

ОРДЕНА ЛЕНИНА И ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ

ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ И НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

На правах рукописи

БАКАЛИНСКАЯ Ольга Николаевна

ПОЛУЧЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА УГЛЕРОДНЫХ СОРБЕНТОВ
С КОВАЛЕНТНО ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ БИОПРЕПАРАТАМИ

Специальность: 02.00.04 - физическая химия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Киев - 1993



00376351 (P)

Робота виконана в Інституті загальної та органічної хімії АН України

АН України

- Научные руководители:
- член-корреспондент АН України
доктор хімічних наук,
професор В.В.СТРЕЛКО
 - доктор хімічних наук
Н.Т.КАРТЕЛЬ
- Офіційні опоненти:
- доктор хімічних наук,
професор В.А.ТЕРТЫХ
 - доктор хімічних наук
Е.А.МАЗУРЕНКО
- Ведущая организация
- Фізико - хімічний інститут
ім.А.В.Вогатського АН України

Захита состоится "26" дубня 1993 г. в 10⁰⁰ час на засіданні спеціалізованого ради Д 016.16.01 при ордену Трудового Червоного Знамени Інституті загальної та неорганічної хімії АН України по адресу: 252680 Київ-142, пр.Палладина 32/34.

С дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту загальної та неорганічної хімії АН України

Автореферат розісланий "22" серпня 1992 г.

Учений секретар
спеціалізованого ради,
кандидат хімічних наук

Т.С.ГЛУЩАК

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время в Украине и за ее пределами стало традиционным применение в медицине сорбционных методов при лечении тяжелых заболеваний различной природы. Ученными и производителями Украины создан богатый ассортимент сорбционных материалов с улучшенными характеристиками, что дает возможность эффективно решать задачи медико-биологического характера. В частности, в Институте сорбции и проблем эндоэкологии АН Украины разработаны медицинские углеродные сорбенты на основе гранулированных синтетических (СКН, СКС) и косточковых (КАУ) активных углей, налажен их промышленный выпуск. Благодаря высокой адсорбционной способности и хорошей биосовместимости указанные материалы нашли широкое применение в медицинской практике.

Главным инструментом управления селективностью процессов при сорбционной очистке крови до сих пор остается изменение структурно-сорбционных характеристик углеродных гемосорбентов. Ясно, что в конечном итоге это определяет терапевтический эффект использования конкретного гемосорбента. Действительно, изменяя пористую структуру и в какой-то мере химию поверхности углеродных гемосорбентов можно добиться направленного воздействия на лечебную функцию углеродного гемосорбента. Однако имеется ряд заболеваний, при которых для достижения эффективности лечения больного необходимо удалить вещества строго определенного класса. В таких случаях гемосорбция на недостаточно селективных углеродных материалах часто не приводит к желаемому эффекту.

Решение проблемы селективности при сорбционной очистке крови с использованием хорошо совместимых с кровью углеродных гемосорбентов позволило бы достичь дальнейшего прогресса в области эфферентных (выделительных) методов медицины и существенно расширить круг заболеваний, при которых показана операция сорбционного очищения биологических жидкостей организма.

Приготовление селективных материалов принципиально возможно путем иммобилизации определенных биопрепаратов на поверхность углеродных гемосорбентов. При этом возникает необходимость решения ряда проблем, связанных с поиском подходящего метода иммобилизации, с одновременным сохранением активности иммобилизуемого биопрепарата. Немаловажным здесь является также

исследование закономерностей изменения физико-химических свойств углеродных сорбентов при осуществлении модификации его поверхности.

Работы в указанном направлении немногочисленны по-видимому, из-за сложности осуществления тонких химических превращений в поверхностном слое углеродных материалов, а также ограниченности методов физико-химического анализа и контроля продуктов при модификации активных углей. Настоящая диссертация выполнялась с той целью, чтобы в какой-то мере заполнить этот пробел.

Работа выполнялась в соответствии с научно-технической программой 0.69.07 "Создать и внедрить в практику методы и средства диагностики и коррекции отклонений внутренней среды организма человека" (постановление ГКНТ СССР от 30.10.85 г., № 555) и плановой темой ИСПЭ АН Украины "Исследование сорбционно-каталитических свойств синтетических активных углей с различной пористостью и химией поверхности" (№ гос. регистрации 86.01.0096706).

Цель настоящей диссертационной работы состояла в следующем:

- исследовать методы модификации поверхности углеродных гемосорбентов (включая иммобилизацию биопрепаратов), с последующим созданием биоспецифических материалов на углеродной основе;
- систематически изучить изменения в пористой структуре и сорбционных свойствах углеродных сорбентов на всех стадиях модификации;
- изучить специфическую сорбционную активность материалов с иммобилизованными биопрепаратами.

Научная новизна. На основании полученных данных о физико-химических свойствах с привлечением современных методов исследования изучена возможность модифицирования углеродных гемосорбентов путем ковалентной иммобилизации биопрепаратов. Применительно к углеродным гемосорбентам СКН, СКС и КАУ отработаны методы "активирования" поверхности матрицы и последующей химической иммобилизации на ней биомолекул. Разработаны также методики иммобилизации аминов и аминсодержащих биопрепаратов на поверхности предварительно окисленных углеродных гемосорбентов жидкофазным хлорангидридным методом. Установлена высокая биоспецифическая активность иммобилизованных белков (инсулин, БСА, иммуноглобулины класса G, протеин А золотистого стафилококка) на углеродной поверхности

карбодимидным методом.

Подробно исследованы физико-химические свойства модифицированных гемосорбентов, в частности способность к ионному обмену после прививки аминов и аминокислот, а также структурно-сорбционных характеристик после иммобилизации белковых молекул. Показано уменьшение объема сорбционных пор и величины удельной поверхности гемосорбентов в результате иммобилизации белков. Изучена адсорбционная способность белоксодержащих гемосорбентов по отношению к веществам-маркерам: метиленовому голубому, витамину B_{12} , яичному альбумину, бычьему сывороточному альбумину. Сделан вывод о том, что гемосорбенты с иммобилизованным на его поверхности биопрепаратом обладают не только биоспецифической активностью, но и сохраняют общедетоксицирующую способность.

Впервые проведена ковалентная иммобилизация аминокислот (лизин, тирозин, триптофан и фенилаланин) на окисленной форме углеродного гемосорбента СКН. Показана способность углей, содержащих привитые аминокислоты извлекать из биологических жидкостей свободный гемоглобин.

Впервые синтезированы также биоспецифические углеродные гемосорбенты с ковалентно иммобилизованным инсулином и белком *A* золотистого стафилококка.

Практическая ценность работы. В результате выполненной работы оптимизированы методики иммобилизации биопрепаратов на углеродные сорбенты карбодимидным и хлорангидридным методами.

Изучение структурно-сорбционных свойств белоксодержащих гемосорбентов открыло возможности направленного выбора исходной углеродной матрицы при получении биоспецифических материалов, которые необходимы для решения задач медицины и биотехнологии. Некоторые углеродные гемосорбенты с ковалентно иммобилизованными биопрепаратами прошли в связи с этим клинико-лабораторные испытания.

Апробация работы. Основные положения работы докладывались на: III Конференции Украины "Новые средства и сферы клинического применения сорбционной детоксикации" (Днепропетровск, 1985 г.), УП Всесоюзном симпозиуме "Синтетические полимеры медицинского назначения" (Минск, 1985 г.), XX Юбилейной конференции молодых ученых ИОНХ АН Украины (Киев, 1986 г.), УП Международном симпозиуме по гемосорбции (Киев, 1986 г.), IV Республиканской

конференции "Сорбенты медицинского назначения и механизмы их лечебного действия" (Донецк, 1988 г.), International Carbon Conference "Carbon-90" (Paris, 1990), XI Congress of European Society for Artificial Organs (Italy, Bologna, 1990), X International Symposium on Hemoperfusion, Adsorbents and Immobilized Reactants (Italy, Roma, 1990), International Carbon Conference "Carbon-92" (Germany, 1992).

Публикации. Основное содержание работы изложено в 13 опубликованных статьях и тезисах докладов, получено 3 авторских свидетельства, 1 положительное решение по заявке на патент.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 163 страницах, содержит 25 рисунков и 17 таблиц. Список литературы включает 254 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении сформулированы актуальность выбранной темы, цель исследования, научная новизна и практическая ценность работы, ее апробация.

В первой главе (обзор литературных данных) представлена краткая сравнительная характеристика матриц, используемых для иммобилизации биопрепаратов, а также известных методов иммобилизации. Подробно рассмотрены особенности иммобилизации биопрепаратов на углеродных сорбентах, использования их в медицинской практике. Дано обоснование перспективности создания углеродных биоспецифических гемосорбентов на основе углей СКН, СКС и КАУ - основной задачи исследования.

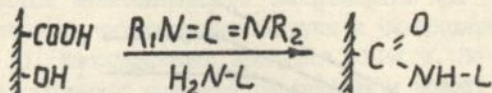
Во второй главе описаны используемые методы приготовления и анализа физико-химических и структурно-сорбционных характеристик углеродных носителей, анализа биологической активности биопрепаратов.

Третья глава посвящена разработке и оптимизации способов ковалентной иммобилизации биопрепаратов на углеродных сорбентах.

Для проведения модификации углеродной поверхности, необходимо наличие на ней исходных функциональных групп. Наиболее доступным и в то же время весьма эффективным способом "активирования" поверхности является введение в поверхностный слой карбоксильных и гидроксильных групп путем жидкофазного окисления азотной кислотой.

Основываясь на литературных данных, ковалентную

иммобилизацию белковых молекул на углеродной поверхности осуществляли карбодимидным (КДИ) методом по следующей схеме:



Изучено влияние времени активирования угля раствором КДИ на количество иммобилизованного белка. Показано, что максимальное количество белка при активировании углей СКНО и СКСо около 60 мин, а углей КАУо - 75 мин. После этого, с увеличением времени обработки угля раствором КДИ, количество привитого белка резко снижается (рис.1), что скорее всего связано с каталитическим разложением КДИ при временах экспозиции больших указанного (наличие индукционного периода).

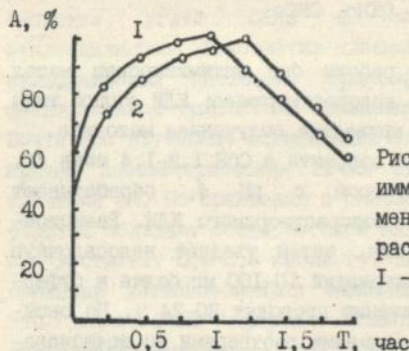


Рис.1. Зависимость количества иммобилизованного БСА от времени активирования угля водорастворимым карбодимидом: 1 - СКНО, СКСо, 2 - КАУо.

Представлялось интересным получить зависимости количества иммобилизованного на угле БСА от времени контакта активированного раствором КДИ угля с раствором белка. В связи с тем, что активные угли - высокопористые материалы, процесс иммобилизации на них белка можно считать законченным (до 90 % белка) через 20-24 ч после начала иммобилизации.

Нами изучена зависимость количества иммобилизованного белка от СОЕ (рис.2). Проведенные исследования позволили заключить, что для иммобилизации максимального количества белка необходимо использовать угли с СОЕ 1,2-1,6 мэкв/г.

Представлялось также интересным исследовать зависимость количества иммобилизованного белка от pH раствора активирования. Показано, что максимально связывание белка с активированным

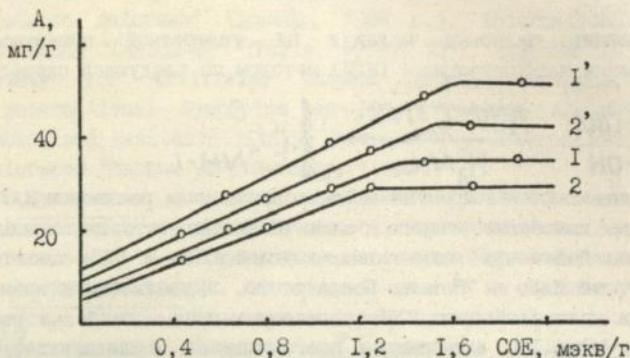


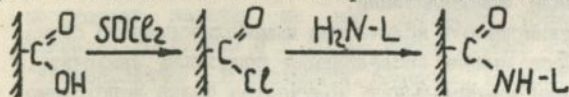
Рис.2. Зависимость количества иммобилизованного белка от СОЕ угля: 1,2 - БСА, 1', 2' - овальбумин; 1,1' - КАУо, 2,2' - СКНо, СКСо

углем при pH 4,5-5,0.

В результате проведенной работы был оптимизирован метод иммобилизации белковых молекул водорастворимыми КДИ углях типа СКНо, СКСо и КАУо. Ниже кратко приведена полученная методика.

1 г окисленного углеродного сорбента с СОЕ 1,2-1,4 мэкв /г, уравновешенного буферным раствором с pH 4, обрабатывают раствором, содержащим 0,1-0,5 г водорастворимого КДИ. Реакционную смесь перемешивают 15-20 мин, затем удаляют надосадочную жидкость, приливают раствор, содержащий 10-100 мг белка в буферном растворе с pH 7,2. Иммобилизацию проводят 20-24 ч. По окончании процесса уголь промывают солевыми растворами до исчезновения следов белка в промывных водах. Сорбент хранят при 0-5 °С.

Большая стоимость препаратов водорастворимого КДИ побудила нас искать другие методы активирования функциональных групп на углях и иммобилизации на них лигандов. Мы остановились на жидкофазном хлорангидридном методе активирования карбоксильных групп угля с иммобилизацией аминсодержащих лигандов по схеме:



Метод был оптимизирован на примере иммобилизации этилендиамин, фенилаланина и БСА на окисленных углях СКНо, СКСо и КАУо. Полученная методика кратко приведена ниже.

Навеску угля обрабатывают хлористым тионилом 3-5 ч при

температуре 60-80 °С, мольном соотношении количества карбоксильных групп угля и хлористого тионила 1:(1,5-2,5). Активированную хлористым тионилем поверхность угля обрабатывают раствором аминсодержащего биопрепарата при pH 7,5-8,5, мольном соотношении активированных групп и аминсодержащего биопрепарата 1:(1-2). Иммунизацию проводят 20-24 ч. По окончании процесса уголь промывают соевыми растворами и водой, сорбент хранят при температуре 0-5 °С.

В четвертой главе исследованы физико-химические характеристики углеродных сорбентов с ковалентно иммобилизованными биопрепаратами.

Использованные для модификации окисленные угли обладают ионообменными свойствами. При ковалентной иммобилизации на них аминсодержащих биопрепаратов, ионообменные свойства исходных углей должны измениться. Нами были исследованы ионообменные свойства углей СКНО с ковалентно иммобилизованными: этилендиамином, гексаметилендиамином, аммиаком, п-нитрофенолом, сульфаниловой кислотой, триптофаном, лизином, тирозином и фенилаланином (рис.3) по сравнению с исходным окисленным углем. Почти все изученные модификации углей имеют амфотерные свойства, причем изоэлектрическая точка сдвинута в область нейтральных значений pH. По сравнению с окисленными углями, модифицированные образцы обладают более высокой анионообменной емкостью (превышение достигает 0,6-0,8 ммоль/г). На такую же величину отмечается снижение катионообменной емкости. Это свидетельствует о том, что химическая природа поверхности углеродного сорбента существенно изменилась.

Иммобилизация биопрепаратов на углеродной поверхности изменяет также структурно-сорбционные характеристики углей.

Нами исследовались активные угли марок СКН, СКС и КАУ разной степени активирования, включая карбонизованные материалы (уголь-сырец). Исследовали как исходный уголь, так и его окисленный аналог. Кроме того, исследовали угли с иммобилизованным БСА и иммуноглобулином класса G (аллергеном домашней пыли для углей СКНО). В табл. I представлены данные изменения величин удельных площадей и объемов сорбционных пор исследованных материалов. Показано, что окисление уменьшает площадь удельной поверхности на 25-30 %, а объем сорбционных пор - в среднем на 5-10%.

Иммобилизация белковых молекул уменьшает удельную поверхность

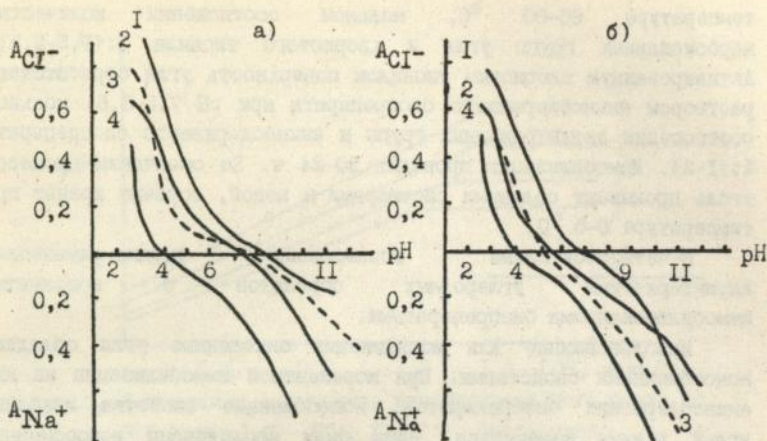


Рис.3. Кривые pH-потенциометрического титрования углей:

- а) I - SKN-CONH(CH₂)₂NH₂, 2 - SKN-CONH(CH₂)₆NH₂,
3 - SKN-CONH₂, 4 - SKN
- б) I - SKN-триптофан, 2 - SKN-лизин,
3 - SKN-фенилаланин, 4 - SKN

образцов на 60-80 %, а объем сорбционных пор - на 40-60 %. Эти данные свидетельствуют, по-видимому, о заполнении части мезопор, и, вероятно, супермикропор иммобилизованным белком, в результате чего доступ к соответствующим микропорам сорбента становится пространственно затрудненным.

Приведенные выше данные согласуются с результатами порометрических исследований углеродных сорбентов с иммобилизованными биопрепаратами путем вдавливания ртути. Нами были получены порограммы исходных и белоксодержащих углей (рис.4). На угли иммобилизовали бычий сывороточный альбумин карбодимидным методом. Показано незначительное уменьшение объема и удельной поверхности мезо- и макро- пор (до 10 %). Распределение пор по эквивалентным радиусам исходного и белоксодержащего материала практически одинаков.

Исследование пористой структуры углей с иммобилизованными биопрепаратами показало, что изученные сорбенты обладают довольно развитой пористой структурой. Вероятно, эти сорбенты будут обладать некоторой адсорбционной способностью по отношению к веществам различной молекулярной массы. В качестве маркеров мы использовали: метиленовый голубой (м.м. 319), витамин В₁₂

Таблица I

Материал	Размер транспортных пор., мм	S уд.		V _B	
		м ² /г	%	см ³ /г	%
СКСк		290	100	0,60	100
СКСко	12	160	55	0,60	100
СКСк-BCA		130	45	0,40	67
СКСк-IgG		110	40	0,40	67
СКС-3		1130	100	1,20	100
СКС-3о		800	71	1,00	83
СКС-3-BCA	12	300	27	0,90	75
СКС-3-IgG		230	20	0,85	71
СКС-5I5		1950	100	1,23	100
СКС-5I5о		1350	69	1,20	98
СКС-5I5-BCA	24	550	28	0,80	60
СКС-5I5-IgG		400	21	0,80	60
СКНк		150	100	0,25	100
СКНко		70	47	0,14	56
СКНк-BCA	35	50	33	0,14	56
СКНк-IgG		45	30	0,10	40
СКН		1950	100	0,76	100
СКНо		1250	64	0,66	87
СКН-Аллерген	35	230	12	0,48	63
СКН-BCA		150	8	0,38	50
СКН-IgG		130	7	0,35	46
КАУк		12	100	0,13	100
КАУко		8	75	0,17	131
КАУк-BCA	-	17	142	0,07	54
КАУк-IgG		10	83	0,07	54
КАУ-1		450	100	1,40	100
КАУ-1о		300	67	0,60	43
КАУ-1-BCA	200	150	33	0,50	36
КАУ-1-IgG		200	44	0,40	29
КАУ-2		1000	100	1,04	100
КАУ-2о		930	93	0,90	87
КАУ-2-BCA	250	440	44	0,70	67
КАУ-2-IgG		300	30	0,45	43

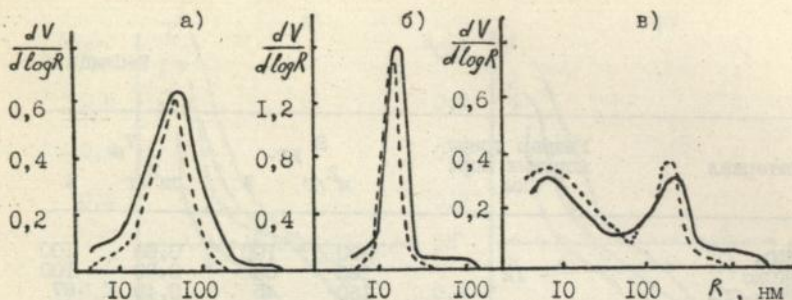


Рис. 4. Порограммы исходных (сплошные) и белоксодержащих (пунктирные линии) углей: а) СКН, б) СКСк, в) КAU-I (м.м. 1355), овальбумин (м.м. 43000), БСА (м.м. 68000). Этот набор маркеров моделирует (по молекулярной массе) достаточно широкий спектр токсических веществ, подлежащих удалению из крови. Данные исследования сведены в табл. 2.

Так, для веществ малой и средней молекулярной массы (метиленовый голубой и витамин B_{12}), которые в основном сорбируются в микро- и супермикропорах, снижение величины адсорбции после модифицирования коррелирует с уменьшением объема сорбционных пор. Необходимо отметить, что в случае метиленового голубого на углях с иммобилизованным IgG величины сорбции в большинстве случаев превышают таковые для исходных матриц. Этот факт, по-видимому, объясняется тем, что иммобилизованный белковый полимер выступает акцептором низкомолекулярных веществ. Эффект превышения сорбции метаболитов небольшой молекулярной массы (барбитуратов, креатинина и др.) отмечался и ранее в литературе при микрокапсулировании углей полимерными пленками. В случае иммобилизованного БСА подобного эффекта не отмечалось, скорее всего из-за высокой степени сшивки белкового полимера и соответствующей потери его акцепторных свойств по отношению к веществам небольшой молекулярной массы.

При модифицировании гемосорбентов происходит значительное снижение величины адсорбции белков. Это можно объяснить тем, что привитые молекулы белков соразмеримы с диаметром транспортных пор и являются стерическим препятствием для проникновения молекул белков из объема раствора в сорбционные поры.

Таким образом, при иммобилизации белковых биопрепаратов на поверхности углеродных сорбентов наблюдаются следующие закономерности: малопористые углеродные сорбенты СКНк, СКСк,

Таблица 2

Величина адсорбции (мг/г) метиленового голубого (I, $C_p=0,4$ мг/мл), витамина B_{12} (II, $C_p=0,2$ мг/мл), овальбумина (III, $C_p=0,14$ мг/мл), БСА (IV, $C_p=0,14$ мг/мл)

Уголь	Активный				Окисленный				Иммоб. IgG				Иммоб. БСА			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
СКСк	36	14	3	1	10	12	2	1	40	9	1	2,5	30	8	1,5	1
СКС-3	90	30	20	9	60	22	13	6	100	22	4	2	60	11	1	1
СКС-515	160	65	48	27	100	65	30	16	210	60	13	4	100	26	2	4
СКНк	10	4,5	3	2	5	1,5	1	1	4	1	0,5	0,5	10	2	2,5	1
СКН	65	20	4,5	3,5	50	15	3	1,5	75	11	3	2,5	50	10	2,5	2
КАУк	4	0,5	0,5	0,5	4	0,5	0,5	0,5	3	0,5	0,5	0,5	4	0,5	0,5	1
КАУ-1	40	9	9	10	25	5	7	8	40	8	3	1	40	8	1,5	2
КАУ-2	60	18	34	35	50	19	15	18	70	18	8	3	60	13	1,5	2

КАУк после иммобилизации биопрепаратов на их поверхности могут выполнять главным образом биоспецифическую функцию; неспецифическая сорбция растворенных веществ на них практически полностью отсутствует. При использовании высокопористых материалов, особенно синтетических углей типа СКН и СКС, после иммобилизации белков сохраняется определенная адсорбционная активность по отношению к биологически активным веществам различной природы в широком диапазоне молекулярных масс. Это означает, что иммуносорбенты, матрицами для которых служили гемосорбенты на основе высокопористых синтетических (СКН, СКС) либо косточковых (КАУ) углей, помимо иммуносорбционных свойств, сохраняют еще и выраженное общедетоксицирующее действие.

В главе пятой исследована биоспецифическая активность углеродных сорбентов с ковалентно иммобилизованными биопрепаратами.

Ранее было показано, что сорбенты с иммобилизованным протеином А золотистого стафилококка в качестве лиганда успешно применяются в медицине для лечения онкологических и аутоиммунных заболеваний. Терапевтическое действие используемых носителей основано на специфической способности белка А селективно взаимодействовать с иммуноглобулинами класса G.

Нами был ковалентно иммобилизован протеин А хлорангидридным и карбодимидным методами на угли СКН, КАУ, а также на специально синтезированный непористый углеродный материал (УМ). Показано, что уголь СКН с иммобилизованным белком А извлекает до 14 мг/г иммуноглобулинов, КАУ - до 11 мг/г, а материал УМ - до 4 мг/г (что в 2-3 раза больше, чем для исходных углей). Полученные материалы с иммобилизованным протеином А также эффективно извлекают (до 11 мг/г) иммуноглобулины класса G из биологических жидкостей (сыворотки и плазмы крови). В связи с тем, что протеин А является дорогостоящим препаратом, мы предприняли попытку его замены более доступным аналогом. В качестве такового мы выбрали обработанные формалином и лиофильно высушенные делипидизированные клеточные стенки бактерий Золотистого стафилококка. Оказалось, что в этом случае емкость сорбентов была даже несколько выше, чем в случае чистого протеина А, и достигала 20 мг/г.

Нами были также синтезированы сорбенты, которые иммунохимически взаимодействуют с сорбатом по типу антиген-антитело.

На углеродные сорбенты СКНо, карбодимидным методом были иммобилизованы антитела к БСА. Далее мы изучали адсорбцию БСА из модельных растворов исходным и модифицированным сорбентом (рис.5). Можно сделать вывод, что привитые антитела сохраняют свою специфичность. Показано, что значительную роль в адсорбции

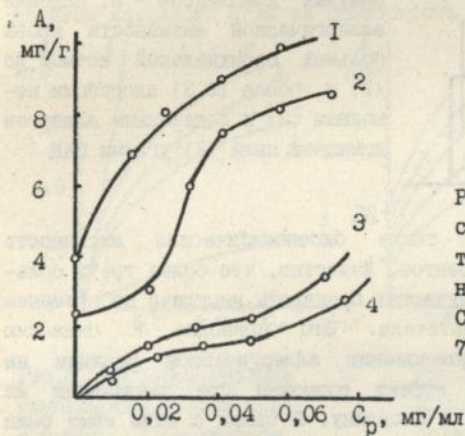


Рис.5. Изотермы сорбции БСА сорбентами с привитыми антителами к БСА (1,3) и исходными сорбентами (2,4). Средний радиус мезопор 75 нм (1,2) и 35 нм (3,4).

онной способности модифицированных сорбентов играет пористость исходных материалов. Углеродные сорбенты с эффективным радиусом пор 75 нм способны сорбировать большее количество белка, чем сорбенты, эффективный радиус которых составлял 35 нм.

Нами были синтезированы и изучены антигенсодержащие сорбенты.

Известно, что при попадании аллергена в организм людей, страдающих аллергией, развивается патологический процесс - аллергическая реакция. Эффективная помощь в этом случае возможна лишь путем удаления из кровотока избыточного количества специфических иммуноглобулинов. Это, в свою очередь, возможно осуществить проведя ковалентную иммобилизацию на носителе аллергена и пропуская кровь больного через синтезированный сорбент. Для двух категорий больных аллергией нами были созданы и испытаны гемоиммуносорбенты. Это касается больных бронхиальной астмой с аллергией на домашнюю пыль и больных сахарным диабетом с развившейся аллергией к инсулину.

Была исследована биоспецифическая активность угля СКН с ковалентно иммобилизованным аллергеном домашней пыли по

отношению к крови больных бронхиальной астмой с аллергией на домашнюю пыль (рис.6). Показано, что содержание патогенных метаболитов в крови больного падает после иммуносорбции.

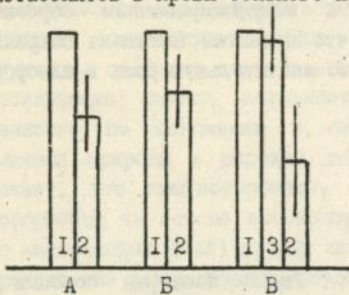


Рис.6. Содержание IgE - А, иммунных комплексов - Б, падение аллергической активности крови больных бронхиальной астмой до (1) и после (2,3) адсорбции исходным (3) и содержащим аллерген домашней пыли (2) углями СКН

Нами была изучена также биоспецифическая активность инсулинсодержащих гемосорбентов. Известно, что более трети больных сахарным диабетом, получающих препараты инсулина со временем вырабатывают к нему антитела. Это приводит к снижению эффективности и/или возникновению аллергической реакции на инсулин. Терапевтический эффект возможен при извлечении из кровотока больных антител к инсулину. В связи с этим нами была исследована способность инсулинсодержащих углей извлекать антитела к инсулину (рис.7).

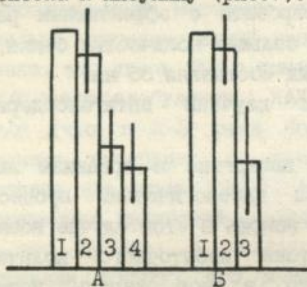


Рис.7. Содержание антител к инсулину в крови больных до (1) и после (2-4) сорбции углями СКН (А) и КАУ (Б) исходными (2), с иммобилизованным инсулином (3 - карбодиимидным, 4 - хлорангидридным методом)

Имеются литературные данные, что низкомолекулярные вещества - тирамин, α -аминоуксусная кислота, иммобилизованные на нерастворимом носителе обладают способностью извлекать свободный гемоглобин из растворов. Принимая во внимание схожесть химического строения аминокислот триптофана, тирозина, фенилаланина с тирамином, а лизина - с α -аминоуксусной кислотой, было интересным синтезировать и исследовать

аминокислотсодержащие углеродные сорбенты. Аминокислоты были иммобилизованы на уголь СКН хлорангидридным методом. Показано, что аминокислотсодержащие углеродные сорбенты обладают способностью селективно извлекать из растворов свободный гемоглобин (рис.8). Нами изучено влияние структурно-сорбционных свойств исходного угля на способность лизинсодержащего сорбента

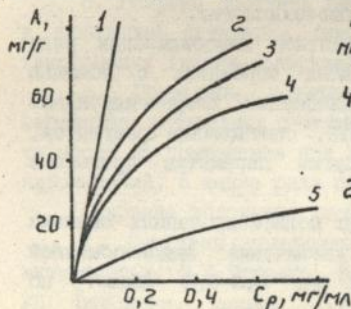


Рис.8. Изотермы сорбции гемоглобина углями СКН: с иммоб. 1 - лизином, 2 - фенилаланином, 3 - тирозином, 4 - триптофаном, 5 - исходным

извлекать гемоглобин. Показано, что адсорбционная емкость лизинсодержащих углей по указанному веществу коррелирует с объемом сорбционных пор исходных носителей. Показано также, что зависимость адсорбционной емкости лизинсодержащего угля от количества иммобилизованного лизина носит экстремальный характер с максимумом при содержании лизина 0,4 ммоль/г (рис.9).

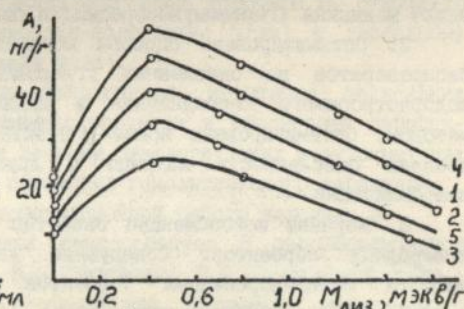


Рис.9. Зависимость величины адсорбции гемоглобина лизинсодержащими углями, отличающимися структурно-сорбционными характеристиками (табл.3.), от количества иммоб. лизина

Таблица 3

Уголь	Насыпная плотность, г/см ³	S _{уд.} , м ² /г	V _с , см ³ /г
1	0,28 - 0,32	1830	1,10
2	0,39 - 0,41	2020	0,87
3	0,48 - 0,50	1600	0,56
4	0,31 - 0,33	1930	1,24
5	0,42 - 0,44	1500	0,65

Выполненная работа позволяет сделать следующие выводы:

1. Проведен обзор и детальный анализ данных литературы, позволившие обозначить перспективы создания биоспецифических сорбентов на основе углеродных пористых материалов с иммобилизованными биопрепаратами, а также для решения некоторых задач медицины (гемоиммуносорбции) и биотехнологии.

2. Оптимизированы способы ковалентной иммобилизации ряда биопрепаратов на окисленных углеродных сорбентах с помощью водорастворимого карбодиимида и жидкофазным хлорангидридным методом. Оптимизированы время контакта, соотношение реагентов, степень окисленности матрицы и другие параметры процессов иммобилизации.

3. Изучены ионообменные свойства модифицированных аминами углеродных сорбентов. Обнаружено увеличение анионообменной емкости модифицированных сорбентов на 0,6-0,8 мэкв/г по сравнению с исходными углями.

4. С использованием ряда физико-химических методов (ртутно-порометрического, адсорбционно-весового и др.), а также метода адсорбции веществ-маркеров из раствора изучены структурно-сорбционные характеристики углеродных сорбентов на всех стадиях модифицирования. Установлено, что иммобилизация белковых молекул на углях уменьшает удельную поверхность последних на 60-80 %, а объем сорбционных пор - на 40-60 %. При этом объем и удельная поверхность мезо- и макропор модифицированных белками сорбентов, а также распределение пор по эквивалентным радиусам практически не изменяются.

5. Показано, что при адсорбции из растворов веществ-маркеров малой и средней молекулярной массы (метиленовый голубой, витамин В₁₂) на модифицированных углеродных сорбентах, снижение величины адсорбции коррелирует с уменьшением объема сорбционных пор. При адсорбции высокомолекулярных веществ - глобулярных белков белоксодержащими сорбентами отмечено значительное снижение величины адсорбции по сравнению с исходной матрицей, что обусловлено экранированием ее сорбционных пор высокомолекулярными лигандами.

6. Обнаружено, что малопористые углеродные сорбенты СКНк, СКСк, КАУк, УМ после иммобилизации биопрепаратов могут выполнять, преимущественно, биоспецифическую функцию, тогда как при использовании высокопористых углей СКН, СКС и КАУ после

иммобилизации биопрепаратов помимо иммуносорбционных свойств сохраняется выраженное общедетоксигирующее действие.

7. Показано, что разработанные способы иммобилизации биопрепаратов на углеродные матрицы обеспечивают их высокую биоспецифическую активность. Так, угли, содержащие протеин А способны связывать в 3 раза больше иммуноглобулинов класса G (I4-20 мг/г) по сравнению с исходными сорбентами.

8. Впервые получены биоспецифические сорбенты по отношению к некоторым антителам (инсулин-содержащие угли) и свободному гемоглобину (лизин-содержащие угли).

9. Проведены клиничко-лабораторные испытания нескольких вариантов углеродных гемоиммуносорбентов и обоснована перспективность их применения при лечении онкологических и аутоиммунных заболеваний, а также ряда патологий гемолитического характера.

Основные положения диссертационной работы изложены в:

1. Свойства углеродных гемосорбентов с биоспецифической активностью. В.В.Стрелко, Н.В.Сухаренко, С.В.Михаловский и др.-УП Всесоюзн. семин. "Синтетические полимеры медицинского назначения". Минск, 1985.-С.105.

2. Бакалинская О.Н. Исследование адсорбции альбумина на углеродных иммуносорбентах.- Ш Конф. УССР "Новые средства и сферы клинического применения сорбционной детоксикации организма" Днепропетровск, 1985.-С.7-8.

3. Бакалинская О.Н. Сорбционные характеристики белоксодержащих углеродных материалов.-1987.-С.137-147. Деп. в ВИНТИ 19.05.87 № 3505-В87.

4. Бакалинская О.Н., Сухаренко Н.В. Сорбционные характеристики иммуноспецифических гемосорбентов для лечения аллергических заболеваний.- УП Междунар. симп. по гемосорбции.-К.:Наукова думка, 1986.-С.34.

5. Бакалинская О.Н., Стрелко В.В., Сухаренко Н.В. Сорбция веществ-маркеров на углеродных иммуносорбентах и белоксодержащих активных углях.-Докл.АН УССР, Сер.Б.-1988.-№ 5.-С.64-67.

6. Бакалинская О.Н., Сухаренко Н.В., Стрелко В.В. Сорбционные характеристики углеродных гемосорбентов, содержащих химически связанные белки.-IУ Респ.конф. "Сорбенты медицинского назначения и механизмы их лечебного действия". 17-18 ноября 1988. Донецк.-1988.-С.1-2.

7. Сорбционные свойства углеродных гемосорбентов с

иммобилизованными белками. О.Н.Бакалинская, Н.В.Сухаренко, В.В.Стрелко и др.-Укр.хим.журн.-1989.-55, № 12.-С.1273-1276.

8. Bakalinskaya O., Sucharenko N. Preparation, investigation & application of biospecific carbon hemosorbents.-Int.conf. "Carbon-90". 16-20 July, 1990, Paris 1990.-P.122-123.

9. Selektive carbon hemosorbent for purification of biologic fluids from hemoglobin. O.Bakalinskaya, N.Koval, N.Kartel et al.-In: Abstr.book Xth Int.Symp. on Hemoperf., Adsorbents and Immob. Reactants.-Roma - Sept. 23-25.-1990.-P.16.

10. Preparation and usage perspectives of protein A- and aminoacid-containing carbon hemosorbents. N.Koval, O.Bakalinskaya, N.Kartel et al.-Int.J. Artif.Organs.-1990.-13, N 9.-P.575.

11. Свойства гемосорбентов СКН с привитыми аминокислотами и аминами. Н.М.Коваль, О.Н.Бакалинская, С.Л.Медведев и др.- Укр. хим.журн.-1991.-57, № II.-С.1132-1135.

12. Bakalinskaya O., Koval N. Synthetic carbon as a matrix for biopreparatous immobilization. Int.Conf. on carbon "Carbon-92", 22-26 June 1992, Essen, Germany, 1992.

13. Углеродные сорбенты - новый вид носителей для иммобилизации биологически активных веществ. Бакалинская О.Н., Картель Н.Т., Стрелко В.В. Препринт ИСПЭ АН Украины 92/ОІ, К.-1992, 60 с.

14. А.с. № 1635560 СССР. Способ получения иммобилизованных ферментов. В.В.Стрелко, Н.Т.Картель, Н.В.Сухаренко и др.

15. А.с. № 1637079 СССР. Способ получения иммуносорбента. О.Н.Бакалинская, Н.В.Сухаренко, Э.Н.Жеребцова и др.

16. А.с. № 1665803 СССР. Способ получения иммуносорбента для выделения иммуноглобулина G из биологических жидкостей. О.Н.Бакалинская, Н.В.Сухаренко, Э.Н.Жеребцова и др.

17. Заявка на пат. № 5033463. Положит решение от 25.06.92 Сорбент для удаления свободного гемоглобина из биологических жидкостей. О.Н.Бакалинская, Н.М.Коваль, А.И.Стариков и др.

Бакалин

Подписано в печать 15.12.92г формат 60x84/16
Бумага писчая. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ № 1870
Отпечатано ЦУОП ГНПП "Плодвиконсерв" г.Киев, Саксаганского, 1

AB 26.701