

АДСОРБЦИЯ БСА ПОРИСТЫМИ МАТРИКСАМИ НА ОСНОВЕ БИОПЭГИЛИРОВАННОГО ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА

© 2018 г. А. П. Бонарцев^{1,2}, В. В. Воинова^{1,2,*}, Е. С. Кузнецова²,
И. И. Жаркова², Т. К. Махина¹, В. Л. Мышкина¹, Д. В. Чеснокова²,
К. С. Кудряшова², А. В. Феофанов², К. В. Шайтан², Г. А. Бонарцева¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, 119234, Россия

*e-mail: veravoynova@mail.ru

Поступила в редакцию 00.00.2017

Изготовлены пористые матриксы для тканевой инженерии на основе поли-3-оксибутирата (ПОБ) и его сополимера с полиэтиленгликолем (ПОБ-ПЭГ), который был получен по технологии биоПЭГилирования. Исследована морфология полученных матриксов и адсорбция на них модельного белка, бычьего сывороточного альбумина (БСА). Показано, что матриксы на основе биоПЭГилированного ПОБ сорбировали больше БСА, а доля необратимо сорбированного белка на них значительно меньше (33%), чем на матриксах из гомополимера ПОБ (47%). Влияние адсорбции белка на биосовместимость матриксов *in vitro* было проверено путем культивирования на них фибробластов линии COS-1. Показано, что матриксы на основе ПОБ-ПЭГ в большей степени поддерживали рост клеток на них по сравнению с матриксами на основе ПОБ. Таким образом, полученные полимерные матриксы на основе биоПЭГилированного ПОБ могут быть более перспективны для использования в инженерии мягких тканей.

Ключевые слова: поли-3-оксибутират, бычий сывороточный альбумин, биоПЭГилирование, полиэтиленгликоль, адсорбция

DOI:

Поли-3-оксиалканоаты (ПОА) – биосовместимые и биоразлагаемые полимеры бактериального происхождения, перспективные для применения в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Предшественником всех ПОА и наиболее известным полимером этого класса является гомополимер поли-3-оксибутират (ПОБ). Перспективные области применения ПОБ – разработка медицинских изделий для стоматологии, челюстно-лицевой хирургии, ортопедии, сердечно-сосудистой хирургии, герниопластики и пластической хирургии, а также тканевая инженерия. Для тканевой инженерии на основе ПОБ и его сополимеров изготавливают пористые 3D-матриксы, используемые в качестве подложек для роста в их объеме клеток различных типов, в том числе мезенхимальных стволовых клеток, создавая таким образом гибридную конструкцию, служащую искусственным прототипом живой ткани [1, 2]. Однако, в ряде случаев, например, при разработке медицинских изделий на основе ПОБ для восстановительной хирургии мягких тканей и сердечно-сосудистой хирургии, некоторые его свойства, такие как относительно высокая гидрофобность, могут серьезно ограничивать применение этого биополимера [3, 4]. Ранее было показано, что разработанная нами технология управляемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров

при помощи высокопродуктивного штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б, позволяет получать эти полимеры высокой степени чистоты, а также управлять их мономерным составом и молекулярной массой. Одним из разработанных методов является так называемое биоПЭГилирование – микробиологический биосинтез сополимера ПОБ с синтетическим полиэтиленгликолем (ПЭГ) путем его добавления в культуральную среду штамма-продуцента ПОБ [5, 6]. Благодаря тому, что ПЭГ является гидрофильным полимером, биоПЭГилирование приводит к снижению гидрофобности природного биополимера, что может расширить сферу использования биосинтетических ПОА. БиоПЭГилирование является альтернативой химическим методам сополимеризации и получения композитов ПОБ с гидрофильными полимерами, которые используются для повышения гидрофильности ПОА и посредством этого улучшения совместимости полимера с некоторыми клетками и тканями (мягкой соединительной, нервной, кровью) [3, 5, 7–10].

Важнейшим показателем, определяющим биосовместимость полимера (цитотоксичность, адгезию и пролиферацию на нем клеток *in vitro*, гемосовместимость и совместимость с живыми тканями

при имплантации *in vivo*) является адсорбция белков на поверхности полимера. Особенно важен этот параметр для 3D-матрицков из ПОБ и его сополимеров, предназначенных для тканевой инженерии, т.к. прикрепление и рост клеток на внутренней поверхности пор биополимерных матрицков в значительной степени зависит от формирования слоя адсорбированного белка на полимерной поверхности. Основную роль в адсорбции белков играет сывороточный альбумин плазмы, так как его содержание в плазме крови и межтканевой жидкости максимальное и составляет 40–55 г/л, тогда как общее содержание белков 60–80 г/л. Сывороточный альбумин, чаще всего это БСА или слабо отличающийся от него по своим свойствам человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), широко используются для тестирования адсорбции белков на различных полимерных биоматериалах [11]. Более того, некоторые авторы предполагают, что эндогенный низкомолекулярный ПОБ в человеческом организме переносится в крови преимущественно за счет нековалентного связывания именно с сывороточным альбумином [12]. К сожалению, при исследовании ПОБ и его сополимеров этому вопросу не всегда уделяют должное внимание, несмотря на наличие работ, посвященных изучению взаимодействия БСА с ПОА. Ранее нами была продемонстрирована возможность получения микроволокнистых матрицков из композита сополимера ПОБ с 3-оксидвалератом (ПОБВ) и БСА методом электроформования, и показано высвобождение белка из этой композитной конструкции [13]. Другими исследователями были получены композитные микро- и наночастицы из ПОБВ с БСА для пролонгированного высвобождения из них белка [14–16]. То есть БСА может вступать во взаимодействие с ПОБ и его сополимерами, но исследование адсорбции белков на пористых матрицках для тканевой инженерии очень редки. Исследований же адсорбции белков на изделиях из биоПЭГирированного ПОБ не проводились вообще.

Цель работы – исследование влияния биоПЭГирирования ПОБ на свойства 3D-матрицков из модифицированного полимера и, прежде всего, адсорбцию на них БСА.

МЕТОДИКА

Реактивы. Натриевая соль валериановой кислоты, или валерат натрия (ВК), полиэтиленгликоль 300 (ПЭГ 300), ацетат натрия (АН); минеральные компоненты культуральной среды: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $CaCO_3$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, KH_2PO_4 , а также цитрат натрия, сахароза, агар, фосфатно-солевой буфер (ФСБ) – фирмы “Sigma Aldrich” (Германия).

Биосинтез полимеров. Для биосинтеза полимеров использован высокоэффективный штамм-продуцент ПОБ *Azotobacter chroococcum* 7Б. Эта несимбиотическая азотфиксирующая бактерия, способна к сверхпродукции полимера до 80% от сухого веса клеток [6]. Штамм был выделен из ризосферы пшеницы (дерново-подзолистая почва) и поддерживался на среде Эшби, содержащей (г/л): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2, NaCl – 0.2, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0.006, $CaCO_3$ – 5.0, сахароза – 20 и агар-агар – 20. Для достижения высокой продуктивности клеток культуру *Azotobacter chroococcum* выращивали в качалочных колбах на качалке Innova 43 (“New Brunswick Scientific”, США) при 250 об./мин температуре 30 °С на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде, следующего состава (г/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.4, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.01, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0.006, цитрат натрия – 0.5, $CaCl_2$ – 0.1, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 1.05, KH_2PO_4 – 0.2 и сахароза – 17 (50 мМ), как основной источник углерода. Объем среды в колбе – 200 мл. Для биосинтеза сополимера ПОБ с ПЭГ был использован биотехнологический способ биоПЭГирирования, заключающийся в том, что в среду для выращивания штамма-продуцента добавляли ПЭГ 300 в качестве предшественника для биосинтеза сополимера. ПЭГ 300 добавляли в культуральную среду через 12 ч после начала культивирования штамма-продуцента в концентрации 150 мМ. Концентрации и время добавки были выбраны ранее как наиболее оптимальные [6]. Для снижения молекулярной массы гомополимера ПОБ с целью получения полимеров ПОБ и ПОБ-ПЭГ с сопоставимой молекулярной массой (ММ) в культуральную среду добавляли ацетат натрия, согласно ранее разработанной методике биотехнологической регуляции ММ ПОБ [17]. Штамм-продуцент культивировали в течение 72 ч. Оптическую плотность культуральной среды контролировали при помощи нефелометрии. Рост и накопление полимера контролировали также с использованием микроскопа Биомед-1 (“Биомед”, Россия) с цифровой камерой. Параметры биосинтеза сополимеров: выход биомассы (г/л среды) и общее содержание полимера в клетках (% от сухого веса клеток) (табл. 1) измеряли согласно ранее разработанным методикам [6]. Процесс выделения и очистки полимера из биомассы штамма-продуцента включал экстракцию хлороформом, фильтрование, осаждение изопропиловым спиртом, очистку путем нескольких циклов растворения-осаждения и высушивание, как описано ранее [6].

Исследование химического состава полимера методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Спектры 1H ЯМР 1%-ных (вес/об.) растворов полимеров в дейтерированном хлороформе

были сняты на спектрометре MSL-300 300 МГц (“Bruker”, Германия) с экспериментальными параметрами: температура 313 °К, релаксационная задержка 2.5 с, ширина спектрального окна – 10 000 Гц. Химические сдвиги (в миллионных долях) выставлены по сигналу остаточных протонов CDCl_3 (7.24 м.д. по ТМС). Процентное содержание элементарных звеньев этиленгликоля (ЭГ) в сополимере ПОБ-ПЭГ было рассчитано, исходя из отношения суммы сигналов интенсивности от групп $-\text{CH}_2-\text{ЭГ}$ (3.61, 3.70, 3.66, 3.73, 4.24 ppm) к сумме сигналов от метильной группы 3-оксибутирата (1.27 ppm) [6].

Определение молекулярной массы полимеров. Величину молекулярной массы ПОБ и ПОБ-ПЭГ определяли методом капиллярной вискозиметрии, используя капиллярный стеклянный вискозиметр марки ВПЖ-1 (диаметр капилляра 0.34 мм, “Новолаб”, Россия). Вязкость определяли при температуре 30 ± 0.5 °С. Концентрация исследуемых образцов находилась в пределах 100–190 мг полимера на 100 мл хлороформа. Удельную вязкость рассчитывали по формуле:

$$\eta_{\text{уд}} = (t - t_0)/t_0,$$

где t_0 – время истечения растворителя, с; t – время истечения раствора полимера, с.

Молекулярную массу вычисляли по уравнению Марка–Хаувинка–Куна, используя следующие коэффициенты:

$$[\eta] = 7.7 \times 10^{-5} \times M^{0.82}.$$

Точность определения вязкости $[\eta]$ составляла ~1%. Точность определения молекулярной массы, вычисленной по уравнению Марка–Хаувинка–Куна, составляла 2–5% [17].

Получение экспериментальных образцов полимерных пленок. Для изучения физико-химических свойств полученных полимеров ПОБ и ПОБ-ПЭГ были получены экспериментальные образцы полимерных пленок толщиной 40 мкм и диаметром 30 мм. Полимерные пленки готовили из 2%-ных (вес/об.) растворов соответствующих полимеров в хлороформе путем испарения растворителя на стеклянной подложке. Вес пленок измеренный с помощью весов AL-64 (макс. = 60 г, d = 0.1 мг, “Acculab”, США) составил 61 ± 8 мг, толщина пленок, измеренная магнитным толщиномером, составила 38 ± 6 мкм [5].

Оценка гидрофильности полимеров. Гидрофильность поверхности полимерных пленок оценивали, измеряя контактный угол смачивания, формирующийся между каплей воды и поверхностью полимерной пленки. Измерение производилось на цифровом угломере Contact Angle Meter 110 VAC

(“Cole-Parmer”, США), позволяющим определить статический угол смачивания поверхности. На поверхность полимерной пленки, зафиксированной на предметном стекле, с помощью микрошприца наносили 5 мкл деионизированной дистиллированной воды и проводили измерение угла смачивания поверхности пленки с помощью фотокамеры прибора и соответствующей компьютерной программы. Аппроксимация формы капли осуществлялась методом Лапласа–Юнга.

Водопоглощение полимерных пленок ПОБ и ПОБ-ПЭГ измеряли в соответствии со стандартом (ISO U. 62: 2008) и рассчитывали по формуле

$$\text{Водопоглощение (\%)} = (m_2 - m_0)/m_0 \times 100\%,$$

где m_0 и m_2 – массы обезвоженного и насыщенного водой образцов соответственно.

Образцы пленок выдерживали при 50 °С до достижения постоянной массы (m_1), необходимое для этого время составляло 2–3 сут, затем пленки погружали в деионизированную воду при 25 °С на 3 ч. После удаления капель воды образцы взвешивали снова. Опыт проводили до момента, когда увеличение массы не превышало 0.1 мг (m_2). После этого образцы снова высушивали при 50 °С в течение суток и взвешивали (m_3). При расчете использовали $m_1 = m_0$ при $m_1 < m_3$ и $m_3 = m_0$ при $m_3 < m_1$. Результат представлен как среднее значение ($n = 3$) [5].

Получение пористых матриксов. Для получения пористых матриксов была использована новая модификация метода выщелачивания, широко применяемого для изготовления матриксов в тканевой инженерии [18, 19], – метод двойного выщелачивания. Раствор полимера в трихлорметане (“ЭКОС-1”, Россия) 60 мг/мл для ПОБ и 30 мг/мл для ПОБ-ПЭГ смешивали с гранулами карбоната аммония (“Химмед”, Россия) и сахарозы (“Sigma”, США) в чашке Петри. После испарения растворителя (хлороформа), чашку Петри с содержимым переносили в горячую воду (~65 °С). На первой стадии метода двойного выщелачивания происходил гидролиз карбоната аммония. После чего, на второй стадии, воду меняли несколько раз до полного вымывания сахарозы. В результате были получены два типа трехмерных пористых матриксов из ПОБ и его сополимера ПОБ-ПЭГ.

Исследование морфологии полимерных матриксов. Исследование внешнего вида матриксов проводили при помощи фотокамеры Cyber-shot DSC-RX100 (“Sony”, Япония) с функцией макросъемки. Исследование морфологии и структуры полученных матриксов проводили с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на JSM-6380LA (“Jeol”, Япония) с предварительным напылением золота на исследуемые

образцы в течение 15 мин с помощью установки IB-3 (“Giko”, Япония) при силе тока 15 мА, а также широкопольной световой микроскопии (ШСМ) с использованием стереомикроскопа Nikon SMZ1500 (“Nikon”, Япония) [19].

Исследование пористости полимерных матриц. Изучение пористости матриц проводилось методом определения пористости по массе полимера в образце. Расчет пористости (П) по первому методу производили по формуле:

$$П = (1 - m_1/m_2) \times 100\%,$$

где m_1 – измеренная масса пористого образца, а m_2 – расчетная масса монолитного образца без пор, объем которого совпадает с объемом пористого образца (плотность полимера – 1.25 г/см³).

Связность пор в матриксе оценивали с помощью метода окраски матрикса чернилами – “чернильного теста”. Образец матрикса обмакивали в чернила, высушивали, после чего разрезали, для того чтобы убедиться в отсутствии закрытых пор, которые выглядят на разрезе как белые пятна [19].

Адсорбции БСА на полимерных матриксах. Для исследования адсорбции белка на полимерных матриксах из ПОБ и ПОБ-ПЭГ в качестве модельного белка использовали БСА (“Sigma”, США). Эксперимент по адсорбции БСА включал следующие этапы: инкубация образцов полимерных матриц (5 × 5 × 5 мм) в растворе белка 1.0 мг/мл в калий-фосфатном буфере (“Serva”, Германия) с в термостате при 37 °С 1 ч; затем образцы переносили в калий-фосфатный буфер и инкубировали в тех же условиях (отмывка белка). Этот этап повторяли 3 раза (I, II, III инкубации) для достижения полной отмывки обратимо адсорбированного белка; после этого образцы переносили в дистиллированную воду для отмывки образцов от буфера. Для изучения необратимо адсорбированного белка образцы переносили в раствор 0.01%-ного ДДС в воде и отмывали в нем образцы 2 раза (IV, V инкубации). Измерение оптической плотности (ОП) растворов, полученных в результате десорбции БСА в ходе инкубаций I, II, III измеряли при 280 нм на спектрофотометре UV-1601PC (“Shimadzu”, Япония).

Исследование адсорбции белка проводили также, инкубируя образцы в растворе калий-фосфатного буфера с БСА, меченым изотиоцианатом флуоресцеина (1 мг/мл, ФИТЦ-БСА, “Sigma”, США) в течение 1 ч в термостате при температуре 37 °С. Белок, который не адсорбировался удаляли промыванием калий-фосфатным буфером, после чего распределение белка на поверхности образцов изучали методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ) на приборе LSM 710 (“Zeiss”, Германия) при длине волны

возбуждения 488 нм, детекцию проводили в диапазоне от 493 до 634 нм. Анализ полученных изображений проводили с помощью программного обеспечения ImageJ.

Растворы с десорбированным белком исследовали также методом кругового дихроизма (КД) на КД-спектрометре “Chirascan” (“AppliedPhotophysics”, Англия) [19].

Пролиферация фибробластов линии COS-1 на полимерных матриксах. Для оценки биосовместимости матриц *in vitro* были использованы фибробласты зеленой мартишки линии COS-1 (“Биолот”, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM (Dubecco’s Modified Eagle Medium, “Invitrogen”, США) с повышенным содержанием глюкозы (4.5 г/л), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (“Invitrogen”, США). Клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂, среду меняли каждые 3 дня. Фибробласты снимали с подложки раствором трипсина-версена (0.05% трипсина и 0.02% версена в ФСБ, “Serva”, Германия) и подсчитывали с помощью камеры Горяева [19].

Для исследования пролиферации фибробластов на матриксах из ПОБ и ПОБ-ПЭГ по 12 образцов полимера каждого матрикса помещали в лунки 96-луночного планшета, клеточную суспензию наносили сверху на каждый образец из расчета 5–6 тысяч кл. в лунку. Планшеты инкубировали 24, 48, и 120 ч. Выживаемость и пролиферацию клеток контролировали с помощью теста, основанного на реакции преобразования нерастворимой соли тетразолиума в растворимую окрашенную соль формазана, осуществляемой активными митохондриальными ферментами клеток (ХТТ Cell Proliferation Kit, “Biological Industries”, Израиль). По окончании времени 24, 48 или 120 ч полимерные пористые пленки быстро и аккуратно переносили в лунки с 100 мкл свежей среды, добавляли по 50 мкл смеси ХТТ в каждую лунку и инкубировали при 37 °С в течение 2.5 ч. Затем полимерные матриксы затем извлекали из лунок и проводили измерения на планшетном спектрофотометре Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector (“Anthos Labtec Instruments”, Австрия) при длине волны 450 нм с базовым уровнем при 620 нм. Количество живых клеток определяли по стандартной калибровочной для теста ХТТ [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Параметры биосинтеза ПОБ и процесса био-ПЭГилирования для получения сополимера ПОБ-ПЭГ приведены в табл. 1. Добавление ПЭГ 300 в культуральную среду штамма-продуцента *A. chroococcum* приводило к подавлению роста биомассы и продукции сополимера ПОБ-ПЭГ

Таблица 1. Условия биосинтеза и характеристики ПОБ и его сополимера ПОБ-ПЭГ, полученного по методике биоПЭГиляции.

Полимеры	Условия культивации и характеристики роста штамма-продуцента			Физико-химические свойства синтезированных полимеров			
	субстрат, (концентрация/ время добавления)	выход биомассы, г/л ± СО	общее содержание полимера, % ± СО	ММ, × 10 ⁵ Да	содержание ЭГ, моль%	контактный угол с водой, (θ)°	водопоглощение, %, (вес/вес)
ПОБ	Сахароза, 50 мМ + АН, 30 мМ/0 ч	4.4 ± 0.5	71.7 ± 3.2	5.2	0	70.1 ± 2.6	1.62 ± 0.24
ПОБ-ПЭГ	Сахароза, 50 мМ + ПЭГ 300, 150 мМ/12 ч	2.2 ± 0.4	34.2 ± 2.7	4.3	0.18	52.3 ± 7.5	3.97 ± 0.18

с молярным содержанием ПЭГ 0.18 мол.%. Учитывая, что молекула ПЭГ связывается с карбоксильной группой синтезируемого полимера, обрывая его дальнейший синтез и, соответственно, снижая его молекулярную массу, такое содержание ПЭГ говорит о том, что практически каждая молекула ПОБ оказывается связана с молекулой ПЭГ. Полученный сополимер ПОБ-ПЭГ имел значительно меньший контактный угол смачивания водой (на 25%) и большее водопоглощение (почти в 2.5 раза), т.е. биоПЭГиляция ПОБ привело к значительному увеличению гидрофильности полученного сополимера ПОБ-ПЭГ.

По методике двойного выщелачивания нами были получены трехмерные матриксы из ПОБ и ПОБ-ПЭГ. Изучение образцов полимерных подложек методом СЭМ и ШСМ, а также с использованием чернильного теста (рис. 1) показало, что матриксы имели трехмерную пористую структуру со сквозной сообщающейся системой пор. Размер пор матриксов из ПОБ и ПОБ-ПЭГ не различались: микропоры – 22–23 мкм, макропоры – 400–600 мкм. Средняя пористость матриксов обоих типов составила 93–94% (табл. 2). Следует отметить, что макропоры более 300 мкм считаются оптимальным для проникновения питательных веществ и клеток по всему объему материала, микропористость также необходима для прикрепления и роста клеток в матриксе [20]. Кроме того, для подобных пористых конструкций из ПОБ была продемонстрирована хорошая проницаемость БСА в растворе [21].

Если изучение микроструктуры матриксов не выявило различий между матриксами из ПОБ и ПОБ-ПЭГ, то исследование адсорбции БСА на матриксах показало, что по этому параметру имелись значительные различия. Инкубация образцов в растворе белка (1 мг/мл) привела к адсорбции белка на поверхности исследуемых матриксов.

Причем, на матрикс из ПОБ-ПЭГ адсорбировалось примерно в 2 раза больше белка, чем на матриксе из ПОБ, что, на первый взгляд, не совсем согласовывалось с результатами, полученными другими исследователями, согласно которым гидрофилизация полимерной поверхности приводила к снижению адсорбции БСА на полимерных матриксах [11, 22, 23].

Последовательная инкубация образцов полимерных матриксов в буфере показала значительное различие в десорбции БСА с поверхности матриксов из ПОБ и ПОБ-ПЭГ. Белок десорбировался с поверхности матриксов преимущественно в ходе инкубации I, причем десорбция в большей степени происходила с матрикса из ПОБ-ПЭГ. В ходе дальнейших инкубаций с матрикса из ПОБ-ПЭГ белок десорбировался на каждой стадии “отмывки”, а десорбции белка с матрикса из ПОБ практически не происходило, белок не смывался даже лаурилсульфатом натрия (рис. 2). Примерно половина белка сорбировалась на матриксах из ПОБ необратимо, тогда как адсорбция БСА на матриксах из биоПЭГилизованного ПОБ на 2/3 осуществлялась обратимо (табл. 3) в соответствии с тем, что гидрофилизация поверхности полимера приводит к уменьшению доли необратимо сорбированного белка [11]. Прочная необратимая адсорбция БСА подтверждалась другими исследователями. Так, было показано формирование устойчивой короны из БСА вокруг наночастиц из ПОБ с 3-оксигексаноатом только за счет адсорбции белка на полимерной поверхности наночастиц, что многократно увеличивало устойчивость дисперсии таких наночастиц [24]. Адсорбция БСА на поверхности пленок из ПОБ с 4-оксибутиратом была также исследована с помощью кварцевых микровесов. Масса сорбируемого БСА быстро увеличивалась в течение примерно 10 мин, а затем выходила на плато, несмотря на последующее промывание пленки буферным раствором, что также свидетельствовало о необратимой

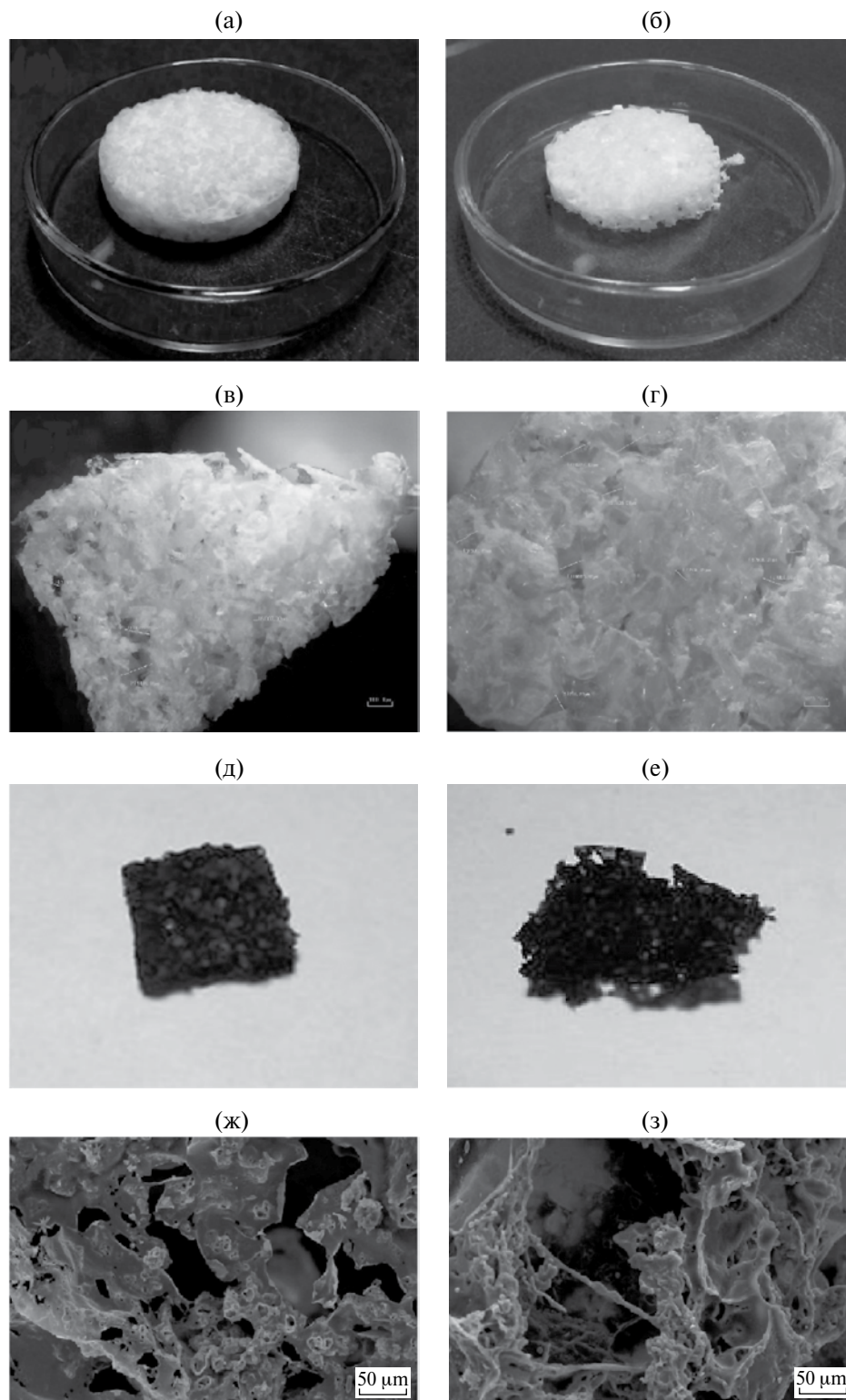


Рис. 1. Общий вид и микроструктура матриц из ПОб (а, в, д, ж) и его сополимера ПОб-ПЭГ (б, г, е, з), полученного биоПЭГилированием.
 а, б – общий вид матриц; в, г – микроструктура матриц, ШСМ, $\times 100$; д, е – чернильный текст, ШСМ, $\times 100$;
 ж, з – микроструктура матриц, СЭМ $\times 300$.

Таблица 2. Пористость матриксов из ПГБ и ПГБ-ПЭГ.

Характеристика матрикса		Матрикс	
Полимер		ПОБ	ПОБ-ПЭГ
Пористость, %		93 ± 1	94 ± 2
Размер пор, мкм	микропоры	23 ± 8	22 ± 9
	макропоры	410 ± 75	615 ± 64

Таблица 3. Адсорбция БСА на матриксах из ПОБ и ПОБ-ПЭГ.

Показатель	Матрикс	
	ПОБ	ПОБ-ПЭГ
Общая адсорбция белка, мкг БСА/мг полимера	2.9 ± 0.1	6.4 ± 1.4
Необратимая адсорбция, %	47 ± 5	33 ± 9

в значительной мере адсорбции белка [23]. Возможно, что биоПЭГилирование ПОБ приводило к увеличению числа сайтов адсорбции белка на полимере и к возрастанию общего количества адсорбированного БСА. Однако за счет изменения конформации полимерной поверхности и возрастания ее гидрофильности адсорбция БСА на ПОБ-ПЭГ происходила преимущественно обратимо без критического изменения конформации белка.

Десорбированный БСА исследовали методом КД, чтобы проанализировать возможное изменение вторичной структуры белка. Известно, что бычий сывороточный альбумин состоит на 70% из α-спиралей [25], соответственно спектр кругового дихроизма этого белка представляет собой, типичный спектр α-спирали. Разницу между спектрами контрольного и экспериментального белка исследовали при 220 нм. В результате обработки данных было выяснено, что имелись различия между спектрами исходного и десорбировавшегося с матриксов белка, но оно составило 3–4%, что не выходило за пределы погрешности измерений прибора (рис. 3).

Качественно адсорбция БСА была также подтверждена с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентно-меченого ФИТЦ-БСА. На рис. 4 видно, что после отмывания матриксов буферным раствором белок покрывает поверхность пор обоих матриксов, иногда располагаясь в виде более “ярких” конгломератов, причем, число таких скоплений БСА-ФИТЦ в случае матрикса из ПОБ больше (рис. 4).

Для исследования взаимосвязи адсорбции белка с ростом клеток на полимерных матриксах была

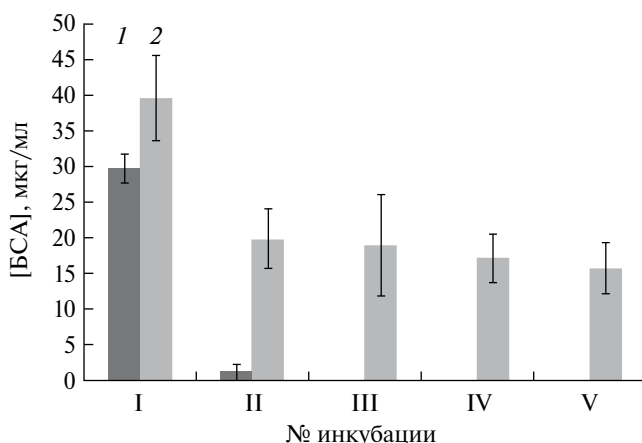


Рис. 2. Диаграмма изменения концентрации раствора БСА в результате его десорбции с матриксов из ПОБ (1) и ПОБ-ПЭГ (2) в ходе инкубаций в калий-фосфатном буфере без добавления детергента (инкубации I, II, III) и в калий-фосфатном буфере с 0.01%-ным ДДС-Na (инкубации IV, V)

исследована пролиферация клеток мягкой соединительной ткани фибробластов на матриксах из ПОБ и ПОБ-ПЭГ. Полученные данные позволяют утверждать, что клетки жизнеспособны и активно пролиферируют на матриксах в течение недели. Хотя достоверных различий в активности роста фибробластов на матриксах из разных полимеров выявлено не было, тем не менее, отмечалась тенденция более интенсивного роста клеток на матриксах из биоПЭГилированного ПОБ (рис. 5).

Таким образом, биоПЭГилирование приводило к увеличению общей адсорбции при одновременном значительном уменьшении доли необратимо адсорбированного белка на полимерных матриксах

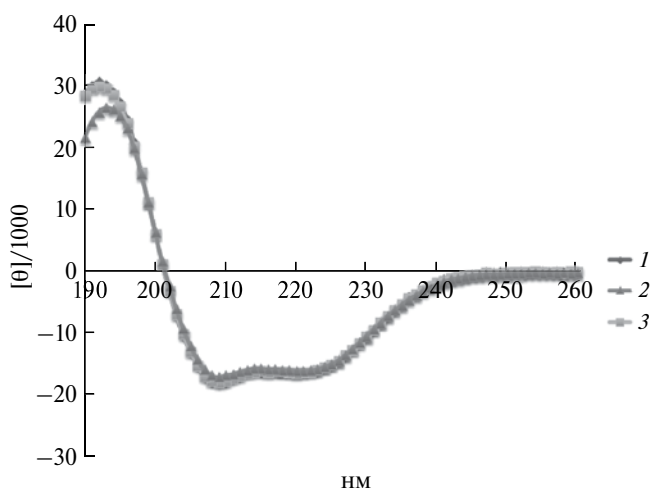


Рис. 3. Спектры БСА, десорбированного с матриксов из ПОБ (2) и ПОБ-ПЭГ (3), и исходного белка (1), полученные методом КД.

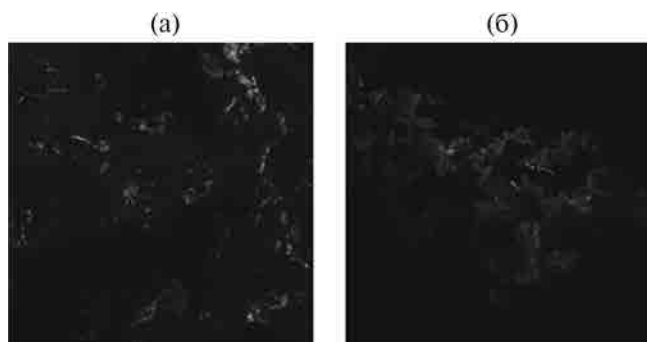


Рис. 4. Изображения флуоресценции ФИТЦ-БСА, сорбированного на матриксах из ПОБ (а) и ПОБ-ПЭГ (б), полученные с помощью флуоресцентной световой микроскопии, $\times 400$.

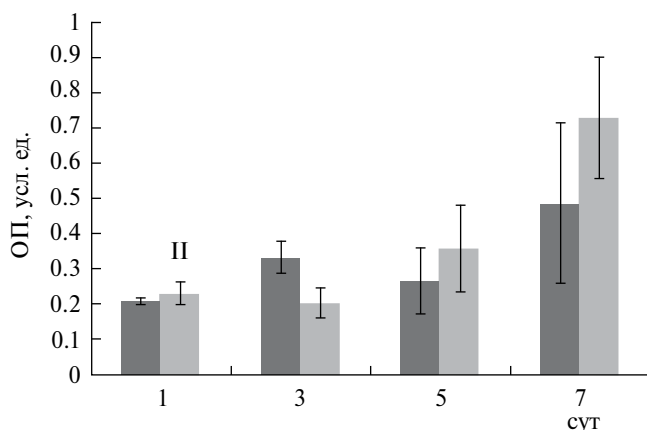


Рис. 5. Рост фибробластов линии COS-1 на матриксах из ПОБ (I) и ПОБ-ПЭГ (II).

из ПОБ-ПЭГ, что может способствовать лучшему росту фибробластов на них. Следовательно, такие матриксы в большей степени подходят для восстановления мягкой соединительной ткани, чем матриксы из ПОБ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 17-74-20104, с использованием оборудования центров коллективного пользования МГУ (в т.ч. комплекса для получения микро- и наночастиц полимеров) и ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lim J., You M., Li J., Li Z.* // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2017. V. 79. P. 917–929.
2. *Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Кирпичников М.П.* // Биомедицинская химия. 2011. Т. 57. № 4. С. 374–391.

3. *Chan R.T., Marcal H., Ahmed T., Russell R.A., Holden P.J., Foster L.J.R.* // Polymer International. 2013. V. 62. № 6. P. 884–892.
4. *Dominguez-Diaz M., Meneses-Acosta A., Romo-Uribe A., Pena C., Segura D., Espin G.* // European Polymer Journal. 2015. V. 63. P. 101–112.
5. *Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhiyev A.P., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Kharitonova E.P., Samsonova O.V., Feofanov A.V., Voinova V.V., Zernov A.L., Efremov Yu.M., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P.* // BMC Biochemistry. 2013. V. 14. P. 12.
6. *Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Voinova V.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A.* // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2017. V. 47. № 2. P. 173–184.
7. *Chan R.T., Russell R.A., Marcal H., Lee T.H., Holden P.J., Foster L.J.* // Biomacromolecules. 2014. V. 15. № 1. P. 339–349.
8. *Cheng G., Cai Z., Wang L.* // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2003. V. 14. № 12. P. 1073–1078.
9. *Nemets E.A., Efimov A.E., Egorova V.A., Tonevitsky A.G., Sevastianov V.I.* // Bull. Exp. Biol. Med. 2008. V. 145. № 3. P. 371–373.
10. *Monnier A., Rombouts C., Kouider D., About I., Fessi H., Sheibat-Othman N.* // Int. J. Pharm. 2016. V. 513. № 1–2. P. 49–61.
11. Биосовместимые материалы: Учебное пособие. / Ред. В.И. Севастьянов, М.П. Кирпичников, М.: Медицинское информационное агентство, 2011. 540 с.
12. *Reusch R.N.* // Med. Hypotheses. 2015. V. 85. № 6. P. 1041–1043.
13. *Pavlova E.R., Bagrov D.V., Kopitsyna M.N., Shchelokov D.A., Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Makhina T.K., Myshkina V.L., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Klinov D.V.* // Journal of Applied Polymer Science. 2017. V. 134. P. 45090.
14. *Atkins T.W., Peacock S.J.* // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 1996. V. 7. № 12. P. 1065–1073.
15. *Baran E.T., Ozer N., Hasirci V.* // J. Microencapsul. 2002. V. 19. № 3. P. 363–376.
16. *Zhu X.H., Wang C.H., Tong Y.W.* // J. Biomed. Mater. Res A. 2009. V. 89. № 2. P. 411–423.
17. *Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 5. С. 533–538.
18. *Kundu J., Pati F., Hun Jeong Y., Cho D.W.* // Biomaterials for Biofabrication of 3D Tissue Scaffolds. Biofabrication: Micro- and Nano-fabrication, Printing, Patterning and Assemblies. / Eds. G. Forgacs, W. Sun. Oxford, UK: Elsevier, 2013. P. 23–46.

19. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Zernov A.L., Kudryashova K.S., Feofanov A.V., Akulina E.A., Ivanova E.V., Zhuikov V.A., Volkov A.V., Andreeva N.V., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. // *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 2016. V. 6. № 1. P. 42–52.
20. Karageorgiou V., Kaplan D. // *Biomaterials*. 2005. V. 26. № 27. P. 5474–5491.
21. Bian Y.Z., Wang Y., Aibaidoula G., Chen G.Q., Wu Q. // *Biomaterials*. 2009. V. 30. № 2. P. 217–225.
22. Venault A., Subarja A., Chang Y. // *Langmuir*. 2017. V. 33. № 9. P. 2460–2471.
23. Zhan J., Wang L., Liu S., Chen J., Ren L., Wang Y. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. V. 7. № 25. P. 13876–13881.
24. Peng Q., Wei X.Q., Yang Q., Zhang S., Zhang T., Shao X.R., Cai X.X., Zhang Z.R., Lin Y.F. // *Int. J. Nanomedicine*. 2015. V. 10. № 2. P. 205–214.
25. Kulikova T., Akhtar R., Aldebert P., Althorpe N., Andersson M., Baldwin A., Bates K., Bhattacharyya S., Bower L., Browne P., Castro M., Cochrane G., Duggan K., Eberhardt R., Faruque N., Hoad G., Kanz C., Lee C., Leinonen R., Lin Q., Lombard V., Lopez R., Lorenc D., McWilliam H., Mukherjee G., Nardone F., Pastor M.P., Plaister S., Sobhany S., Stoehr P., Vaughan R., Wu D., Zhu W., Apweiler R. // *Nucleic Acids Research*. 2007. V. 35. (Suppl. 1). P. D16–20.

Adsorption of BSA on Porous Scaffolds from BioPEGylated poly(3-hydroxybutyrate)

**A. P. Bonartsev^{1,2}, V. V. Voinova^{1,2,*}, E. S. Kuznetsova², I. I. Zharkova²,
T. K. Makhina¹, V. L. Myshkina¹, D. V. Chesnokova², K. S. Kudryashova²,
A. V. Feofanov², K. V. Shaitan², G. A. Bonartseva¹**

¹*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
Leninsky Ave. 33, bld. 2, 119071 Moscow, Russia*

²*Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, bld. 12, 119236 Moscow, Russia*

*e-mail: veravoinova@mail.ru

Received November 20, 2017

We manufactured porous scaffolds for tissue engineering based on biopolymers, poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its copolymer with polyethylene glycol (PHB-PEG) produced by bioPEGylation. The morphology of the obtained scaffolds and the adsorption of model protein, bovine serum albumin (BSA) on them, were studied. The scaffolds from bioPEGylated PHB sorbed more BSA, and the proportion of irreversibly bound protein on them is much lower (33%) than on scaffolds from the PHB homopolymer (47%). The effect of protein adsorption on scaffolds biocompatibility *in vitro* was tested by culturing COS-1 fibroblasts on scaffolds. It was shown that PHB-PEG-based scaffolds contribute to better cell growth on them than do PHB-based scaffolds. Thus, the developed polymer scaffolds based on bioPEGylated PHB may be more promising for use in the engineering of soft tissues.

Keywords: poly(3-hydroxybutyrate), bovine serum albumin, bioPEGylation, polyethylene glycol, adsorption