

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЛИЗОЦИМА В КРИОГЕЛЬ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА

С. С. Декина¹
И. И. Романовская¹
А. М. Овсепян¹
А. Л. Молодая²
И. И. Пашкин³

¹Физико-химический институт им. А. В. Богатского
НАН Украины, Одесса

²ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии
им. В. П. Филатова НАМН Украины», Одесса

³Московский государственный университет
тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова,
Россия

E-mail: s.dekina@gmail.com

Получено 08.11.2013

Целью работы было исследование иммобилизации лизоцима в криогель поливинилового спирта и физико-химических свойств полученного продукта. Гидролитическую активность лизоцима определяли бактериолитическим методом, используя в качестве субстрата ацетоновый порошок клеток *Micrococcus lysodeikticus*. Содержание протеина устанавливали методом Лоури–Хартри. Иммобилизацию лизоцима проводили посредством включения в гель поливинилового спирта с последующими циклами замораживания-оттаивания. Антимикробную активность изучали стандартным диско-диффузионным методом. Получены гидрогелевые пленочные покрытия с антимикробным действием, нерастворимые в физиологических условиях, с количественным сохранением протеина и гидролитической активности лизоцима. Продукт характеризуется расширенным рН-профилем активности при кислых значениях рН, стабильностью в кислой среде (рН 5,5) и во время хранения. Отмечено его антимикробное действие в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 F -49, *Pseudomonas aeruginosa* 415, *Escherichia coli* 055 K59912/4, *Candida albicans* ATCC 885-653. Предложенный метод иммобилизации лизоцима в криогель поливинилового спирта позволяет получать стабильный, высокоэффективный продукт, обладающий антимикробной активностью и являющийся перспективным для использования в биомедицинских исследованиях.

Ключевые слова: лизоцим, криогель поливинилового спирта, гидрогелевые покрытия, антимикробное действие.

Учитывая возрастающую резистентность микроорганизмов к антибиотикам, перспективным для лечения инфекционных заболеваний является использование бактериолитических энзимов. Лизоцим (КФ 3.2.1.17) — энзим, разрушающий клеточную стенку бактерий за счет гидролиза 1,4- β -связей между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина в составе цепи пептидогликана.

В медицине лизоцим применяют для лечения хронических септических состояний и гнойных процессов, при ожогах, отморожениях, конъюнктивитах, эрозиях роговицы, стоматитах и других инфекционных заболеваниях. Препарат нетоксичен, не раздражает ткани и может использоваться при плохой переносимости других антибактериальных средств [1].

Отсутствие стабильных лекарственных форм энзима (за исключением таблеток), необходимость приготовления растворов *ex tempore* стимулируют исследования в области его иммобилизации. Матрицей для иммобилизации лизоцима выбрали криогель поливинилового спирта (КГПВС). Эти криогели являются подходящими носителями для иммобилизации клеток, энзимов, поскольку они экономичны, нетоксичны, обладают высокой емкостью, нерастворимы в физиологических условиях, образуют прозрачные пленки, что дает возможность применять их в различных биотехнологических процессах, синтезе пептидов, в медицине [2–5].

Криогель образуется из водного раствора поливинилового спирта (ПВС) в процессе замораживания-оттаивания вследствие многочисленных водородных связей. ПВС

является стереорегулярным полимером с синдиотактическими и изотактическими участками. Синдиотактические участки ответственны за формирование межмолекулярных водородных связей, а изотактические образуют внутримолекулярные связи (рис. 1).

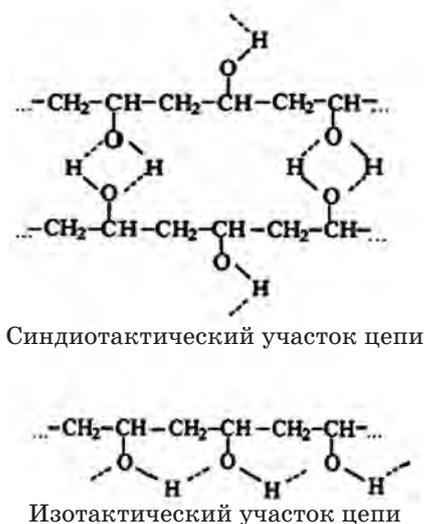


Рис. 1. Структура криогеля поливинилового спирта [6]

Целью работы являлось исследование особенностей процесса иммобилизации лизоцима в криогель поливинилового спирта и физико-химических свойств иммобилизованного продукта.

Материалы и методы

В работе использовали лизоцим яичного протеина (М. м. 14,4 кДа, 68000 ед/мг, AppliChem, Бельгия), ацетоновый порошок клеток *Micrococcus lysodeikticus* 2665 (Merck, Германия), поливиниловый спирт (М. м. 125 кДа, Sigma — Aldrich Co. LLC, США).

Гидролитическую активность лизоцима определяли бактериолитическим методом в буферном растворе ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6,2; 0,1 моль/дм³), используя в качестве субстрата ацетоновый порошок клеток *Micrococcus lysodeikticus* 2665 [7]. За единицу активности энзима принимали количество, снижающее оптическую плотность суспензии клеток на 0,001 за 1 мин при 55 °С. Активность свободного лизоцима принимали за 100% и сравнивали ее с активностью иммобилизованного образца. Содержание протеина устанавливали по методу Лоури–Хартри [8].

Иммобилизацию лизоцима проводили согласно разработанной нами методике:

к 25 см³ 10%-го водного раствора ПВС добавляли 8,8 см³ 0,1%-го раствора лизоцима, содержащего 0,25 мг биглюконата хлоргексидина, при постоянном перемешивании (30 мин). Для формирования пленочных покрытий рассчитанный объем смеси вносили в чашки Петри, замораживали при –24 °С, выдерживали 24 ч и размораживали, с последующим повторным замораживанием и оттаиванием. Высекали образцы площадью 0,8 см², герметично упаковывали.

Для изучения динамики выхода лизоцима к иммобилизованному препарату добавляли 8,8 см³ дистиллированной воды. Через равные промежутки времени в течение 3 ч отбирали по 0,1 см³ раствора и определяли гидролитическую активность энзима.

pH-оптимум активности энзима оценивали, добавляя к одинаковым по активности пробам свободного и иммобилизованного образца раствор субстрата и буферные растворы с концентрацией 0,1 моль/дм³ в диапазоне pH 3,0–10,0. Для определения pH-стабильности равные по активности пробы свободного и иммобилизованного лизоцима инкубировали в Na-фосфатном буферном растворе (0,1 моль/дм³, pH 5,5, 37 °С) в течение 3 ч, активность контролировали с интервалом 30 мин.

Термооптимум активности образцов энзима устанавливали по активности лизоцима в диапазоне температур 20–80 °С. Термостабильность определяли инкубацией равных по активности проб лизоцима в Na-фосфатном буферном растворе (0,1 моль/дм³, pH 6,2) при температуре 80 °С в течение 6 ч, активность контролировали с интервалом 30 мин.

Полученный иммобилизованный продукт хранили при температуре 4 °С. Определяли гидролитическую активность иммобилизованного лизоцима через один, два и три месяца.

Микробиологические исследования выполняли в лаборатории микробиологии (свидетельство об аттестации № РО-041а/2012) ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины». В качестве тест-штаммов применяли стандартные типовые музейные культуры микроорганизмов:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 F-49;
- *Pseudomonas aeruginosa* 415;
- *Escherichia coli* 055 K59912/4;
- *Candida albicans* ATCC 885-653.

В качестве контроля использовали образцы, не содержащие лизоцим.

Антимикробную активность образцов изучали стандартным диско-диффузионным методом с применением питательной среды

Мюллера–Хинтона [9]. Питательную среду готовили согласно инструкции изготовителя, разливали в чашки Петри. Из культур микроорганизмов готовили микробную суспензию с концентрацией $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/см³, что соответствует стандарту мутности 0,5 по МакФарланду [9]. Контроль оптической плотности суспензии осуществляли с помощью денситометра.

Стандартный инокулюм наносили пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1–2 см³. Приоткрытые чашки подсушивали при комнатной температуре в течение 10–15 мин.

На поверхность питательной среды помещали образцы с иммобилизованным лизоцимом. Аппликацию проводили стерильным пинцетом. Сразу после аппликации чашки Петри помещали в термостат вверх дном и инкубировали при температуре 35 °С в течение 24 ч. После инкубации чашки помещали вверх дном на темную матовую поверхность таким образом, чтобы свет падал на них под углом 45° (учет в отраженном свете) и определяли диаметр зон задержки роста микроорганизмов (д. з. з. р.) вокруг исследуемых препаратов.

Данные экспериментов обрабатывали статистически согласно [10].

Результаты и обсуждение

Для получения стабильных форм протеиновых образцов в биотехнологии, в зависимости от поставленной цели, применяют 2 основных подхода: нековалентное включение и химическое связывание [11]. С целью иммобилизации лизоцима использовали метод нековалентного включения в поливиниловый спирт, в меньшей степени нарушающий протеиновую структуру и позволяющий конструировать новые стабильные, высокоактивные продукты пролонгированного действия, определенного вектора всасывания.

В результате иммобилизации лизоцима в криогель ПВС получены гидрогелевые полимерные пленки пролонгированного действия с высокой гидролитической активностью, основные характеристики которых представлены в табл. 1.

Известно, что процесс иммобилизации приводит к повышенной устойчивости энзимов в денатурирующих условиях. Так, при исследовании рН-оптимума активности и рН-стабильности иммобилизованного лизоцима наблюдали расширение первого показателя на 1,5 ед. в область кислых значений (рис. 2), при этом иммобилизованный продукт сохранял высокую активность (более

70%) в кислой среде (рН 5,5) в течение 3 ч, в то время как свободный лизоцим активен не более 1 ч (рис. 3). Расширение рН-профиля активности и повышенная стабильность в кислой среде могут быть обусловлены буферными свойствами полимерной матрицы в микроокружении энзима.

Термооптимум и термостабильность иммобилизованного образца аналогичны таковым свободного энзима. Значения констант термоинактивации для свободного и иммобилизованного лизоцима существенно не отличаются и составляют $2,6 \cdot 10^{-3}$ мин⁻¹, $3,6 \cdot 10^{-3}$ мин⁻¹, соответственно. Таким образом, КГПВС не влияет на термостабильность энзима.

Изучение динамики высвобождения лизоцима из полимерной матрицы свидетельствует, что 100%-й выход наблюдается через 1 ч инкубации в водном растворе. Высвобождение лизоцима происходит равномерно — 50% за первые 30 мин, 50% в последующие 30 мин, что обусловлено пористой морфологией КГПВС, обеспечивающей диффузионно-незатрудненное высвобождение лизоцима в раствор (рис. 4).

Микробиологические исследования показали, что продукт обладает выраженным антимикробным действием по отношению

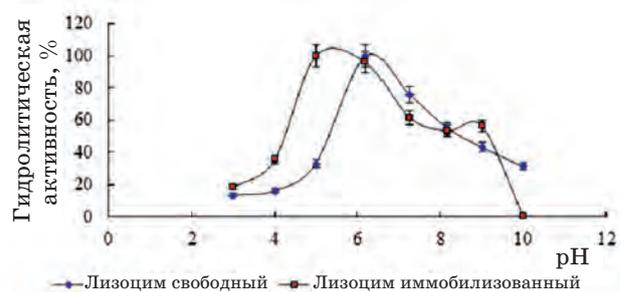


Рис. 2. Зависимость гидролитической активности свободного и иммобилизованного лизоцима от рН инкубационной среды ($M \pm m$, $n = 5$)

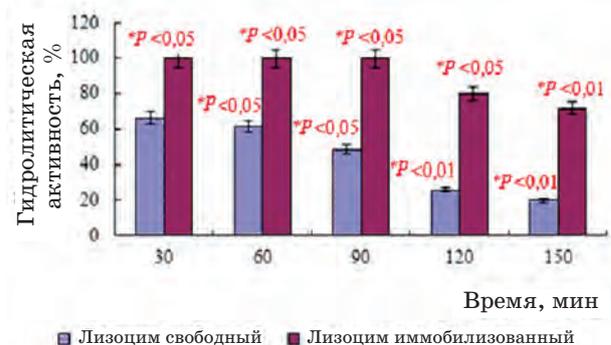


Рис. 3. Зависимость гидролитической активности свободного и иммобилизованного лизоцима от времени инкубации (рН 5,5, $n = 5$)

Таблица 1. Характеристика иммобилизованного лизоцима (* при $n = 5$)

Свойства	Показатели ($M \pm m$)
Мольное отношение лизоцим: ПВС	1:35
Гидролитическая активность, ед/г иммобилизованного препарата	8125 ± 340 (* $P < 0,005$)
Степень включения протеина, %	$100 \pm 2,5$ (* $P < 0,005$)
Площадь, см ²	$0,8 \pm 0,04$ (* $P < 0,05$)
Толщина, мм	$3,0 \pm 0,1$ (* $P < 0,01$)
Средняя масса пленки, мг	$8 \pm 0,3$ (* $P < 0,01$)
Цвет	Бесцветные, прозрачные
Время растворения в воде, физ. растворе, мин	Нерастворимы в физиологических условиях
Время хранения, мес	3 мес ($94,0 \pm 2,3\%$, * $P < 0,01$) сохранения активности

к тест-штаммам *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 F-49, *Pseudomonas aeruginosa* 415, *Escherichia coli* 055 K59912 / 4, *Candida albicans* ATCC 885 — 653 (табл. 2).

Полученный продукт иммобилизованного лизоцима перспективен для применения при трансбуккальном и интраназальном способах введения лекарств.

Таким образом, в результате исследований получен иммобилизованный лизоцим в криогеле поливинилового спирта в виде гидрогелевых пленок пролонгированного действия, характеризующийся полным сохранением гидролитической и антимикробной активности после иммобилизации, а также стабильностью. Эффективность иммобилизации подтверждена расширением рН-профиля гидролитической активности лизоцима в область кислых значений, стабилизацией в кислой среде, сохранением 94% активности в течение 3 мес. Иммобилизованный лизоцим свободно диффундирует из полимерной матрицы, оказывая выраженное антимикробное действие относительно тест-штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 F-49, *Pseudomonas aeruginosa* 415, *Escherichia coli* 055 K59912 / 4, *Candida albicans* ATCC 885-653 и может найти применение в медицине.

REFERENCES

1. Mashkovsky M. D. Medicines: A guide for physicians. 16th ed. Moscow: Novaya volna. 2012, 1216 p. (In Russian).
2. Martynenko N. N., Gracheva I. M., Sarishvili N. G., Zubov A. L., El'-Registan G. I., Lozinsky V. I. Immobilization of champagne yeasts by inclusion into cryogels of polyvinyl alcohol: Means of preventing cell release from the carrier matrix. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2004, 40 (2), 158–164.
3. Lozinskiy V. I. Cryogels based on natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. *Uspekhi khimii.* 2002, 71 (6), 559–585. (In Russian).
4. Lozinskiy V. I. New family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes-polymeric cryogels. *Izvestiya RAN, Seriya Khimiya.* 2008, V. 5, P. 996–1013. (In Russian).
5. Lozinskiy V. I., Damshkaln L. G., Kurochkin I. N. Study of cryostructuring of polymer systems. 33. The cooling rate of aqueous solutions of polyvinyl alcohol influence at their freezing on physicochemical properties and morphology of porous cryogels, obtained after thawing. *Colloid. Zh.* 2012, 74 (3), 343–352. (In Russian).

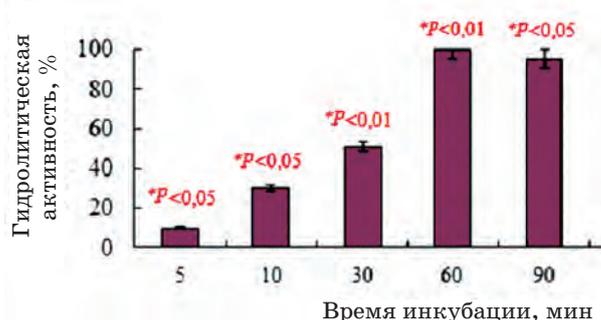


Рис. 4. Динамика высвобождения лизоцима из пленки (рН 6,2, 37 °С)

 Таблица 2. Антимикробное действие гидрогелевых пленок с лизоцимом ($n = 5$)

Тест-штамм микроорганизма	Д.з.з.р., см ($M \pm m$)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 F-49	$1,7 \pm 0,15$ (* $P < 0,05$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 415	$1,1 \pm 0,10$ (* $P < 0,05$)
<i>Escherichia coli</i> 055 K59912 / 4	$1,2 \pm 0,13$ (* $P < 0,01$)
<i>Candida albicans</i> ATCC 885 — 653	$1,3 \pm 0,11$ (* $P < 0,05$)

6. *Lozinsky V. I., Plieva F. M.* Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enz. Microb. Technol.* 1998, 23 (3–4), 227–242.
7. *Levitskiy A. P.* Lysozyme instead of antibiotics. *Odessa: KP OGT*, 2005, 74 p. (In Russian).
8. *Hartree E. F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 1972, 48 (2), 422–427.
9. *MB 9.9.5-143-2007.* Determination of the sensitivity of microorganisms to antibiotics. *Methodologichni rekomendacii.* 74 p. (In Ukrainian).
10. *Lapach S. N., Tschubenko A., Babich L. N.* Statistical methods in biomedical research using Excel. *Kyiv: Morion*, 2000, 320 p. (In Russian).
11. *Romanovskaya I., Dekina S., Andronati S.* Construction of immobilized proteins. *Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG.*, 2012, 335 p. (In Russian).

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ЛІЗОЦИМУ В КРІОГЕЛЬ ПОЛІВІНІЛОВОГО СПИРТУ

*С. С. Декіна¹, І. І. Романовська¹
А. М. Овсепян¹, А. Л. Молода², І. І. Пашикін³*

¹Фізико-хімічний інститут
ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса
²ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної
терапії ім. В. П. Філатова НАМН
України», Одеса
³Московський державний університет
тонких хімічних технологій
ім. М. В. Ломоносова, Росія

E-mail: s.dekina@gmail.com

Метою роботи було дослідження іммобілізації лізоциму в криогель полівінілового спирту та фізико-хімічних властивостей отриманого продукту. Гідролітичну активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом, використовуючи як субстрат ацетоновий порошок клітин *Micrococcus lysodeikticus*. Вміст протеїну визначали методом Лоурі–Хартрі. Іммобілізацію лізоциму проводили включенням в гель полівінілового спирту з подальшими циклами заморожування-відтавання. Антимікробну активність зразків вивчали стандартним диско-дифузійним методом. Одержано гідрогелеві плівкові покриття з антимікробною дією, нерозчинні у фізіологічних умовах, з кількісним збереженням протеїну і гідролітичною активністю лізоциму. Продукт характеризується розширеним рН-профілем активності за кислих значень рН, стабільністю в кислому середовищі (рН 5,5) і під час зберігання. Відзначено його антимікробну дію щодо *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 F-49, *Pseudomonas aeruginosa* 415, *Escherichia coli* 055 K59912 / 4, *Candida albicans* ATCC 885-653. Запропонований метод іммобілізації лізоциму в криогель полівінілового спирту дає змогу одержувати стабільний, вискоєфективний продукт з антимікробною активністю, перспективний для використання в біомедичних дослідженнях.

Ключові слова: лізоцим, криогель полівінілового спирту, гідрогелеві покриття, антимікробна дія.

IMMOBILIZATION OF LYSOZYME IN POLYVINYL ALCOHOL CRYOGEL

*S. S. Dekina¹, I. I. Romanovska¹,
A. M. Ovsepyan¹, A. L. Molodaya²,
I. I. Pashkin³*

¹Bogatsky Physico-Chemical Institute
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Odesa
²The Filatov Institute of Eye Diseases
and Tissue Therapy of the National Academy
of Medical Sciences of Ukraine, Odesa
³Lomonosov Moscow State University
of Fine Chemical Technology, Russian

E-mail: s.dekina@gmail.com

The lysozyme immobilization in cryogel of polyvinyl alcohol and physico-chemical properties of obtained preparation was investigated. Hydrolytic activity of lysozyme was determined by bacteriolytic method, using *Micrococcus lysodeikticus* cells acetone powder as substrate. Protein content was determined by the Lowry–Hartree method. Immobilization of lysozyme was conducted by entrapment in polyvinyl alcohol gel with subsequent cycles of freezing-thawing. Antimicrobial activity was studied by standard disk-diffusional method. The hydrogel filmic coatings with antimicrobial action, insoluble at physiological conditions, with quantitative retaining of protein and hydrolytic activity of lysozyme were obtained. The product is characterized by the widened pH-profile of activity at acidic pH values, stability in acidic medium (pH 5.5) and at storage. Its antimicrobial action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 F-49, *Pseudomonas aeruginosa* 415, *Escherichia coli* 055 K 59912/4 and *Candida albicans* ATCC 885-653 was noted. The proposed method of lysozyme immobilization allows to obtain stable, highly effective product with antimicrobial activity, prospective for usage in biomedical investigations.

Key words: lysozyme, cryogel of polyvinyl alcohol, hydrogel coatings, antimicrobial action.