

УДК 541.64:547.96

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АНТИПРОТЕИНАЗНЫЙ ГЕМОСОРБЕНТ

© 2022 г. И. Л. Валув^{а,*}, Л. В. Ванчугова^а, И. В. Обыденнова^а, Л. И. Валув^а

^а Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук
119991 Москва, Ленинский пр., 29, Россия

*e-mail: ivaluev@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 10.12.2021 г.

После доработки 20.12.2021 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

Сополимеризацией акриламида, акриловой кислоты и N,N'-метиленабисакриламида с макромономером ингибитора протеиназ овомукоида, синтезирован гемосорбент для селективного удаления из крови активированных протеолитических ферментов. Изучена зависимость времени свертывания крови в объеме гемосорбента от его состава и строения и оценена способность гемосорбента сорбировать α -химотрипсин из плазмы крови человека. Показано, что введение звеньев акриловой кислоты в состав гемосорбента приводит к повышению его тромборезистентности и сорбционной способности, а также упрощает технологию получения гемосорбента.

DOI: 10.31857/S2308113922020073

Гемосорбция – это метод детоксикации организма, основанный на удалении из крови пациента токсичных веществ эндогенной и экзогенной природы при перфузии цельной крови через специальный сорбент. К гемосорбентам, непосредственно контактирующим с кровью, предъявляются достаточно жесткие требования, главными из которых являются избирательность сорбции, высокая поглощающая способность и совместимость с кровью. Они не должны сорбировать или травмировать жизненно важные компоненты крови, включая ее форменные элементы, белки и ферменты, изменять электролитный баланс, компоненты свертывающей системы, артериальное давление и другие медико-биологические показатели [1–3].

Большинству из этих требований в значительной степени отвечает созданный в Институте нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук биоспецифический гемосорбент “Овосорб”, выпуск которого был налажен на предприятии “Белмедпрепараты” (Белоруссия) (ТУ 42-2-640-91). Гемосорбент представляет собой полиакриламидный гидрогель, в котором иммобилизован овомукоид из белка яиц утки – гликопротеин с M 31000, способный ингибировать сериновые протеиназы, образуя с ними неактивные комплексы с константами диссоциации порядка 10^{-8} моль/л [4].

Селективно удаляя из крови только активированные формы протеиназ, “Овосорб” в отличие от угольных гемосорбентов и сорбентов на основе ионообменных смол не обладает свойством не-

специфической сорбции ингибиторов протеиназ и других индивидуальных белков плазмы, что приводит к нормализации метаболических процессов поддержания гомеостаза в целом. Уникальные свойства гемосорбента обеспечивают его клиническое применение и до настоящего времени его используют для лечения гнойного перитонита, сепсиса, ожоговой и лучевой болезни, бронхиальной астмы, печеночной и почечной недостаточности и других заболеваний, сопровождающихся активацией протеолиза и ферментной интоксикацией организма [5–7]. В последние годы “Овосорб” нашел еще одно применение в качестве носителя белковых препаратов, защищающего их от гидролитического действия пищеварительных ферментов при пероральном введении [8–10].

Изучение особенностей применения гемосорбента в клиниках, наряду с безусловно положительными клиническими результатами, выявило необходимость решения ряда задач и в первую очередь усовершенствования технологии его получения, а также повышения емкости и тромборезистентности гемосорбента.

Изучение возможности решения этих задач и является основной целью настоящей работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали акриламид, акриловую кислоту, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (“Serva”, Германия), сывороточный альбумин,

гепарин, α -химотрипсин (“Sigma”, США), овомукоид из белка утиных яиц (“Белмедпрепараты”, Беларусь), толуидиновый синий (“ДиаМ”, Россия).

Для получения макромомера овомукоида 500 мг овомукоида растворяли в 100 мл 0.5 М раствора бикарбоната аммония (рН 8.0), раствор охлаждали до 0–5°C, добавляли 0.05 мл хлорангидрида акриловой кислоты и перемешивали в течение 30 мин. Макромономер гепарина синтезировали по аналогичной методике.

Для получения гемосорбента в 100 мл бикарбонатного буфера (рН 8.0) растворяли 10.0 г акриламида или смеси акриламида и предварительно нейтрализованной бикарбонатом натрия акриловой кислоты, 1.0 г N,N'-метиленбисакриламида, 1.2 г макромомера овомукоида или его смеси с макромономером гепарина. К полученному раствору добавляли катализатор — 0.08 г персульфата аммония и 0.08 мл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина. Раствор вакуумировали при 10–12 мм рт.ст. и выдерживали при комнатной температуре (18–21°C) в течение 60 мин. Полученный гидрогель измельчали продавливанием через сито с диаметром пор 5 мм, промывали восьмикратным количеством дистиллированной воды, а затем воду замещали раствором соляной кислоты (рН 2.5). При этом гидрогель коллапсировал, существенно уменьшая объем и выделяя в раствор присутствующие в нем примеси. Процедуру замены воды на раствор соляной кислоты повторяли 2 раза в течение 8 часов, а затем гемосорбент промывали проточной дистиллированной водой до содержания акриламида в гидрогеле менее 0.01 мг на 1.0 г полимера. Для определения содержания в гидрогеле незаполимеризовавшегося акриламида, 1.0 г набухшего в воде гидрогеля заливали 50 мл дистиллированной воды и выдерживали в течение 48 ч. Концентрацию акриламида измеряли спектрофотометрически на приборе “Hitachi-3410” (Япония) при длине волны 220 нм, используя предварительно построенную калибровочную прямую.

Содержание звеньев акриловой кислоты в гемосорбенте оценивали титрованием карбоксильных групп гидроокисью калия. Количество иммобилизованных в гидрогеле овомукоида и гепарина оценивали по разнице между их исходной концентрацией и концентрацией в промывных водах. Овомукоид определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм, а гепарин после его реакции с толуидиновым синим — при длине волны 500 нм [11]. Степень набухания гидрогелей оценивали гравиметрически и рассчитывали по формуле $S_r = m_1/m_2 - 1$, где m_1 и m_2 — масса равновесно набухшего и лиофильно высушенного гидрогеля соответственно.

Для изучения проницаемости к 2 мл геля, набухшего в 0.5 М бикарбонате аммония (рН 8.0) добавляли 4 мл раствора сывороточного альбуми-

на в том же буфере. Смесь оставляли при 4°C до установления постоянного значения оптической плотности раствора белка при 280 нм (обычно не более 48 ч). Концентрацию белка в исходном растворе и после его инкубации с гелем оценивали с помощью калибровочной зависимости. Учитывая соотношения объемов используемых фаз, рассчитывали количество пор, доступных для белка, принимая за 100% количество пор, доступных для воды.

Для определения времени свертывания крови в стеклянной пробирке 2.0 г гемосорбента инкубировали с 5.0 мл крови и измеряли время образования сгустка крови.

Для изучения емкости гемосорбента его помещали в колонку объемом 25 мл и через колонку пропускали плазму крови человека, содержащую 1.1 мг α -химотрипсина в 1 мл, до полного насыщения сорбента. Количество сорбированного фермента определяли путем смывания его с колонки водным раствором с рН 1.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс получения гемосорбента “Овосорб” включает сополимеризацию акриламида с ненасыщенным производным овомукоида и N,N'-метиленбисакриламидом и последующее промывание получаемого гидрогеля апиrogenной водой в течение полутора–двух суток. Столь длительное промывание гидрогеля, которое и является лимитирующей стадией всего процесса, обусловлено необходимостью удаления из гидрогеля крайне токсичного акриламида, способного поражать нервную систему, печень и почки [12, 13]. Остаточная концентрация акриламида должна быть менее 0.01 мг на 1.0 г полимера (ТУ 42-2-640-91).

Сокращение времени промывки может быть достигнуто приданием гидрогелю рН-чувствительности и проведением процесса промывания по типу промывание–отжим. Для этого в процессе полимеризации часть акриламида замещали акриловой кислотой. При нейтральных значениях рН карбоксильные группы звеньев акриловой кислоты (pK_a 4.8) ионизованы, что способствует увеличению объема набухшего гидрогеля из-за их взаимного отталкивания. При замене воды на раствор соляной кислоты (рН 2.0–2.5), подавляющей диссоциацию карбоксильных групп, существенно уменьшался объем гидрогеля (своеобразный “химический отжим”). Двукратное повторение этой процедуры и последующее промывание гидрогеля проточной дистиллированной водой снижало время достижения приемлемой концентрации акриламида в сорбенте (0.008 мг/г) до 15–18 ч.

При изучении свойств синтезированных сорбентов неожиданно было обнаружено, что введе-

Таблица 1. Свойства синтезированных гемосорбентов

Содержание акриловой кислоты, % (± 0.8)	Степень набухания, г воды/г сухого полимера (± 0.8)	Содержание иммобилизованного овомукоида, мг/г сорбента (± 0.3)	Эффективность сорбции, мг фермента/мг иммобилизованного овомукоида (± 0.4)	Количество пор, не доступных для молекул СА, ($\pm 0.4\%$)	Время свертывания крови, мин
0	10.3	8.8	0.34	22	8–9
4.3	12.1	7.6	0.38	28	8–9
8.7	13.4	7.2	0.42	32	10–11
13.6	14.2	7.4	0.47	44	12–13
28.4	17.3	6.9	0.52	42	13–14

ние в состав гидрогеля звеньев акриловой кислоты приводит к повышению емкости сорбентов по α -химотрипсину (табл. 1). Молекула овомукоида имеет один антихимотриптический центр, поэтому максимально достижимое значение сорбции составляет 0.7 мг α -химотрипсина с M 22 000 на 1 мг иммобилизованного овомукоида с M 31 000. В промышленно выпускаемом гемосорбенте эта величина равна 0.34 мг фермента/мг иммобилизованного овомукоида, т.е. только половина молекул овомукоида доступны для взаимодействия с ферментом, а вторая половина недоступна и локализована в стенках, разделяющих поры гидрогеля. Модификация гемосорбента акриловой кислотой почти в полтора раза увеличивает эффективность использования иммобилизованного овомукоида. Поскольку нет оснований предполагать, что сама модификация гидрогеля изменяет элементарный акт взаимодействия активного центра овомукоида с ферментом, скорее всего, причина данного явления заключается в структурных изменениях гидрогеля, формируемого с участием отрицательно заряженного мономера, приводящих к увеличению количества доступных для взаимодействия с ферментом молекул иммобилизованного овомукоида. При этом определяющим является не степень набухания гидрогеля, т.е. общее количество пор, а величина их поверхности.

Действительно, изменение степени набухания гемосорбентов путем полимеризации акриламида в отсутствие акриловой кислоты, но в присутствии различных количеств сшивающего агента не приводило к заметному изменению их емкостей. Так, эффективность иммобилизованного овомукоида в таких сорбентах со степенями набухания 10.3, 17.6 и 25.1 практически была постоянной и составляла 0.34 ± 0.04 , 0.36 ± 0.04 и 0.40 ± 0.04 мг фермента/мг иммобилизованного овомукоида. При использовании акриловой кислоты в процессе образования гидрогеля изменялось распределение пор гидрогеля по размерам: повы-

шалось количество мелких пор, на поверхности которых и происходит взаимодействие фермента с ингибитором. Так, например, при увеличении количества мелких пор, не доступных, например, для молекул сывороточного альбумина, гидродинамический диаметр которых равен 7 нм, с 22 до 42% емкость гемосорбента повышалась с 0.34 до 0.52 мг фермента/мг иммобилизованного овомукоида.

Введение в состав гидрогеля звеньев акриловой кислоты, карбоксильные группы которой ионизованы при физиологическом значении pH, как и ожидалось [14], позволило несколько повысить троборезистентность гемосорбента. Время свертывания крови в объеме гемосорбента в статических условиях контакта увеличивалось с 8–9 до 13–14 мин, что достаточно позитивно, учитывая то, что в динамическом режиме процесса гемосорбции время контакта с гемосорбентом определенного объема крови, равного объему колонки, составляет несколько минут.

Обычно для предотвращения свертывания крови при контакте с гемосорбентом пациенту перед операцией в кровь вводят антикоагулянт — гепарин в количестве 0.5–1.0 мг на кг массы с последующей его нейтрализацией протаминсульфатом. Особенность процедуры гепаринизации крови заключается в том, что даже небольшой избыток гепарина может вызывать кровотечение и поэтому необходимо добиваться строго сбалансированной антикоагуляции, чтобы, с одной стороны, предупредить тромбоэмболические осложнения, а с другой стороны, избежать геморрагических осложнений [15].

Очевидно, что гораздо более перспективным является предложенный в работе [16] способ химического связывания гепарина с гемосорбентом, который заключается в сополимеризации макромономера гепарина с акриламидом, сшивающим агентом и макромономером овомукоида. Время свертывания крови в объеме получаемого сорбента составляло 23–24 мин при содержании

гепарина в сорбенте 0.15%. Близкий результат был получен и при использовании макромономера гепарина в процессе получения сорбента на основе акриламида и акриловой кислоты. Время свертывания крови составляло 22–23 мин при содержании связанного гепарина 0.19%, что должно значительно минимизировать количество вводимого в кровь пациента антикоагулянта и предотвращать возможные кровотечения. При этом гепарин проявлял свою антикоагуляционную активность исключительно в объеме гемосорбента и не выделялся в кровь. Концентрация свободного гепарина в крови после ее контакта с гемосорбентом не превышала 5 мкг/мл – минимальное значение, определяемое спектрофотометрическим методом после реакции гепарина с толуидиновым синим [11].

Таким образом, модификация гемосорбента “Овосорб” введением в его состав звеньев акриловой кислоты позволяет повысить сорбционную способность иммобилизованного овомукоида и его тромборезистентность, а также существенно упростить технологию получения гемосорбента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kawasaki T.* // Blood Purif. 2018. V. 46. № 2. P. 136.
2. *Ankawi G., Xie Y., Yang B., Xie Y., Xie P.* // Blood Purif. 2019. V. 48. № 3. P. 196.
3. *House A.A., Ronco C., House A.A.* // Blood Purif. 2008. V. 26. № 1. P. 30.
4. *Шульгин М.Н., Валуева Т.А., Кестере А.Я., Мосолов В.В.* // Биохимия. 1981. Т. 46. № 3. С. 473.
5. *Plate N.A., Valuev L.I., Valueva T.A., Chupov V.V.* // Biomaterials. 1993. V. 14. № 1. P. 51.
6. *Plate N.A., Kirkovsky V.V., Antiperovich O.F., Nicolaichik V.V., Valueva T.A., Sinilo S.B., Moin V.M., Lobacheva G.A.* // Biomaterials. 1994. V. 15. № 4. P. 285.
7. *Kirkovsky V.V., Antiperovich O.F., Valueva T.A., Moin V.M., Lobacheva G.A., Berezkina O.G.* // Biomaterials. 1994. V. 15. № 5. P. 334.
8. *Платэ Н.А., Валуев Л.И., Старосельцева Л.К., Валуева Т.А., Ванчугова Л.В., Ульянова М.В., Валуев И.А., Сытов Г.А., Аметов А.С., Княжев В.А.* // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 11. С. 1876.
9. *Валуев И.Л., Валуев Л.И., Сытов Г.А.* // Прикл. биохимия микробиол. 1996. Т. 32. № 4. С. 371.
10. *Валуев И.Л., Валуев Л.И., Платэ Н.А.* // Докл. РАН. 1998. Т. 358. № 1. С. 57.
11. *Smith P.K., Mallia A.K., Hermanson G.T.* // Anal Biochem. 1980. V. 109. № 2. P. 466.
12. *Linhardt R.J., Claude S.* // J. Med. Chem. 2003. V. 46. № 6. P. 2551.
13. *Paulsson B., Granath F., Grawe J., Ehrenberg L., Tornqvist M.* // Cancirogenesis. 2001. V. 22. № 5. P. 917.
14. *Srinivasan S., Sawyer P.N.* // J. Macromolec. Sci., Chem. 1970 V. 4. № 4. P. 545.
15. *Harter K., Levine M., Henderson S.O.* // West J Emerg Med. 2015. V. 16. № 1. P. 11.
16. *Валуев И.Л., Ванчугова Л.В., Обыденнова И.В., Валуев Л.И.* // Прикл. биохимия микробиол. 2019. Т. 55. № 1. С. 34.