

*На правах рукописи*

Лещинская Анастасия Петровна

СОЗДАНИЕ НОВЫХ ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫХ СОРБЕНТОВ  
МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО  
ИМПРИНТИНГА

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ – 2011

Работа выполнена на кафедре медицинской биотехнологии Факультета медицинской физики и биоинженерии ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет»

Научный руководитель: кандидат химических наук,  
доцент Писарев Олег Александрович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,  
профессор Галль Лидия Николаевна;  
кандидат химических наук,  
доцент Глазова Наталья Владимировна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский  
государственный технологический институт  
(технический университет)»

Защита состоится «9» февраля 2011 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» по адресу:

195251, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д.5,  
Факультет медицинской физики и биоинженерии, ауд. 305.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

Автореферат разослан «    » декабря 2010 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат физико-математических наук, доцент



Власова О.Л.

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Мочевая кислота (МК) – конечный продукт пуринового метаболизма в организме человека. МК находится в виде уратов в плазме крови. При высокой концентрации МК (свыше 420 мкмоль/л) наблюдается гиперурикемия. При этом ряд локальных физико-химических условий, таких как избыток катионов, повышение температуры, вызывает кристаллизацию уратов и накопление в различных тканях организма (суставах, почках, мочевых путях и даже в клапанах сердца) и часто приводит к подагре. Но и при отсутствии кристаллизации повышенные концентрации МК могут вызывать значительные дисфункции организма, такие как артериальная гипертензия, атеросклероз и их осложнения (инфаркт, инсульт, сердечная и почечная недостаточность).

Используемые в настоящее время традиционные способы коррекции гиперурикемии и подагры (специальная диета и лекарственное ограничение образования МК) малоэффективны и чреваты побочными эффектами.

Вместе с тем, все большее внимание уделяется развитию и внедрению в клиники современных эфферентных методов лечения с использованием экстракорпоральных устройств. Эфферентные методы моделируют естественные механизмы детоксикации организма, в основе которых лежат сорбционные механизмы связывания токсинов. С этой точки зрения, разработка сорбционных методов удаления МК непосредственно из плазмы крови больных представляется очень перспективной. В настоящее время в экстракорпоральных установках в качестве сорбентов применяются соединения на основе активированных углей. Активированные угли не являются высокоселективными сорбентами поскольку наряду с токсическими веществами способны поглощать широкий спектр физиологически активных веществ, необходимых для нормальной жизнедеятельности организма человека. Поэтому исследование межмолекулярных взаимодействий МК с сорбентами различной молекулярной структуры, а также синтез и изучение свойств новых сорбентов, способных селективно поглощать уремические токсины из плазмы крови, являются актуальными смежными проблемами биофизики, медицинской физики и биотехнологии.

### **Цели и задачи исследования.**

Цель работы - получение и исследование физико-химических и сорбционных свойств новых полимерных сорбентов, молекулярно импринтированных МК и способных селективно извлекать ее из перитонеальной жидкости и плазмы крови.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Изучены равновесные параметры селективной сорбции МК из растворов, моделирующих плазму или сыворотку крови. С целью анализа специфических взаимодействий сорбент-сорбат проведено исследование механизмов межмолекулярного связывания МК с известными синтетическими и природными сорбентами различной молекулярной структуры.
2. Выявлены сорбенты, наиболее селективно сорбирующие МК из многокомпонентной перитонеальной жидкости. На основе исследования механизма межмолекулярных взаимодействий МК с полимерными сорбентами проведен выбор сомономеров и физико-химических условий для синтеза новых сорбентов, импринтированных молекулами уремиического токсина (МК).
3. Получены полимерные сорбенты, «настроенные» на молекулу МК. Изучены физико-химические свойства полученных сорбентов. Проведены модификация и оптимизация синтеза сорбента, молекулярно импринтированного МК.
4. Исследованы специфичность сорбции и распределение полостей, комплементарных молекуле МК в структуре оптимизированного сорбента. Исследованы равновесно-кинетические и динамические параметры сорбции МК на импринтированном оптимизированном сорбенте.
5. Осуществлены эксперименты по селективной динамике сорбции МК из плазмы крови больных гиперурикемией и подагрой с повышенным содержанием МК.

### **Научная новизна работы.**

Впервые на основании проведенного исследования равновесных параметров сорбции МК сорбентами различной молекулярной структуры из однокомпонентных растворов и из перитонеального диализного раствора установлен механизм межмолекулярного взаимодействия МК с полимерными сорбентами. Показано, что межмолекулярное взаимодействие МК с матрицами сетчатых полимеров носит полифункциональный

характер, при этом МК проявляет свойства органического аниона, а также способна образовывать водородные связи с полимерными сорбентами.

Впервые для создания высокоселективных полимерных сорбентов МК применён метод молекулярного импринтинга и изучены их физико-химические свойства.

Проведена модификация и оптимизация получения молекулярного сорбента на основе ДМЭГ, импринтированного МК (МК-МИП-7-16). Впервые было достигнуто узкое распределение комплементарных к молекулам МК полостей в импринтированной сетке. Это привело к росту вклада специфичного межмолекулярного взаимодействия МК с оптимизированным сорбентом. Полученный молекулярно импринтированный сорбент впервые использован для селективной сорбции МК из плазмы крови больных гиперурикемией и подагрой.

**Практическая значимость.** Результаты диссертационной работы являются основой разработки эфферентного метода лечения гиперурикемии и подагры. Плазмсорбционный метод селективного удаления МК предназначен для использования импринтированного сорбента МК-МИП-7-16 в портативной экстракорпоральной установке для использования в стационарных и в амбулаторных условиях.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы были представлены на 2-ой и 3-ей Всероссийских научных конференциях с международным участием «Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья» (Белгород, 2006, 2008), на 2-й, 3-ей, 4-ой и 5-ой Санкт-Петербургских конференциях молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2006, 2007, 2008, 2009), на межвузовской научной конференции студентов и аспирантов «XXXVI-XXXVIII неделя науки СПбГПУ» (Санкт-Петербург, 2007, 2008, 2009), на 11 международном симпозиуме по препаративной и индустриальной хроматографии «SPICA 2006». (Инсбрук, 2006), на X Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования в технических университетах» (Санкт-Петербург, 2006), на 3-ей международной научно-практической школе-конференции «Медбиотек» «Актуальные вопросы инновационной деятельности в биологии и медицине» (Москва, 2006), на Всероссийском симпозиуме по нанобиотехнологии (Новороссийск, 2007), на международном симпозиуме «Molecular order and Mobility in Polymer Systems» (Санкт-Петербург, 2008), на конференциях и семинарах по направлениям Программы

«Фундаментальные науки - медицине» в 2009 году (Москва, 2009), на Четвертом всероссийском форуме студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновация в технических университетах» (Санкт-Петербург, 2010).

Работа была выполнена при финансовой поддержке грантов Правительства Санкт-Петербурга для молодых ученых (2007, 2008) и программы «УМНИК» (2007-2009).

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Специфика межмолекулярных взаимодействий уремиического токсина МК с сорбентами природного и синтетического происхождения позволяет интерпретировать природу межмолекулярных взаимодействий уремиического токсина с полимерными сорбентами и установить, что взаимодействие МК с матрицами сетчатых полимеров носит полифункциональный характер.
2. Применение метода молекулярного импринтинга позволило получить высокоспецифичные для МК импринтированные сорбенты на основе ДМАЭМ и ДМЭГ. Проведена оптимизация получения молекулярного сорбента на основе ДМЭГ, импринтированного МК (МК-МИП-7-16). В этом сорбенте достигнуто узкое распределение комплементарных к МК полостей в полимерной сетке.
3. Доказано, что специфический сорбат связывается преимущественно в полученных молекулярным импринтингом полостях.
4. Продемонстрирована высокая эффективность сорбента МК-МИП-7-16 в клинических экспериментах по извлечению МК из сыворотки крови больных с повышенным содержанием МК.

**Личный вклад автора.** Материалы, представленные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор принимал участие в постановке задач, обработке и интерпретации полученных экспериментальных данных.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, имеется 1 патент.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части и раздела, посвященного результатам и их обсуждению. Диссертация включает в себя выводы и 123 использованных литературных источника отечественных и зарубежных авторов. Работа изложена на 111 страницах и содержит 39 рисунков и 11 таблиц.

## 2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

### Материалы и методы.

В работе использовалась кристаллическая МК («Вектон», Россия). МК представляет собой 2,6,8 – тригидроксипурин (рис.1). Для нее характерна лактим-лактаминная таутомерия (равновесие сдвинуто в сторону лактаминной формы).

Для исследования сорбционных параметров использовался однокомпонентный водный раствор МК. Поскольку МК плохо растворима в воде, ее раствор готовили в среде  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  ( $C = 0,3$  г/л). Также использовалась перитонеальная жидкость и сыворотка крови, получаемые от больных с хронической почечной недостаточностью.

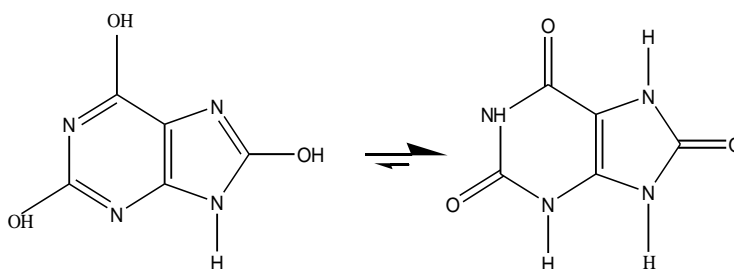


Рис. 1. Таутомерные формы МК (ММ=168).

В качестве широко используемых на практике сорбентов использовались полимеры на основе целлюлозы: диэтиламиноэтилцеллюлоза (DEAE), триэтиламиноэтилцеллюлоза (TEAE), целлюлоза-фосфат (CP), карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ); вискоза; четвертичное аммониевое основание хитозана (ЧАО ХАН); карбоксильный катионит на основе метакриловой кислоты и сшивающего агента диметакрилата этиленгликоля (ДМЭГ) – БДМ-18; высокоосновные аниониты на основе стиролдивинилбензола (ФАФ, АВ, АРА). В ходе выполнения работы был синтезирован оптимизированный сшитый полимерный сорбент МК-МИП-7-16 на основе ДМЭГ, импринтированный молекулами МК.

Коэффициенты набухания сорбентов определяли как отношение объема набухшего образца сополимера к объему сухого после набухания фиксированного объема сухого образца в течение 8-10 часов.

Величину полной обменной емкости (ПОЕ) определяли по амино- и карбоксильным группам. Для титрования аминогрупп сорбенты предварительно переводили в ОН-форму. Затем к 10 мг сорбента добавляли 20 мл раствора 0,1н HCl. Смесь перемешивали до установления равновесия в течение 7 суток. Избыток Cl<sup>-</sup>-ионов в равновесном растворе

титровали 0,1н раствором NaOH по метиловому красному. По эквивалентному количеству титранта рассчитывали ПОЕ аминогрупп в мг-экв на грамм сорбента.

ПОЕ по карбоксильным группам определяли в  $H^+$ -форме сорбента в статических условиях. Полимер выдерживали в 0,1н растворе NaOH в течение 7 суток. Аликвотную часть фильтрата титровали 0,1н HCl в присутствии метилового красного и рассчитывали содержание карбоксильных групп (мг-экв/г).

Равновесные, кинетические и динамические параметры сорбции МК исследовали спектрофотометрическим методом, основанном на способности МК поглощать ультрафиолетовый свет с максимумом поглощения при  $\lambda = 291$  нм. Для определения равновесной концентрации использовали предварительно построенные калибровочные кривые  $D_{291\text{нм}} = f(C)$ , которые носили линейный характер вплоть до  $C = 0.04$  ммоль/л.

Сорбционную емкость сорбентов по МК находили по формуле:

$$m = \frac{(C - C_{равн}) \cdot V}{m_n} \cdot 1000, \text{ мкмоль/г}$$

где:  $C, C_{равн}$  – начальная и равновесная концентрации МК соответственно, мкмоль·мл<sup>-1</sup>;  $V$  – объем раствора, мл;  $m_n$  – масса навески сорбента, г.

Математическую обработку экспериментальных данных по кинетике межмолекулярного взаимодействия МК с сорбентами осуществляли с использованием двух кинетических моделей:

### 1. Модель Бойда.

Гомогенная модель Бойда чаще всего применяется для обработки кинетических экспериментальных данных при внутридиффузионной кинетике сорбции.

$$\bar{D} = 0,087tg^2 \beta R^2,$$

где:  $\bar{D}$  – коэффициент диффузии, см<sup>2</sup>/с;  $R$  – радиус зерна ионита в набухшем состоянии, мкм;  $\beta$  – угол наклона линейного участка зависимости  $F = f(t^{1/2})$ ,  $F$  – степень достижения равновесия за время  $t$ .

Среднее время сорбции ( $\bar{t}_{cp}$ , мин) рассчитывалось следующим образом:

$$\bar{t} = \int_0^1 t dF$$



В случае внутридиффузионной кинетики в сферическое зерно сорбента:

$$\bar{t}_{cp} = \frac{R^2}{15D}$$

## 2. Модель «оболочка-ядро».

Кинетические параметры сорбции рассчитывали также по модели «оболочка - ядро», которая учитывает сорбцию целевого компонента в ограниченном слое сорбента.

$$F = \frac{1}{L} \left[ \frac{6}{3 - \frac{L}{R} \left( 3 - \frac{L}{R} \right)} \right] \sqrt{\frac{Dt}{\pi}}$$

где: L – толщина сорбционного слоя «оболочки», мкм; R – радиус зерна ионита в набухом состоянии, мкм;  $\bar{t}$  – среднее время диффузии.

Среднее время диффузии вычислялось по формуле:

$$\bar{t} = L^2(1 + 3\rho + 6\rho^2 + 5\rho^3)/15\bar{D}(1 + \rho + \rho^2)$$

где:  $\rho$  – относительный радиус несорбирующего «ядра», который вычисляется по формуле:

$$\rho = \frac{R - L}{R}$$

Толщина сорбционного слоя, L, была определена экспериментально как средний радиус частиц сорбента, при котором реализуется максимальная сорбция. При измельчении и последующем просеивании, а так же суспензионным осаждением получали фракции частиц сорбента: 8÷24 мкм; 25÷ 60 мкм; 71÷80 мкм; 80÷100 мкм; 100÷160 мкм; 160÷315 мкм; 315÷400 мкм; 400÷500 мкм; 500÷800 мкм. Далее проводился эксперимент по равновесию сорбции МК и находилась зависимость сорбционной емкости от среднего радиуса частиц каждой фракции. Средняя величина радиуса зерен, при котором достигалась максимальная величина сорбционной емкости, принималась за толщину сорбционного слоя L.

Для исследования специфичности сорбции рассчитывали термодинамические функции.

Свободную энергию сорбции,  $\Delta G$  (Дж/моль), рассчитывали по уравнению:

$$\Delta G = - RT \ln \Gamma,$$

где:  $R$  – универсальная газовая постоянная ( $R=8,3 \text{ Дж}\cdot^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$ );  $T$  – температура,  $K$ ;  $\Gamma$  – интегральный коэффициент распределения.

Энтальпию сорбции,  $\Delta H$  ( $\text{Дж}\cdot\text{моль}^{-1}$ ), рассчитывали по значениям коэффициентов распределения, полученных при двух температурах (293 К и 310 К):

$$\Delta H = -R \frac{\ln \Gamma_2 - \ln \Gamma_1}{1/T_2 - 1/T_1},$$

где:  $\Gamma_1$  и  $\Gamma_2$  – интегральные коэффициенты распределения соответственно при  $T_1=293 \text{ К}$  и  $T_2=310 \text{ К}$ .

Величину  $\Gamma$  находили графическим способом, интегрируя график зависимости  $\Gamma_i = f(\gamma)$ , где  $\gamma$  – степень насыщения сорбента сорбтивом.  $\gamma$  представляет собой отношение величины максимальной сорбционной емкости в заданных условиях сорбции к величине емкости в  $i$ -той точке равновесной изотермы.

Изменение энтропии при сорбции,  $\Delta S$  ( $\text{Дж}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$ ), определяли следующим образом:

$$T\Delta S = \Delta H - \Delta G.$$

Динамику взаимодействия МК с полимерными сорбентами исследовали на лабораторных колонках с различным отношением высоты к диаметру. По данным экспериментов строились кривые в координатах:

$$C = f(V),$$

где:  $C$  – концентрация мочевой кислоты в элюате, ммоль/л,  $V$  – объем элюата, мл.

При работе с сывороткой крови в динамических условиях рассчитывали процент удаления МК из сыворотки. Аналогичные расчеты проводились и для других компонентов сыворотки крови.

### **Результаты и их обсуждение.**

Исследование межмолекулярных взаимодействий МК с сорбентами природного и синтетического происхождения.

Задачей первого этапа работы был скрининг сорбентов, обладающих сорбционной емкостью по отношению к МК. Кроме сорбентов природного происхождения был изучен ряд полимерных синтетических сорбентов с различной молекулярной структурой. Это

позволило не только исследовать селективность сорбции, но и установить природу межмолекулярных взаимодействий МК в сорбционных системах.

Табл. 1. Сорбция МК из перитонеальной жидкости.

<i>Сорбент</i>	<i>Структурные характеристики матрицы сорбента</i>	<i>Сорбционная емкость t, мкмоль/г</i>
БДМ-18 (H <sup>+</sup> )	Карбоксильный катионит на основе метакриловой кислоты и ДМЭГ	1,7
СР (H <sup>+</sup> )	Фосфорнокислый катионит на основе целлюлозы	4,7
КМЦ (Na <sup>+</sup> )	Карбоксильный катионит на основе целлюлозы	1,7
ЧАО ХАН	Четвертичное аммониевое основание модифицированного хитина, полисахарид	1,2
DEAE (OH <sup>-</sup> )	Аниониты на основе целлюлозы	1,4
TEAE (OH <sup>-</sup> )		1,3
AB-17-40П(OH <sup>-</sup> )	Аниониты на основе стирола и дивинилбензола, синтезированные методом радикальной сополимеризации	46,6
AB-18 (OH <sup>-</sup> )		57,6
AB-22 (OH <sup>-</sup> )		56,9
ЭДЭ-10П (OH <sup>-</sup> )	Анионит на основе полиэтиленполиамин и эпихлоргидрина, синтезирован методом поликонденсации	37,9
АРА-12П (OH <sup>-</sup> )	Анионит на основе дивинилбензола, синтезирован методом поликонденсации	30,95

В табл.1 представлены сорбенты и их ионные формы, на которых наблюдалась сорбция МК. Природные сорбенты обладали низкими величинами значений сорбционных емкостей. Значительные величины сорбционных емкостей наблюдалась на полимерных анионитах на основе стирола и дивинилбензола, синтезированных методом радикальной сополимеризации (AB-17-40П, AB-18, AB-22), а также на анионитах, синтезированных методом поликонденсации (АРА-12П, ЭДЕ-10П).

МК также сорбировалась из перитонеальной жидкости карбоксильным катионитом БДМ-18. Эти результаты дали основание предполагать, что МК преимущественно ведет себя как органический анион.

Для детальной интерпретации природы межмолекулярных взаимодействий МК с сорбентами было проведено систематическое изучение изотерм сорбции МК из водных однокомпонентных растворов, а также в присутствии конкурирующего иона.

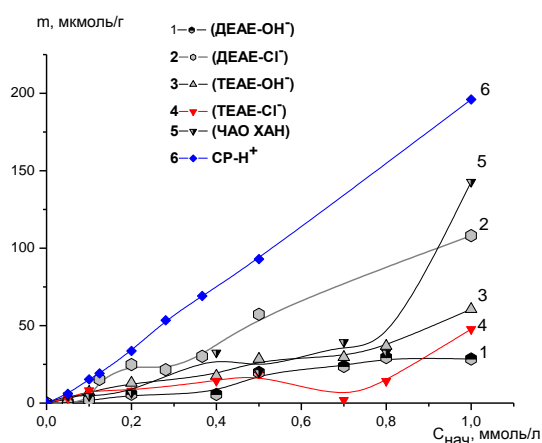


Рис. 2. Изотермы сорбции МК на природных сорбентах из водного раствора в отсутствие конкурирующего иона.

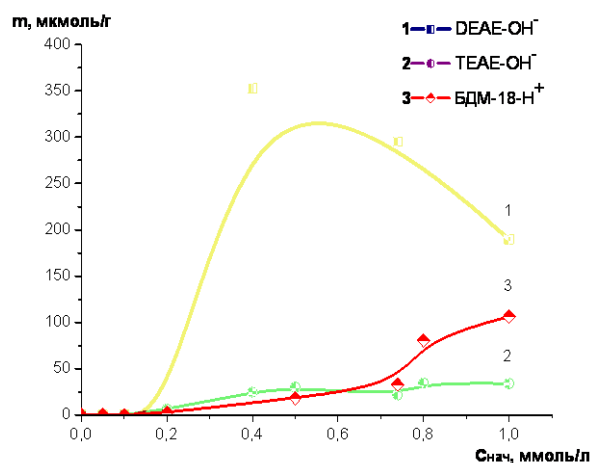


Рис. 3. Изотермы сорбции МК на природных сорбентах из водного раствора, содержащего 0.9% NaCl.

На рис.2 представлены изотермы сорбции МК из водных однокомпонентных растворов на сорбентах природного происхождения (целлюлоза, вискоза и хитозан). Увеличение сорбционной емкости при переходе от анионита TEAE (Cl<sup>-</sup>) к аниониту DEAE (Cl<sup>-</sup>), то есть при уменьшении содержания этильного радикала в фиксированных ионообменных группах сорбентов, и соответственно, при увеличении их основных и гидрофильных свойств также свидетельствует о том, что МК в большей степени проявляет свойства органического аниона. Кроме того, ярко выраженные гидрофильные свойства сорбентов на основе целлюлозы и хитозана создают условия для образования в сорбционной среде водородных связей. Это предположение подтверждается наличием сорбционной емкости МК на фосфорнокислом катионите CP. Гидрофильная целлюлозная матрица CP и склонность к гидратации фосфатных групп катионита способствуют сорбции МК за счет образования водородных связей в сорбционной среде.

В присутствии 0.9 % NaCl, сорбция МК частично или полностью подавлялась под воздействием конкурентной сорбции хлорид ионов на анионитах, а также понижения степени диссоциации фиксированных групп сорбентов (рис. 3). Отсутствие сорбции на катионите СР, по всей видимости, обусловлено тем, что в присутствии NaCl понижалась гидратация фосфатных групп за счет вытеснения ионов водорода ионами натрия и, следовательно, подавлялось образование водородных связей.

Одновременно с этим, в присутствии 0.9% NaCl наблюдалась сорбционная ёмкость МК на структурно сегрегированном карбоксильном катионите БДМ-18. По всей видимости, в основе связывания МК с БДМ-18, лежат необменные взаимодействия. При этом отсутствие сорбции на катионите БДМ-18 из водного раствора без NaCl подтверждало предположение о реализации анионного обмена в сорбционных средах с участием МК.

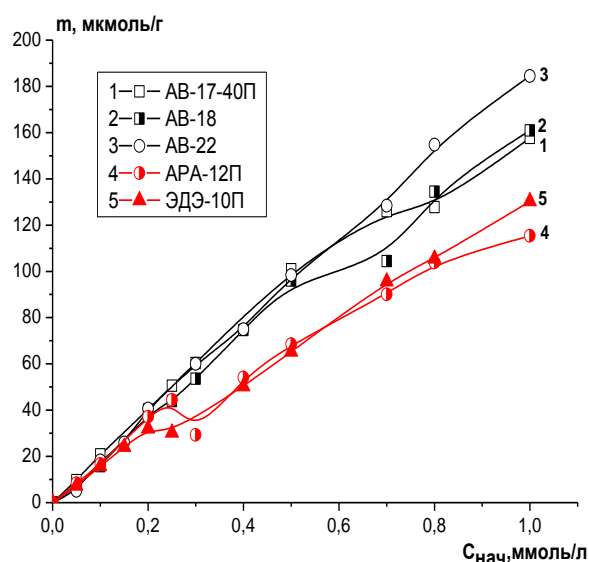


Рис. 4. Изотермы сорбции МК из водного раствора на синтетических анионитах из водного раствора в отсутствие конкурирующего иона.

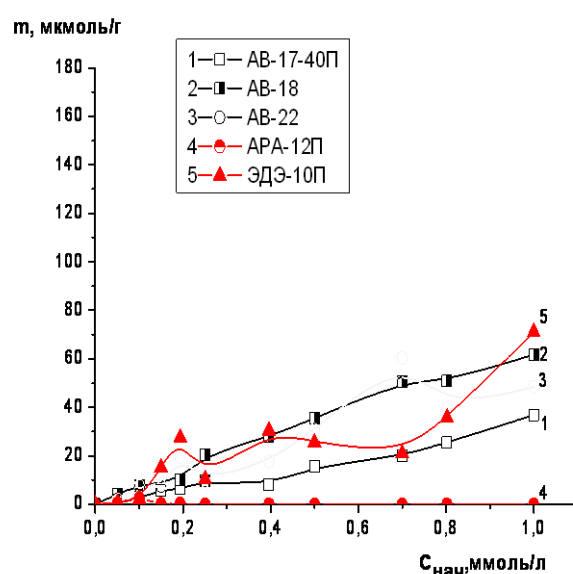


Рис. 5. Изотермы сорбции МК на синтетических анионитах из водного раствора, содержащего 0.9% NaCl.

Для сорбентов группы АВ, получаемых методом радикальной сополимеризации, характерна структурная сегрегация матрицы с неравномерным распределением в ней участков макро и микропор и, соответственно, термодинамически неравноценных сорбционных центров. Поэтому наряду с ионообменными взаимодействиями вероятны полифункциональные взаимодействия этих сорбентов с МК. Аниониты, синтезированные

методом поликонденсации (АРА-12П, ЭДЕ-10П), обладают структурно упорядоченной матрицей с высокой вероятностью равномерно распределенных в ней термодинамически равноценных анионообменных центров. Для этих сорбентов также характерны полифункциональные взаимодействия, однако ионный обмен является фактором, определяющим сорбцию. Это следует из факта подавления сорбции МК при введении в сорбционную среду 0.9% NaCl (рис.4, 5).

В присутствии 0.9% NaCl наблюдалось образование ступенчатых изотерм, которые при значениях концентраций МК в растворе, близких к физиологическим значениям, имели вид выпуклых изотерм (рис. 5). Это свидетельствует о том, что для этих сорбентов вероятно послойное связывание сорбтива с сорбентом, чему могут способствовать необменные взаимодействия в среде.

Таким образом, систематическое исследование селективной сорбции МК на известных типах сорбентов позволило интерпретировать природу межмолекулярных взаимодействий уремического токсина с полимерными сорбентами. На основании полученных результатов был произведен выбор функциональных мономеров для синтеза полимерных сорбентов с молекулярными отпечатками МК.

#### Синтез сорбентов с молекулярными отпечатками МК.

Метод получения сорбентов с молекулярными отпечатками (МИПов) включает три основные стадии. Первая стадия состоит в создании предполимеризационного комплекса между целевым объектом, выполняющим роль шаблона, и функциональным мономером путем ковалентных или нековалентных взаимодействий их функциональных групп. На следующей стадии в присутствии сшивающего агента осуществляется полимеризация, при которой комплексы мономеров с шаблонами фиксируются в определенных позициях полимерной сетки. На заключительной стадии синтеза МИПов при удалении молекул-шаблонов путем экстракции органическим растворителем или разрушения связей шаблона с мономерами в полимере образуются полости или отпечатки, комплементарные шаблонным молекулам по размеру, форме, и функциональности, и сохраняющие «молекулярную память» о них. В результате в полимерной сетке формируются адсорбционные центры, способные к повторному высокоспецифичному взаимодействию с шаблоном или его структурным аналогом, и к высокоселективному извлечению молекул-

мишеней из многокомпонентных растворов. Образцы молекулярно импринтированных МК сорбентов были синтезированы в лаборатории гидрофильных полимеров ИВС РАН (зав. лаб. – член-корр. РАН, проф. Панарин Е.Ф.).

Первым этапом работы по созданию новых типов молекулярно импринтированных сорбентов был синтез сорбентов на основе диметиламиноэтилметакрилата (ДМАЭМ) и ДМЭГ без введения МК в полимеризационную среду.

Табл.2. Характеристики сорбентов, молекулярно импринтированных молекулами МК.

Сорбент	Способ введения МК/ растворитель	ПОЕ <sub>N<sup>+</sup></sub> , мг-экв/г	ПОЕ <sub>COO<sup>-</sup></sub> , мг-экв/г	Выход, масс %	K <sub>n</sub>	ρ, г/ см <sup>3</sup>
МК-МИП-1 (0,08)	МК – тетраборат натрия / вода-этанол.	3,3	1,7	85	1,7	0,68
МК-МИП-2 (0,08)	МК - карбонат лития / вода-этанол.	3,1	1,5	85	1,5	0,53
МК-МИП-3-16	диаллиламин – МК (1:1) / вода-этанол.	4,4	–	<30	2,5	0,37
МК-МИП-4-16	диаллиламин – МК (1:1)/ глицерин	2,6	0,4	<30	1,7	0,6
МК-МИП-5-7	этилендиамин - МК/ глицерин	-	-	93	1,1	0,53
МК-МИП-6-16	диэтил амин – МК/ глицерин	-	-	84	1,05	0,56
МК-МИП-7-16	диэтил амин – МК/ глицерин	-	-	84	1.2	0.47

Далее были синтезированы образцы сорбентов с введением МК в качестве молекулярных шаблонов (табл. 2). Затем была проведена оптимизация метода получения сорбентов с молекулярными отпечатками МК, направленная на увеличение количества молекул МК, введенной в полимеризационную среду. В результате модификации метода (исключение

ДМАЭМ из синтеза МИП) был получен молекулярный сорбент МК-МИП-7-16 на основе ДМЭГ. Сорбент был получен в виде шарообразных гранул с большим выходом (84%), обладал механической прочностью и незначительной набухаемостью. Это соответствует требованиям, предъявляемым к гемо- и плазмосорбентам, а также к препаративным динамическим процессам сорбции. Было показано, что из всех синтезированных сорбентов МК-МИП-7-16 обладал наибольшей сорбционной емкостью при извлечении МК из перитонеальной жидкости. Поэтому дальнейшие эксперименты по исследованию равновесия, кинетики и динамики сорбции МК были проведены на МК-МИП-7-16.

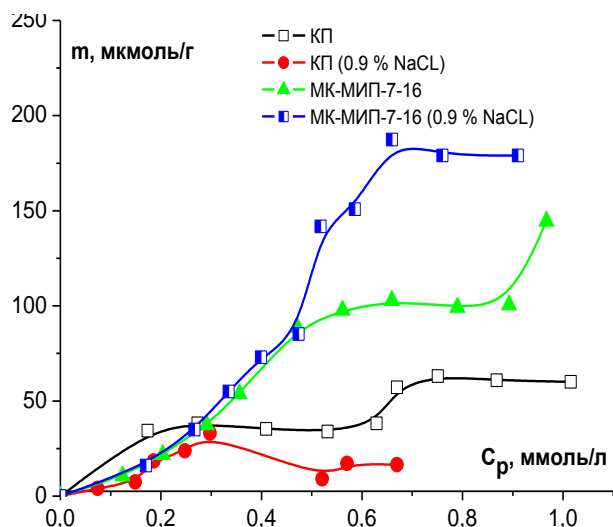
Исследование механизмов распределения МК в полимерной импринтированной матрице.

Следующим этапом работы было доказательство присутствия в матрице сорбента комплементарных полостей, которые способны специфично связывать МК. С этой целью были изучены равновесные параметры сорбции МК с молекулярно импринтированным сорбентом МК-МИП-7-16 и с контрольным полимером (КП), в сетчатую матрицу которого при синтезе не вводились молекулы МК. Для детальной интерпретации природы межмолекулярных взаимодействий были изучены изотермы сорбции МК в различных физико-химических условиях сорбции.

При  $T=293$  К сорбция МК осуществлялась в широком диапазоне концентраций, причем из водного однокомпонентного раствора сорбция реализовалась как на МК-МИП-7-16, так и на КП (рис. 6а). Величины сорбционных емкостей при взаимодействии МК с МК-МИП-7-16 значительно превышали значения сорбционных емкостей МК на КП, особенно в области физиологических концентраций МК ( $>300$  мкмоль/л). Это свидетельствует о том, что МК способна вступать как и в неспецифические взаимодействия с сорбентом, так и в специфические взаимодействия (сорбция по комплементарным полостям). При введении в систему конкурирующего иона тенденция не менялась: в области физиологических концентраций значения емкости при сорбции МК на МК-МИП-7-16 превышали емкости сорбции МК на КП.



а)  $T=293\text{ K}$



б)  $T=310\text{ K}$

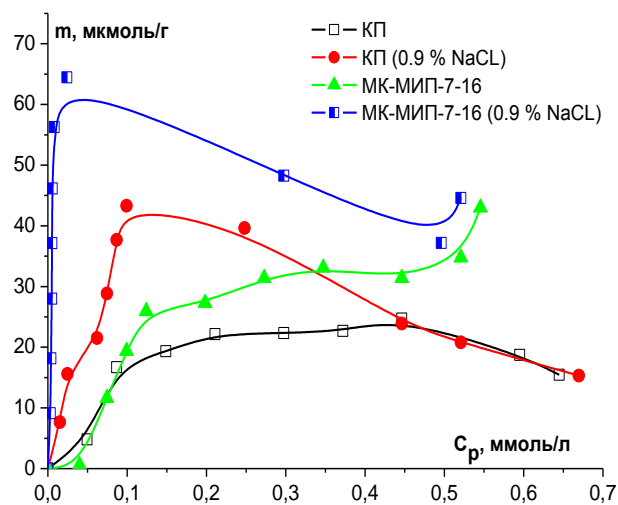


Рис. 6. Изотермы равновесной сорбции МК из водного раствора на настроенном сшитом полимере МК-МИП-7-16 и КП (а -  $T=293\text{ K}$ ; б -  $T=310\text{ K}$ ).

При  $T = 310\text{ K}$  как из водного однокомпонентного раствора МК, так и в присутствии конкурирующего иона сорбция также наиболее полно осуществлялась на импринтированном сорбенте (рис. 6б). Это свидетельствовало об увеличении специфичности сорбции МК МИПом.

Для исследования специфичности сорбции было изучено также равновесие сорбции ксантина (2,6 -диоксипурин) на импринтированном сорбенте МК-МИП-7-16 и КП. Ксантин является наиболее близким структурным аналогом МК и ее предшественником в схеме биосинтеза пуриновых оснований.

На рис. 7 (а, б) представлены изотермы сорбции ксантина. Значения сорбционных емкостей при сорбции ксантина в несколько раз ниже значений сорбционных емкостей при сорбции МК как на КП, так и на МК-МИП-7-16. Более того, на КП сорбция ксантина реализуется более полно, чем на МК-МИП-7-16. Отсюда следует, что ксантин может вступать в те же неспецифические взаимодействия, что и МК, а МК сорбируется на МК-МИП-7-16 с высокой специфичностью.

а) T=293 К

б) T=310 К

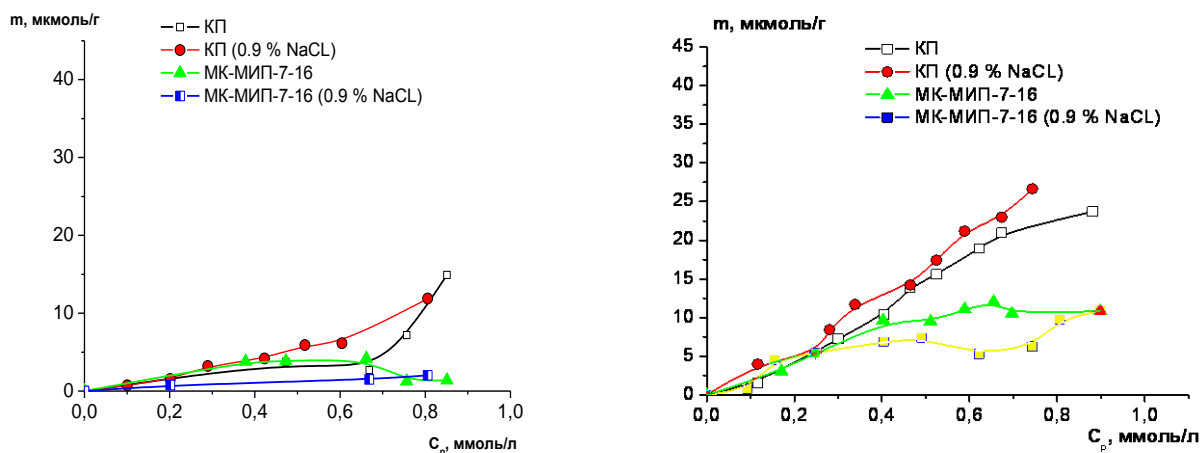


Рис. 7. Изотермы равновесной сорбции ксантина из водного раствора на настроенном сшитом полимере МК-МИП-7-16 и КП (а - T=293 К; б - T=310 К).

Детальная интерпретация природы межмолекулярных взаимодействий МК с импринтированным и неимпринтированным сорбентами осуществлялась на основании анализа термодинамических функций сорбции. Как видно из табл. 3, независимо от физико-химических условий, сорбция МК неимпринтированным КП протекала как эндотермический энтропийно контролируемый процесс. Это указывало на превалирование неспецифического связывания МК с сорбентом.

При сорбции МК импринтированным сорбентом из водного раствора в отсутствие конкурирующего иона и из многокомпонентного перитонеального диализного раствора протекал экзотермический энтальпийно контролируемый процесс (табл. 3). МК-МИП-7-16 является молекулярным, не содержащим ионогенных групп сорбентом. Полученный результат свидетельствовал о вкладе молекулярных, в первую очередь, водородных взаимодействий в сорбцию МК. Данный факт подтвердил опыт по равновесию сорбции МК на МК-МИП-7-16 в присутствии вещества, способного подавлять водородную связь. Эксперимент был проведен в 0.1М растворе мочевины. Сорбции МК в этих условиях не наблюдалось.

Кроме того, формирование предполимеризационного комплекса «шаблонные молекулы МК – функциональный мономер» также осуществлялось в результате реализации водородных связей между МК и мономером. Таким образом, изменение знака

энтальпии сорбции МК на МК-МИП-7-16 по сравнению с КП свидетельствовало о возрастании вклада специфического связывания МК с импринтированным сорбентом.

Табл. 3. Термодинамические функции сорбции МК и ксантина контрольным и импринтированным сорбентами.

	<b>293 К</b>				<b>310 К</b>			
	$\Gamma_1$	$\Delta G,$ кДж/моль	$\Delta H,$ кДж/моль	$T\Delta S,$ кДж/ моль	$\Gamma_2$	$\Delta G,$ кДж/моль	$\Delta H,$ кДж/моль	$T\Delta S,$ кДж/моль
<b>МОЧЕВАЯ КИСЛОТА</b>								
<b>Однокомпонентный водный раствор</b>								
<b>КП</b>	37.3	- 8.8	30.2	38.9	73.4	- 10.4	30.2	40.6
<b>МК-МИП-7-16</b>	72.4	- 10.4	- 18.2	- 7.8	47.8	- 9.9	- 18.	- 8.2
<b>Изотонический раствор (0.9 % NaCl)</b>								
<b>КП</b>	15.6	- 6.7	108.7	115.4	187.9	- 12.7	108.7	121.5
<b>МК-МИП-7-16</b>	36.5	- 8.7	176.2	184.9	1940.4	- 18.4	176.2	194.6
<b>Перитонеальный диализный раствор</b>								
<b>КП</b>	-	-	-	-	10	- 5.9	102.1	108
<b>МК-МИП-7-16</b>	30	- 8.3	- 62.6	- 54.3	7.3	- 5.1	- 62.6	- 57.4
<b>КСАНТИН</b>								
<b>Однокомпонентный водный раствор</b>								
<b>КП</b>	39.68	- 8.9	- 28.3	-19.3	21	- 7.8	-28.3	- 20.5
<b>МК-МИП-7-16</b>	1.43	-2.05	-8.6	-6.6	12	- 6.4	45.3	51.6
<b>Изотонический раствор (0.9 % NaCl)</b>								
<b>КП</b>	13.67	-3.4	22.7	29.1	22.9	- 8.1	22.7	30.8
<b>МК-МИП-7-16</b>	4. 35	- 3.6	45.3	48.8	11.5	- 6.3	108.4	114.7

*Кинетика взаимодействия МК с импринтированным сорбентом МК-МИП-7-16.*

Изучение кинетики сорбции позволяет определить механизм диффузии сорбтива в фазу сорбента, а также влияние физико-химических факторов сорбционной среды на гетерогенный массоперенос. Анализ и математическая обработка полученных экспериментальных данных осуществлялись по кинетическим кривым зависимости

степени насыщения сорбента сорбатом от времени сорбции. Этот анализ позволил определить основные кинетические параметры сорбции: эффективный коэффициент диффузии и среднее время диффузии сорбтива в фазу сорбента, необходимые для прогнозирования поведения исследуемой сорбционной системы в условиях динамической сорбции. Тип кинетики сорбции устанавливался с помощью анализа кинетических кривых  $F=f(\sqrt{t})$ .

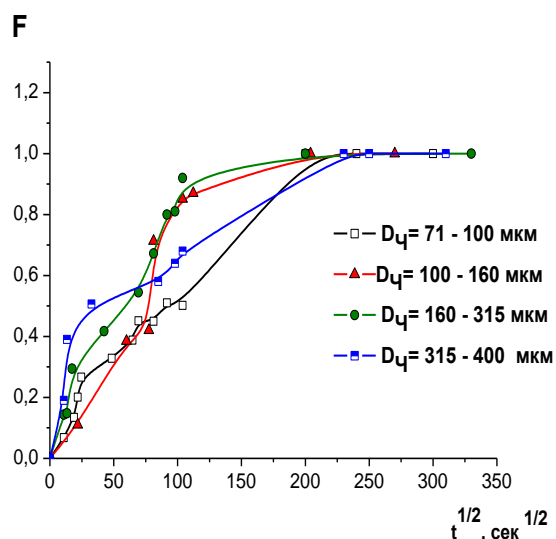


Рис. 8. Кинетические кривые сорбции МК на импринтированном сорбенте МК-МИП-7-16 на частицах различного размера. Сорбция из водного однокомпонентного раствора МК.

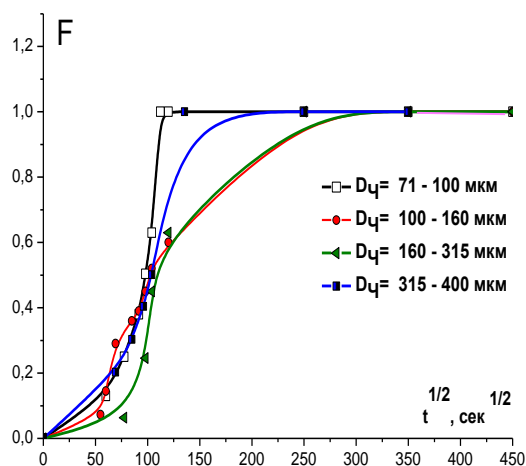


Рис. 9. Кинетические кривые сорбции МК на импринтированном сорбенте МК-МИП-7-16 на частицах различного размера. Сорбция из многокомпонентной перитонеальной жидкости.

В условиях сорбции из водного однокомпонентного раствора МК кинетические кривые свидетельствовали о внутридиффузионном механизме массопереноса МК в фазу сорбента (рис. 8). Кинетические параметры мало зависели от размера частиц, что указывает на равноценное влияние обменного и необменного связывания МК с комплементарными полостями импринтированного сорбента. При отсутствии конкурирующих ионов замедлялся массоперенос МК к специфичным сайтам связывания (молекулярным отпечаткам).

Кинетика сорбции МК импринтированным сорбентом из многокомпонентной перитонеальной жидкости также незначительно зависела от размера частиц сорбента (рис. 9). Основные кинетические параметры были обчислены с помощью 2-х кинетических моделей: модели Бойда и модели «оболочка - ядро» (табл. 4).

Табл. 4. Основные кинетические параметры сорбции МК.

D <sub>частиц ср.</sub> , МКМ	tgα	МОДЕЛЬ БОЙДА		МОДЕЛЬ «ОБОЛОЧКА- ЯДРО»	
		$\bar{t}$ , МИН	$\bar{D} \times 10^{11}$ , см <sup>2</sup> ×сек <sup>-1</sup>	$\bar{t}$ , МИН	$\bar{D} \times 10^{11}$ , см <sup>2</sup> ×сек <sup>-1</sup>
<i>Однокомпонентный раствор МК</i>					
71-100	0.007	406	9.1	275.4	5.4
100-160	0.006	193	14	131	9.9
160-315	0.013	123	15.8	86	13.7
315-400	0.03	276	13.5	193	6.5
<i>Перитонеальный диализный раствор</i>					
71-100	0.003	160	8.5	112	9.3
100-160	0.003	400	4.5	272	4.0
160-315	0.002	410	5.5	278	4.1
315-400	0.003	169	9.8	118	10.1

где: tgα – тангенс угла наклона начального участка кинетических кривых  $F=f(t^{1/2})$ ;

$\bar{D}$  - эффективный коэффициент диффузии;  $\bar{t}$  - среднее время диффузии.

Одинаковый порядок коэффициентов диффузии, рассчитанных по двум различным кинетическим моделям, свидетельствовал об узком распределении комплементарных к МК полостей преимущественно на поверхности зерна сорбента МК-МИП-7-16.

Межмолекулярные взаимодействия МК с импринтированным сорбентом МК-МИП-7-16 в динамических условиях.

Следующим этапом работы было изучение динамики сорбции МК из модельного раствора и из перитонеальной жидкости, а также непосредственно из сыворотки крови больных с уровнем МК выше нормы. В качестве модельных растворов использовались перитонеальная жидкость, получаемая от больных с хронической почечной недостаточностью, а также раствор МК в присутствии 0.9% NaCl.

Поскольку при сорбции МК из модельного раствора и из перитонеальной жидкости было показано, что наибольшее удаление МК из перитонеальной жидкости наблюдалось на колонке  $D \times H = 10 \times 80$  мм со скоростью подвижной фазы  $W = 0.4$  мл/мин, то дальнейшие эксперименты по динамике сорбции МК из сыворотки крови в клинических условиях проводились в этих условиях.

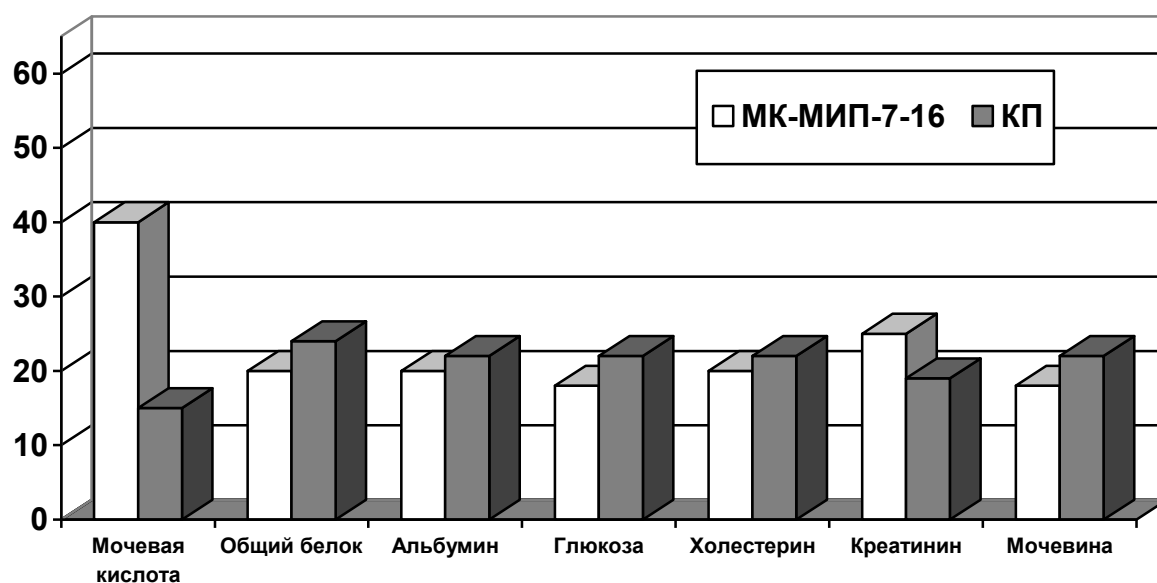


Рис. 10. Извлечение (%) МК и основных компонентов сыворотки крови на колонке  $D \times H = 10 \times 80$  мм как на КП, так и на МК-МИП-7-16.

Эксперименты по сорбции МК из сыворотки крови были проведены во Всероссийском центре экстренной и радиационной медицины МЧС им. Никифорова (г. С.-Петербург). Была отобрана сыворотка крови с повышенным содержанием МК (509 мкмоль/л). Скорость сорбции – десорбции  $W = 0.4$  мл/мин. Содержание МК и других жизненно важных компонентов сыворотки крови фиксировались на входе и на выходе из колонки.

Из гистограммы (рис. 10) следует, что степень извлечения МК на импринтированном сорбенте намного превышает сорбцию МК на КП. Одновременно с этим наблюдалась сорбция и других компонентов крови, но процент извлечения МК импринтированным сорбентом выше процента извлечения других компонентов (незначительно сорбируются белки, глюкоза, холестерин, креатинин, мочевина). Это подтверждает высокую избирательность сорбции МК сорбентом МК-МИП-7-16 и свидетельствует о высокой

эффективности метода молекулярного импринтинга в получении высокоспецифичных сорбентов.

### **Выводы**

1. Исследование сорбции МК на известных природных и синтетических полимерных сорбентах позволило интерпретировать природу межмолекулярных взаимодействий уремического токсина с полимерными сорбентами. Показано, что межмолекулярное взаимодействие МК с матрицами сетчатых полимеров носит полифункциональный характер, при этом МК проявляет свойства органического аниона, а также способна образовывать водородные связи с полимерными сорбентами.
2. Получены молекулярно импринтированные сорбенты на основе ДМАЭМ и ДМЭГ. Проведена модификация и оптимизация получения молекулярного сорбента на основе ДМЭГ, импринтированного МК (МК-МИП-7-16).
3. Сравнительный анализ равновесия и термодинамических функций сорбции МК и ксантина на МК-МИП-7-16 и КП показал преобладание вклада специфического связывания сорбата в импринтированной матрице.
4. Исследование кинетики сорбции МК показало, что в результате синтеза МК-МИП-7-16 было достигнуто узкое распределение комплементарных к молекулам МК полостей в импринтированной сетке. Это способствовало росту вклада специфического межмолекулярного взаимодействия МК с оптимизированным сорбентом.
5. Исследование динамики сорбции МК из сыворотки крови в клинических условиях показало высокую специфичность сорбции МК МК-МИП-7-16, причем сорбция МК из сыворотки на импринтированной матрице превышала более чем в 2 раза сорбцию на КП. Полученные в работе экспериментальные данные являются основой для разработки плазмосорбционного метода лечения гиперурикемии и подагры.

**Список опубликованных работ по теме диссертации.** Основные результаты диссертации изложены в работах:

1. *Лецинская А.П., Полякова И.В., Писарев О.А.* Исследование сорбции мочевой кислоты на полимерных сорбентах с различной молекулярной структурой // Тезисы докладов II

- Санкт-Петербургской конференции молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах». - Санкт-Петербург, 2006. - С.102.
2. *Лецинская А.П., Полякова И.В., Писарев О.А.* Селективное удаление мочевой кислоты из перитонеальной жидкости // Материалы X Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования в технических университетах». - Санкт-Петербург, 2006. - С.379.
  3. *Полякова И.В., Лецинская А.П., Писарев О.А., Хирманов В.Н., Шостка Г.Д.* Роль сорбентов в удалении уремических токсинов // Сб. статей «Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья». - Белгород, 2006. - С.199-204.
  4. *Irina V. Polykova, Anastasia P. Leshchinskaya, Oleg A. Pisarev.* Elaboration of Hemosorption Method of Eliminating Uric Acid for Correction of Hyperuricemia // 11 International Symposium on Preparative and Industrial Chromatography and Allied Techniques «SPICA 2006». - Innsbruk, 2006. - P.32-33.
  5. *Лецинская А.П., Полякова И.В., Писарев О.А.* Исследование селективного связывания мочевой кислоты полимерными сорбентами различной молекулярной структуры // 3-я международная научно-практическая школа-конференция «Медбиотек» «Актуальные вопросы инновационной деятельности в биологии и медицине». - Москва, 2006. - С.58.
  6. *Полякова И.В., Лецинская А.П., Писарев О.А., Хирманов В.Н., Шостка Г.Д.* Специфика межмолекулярных взаимодействий мочевой кислоты с природными и синтетическими сорбентами // Научно-технические ведомости Санкт-Петербургского государственного политехнического университета. - Санкт-Петербург, 2007. - №2. - С.132-137.
  7. *Лецинская А.П., Писарев О.А.* Специфика межмолекулярных взаимодействий мочевой кислоты с селективными хроматографическими носителями // Материалы Всероссийской Межвузовской научно-технической конференции. СПбГПУ. - Санкт-Петербург. 2007. - С.252.
  8. *Лецинская А.П., Полякова И.В., Писарев О.А.* Сорбция мочевой кислоты природными и синтетическими сорбентами // Сорбционные и хроматографические процессы. Т.7. - 2007. - №6. - С.654-659.



9. Полякова И.В., Лещинская А.П., Писарев О.А. Сорбция мочевой кислоты природными и полимерными сорбентами // Материалы Симпозиума по нанобиотехнологии. - Новороссийск, 2007. - С.34.
10. Лещинская А.П., Писарев О.А. Равновесие сорбции мочевой кислоты полимерными и природными сорбентами // 37 неделя науки СПбГПУ. Материалы Всероссийской Межвузовской научно-технической конференции. СПбГПУ. - С.-Петербург, 2008. - С.214.
11. А.П. Лещинская, И.В. Полякова, А.Р. Грошикова, О.А. Писарев, Е.Ф. Панарин. Синтез и сорбционные свойства сшитых полимерных сорбентов на основе диметиламиноэтилметакрилата и диметакрилата этиленгликоля // Сорбционные и хроматографические процессы. Т.8. - 2008. - №4. – С.694-705.
12. Anastasia P. Leshchinskaya. Influence of uric acid on forming the crosslinked matrix of polymeric sorbents based on dimethylaminoethylmethacrylate and ethyleneglycoldimethacrylate // Тезисы докладов IV Санкт-Петербургской конференции молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах». - С.-Петербург, 2008. – С.116.
13. А.П. Лещинская, И.В. Полякова, А.Р. Грошикова, О.А. Писарев, Е.Ф. Панарин. Синтез и изучение свойств сетчатых полимерных сорбентов для селективной сорбции мочевой кислоты // Сб. статей «Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья». - Белгород, 2008. - С.36-40.
14. Лещинская А.П., Грошикова А.Р., Полякова И.В., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Синтез новых сшитых полимерных сорбентов для селективной сорбции мочевой кислоты // Сб. Фундаментальные исследования и инновации в технических университетах. СПбГПУ. - С.-Петербург, 2008. - С.249.
15. A. R. Groshikova, A. P. Leshchinskaya, I. V. Polyakova, O. A. Pisarev, E. F. Panarin Synthesis and Study of Polymeric Sorbents for Selective Sorption of Uric Acid // 6-th International Symposium “Molecular Order and Mobility in Polymer Systems”. - St. Petersburg, 2008. - P.215.

16. *Лещинская А.П., Грошикова А.Р., Полякова И.В., Писарев О.А., Панарин Е.Ф.* Синтез и изучение свойств полимерных сорбентов, селективно сорбирующих мочевую кислоту // 38 неделя науки СПбГПУ. Материалы Всероссийской Межвузовской научно-технической конференции. СПбГПУ. - С.-Петербург, 2008. - С.61-63.
17. *Е.Ф. Панарин, А.Р. Грошикова, А.П. Лещинская, И.В. Полякова, О.А. Писарев, В.Н. Хирманов.* Создание высокоселективных молекулярно импринтированных полимерных сорбентов для эфферентных методов лечения гиперурикемии и подагры. «Фундаментальные науки – медицине» // Тезисы докладов на конференциях и семинарах по направлениям Программы в 2009 году. – Москва: Слово. - С.220-221.
18. *Panarin E.F., Pisarev O.A, Polyakova I.V., Groshikova A.R., Leschinskaya A.P.* Study of the correlation of the specific and non-specific binding contribution to the uric acid sorption by the crosslinked molecularly imprinted polymers // Modern Problems of Polymer Science. Program and Abstract Book. - Saint-Petersburg, 2009. - P.40.
19. *Лещинская А.П., Грошикова А.Р., Полякова И.В., Писарев О.А., Панарин Е.Ф.* Селективная сорбция мочевой кислоты молекулярно импринтированным сорбентом // Сб. «Фундаментальные исследования и инновации в технических университетах». - С.-Петербург, 2009. - С.65.
20. *Лещинская А.П., Грошикова А.Р., Полякова И.В., Писарев О.А., Панарин Е.Ф.* Исследование механизмов распределения мочевой кислоты в полимерной импринтированной матрице // Материалы международной научно-практической конференции «Формирование технической политики инновационных наукоемких технологий» СПбГПУ. - С.-Петербург, 2009. - С.48.
21. *А. П. Лещинская, А. Р. Грошикова, И.В. Полякова, О. А. Писарев, Е. Ф. Панарин.* Сорбция мочевой кислоты на молекулярно «настроенных» сорбентах // 38 международная научно-практическая конференция «Неделя науки СПбГПУ», материалы докладов. - С.-Петербург, 2010. - С.183-185.
22. *И.В. Полякова, А. Р. Грошикова, А. П. Лещинская, О. А. Писарев, Е. Ф. Панарин.* Влияние условий синтеза на специфичные свойства полимерных сорбентов, импринтированных молекулами мочевой кислоты // Сорбционные и хроматографические процессы. Т.10.- 2010. -№6. - С.952-959.

23. *Лещинская А.П., Полякова И.В., Грошикова А.Р., Писарев О.А., Панарин Е.Ф.* Специфика межмолекулярного взаимодействия мочевого кислоты с импринтированным сорбентом МК-МИП-16 // Тезисы докладов четвертого всероссийского форума студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах». СПбГПУ. - С.-Петербург, 2010. - С.83.
24. *I.V. Polyakova, A.R. Groshikova, N.M. Ezhova, I.S. Garkushina, A.P. Leschinskaya, O.A. Pisarev, E.F. Panarin.* Polymeric sorbents molecularly imprinted for selective sorption of target biologically active substances from multicomponent mixture // The First Bilateral Russian-Chinese Scientific Seminar. - Saint-Petersburg, 2010. - P.26.
25. *Панарин Е.Ф., Грошикова А.Р., Писарев О.А., Полякова И.В., Лещинская А.П., Хирманов В.Н.* «Способ синтеза сетчатого полимерного плазмсорбента, молекулярно импринтированного мочевого кислотой». Заявка № 2010106660 от 24.02.2010. Положительное решение от 18.11.2010.