Сидорский Егор Владимирович. Синтез, свойства и применение в качестве биосовместимых носителей веществ пептидной природы широкопористых криогелей на основе белков сыворотки крови;[Место защиты: ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»], 2023

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

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 in situ 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 in vitro 58

2.3.16. In vivo 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

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. In vitro биотестирование криогелей на основе сыворотки крови в

качестве носителя белково-пептидного биорегулятора ткани склеры 94

3.2.12. In vivo 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

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 а-спиралей этих белков и перехода их в P-структурированное состояние.

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

Найдено, что в состав полимерной сетки полученных криогелей помимо цепей сывороточного альбумина включаются полипетиды, 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