адгезионного фактора сыворотки крови на пролиферацию клеток млекопитающих *in vitro* / Э.И. Буеверова, Е.В. Брагина, М.М. Резникова, В.П. Ямскова, Н.Г. Хрущов // *ДАН СССР*. – 1985. – Т. 281. – № 1. – С. 158–160.
169. Ямскова В.П. Сравнительное исследование действия экстрактов печени мышей линии С57В1 и СВА на адгезию гепатоцитов / В.П. Ямскова, Н.Б. Туманова, А.С. Логинов // *Бюлл. exper. биол. и мед.* – 1990. – № 3. – С. 303–306.
170. Туманова Н.Б. Влияние макромолекулярных адгезионных факторов на пролиферацию гепатоцитов в органных культурах эмбриональной печени

- мышей / Н.Б. Туманова, Н.В. Попова, В.П. Ямскова // Известия Акад. наук. Серия биол. – 1996. – № 6. – С. 653–657.
171. Краснов М.С. Модель органотипического культивирования сетчатки вместе с тканями заднего сектора глаза тритона для изучения действия адгезивных гликопротеинов / М.С. Краснов, Э.Н. Григорян, В.П. Ямскова // Изв. Акад. Наук. Серия биол. – 2003. – № 1. – С. 22–36.
172. Краснов М.С. Регуляторные белки тканей глаза позвоночных / М.С. Краснов, Э.Н. Григорян, В.П. Ямскова, Д.В. Богуславский, И.А. Ямсков // Радиционная биология и радиоэкология. – 2003. – № 3. – С. 265–268.
173. Краснов М.С. Исследование влияния регуляторного белка, выделенного из хрусталика глаза быка, на катарактогенез у крыс *in vitro* / М.С. Краснов, Е.П. Гурмизов, В.П. Ямскова, Р.А. Гундорова, И.А. Ямсков // Вестник офтальмологии. – 2005. – Т. 121. – № 1. – С. 37–39.
174. Краснов М.С. Модель катарактогенеза позвоночных животных *in vitro* / М.С. Краснов, Е.П. Гурмизов, Р.А. Гундорова, В.П. Ямскова, Ю.А. Капитонов // Офтальмология. – 2005. – Т. 2. – № 2. – С. 43–49.
175. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A. Biochemical Physics Frontal Research. – NY: Nova Science Publishers Inc., 2007. – P. 49–56.
176. Маргасюк Д.В. Исследование влияния на клеточную пролиферацию в роговице глаза тритона адгезивного белка, выделенного из роговицы глаза быка / Д.В. Маргасюк, Э.Н. Григорян, В.П. Ямскова // Изв. РАН Сер. Биол. – 2005. – № 6. – С. 738–743.
177. Ямскова В.П. Экспериментальные модели культивирования тканей глаза тритона *Pleurodeles waltl* для исследования специфического действия активного в сверхмалых дозах биорегулятора склеры / В.П. Ямскова, М.С. Краснов, В.С. Скрипникова, И.А. Ямсков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 4. – С. 393–395.
178. Ямскова В.П. Структурно-функциональные особенности нового биорегулятора, выделенного из ткани пигментного эпителия глаза быка / В.П.

- Ямскова, В.С. Скрипникова, А.А. Молявка, А.П. Ильина, М.С. Краснов, Д.В. Маргасюк, А.В. Борисенко, Б.Б. Березин, Е.С. Кузнецова, А.К. Буряк, И.А. Ямсков // Биохимия. – 2009. – Т. 741. – № 9. – С. 1195–1203.
179. Ямскова В.П. Исследование белка-инактиватора адгезивного гликопротеина из сыворотки крови млекопитающих / В.П. Ямскова, Е.Ю. Рыбакова, А.А. Виноградов, В.В. Вечеркин, И.А. Ямсков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 401. – № 4. – С. 407–413.
180. Ильина А. П. Исследование структуры биорегулятора, выделенного из головного мозга крыс / А.П. Ильина, А.А. Молявка, В.П. Ямскова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50. – № 4. – С. 442–448.
181. Ильина А.П. Идентификация новых пептидов из межклеточного пространства методом MALDI TOF-масс-спектрометрии / А.П. Ильина, О.Г. Куликова, Д.И. Мальцев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47. – № 2. – С. 135–140.
182. Ямсков И.А. Низкомолекулярный гликопротеин из сыворотки крови крупного рогатого скота: структура и свойства / И.А. Ямсков, А.А. Виноградов, А.Н. Даниленко, Л.А. Маслова, Е.Ю. Рыбакова, В.П. Ямскова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37. – № 1. – С. 36–42.
183. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V. 227. – №. 5259. – P. 680–685.
184. Warburg O. Isolierung und kristallisation des garungfermens enolase / O. Warburg, W. Christian // Biochem. Ztschr. – 1941. – V. 310. – P. 384–421.
185. Edman P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides // Arch. Biochem. – 1949. – V. 22. – №. 3. – P. 475.
186. Brown W. Dynamic Light Scattering. The Method and Some Applications. New York: Oxford University Press., 1993.
187. Provencher S.W. Inverse problems in polymer characterization: Direct analysis of polydispersity with proton correlation spectroscopy // Macromol. Chemistry. – 1949. – V. 180. – P. 201–209.

188. Kelly S.M. How to study proteins by circular dichroism / S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – №. 1751. – P. 119–139.
189. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Наговицын А.В., Краснов М.С. Способ получения лекарственного средства для лечения катаракты // Пат. РФ № 2315507 (2005).
190. Li P. A novel albumin-based tissue scaffold for autogenic tissue engineering applications / P. Li, I. Lee, W. Yu, J. Sun, W. Jane, H. Shen // *Sci. Rep.* – 2014. – V. 4. – №. 5600. – Article # 5600.
191. Dainiak M.B. Gelatin–fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimisation and in vitro study / 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 // *Biomaterials.* – 2010. – V. 31. – №. 1. – P. 67–76.
192. Azzazy E., Christenson R.H. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. USA: Academic Press: Cambridge, 1996. – P. 432.
193. Putman F.W. The Plasma Proteins, 2nd ed. Netherlands: Acad. Press Inc., 1975. – V. 1. – P. 497.
194. Görg A. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of proteins A. / Görg, W. Postel, J. Weser, H.W. Schiwara, W.H. Boesken // *Sci. Tools.* – 1985. – V. 32. – №. 1. – P. 5–9.
195. Keren D.F. Electrophoresis in Clinical Diagnosis. London: Edward Arnold Ltd., 2003. – P. 256.
196. Agarwal P. Bisalbuminemia: A Rare Finding on Serum Electrophoresis / P. Agarwal, A. Parkash, N. Tejwani, A. Mehta // *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* – 2018. – V. 34. – P. 558–559.
197. Ichikawa T. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry / T. Ichikawa, H. Terada // *Chem. Pharm.* – 1981. – V. 29. – P. 438–444.
198. Chudvik M. Spectroscopic studies on the molecular ageing of serum albumin / M. Chudvik, M. Maciążek-Jurczyk, B. Pawełczak, A. Sułkowska // *Molecules.* – 2017. – V. 22. – P. 34.

199. Woody R.W., Dunker A.K. Aromatic and cystine side-chain circular dichroism protein. In Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. US: Springer-Verlag, 1996. – P. 109-157.
200. Manavalan P. Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class / P. Manavalan, W.C.Jr. Johnson // Nature. – 1983. – V. 305. – P. 831–832.
201. Abrosimova K.V. FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin / K.V. Abrosimova, O.V. Shulenina, S.V. Paston // J. Phys. Conf. Ser. – 2016. – №. 769. – P. e012016.
202. Aoki K. Heat denaturation of bovine serum albumin. I. Analysis by acrylamide-gel electrophoresis / K. Aoki, K. Hiramatsu, K. Kimura, S. Kaneshina, Y. Nakamura, K. Sato // Bull. Inst. Chem. Res. – 1969. – T. 47. – P. 274–282.
203. Borzova V.A. Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin / V.A. Borzova, K.A. Markossian, N.A. Chebotareva, S.Y. Kleymenov, N.B. Poliansky, K.O. Muranov, V.A. Stein-Margolina, V.V. Shubin, D.I. Markov, B.I. Kurganov // PLOS ONE. – 2016. – V. 11. – P. e0153495.
204. Wyatt A.R. Extracellular chaperones and proteostasis / A.R.Wyatt, J.J. Yerbyry, H. Ecroyd, M.R. Wilson // Ann. Rev. Biochem. – 2013. – V. 82. – P. 295–322.
205. Ueki T. Aggregation of bovine serum albumin upon cleavage of its disulfide bounds, studied by the time-resolved small-angle x-ray scattering technique with synchrotron radiation / T. Ueki, Y. Hiragi, M. Kataoka, Y. Inoko, Y. Ameniya, Y. Izumi, H. Tagawa, Y. Muroga // Biophys. Chem. – 1985. – V. 23. – P. 115–124.
206. Wang C.H. Raman characterizing disulfide bonds and secondary structure of bovine serum albumin / C.H. Wang, W. Chen // AIP Conf. Proc. – 2010. – V. 1267. – №. 1. – P. 346–347.
207. Davidson B.E. The reactivity of the disulfide bonds of purified proteins in relationship to primary structure / B.E. Davidson, F.Y. Hird // J. Biochem. – 1967. – V. 104. – №. 1. – P. 473–479.
208. Swaminathan R. Lysozyme: a model protein for amyloid research / R. Swaminathan, V.K. Ravi, S. Kumar, M.V.S. Kumar, N. Chandra // Adv. Protein Chem. Struct. Biol. – 2011. – V. 84. – P. 63–111.

209. Merlini G. Molecular mechanisms of amyloidosis / G. Merlini, V. Bellotti // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – V. 349. – P. 583–596.
210. Arnaudov L.N. Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme / L.N. Arnaudov, R. de Vries // *Biophys. J.* – 2005. – V. 88. – P. 515–526.
211. Usuki S. Denaturation of Lysozyme with Visible-light-responsive Photocatalysts of Ground Rhodium-doped and Ground Rhodium-antimony-co-doped Strontium Titanate / S. Usuki, K. Yamatoya, Y. Kawamura, i Y. Yamaguch, i N. Suzuk, K. Katsumata, K. Nakata // *Journal of Oleo Science.* – 2018. – V. 67. – № 12. – P. 1521–1533.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СИДОРСКОГО ЕГОРА ВЛАДИМИРОВИЧА

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 альбуминовой губки, содержащей биорегулятор / М.С. Краснов, А.И. Шайхалиев, Е.В. Коршаков, Г.А. Гасбанов, Л.Д. Аразашвили, Т.Р. Давыдова, Е.С. Сеницкая, 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. Yamskov // Biochemistry and biophysics reports. – 2020. – V. 24. – P. 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. Lozinsky // Gels. – 2020. – V. 6. – №. 4 – 50.
6. Шайхалиев А.И. Индукция остеогенеза костной ткани нижней челюсти кролика с использованием криогенно-структурированного губчатого альбуминового 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. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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 и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург, РФ, 2018, С. 80.
12. 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.
13. Краснов М.С., Шайхалиев А.И., Ямскова В.П., Сидорский Е.В., Лозинский В.И. Исследование эффективности нового биополимерного материала, содержащего белково-пептидный комплекс из сыворотки крови, для челюстно-лицевой хирургии // 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.