

На правах рукописи

Плотникова Полина Владимировна

**КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПОЛИКОМПЛЕКСОВ В
БЕЛКОВО-ПОЛИМЕРНЫХ ДИСПЕРСИЯХ**

03.01.02 – биофизика

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук**

Санкт-Петербург – 2010

Работа выполнена на кафедре физико-химических основ медицины в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет»

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук,
доцент Власова Ольга Леонардовна

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
ст. научный сотрудник Паутов Владимир Дмитриевич
кандидат физико-математических наук,
доцент Капралова Виктория Маратовна

Ведущая организация: Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

Защита состоится _____ 2011 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» по адресу: 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 5, факультет медицинской физики и биоинженерии.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГОУ ВПО «Санкт-Петербургского государственного политехнического университета».

Автореферат разослан _____ 2010 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета _____  Власова О.Л.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Состояние биологических дисперсных систем (БДС), характеризующееся набором определённых параметров (например, эффективным диаметром частиц), может радикально изменяться при добавлении очень малых количеств различных водорастворимых полимеров, обладающих биоспецифическими свойствами. Для решения проблем регулирования изменений состояния БДС в ряде практических биотехнологических и биомедицинских задач все шире используют метод флокуляции, в основе которого лежит процесс снижения устойчивости дисперсной системы, обусловленный агрегацией частиц вследствие их взаимодействия с макромолекулами адсорбированного или хемосорбированного реагента (добавленного флокулянта). В связи с этим, особое значение и актуальность приобретают фундаментальные исследования, позволяющие определить механизмы межмолекулярных взаимодействий и кинетику образования биополикомплексов с участием природных и синтетических полимеров в модельных и практически используемых системах.

Эффективная реализация метода флокуляции зависит от совокупности большого числа показателей. Такими показателями являются: внешние параметры системы (температура, давление и т.д.), специфика частиц культуральных жидкостей (структура, конформация и изомерная форма молекул и т.д.), показатели дисперсионной среды, концентрация и характеристики добавляемого полимера (химическое строение, молекулярная масса, тип, количество и распределение зарядов и т.д.).

В данной работе проведено систематическое исследование влияния концентрации, молекулярной массы, структурной организации, химического состава, содержания и типа ионогенных групп растворимых полимеров, а также физико-химических параметров среды на кинетику и механизмы их взаимодействия с частицами биологического происхождения. Это позволило с помощью разработанной методики многопараметрического оптического анализа оценить в режиме реального времени (on-line) исходное состояние дисперсий биополимеров и особенности изменения этого состояния в условиях различного микроокружения.

Подобные разработки относятся к одному из актуальных направлений современной биофизики — изучению механизмов физических и физико-химических процессов в биологических системах на разных уровнях их структурной организации.

Цели и задачи исследования. Целью исследований явилось определение механизмов межмолекулярного связывания в модельных и используемых на практике дисперсиях, содержащих биологические и синтетические полимеры, а также изучение кинетики формирования биополикомплексов с помощью разработанной комплексной on-line методики.

Для выполнения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

1. Разработка методики многопараметрического оптического анализа для исследования кинетики и механизмов формирования комплексов белок–синтетический полимер в модельных и используемых на практике системах.
2. Изучение влияния молекулярной массы (ММ) и структурной организации катионных полиэлектролитов нового типа на кинетику образования поликомплексов с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и величину эффективного диаметра агрегатов.
3. Исследование влияния рН среды, содержания и типа ионогенных групп полимеров на механизмы и кинетику взаимодействия БСА с катионными полиэлектролитами.
4. Определение оптимальных условий флокуляции примесных белков в культуральной жидкости антрациклинового антибиотика рубомицина.

Объекты исследования:

- БСА (ММ = 66430 Да, рI = 4,8, «Реахим», Россия) как адекватная модель примесных белков, содержащихся в культуральных жидкостях антибактериальных и противоопухолевых антибиотиков, а также белков плазмы крови;
- плазма крови здоровых белых беспородных крыс как многокомпонентная модельная среда;
- культуральная жидкость *S. coeruleorubidus* (штамм 2679) противоопухолевого антрациклинового антибиотика рубомицина как используемая в биотехнологии система. Рубомицин является однозарядным органическим катионом с ММ = 528 Да, рк = 8,2;
- растворимые полимеры нового типа, синтезированные в лаборатории гидрофильных полимеров Института Высокмолекулярных Соединений (зав. лаб., член-корр. РАН, проф. Панарин Е.Ф.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанная на основе совместного применения методов интегрального и дифференциального светорассеяния оригинальная методика оптического анализа позволяет исследовать кинетику и механизмы формирования биополикомплексов БСА–синтетический полимер.
2. Межмолекулярное связывание сывороточного альбумина с растворимыми полимерами определяется ион–ионными и гидрофобными взаимодействиями. Соотношение вкладов каждого типа взаимодействия в образование поликомплексов можно регулировать при изменении физико-химических условий в дисперсной системе.
3. Увеличение ММ линейного гомополимера метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония способствует уменьшению концентрации полимера, необходимой для формирования биополикомплексов.
4. Рост числа контактов гомополимера метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония с белком приводит к уменьшению времени, необходимого для установления равновесного состояния в дисперсной системе.
5. Величина эффективного диаметра сформированных белок–полимерных комплексов определяется разветвленностью полиэлектролита и не зависит от ММ линейных гомополимеров.
6. рН-зависимые конформационные переходы БСА приводят к увеличению значений эффективного диаметра биополикомплексов и влияют на кинетику их формирования.

Научная значимость результатов. Для определения кинетики и механизмов формирования комплексов белок–синтетический полимер в модельных и практически используемых системах впервые разработана комплексная on-line методика. Впервые определены механизмы и кинетические параметры процесса формирования комплексов БСА с катионными полиэлектролитами нового типа в различных физико-химических условиях. Проведено систематическое исследование влияния различных характеристик полимеров, а также показателей дисперсионной среды на механизмы и кинетику образования комплексов белок–синтетический полимер в модельных системах. Установлен преимущественный вклад электростатических (ион–ионных) и гидрофобных взаимодействий БСА с водорастворимыми полимерами. Показано, что соотношение вкладов каждого типа взаимодействия в формирование биополикомплексов можно регулировать при изменении физико-химических условий в дисперсной системе. Впервые

исследованы особенности взаимодействия катионных полиэлектролитов с примесными белками в культуральной жидкости антрациклинового антибиотика рубомицина и с белками плазмы крови. Показано, что разветвленный гомополимер метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония обладает лучшими равновесными и кинетическими свойствами.

Практическая значимость результатов. Методами светорассеяния исследованы основные параметры взаимодействия БСА с синтетическими полимерами. Получен патент Российской Федерации № 121 402 (Бюл. изобр. и откр. № 36 от 27.12.2007.), «Оптический способ определения размеров частиц дисперсной системы». Это позволило определить механизмы формирования сложных биополикомплексов и найти оптимальные физико-химические условия флокуляции примесных белков в культуральной жидкости противоопухолевого антрациклинового антибиотика рубомицина.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы были представлены на Межвузовских научно-технических конференциях студентов и аспирантов «XXXV, XXXVII, XXXVIII Недели науки СПбГПУ» (Санкт-Петербург, 2007, 2008, 2009), на Международной конференции "Экобалтика" (Санкт-Петербург, 2006), на 3-ей Международной научно-практической конференции МЕДБИОТЕК «Актуальные вопросы инновационной деятельности в биологии и медицине» (Москва, 2006), на 2-й и 3-ей Санкт-Петербургских конференциях молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2006, 2007), на Международной научной конференции «Измерительные и информационные технологии в охране здоровья. МЕТРОМЕД-2007» (Санкт-Петербург, 2007), на Политехническом симпозиуме «Молодые ученые — промышленности Северо-Западного региона» (Санкт-Петербург, 2007), на XIV Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Современные техника и технологии» (Томск, 2008), на Научно-практической конференции «Научные исследования и инновационная деятельность» (Санкт-Петербург, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 работ.

Личный вклад автора. Все экспериментальные результаты получены лично автором диссертации, их обсуждение и трактовка проведены совместно с руководителем.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, полученных экспериментальных результатов и их математической обработки, выводов, библиографического списка литературы, включающего 190 работ отечественных и зарубежных авторов. Работа изложена на 133 страницах, содержит 33 рисунка и 11 таблиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развития малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках Программы «Старт» 2006 г. (заявка № 06-2-Н2.7-0185); Программы «УМНИК» («Участник Молодежного Научно-Инновационного Конкурса») 2007 г. (проект № 07/2-П-11); Комитета по науке и высшей школы Правительства Санкт-Петербурга 2008 г. (грант серия ПСП № 080472).

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава диссертации представляет собой литературный обзор, в котором на основании проведенных научных исследований отечественных и зарубежных ученых дано краткое описание особенностей взаимодействия биологически активных веществ (БАВ) с полимерами, а также кинетики и теоретических моделей механизма флокуляции. Описаны основные типы полимеров, используемые для регулирования седиментационной устойчивости дисперсных систем (катионные, неионогенные, анионные полимеры), а также свойства сывороточных альбуминов, антрациклиновых антибиотиков и плазмы крови как объектов исследования.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. Изложены методики и приведены основные математические формулы, которые применялись для обработки экспериментальных данных.

В **третьей главе** описаны результаты исследований механизмов взаимодействия в дисперсиях, содержащих сывороточный альбумин и растворимые полимеры, а также кинетики образования поликомплексов в различных физико-химических условиях, полученные с помощью разработанной комплексной on-line методики.

В **заключении** сформулированы выводы диссертационной работы.

Библиографический список литературы отражает научные источники, к которым обращался автор диссертационной работы в ходе исследований и анализа полученных экспериментальных результатов.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Комплексная on-line методика многопараметрического оптического анализа

Для изучения исходного состояния биообъектов, а также характера и степени изменения этого состояния в условиях различного микроокружения и под влиянием физико-химических воздействий использовали оптические методы, которые являются «неразрушающими» и не требуют «фиксирующих» процедур. В основе оптических методов анализа биологических объектов и систем лежат физические эффекты, проявляющиеся при взаимодействии света и вещества. При этом регистрируются изменения различных характеристик электромагнитного излучения после прохождения его через исследуемый образец. Параметры светорассеяния индивидуальны для каждой системы и могут служить основой для идентификации размеров, числа, формы частиц (в том числе и смешанной природы). Современная техника позволяет автоматизировать измерения и проводить исследования в режиме on-line. Однако, из-за сложности дисперсных систем, содержащих биологические частицы, возникает необходимость использовать для их анализа целый комплекс оптических методов (спектроскопия поглощения, флуоресценция, различные модификации метода светорассеяния — динамическое и усредненное по времени статическое, интегральное и дифференциальное, неполяризованное и поляризованное, однократное и многократное). При изучении кинетики процессов в силу низкой чувствительности или существенных ограничений в применении использование одного из методов по отдельности не является достаточно информативным.

В диссертационной работе для идентификации и оценки параметров образующихся биополикомплексов в жидкостях, содержащих белок и синтетические полимеры, разработана оригинальная комплексная on-line методика. Данный подход основан на совместном применении методов интегрального (спектротурбидиметрия — СТ) и дифференциального (нефелометрия) светорассеяния и подборе наиболее информативных оптических параметров в сочетании с расчетом размеров, а также численной концентрации частиц. В таблице 1. представлены основные физико-химические характеристики исследованных полимеров.

Таблица 1. Физико-химические характеристики полимеров

№ образца	Состав полимера	Молекулярная масса, млн. Да (ММ 10^{-6})	Содержание основного вещества, %

1	гомополимер метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония (СМС, линейный, кат. заряд 3,5 мг-экв/г)	25,5	86
2	гомополимер метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония (СМС, линейный, кат. заряд 3,5 мг-экв/г)	3,1	100
3	гомополимер метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония (СМС, разветвленный, кат. заряд 3,5 мг-экв/г)	14,0	100
4	гомополимер полиакриламид (АА)	0,92	100
5	гомополимер полиакриламид (АА)	2,6	100
6	сополимер метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония и акриламида (АА:СМС = 50:50%, кат. заряд 2,8 мг-экв/г)	5,0	95
7	полистиролсульфонат натрия (ПССН)	1,2	100

Экспериментальные данные получали с помощью спектрофотометра СФ-46, предназначенного для измерения коэффициентов пропускания жидких и твердых веществ в области спектра 190–1100 нм.

В отсутствие поглощения $I = I_0 e^{-\tau \ell}$, где τ — мутность, ℓ — длина кюветы (в данной работе использовались кюветы длиной 1 см), I_0 — интенсивность падающего излучения, I — интенсивность прошедшего через образец излучения. $\tau \sim \lambda^{-n}$, где λ — длина волны падающего света, n — волновой экспонент. Для каждой системы измеряли оптическую плотность $D(\lambda)$ (при $\lambda = 400, 500, 600$ нм, в начальный момент времени и с течением времени в ходе седиментации частиц), которая определяется соотношением: $D = \lg(I_0 / I)$

В свою очередь, для жидкостей, содержащих рассеивающие частицы, вне полосы поглощения мутность пропорциональна оптической плотности: $\tau = 2,3D / \ell$

В случае, когда вкладом поглощения в ослабление света можно пренебречь, в двулогарифмическом масштабе зависимость величины оптической плотности от длины волны линейна. Из полученных данных методом СТ рассчитывали значение волнового экспонента по формуле: $n = -\partial \lg \tau / \partial \lg \lambda$

Затем определяли отношение: $A = n_t / n_0$, где n_t — значение волнового экспонента в момент времени t ; n_0 — значение волнового экспонента в начальный момент времени.

Согласно теории [Кленин В.И., Щеголев С.Ю., Лаврушин В.И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1977. 177с; Борен К., Хафмен Д. Поглощение и рассеяние света малыми частицами. М.: Мир, 1986. 664с.], при прочих равных условиях уменьшение величины волнового экспонента и увеличение "вытянутости" индикатрисы в область малых углов свидетельствует об укрупнении частиц в системе. Экспериментально было показано, что в случае образования поликомплексов БСА с синтетическими полимерами, также наблюдалось уменьшение величины волнового экспонента (рис. 1.).

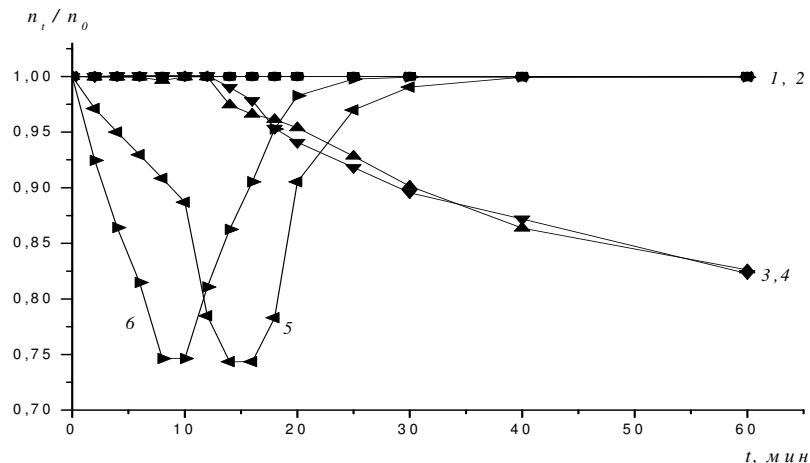


Рис. 1. Зависимость n_t / n_0 от времени эксперимента; рН = 9,18; 1 — дисперсия БСА, не содержащая полимеров; дисперсии БСА + образец № 2 с различной концентрацией C , мг/л: 0,5 (2), 1,0 (3), 2,5 (4), 5,0 (5), 6,0 (6). Величина относительной погрешности 5%

Для измерения индикатрисы рассеяния использовали нефелометр, позволяющий производить измерения в диапазоне углов 60° – 120° . В качестве источника линейно поляризованного излучения применяли гелий-неоновый лазер ($\lambda = 632,8$ нм).

Вытянутость индикатрисы в область малых углов можно характеризовать отношением $I(60^{\circ})/I(90^{\circ})$, а изменение отношения $I(60^{\circ})/I(90^{\circ})$ с течением времени

рассчитать по формуле: $B = [I(60^\circ)/I(90^\circ)]_t / [I(60^\circ)/I(90^\circ)]_0$, где $[I(60^\circ)/I(90^\circ)]_t$ — отношение интенсивностей рассеяния света в момент времени t ; $[I(60^\circ)/I(90^\circ)]_0$ — отношение интенсивностей рассеяния света в начальный момент времени.

Полученные экспериментальные результаты в случае образования поликомплексов БСА с синтетическими полимерами, как и в методе СТ, характеризуют динамику увеличения размеров частиц в дисперсии (рис. 2.).

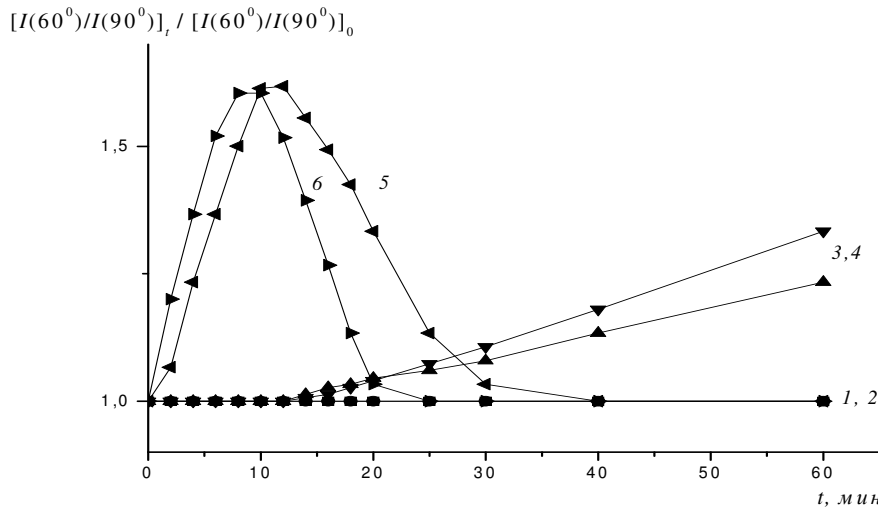


Рис. 2. Зависимость $[I(60^\circ)/I(90^\circ)]_t / [I(60^\circ)/I(90^\circ)]_0$ от времени эксперимента; рН = 9,18; 1 — дисперсия БСА, не содержащая полимеров; дисперсии БСА + образец № 2 с различной концентрацией C , мг/л: 0,5 (2), 1,0 (3), 2,5 (4), 5,0 (5), 6,0 (6). Величина относительной погрешности 5%

Таким образом, с увеличением размеров частиц дисперсной фазы, значение коэффициента B , определяемого методом нефелометрии, растет, а коэффициента A , определенного в тот же момент времени методом СТ, падает. Поэтому деление B на A позволяет получить коэффициент C (т.е. ввести эмпирически подобранный коэффициент), который ещё более чувствителен к изменениям эффективных размеров частиц:

$$C = ([I(60^\circ)/I(90^\circ)]_t / [I(60^\circ)/I(90^\circ)]_0) / (n_t / n_0)$$

Эффективный диаметр частиц и его изменение с течением времени определяли следующим образом:

1) пользуясь результатами экспериментов, рассчитывали величину волнового экспонента и из таблиц [Кленин В.И. и др., 1977] находили соответствующее значение относительного (к длине волны падающего света) размера частиц α ;

2) по формуле $\alpha = \pi d_{0\text{эфф}} \mu_0 \lambda^{-1}$, где μ_0 — показатель преломления среды, находили значения начального эффективного диаметра частиц, нм;

3) по формуле $d_{t\text{эфф}} = C_t \times d_{0\text{эфф}}$ рассчитывали изменение значения $d_{0\text{эфф}}$ с течением времени. Следует отметить, что эффективный диаметр частиц является относительной величиной, которая характеризует образование комплексов белок — синтетический полимер.

С помощью таблиц [Кленин В.И. и др., 1977] можно рассчитать численную концентрацию частиц определённого диаметра по формуле: $N = \frac{\tau}{\pi r^2 K(d, \lambda, m, \rho)}$, где τ — мутность; $K(d, \lambda, m, \rho)$ — коэффициент рассеяния или фактор эффективности рассеяния; d — средний эффективный диаметр частиц в дисперсии; λ — длина волны; m — относительный показатель преломления; ρ — сдвиг фазы световой волны при прохождении через шар вдоль его диаметра.

Сравнительный анализ использования отдельно метода СТ и комплексной методики показал, что предлагаемый подход чувствительнее в определении изменения размеров образующихся поликомплексов, чем традиционный оптический метод (табл. 2.).

Таблица 2. Определение размера образовавшихся комплексов растворимого гомополимера СМС с БСА

t , мин	d_t , нм <i>СТ метод</i>	$d_{t\text{эфф}} = C_t \times d_t$, нм <i>Комплексная методика</i>
0	147±7	147±7
60	147±7	160±8
120	151±8	222±11
180	161±8	248±12
240	157±8	213±11
300	147±7	151±8
330	147±7	147±7

3.2. Механизмы и кинетика взаимодействия БСА с катионными полиэлектролитами

3.2.1. Влияние молекулярной массы катионных полиэлектролитов на кинетику образования поликомплексов с БСА

Линейный образец СМС с молекулярной массой $25,5 \times 10^6$ Да при $\text{pH} = 6,9$ вызывал флокуляцию частиц дисперсной фазы в концентрациях 2,5 мг/л, 5,0 мг/л и 6,0 мг/л (рис. 3. а). Для реализации процесса взаимодействия БСА с линейным образцом СМС более низкой молекулярной массы $3,1 \times 10^6$ Да были необходимы концентрации 5,0 мг/л и 6,0 мг/л (рис. 3. б). При этом для образца № 1 характерна более быстрая кинетика образования комплексов с белком.

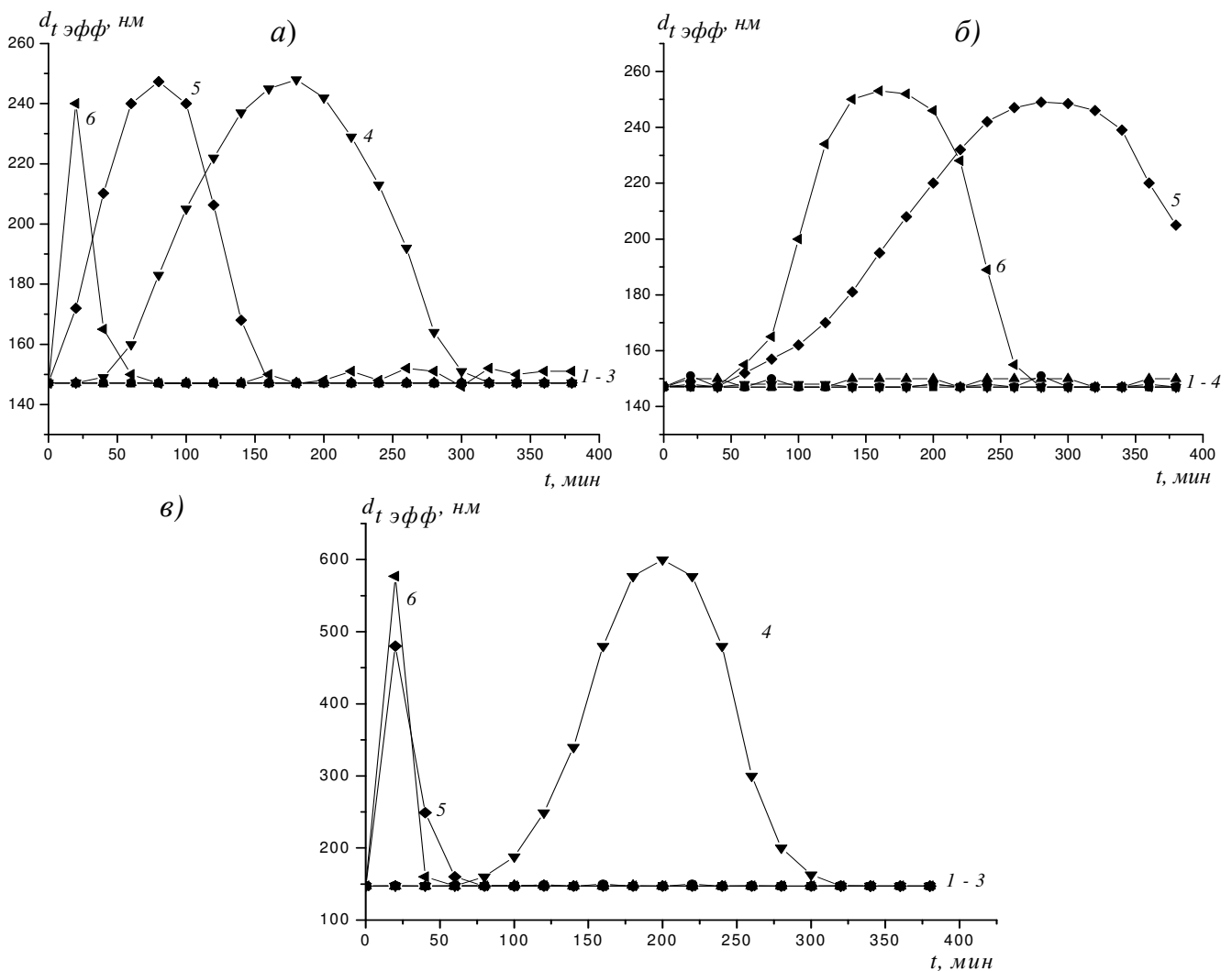


Рис. 3. Зависимость эффективного диаметра частиц от времени эксперимента при $\text{pH} = 6,9$; 1 — дисперсия БСА ($C = 1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$); а) 2–6 — дисперсия БСА + образец № 1; б) 2–6 — дисперсия БСА + образец № 2; в) 2–6 — дисперсия БСА + образец № 3. Концентрация полимеров C , ($\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$): 0,5 (2), 1,0 (3), 2,5 (4), 5,0 (5), 6,0 (6). Величина относительной погрешности 5%

Таким образом, чем выше молекулярная масса линейного катионного полиэлектролита, тем меньшая концентрация этого полимера необходима для формирования биополикомплексов. По всей видимости, это определяется увеличением вероятности контакта периферических звеньев адсорбированной макромолекулы с соседними дисперсными частицами. Максимальные значения эффективного диаметра частиц для исследованных полимеров достигали ~ 240–250 нм. Это позволяет сделать вывод о том, что молекулярная масса линейного полиэлектролита не влияла на размер образовавшихся комплексов белок–синтетический полимер.

3.2.2. Влияние структурной организации катионных полиэлектролитов на кинетику образования макромолекулярных поликомплексов с БСА

Разветвленный полимер СМС с молекулярной массой $14,0 \times 10^6$ Да при рН = 6,9 вызывал фазовое разделение системы, начиная с концентрации 2,5 мг/л, при этом значения эффективного диаметра комплексов достигали 590–600 нм, а область дестабилизации дисперсии составляла 40–200 мин (рис. 3. в). Увеличение концентрации полимера до 5,0 мг/л и 6,0 мг/л способствовало более быстрой кинетике флокуляции. Это связано с тем, что разветвленная макромолекула может одновременно присоединиться к двум и более частицам белка, связывая их через полимерные мостики, так как имеет несколько мест присоединения (обладает несколькими ветвями). Следовательно, увеличение числа контактов полимерной макромолекулы с БСА приводило к уменьшению времени, необходимого для установления равновесного состояния в системе, то есть к более быстрой кинетике взаимодействия. Величина эффективного диаметра сформированных поликомплексов определялась разветвленностью полиэлектролита. Таким образом, структурная организация синтетических катионных полимеров также оказывает влияние на кинетику формирования комплексов белок–полиэлектролит и на эффективный размер частиц.

3.2.3. Влияние рН среды на механизмы и кинетику межмолекулярного взаимодействия БСА с синтетическими полиэлектролитами

Для интерпретации природы межмолекулярных взаимодействий в сложных многокомпонентных системах необходимо изучение кинетики изменения величины эффективного диаметра поликомплексов от значения рН среды. В связи с этим, эксперименты проводились в нейтральной, кислой и щелочной среде при постоянной концентрации БСА ($C = 1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Это позволило систематически варьировать степень ионизации белка. Вместе с тем, так как синтезированные растворимые полиэлектролиты

являются сильными полиоснованиями, то при исследованных значениях рН аммониевые группы в структуре полимеров были полностью ионизованы.

Из рис. 3. следует, что при рН = 6,9 наблюдалось формирование комплексов белок–полимер. При этом величина численной концентрации частиц уменьшалась. Это связано с тем, что при нейтральных значениях рН ионизация основных аминогрупп БСА подавлена, а карбоксильные группы полностью диссоциированы, т.е. молекула несет отрицательный заряд, тогда как аммониевые группы полиэлектролитов сохраняли положительный заряд (полностью диссоциированы). Следовательно, формирование биополикомплексов было обусловлено ион–ионным притяжением между белком и полимерными ионами с кислотными функциональными группами.

В структуре БСА преобладают гидрофобные аминокислотные остатки. Это позволило сделать предположение о том, что в комплексах белок–полимер не исключена возможность образования дополнительных неионных взаимодействий. Для подтверждения данного предположения в условиях постоянной концентрации БСА и ионной силы дисперсии было исследовано влияние 50% изопропилового спирта на природу взаимодействия БСА с поликатионами (образцы № 1–3). Установлено, что в условиях полного подавления возможного гидрофобного связывания, при нейтральных значениях рН среды, наблюдалось значительное ослабление взаимодействия БСА с полиэлектролитами. В присутствии 50% изопропанола максимальные значения d_t эфф комплексов БСА с образцом № 1 составляли ~ 185–188 нм, тогда как в случае без изопропилового спирта значения d_t эфф достигали ~ 240–250 нм. При использовании линейного образца № 2 в присутствии изопропанола d_t эфф = 176–179 нм, в отсутствие изопропилового спирта d_t эфф = 240–250 нм. При использовании разветвленного образца № 3 d_t эфф = 268–274 нм (в присутствии изопропилового спирта), d_t эфф = 490–600 нм (в отсутствие изопропанола). Кинетика формирования биополикомплексов также существенно менялась. Величина эффективного диаметра частиц дисперсной фазы без добавления полимера во всех случаях оставалась постоянной и составляла ~ 147–150 нм. Следовательно, формирование комплексов БСА с поликатионами при нейтральных значениях рН среды в отсутствие изопропилового спирта было обусловлено ион–ионным и гидрофобным взаимодействиями.

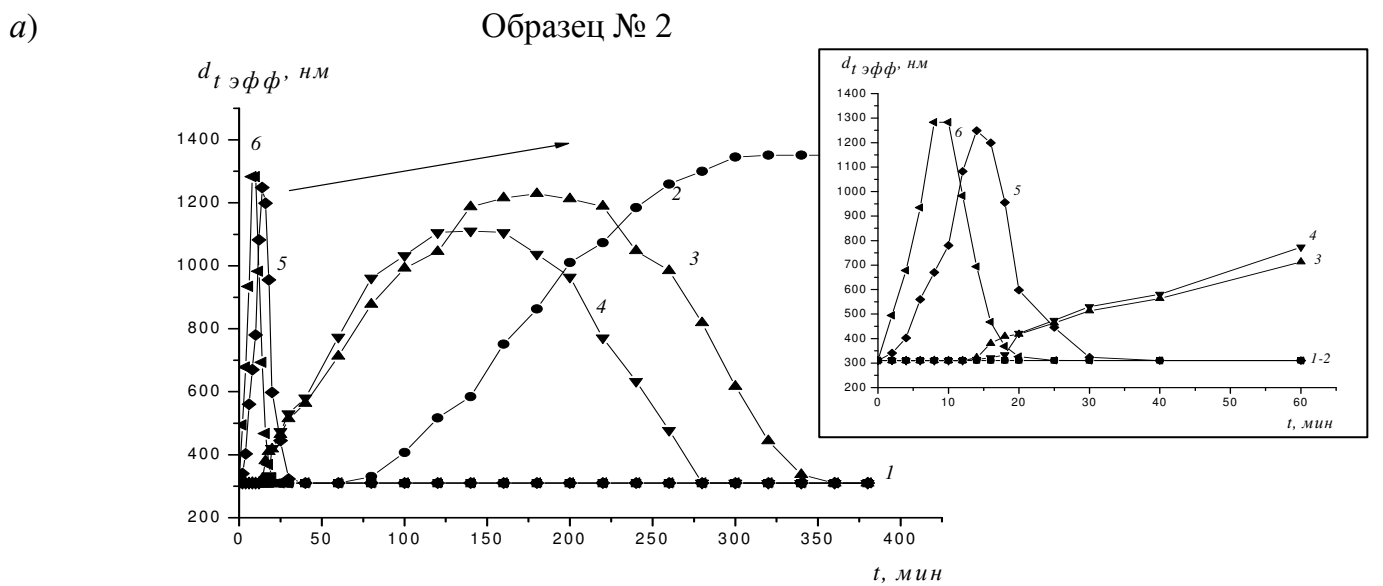
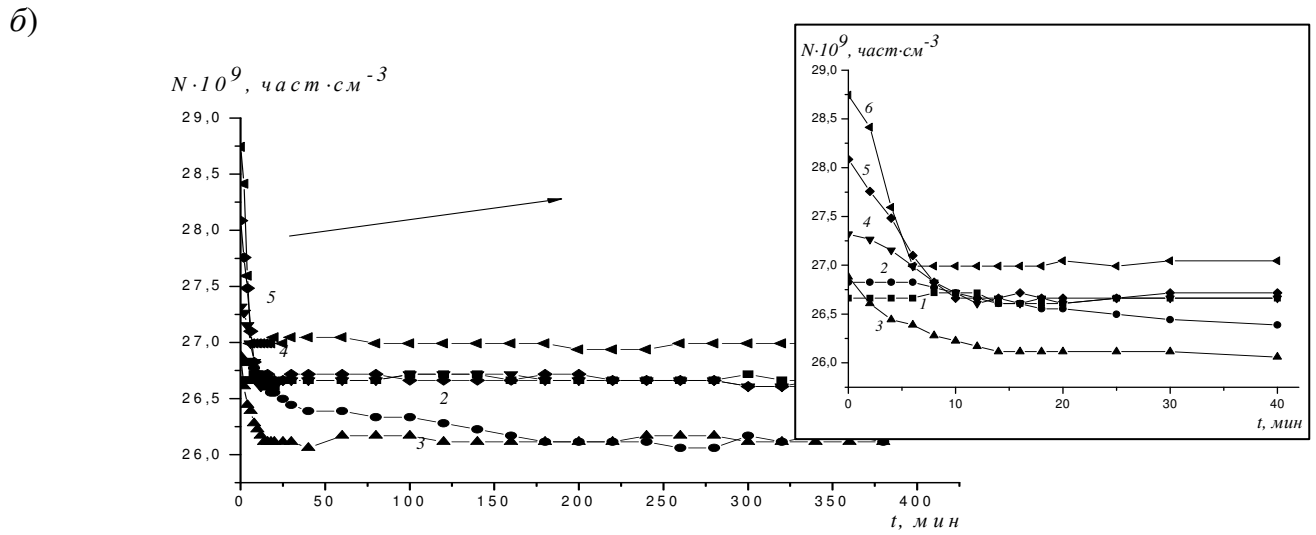
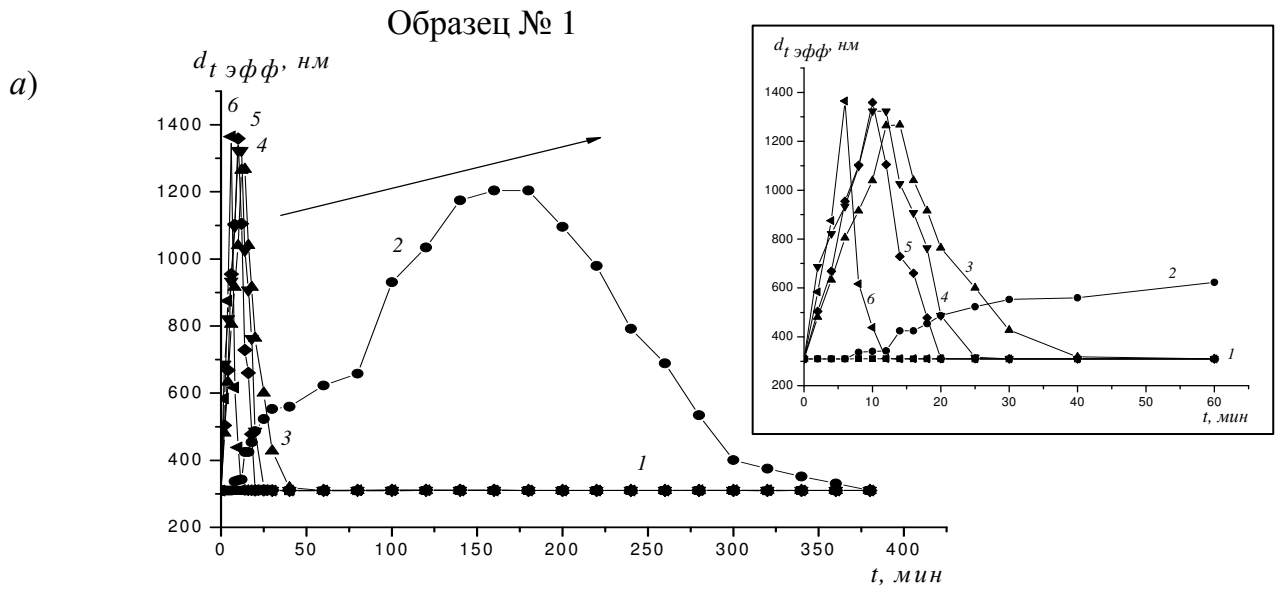
При рН = 3,56 для всех исследованных полимеров образование биополикомплексов не наблюдалось. При этом величина эффективного диаметра частиц составляла ~ 308–313 нм ($t = 0–400$ мин.). Численная концентрация частиц также не изменялась. Это обусловлено тем, что ионизация карбоксильных групп БСА подавлена и молекула несет

положительный заряд, тогда как аммониевые группы полиэлектролитов полностью диссоциированы. Следовательно, ион–ионное отталкивание одноименно заряженных функциональных групп полиэлектролитов и БСА приводило к невозможности взаимодействия дисперсных частиц. В этом случае гидрофобное взаимодействие было существенно слабее, чем силы отталкивания одноименно заряженных ионов.

Следует отметить, что величина эффективного диаметра частиц дисперсной фазы при $pH = 3,56$ увеличивалась без добавления полимера. По всей видимости, макромолекулы БСА претерпевали конформационный переход, в результате которого они «разворачивались». Известно, что под действием различных физико-химических факторов, в том числе при изменении pH среды, конформационные свойства белка меняются. В настоящее время различают пять изомерных форм альбумина: расширенная E (expanded); быстро мигрирующая F1, F (fast migrating); нейтральная или нормальная N (neutral or normal); основная B (basic); "состарившаяся" A (aged), которые могут переходить друг в друга в определенных интервалах pH и сопровождаются изменением размера глобулы. При $4,3 < pH < 8,0$ молекулы БСА находились в N-форме и представляли собой компактную структуру, стабилизированную гидрофобными взаимодействиями, солевыми мостиками, водородными связями и т.п., при этом $d_{эфф}$ составляло $\sim 147\text{--}150$ нм (см. рис. 3.). Однако, при $3,5 < pH < 4,3$ N-форма БСА подвергалась конформационной перестройке за счет нарушения взаимодействий в ее структуре и переходила в F1-изомерную форму ($pH = 3,56$ — переход N–F1). Из-за этого происходило увеличение значений эффективного диаметра частиц до $308\text{--}313$ нм.

Экспериментальные данные по исследованию кинетики процесса взаимодействия белка с синтетическими поликатионами СМС при $pH = 9,18$ показали, что в условиях, когда карбоксильные группы БСА и аммониевые группы полимеров полностью ионизованы, образование поликомплексов определялось ион–ионным притяжением карбоксильных групп БСА и основных групп полиэлектролитов, а также гидрофобным связыванием (рис. 4.).

Для всех исследованных полимеров среднее значение численной концентрации частиц в начальный момент времени увеличивалось прямо пропорционально концентрации добавляемого полимера, тогда как общее число частиц в модельной дисперсии уменьшалось с течением времени (рис. 4. б).



Образец № 3

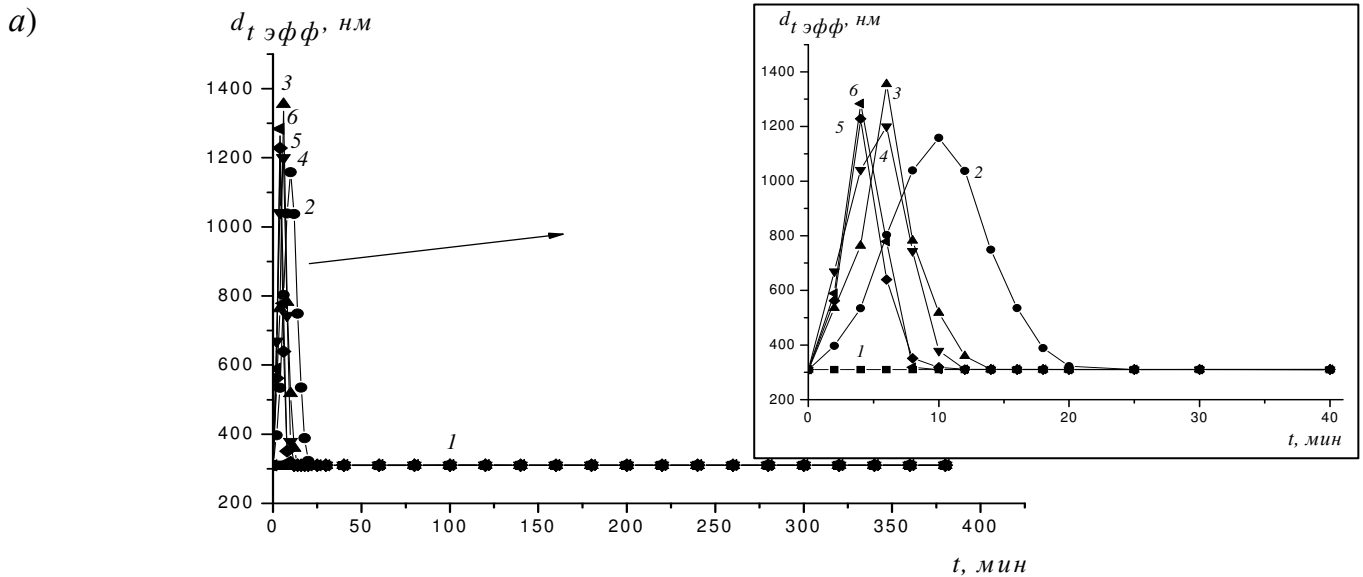


Рис. 4. Зависимость эффективного диаметра (а) и численной концентрации частиц (б) от времени эксперимента; рН = 9,18; 1 — дисперсия БСА ($C = 1 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$), не содержащая полимеров; дисперсии БСА + полимеры (образцы № 1–3) с различной концентрацией C , мг/л: 0,5 (2), 1,0 (3), 2,5 (4), 5,0 (5), 6,0 (6). Величина относительной погрешности 5%

Величина эффективного диаметра частиц дисперсной фазы при рН = 9,18 увеличивалась. Это, возможно, связано с тем, что сдвиг рН среды в щелочную область приводил к потере нативной конформации БСА, вследствие чего наблюдался N–В переход.

Для всех исследованных полимеров при рН = 9,18 время, необходимое для установления равновесного состояния в системе, уменьшалось, а максимальные значения эффективного диаметра образующихся комплексов увеличивались в несколько раз по сравнению с аналогичными параметрами при нейтральных значениях рН среды. Это, по всей видимости, связано с усилением ион–ионного взаимодействия аммониевых групп полиэлектролита с карбоксильными группами белка, а также с тем, что в молекуле БСА имеются сформированные гидрофобные области. При нейтральных рН гидрофобные области частично находятся на поверхности альбумина, а частично погружены внутрь глобулы (так называемые "гидрофобные карманы (складки)"). При сдвиге показателей рН в щелочную область структура белка претерпевает конформационный переход (N–В), т.е. полипептидная цепь БСА разворачивается. В результате этого "гидрофобные карманы" «открываются» и становятся доступными областями для активного связывания (увеличение количества контактов), что в свою очередь, вероятно, влияло на кинетику формирования биополикомплексов.

3.3. Механизмы и кинетика взаимодействия БСА с неионогенными полимерами

Полиакриламид (образцы № 4, № 5) при рН = 6,9 вызывал фазовое разделение системы при всех исследованных концентрациях. При этом число частиц в модельной дисперсии уменьшалось. Следовательно, связывание БСА с АА определялось взаимодействием неэлектростатической природы.

3.4. Механизмы и кинетика взаимодействия БСА с сополимером ААСМС

Экспериментальные данные по изучению взаимодействия БСА с катионным сополимером ААСМС при рН = 6,9 (в условиях, когда карбоксильные группы БСА и аммониевые группы сополимера полностью диссоциированы) показали, что устойчивость дисперсии сначала снижалась, а после достижения минимума возрастала. При этом число частиц уменьшалось. Следовательно, образование биополикомплексов обусловлено ион-ионным притяжением между белком и полимерными ионами с кислотными функциональными группами, а также гидрофобным взаимодействием, что было подтверждено экспериментальными данными с 50% изопропиловым спиртом.

Сравнительный анализ использования катионных гомополимеров СМС, неионогенных гомополимеров АА и катионного сополимера ААСМС при рН = 6,9 показал существенные отличия кинетики формирования биополикомплексов с БСА. Катионный сополимер ААСМС обладал более высокой способностью формирования надмолекулярных структур, чем неионогенные гомополимеры АА, и меньшей, чем катионные гомополимеры СМС. При этом величина эффективного диаметра частиц дисперсной фазы без добавления полимеров составляла ~ 147–150 нм ($t = 0-400$ мин.). По всей видимости, это связано с разным соотношением вкладов каждого типа взаимодействия в формирование белок-полимерных комплексов в дисперсных системах, специфика возникновения которых определяется содержанием и типом ионогенных групп полимеров.

3.5. Механизмы и кинетика взаимодействия БСА с анионным полиэлектролитом

Экспериментальные данные по изучению взаимодействия частиц БСА с анионным полиэлектролитом ПССН при рН = 6,9 показали, что происходило ион-ионное отталкивание одноименно заряженных функциональных групп компонентов, что препятствовало формированию биополикомплексов.

3.6. Кинетика взаимодействия катионных полиэлектролитов с белками в многокомпонентной модельной среде плазме крови

Использование низкомолекулярного линейного образца № 2 с концентрациями 0,25 мг/л, 0,5 мг/л при рН = 7,4 приводило к формированию биополикомплексов в плазме крови, что подтверждало результаты, полученные для модельных дисперсий БСА.

3.7. Кинетика взаимодействия катионных полиэлектролитов с примесными белками в культуральной жидкости противоопухолевого антрациклинового антибиотика рубомицина

Результаты, полученные на модельных системах, легли в основу экспериментов по выбору условий предварительной очистки культуральной жидкости антрациклинового антибиотика рубомицина от примесных белков. Необходимость таких исследований связана с тем, что культуральные жидкости целевых биологически активных веществ, получаемые после отделения мицелия, представляют собой сложные системы, включающие примесные растворенные органические и неорганические вещества, коллоидные частицы и взвеси. Именно поэтому выделение целевых продуктов микробиологического синтеза включает в себя концентрирование и очистку данных дисперсий.

На рис. 5. представлены результаты экспериментов по флокуляции белковых примесей в культуральной жидкости противоопухолевого антибиотика рубомицина синтетическими катионными полимерами (образцы № 1–3) при рН = 6,9.

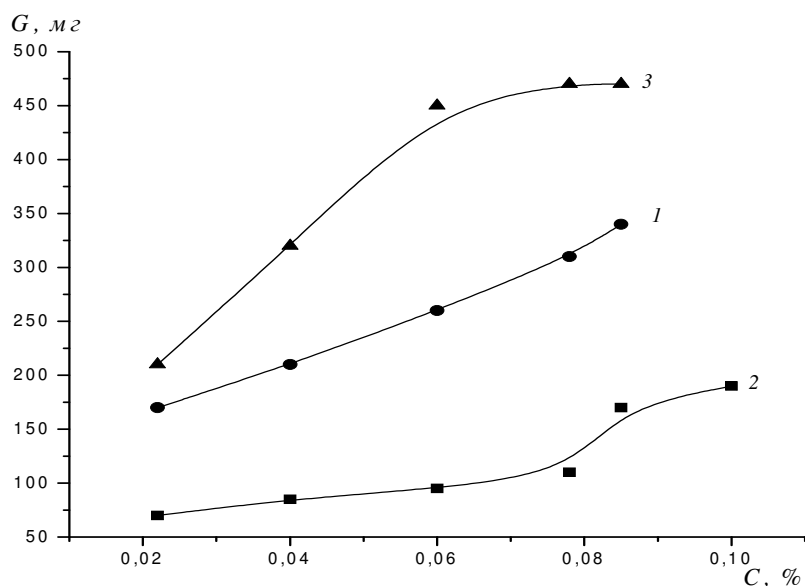


Рис. 5. Флокуляция примесных белков в культуральной жидкости *S. coeruleorubidus* (штамм 2679) противоопухолевого антибиотика рубомицина полиэлектролитами; G — вес высушенного осадка примесных белков; C — концентрация растворимых полимеров в культуральной жидкости; объем культуральной жидкости 20 мл; рН = 6,9; 1 — образец № 1; 2 — образец № 2; 3 — образец № 3. Величина относительной погрешности 5%

Установлено, что обработка культуральной жидкости антибиотика полиэлектролитами, в подобранном оптимальном интервале концентраций, приводила к выделению значительного количества осадка примесных компонентов белковой природы. При этом активность антибиотика до обработки и после нее практически не менялась. Это подтверждает результаты, полученные на модельных системах. Разветвленный образец СМС с молекулярной массой $14,0 \times 10^6$ Да обладал лучшими равновесными и кинетическими свойствами по сравнению с линейными поликатионами, что также соответствует результатам экспериментов на модельных системах.

Выводы:

1. Межмолекулярное связывание БСА с водорастворимыми полимерами определяется ион-ионными и гидрофобными взаимодействиями. Соотношение вкладов каждого типа взаимодействия зависит от содержания и типа ионогенных групп полимеров, а также pH среды.

2. При увеличении ММ линейного гомополимера метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония требуются меньшие концентрации полимера для формирования биополикомплексов.

3. Рост числа контактов гомополимера метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония с белком приводит к уменьшению времени, необходимого для установления равновесного состояния в дисперсной системе.

4. Величина эффективного диаметра сформированных биополикомплексов в белково-полимерных дисперсиях определяется разветвленностью полиэлектролита и не зависит от ММ линейных гомополимеров.

5. pH-зависимые конформационные переходы БСА приводят к увеличению значений эффективного диаметра биополикомплексов и влияют на кинетику их формирования.

6. Определены оптимальные условия флокуляции примесных белков в культуральной жидкости противоопухолевого антрациклинового антибиотика рубомицина.

7. На основе совместного применения методов интегрального и дифференциального светорассеяния разработана оригинальная методика многопараметрического оптического анализа для исследования кинетики и механизмов формирования биополикомплексов в модельных и используемых на практике белково-полимерных дисперсиях.

Список опубликованных работ по теме диссертации.

1. Писарев О.А., Власова О.Л., Плотникова П.В., Тощевикова А.Ю. Разработка экологически безопасной технологии получения противоопухолевого антибиотика

- рубомидина //Тез. докладов Международной конференции "Экобалтика". 2006. С. 34–35.
2. Власова О.Л., Плотникова П.В., Грошикова А.Р., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Использование растворимых флокулянтов для интенсификации биотехнологических процессов //Труды третьей международной научно-практической школы — конференции МЕДБИОТЕК «Актуальные вопросы инновационной деятельности в биологии и медицине». Москва: Изд-во ОАО «Авиаиздат», 2006. С. 22–23.
 3. Плотникова П.В., Власова О.Л., Грошикова А.Р., Писарев О.А. Флокулирующие свойства полиэлектролитов на основе метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония //Тез. докладов II Санкт-Петербургской конференции молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах». СПб.: Изд-во ИВС РАН, 2006. Часть 3. С. 103.
 4. Плотникова П.В., Власова О.Л., Грошикова А.Р., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Использование растворимых катионных полиэлектролитов для флокуляции нативных растворов противоопухолевых антибиотиков //Сб. материалов. Фундаментальные исследования в технических университетах. СПб.: Изд-во Политехнического ун-та, 2006. С. 383.
 5. Плотникова П.В., Власова О.Л. Использование новых типов растворимых полиэлектролитов для флокуляции растворов лигногумата, модельных белков и нативных растворов антибиотиков //Материалы Всероссийской межвузовской научно-технической конференции студентов и аспирантов. XXXV Неделя науки СПбГПУ. СПб.: Изд-во Политехнического ун-та, 2007. Часть IV. С. 254–256.
 6. Плотникова П.В. Использование on-line измерений параметров светорассеяния примесных частиц для оптимизации процесса выделения и очистки БАВ //Труды международной научной конференции «Измерительные и информационные технологии в охране здоровья. МЕТРОМЕД-2007». СПб.: Изд-во Политехнического ун-та, 2007. С. 148–149.
 7. **Власова О.Л., Писарев О.А., Безрукова А.Г., Плотникова П.В. Оптический способ определения размеров частиц дисперсной системы //Патент РФ № 121 402 (Бюл. изобр. и откр. № 36 от 27.12.2007.).**
 8. **Власова О.Л., Плотникова П.В., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Исследование процессов комплексообразования биологически активных веществ и синтетических полимеров методами оптической спектроскопии //Научно-технические Ведомости СПбГПУ. 2007. Т. 50. № 2. С. 118–122.**

9. Плотникова П.В., Власова О.Л., Писарев О.А. Комплексная методика on-line контроля биотехнологических процессов получения БАВ //Материалы конференции политехнического симпозиума 2007 года «Молодые ученые — промышленности Северо-Западного региона». СПб.: Изд-во СПбГПУ, 2007. С. 50–51.
10. Плотникова П.В., Власова О.Л., Грошикова А.Р., Писарев О.А. Исследование флокуляции нативных растворов антрациклиновых антибиотиков растворимыми полиэлектролитами //Тез. докладов III Санкт-Петербургской конференции молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах». СПб.: Изд-во ИВС РАН, 2007. Часть 3. С. 107.
11. **Власова О.Л., Плотникова П.В., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Структурно-функциональное исследование процесса флокулообразования в модельных биосистемах //Научно-технические Ведомости СПбГПУ. 2007. Т. 51. № 3. С. 176–180.**
12. Vlasova O.L., Plotnikova P.V., Pisarev O.A., Panarin E.F. Creation of new ecologically safe technology of production antitumor antibiotic rubomycin //Abstracts celebrating the 25th DECHEMA annual convention of biotechnologists "European BioPerspectives". Koln, 2007. P. 137.
13. **Плотникова П.В., Власова О.Л. Структурно-функциональное оптическое исследование рН-зависимых конформационных переходов в модельных растворах БСА, содержащих синтетические полиэлектролиты //Научно-технические Ведомости СПбГПУ. 2008. Т. 59. № 3. С. 223–230.**
14. Плотникова П.В., Власова О.Л. Применение комплексной on-line методики контроля и управления качеством антрациклиновых антибиотиков в биотехнологическом производстве //Сборник трудов XIV международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Современные техника и технологии». Томск: Изд-во ТПУ, 2008. Т. 3. С. 270–272.
15. Власова О.Л., Безрукова А.Г., Плотникова П.В., Любинский А.И. Многопараметрический оптический анализ модельных и природных альбуминосодержащих систем //Материалы XII Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования и инновации в технических университетах». СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2008. С. 266–267.
16. Плотникова П.В., Власова О.Л. Многопараметрический оптический анализ конформационных переходов белковых примесей растворов БАВ в присутствии

- синтетических полиэлектролитов //Материалы научно-практической конференции «Научные исследования и инновационная деятельность». СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2008. С. 159–165.
17. **Плотникова П.В., Власова О.Л., Грошикова А.Р., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Влияние молекулярной массы и структурной организации катионных полиэлектролитов на флокуляцию белка //Журнал прикладной химии. 2008. Т. 81. Вып. 9. С. 1533–1536.**
18. Плотникова П.В. Оптимизация процесса выделения и очистки БАВ с помощью on-line измерений параметров светорассеяния примесных частиц //XIII Санкт-Петербургская Ассамблея молодых ученых и специалистов. Аннотации работ победителей конкурса грантов Санкт-Петербурга 2008 года для студентов, аспирантов, молодых ученых и молодых кандидатов наук. СПб.: Фонд «ГАУДЕАМУС», 2008. С. 115–116.
19. Плотникова П.В., Власова О.Л. Структурно-функциональное исследование процесса образования поликомплексов сывороточного альбумина с катионными полиэлектролитами //Материалы Всероссийской межвузовской научной конференции студентов и аспирантов. XXXVII Неделя науки СПбГПУ. СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2008. С. 20–22.
20. Плотникова П.В., Власова О.Л. Многопараметрический оптический анализ механизмов образования макромолекулярных поликомплексов //Материалы международной научно-практической конференции. XXXVIII Неделя науки СПбГПУ. СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2009. С. 51–53.