

R. NOVZOVA¹, N.M. ЖУНУСБЕКОВА², J. MICHALEK¹, M. PRADNY¹

СИНТЕЗ НОВЫХ БИОАКТИВНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ ПОДЛОЖЕК ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

Изучена иммобилизация авидина на гидрогелях поли(2-гидроксиэтилметакрилата). С помощью спектрофотометрического Bradford метода установлено комплексообразование г-поли(2-гидроксиэтилметакрилат) – авидин за счет ковалентных связей. Найдено, что основной вклад в образование ковалентно связанных комплексов вносит природа гидрогелей поли(2-гидроксиэтилметакрилата). Рассчитано количество иммобилизованного авидина. Показано влияние концентрации и температуры на гидролиз поли(2-гидроксиэтилметакрилата) с последующим взаимодействием с авидином.

В последние десятилетия существенный прогресс в области биотехнологии требует разработок подходящих материалов, которые могут использоваться для регенерации и замены поврежденной ткани. Известно, что для адгезии и увеличения роста клеток необходимо присутствие на поверхности подложки биологически активных молекул (белков или сахаридов) [1-2]. Синтетические гидрогели (редкосшитые трехмерные сетки), как известно, обладают большинством требований предъявляемых при создании искусственных тканей, включая биологическую совместимость.

Одним из распространенных методов иммобилизации является адсорбция, которая является простым и недорогим процессом, где сохраняется высокая каталитическая активность полимера и может иметь высокий коммерческий потенциал, чем другие методы. Однако процесс адсорбции имеет и свои минусы, так, например,

некоторые из адсорбированных белков могут вымываться в процессе промывки. Отсюда следует, что иммобилизация путем адсорбции требует наличия особых взаимодействий между биологически активным соединением и матрицей.

Представляемая работа проводилась в Институте Макромолекулярной химии Академии Наук Чешской Республики (АНЧР) (г. Прага), при непосредственном участии в исследованиях и сотрудничестве с чешскими учеными по проекту АНЧР (AS CR 1QS400500558 и MEYS 1M 0021620803).

Целью данной работы является получение новых биоактивных полимерных носителей (подложек трехмерной структуры) методом радикальной полимеризации, подходящих для иммобилизации биологически активных соединений посредством ковалентных связей с дальнейшим практическим применением в области медицины.

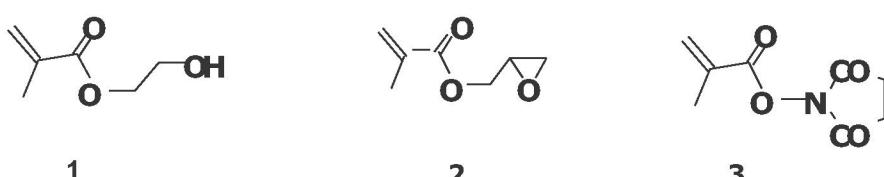


Рис. 1. Химическая структура мономеров: ХЕМА (1), ГМА (2), N-СМА (3)

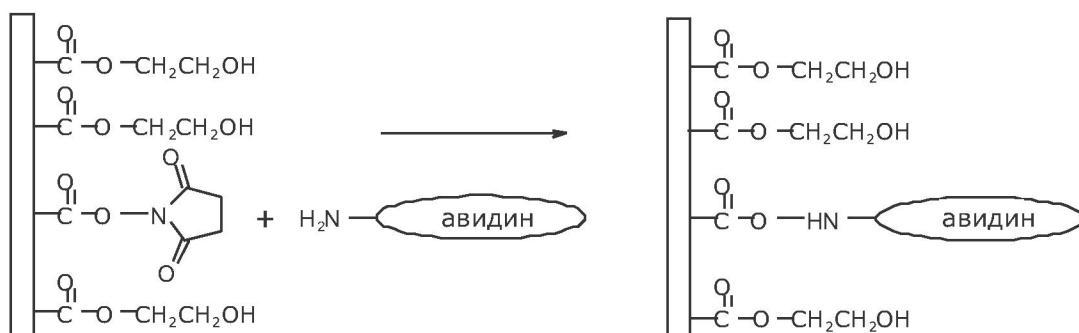


Рис. 2. Схема ковалентной иммобилизации avidина на подложке поли(ХЕМА-ко-Н-СМА)

Экспериментальная часть

Для приготовления полимерных трехмерных структур были отобраны некоторые производные метакриловой кислоты: 2-гидроксиэтилметакрилат (ХЕМА), глицидилметакрилат (ГМА), N-сукцинимидметакрилат (N-СМА) (рисунок 1). Сополимеризация данных соединений ведет к получению гелей с регулируемыми физико-химическими свойствами, такими как гидрофильность, механическая прочность и т.д.

Гидрогели получены методом радикальной полимеризации в присутствии УФ облучения. Синтез гидрогелей 2-гидроксиэтилметакрилата детально описан в работе [3].

Протеин avidin (яичный белок) от «Sigma Chemical Co.» (St Louis, MO), использован без дополнительной очистки. Кератиноциты человека и фибробласты мыши были культивированы на поверхности полимерных подложек. Коэффициент набухания (K_n) гидрогелей определяли гравиметрическим методом. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре «UV/VIS spectroscopy Lambda 35», «Perkin Elmer». pH растворов определяли на pH-150MA «Antex». ИК спектры феофитинов и их комплексов получали на ИК-Фурье спектрометре «Nicolet 5700 FT-IR», «Thermo Electron corporation». Характеристику гидрогелей проводили с помощью метода контактного угла, а также фотоэлектронной спектроскопии (XPS). Гидролиз поли(ХЕМА) осущес-

твляли 6M и 12M NaOH при температуре 60°C–130°C.

Результаты и их обсуждение

Иммобилизация становится одной из важных направлений в биомедицине и биотехнологии. Значительное число биоактивных материалов, таких как лекарственные вещества, белки, растительные и животные клетки, а также микроорганизмы различных классов успешно иммобилизуются на подходящих полимерных подложках.

Конечные продукты иммобилизации могут быть использованы при создании искусственных органов, биосенсоров и биореакторов. в качестве матриц Полимерные микроструктуры привлекают значительное внимание в связи с нетрудоемким процессом их получения в широком ассортименте составов и могут быть модифицированы для иммобилизации биомолекул путем включения большого ряда дополнительных лигандов.

Благодаря биосовместимости акриловые полимеры рассматривают как подходящие матрицы для иммобилизации ферментов в биомедицинских и биотехнологических целях. Кроме того, благодаря их гидрофильной природе, высокой химической и механической стабильности, а также сопротивляемости к микробному и ферментативному воздействию поли(ХЕМА) является очень удобным и ценным полимером. Известно, что гидрогели ХЕМА способны к сорбции про-

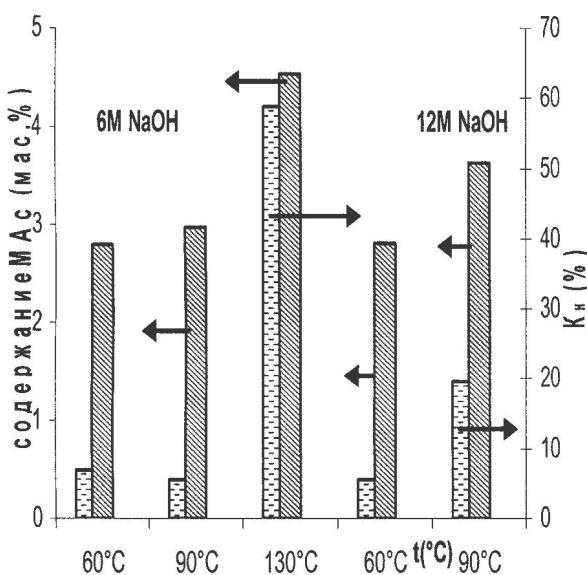


Рис. 3. Зависимость содержания Mac-группы и степени набухания от температуры гидролиза, проведенного в течение 1 ч 6М и 12М NaOH

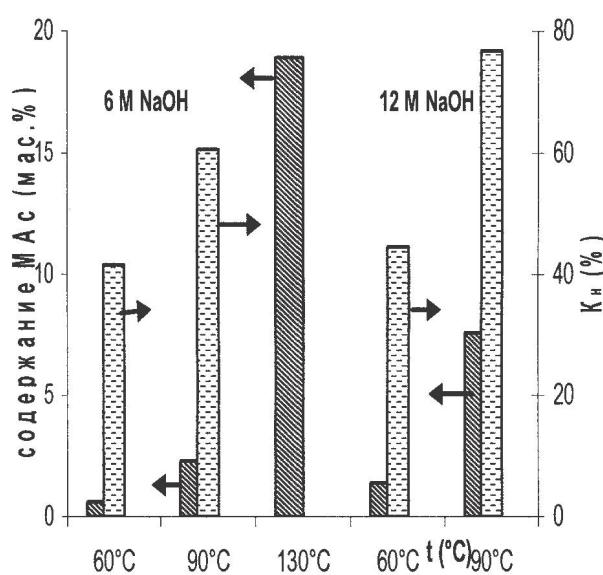


Рис. 4. Зависимость содержания Mac-группы и степени набухания от температуры гидролиза, проведенного в течение 3 ч 6М и 12М NaOH

тейнов за счет неспецифических взаимодействий [4].

Нами использованы модифицированные формы сшитых полимеров ХЕМА, на поверхности которых проведена иммобилизация белка – авидина. В ходе работы модификация исходного гидрогеля ХЕМА осуществлялась 2-способами: 1 введением функциональных групп в полимерную матрицу с образованием поли(ХЕМА-со-ГМА) и поли(ХЕМА-со-N-CMA); 2 введением карбоксильных групп путем полимеризации сополимера ХЕМА-МА с разным исходным соотношением мономеров, а также гидролизом поли(ХЕМА) 6М и 12М NaOH при 60°C–130°C.

С целью образования ковалентных связей между протеином и полимерной подложкой нами синтезированы гидрогели поли(ХЕМА-со-ГМА), а также поли(ХЕМА-со-N-CMA), содержащие в своем составе подходящие функциональные группы (эпокси- и активированные COO-группы), способные вступать во взаимодействие с NH₂-группами авидина (рисунок 2), при этом содержание сомономера варьировалось от 0 до 40 мас.% относительно ХЕМА. В результате, с увеличением количества групп сомономера наблюдалось увеличение гидрофобного характера приготовленных гелей вследствие уменьшения поглощения воды и увеличения значений измерений контактного угла [5].

Как правило, для увеличения числа карбоксильных групп на поверхности полимера необхо-

димо проведение реакции гидролиза, для чего исходные гели поли(ХЕМА) помещали в раствор 6М и 12М NaOH, при этом температура гидролиза варьировалась от 60°C до 130°C и время выдержки от 30 мин до 6 ч. На следующих рисунках представлены результаты гидролиза, проведенного 6М и 12М NaOH при различной температуре и времени выдержки в течение 1ч (рисунок 3) и 3ч (рисунок 4). Как видно, на рисунке 3, увеличение температуры гидролиза в течение 1 ч и концентрации раствора щелочи ведет к росту количества метакриловых групп на поверхности сшитого полимера и коэффициенту набухания гелей.

Однако иная картина наблюдается при гидролизе образцов поли(ХЕМА) проведенного в тех же условиях, но при большем времени выдержки образца в растворе щелочи (3 ч) (рисунок 4). В данном случае, значения коэффициента набухания гелей и количества метакриловых групп на поверхности сшитого полимера принимают более высокие значения, однако, наблюдается ухудшение механических свойств модифицированного геля. Так при температуре гидролиза 130°C проведенного 12М NaOH становится невозможным измерение набухания платины геля, из-за распада на мелкие частицы.

Полученные ИК спектры подтверждают выше изложенные результаты гидролиза, следовательно, увеличение концентрации щелочи и

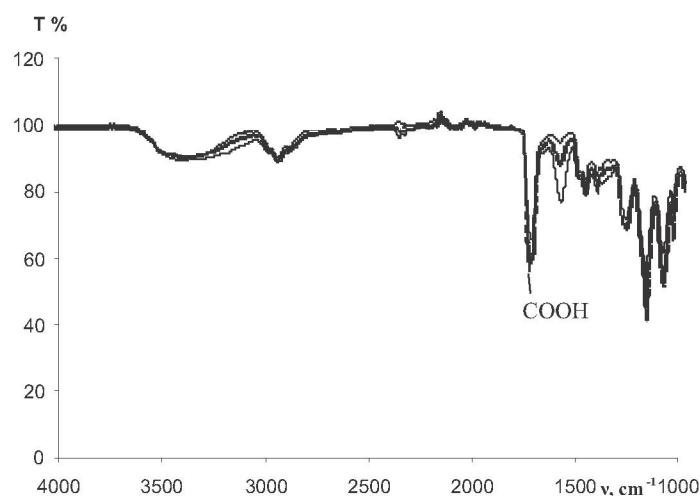


Рис. 5. ИК спектры образцов геля ХЕМА после гидролиза 12М NaOH, при различной температуре

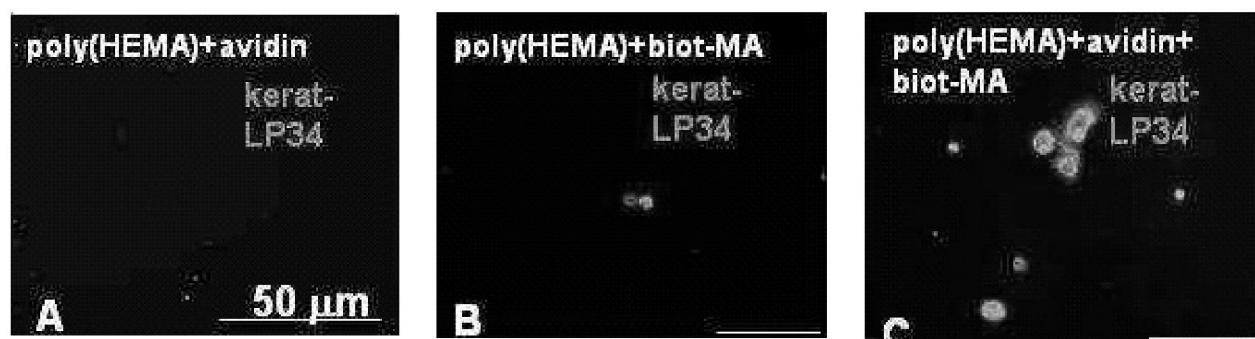


Рис.6. Снимки флуоресцентного микроскопа культивации (наращивания) кератиноцитов на модифицированной поверхности поли(ХЕМА)

времени гидролиза приводит к увеличению карбоксильных групп на поверхности подложки (рисунок 5).

После модификации и характеристики полимерных подложек, была проведена активация функциональных групп полимера с последующей иммобилизацией авидина. Для этого набухшие образцы модифицированного геля помещали в раствор протеина (физиологический раствор концентрации 0,5 mg/ml) и оставляли в течение разного времени. С помощью УФ спектроскопии анализировали надгелевую жидкость после процесса сорбции, определяя содержание белка в растворе при длине волны 595 нм. Показано, что наибольшее количество иммобилизованного авидина наблюдалось в образце модифицированного геля ХЕМА активированного в течение 40 ч.

Следует отметить, что культивация кератиноцитов человека (рисунок 6) показала неплохие результаты на поверхности полимерных подложек модифицированных поли(ХЕМА) с иммобилизованным авидином [6].

Таким образом, синтезированы гидрогели, различного состава, проведена модификация полученных сшитых полимеров с целью улучшения их физико-химических и сорбционных свойств. Иммобилизация авидина достигнута за счет образования электростатических сил и ковалентных связей в зависимости от природы реагирующего сшитого геля. Показано, что модифицированные поли(ХЕМА) с иммобилизованным авидином являются лучшими полимерными подложками с точки зрения механизма культивирования клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Bayramoglu. Poly(2-Hydroxyethylmethacrylate)/Chitosan Dye and Different Metal-Ion-Immobilized Interpenetrating Network Membranes: Preparation and Application in Metal Affinity Chromatography // Journal of Applied Polymer Science. 2003. V. 88. 1843–1853.
2. G. Bayramoglu, Emine Yalcin, M.Yakup Aræsa. Immobilization of urease via adsorption onto L-histidine-Ni(II) complexed poly(HEMA-MAH) microspheres: Preparation and characterization // Process Biochemistry. 2005.V.40. P. 3505–3513.
3. Hobzova R., Zhunusbekova N., Sirc J., Dvorankova B., Smetana K., Pradny M., Michalek J. Methacrylate based hydrogels for tissue engineering // Asia Polymer Association International Conference on Advances in Polymer Science and Technology. New Delhi 28.-31.1.2008. P.1.
4. D. Delmarre, Claude Bied-Charreton. Grafting of cobalt porphyrins in sol-gel matrices: application to the detection of amines // Sensors and Actuators. 2000.V.B. 62. P. 136–142.
5. Hobzova R., Zhunusbekova N. M., Michalek J., Pradny M. Avidin covalently bonded to selected hydrogels and their characterization by optical methods // 47th Microsymposium on Advanced Polymer Materials for Photonics and Electronics. Prague 15.-19.07.2007. Book of Abstracts. PC-19. P. 94.
6. Hobzova R., Zhunusbekova N., Sirc J., Michalek J. Surface modification and characterization of methacrylate polymer networks for tissue engineering // 9th Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society ‘YUCOMAT’. Herceg Novi. 2007. Book of Abstracts. P. 173.

Резюме

Авидиннің поли(2-гидроксигітилметакрилат) гидрогелдерінде иммобілизациялануы зерттелді. Спектрофотометрлік Bradford әдісімен г-поли(2-гидроксигітилметакрилат)-авидин комплексін түзілуі коваленттік байланыстары арқылы көрсетілді. Коваленттік байланысқан комплекстер түзілуіне поли(2-гидроксиметакрилат) гидрогелдері табигатының көп әсер етуі анықталды. Спектрофотометр әдісімен иммобілизацияланған авидиннің мөлшері анықталды. поли(ХЕМА)нің гидролизіне концентрациясының және температурасының жалғасы авидинмен әрекеттесу әсері көрсетілді.

Summary

The immobilization of avidin on the poly(HEMA) hydrogels was studied. The complexformation of g-poly(HEMA)-avidin due to covalent bond was established by the Bradford method of spectrophotometric investigations. It was found that the main contribution to the formation of covalent-bonded complexes makes the nature of poly(HEMA) hydrogels. The amount of immobilized avidin has been calculated. The concentration and temperature influences on g-poly(HEMA) hydrolysis and subsequent reaction with avidin were shown.

Институт Макромолекулярной химии АНЧР,
г. Прага
²АО «Институт химических наук
им. А. Б. Бекетурова»,
г. Алматы

Поступила 05.03.2010 г.