

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций  
Кафедра «Медицинская физика»

Работа допущена к защите  
и.о.зав.кафедрой «МФ»  
\_\_\_\_\_ О.Л. Власова  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

## **ВЫПУСКНАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА**

Тема: *ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕГРАДАЦИИ  
ПОЛИ(МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ)*

Направление: Техническая физика

Профиль подготовки: Медицинская и биоинженерная физика

Работа выполнена на базе Института высокомолекулярных соединений РАН  
в Лаб. № 12 - полимерных сорбентов и носителей для биотехнологий  
*название лаборатории и организации*

Выполнил студент гр. 43431/1: \_\_\_\_\_ Царев Н.С.  
*подпись*

Руководители: \_\_\_\_\_ с.н.с., к.х.н., доцент, Влах Е.Г.  
*подпись*

Куратор: \_\_\_\_\_ к.х.н., с.н.с., Писарев Олег Александрович  
*подпись*

Санкт-Петербург  
2015

## РЕФЕРАТ

С. 39, Рис. 9, Табл. 4

### ПОЛИМЕРЫ, ПОЛИ(МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА), ДЕГРАДАЦИЯ, ЭСТЕРАЗА, ЛИПАЗА, НАНОЧАСТИЦЫ, ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ, ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, ГЕТЕРОГЕННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ

**Объекты исследования** – поли(молочная кислота), нативные и иммобилизованные ферменты, наночастицы на основе поли(молочной кислоты).

**Цель данной работы** - изучение процесса биodeградации ПМК и наночастиц на основе ПМК при использовании нативных и иммобилизованных форм ферментов.

В результате выполнения данной работы был изучен процесс деградации ПМК в растворе при использовании различных ферментов подкласса эстераз. Наиболее эффективная деградация поли(молочной кислоты) в растворе наблюдалась при использовании липазы из *Candida rugosa* (C=0.40 мг/мл) и эстеразы из свиной печени (C=0.04 мг/мл). Получено два гетерогенных биокатализатора на основе макропористых полиметакрилатных монолитных дисков, содержащих иммобилизованную через макромолекулярный спейсер липазу из *Candida rugosa* и эстеразу из свиной печени. Установлено, что деструкция поли(молочной кислоты) с использованием иммобилизованной эстеразы протекала более эффективно. Также был изучен процесс деградации ПМК при использовании биореакторов на основе эстеразы и липазы. Были рассчитаны кинетические параметры для сравнения различных форматов биокатализа. Был исследован процесс деградации наночастиц на основе ПМК, в результате чего установлено, что полная деградация наночастиц во всех случаях достигалась спустя 50 суток, что позволяет заключить, что гетерогенные биокатализаторы на основе макропористых монолитных носителей могут быть использованы для изучения процессов деградации полимеров медицинского назначения.

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	9
1.1. Полимерные частицы для биомедицинского назначения.....	9
1.2. Поли(молочная кислота).....	10
1.2.1 Синтез поли(молочной кислоты) .....	10
1.2.2. Свойства поли(молочной кислоты).....	13
1.2.3. Деградация поли(молочной кислоты).....	15
1.3 Иммобилизация ферментов .....	18
1.3.1 Преимущества иммобилизованных ферментов.....	18
1.3.2 Макропористые монолиты как стационарные фазы для иммобилизации ферментов.....	19
<b>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	21
2.1. Разработка методов детектирования ПМК и продуктов ее деструкции методом ВЭЖХ .....	21
2.1.1. Анализ ПМК с использованием колонки C12 .....	21
2.1.2. Анализ МК методом АО ВЭЖХ.....	21
2.2. Создание гетерогенных биокатализаторов на основе липазы и эстеразы	21
2.3. Изучение деградации ПМК .....	23
2.3.1. Деградация ПМК различными ферментами подкласса эстераз в растворе .....	23
2.3.2. Изучение процесса деградации ПМК иммобилизованными ферментами .....	24
2.3.3. Изучение каталитических свойств эстеразы .....	24
2.4. Деградация наночастиц на основе ПМК.....	25
<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	27
3.1. Изучение процесса деградации ПМК в растворе с помощью различных ферментов подкласса эстераз .....	27

3.2. Создание гетерогенных биокатализаторов .....	29
3.3. Изучение деградации ПМК с использованием иммобилизованных ферментов .....	31
3.4. Определение кинетических параметров деградации ПМК нативной и иммобилизованной эстеразой.....	32
3.5. Изучение деградации наночастиц на основе ПМК .....	34
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	37
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	38

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПМК – поли(молочная кислота);

МК – молочная кислота;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

АО ВЭЖХ – анионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография;

КМ - константа Михаэлиса;

Ауд - удельная активность;

$k_{cat}$  - число оборотов;

$k_{cat}/K_M$  - эффективность биокатализа.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время биodeградируемые полимеры с контролируемым временем распада представляют большой интерес в качестве материалов медицинского назначения. В частности, материалы на основе данных полимеров могут быть использованы в качестве временного каркаса, временного барьера, а также для получения систем пролонгированного выделения лекарственных средств. Использование полимеров как временного каркаса подразумевает постепенное замещение искусственного имплантата из биodeградируемой полимерной матрицы естественной тканью. В эту категорию также попадают хирургические шовные материалы. Временные барьеры на основе биodeградируемых полимеров применяются для предотвращения адгезии между тканями, а также для закрытия ожоговых или других поврежденных тканей. Наконец, биodeградируемые полимеры используются для инкапсулирования или химического связывания лекарственных веществ с образованием лекарственных форм, которые деградируют в организме с определенной скоростью, постепенно выделяя лекарственное вещество.

Полимеры на основе молочной кислоты занимают ведущее место среди известных биodeградируемых молекул. Причиной подобного интереса являются низкая токсичность, отличная биологическая совместимость, а также способность продуктов ее биodeградации к утилизации *in vivo* естественным метаболическим путем.

Полезные свойства медицинских препаратов на основе биodeградируемых полимеров сильно зависят от стабильности материала. Несмотря на то, что организм человека представляет собой довольно агрессивную среду, необходимо, чтобы эти материалы сохраняли свои свойства в течение всего периода своего применения. Таким образом, контролируемое время деградации является ключевым фактором в процессе выбора материала для биомедицинского назначения, а изучение процесса деструкции – необходимым этапом в процессе создания медицинских препаратов на основе

биodeградируемых полимерных молекул.

Обычно для этих целей используют модельные биологические смеси, содержащие ферменты, подходящие для деструкции полимерных молекул. Однако, получение корректных результатов в данном случае осложняется вследствие того, что процесс деградации может быть довольно продолжительным, в то время как используемые нативные формы ферментов представляют собой крайне лабильные соединения, которые подвержены быстрой инактивации *in vitro*.

Применение ферментов, закрепленных на твердой поверхности, может помочь в преодолении данных недостатков. Как правило, локализация фермента на поверхности носителя способствует стабилизации структуры биокатализатора, сохранению его активности в течение длительного времени, возможности многократного использования, а также проведения непрерывных каталитических процессов.

Целью данной работы являлось изучение процесса биodeградации ПМК и наночастиц на основе ПМК при использовании нативных и иммобилизованных форм ферментов. В качестве носителей для иммобилизации ферментов были использованы макропористые монолитные сорбенты. Материалы данного вида, характеризующиеся высокой проницаемостью и обеспечивающие тем самым эффективный массоперенос, представляют собой перспективные стационарные фазы для создания проточных биоконверсионных систем и на сегодняшний день широко используются для получения гетерогенных биокатализаторов.

В рамках данной работы для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- разработка эффективных методов анализа ПМК и продуктов ее деградации;
- выбор фермента из ряда тестируемых представителей подкласса эстераз и времени протекания биокаталитической деградации ПМК для дальнейшей работы;
- определение кинетических параметров деградации ПМК с помощью

нативной и иммобилизованной эстеразы;

- иммобилизация выбранного фермента на поверхности монолитного полиметакрилатного сорбента;

- исследование свойств иммобилизованного фермента;

- сравнение эффективности процессов деградации ПМК в растворе и с помощью иммобилизованного фермента;

- исследование процессов биodeградации наночастиц на основе ПМК с использованием эстеразы в модельных физиологических условиях, а также в плазме крови человека.



# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Полимерные частицы для биомедицинского назначения

Полимерные частицы (наносферы, нанокапсулы, полимерные липосомы) представляют собой лекарственные формы, в которых препарат заключен в частицы на основе полимерной матрицы. Преимущества использования полимерных частиц обусловлены возможностью помещения биологически активных молекул во внутренний объем частицы, что способствует их защите от агрессивного воздействия иммунной и ферментативной систем организма, а также дает возможность контролируемого высвобождения этих молекул в окружающую физиологическую среду [1].

Таким образом, по сравнению с обыкновенными лекарственными формами наночастицы позволяют реже принимать лекарство, что эффективно для улучшения восприимчивости пациента к лекарственному средству. Кроме того, системы контролируемого высвобождения снижают флуктуации уровня препарата в плазме крови, замедляя скорость поглощения, что происходит благодаря более низкой скорости высвобождения лекарства и приводит к эффективной фармакологической реакции и минимизации риска интоксикации организма.

Использование полимерных частиц *in vivo* предполагает, что полимеры, используемые для их получения, должны быть биосовместимы, а также биodeградируемы. При этом биodeградация является не только средством выведения частиц из организма, но и способом контролирования высвобождения биологически активных молекул из полимерных частиц за счет регулирования состава и структуры полимера.

В настоящее время широко используются биodeградируемые частицы на основе синтетических и природных полимеров. Примерами первой группы могут выступать частицы на основе поли(молочной кислоты) или сополимера молочной и гликолевой кислот, ко второй группе относятся сшитые полисахариды [1].

При выборе полимера для получения частиц для доставки лекарственных средств важно учитывать его молекулярную массу, так как она обычно влияет на динамику разложения полимеров. В ходе реакции биodeградации полимерные цепи, составляющие оболочку для лекарственного препарата, постепенно разрушаются, что приводит к образованию пор. Через поры внутрь частицы всасывается вода, что способствует высвобождению препарата. Таким образом, при высокой начальной молекулярной массе полимера процесс разрушения будет протекать медленнее, поскольку для достижения критического значения молекулярной массы, при которой начинается высвобождение лекарственного вещества, требуется больше времени. Напротив, при низких начальных значениях молекулярной массы высвобождение препарата происходит незамедлительно, в связи с тем, что процесс биodeградации происходит тоже быстрее.

Другой важный параметр, определяющий скорость высвобождения препарата – это размер частиц. По сравнению с более мелкими сферами, более крупные имеют тенденцию к медленному и продолжительному высвобождению заключенных в них соединений.

## **1.2. Поли(молочная кислота)**

### **1.2.1 Синтез поли(молочной кислоты)**

Основным мономером для синтеза полимолочной кислоты является молочная (2-гидроксипропионовая) кислота, которая впервые была выделена в 1780 году из кислого молока шведским химиком Шееле, и существующая в двух оптически активных конфигурациях [2]. L(+)-изомер вырабатывается человеческим организмом и организмами других млекопитающих; бактериальные системы (например, *Lactobacilli*) способны вырабатывать как D(–), так и L(+)- энантиомеры.

Поли(молочная кислота) может быть получена путем ферментации или же путем химического синтеза. Синтез поли(молочной) кислоты можно проводить

тремя основными способами (Рисунок 1) [2].

Поликонденсация по способу I представляет собой процесс образования полимера, основанный на элементарных реакциях замещения. Этот процесс – равновесный. Конкурирующими реакциями в данном случае являются реакции образования полимера и гидролиза образовавшегося полимера. Для получения высокомолекулярных продуктов необходимо эффективно удалять воду из реакционной среды. Полная процедура этого метода состоит из перегонки молочной кислоты при пониженном давлении от 2 до 3 часов при 130°C, чтобы удалить большую часть конденсационной воды. После окончания поликонденсации излишек воды из олигомера удаляют азеотропной отгонкой. Данный метод позволяет синтезировать поли(молочную кислоту) с достаточно высокой молекулярной массой из молочной кислоты напрямую. Метод достаточно недорог и не требует каких-либо специальных добавок. Тем не менее, он не позволяет получать высокомолекулярные продукты с достаточной воспроизводимостью. Очевидным минусом также является очень широкое молекулярно-массовое распределение ввиду высокого содержания олигомерных продуктов реакции. Кроме того, в получаемом полимере могут содержаться примеси токсичного катализатора, от следов которого избавляются осаждением или фильтрованием после добавления сильных кислот (например, серной) [2].

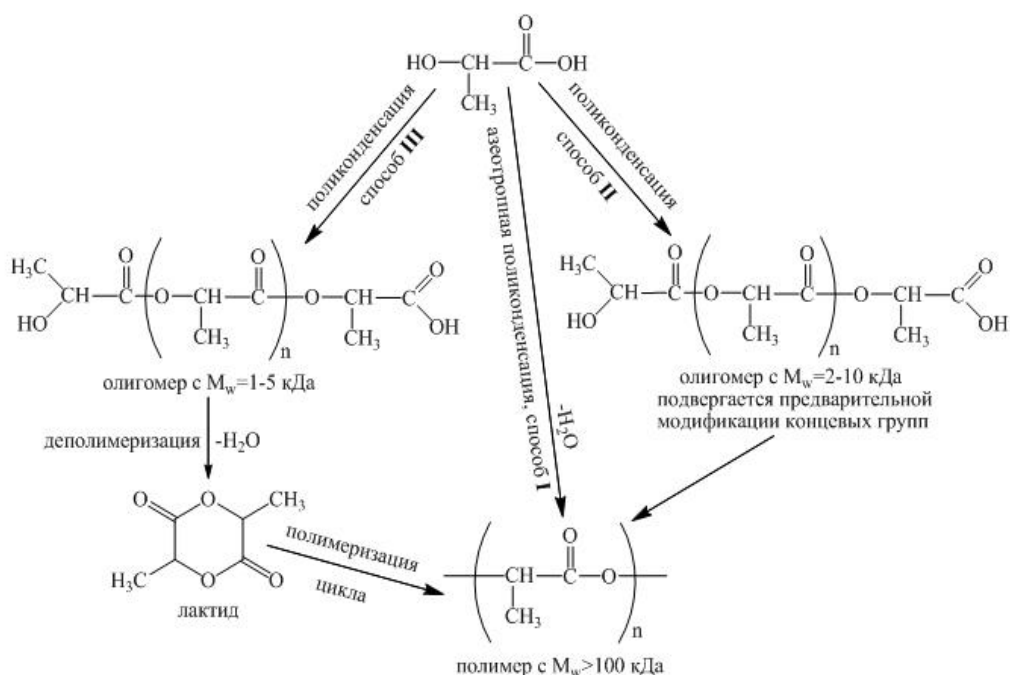


Рис.1 Схема синтеза поли(молочной кислоты)

В основе других способов (II и III) получения поли(молочной кислоты) с высокой молекулярной массой лежит предварительный синтез олигомера с достаточным количеством концевых гидроксильных и карбоксильных групп [2].

Так, по способу II поли(молочную кислоту) ( $M_w > 100$  кДа) синтезируют из олигомера с  $M_w = 2-10$  кДа с модифицированными концевыми группами. Для этого из продукта поликонденсации молочной кислоты отдельно получают 2 олигомера: с концевыми гидроксильными группами и отдельно – с концевыми карбоксильными. Олигомер с концевыми гидроксильными группами синтезируют с использованием малых количеств полифункциональных OH-содержащих веществ (2-бутен-, 4-диол или глицерин), а олигомер с концевыми карбоксильными – при добавлении небольших количеств карбоновых кислот (малеиновая, янтарная или адипиновая). Полученные олигомеры подвергают поликонденсации между собой, в результате чего образуется поли(молочная кислота), причем молекулярная масса продукта складывается из молекулярных масс прореагировавших олигомеров и зависит от их мольного соотношения.

Способ II дороже и сложнее, чем способ I, так как в данном случае применяются специфические добавки, нейтрализующие или удаляющие

нежелательные примеси и побочные продукты синтеза. Однако, это дает возможность получить высокочистый полимер без нежелательных примесей катализаторов, низкомолекулярных фракций и остаточных металлов [2].

По способу III молочная кислота подвергается поликонденсации при пониженном давлении с получением хрупкого, стекловидного олигомера с низкой молекулярной массой ( $M_w=1-5$  кДа), который, по большей части, не пригоден для применения. Данный олигомер подвергают деполимеризации, в результате которой образуется циклический лактид, который впоследствии подвергают полимеризации. При этом цикл лактида раскрывается с образованием высокомолекулярной ПМК.

Полимеризация лактидов и лактонов с раскрытием цикла (ПРЦ) происходит по механизму роста цепи. Образование полиэфиров в этом случае имеет преимущество по сравнению с методом поликонденсации I. Во-первых, процесс можно проводить в более мягких условиях, а во-вторых, отпадает необходимость удаления побочных продуктов реакции [2]. В настоящее время данный способ синтеза является единственным промышленным способом, позволяющим получать чистую высокомолекулярную ( $M_w > 300$  кДа) поли(молочную кислоту) с низким индексом полидисперсности, что в конечном итоге определяет наличие ценных физико-химических свойств и пригодность для изготовления материалов для биомедицинских применений.

### **1.2.2. Свойства поли(молочной кислоты)**

До 60-х годов гидролизующиеся полимеры считались ненужными. Однако, уже в 1966 году было предложено использовать ПМК для производства биodeградируемых хирургических имплантатов, так как гидролиз данного полимера приводит к выделению молочной кислоты, представляющую собой естественный метаболит. Годом позже были запатентованы биodeградируемые шовные нити на основе полигликолевой кислоты. С этого времени началось развитие областей синтеза и применения биodeградируемых полимеров [1].

Таким образом, ПМК была исторически первым биodeградируемым

материалом, используемым в медицинских целях. Поли(молочная) кислота представляет собой жесткий термопластичный, высокопрочный, с высоким модулем упругости, сложный алифатический полиэфир который может быть изготовлен из ежегодно возобновляемых ресурсов, получая изделия для использования в любой области промышленного создания упаковок или биосовместимых и биodeградируемых препаратов медицинского назначения [3]. ПМК является одним из нескольких полимеров, в котором стереохимическую структуру можно легко модифицировать путем полимеризации контролируемой смеси *L*- или *D*-изомеров с получением высокомолекулярных аморфных или кристаллических полимеров. Структурная схема ПМК приведена на Рисунке 2.

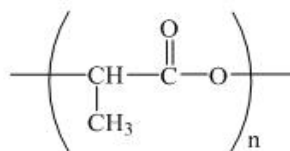


Рис.2 Структурная схема поли(молочной кислоты).

Два изомера молочной кислоты могут производить четыре различных материала: поли (*D*-молочная кислота) (PDLA), кристаллический материал с обычной структурой цепи; поли(*L*-молочная кислота) (PLLA), которая является гемикристаллической, и также с обычной структурой цепи; поли (*D*, *L*-молочная кислота) (PDLLA), которая является аморфной; и мезо-ПМК, полученная путем полимеризации мезо-лактида. PDLA, PLLA и PDLLA растворимы в обычных растворителях, включая бензол, хлороформ, диоксан и т.д., и деградируют при простом гидролизе сложноэфирной связи, даже в отсутствие гидролизующих ферментов. ПМК деградирует в окружающей среде в интервале от 6 месяцев до 2 лет, в зависимости от размера и формы изделия и температуры. Некоторые из физических и химических свойств ПМК приведены в Таблице №1 [4].

## Свойства ПМК

Свойства	D-ПМК	L-ПМК	D,L-ПМК
Растворимость	Растворимы в бензоле, ацетонитриле, диоксане и т.д., но не растворимы в этаноле, метаноле, и в алифатических углеводородах		
Температура плавления, °С	180	180	Варьируется
Температура стекл., °С	50-60	55-60	Варьируется
Температура разложения, °С	200	200	185-200
Относительное удлинение при разрыве, (%)	20-30	20-30	Варьируется
Прочность при разрыве	4.0-5.0	5.0-6.0	Варьируется
Период полураспада при 37°С в физ. р-ре	4-6 месяцев	4-6 месяцев	2-3 месяца

Данный полиэфир является одним из самых широко применяемых полимеров для создания микроносителей лекарственных средств. Низкая токсичность, превосходная биологическая совместимость и отсутствие воспалений при контакте с живыми организмами, а также хорошие механические свойства делают его наиболее привлекательным для фармацевтической промышленности, в том числе для создания систем лекарственных средств пролонгированного действия [1].

### 1.2.3. Дегградация поли(молочной кислоты)

В 1981 году термин «биодегградация» обозначал разрушение полимера, обусловленное только жизнедеятельностью организма. Однако позднее это определение было расширено путем включения в него всех процессов разрушения полимерных материалов, протекающих как *in vivo*, так и *in vitro* [5].

Биодегградация полимерного материала может протекать посредством нескольких процессов, а именно растворением, ионизацией с последующим

растворением, обычным гидролизом, а также ферментативно-катализируемым гидролизом. Для создания материалов биомедицинского назначения, способных к постепенной деградации, обычно используются полимеры, способные к распаду за счет гидролиза или ферментативного гидролиза. К полимерам данного типа относится ПМК.

Рост спроса на биоматериалы с контролируемым и предсказуемым временем деградации привел к широкомасштабным исследованиям процессов биодеструкции различных полимеров. Большое внимание было уделено изучению механизмов деградации полимерных систем на основе поли (молочной кислоты).

### **1.2.3.1. Ферменты для деградации ПМК**

Деградация поли(молочной кислоты) в организмах осуществляется различными ферментами подкласса эстераз, которые принадлежат к классу гидролаз [5]. Данные ферменты участвуют в реакциях расщепления сложноэфирной связи в органических соединениях на спирты и кислоты при участии молекул воды [6].

В этот подкласс включены несколько ферментов, обладающих широкой специфичностью, которые способны гидролизовать большое количество различных эфиров, хотя и не с одинаковой скоростью. К эстеразам в широком смысле слова относятся: липазы, фосфатазы, сульфатазы и собственно эстеразы. К последним принадлежат многочисленные специфические ферменты: холинэстераза, хлорофиллаза, танназа, пектаза и др [6].

Было высказано предположение, что ферменты этого подкласса произошли от общей исходной эстеразы, при этом эволюционные изменения привели к различиям в специфичности ферментов, однако мало затронули химический механизм каталитической реакции [7].

Эстеразы являются широко используемым классом ферментов в биотехнологии. Они доступны в больших количествах, потому что многие из них могут быть получены с высоким выходом из микроорганизмов, а именно из



грибов и бактерий, а также выделены из животных и растительных тканей.

Трехмерные структуры многих видов эстераз были определены с использованием метода рентгеновской кристаллографии [8]. Большинство эстераз имеют структуру, которая состоит из сердцевины, в свою очередь, состоящей из параллельных  $\beta$ -складчатых слоев, окруженных  $\alpha$ -спиралями. Активные центры многих представителей эстераз являются химически похожими, но структурно отличаются. Как правило, в его состав входят три аминокислоты, а именно серин, гистидин, а также аспарагиновая или глутаминовая кислоты (Рисунок 3).

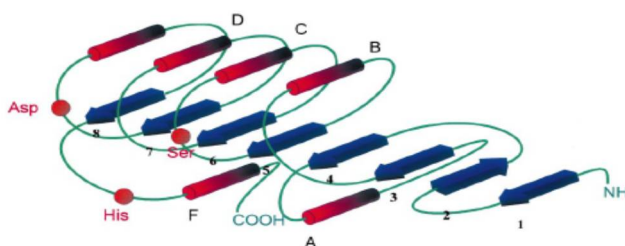


Рис.3 Схема трехмерной структуры эстеразы.

1 – 8 –  $\beta$ -складчатые слои, A – F –  $\alpha$ -спирали

Из-за сходства каталитической триады активного центра, механизмы катализа представителей подкласса эстераз также аналогичен [8]. В частности, механизм включает в себя нуклеофильную атаку гидроксильной группы остатка серина, присутствующего в активном центре. Это приводит к образованию тетраэдрического промежуточного соединения, которое затем теряет молекулу спирта с получением ацил-ферментного промежуточного соединения. Затем молекула воды атакует комплекс (нуклеофильная атака), чтобы образовать четырехгранное промежуточное соединение, которое, наконец, теряет молекулу кислоты с выходом фермента в своей нативной форме. Оптимальная температура для действия большинства представителей эстераз 35—40°C, при 50°C наступает слабая, а при 65°C – быстрая (30 мин) инактивация.

### 1.3. Иммуобилизация ферментов

#### 1.3.1 Преимущества иммуобилизованных ферментов

В настоящее время использование природных биокатализаторов, доминирующую часть которых представляют ферменты, широко распространено в самых различных областях научной и практической деятельности. Однако применение свободных ферментов в растворе имеет ряд ограничений, связанных как с их высокой стоимостью и малой стабильностью структуры, так и с большими трудностями в удалении их из реакционной среды по окончании каталитической реакции. Альтернативным методом является применение гетерогенных биокатализаторов, то есть ферментов, иммуобилизованных на твердых носителях [9].

Иммуобилизация ферментов является весьма эффективным методом, так как позволяет получить препараты, обладающие целым спектром преимуществ по сравнению со свободно используемыми ферментами [10]. Среди них легкое отделение гетерогенного биокатализатора от реакционной среды, что дает возможность сразу получать чистый от фермента продукт без необходимости проведения дополнительных трудоемких и экономически затратных стадий очистки, возможность многократного использования гетерогенного биокатализатора, а также возможность непрерывного проведения процесса и его автоматизации, регулирования скорости и выхода продукта. Иммуобилизация оказалась особенно ценным приемом, благодаря возможности модификации свойств фермента, таких как стабильность и активность путем подбора оптимального метода иммуобилизации и материала носителя [11]. Известно, что локализация фермента на твердом сорбенте способствует стабилизации его конформации, препятствуя, таким образом, денатурации и падению каталитической активности, что позволяет успешно работать в больших температурных и рН диапазонах.

### **1.3.2 Макропористые монолиты как стационарные фазы для иммобилизации ферментов**

Для получения иммобилизованных ферментов используются различные носители, к которым предъявляется большое число требований, таких как высокая химическая и биологическая устойчивость, высокая химическая прочность, достаточная проницаемость для фермента и субстратов, большая удельная поверхность и пористость, а также высокая гидрофильность [9].

Ранее для изготовления проточных биореакторов в основном использовались колонки, упакованные пористыми частицами носителя с иммобилизованным ферментом [12]. Для того, чтобы субстрат смог образовать комплекс с ферментом, ему необходимо было сначала проникнуть в поры частиц вследствие диффузии. В таких системах количество преобразованного субстрата в продукт зависело в основном от молекулярной диффузии, размеров пор и частиц и скорости потока субстрата, так как при увеличении скорости потока большая часть раствора субстрата протекала в межчастичном пространстве. В результате, эта система проявила себя как достаточно медленная и неэффективная.

Важным шагом в направлении усовершенствования стационарных сред явилось введение макропористых полимерных сорбентов. Макропористые материалы монолитного типа представляют собой новый класс сорбентов, свойства которых удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к твердым фазам для иммобилизации ферментов [12]. Данные материалы представляют собой цельный стержень, пронизанный системой взаимосвязанных проточных пор. Благодаря такому строению важной особенностью данных носителей является их высокая проницаемость, что позволяет использовать поток субстрата при высоких скоростях потока подвижной фазы, обеспечивая при этом эффективный массоперенос внутри монолитной матрицы [13]. Среди прочих достоинств данных материалов следует отметить высокую механическую и химическую устойчивость, возможность вариации реакционных групп

поверхности и, что немаловажно, простоту синтеза.

## **2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **2.1. Разработка методов детектирования ПМК и продуктов ее деструкции методом ВЭЖХ**

#### **2.1.1. Анализ ПМК с использованием колонки C12**

Мониторинг ПМК и продуктов ее гидролиза осуществляли методом ВЭЖХ с использованием в качестве стационарной фазы монолитного полиметакрилатного сорбента C12 в форме колонки размером 4.6×50 мм. В качестве подвижной фазы использовали: воду (фаза А) и ацетонитрил (фаза Б). Элюирование исследуемого вещества проводили с использованием линейного градиента при скорости потока 0.5 мл/мин по схеме: 0-5 мин – фаза А; 5-25 мин – 0-100% фаза Б при длине волны 210 нм. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл.

#### **2.1.2. Анализ МК методом АО ВЭЖХ**

Мониторинг МК осуществляли методом анионообменной ВЭЖХ с использованием в качестве стационарной фазы трех монолитных полиметакрилатных DEAE дисков размером 12 мм × 3 мм. В качестве подвижной фазы использовали: 5 мМ натрий ацетатный буферный раствор, рН 4.5 (фаза А) и – расвор 1М NaCl в фазе А (фаза Б). Анализ исследуемого вещества осуществляли с использованием линейного градиента при скорости потока 0.5 мл/мин по схеме: 0-5 мин – фаза А; 5-25 мин – 0-100% фаза Б при длине волны 210 нм. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл.

### **2.2. Создание гетерогенных биокатализаторов на основе липазы и эстеразы**

Создание гетерогенных биокатализаторов на основе липазы и эстеразы осуществляли за счет иммобилизации ферментов на поверхности макропористых монолитных носителей в форме дисков размером 12 мм × 3 мм

путем введения между ферментом и поверхностью промежуточного макромолекулярного спейсера. Данный метод иммобилизации включал несколько стадий, а именно, аминирование сорбента посредством превращения эпоксидных групп, ковалентное присоединение альдегид-содержащего полимерного спейсера, иммобилизацию фермента и, наконец, восстановление остаточных альдегидных групп и иминных связей между белком и полимером. В качестве спейсера был использован окисленный полимер 2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкозы (ок.пМАГ).

#### Аминирование

25% водный раствор аммиака прокачивали через диск в количестве 3 мл, соответственно. Заполнив поровое пространство монолита раствором аммиака, диск термостатировали в течение 5 ч при температуре 40°C. После завершения реакции последовательно промывали дистиллированной водой, 2М раствором NaCl и снова водой.

#### Иммобилизация спейсера

Для ковалентного присоединения, альдегид-содержащего полимерного спейсера (окисленного полимера N-метакрилоиламино-D-глюкозы, пМАГ) аминированный монолитный сорбент уравнивали 0.01М Na-фосфатным буферным раствором, pH 7.0, в течение 20 мин. Затем сквозь колонку с помощью перистальтического насоса прокачивали 4 мл раствора окисленной пМАГ в 0.01М PBS, pH 7.0, с концентрацией 0.45 мг/мл. После окончания реакции в течение 15 минут колонку промывали 0.01М PBS, pH 7.0

#### Иммобилизация фермента

Перед иммобилизацией липазы, диск, содержащий полимерный спейсер, промывали 0.01 М натрий боратным буферным раствором, pH 8.4. Реакцию иммобилизации проводили, инкубируя диски, заполненные раствором эстеразы/липазы с концентрацией 2.0 и 0.7 мг/мл, при температуре 22°C в течение 3 часов, соответственно. Функционализированный сорбент промывали динамическим способом сначала реакционным буферным раствором, а затем 0.01 М фосфатного буфера, pH 7.0.

## Восстановление альдиминных связей

На заключительной стадии диски инкубировали в 1 мл раствора боргидрида натрия в воде с концентрацией 2 мг/мл в течение часа при температуре 22°C. После завершения реакции восстановления свободных альдегидных групп и азометиновых связей колонку промывали большим объемом фосфатного буфера.

Содержание фермента в растворах определяли спектрофотометрически по методу Лоури-Фолина. Массу иммобилизованного лиганда вычисляли по разнице: (количество лиганда в исходном растворе (мг) + количество в объеме порового пространства (мг)) – количество лиганда в растворе после иммобилизации (мг) – количество лиганда в промывном растворе (мг).

### **2.3. Изучение деградации ПМК**

#### **2.3.1. Деградация ПМК различными ферментами подкласса эстераз в растворе**

В качестве исследуемых объектов использовали такие ферменты подкласса эстераз как липаза из *Candida rugosa*, липаза из поджелудочной железы крупного рогатого скота, а также эстераза из свиной печени.

Во всех случаях к 360 мкл раствора ПМК, растворенной в смеси ацетонитрила и фосфатного буфера, рН 7.4, взятых в соотношении 1/1, добавили 40 мкл фермента с концентрацией 1 мг/мл. Концентрация раствора полимера составляла 0.5 мг/мл, а концентрация ферментов в реакционной среде – 0.04 мг/мл. В случае использования липазы из *Candida rugosa* был также приготовлен раствор с другим содержанием фермента. В частности, в раствор ПМК, объемом 200 мкл и концентрацией 1 мг/мл, добавили 200 мкл фермента с концентрацией 2 мг/мл. Таким образом, содержание фермента в реакционной смеси составило 0.40 мг/мл.

Реакцию биодеградации проводили в воздушном термостате в течение нескольких часов при температуре 37°C. Пробы для анализа отбирали через 3, 8,

24, 48, 72 часов после начала реакции. Анализ продуктов деградации ПМК проводили по методике, приведенной в п.2.1.1.

### **2.3.2. Изучение процесса деградации ПМК иммобилизованными ферментами**

В качестве исследуемых объектов использовали полученные биореакторы на основе липазы из *Candida rugosa* и эстеразы из свиной печени.

В обоих случаях 3 мл раствора ПМК в смеси ацетонитрила и Na-фосфатного буфера, pH 7.4, взятых в соотношении 1/1, пропускали через гетерогенный биокатализатор в режиме рециркуляции со скоростью потока 1 мл/мин. Концентрация раствора полимера составляла 0.5 мг/мл. Реакцию биodeградации проводили в колоночном термостате в течение нескольких часов при температуре 37°C. Пробы для анализа отбирали через 7, 20, 42, 50 часов после начала реакции. Анализ продуктов деградации ПМК проводили с использованием метода ВЭЖХ, разработанного ранее (п. 2.1).

### **2.3.3. Изучение каталитических свойств эстеразы**

#### Нативная эстераза

Для определения гидролитической активности свободной липазы использовали серию растворов высокомолекулярного субстрата, а именно ПМК, с концентрациями в пределах 0.1-1.0 мг/мл. Реакцию проводили в 3 мл раствора субстрата в 0.1 М натрий ацетатном буферном растворе при pH среды 7.4 и температуре 37°C. Спустя 3 часа после начала реакции получаемые продукты анализировали с помощью разработанного ранее метода ВЭЖХ (п. 2.1.1).

#### Иммобилизованная эстераза

Исследование гидролитической активности иммобилизованной липазы производили в режиме рециркуляции растворов субстрата сквозь стационарную фазу, содержащую иммобилизованный фермент. Для этого диск с иммобилизованным ферментом встраивали в систему ВЭЖХ низкого давления. Раствор субстрата объемом 3.0 мл с концентрацией в пределах 0.1 – 3.0 мг/мл



циркулировал сквозь биореактор при скорости потока подвижной фазы (натрий ацетатный буферный раствор рН 7.4 с 50 %-м содержанием ацетонитрила) 1.0 мл/мин. Температура проведения реакции составляла 37°C. Спустя 5 часов после начала реакции получаемые продукты анализировали разработанным ранее методом ВЭЖХ (п. 2.1.1).

## **2.4. Дегградация наночастиц на основе ПМК**

Для оценки степени дегградации наночастиц осуществляли мониторинг дегградации ПМК в течение времени путем проведения реакции с использованием нативной эстеразы в растворе, а также гетерогенного формы данного биокатализатора. Более того, был исследован процесс дегградации наночастиц в плазме крови человека.

### Нативный фермент

К 360 мкл натрий фосфатного буферного раствора (рН 7.4), содержащего 190 мкг наночастиц, добавляли 40 мкл раствора фермента в том же буфере с концентрацией 1 мг/мл. Реакция протекала в течение двух месяцев в воздушном термостате при температуре 37°C. Через некоторые интервалы времени (от 1 до 10 дней) отбирали пробы получаемых продуктов. Так как степень дегградации наночастиц оценивали посредством количества образовавшейся в ходе реакции молочной кислоты, отобранные пробы изначально отфильтровывали с помощью центрифугирования (5000g) через мембранный фильтр (3000 Да) в течение 5 минут. Анализ получаемых продуктов осуществляли методом АО ВЭЖХ на основе разработанного ранее протокола (п. 2.1.2).

### Биореактор на основе эстеразы

3 мл натрий фосфатного буферного раствора (рН 7.4), содержащего 5.5 мг наночастиц на основе ПМК, пропускали в режиме рециркуляции сквозь полученный ранее (п.3.1) биореактор, несущий 0.52 мг иммобилизованной эстеразы. Остальные условия были аналогичны таковым, описанным для реакции с участием нативного фермента. Анализ получаемых продуктов

осуществляли методом АО ВЭЖХ на основе разработанного ранее протокола (п. 2.1.2).

#### Дегградация частиц в плазме крови

В 395 мкл плазмы крови добавили 5 мкл раствора наночастиц на основе ПМК. Остальные условия проведения эксперимента совпадали с таковыми, использованными для реакции дегградации наночастиц в модельной среде, содержащей эстеразу.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

#### 3.1. Изучение процесса деградации ПМК в растворе с помощью различных ферментов подкласса эстераз

На первом этапе работы был изучен процесс деградации ПМК в растворе при использовании различных ферментов подкласса эстераз. Основной задачей данного этапа был выбор фермента и времени протекания биокаталитической деградации ПМК для дальнейшей работы по определению кинетических параметров и разработке гетерогенного биокатализатора, а также для изучения деградации наночастиц на основе ПМК. Для решения поставленной задачи проводили каталитическую реакцию деградации ПМК (ММ 30 000) в растворе с использованием таких ферментов как липаза из *Candida rugosa*, липаза из поджелудочной железы крупного рогатого скота и эстераза из свиной печени.

Реакцию деградации ПМК проводили в условиях близких к физиологическим, то есть при рН среды равной 7.4 в воздушном термостате в течение нескольких часов при температуре 37°C. Во всех случаях соотношение фермент/субстрат поддерживалось одинаковым, а именно 1/48. В случае использования липазы из *Candida rugosa* был также приготовлен раствор с другим содержанием фермента. В частности, в данном случае количество фермента в реакционной смеси увеличили в 10 раз. Пробы образующихся продуктов каталитической реакции для анализа отбирали через 3, 8, 24, 48, 72 часов после начала реакции.

Анализ продуктов деградации ПМК проводили разработанным ранее методом ВЭЖХ. На Рисунке 4 в качестве примера получаемых хроматограмм, иллюстрирующих процесс деградации ПМК в течение времени, представлен процесс с использованием липазы из *Candida rugosa*. В данном случае пик, выходящий в 20.5 мин, соответствует элюированию ПМК.

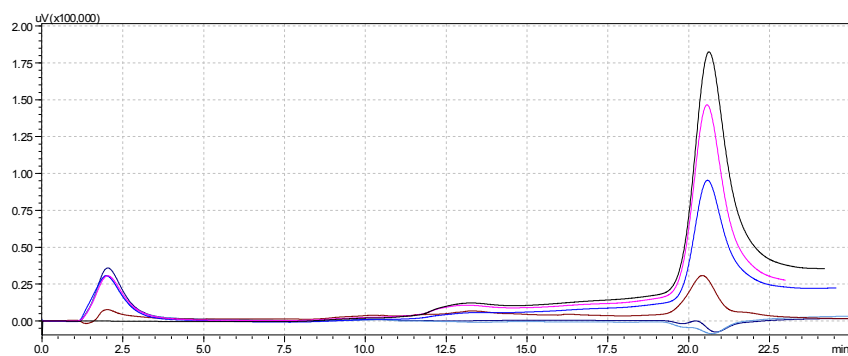


Рис.4 Гидролиз ПМК липазой из *Candida rugosa* (C= 0.40 мг/мл).

Обозначения: исходный полимер – черная, 1 – 3 часа – розовая, 2 – 8 часов – синяя, 3 – 24 часа – коричневая, 4 – 48 часов – голубая, 5 – 72 часа – фиолетовая кривая.

На основе анализа представленных хроматограмм очевидно, что при деградации ПМК происходит уменьшение количества ПМК в растворе, что выражается в уменьшении площади пика ПМК на хроматограмме (см. область 20.5 мин).

Расчет количества деградированного полимера производили посредством обсчета площадей пиков, отвечающих ПМК. Были построены кривые зависимости площади пика от времени протекания каталитической реакции в часах (Рисунок 5 (А)). Также приведена степень деградации ПМК в течение 24 часов (Рисунок 5 (Б)).

Очевидно, что процесс деградации наиболее эффективно протекает при использовании эстеразы и липазы из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Так как рН оптимум данных ферментов близок к нейтральной области, процесс деградации ПМК протекает удовлетворительно при малом количестве фермента в растворе.

В случае использования липазы из *Candida rugosa* в соотношении фермент/субстрат равном 1/48, эффективность биокатализа существенно снижалась. Известно, что деградация ПМК данной липазой протекает наиболее эффективно при использовании оптимального рН среды для данного фермента, а именно 9.0. При использовании условий, близких к физиологическим, даже в

течение 72 часов не удалось добиться полной деградации ПМК. Однако при увеличении количества фермента удалось достичь удовлетворительных результатов.

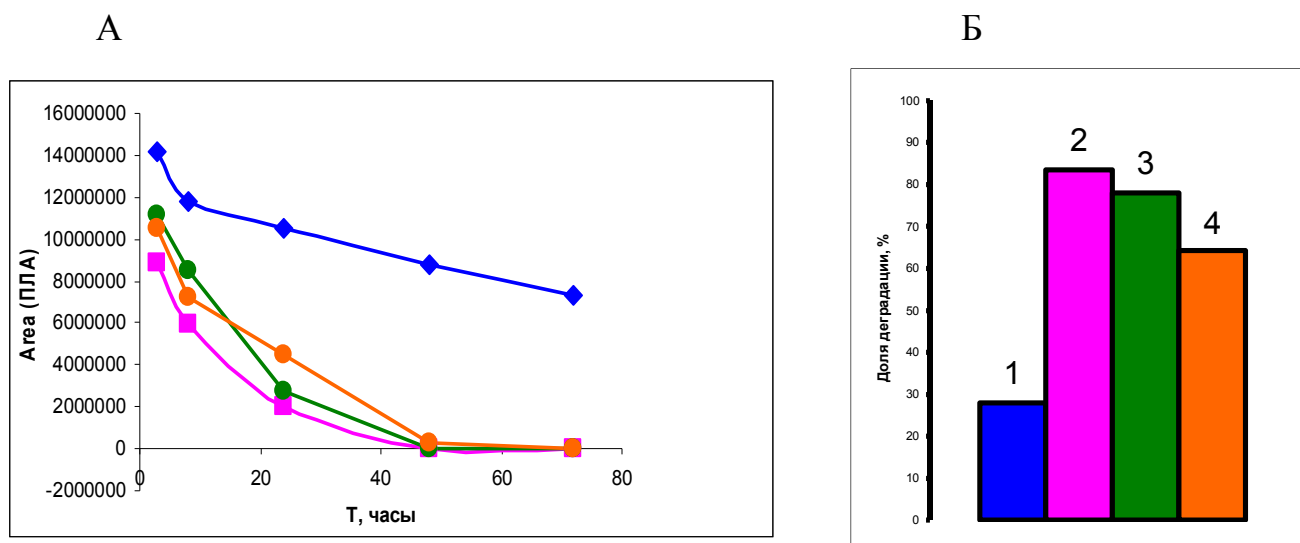


Рис.5 Дегградация ПМК различными ферментами в течение времени (А) и доля ПМК, дегградировавшего под действием различных ферментов в течение 24 часов (Б).

Обозначения: 1 – липаза из *Candida rugosa* (C = 0.04 мг/мл), 2 – липаза из *Candida rugosa* (C = 0.40 мг/мл), 3 – эстераза из свиной печени (C = 0.04 мг/мл), 4 – липаза из поджелудочной железы крупного рогатого скота (C = 0.04 мг/мл)

### 3.2. Создание гетерогенных биокатализаторов

Для получения гетерогенных биокатализаторов были выбраны такие ферменты как эстераза и липаза из *Candida rugosa*. Как было показано, эстераза представляет собой эффективный фермент для деградации ПМК в физиологических условиях, вследствие чего и была использована для получения биореактора. В случае липазы, проявляющей небольшую активность, рассматривали возможность увеличения активности фермента вследствие иммобилизации, часто приводящей к смещению или расширению оптимального диапазона рН для локализованных ферментов.

В качестве носителей для иммобилизации использовались коммерческие

макропористые монолитные диски размером 3 мм × 12 мм. Используемые носители имели полиметакрилатную природу и содержали на поверхности реакционно-способные эпоксидные группы. Характеристики стационарных фаз и количества иммобилизованного фермента представлены в Таблице №2.

Таблица №2

### Характеристики стационарных фаз

Характеристики стационарной фазы	Макропористый монолитный диск
Диаметр, (мм)	12
Длина, (мм)	3
Средний размер пор, (нм)	1600
Пористость, (%)	60
Объем колонки, (мл)	0.34
Объем порового пространства, (мл)	0.20

Известно, что иммобилизация фермента может приводить к частичной потере его активности. С целью уменьшения влияния стационарной фазы на локализованный фермент был выбран метод иммобилизации ферментов на поверхности монолитных дисков, основанный на введении промежуточного макромолекулярного спейсера. Введение спейсера позволяет дистанцировать фермент от поверхности твердой фазы, и, таким образом, обеспечить повышенную доступность его активного центра.

Данный метод иммобилизации включал несколько стадий, а именно аминирование эпоксидных групп сорбента, ковалентное присоединение альдегид-содержащего спейсера, иммобилизацию фермента и восстановление остаточных альдегидных групп и образовавшихся альдиминных связей. В качестве спейсера был использован окисленный полимер на основе 2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкозы (окисл.-пМАГ). Характеристики полученных гетерогенных биокатализаторов представлены в Таблице №3.

### Характеристики полученных гетерогенных биокатализаторов

Количество иммобилизованного фермента	Липаза из <i>Candida rugosa</i>	Эстераза из свиной печени
мг/диск	0.12	0.58
мкмоль/диск	2.5	3.6
мкмоль/мл сорбента	7.4	10.6

### 3.3. Изучение деградации ПМК с использованием иммобилизованных ферментов

Был изучен процесс деградации ПМК при использовании биореакторов на основе эстеразы и липазы. Для решения поставленной задачи проводили каталитическую реакцию деградации ПМК (ММ 30 000) в режиме рециркуляции раствора субстрата. Реакцию деградации ПМК проводили в условиях близких к физиологическим, то есть при рН 7.4 и температуре 37°C. Соотношение фермент/субстрат поддерживалось одинаковым, а именно 1/48. Пробы получаемых продуктов реакции для анализа отбирали через 7, 22, 44, 72 часа после начала реакции. Анализ продуктов деградации ПМК проводили разработанным ранее методом ВЭЖХ. Полученные хроматограммы представлены на Рисунках 6 и 7, где пик, выходящий в 20.5 мин, соответствует элюированию ПМК.

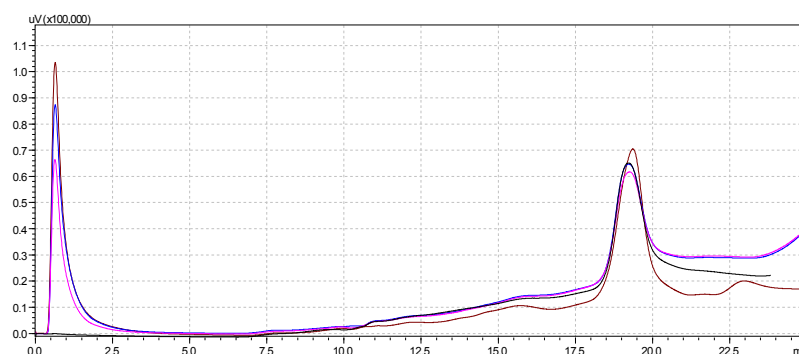


Рис.6 Деградация ПМК липазой (*Candida rugosa*), иммобилизованной на поверхности монолитного диска.

Обозначения: черная кривая – исходный ПЛА, розовая – 7 часов, синяя – 20 часов, коричневая – 42 часа.

На основе анализа представленных хроматограмм, как и в случае реакции в растворе, видно, что при деградации ПМК происходит уменьшение количества ПМК в растворе, что выражается в уменьшении площади пика ПМК на хроматограммах (см. область 20.5 мин). Эффективный биокатализ наблюдался в случае использования эстеразы. При использовании иммобилизованной липазы из *Candida rugosa*, наблюдалось лишь незначительное изменение величины пика, отвечающего ПМК, что можно объяснить использованием неоптимальных условий для данного фермента.

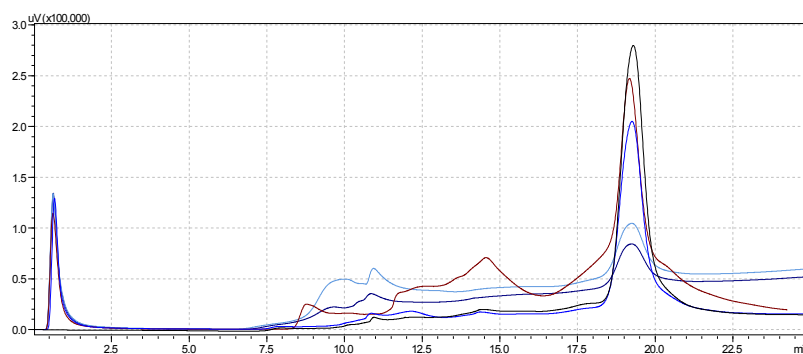


Рис.7 Деградация ПМК эстеразой, иммобилизованной на поверхности монолитного диска.

Обозначения: черная кривая – исходный ПЛА, коричневая – 7 часов, синяя – 20 часов, фиолетовая – 44 часа, голубая – 50 часов.

### 3.4. Определение кинетических параметров деградации ПМК нативной и иммобилизованной эстеразой

Для определения гидролитической активности эстеразы использовали серию растворов ПМК с концентрациями в пределах 0.1-1.6 мг/мл. Реакции проводили в 0.1М Na-фосфатном буферном растворе при рН среды 7.4 и температуре 37°C в воздушном термостате. В случае иммобилизованной липазы реакцию деградации ПМК проводили в режиме рециркуляции раствора субстрата сквозь стационарную фазу с иммобилизованным ферментом. По



завершении реакции полученные продукты анализировали разработанным методом ВЭЖХ. По экспериментальным данным, полученным при обсчете площадей пиков, отвечающих ПМК на хроматограммах, были построены кривые *Михаэлиса-Ментен*, линейаризация которых в координатах по методу Хейнса (Рисунок 8) позволила рассчитать кинетические параметры исследуемой реакции (Таблица №4). Для сравнения различных форматов биокатализа из экспериментальных данных были рассчитаны значения констант Михаэлиса ( $K_M$ ), удельной активности ( $A_{уд.}$ ), число оборотов ( $k_{cat}$ ) и эффективность биокатализа ( $k_{cat}/K_M$ ).

Обычно, иммобилизация фермента приводит к увеличению значения  $K_M$  по сравнению с величиной, определенной для нативной формы биокатализатора. Данное явление связано с влиянием твердой фазы, затрудняющей доступ субстрата к активному центру фермента. Введение спейсера, дистанцирующего фермент от твердой поверхности, повышает доступность активного центра биокатализатора для молекул субстрата, что не приводит к увеличению значения  $K_M$  и наблюдалось в случае иммобилизованной эстеразы. При этом активность иммобилизованной эстеразы оказалась на 34% ниже, чем данный показатель для нативного фермента.

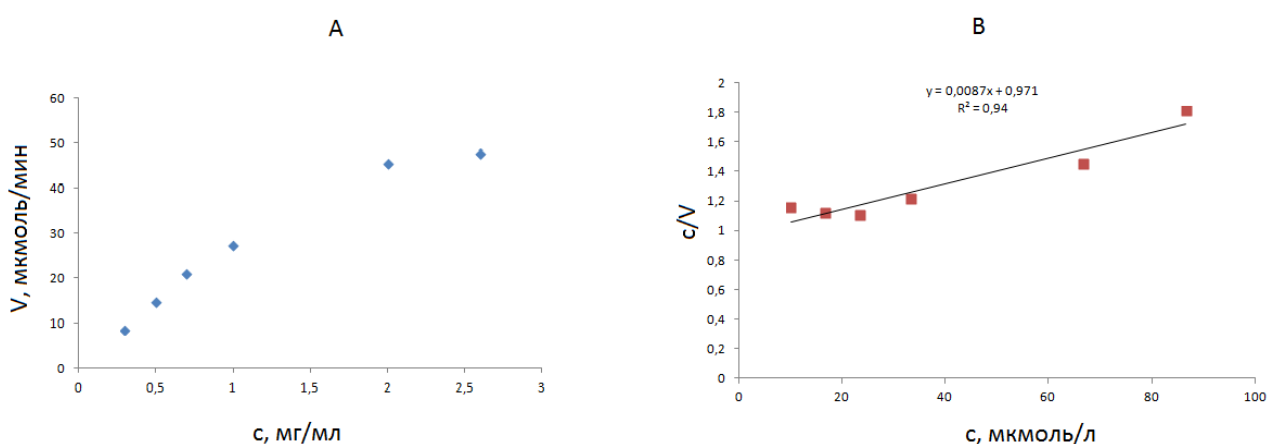


Рис.8 Кривая Михаэлиса (А) и ее линейаризованная по методу Хейнса форма (В), построенные для гетерогенной реакции деградации ПЛА.

Как известно, эффективность биокатализа часто оценивают по отношению каталитической константы ( $k_{cat}$ ) к константе Михаэлиса, т.е. величиной  $k_{cat}/K_M$ .

Рассчитанные значения соотношения  $k_{cat}/K_M$  оказались сопоставимы для нативной и иммобилизованной формы эстеразы и подтверждают достаточно высокую эффективность использования полученного гетерогенного биокатализатора. В частности, для иммобилизованной эстеразы значение эффективности составляет 87% от эффективности биокатализа нативным ферментом.

Таблица №4

#### Кинетические параметры деградации ПМК эстеразой

Биокатализатор	$M_{ферм},$ мкг	$K_M,$ мМ	$V_{max},$ мкмоль· мин <sup>-1</sup> ·л <sup>-1</sup>	$A_{sp},$ мкмоль· мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup>	$k_{cat},$ мин <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M,$ мин <sup>-1</sup> · мМ <sup>-1</sup>
Эстераза в растворе	20	0.15	188	938	152	1013
Иммобилизованная эстераза	580	0.11	115	596	96	878

### 3.5. Изучение деградации наночастиц на основе ПМК

В рамках данной работы был исследован процесс деградации наночастиц на основе ПМК ( $d \sim 380$  нм) при использовании нативной эстеразы, иммобилизованной эстеразы, а также в плазме крови человека в течение времени. Графики, иллюстрирующие данный процесс, представлены на **рисунке 9**.

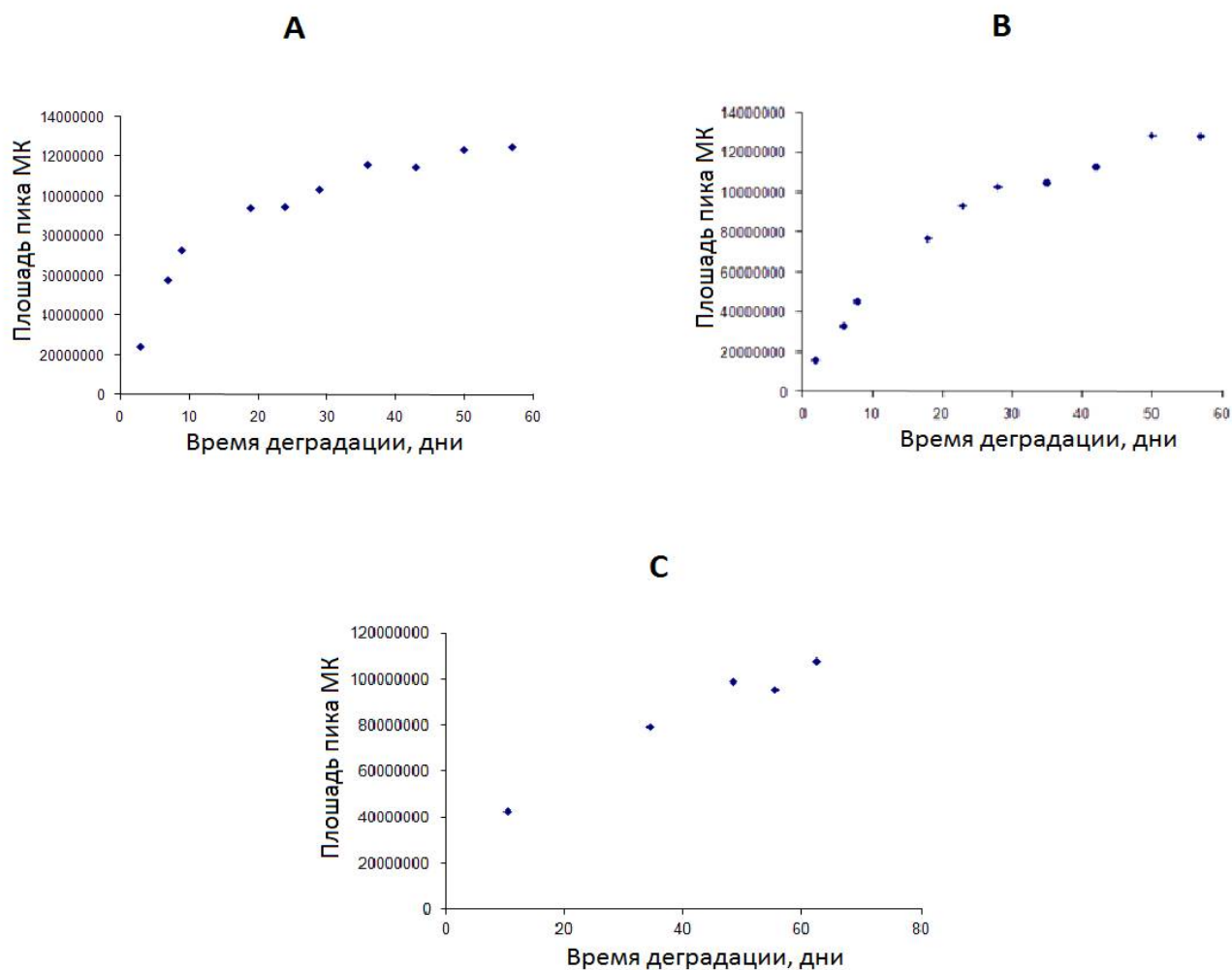


Рис.9 Графики зависимости площади пика, отвечающего МК, от времени протекания каталитической реакции:

(А) деградация наночастиц нативной эстеразой, (Б) деградация наночастиц иммобилизованной эстеразой, (В) деградация наночастиц в плазме крови

Степень деградации наночастиц на основе ПМК оценивали посредством расчета выделившейся в ходе реакции МК. Для этого пробы продуктов реакции отфильтровывали в условиях центрифугирования с помощью мембранных фильтров, позволяющих отделить низкомолекулярную фракцию продуктов деградации. Анализ полученных продуктов проводили разработанным методом АО ВЭЖХ. В противоположность ПМК, полная деградация которой происходит в течение 2-3 дней, биодеградация наночастиц на основе ПМК как с использованием ферментов, так и в плазме крови протекает в течение 1.5 - 2

месяцев.

На основе полученных зависимостей было показано, что эффективность нативной и иммобилизованной эстеразы сопоставимы и хорошо коррелируют с процессом естественной деградации полимера в плазме крови человека. Таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность применения разработанных гетерогенных каталитических систем в процессах изучения деградации биополимеров различного медицинского назначения.

## ВЫВОДЫ

1. Проведено исследование деградации поли(молочной кислоты) с использованием нескольких ферментов класса эстераз. Показано, что наиболее эффективная деградация поли(молочной кислоты) в растворе наблюдалась при использовании липазы из *Candida rugosa* ( $C=0.40$  мг/мл) и эстеразы из свиной печени ( $C=0.04$  мг/мл).
2. Получено два гетерогенных биокатализатора на основе макропористых полиметакрилатных монолитных дисков, содержащих иммобилизованную через макромолекулярный спейсер липазу из *Candida rugosa* и эстеразу из свиной печени. Установлено, что деструкция поли(молочной кислоты) с использованием иммобилизованной эстеразы протекала более эффективно.
3. Проведено сравнение эффективности ферментативной деградации поли(молочной кислоты) с использованием нативной и иммобилизованной эстеразы. Установлено, что эффективность биокатализа с помощью иммобилизованного фермента составляла 87% от эффективности каталитической реакции в растворе.
4. Изучен процесс биodeградации наночастиц на основе поли(молочной кислоты) с использованием нативной и иммобилизованной эстеразы, а также в плазме крови человека. Установлено, что полная деградация наночастиц во всех случаях достигалась спустя 50 суток, что позволяет заключить, что гетерогенные биокатализаторы на основе макропористых монолитных носителей могут быть использованы для изучения процессов деградации полимеров медицинского назначения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Полимеры для систем доставки лекарственных веществ пролонгированного действия (обзор). Полимеры и сополимеры молочной и гликолевой кислот [Текст]: монография / С.А. Кедик [и др.]. – *Разработка и регистрация лекарственных средств* - 2013 - №3 - С. 18-35.
- 2) Donald, G. A, Literature Review of Poly(Lactic Acid) [Текст] / Donald Garlotta // *Journal of Polymers and the Environment* - 2001 - Vol. 9 - No. 2 - P. 63-84.
- 3) Albertsson, A., Aliphatic Polyesters: Synthesis, Properties and Applications [Текст] / Ann-Christine Albertsson, IndraK. Varma // *Advances in Polymer Science* - 2002 - Vol. 157 – P. 2-32.
- 4) Lin, X., Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications [Текст] / Lin Xiao, Bo Wang, Guang Yang // *Biomedical Science, Engineering and Technology* - 2012 – Ch. 11 - P. 247-282.
- 5) Azevedo, H.S., Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate [Текст] / Helena S. Azevedo and Rui L. Reis // *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2004* – Ch. 12 - P. 178-197.
- 6) Satoh, T., Structure, function and regulation of carboxylesterases [Текст] / Tetsuo Satoh, Masakiyo Hosokawa // *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 162 - No 3 - P. 195–211.
- 7) Диксон, М., Ферменты [Текст]: в 3-х т. / М.Диксон, Э.Уэбб // Москва: МИР, 1982.
- 8) Esterases as stereoselective biocatalysts *Biotechnology Advances* [Текст]: монография / Diego Romano [и др.]. – *Enzyme Research* - 2013 - Vol. 2013 - P. 1-11.
- 9) Klibanov, A.M., Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts [Текст] / Klibanov A.M. // *Science* - 1983 - Vol. 219 - P. 722-727.
- 10) Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы [Текст] / Бодей С.П. [и др.]. -

М.: Мир, 1988

- 11) И.О. Березина, Имобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы [Текст]: учеб. - метод, пособие / И.О. Березин // т. 1-2, М., 1976 - С. 1-153
- 12) Poly (lacticacid)/chitosan fiber mats: Investigation of effects of the support on lipase immobilization [Текст]: монография / Nataly M. Siqueira [и др.]. - *International Journal of Biological Macromolecules* - 2015 - Vol. 72 - P. 998-1004
- 13) Porous Polymer Monoliths: An Alternative to Classical Beads [Текст]: монография / S. Xie [и др.]. - In book: T. Scheper, R. Freitag (Eds.). *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 2002 - Vol. 76 - P. 87-126.