



УДК 544

Масштабирование процессов фронтальной хроматографии белков на карбоксилированных монолитных носителях

Демин А.А., Очкур О.В., Меленевский А.Т.,
Павлова Е.Н., Никифорова Е.С.

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 13.05.2009 г.

Аннотация

Масштабирование процессов фронтальной хроматографии смесей белков было проведено на монолитной колонке на основе макропористых сополимеров глицидилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата объемом в 8 мл. Карбоксиметилирование поверхности позволило получить сорбент с полной обменной емкостью 0,2 мг-экв/г. Пропускание через колонку модельной смеси цитохрома *c* с бычьим сывороточным альбумином или фибриногеном показало, что увеличение объема сорбента позволяет достичь большей избирательности сорбции для более крупных белков по сравнению с монолитными дисками объемом в 0,3 мл. Результаты, полученные на модельных смесях, были использованы для разделения белков плазмы крови.

Ключевые слова: адсорбция, ионообменники, белки, монолиты, хроматография

Upscaling of frontal chromatographic processes using the monolithic 8 ml column on basis of glycidylmethacrylate-ethylenglycoldimethacrylate (GMA-EDMA) copolymer was performed. By means of carboxymethylation of the polymer surface the cation-exchanger with the total exchange capacity 0.2 mg-equiv/g was obtained. Experiments with dynamic sorption of the model cytochrom *c* - BSA or cytochrom *c* - fibrinogen mixtures showed the increase of the sorption selectivity for the larger proteins in comparison to the monolithic 0.3 ml disks. Results obtained for the model mixtures were used in the process of plasma proteins separation.

Key words: Adsorption, Ion-exchangers, Proteins, Monoliths, Chromatography

Введение

Хроматография на основе монолитных макропористых сополимеров глицидилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата (ГМА-ЭДМА) стала одним из популярных скоростных методов разделения веществ, в частности биополимеров, благодаря незатрудненному диффузией массопереносу, низким рабочим давлениям и наличию высокореакционноспособных эпоксидных групп, позволяющих модифицировать поверхность различными функциональными группами (и таким образом получать сорбенты для ионообменной и аффинной хроматографии) [1-4].

Разумеется, выпускаемые промышленно монолитные диски объемом 0.3 мл могут применяться в аналитических целях, но никак не для препаративного разделения биополимеров, в том числе и белков. Однако, преимущества этих

материалов, в частности, быстрота проведения операций, очевидны. Поэтому в настоящее время ведутся активные работы по разработке других форм макропористых монолитов, в том числе на основе сополимера ГМА-ЭДМА, например, в виде цилиндров. Уже существуют такие цилиндры объемом от 8 до 800 мл.

Ранее нами было показано, что в процессах последовательной и совместной сорбции белков различных размеров на карбоксильных катионитах монолитного типа в виде дисков, при большой (до 1,6 мг-экв/г) концентрации ионогенных групп в условиях, близких к условиям максимального связывания, наблюдаются синергетические явления [5].

Уменьшение концентрации карбоксильных групп приводит к ослаблению связывания белка с поверхностью монолитного носителя. Ослабление связывания зависит от размеров белка. Это обстоятельство позволяет резко (на два порядка) увеличить избирательность сорбции из смеси белка большего по размеру.

Задачей настоящей работы являлось масштабирование ранее разработанных процессов фронтальной хроматографии смесей белков.

Материалы и методы исследования

В качестве модельных белков были использованы бычий сывороточный альбумин (БСА) производства Calbiochem-Behring (USA), цитохром *c* (производства Санкт-Петербургского завода медпрепаратов) и фибриноген производства MP Biomedicals.

Цитохром *c* – щелочной белок с молекулярной массой 12,3 кДа и изоэлектрической точкой 10,05. Размеры молекулы: 5,9×5,9×4,2 (нм). В спектре обнаруживает два пика поглощения: в видимой (410 нм) и в ультрафиолетовой (280 нм) области.

БСА – кислый белок с молекулярной массой 66,4 кДа и pI 4,7. Размеры молекулы: 14,1×4,1×4,1 (нм).

Фибриноген – белок с молекулярной массой 370 кДа и изоэлектрической точкой pI=5,6. Размеры молекулы: 10,0×15,8×11,0 (нм).

Кроме модельных белков в работе использовали замороженную плазму крови (ГУ НИИ АГ РАМН им. Д.О. Отта группа В(III) Rh⁺). Перед пропусканием через колонку плазму постепенно размораживали до получения однородного раствора (иногда требуется небольшое нагревание до 30-35°C) и доводили до рабочего значения pH (pH=3.8) 0.1M уксусной кислотой.

Монолитная CIM[®] колонка на основе сополимера ГМА-ЭДМА была предоставлена BIA Separations (Slovenia).

Общий вид колонки представлен на рис 1.



Рис. 1. Общий вид колонки (фото с сайта BIA Separation.com)

Колонка имеет следующие размеры:

Диаметр корпуса	26 мм
Диаметр фиксаторов	31 мм
Длина	100 мм
Материал	Инертный пластик

Внутри неё размещается монолитный носитель (картридж) в виде стержня. Картридж имеет следующие размеры:

Внешний диаметр	15.0 мм
Внутренний диаметр	1.5 мм
Длина	45.0 мм
Объём	8 мл

Разделение белков в соответствии с концепцией, предложенной в [6,7], может быть представлено как единственный акт адсорбции-десорбции, поэтому начальное распределение молекул белка на адсорбционной поверхности проточных пор (каналов) тонких монолитных дисков имеет решающее значение. Для того, чтобы однажды десорбированная молекула белка немедленно покинула свое «место» и вымылась из сорбента потоком элюента, диски были специально сконструированы таким образом, чтобы сепарационный слой был не слишком большой. В случае использования монолитных дисков, благодаря их небольшой толщине, процесс осуществлен традиционным методом продавливания растворов в осевом направлении. При использовании монолитных стержней, для обеспечения концепции однократного акта адсорбции-десорбции, также необходимо, чтобы сепарационный слой, через который проходит раствор, был достаточно тонким. Для этого в центре стержня монолита проделан тонкий (1.5 мм) сквозной канал, проходящий вдоль оси монолита, и раствор подается в радиальном направлении.

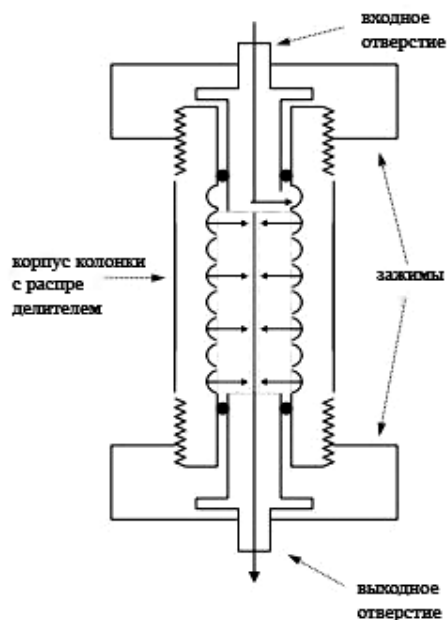


Рис. 2. Принцип действия колонки

(рисунки с сайта VIA Separation.com)

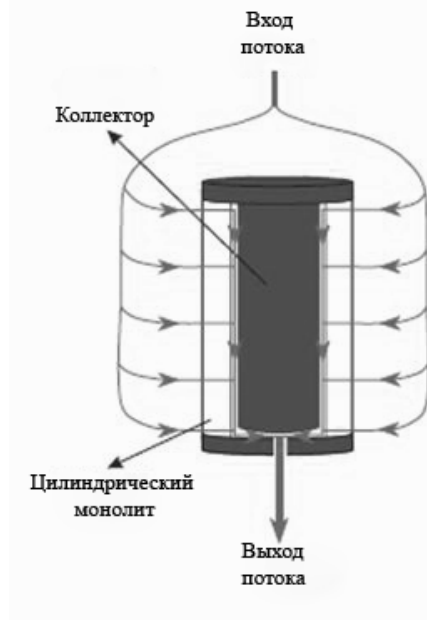


Рис. 3. Направление потока

Подаваемый раствор, попадает в колонку через входное отверстие и направляется к внутренней поверхности корпуса колонки, на которой имеется распределительное устройство - спиральный канал. Посредством такого канала

раствор равномерно распределяется по внешней поверхности стержня носителя. Под давлением насоса, раствор радиально продавливается через слой сорбента, где и происходит ионообменный процесс. Затем жидкость попадает в центральный канал-коллектор, откуда выводится через выходное отверстие колонки (Рис 2, 3).

Таким образом, радиальная подача потока, позволяет провести процесс в соответствии с принципами высокоэффективной монолитной дисковой хроматографии, практически при любых размерах монолитов, что открывает возможности препаративного разделения.

Цикл модификация сорбентов ГМА-ЭДМА производится в два этапа: сначала осуществляется гидролиз нативных эпоксидных групп, а затем - реакция карбоксиметилирования, условия которой зависят от желаемой степени модификации. Условия проведения реакций для модификации колонки несколько отличаются от приведенных в работе [5], где речь шла о модификации монолитных дисков.

Колонку с сорбентом помещали в термостат и при температуре 60 °С непрерывно, циклически пропускали 125 мл 0.1 М серной кислоты в течение 3 часов. После чего, колонку промывали дистиллированной водой до нейтрального значения рН (по метиловому оранжевому) и проверяли на наличие гидрофобного связывания белка, пропуская через колонку раствор БСА. В случае если наблюдалось связывание белка с сорбентом, последний промывали 50% ацетонитрилом для удаления белка, и обработку повторяли.

Затем проводили реакцию карбоксиметилирования полимера хлоруксусной кислотой, для чего через колонку циклически пропускали смесь растворов А (21.75 г NaOH в 61 мл воды) и В (26.5 г хлоруксусной кислоты в 12.5 мл воды) при термостатировании при температуре 60°С. Так как важно было получить сорбент с небольшой обменной емкостью, эту стадию проводили постепенно, в несколько этапов, причем время каждого этапа карбоксиметилирования было сокращено до 45 минут (в сравнении с 1,5 часами по методике, ранее отработанной для макропористых монолитных дисков). Затем полимер отмывали водой до нейтрального значения рН (по фенолфталеину). После каждой стадии производилось определение обменной ёмкости сорбента.

Обменную емкость по малому иону для синтезированного сорбента определяли методом обратного кислотно-основного титрования.

Для этого через колонку с сорбентом в Н-форме пропускали точно известный объём (500 мл) 0.1 М NaOH в течение 4-5 часов. Непрореагировавшую щелочь титровали 0.1 М H₂SO₄ по фенолфталеину. Емкость рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{(V_1 - V_2) \times 0.1}{m} \text{ [мг-экв/г]},$$

где V_1 - объём щелочи (мл), V_2 – объём кислоты, пошедшей на титрование (мл), m – масса сорбента в колонке (г).

Поскольку сорбент после модификации находится в солевой форме, его переводили в Н-форму с помощью 1 М раствора HCl, после чего сорбент отмывали водой до отрицательной реакции на хлорид-ионы.

Для исследования динамики сорбционных процессов через колонку прокачивали раствор белка при помощи перистальтического насоса со скоростью 6 мл/мин.

Сорбцию проводили из растворов с рН=3,8 и ионной силой 0,1М – в условиях, ранее определенных для карбоксилированных монолитных дисков.

При последовательной сорбции, после насыщения сорбента одним из белков,

колонку промывали буфером и пропускали через нее раствор второго белка. Затем колонку вновь промывали буфером и проводили десорбцию белков 0,3% раствором ортофосфорной кислоты. Скорость элюции в экспериментах составляла 6 мл/мин. Предварительно было показано, что в таких условиях происходит полная десорбция белков, использованных в работе.

При совместной сорбции через колонку пропускали бинарный белковый раствор до насыщения (определяли по прекращению изменения состава раствора на выходе из колонки). Промывали колонку буфером, после чего десорбировали белок 0,3% раствором ортофосфорной кислоты. После завершения процесса десорбции определяли состав полученных элюатов.

При изучении процессов сорбции использовали метод определения связывания белков по изменению концентраций белковых растворов, приведенных в контакт с сорбентом. Концентрации белков в индивидуальных растворах БСА и фибриногена определяли с помощью калибровочных графиков по оптической плотности на длине волны 280 нм, цитохрома *c* – на длине волны 410 нм. В работе был использован спектрофотометр SPECORD M 40 (Германия), имеющий в своем распоряжении самописец для изображения спектра.

Концентрации белков в смешанных растворах, одним из компонентов которых был цитохром *c*, определяли, исходя из свойства аддитивности величины оптической плотности [8], относительная погрешность измерений по такой методике составляет 5%. При этом:

$$D = D_{\text{цитохром}} + D_{\text{фибриноген}}$$

Основываясь на этом утверждении, проводили следующие действия:

- 1) измеряли величину D_{280} (оптическая плотность смеси белков на длине волны 280 нм);
- 2) измеряли величину D_{410} (оптическая плотность раствора цитохрома *c* на длине волны 410 нм);
- 3) находили концентрацию цитохрома *c* в смеси по калибровочному графику.
- 4) по предварительно построенной градуировочной зависимости определяли величину $D_{\text{цитохром } 280}$ (поглощение цитохромом *c*, полученной концентрации на длине волны 280).
- 5) рассчитывали величину $D_{\text{фибриноген } 280} = D_{280} - D_{\text{цитохром } 280}$ (поглощение фибриногена на длине волны 280);

Таблица 1. Состав разделяющего и концентрирующего гелей

Разделяющий гель (ширина около 9-10 см)	9%-ный акриламид 0.3%-ный N,N'-метиленбисакриламид 0.375 М трис-HCl pH 8.8 0.02%-ный персульфат аммония 0.1%-ный [об./об.] NNN'N'-тетраметилэтилен-диамин (ТЕМЕД)
Концентрирующий гель (ширина около 1-1.5 см)	4%-ный акриламид 0.13%-ный N,N'-метиленбисакриламид 0.125 М трис-HCl pH 6.8 0.06%-ный персульфат аммония 0.1%-ный ТЕМЕД

Находили концентрацию фибриногена в смеси по калибровочному графику.

Десорбат после насыщения сорбента белками плазмы крови анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в системе с додецилсульфатом натрия (ДСН) была использована методика Лэммли [9] с некоторыми модификациями. Для электрофореза использовался двухступенчатый ПААГ, состав которого приведен в таблице 1:

В качестве электродного использовался буфер с рН 8.3 следующего состава: 0.025 М трис, 0.192 М глицин, 0.1%-ный ДСН

Белковые пробы перед нанесением на гель прогревали 1.5-2 минуты при 100°C в буфере для образцов, содержащем: 0.0625 М трис-НСl рН 6.8; 2%-ный ДСН; 10%-ный глицерин; 5%-ный β -меркаптоэтанол; 0.001%-ный бромфеноловый синий.

Электрофорез белков проводился около 3 часов при напряженности электрического поля около 16-18В/см от катода к аноду. Окрашивали белки в полиакриламидном геле с помощью красителя *Coomassie brilliant blue R-250*. Чувствительность такой окраски позволяет регистрировать количество белка, равное 0.5 мкг/см² геля.

Обсуждение результатов

Была проведена модификация монолитного носителя объемом 8 мл. Карбоксиметилирование поверхности позволило получить сорбент с полной обменной емкостью 0,2 мг-экв/г.

Для количественной оценки процесса вытеснения проводились опыты по последовательной сорбции в динамических условиях. В качестве примера на рис. 4 приведены результаты, полученные для пары фибриноген-цитохром. Следует подчеркнуть, что результаты последовательной сорбции позволяют определить, равномерно ли распределены ионогенные группы [10, 11]. В случае образования кластеров на поверхности сорбента вытеснения белков не происходит.

Диаграммы 1 и 2 на рис. 4. отражают количество белка, сорбированного из индивидуальных растворов, диаграммы 3 и 4 – результаты последовательной сорбции; нижняя часть диаграмм отражает количество белка, сорбированного на первом этапе. Хорошо видно, что если вначале сорбент насыщен фибриногеном, то после добавления цитохрома с вытеснения фибриногена не происходит, тогда как после пропускания раствора фибриногена через колонку, предварительно насыщенную цитохромом с, содержание цитохрома в сорбенте уменьшается почти в 10 раз.

Полученные данные вновь соответствуют общей гипотезе о возможности вытеснения меньшего белка большим при ослаблении взаимодействия с фазой сорбента.

Таким образом, механизм сорбции в нашем случае, при сорбции белков на сорбент со сниженной концентрацией ионогенных групп, нельзя назвать конкурентным, так как не наблюдается взаимного вытеснения белков. Именно такой механизм сорбции, когда для одного из них наблюдается конкурентный механизм сорбции, а для другого имеют место отклонения от конкурентного механизма мы и предложили называть частично конкурентным механизмом сорбции [12]. Отсутствие вытеснения более крупного белка более мелким подтверждает тот факт, что при разрежении ионогенных групп создаются условия благоприятные для сорбции и удерживании на поверхности сорбента более крупного белка, вследствие более прочного его связывания с поверхностью сорбента.

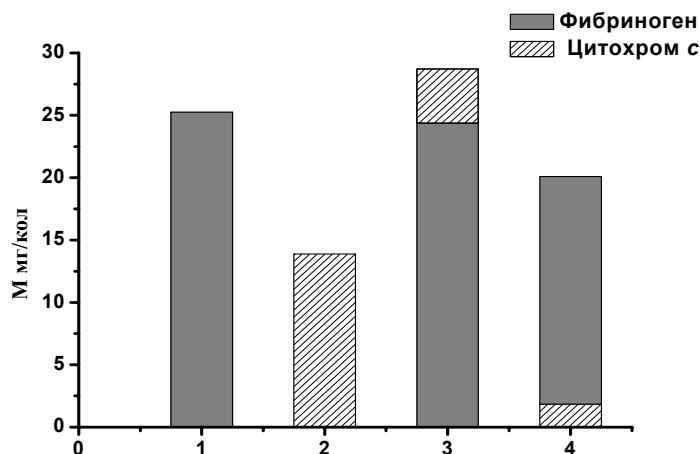


Рис. 4. Последовательная сорбция цитохрома *c* и фибриногена на поверхности карбоксилированного монолита с обменной емкостью 0.2 мг-экв/г

Для определения наличия или отсутствия избирательности процесса сорбции были поставлены эксперименты по совместной сорбции (рис. 5) в динамических условиях. Сорбция проводилась из бинарных белковых растворов с разными массовыми концентрациями белков.

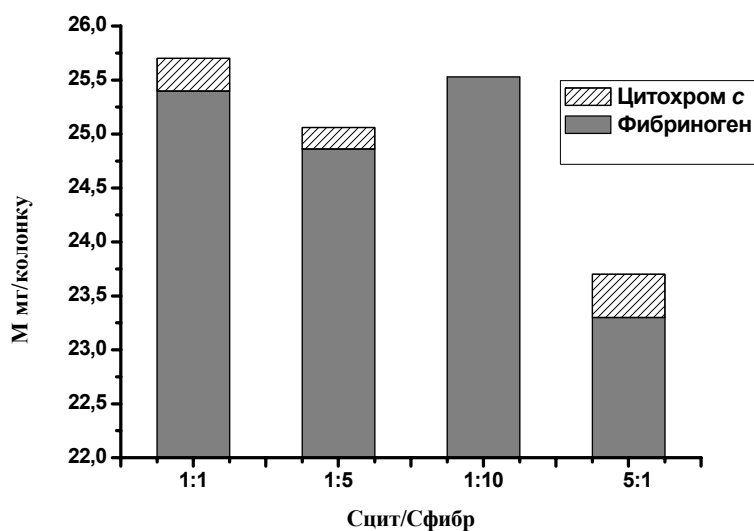


Рис. 5. Диаграмма состава элюатов, определенных после сорбции из бинарных белковых растворов

Таблица 2. Состав элюатов, определенный после сорбции из бинарных белковых растворов

$C_{\text{цит}}/C_{\text{фибр}}$ в исх. растворе	Фибриноген, мг/кол	Цитохром <i>c</i> , мг/кол	$C_{\text{фибр}}/C_{\text{цит}}$ на выходе из кол.
5	23	0.4	58
1	25	0.3	85
0.2	25	0.2	124
0.1	25.5	0	более 255

По данным таблицы 2 видно, что для сорбента с обменной емкостью 0.2 мг-экв/мл отношение концентраций большего белка к меньшему на выходе из колонки возрастает по отношению к этой же величине в исходном растворе в десятки раз.

Наличие в данном случае избирательности по более крупному белку можно объяснить тем, что больший по размеру белок способен образовывать большее количество связей с поверхностью сорбента, что делает связывание крупных молекул белка с разреженной по ионогенным группам поверхностью сорбента в большей степени возможным. Связь же белка меньшего размера с разреженными ионогенными группами затруднена, таким образом, он не может удержаться на сорбционных центрах, и может быть вытеснен более крупным белком.

Более того, из таблицы видно, что уже при отношении концентраций в исходном растворе 0.1 в пользу целевого компонента (т.е. низкомолекулярные белки составляют порядка 10%), на выходе из колонки можно получить чистый целевой компонент. Т.о. можно предложить такую схему выделения крупного белка из сложной смеси, которая предусматривала бы первую стадию – концентрирования целевого компонента, и вторую – получения уже чистого компонента.

Для определения наличия или отсутствия влияния скорости пропускания раствора на эффективность разделения были проведены две сравнительные сорбции, с разными скоростями подачи растворов. Сорбция проводилась из бинарных белковых растворов с равными массовыми концентрациями белков (1 мг/мл).

Таблица 3. Состав элюатов, определенный после сорбции из бинарных белковых растворов

Скорость подачи раствора, мл/мин	Фибриноген, мг/кол	Цитохром с, мг/кол	$C_{\text{фибр}}/C_{\text{цит}}$
6	25	0.3	85
12	25	0.3	85

По данным таблицы 3 видно, что увеличение скорости в два раза не приводит даже к незначительным изменениям состава выходящего раствора. А возможность работать при скоростях много выше принятых для стандартных хроматографических методик, позволяет осуществить весь цикл работ за сравнительно небольшое время.

Результаты опытов по адсорбции белков из плазмы на карбоксилированной монолитной колонке были оценены методом электрофореза в ПААГ. На рисунке 6 представлены результаты анализа состава раствора, полученного после десорбции белков из фазы сорбента.

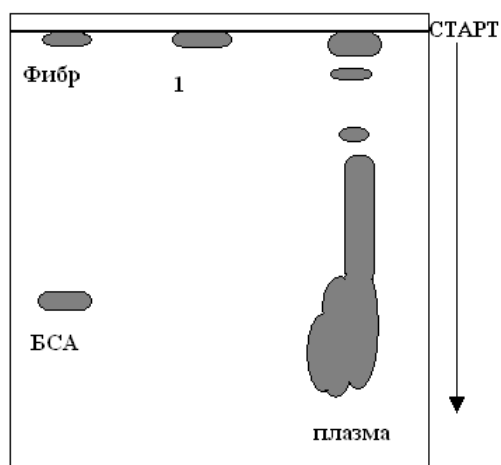


Рис. 6. Результаты адсорбции белков плазмы крови на карбоксилированной ГМА-ЭДМА колонке. 1 – раствор, полученный после десорбции с диска

К сожалению, данный метод не позволяет разделять белки с молекулярной массой, близкой к молекулярной массе фибриногена и выше. Эти белки остаются в геле на линии старта и проявляются одной полосой. Т.е. мы не можем судить о том, сорбирован ли только самый высокомолекулярный белок (Альфа₂-макроглобулин), или смесь наиболее высокомолекулярных белков (фактор XIII, фибриноген и Альфа₂-макроглобулин). Однако мы можем видеть, что после пропускания плазмы через катионит со сниженным содержанием ионогенных групп в фазе сорбента отсутствуют какие-либо белки с молекулярной массой ниже, чем молекулярная масса фибриногена. Это означает, что даже в том случае, если адсорбируется смесь из двух-трех самых «крупных» белков, настоящий метод позволяет легко, в одну стадию избавиться от большого количества сопутствующих более низкомолекулярных белков.

Заключение

Проведено масштабирование процессов разделения белков на макропористых монолитных сорбентах – сополимерах ГМА-ЭДМА. Отработаны условия модификации поверхности макропористой монолитной ГМА-ЭДМА колонки ионогенными (карбоксильными) группами. На основе ГМА-ЭДМА колонки получен карбоксильный катионит с низкой обменной емкостью (0.2 мг-экв/г).

Показано, что на карбоксилированной колонке с обменной емкостью 0.2 мг-экв/г имеет место вытеснение белка меньшего размера белком большего размера, т.е. реализация полуконкурентной (или частично конкурентной) сорбции. Это позволяет существенно (на 2 порядка) увеличить избирательности сорбции более крупных белков из смеси. Показано, что в случае 10-кратного преобладания в смеси целевого компонента (большого белка), возможно, его выделение в чистом виде за 1 цикл.

Продемонстрировано, что изменение скорости потока через карбоксилированную монолитную колонку в диапазоне от 6 до 12 мл/мин не оказывает влияния на результат сорбционного процесса.

Список литературы

1. Svec F., Tennikova T.B. Polymeric separation media for chromatography of biopolymers in a novel shape: macroporous membranes // J. Bioact. Compat. Polym. - 1991. V.6. P. 393-405.
2. Svec F., Tennikova T.B., Deyl Z. Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications. // Elsevier. - 2003. P. 773.
3. Tennikova T., Reusch T.. Short monolithic beds: history and introduction to the field // J. Chromatogr. A - 2005. V1065. Iss1-2. P.13-17.
4. Joisic D., Ceifton J. Use of monolithic supports in proteomics technology // J. Chromatogr. A -2007. V.1144. Iss.1. P.2-13.
5. Очкур О.В., Демин А.А., Тенникова Т.Б. Избирательность сорбции белков на карбоксильных катионитах различного строения // Сорбционные и хроматографические процессы. Т.7. Вып.6. 2007. С. 946-951.
6. Huang J.X., Horvath Cs. Adsorption isotherms on high-performance liquid chromatographic sorbents. II. Proteins on cation exchangers with silica support // J.Chromatogr. A – 1987. V.406. P. 285–294.

7. Dowd V., Yon R.J. Heterogeneous binding of aldolase to phosphocellulose: interpretation in terms of a concerted cluster model of multivalent affinity // J.Chromatogr. A – 1992. V.627. P. 145–151.
8. Меленевский А.Т., Чиждова Е.Б., Папукова К.П. Сорбция белков лизоцима и цитохрома С на карбоксильном катионите КМДМ-6-5 // ЖФХ – 1999. Т. 73. №11. С. 2068-2071.
9. Laemmli, UK Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V.227. P. 680-685.
10. Папукова К.П., Никифорова Е.С., Демин А.А. и др. Гидрофильные гетеросетчатые полиэлектролиты с варьируемым содержанием карбоксильных групп // Высокомолекулярные соединения. - 2004. Т. А46. №8. С. 1-5.
11. Demin A.A., Melenevsky A.T., Papukova K.P.. The effect of the concentration of ionogenic groups of the sorbent on the separation of protein mixtures // J.Chromatogr. A. - 2007. V.1006. P.185.
12. Demin A.A., Ochkur O.V. Cation exchangers for selective sorption of large proteins. // Journal of Chromatogr. B. 2007. V.849, Iss. 1-2. P. 231-235.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда
фундаментальных исследований (код проекта 06-03-32363)*

Демин Александр Александрович – д.х.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией, Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, тел. (812)3288547

Очкур Ольга Витальевна – к.х.н., младший научный сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Меленевский Александр Тарасович – старший научный сотрудник, к.х.н., Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Павлова Екатерина Николаевна – младший научный сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Никифорова Елена Сергеевна – Научный сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Demin Alexander A. – Doctor of Science, Head of Laboratory, Institution of Russian Academy of Sciences Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, e-mail: demin@imc.macro.ru

Ochkur Olga V. – PhD., Institution of Russian Academy of Sciences Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, e-mail: Ochkur@imc.macro.ru

Melenevsky Alexander T. – PhD., Institution of Russian Academy of Sciences Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, e-mail: melenev@imc.macro.ru

Pavlova Ekaterina N. – researcher, Institution of Russian Academy of Sciences Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences

Nikiforova Elena S. – researcher, Institution of Russian Academy of Sciences Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg