

УДК 541.64:539.2:547.9

БИОСОВМЕСТИМЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫЕ КРИОГЕЛЕВЫЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ БЕЛКА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

©2024 г. М. С. Леонович^{a,b}, В. А. Коржииков-Влах^{a,*}, Е. Г. Коржиикова-Влах^b, И. А. Гурьянов^a, О. Н. Бревнов^a, Т. Б. Тенникова^a

^aСанкт-Петербургский государственный университет, Институт химии, 198504 Санкт-Петербург, Петергоф, Университетский пр., 26, Россия

^bИнститут высокомолекулярных соединений Российской академии наук 199004 Санкт-Петербург, Большой пр., 31, Россия

*e-mail: v.korzhiikov-vlakh@spbu.ru

Поступила в редакцию 21.03.2024 г.

После доработки 13.05.2024 г.

Принята к публикации 23.05.2024 г.

В условиях различного соотношения и содержания мономеров в полимеризационной смеси получена серия молекулярно-импринтированных и неимпринтированных криогелей на основе сополимера 2-гидроксиэтилметакрилата с *N,N'*-метилден-*бис*-акриамидом. Полученные материалы были охарактеризованы с точки зрения морфологии поверхности, способности к набуханию, среднего размера пор и пористости, а также механических характеристик на сжатие. Кроме того, была проведена сравнительная оценка адсорбционных свойств молекулярно-импринтированных и неимпринтированных криогелей в отношении целевого белка (α -химотрипсина) в динамическом режиме, а также биосовместимости криогелей *in vitro* с использованием двух клеточных линий.

DOI: 10.31857/S2308112024010034 EDN: NLNEKQ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время аффинные методы широко применяются в различных областях биотехнологии и медицины, включая очистку биомолекул, клеток, вирусов, а также диагностику тех или иных заболеваний, доставку лекарств и т.д. [1–6]. В связи с этим распознавание, выделение и очистка свободных белков, а также содержащих белки биологических объектов, таких как клетки и вирусы, являются важными и актуальными направлениями исследований.

Молекулярный импринтинг представляет собой метод, позволяющий искусственно создавать сайты молекулярного распознавания в полимерных матрицах для селективного связывания различных молекул [7–9], включая белки [10, 11]. Метод молекулярного импринтинга заключается в создании предполимеризационного комплекса между молекулой-шаблоном и функциональным мономером, с последующим сшиванием системы и формированием импринт-сайта в сшитой полимерной сетке [12]. После образования полимерной матрицы молекулы-шаблоны удаляются, и готовый сорбент содержит участки селективного молекулярного распознавания, представля-

ющие собой молекулярные отпечатки, по форме и функциональности комплементарные молекуле-шаблону [12–14]. Молекулярно-импринтированные полимерные системы (МИП) весьма привлекательны ввиду относительной простоты их получения, высокой стабильности и при этом селективности и специфичности, зачастую сопоставимыми с параметрами природных аффинных пар [15]. Кроме того, данные материалы выдерживают более жесткие условия применения, чем аффинные системы, несущие иммобилизованные природные лиганды [16].

Макропористые МИП-сорбенты широко используются в качестве неподвижных фаз в различных областях: высокоэффективной жидкостной хроматографии [17], твердофазной экстракции [18], органическом катализе [16], а также в качестве сенсоров [19]. Также хроматография на МИП-колонках оказалась конкурентоспособной альтернативой аффинной хроматографии при разделении диастереомеров, энантиомеров, соединений с несколькими хиральными центрами и их различных аналогов [20]. МИП-сорбенты зарекомендовали себя как материалы с высокой механической, химической

устойчивостью; результаты, получаемые при использовании материалов подобного типа, характеризуются хорошей воспроизводимостью [12].

Белки являются важными маркерами некоторых заболеваний, а импринтинг белков представляет один из возможных инструментов для создания биомиметических рецепторов с антителоподобными специфическими сайтами узнавания. По сравнению с импринтингом низкомолекулярных соединений ввиду множества причин, таких как большой размер молекул, их структурная и химическая сложность, ограниченная растворимость в органических растворителях и низкая стабильность, импринтинг биомакромолекул все еще остается нетривиальной задачей [21, 22].

Для создания МИП-системы с отпечатками белков необходимо подобрать подходящую полимерную матрицу, которая обеспечивала бы взаимодействие белковых молекул с сайтами распознавания с минимальным вкладом диффузионных ограничений. Высокая проницаемость, а также отсутствие диффузионных затруднений при сорбции и десорбции веществ в достаточно широком диапазоне значений молекулярных масс может быть достигнута при использовании макро- и сверхмакропористых материалов с высокой внутрипоровой связностью. С этой точки зрения к одним из перспективных типов сверхмакропористых материалов для импринтинга белков относятся криогели.

Криогели представляют собой сшитые пористые полимерные матрицы, полученные при неглубоком замораживании раствора мономеров или полимера, обеспечивающим с одной стороны кристаллизацию воды, а с другой – протекающие низкотемпературных реакций, приводящих к образованию полимерной сетки [12, 22–24]. Вследствие способности поглощать и удерживать значительные объемы жидкости криогели стали предметом пристального изучения в целом ряде областей [25–27]. Основным преимуществом использования криогелей является сверхмакропористый характер их структуры, а также хорошая проницаемость внутрипорового пространства, что приводит к улучшенным гидродинамическим свойствам [28, 29]. Наличие пор размером в десятки, а иногда и сотни, микрометров, а также общая высокая пористость криогелей обуславливают преобладание конвективного механизма массопереноса при пропускании через них потока растворенных веществ. Эти особенности позволяют применять их не только в хроматографическом разделении белков [10, 18, 30–32], но и для разделения больших частиц, вирусов [26] и даже клеток [25]. Кроме того, криогели нашли широкое применение в доставке лекарственных препаратов [33], микробиологии [34] и биотехнологии [35],

а также в качестве скаффолдов для тканевой инженерии [36–38].

В настоящей работе изучена возможность получения биосовместимых матриц криогеля на основе сополимера 2-гидроксиэтилметакрилата с *N,N'*-метилден-бис-акриамидом, содержащих молекулярные отпечатки модельного белка — α -химотрипсина. Полученные материалы были охарактеризованы с точки зрения морфологии поверхности, способности к набуханию, среднего размера пор и пористости, механических характеристик на сжатие, биосовместимости *in vitro* и адсорбционных свойств в отношении импринтированного целевого белка (α -химотрипсина).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Мономеры: 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА), *N,N'*-метилден-бис-акриамид (МБАА); инициаторы: аммония пероксодисульфат (АПС), *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин (ТМЭДА) были приобретены в компании “Sigma-Aldrich” (Германия). α -химотрипсин из бычьей поджелудочной железы ($M = 27 \times 10^3$) поставлен компанией “Sigma-Aldrich” (Германия).

Соли для приготовления буферных растворов являлись продуктами компаний “Fluka” (Швейцария), “Sigma-Aldrich” (Германия), “Вектон” (Россия) и ROTH (Германия). Гидроокись натрия, соляная кислота и параформальдегид – продукты компаний “Вектон” (Россия), “Сигма Тэк” (Россия) и “Merck” (Германия) соответственно. Реактив Фолина–Чокальтеу был приобретен в компании “Sigma-Aldrich” (Германия). Буферные растворы готовили путем растворения соответствующих компонентов в дистиллированной воде.

Базальные среды: α -MEM (alpha modified Eagle’s minimal essential medium) и ДМЕМ (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium) являлись продуктами компаний “ThermoFisher” (Германия) и “Sigma-Aldrich” (Германия). Сыворотка человека группы крови АВ, эмбриональная бычья сыворотка, гентамицин, пенициллин/стрептомицин были приобретены в компаниях “СС-pro” (Германия) и “Merck” (Германия).

Для работы с клетками готовили питательные клеточные среды следующего состава: α -MEM с добавлением 2.2 г/л гидрокарбоната натрия, 10% сыворотки человека группы крови АВ и 0.5% гентамицина; ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина.

Флуоресцентные красители: CellTiter-Blue (СТВ), кальцеин-ацетоксиметил (Calcein-AM; Cal-AM), пропиций йодид (PI) и 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) были продуктами компаний "Promega" (США), "Sigma-Aldrich" (Германия) и "Merck" (Германия). Изучение цитотоксичности и биосовместимости проводили в 24- и 96-луночных планшетах (TPP, "Trasadingen", Швейцария).

Перед дозированием в хроматографическую систему растворы белка фильтровали через шприцевые фильтры МСЕ "MicroLab Scientific Co" (диаметр пор 45 мкм, Китай). Коммерчески доступные реагенты и растворители, если не указано отдельно, использовали без дополнительной очистки.

Методы

Синтез криогелей с молекулярными отпечатками α -химотрипсина. Для получения молекулярно-импринтированных полимеров навеску α -химотрипсина (3 мас. % от массы сомономеров) растворяли в 1 мл дистиллированной воды, добавляли необходимое количество ГЭМА, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30 мин для образования предполимеризационного комплекса. К полученному комплексу добавляли раствор расчетного количества МБАА в 2.5 мл дистиллированной воды. Полученную смесь сомономеров перемешивали и охлаждали на ледяной бане в течение 10 мин. В исследовательских целях варьировали мольные соотношения ГЭМА : МБАА в диапазоне от 6 : 1 до 2 : 1. Навески АПС и ТМЭДА (2% от массы мономеров, мольное соотношение 1 : 1) растворяли по отдельности в 0.25 мл дистиллированной воды и также охлаждали на ледяной бане в течение 3 мин. К охлажденному раствору мономеров последовательно при перемешивании добавляли растворы АПС и ТМЭДА. Полученную реакционную смесь объемом 4 мл быстро переносили в стальную хроматографическую колонку длиной 50.0 мм, внутренним диаметром 4.6 мм и помещали в морозильную камеру на 24 ч при температуре -13°C .

Полученные криогели размораживали при комнатной температуре (около 22°C). Для удаления непрореагировавших низкомолекулярных соединений гель в колонке промывали дистиллированной водой объемом 200 мл с использованием перистальтического насоса REN 520 Watson Marlow 520S (Великобритания). Промытый гель повторно замораживали и лиофильно высушивали в течение 1 сут с использованием лиофильной машины "Zirbus Technology GmbH" (Германия). Полученные полимерные матрицы хранили в сухом состоянии. Перед применением высушенные образцы подвергали повторному набуханию в дистиллированной воде.

Для удаления шаблона (α -химотрипсина) из МИП криогелей использовали промывание 0.1 М ацетатным буферным раствором (рН 4.0) с помощью перистальтического насоса при комнатной температуре в течение 48 ч (скорость потока 1.0 мл/мин). Процедуру продолжали до полного удаления белка. Полноту удаления α -химотрипсина контролировали, измеряя величину оптической плотности раствора при 280 нм с помощью УФ-спектрофотометра "Shimadzu UV-1800" (Япония). Общее количество α -химотрипсина, экстрагированного из полимерной матрицы при промывке, определяли по методу Лоури–Фолина с использованием предварительно построенной калибровочной зависимости.

Неимпринтированные криогели (НИП) получали с использованием описанной выше методики, но в отсутствие α -химотрипсина.

Изучение морфологии полученных криогелей. Морфологию высушенных образцов изучали с использованием оптического микроскопа "Leica DM4500 P" (Германия), сканирующего электронного микроскопа "Hitachi S-3400N" (Япония) и рентгеновского нанотомографа "Brucker SkyScan2011" (США). Средний диаметр пор криогелей по микрофотографиям СЭМ определяли с использованием свободно распространяемой программы для анализа изображений ImageJ (США); данные, полученные с помощью компьютерной томографии, обрабатывали в программах DataViewer (США) и CTvox (США).

Механические испытания. Изучение механических свойств проводили с использованием системы "Shimadzu EZTest EZ-L" (Япония) в режиме одноосного сжатия. Для обеспечения плотного контакта поверхности с образцом начальное напряжение составило 0.1 Н; скорость движения 2 мм/мин, для всех образцов криогелей была проведена серия параллельных измерений ($n = 5$).

Изучение способности криогелей к набуханию. Степень набухания полимерной сетки матриц S устанавливали следующим образом. Определяли массу извлеченного из формы промытого и высушенного в лиофильной сушке до постоянной массы образца материала длиной 50 мм и диаметром 4.6 мм. Далее помещали его в чашку Петри и заливали 6 мл дистиллированной воды. Выдерживали образец погруженным в воду в течение 24 ч при комнатной температуре. По истечении данного времени образец извлекали, излишки воды с поверхности убирали с помощью фильтровальной бумаги, жидкость из пор удаляли под давлением подаваемого потока воздуха, и снова взвешивали. Для продувания набухших образцов они были помещены в стальные хроматографические колонки, давление воздуха в которых создавалось с использованием компрессора. Воздух подавался

до тех пор, пока с противоположной стороны не переставала капать жидкость. Процедура была стандартизована и для всех образцов было установлено фиксированное время продувки, после которого масса геля не менялась.

Степень набухания рассчитывали по формуле

$$S = \frac{m - m_0}{m_0} \times 100\%, \quad (1)$$

где m_0 – масса сухого образца, m – масса набухшего образца.

Исследование адсорбционных свойств криогелей. Для подтверждения способности распознавания импринтированными матрицами молекул-шаблонов были проведены эксперименты по адсорбции α -химотрипсина на МИП и НИП криогелевых матрицах в динамическом режиме с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Градиентную элюцию осуществляли с использованием системы “Shimadzu” (Япония), состоящей из двух насосов LC-20AD, УФ-детектора на диодной матрице SPD-M20A, системного контроллера CBM-20A, термостата СТО-20А и блока дегазатора DGU-20A_{5R}. 0.01 М фосфатный буферный раствор, pH 6.0 (элюент А) и 0.1 М ацетатный буферный раствор, pH 4.0 (элюент Б) были компонентами подвижной фазы. Элюирование проводили в следующем режиме: 0–5 мин – элюент А, 5–19 мин – 0–35% элюент Б (линейный градиент). Анализ проводили при 22°C, контроль адсорбции белка осуществляли спектрофотометрически при 280 нм. Объем дозирования составлял 20 мкл (объем петли дозатора), концентрация раствора аналита 0.5 мг/мл. Коэффициент удерживания находили по формуле

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2)$$

Здесь t_R и t_0 – времена элюирования удерживаемого и неударживаемого компонента соответственно.

Коэффициент импринтирования (IF) рассчитывали по формуле

$$IF = \frac{Q_{\text{МИП}}}{Q_{\text{НИП}}}, \quad (3)$$

где $Q_{\text{МИП}}/Q_{\text{НИП}}$ – количества адсорбированного вещества на МИП/НИП-сорбентах.

Изучено влияние скорости потока на адсорбционную способность матриц. Скорость потока

раствора составляла 1.0 и 2.0 мл/мин. Концентрацию белка определяли по предварительно построенному калибровочному графику.

Биологические свойства криогелей. Анализ цитотоксичности проводили с помощью СТВ-теста. В экспериментах использовали два типа клеток: мезенхимальные стволовые клетки человека (MSCs) и эмбриональные мышечные фибробласты (NIH 3T3).

Изучение влияния экстрактов из криогелей на жизнеспособность клеток. Для исследования были выбраны образцы, полученные путем крио-сополимеризации ГЭМА–МБАА при содержании сомономеров 8 мас. %, а также при мольных соотношениях ГЭМА : МБАА, равных 4 : 1 и 6 : 1. Извлеченные из формы образцы набухшего материала нарезали острым скальпелем на равные диски толщиной 4.0 ± 0.6 мм и массой 5.0 ± 0.4 мг. Полученные образцы помещали в 24-луночный планшет (по 6 дисков в лунку) и стерилизовали УФ-облучением (диапазон длины волн 200–295 нм) в течение 30 мин с каждой стороны. Затем в каждую лунку с образцом добавляли по 500 мкл α -MEM или DMEM (питательные среды для клеток MSCs и NIH 3T3, соответственно) и помещали в CO₂-инкубатор (37°C, 5% CO₂, 80% влажности) “Thermo Fisher” (США) на 72 ч. К высеянному в двух 96-луночных планшетах клеткам MSCs и NIH 3T3 добавляли по 150 мкл промывной жидкости из криогелей и инкубировали еще 24 ч.

Изучение временной зависимости пролиферации клеток на поверхности криогелей. Для изучения временной зависимости выживаемости и поведения клеток на поверхности криогелей, материалы синтезировали непосредственно в лунках 24-луночного планшета. Для исследования были выбраны криогели, полученные с использованием 8%-ной смеси мономеров ГЭМА–МБАА и мольным соотношением мономеров 4 : 1 и 6 : 1. Для удаления непрореагировавших низкомолекулярных соединений готовые криогели промывали в течение 24 ч дистиллированной водой при перемешивании на орбитальном шейкере, после чего проводили стерилизацию УФ-излучением (диапазон длины волн 200–295 нм) по 30 мин с каждой стороны. В экспериментах использовали указанные выше два типа клеток: MSCs и NIH 3T3. На поверхность криогелей в каждую лунку высевали по 4×10^4 клеток в 500 мкл питательной среды. Клетки инкубировали в течение 24, 72 и 168 ч.

Спустя заданное время инкубирования, в лунки планшетов вносили по 10% раствора СТВ от общего объема жидкости в лунке и инкубировали при 37°C в течение 1.5 ч. Флуоресценцию СТВ, восстановленного жизнеспособными клетками, измеряли при длине волны возбуждения 544 нм

и длине волны испускания 590 нм с помощью планшетного флуориметра “FluoroskanAscent”, “ThermoFisher Scientific (США). Значения представлены как сигнал флуоресценции чистого восстановленного реагента СТВ после вычитания холостой пробы (100 мкл рабочего раствора СТВ (1 : 10 об./об. в базальной α-МЕМ в случае MSCs или ДМЕМ в случае NIH 3T3 после 1.5 ч инкубирования в отсутствие клеток и криогеля) и нормировки в процентах по отношению к контролю (лункам, содержащим клетки, инкубированные без криогелей). Для всех образцов анализ повторяли три раза.

Для наглядной визуализации роста клеток на материалах проводили окрашивание живых/мертвых клеток флуоресцентными красителями. Окрашивание осуществлялось через 24, 72 и 168 ч культивирования клеток на материалах. Образцы инкубировали в 3 мкмоль Cal-AM и 2.5 мкмоль PI в базальной α-МЕМ (в случае MSCs) или базальной ДМЕМ (в случае NIH 3T3) в течение 15 мин при 37 °С и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа (“Olympus, BX-51”, “Olympus Corporation”, Япония), оснащенного камерой (“Olympus SC30, IX-TVAD”, “Olympus Corporation”, Япония) и программным обеспечением CellSens (CellSens Standard 1.7.1, “Olympus Corporation”, Япония). Окрашивание DAPI осуществляли для образцов, полученных при культивировании клеток на поверхности в течение 24, 72 и 168 ч. Матрицы дважды промывали теплым 0.01 М фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7.4) в течение 30 мин. Культуральную среду удаляли и к образцу добавляли 200 мкл 4%-ного параформальдегида в фосфатно-солевом буферном растворе для фиксирования клеток, оставляли на 20 мин при комнатной температуре. После фиксации образцы еще раз промывали 0.01 М фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7.4) и окрашивали клеточные ядра в течение 15 мин рабочим раствором DAPI (1 : 1000 (об./об.) в фосфатно-солевом буферном растворе) при комнатной температуре (около 22°С) в темноте. Образцы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа (“Olympus, BX-51”, “Olympus Corporation”, Япония).

Статистическая обработка данных. Оценку погрешности результатов всех экспериментов проводили путем вычисления среднего квадратического отклонения (S_0) по формуле

$$S_0 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (a_i - \bar{a})^2}{n(n-1)}}, \quad (4)$$

где a_i – i -й элемент выборки, \bar{a} – среднее арифметическое выборки, n – объем выборки ($n = 5$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика криогелей

Сверхмакропористые криогели получали сополимеризацией в замороженном состоянии функционального и сшивающего мономеров, а именно ГЭМА и МБАА, в присутствии АПС/ТМЭДА в качестве пары инициатор/активатор радикальной реакции. Растворителем служила вода, которая при замерзании в фазу льда также выступала в качестве порообразователя. Использование воды удобно с точки зрения ее биосовместимости и, как следствие, биологической безопасности получаемых матриц. Кроме того, вода хорошо растворяет белок-шаблон, что является необходимым условием для молекулярного импринтинга. Макропористые колонки с отпечатками α-химотрипсина были синтезированы с применением подхода нековалентного импринтинга. С целью формирования устойчивого предполимеризационного комплекса, мономеры были взяты в избытке по отношению к шаблону.

Полученные образцы криогелей представляли собой белые, непрозрачные, губчатые и эластичные матрицы, из которых можно легко удалить воду, находящуюся в порах, путем сжатия. Сжатый материал при погружении в воду быстро набухал и через несколько секунд восстанавливал свой первоначальный размер и форму. Набухание высушенных матриц определяется диффузией молекул растворителя в сшитую сетку сополимера, а также сольватацией полимерных цепей между узлами химической сшивки. Данная характеристика для изучаемых образцов находится в диапазоне от 1140 до 2250 % (табл. 1).

Можно заметить, что образцы материала на основе ГЭМА–МБАА-5% демонстрирует лучшую способность к набуханию по сравнению с образцами ГЭМА–МБАА-8%, что обусловлено меньшей плотностью сшивки в случае матриц на основе 5%-ной смеси мономеров. Однако для образцов ГЭМА–МБАА, полученных при использовании концентрации мономеров 5 мас. %, можно проследить следующую зависимость: степень набухания возрастает с увеличением количества сшивающего агента в реакционной смеси. Наблюдаемый эффект может быть связан с уменьшением среднего размера пор и вместе с тем с увеличением общей пористости образцов (табл. 1). В свою очередь это приводит к улучшению способности криогеля удерживать воду, что и объясняет повышение степени набухания.

Морфология является важнейшей характеристикой исследуемых материалов. Изображения, полученные методом оптической микроскопии, приведенные на рис. 1, демонстрируют однород-

ность поровой структуры и высокую пористость высушенных полимерных матриц.

Детальное изучение поровой структуры высушенных образцов было проведено с применением метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 2).

Приведенные данные позволили получить представление о том, как влияет концентрация мономеров и количество сшивающего агента на морфологические характеристики матриц. Как видно на микрофотографиях, матрицы ГЭМА–МБАА с содержанием сомономеров 5 мас. % (рис. 2а–2г), обладают менее гомогенной, рыхлой и слоистой структурой, которая характеризуется порами большего размера, по сравнению с более плотно сшитыми материалами ГЭМА–МБАА с содержанием сомономеров 8 мас. % (рис. 2д–2е). Данные о среднем размере пор, полученные путем

обработки микрофотографий (табл. 1), отражают изменение размера пор в зависимости от общего содержания мономеров и их мольного соотношения в смеси.

Также морфология и пористость сухих матриц была исследована с использованием метода компьютерной рентгеновской нанотомографии. 3D-модели материалов демонстрируют наличие в них большого количества открытых пор, а также развитой системы проточных каналов (рис. 3), что позволяет предположить высокую проницаемость исследуемых материалов. Кроме того, на основании данных компьютерной рентгеновской нанотомографии была рассчитана общая пористость образцов (табл. 1). Среднее значение пористости изучаемых матриц крайне высоко и лежит в пределах 85–92%. Полученные данные свидетельствуют о том, что материалы обладают

Таблица 1. Влияние концентрации реакционной смеси и соотношения мономеров на характеристики полученных полимерных матриц в сухом состоянии. Погрешность величин получена при статистической обработке пяти параллельных измерений ($n = 5$).

Образец	Концентрация мономеров, мас. %	Мольное соотношение [ГЭМА] : [МБАА]	Степень набухания, %	Пористость*, %	Средний размер пор**, мкм
1	5	6	1780 ± 15	85	160 ± 75
2		4	1850 ± 13	86	80 ± 35
3		3	2050 ± 15	88	30 ± 15
4		2	2250 ± 15	91	26 ± 11
5	8	6	1140 ± 15	90	62 ± 21
6		4	1300 ± 25	92	48 ± 17

* По данным компьютерной томографии.

** По данным СЭМ.

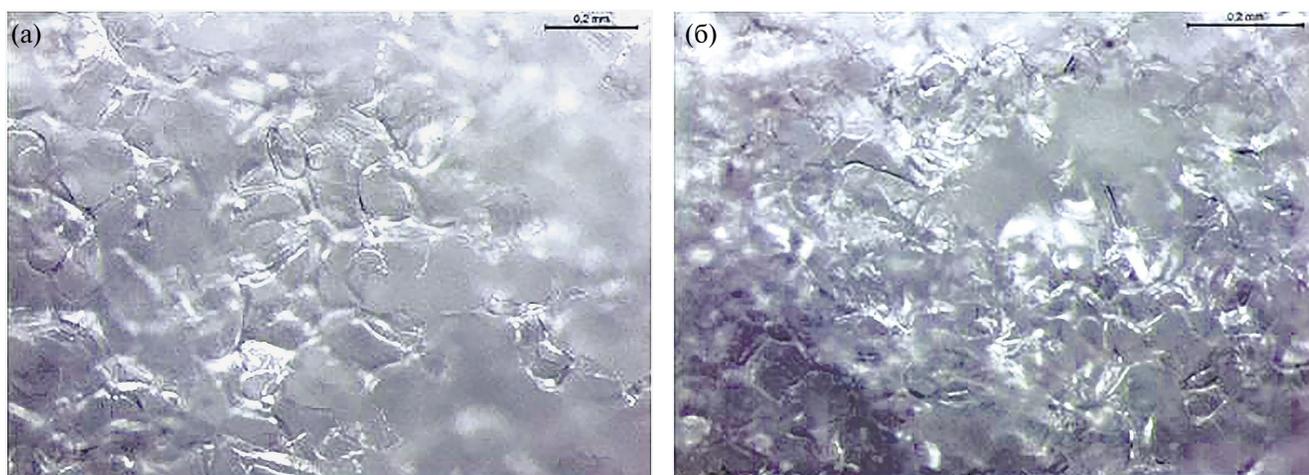


Рис. 1. Оптические микрофотографии высушенных полимерных матриц, полученных путем криосополимеризации ГЭМА и МБАА (мольное соотношение 6 : 1) при суммарной концентрации сомономеров 5 (а) и 8 мас. % (б). Цветные рисунки можно посмотреть в электронной версии.

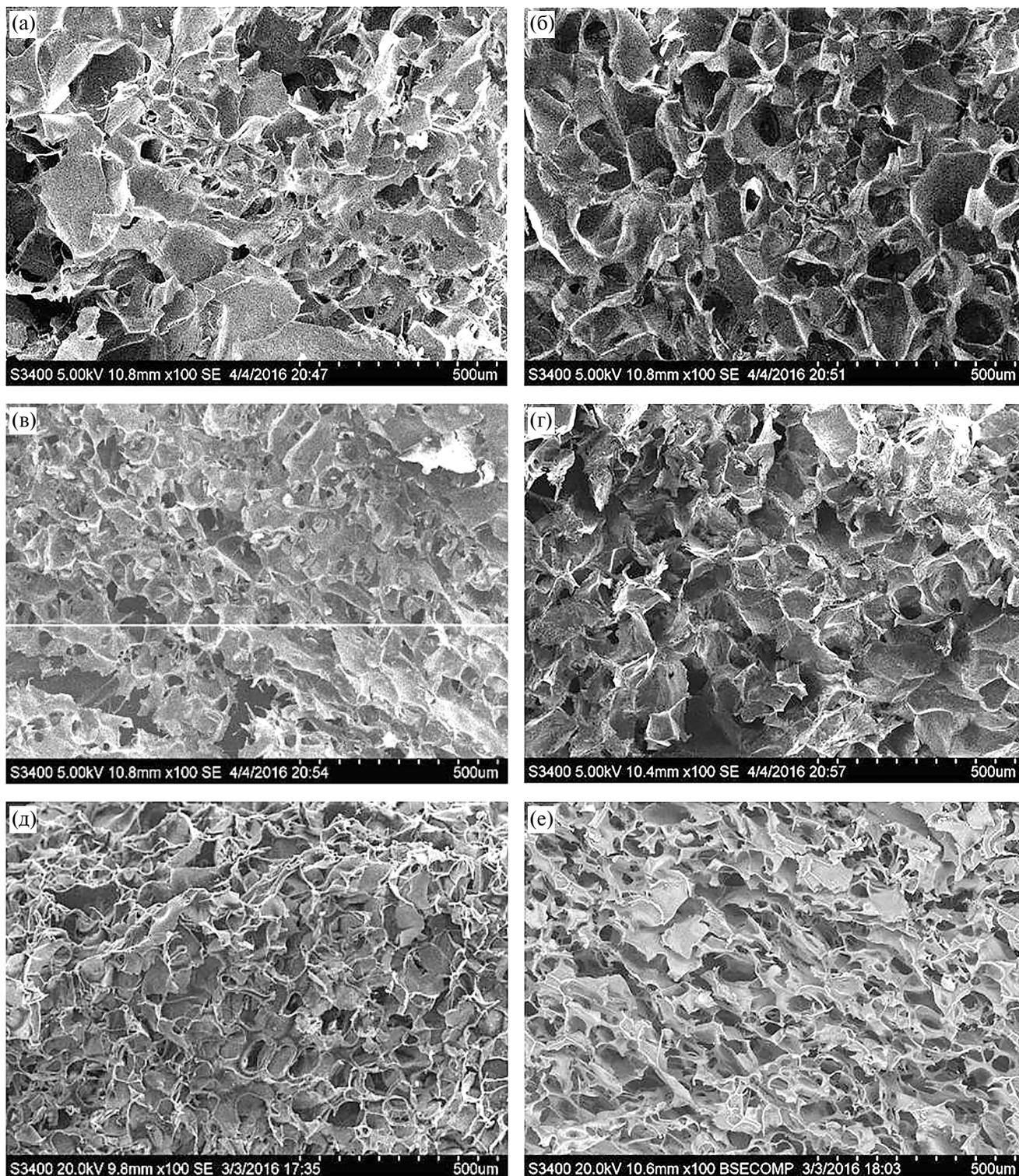


Рис. 2. Микрофотографии СЭМ, полученные для высушенных полимерных матриц, полученных при концентрации сомономеров 5 (а, г) и 8 мас. % (д, е), а также мольном соотношении ГЭМА : МБАА = 6 : 1 (а, д), 4 : 1 (б, е), 3 : 1 (в) и 2 : 1 (г).

выраженной сверхмакропористой структурой и развитой системой проточных каналов.

Наличие пор больших размеров, а также развитой системы проточных каналов служит пред-

посылкой свободной диффузии и эффективного массопереноса биомолекул в системе, что является необходимым свойством стационарных фаз для твердофазного разделения/выделения белков.

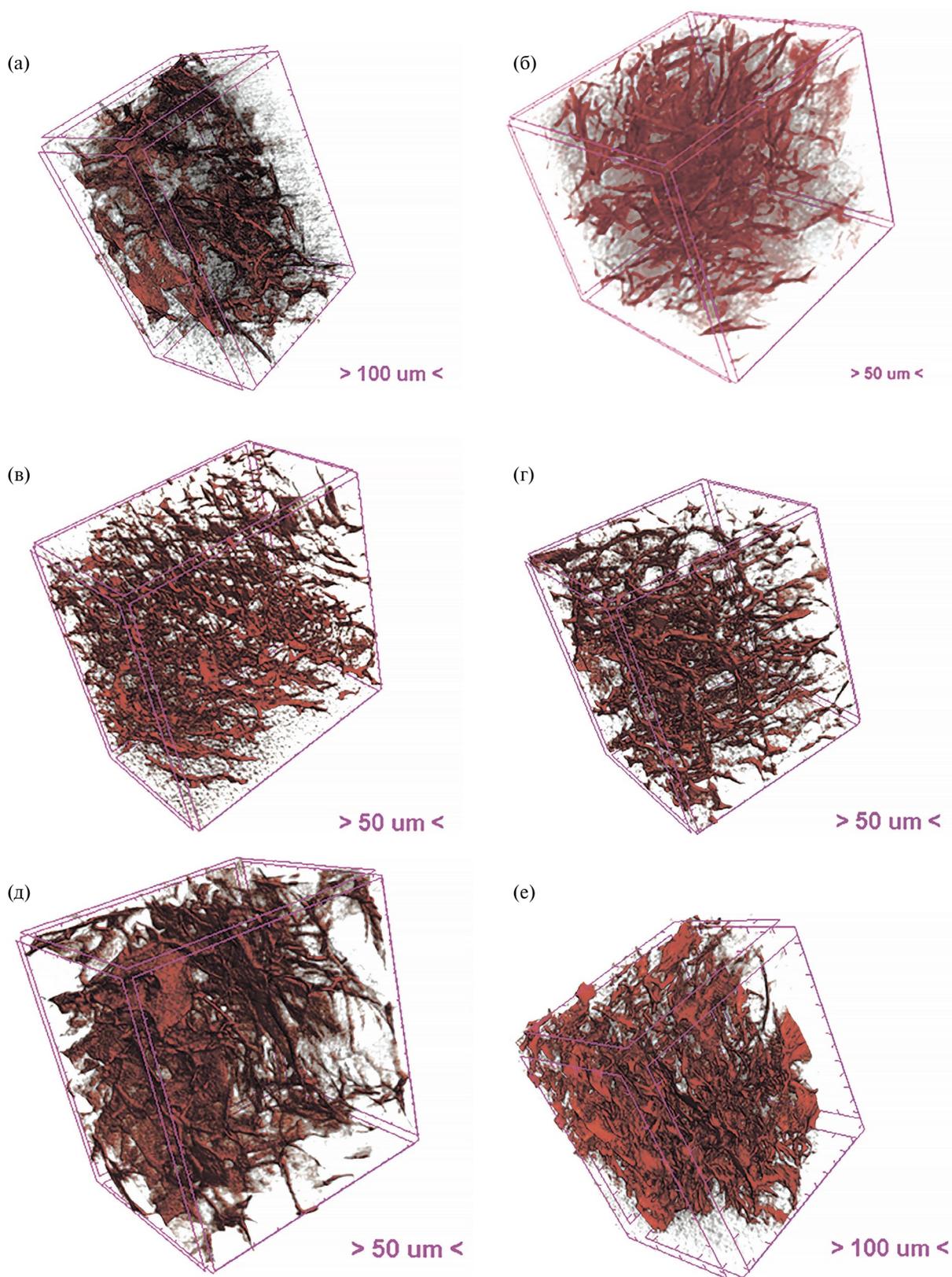


Рис. 3. Результаты исследования материалов методом компьютерной томографии. 3D-модели высушенных полимерных матриц на основе ГЭМА–МБАА, полученных при концентрации сомономеров (а, г) и 8 мас. % (д, е), а также мольном соотношении ГЭМА : МБАА = 6 : 1 (а, д), 4 : 1 (б, е), 3 : 1 (в) и 2 : 1 (г).

Полученные материалы имеют пористые и тонкие полимерные стенки, большие непрерывные взаимосвязанные поры, обеспечивающие прохождение подвижной фазы. Размеры пор матриц намного больше, чем размер макромолекул белка, что обеспечивает высокую проницаемость неподвижной фазы по отношению как к подвижной фазе, так и к биомacroмолекулам. Именно высокая проницаемость объясняет механизм конвективного массопереноса, характерный для сорбентов монолитного типа, и позволяет применять их не только в хроматографическом разделении белков [39], но также для разделения наночастиц и даже клеток [40, 41].

В процессе использования криогелей как части проточной системы они подвергаются воздействию давления, из-за чего возможно существенное сжатие образца и даже его разрушение. Необходимым условием использования криогелей в динамическом режиме является механическая устойчивость матриц, а также способность к сохранению целостности структуры при значительных давлениях. Как высушенные, так и набухшие образцы матриц, полученные при различных мольных соотношениях ГЕМА : МБАА, были протестированы с применением метода одноосного сжатия (рис. 4).

Данный метод позволяет получать результаты с достаточной надежностью (95–98%) даже для хрупких полимеров. Испытание состояло в сжатии цилиндрического образца с постоянной скоростью и автоматической регистрации напряжения.

Необходимо отметить, что измерения образцов, полученных при содержании сомономеров

5 мас. %, показали их неудовлетворительные механические свойства. Поэтому здесь мы приводим данные для более механически стабильных образцов, полученных при концентрации сомономеров 8 мас. %. Для данных материалов вариация соотношений функционального мономера и сшивающего агента влияла на механическую прочность как сухих, так и набухших материалов предсказуемым образом (рис. 4). Увеличение количества сшивающего мономера МБАА приводило к образованию более прочных матриц. На представленных зависимостях видно, что сухие образцы обладают значительной упругостью и проявляют устойчивость к разрушению даже при деформации 40%. Однако в исследуемых высушенных матрицах за счет их хрупкости происходит образование трещин и скалывание частей образца, что является показателем разрушения полимера.

В набухом состоянии материалы обладают значительно более низким по величине модулем упругости, что может быть объяснено увеличением свободы сольватированных макромолекул и, как следствие, их более выраженной подвижности. Тем не менее испытания на одноосное сжатие образцов криогелей в набухом состоянии подтвердили их устойчивость к разрушению даже при деформации более 60%. Это свидетельствует об их высокой эластичности, обусловленной, по всей видимости, ковалентными сшивками и огромными порами внутри полимерного материала.

На основании проведенных механических испытаний было принято решение в дальнейших экспериментах использовать только 8%-ные гели. При этом по причине наблюдаемой

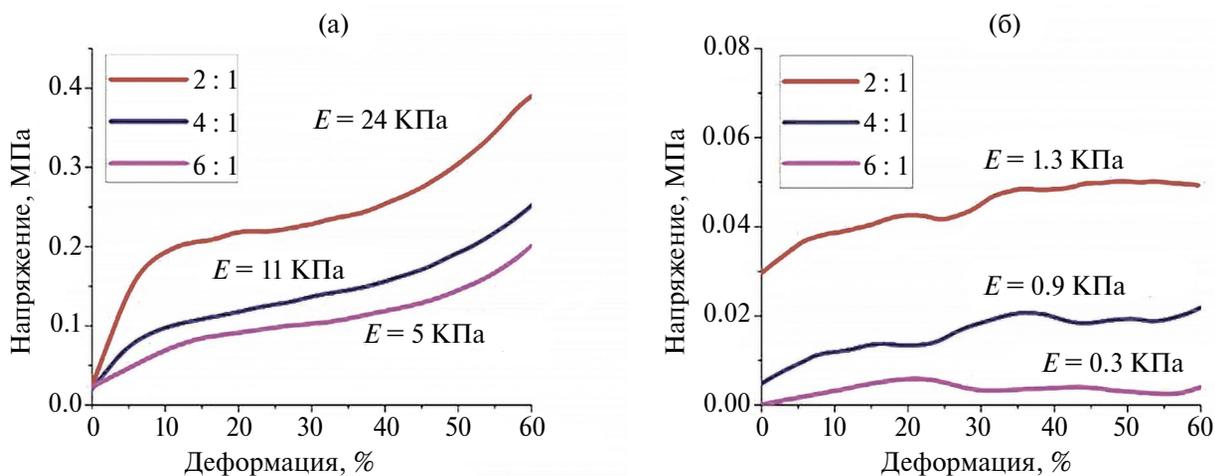


Рис. 4. Деформационные кривые и значения модулей Юнга, полученные для высушенных полимерных матриц (а) и набухших гелей (б), полученных на основе ГЭМА–МБАА (8 мас. %) при мольном соотношении сомономеров 2 : 1 (1), 4 : 1 (2) и 6 : 1 (3). а — $E = 24$ (1), 11 (2) и 5 кПа (3); б — $E = 1.3$ (1), 0.9 (2) и 0.3 кПа (3).

экспериментально наилучшей проницаемости гелей для работы были выбраны образцы, полученные при мольном соотношении ГЭМА : МБАА = 6 : 1 и 4 : 1.

Биологические свойства криогелей

Огромный размер пор и высокая проницаемость делают криогели перспективными материалами не только для разделения биомакромолекул, но также для экстракции клеток. Для определения возможности использования полученных полимерных материалов для работы с живыми клетками была оценена их цитотоксичность. Вначале было проведено исследование влияние возмож-

ного присутствия токсичных компонентов в экстрактах из криогелей на жизнеспособность клеток. Для этого использовали две чувствительные к токсинам клеточные линии, а именно мезенхимальные стволовые клетки (MSCs) и фибробласты (NIH 3T3). Данные, полученные с использованием СТВ-теста, показали отсутствие снижения выживаемости клеток в присутствии экстракта из полимерных матриц ГЭМА–МБАА (рис. 5).

На втором этапе биологических исследований нами было проведено изучение временной зависимости выживаемости клеток на поверхности матриц (рис. 6).

Как MSCs, так и NIH 3T3 являются адгезивными культурами, для выращивания которых требуется поверхность. Такие клетки погибают не только в случае присутствия токсичного компонента, но и ввиду отсутствия возможности прикрепиться к поверхности. В основе метода СТВ лежит образование резаруфина, флуоресцентного продукта восстановления резазурина, пропорционально количеству жизнеспособных клеток. На представленных зависимостях (рис. 6) видно, что клетки пролиферируют на поверхности матриц на основе ГЭМА–МБАА. Очевидно, что клетки NIH3T3 делятся гораздо активнее, чем MSCs. Это связано с тем, что период удвоения популяции у фибробластов составляет 16 ч, в то время как у мезенхимальных стволовых клеток это время составляет 24–26 ч. Кроме того, для MSCs характерно явление контактного ингибирования роста.

Также проводили визуальный контроль пролиферации клеток, окрашенных специально-

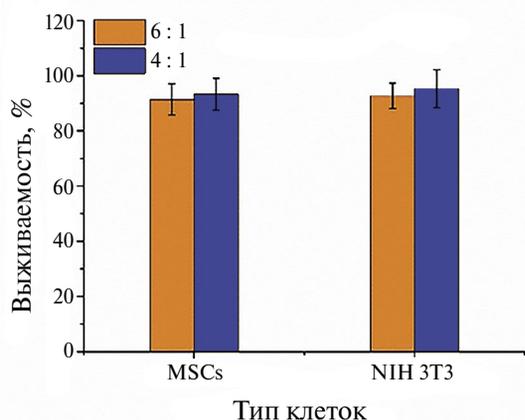


Рис. 5. Выживаемость клеток MSCs и NIH 3T3 в присутствии экстрактов из гелей, полученных путем криосополимеризации ГЭМА и МБАА (8 мас. %) при мольном соотношении сомономеров 6 : 1 (1) и 4 : 1 (2) (табл. 1, образцы 5 и 6).

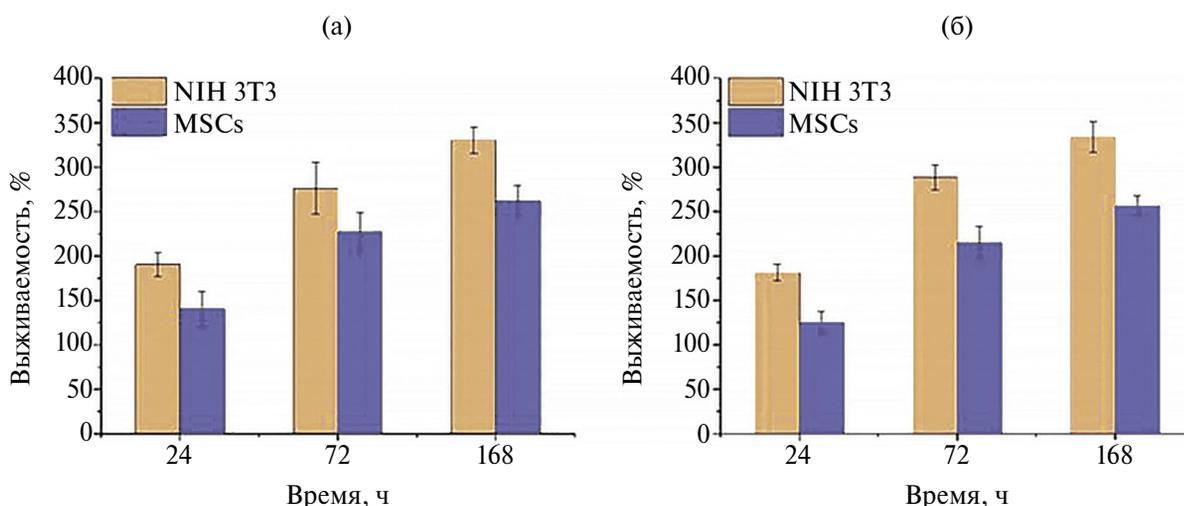


Рис. 6. Выживаемость мышинных фибробластов NIH 3T3 (1) и мезенхимальных стволовых клеток MSCs (2) на поверхности гелей, полученных путем криосополимеризации ГЭМА и МБАА (8 мас. %) при мольном соотношении сомономеров 4 : 1 (а) и 6 : 1 (б).

ми красителями, на поверхности исследуемых материалов с использованием флуоресцентной микроскопии (рис. 7).

Данным методом удалось наглядно продемонстрировать активное деление клеток на по-

верхности матриц на основе ГЭМА–МБАА. При этом клетки NIH 3T3 делятся быстрее по сравнению с MSCs (рис. 8), что согласуется с данными СТВ-теста (рис. 6).

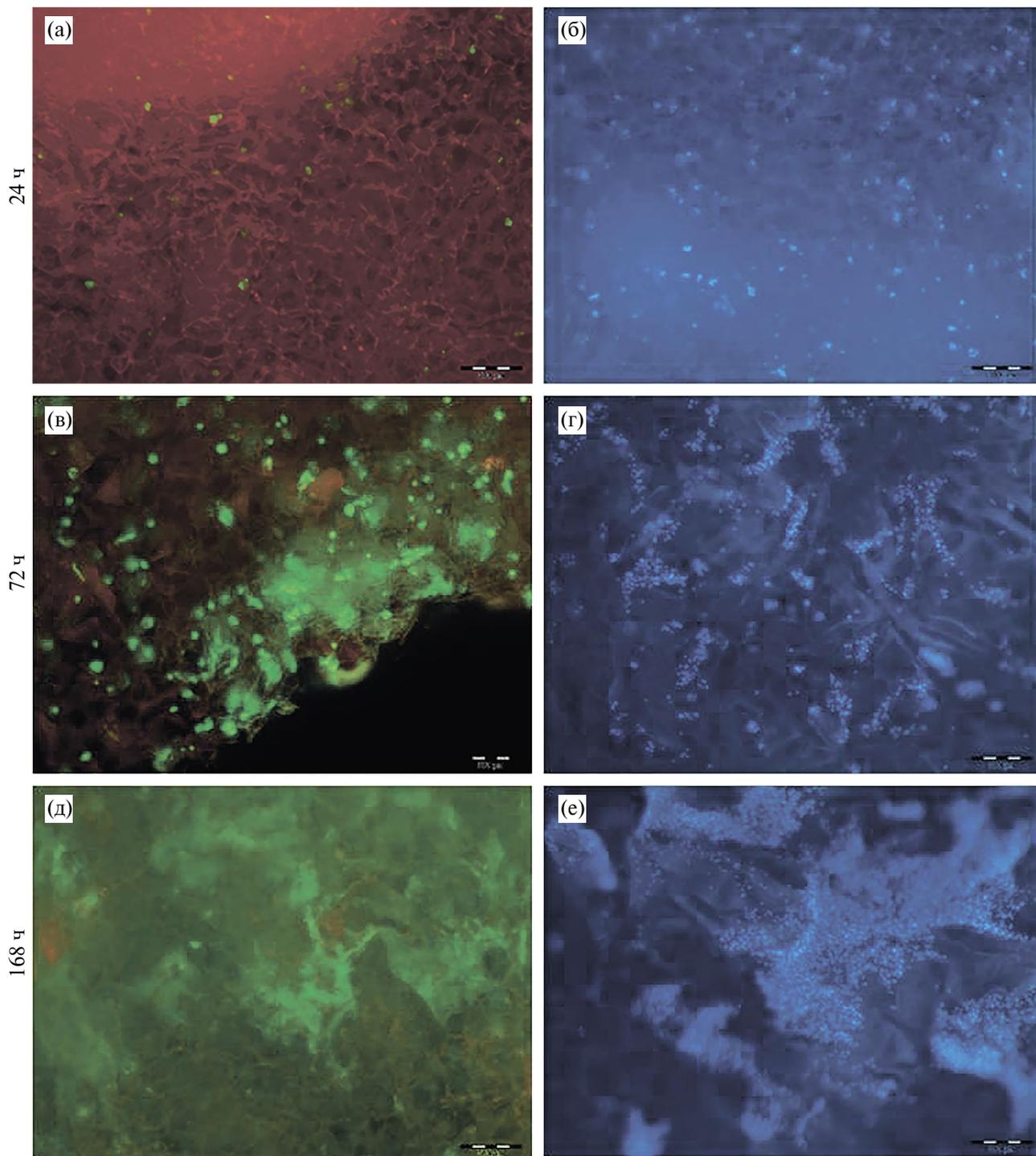


Рис. 7. Фотографии флуоресцентно окрашенных клеток NIH-3T3 высеванных на матрицы, полученные путем криосополимеризации ГЭМА и МБАА (8 мас. %) при мольном соотношении сомономеров 4 : 1 (увеличение 4). Интенсивность зеленого и синего окрашивания пропорциональна количеству клеток на поверхности материалов.

Таким образом, результаты проведенных биологических исследований демонстрируют отсутствие токсического воздействия материалов на клетки, что свидетельствует о возможности их использования в биотехнологии, в том числе для разделения клеток.

Твердофазная экстракция α -химотрипсина с использованием криогелей ГЭМА–МБАА

Известно, что состав подвижной фазы существенно влияет на эффективность адсорбции целевого компонента, что связано с механизмом

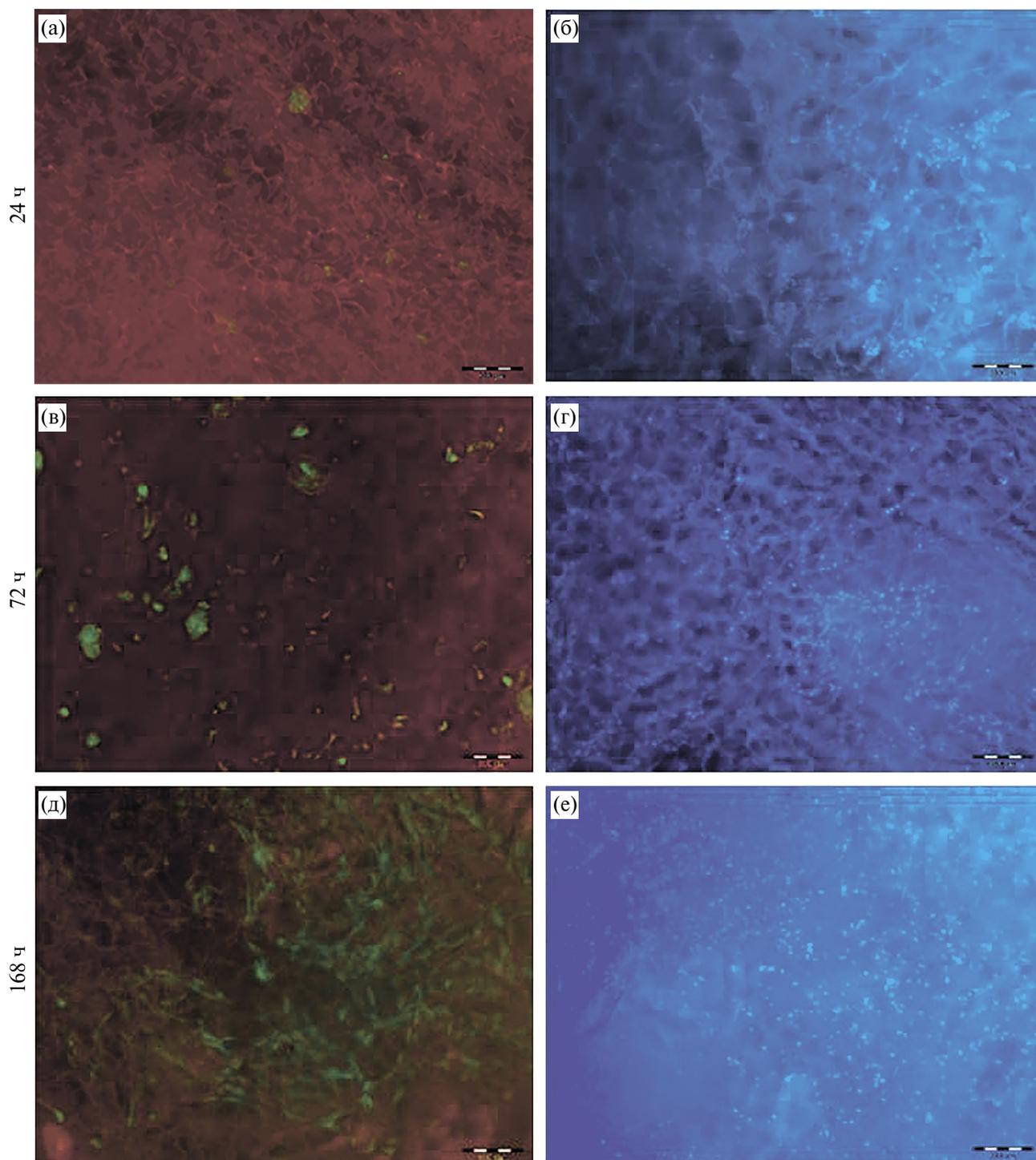


Рис. 8. Фотографии флуоресцентно окрашенных клеток MSCs на поверхности материалов на основе ГЭМА–МБАА–8% (4 : 1) (увеличение $\times 4$). Интенсивность зеленого и синего окрашивания пропорциональна количеству клеток на поверхности материалов.

специфического взаимодействия между молекулой шаблона и сайтом распознавания [42]. В качестве элюента были использованы различные смешанные растворители и буферные растворы. Также в процессе тестирования МИП-колонок проводилось варьирование параметров градиента — скорости потока подвижной фазы, объема, времени и наклона градиента. В ходе большого числа экспериментов эффективное элюирование целевого лиганда из матриц наблюдалось при использовании системы 0.01 М фосфатный буферный раствор, рН 6.0 (элюент А) и 0.1 М ацетатный буферный раствор, рН 4.0 (элюент Б) в качестве компонентов подвижной фазы. Десорбция белка при рН 4.0 позволяет предположить, что на данный процесс оказывают влияние несколько процессов. Происходит протонирование карбоксилат-анионов в боковых остатках аспарагиновой и глутаминовой кислот (их $pK_a \sim 4$) в составе белка, по-видимому, приводящее к снижению эффективности водородных связей между указанными группами в белке и группами ОН/NH в составе полимерных матриц. Также известно, что уменьшение рН вызывает изменение конформации молекулы α -химотрипсина [43, 44]. Это в свою очередь может влиять на его взаимодействие с полимерной стационарной фазой.

Скорость подвижной фазы является одним из важных параметров любого динамического процесса. Известно, что в случае макропористых монолитных сорбентов эффективность хроматографического процесса не зависит от скорости подвижной фазы в достаточно широком диапазоне [12]. При увеличении скорости процесса с 1 до 2 мл/мин наблюдалось сужение пиков без ухудшения разделения для МИП-сорбентов (рис. 9, 10).

Условия: подвижная фаза А — 0.01 М фосфатный буферный раствор (рН 6.0); вытеснитель (элюент Б) — 0.1 М ацетатный буферный раствор (рН 4.0); программа градиента: 0–5 мин — 100% фаза А, 5–19 мин — 0–35% фаза В; λ : 280 нм, объем дозирования: 20 μ л; концентрация белка: 0.5 мг/мл.

Доля неудерживаемого компонента для НИП-сорбента была в обоих случаях выше, чем для МИП-сорбента, что подтверждает более сильные взаимодействия белка с матрицей МИП-криогеля.

Эффективность синтезированных МИП-систем оценивается рядом параметров. Одними из наиболее важных характеристик являются коэффициент удержания и коэффициент

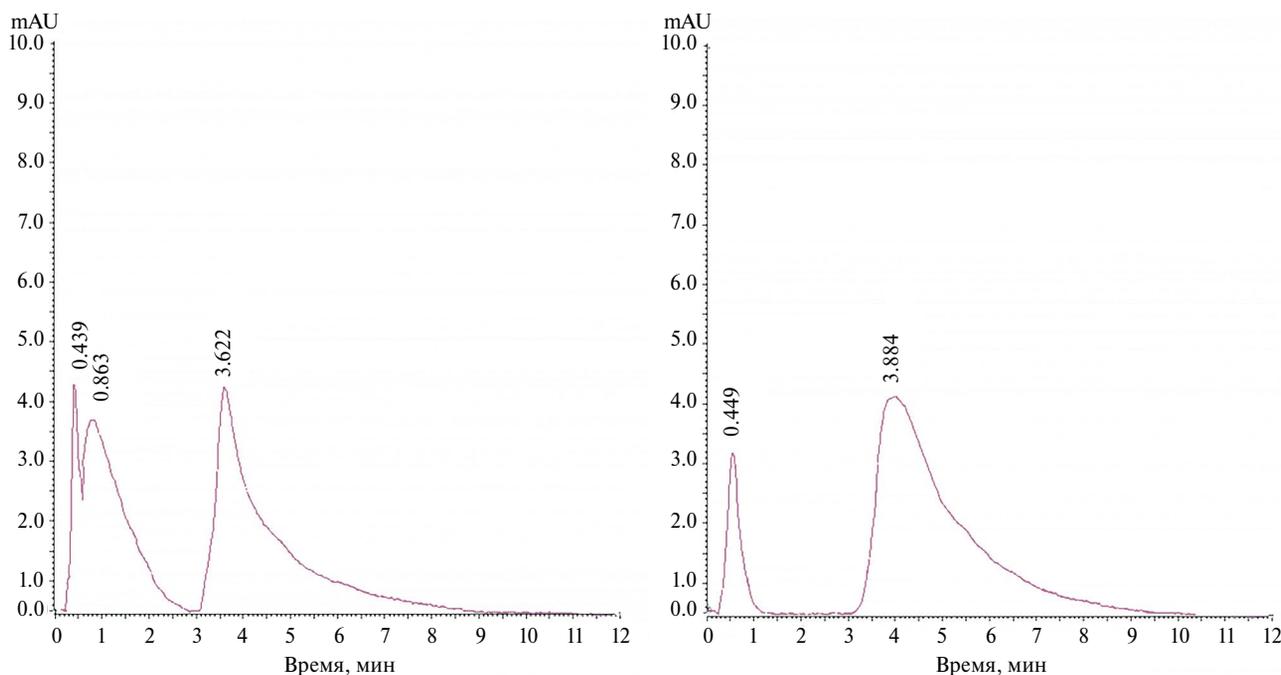


Рис. 9. Кривые элюирования α -химотрипсина, полученные методом ВЭЖХ с использованием колонок, заполненных гелями полученными путем криосополимеризации ГЭМА и МБАА (8 мас. %) при мольном соотношении сомономеров 4 : 1 (табл. 1, образец 6): без α -химотрипсина (НИП-колонка) (а) и в присутствии α -химотрипсина (МИП-колонка) (б). Условия: скорость элюирования 2 мл/мин; подвижная фаза (элюент А) — 0.01 М фосфатный буферный раствор (рН 6.0); вытеснитель (элюент Б) — 0.1 М ацетатный буферный раствор (рН 4.0); программа градиента: 0–5 мин — 100% фаза А, 5–19 мин — 0–35% фаза В; $\lambda = 280$ нм; объем дозирования 20 мкл; концентрация белка 0.5 мг/мл.

импринтирования (или импринт-фактор — IF , от англ. imprinting factor). Данные параметры были рассчитаны для НИП- и МИП-колонок для разных скоростей потока подвижной фазы (табл. 2).

Таблица 2. Зависимость факторов удерживания и коэффициентов импринтинга от скорости потока подвижной фазы

Скорость потока, мл/мин	k'		IF
	НИП	МИП	
1.0	8.1	8.5	1.7
2.0	7.0	7.6	2.0

На основании полученных данных можно заключить, что действительно имеет место импринтинг α -химотрипсина в криогелевые полимерные матрицы на основе сополимера ГЭМА–МБАА.

Интересно, что при увеличении скорости подвижной фазы от 1 до 2 мл/мин наблюдается возрастание эффективности селективной адсорбции (табл. 2). Данное явление может быть объяснено тем, что с повышением скорости потока подвижной фазы эффективность конвективного массопереноса между фазами возрастает, что приводит к более эффективному взаимодействию белка с его молекулярными отпечатками.

С целью изучения стабильности и возможности повторного использования МИП-криогеля, цикл адсорбция–десорбция белка повторяли 15 раз на одной и той же колонке. После каждого цикла криогель промывали 0.1 М ацетатным буферным раствором (рН 4.0) в течение 30 мин, затем дистиллированной водой в течение 30 мин и уравнивали 0.01 М фосфатным буферным раствором (рН 6.0) для следующего цикла адсорбции–десорбции. Исследования показали, что после первого цикла криогель сохраняет свою адсорбционную способность в течение последующих 14 циклов на постоянном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Селективное распознавание и связывание белков синтетическими полимерными материалами представляет большой научный и практический интерес. Основные преимущества МИП-криогелей заключаются в простоте их получения, стабильности, а также возможности создания молекулярных отпечатков различных молекул. В данной работе был проведен синтез серии МИП и НИП образцов криогелевых матриц. Синтезированные материалы имели губчатую и эластичную структуру. Изучение морфологических особенностей криогелей было проведено с помощью оптической микроскопии, СЭМ, компьютерной рентгеновской нанотомографии. Обнаружено,

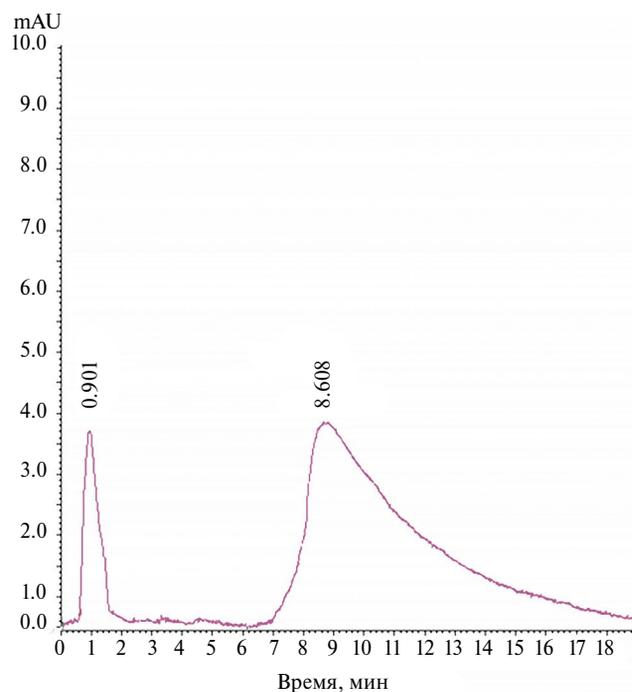
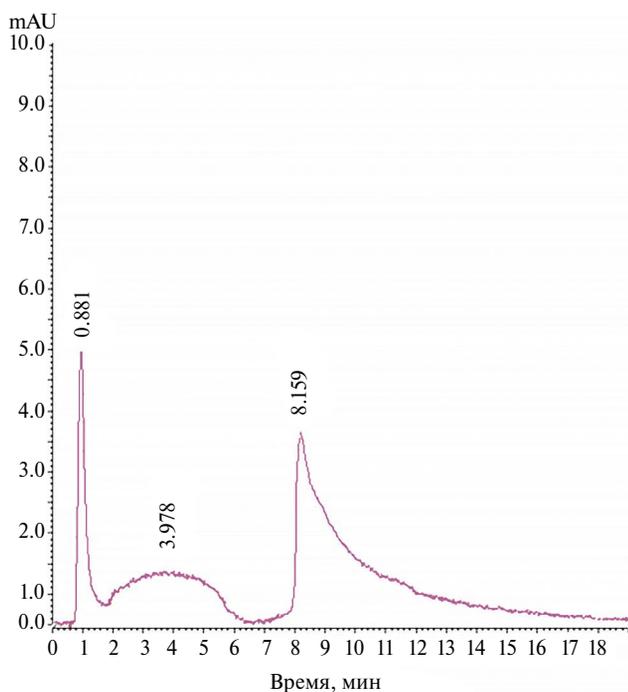


Рис. 10. Кривые элюирования альфа-ХТР, полученные методом ВЭЖХ, с использованием криогелей ГЭМА-МБАА-8% (4:1) при скорости элюирования 1 мл/мин: НИП колонка (а); МИП колонка (б). Остальные условия см. в подписи к рис. 9.

что полученные образцы являются сверхмакропористыми (диаметр пор 20–200 мкм) и обладают развитой системой проточных каналов. Установлено, что наилучшими свойствами для применения в качестве сорбентов обладают матрицы, полученные при содержании ГЭМА и МБАА в мономерной смеси 8 мас. %, при мольном соотношении сомономеров 6 : 1 и 4 : 1.

Биосовместимость криогелей на основе ГЭМА–МБАА подтверждена в экспериментах *in vitro* для двух типов клеток. Показано, что открытая сверхмакропористая архитектура матриц делает материалы легко смачиваемыми. Это позволяет суспензии клеток свободно проникать в структуру криогеля, что приводит к более однородному распределению клеток.

Подтверждена успешность молекулярного импринтинга α -химотрипсина в структуру полимерной матрицы. Значения коэффициента удерживания и коэффициента импринтирования зависели от скорости потока подвижной фазы.

Работа выполнена в рамках Мегагранта Министерства науки и высшего образования (№ 075-15-2021-637).

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных центров “Рентгенодифракционные методы исследования” и “Геомодель” Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rodriguez E.L., Poddar S., Iftekhar S., Suh K., Woolfork A.G., Ovbude S., Pekarek A., Walters M., Lott S., and Hage D.S. // J. Chromatogr. 2020. V. 1157. P. 122332.
- Akgonullu S., Yavuz H., Denizli A. // Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. 2017. V. 45. P. 800.
- Volokitina M., Krutyakova M., Siroto V., Larionov M., Tennikova T., Korzhikova-Vlakh E. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2019. V. 165. P. 242.
- Antipchik M., Polyakov D., Sinitsyna E., Dzhuzha A., Shavlovsky M., Korzhikova-Vlakh E., Tennikova T. // Sensors (Switzerland). 2020. V. 20. P. 2719.
- Dogan A.B., Dabkowski K.E., von Recum H.A. // Pharmaceutics. 2022. V. 14. P. 1088.
- Polyakov D., Sinitsyna E., Grudinina N., Antipchik M., Sakhabeev R., Korzhikov-Vlakh V., Shavlovsky M., Korzhikova-Vlakh E., Tennikova T. // Pharmaceutics. 2021. V. 13. P. 672.
- Erturk G., Mattiasson B. // Sensors (Switzerland). 2017. V. 17. P. 1.
- Bagheri A.R., Ghaedi M. // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 139. P. 40.
- Stepanova M.A., Kinziabulatova L.R., Nikitina A.A., Korzhikova-Vlakh E.G., Tennikova T.B. // Electrophoresis. 2017. V. 38. P. 2965.
- Ansari S., Masoum S. // TrAC – Trends Anal. Chem. 2019. V. 114. P. 29.
- Kidakova A., Reut J., Rappich J., Opik A., Syritski V. // React. Funct. Polym. 2018. V. 125. P. 47.
- Vlakh E.G., Korzhikov V.A., Hubina A.V., Tennikova T.B. // Russ. Chem. Rev. 2015. V. 84. P. 952.
- Refaat D., Aggour M.G., Farghali A.A., Mahajan R., Wiklander J.G., Nicholls I.A., Piletsky S.A. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 6304.
- Vasapollo G., Sole R.D., Mergola L., Lazzoi M.R., Scardino A., Scorrano S., Mele G. // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 5908.
- Hoshino Y., Shea K.J. // J. Mater. Chem. 2011. V. 21. P. 3517.
- Stepanova M., Solomakha O., Ten D., Tennikova T., Korzhikova-Vlakh E. // Catalysts. 2020. V. 10. P. 1395.
- Balamurugan K., Gokulakrishnan K., Prakasam T. // Arab. J. Chem. 2016. V. 9. P. S528.
- Tan J., iang Z.T.J., Li R., Yan X.P. // TrAC – Trends Anal. Chem. 2012. V. 39. P. 207.
- Ayankojo G., Reut J., Ciocan V., Opik A., Syritski V. // Talanta. 2020. V. 209. P. 120502.
- Pu J., Wang H., Huang C., Bo C., Gong B., Ou J. // J. Chromatogr. A. 2022. V. 1668. P. 462914.
- He Y., Lin Z. // J. Mater. Chem. B. 2022. V. 10. P. 6571.
- Okay O., Lozinsky V.I. Polymeric Cryogels. Advances in Polymer Science. / Ed. by Okay O. Springer. 2014. P. 103–157.
- Mikhailovsky S.V., Savina I.N., Dainiak M., Ivanov A.E., Galaev I.Y. Biomaterials/cryogels. Comprehensive Biotechnology. Elsevier Inc. 2019.
- Erturk G., Mattiasson B. // J. Chromatogr. A. 2014. V. 1357. P. 24.
- Eggermont L.J., Rogers Z.J., Colombani T., Memic A., Bencherif S.A. // Trends Biotechnol. 2020. V. 38.
- Henderson T.M.A., Ladewig K., Haylock D.N., McLean K.M., O'Connor A.J. // J. Mater. Chem. B. 2013. V. 1. P. 2682.
- Zvukova N.D., Klimova T.P., Ivanov R.V., Ryabev A.N., Tsiskarashvili A.V., Lozinsky V.I. // Gels. 2019. V. 5. P. 25.
- Yavuz H., Denizli A.A. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier. 2015.
- Farias T., Hajizadeh S., Ye L. // Sep. Purif. Technol. 2020. V. 235. P. 116203.
- Capriotti A., Piovesana S., Chiozzi R.Z., Montone C.M., Bossi A.M., Lagana A. // J. Proteomics. 2020. V. 219. P. 103736.
- Liu X., Lin W., Xiao P., Yang M., Sun L.P., Zhang Y., Xue W., Guan B.O. // Chem. Eng. J. 2020. V. 387. P. 124074.
- Wang P., Tang X., Hu L., Yin Y., Chen S., Xu J., Wang H. // Process Biochem. 2020. V. 88. P. 31.
- Piletsky S., Canfarotta F., Poma A., Bossi A.M., Piletsky S. // Trends Biotechnol. 2020. V. 38. P. 368.

34. *Plieva F.M., Galaev I.Y., Noppe W., Mattiasson B.* // Trends Microbiol. 2008. V. 16. P. 543.
35. *Lozinsky V.I.* // Russ. Chem. Bull. 2008. V. 57. P. 1015.
36. *Bolgen N., Demir D., Yalcın M.S., Ozdemir S.* // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 161. P. 1581.
37. *Murphy C.M., Haugh M.G., O'Brien F.J.* // Biomaterials. 2010. V. 31. P. 461.
38. *Bolgen N., Yang Y., Korkusuz P., Guzel E., El Haj A.J., Pişkin E.J.* // Tissue Eng. Regen. Med. 2011. V. 5. P. 770.
39. *Babanejad N., Mfoafo K., Zhang E., Omid Y., Razeghifard R., Omidian H.* // J. Chromatogr. A. 2022. V. **1683**. P. 463546.
40. *Hajizadeh S., Kettisen K., Bulow L., Ye L.* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. P. 671229.
41. *Bakhshpour M., Idil N., Percin I., Denizli A.* // Appl. Sci. 2019. V. 9. P. 553.
42. *Sellergren B.* // J. Chromatogr A. 2001. V. 906. P. 227.
43. *McConn J., Fasman G.D., Hess G.P.* // J. Mol. Biol. 1969. V. 39. P. 551.
44. *Осташевский И.Я., Безрукова А.Г.* // Молекулярная биология. 1976. Т. **10**. № 521.