

Влияние полимеров на процессы ассоциации молекул лизоцима

С. С. Декина, И. И. Романовская, Т. Ю. Громовой¹

Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины
Люстдорфская дор., 86, Одесса, Украина, 65080

¹Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины
Ул. Генерала Наумова, 17, Киев, Украина, 03164

romairina@gmail.com

Цель. Исследовать поведение молекул лизоцима при иммобилизации в растворы желатина и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) методом матрично активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ). **Методы.** Гидролитическую активность свободного и включенного в растворы желатина и Na-КМЦ-лизоцима определяли бактериолитическим методом. Взаимодействие фермента с полимерами подтверждено методами вискозиметрии и масс-спектрометрии. **Результаты.** Показано наличие лизоцима в водном растворе в виде мономера и олигомерных форм. Нековалентные взаимодействия фермента с растворами полимеров вызывают диссоциацию олигомерных структур на субъединицы, зависящую от природы носителя и массовых соотношений лизоцим:полимер. Установлено количественное сохранение гидролитической активности иммобилизованного лизоцима, что способствует получению мукоадгезивных пленочных форм с бактериолитическим действием. **Выводы.** Иммобилизация лизоцима за счет нековалентных взаимодействий в растворы желатина и Na-КМЦ приводит к диссоциации олигомерных структур фермента, при этом отмечено более прочное связывание лизоцима с Na-КМЦ.

Ключевые слова: лизоцим, олигомеры, диссоциация, желатин, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, МАЛДИ.

Введение. Нековалентные взаимодействия белковых биологически активных веществ (БАВ) с полимерными носителями представляют определенный интерес, поскольку позволяют создавать стабильные, активные препараты пролонгированного действия с контролируемым высвобождением и направленным местом всасывания, а также разрабатывать новые пути их введения для использования в различных областях медицины, в том числе в стоматологии в виде мукоадгезивных пленок [1].

Учитывая все возрастающую резистентность к антибиотикам, актуальным является использование иммобилизованного гидролитического фермента лизоцима, обладающего противовоспалительным,

иммунокорректирующим, бактериолитическим и адаптационно-трофическим действием. В качестве матриц для иммобилизации лизоцима применяют полимеры – желатин и натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ), перспективные для изготовления мукоадгезивных пленок [2, 3].

Известно, что в растворе лизоцим проявляет склонность к гетерологической ассоциации, образуя структуры большего размера, чем исходная молекула [4, 5], однако взаимодействие лизоцима с данными полимерами методом МАЛДИ ранее не изучали.

Целью работы явилось исследование поведения молекул лизоцима при иммобилизации в растворы желатина и Na-КМЦ методом МАЛДИ.

Материалы и методы. В работе использованы коммерческий препарат лизоцима яичного белка

КФ 3.2.1.17 («Applichem», Бельгия), пищевой желатин (ГОСТ 11253-89), Na-КМЦ (Akucell AF 3265 пищ., РФ).

Гидролитическую активность лизоцима определяли бактериолитическим методом, используя в качестве субстрата ацетоновый порошок *Micrococcus lysodeikticus* (штамм 2665) [6].

Лизоцим (0,01 %) вводили в водные растворы полимеров (0,5; 1,5; 6,0 %) при массовых отношениях 1:50, 1:150, 1:600 и температуре 30 °С, рН 6,2, перемешивая в течение 30 мин.

Вязкость растворов полимеров с лизоцимом регистрировали с помощью вискозиметра Оствальда с диаметром капилляра 0,73 мм [7].

Масс-спектрометрические исследования выполняли на приборе Autoflex II («Bruker Daltonics», ФРГ). Методику МАЛДИ применяли согласно [8].

Матрицу на основе синаповой кислоты (Sinapic Acid (SA), «Fluka», Switzerland) готовили следующим образом: 12 мг SA разводили в 1 мл водно-ацетонитрильной смеси 1:1 с добавлением 0,1 % трифторуксусной кислоты. Раствор инкубировали на протяжении 10 мин при температуре 30 °С в ультразвуковой бане до полного растворения кислоты.

Анализировали суммарные спектры позитивных ионов, полученные накоплением 600 одинарных спектров.

Исследования проводили в массовом диапазоне 10–140 кДа.

На всех рисунках представлены только информативные участки масс-спектров.

Результаты и обсуждение. Выбранные полимерные матрицы отличаются высокой гидрофильностью, наличием функциональных групп, способных образовывать ионные и водородные связи, возможностью получать матричные системы с однородным распределением иммобилизованного БАВ, причем его молекулы остаются стерически доступными [9, 10], что перспективно для нековалентной иммобилизации, в меньшей степени затрагивающей структуру белковой глобулы фермента.

Взаимодействие полимер:лизоцим подтверждено исследованием кинематической вязкости растворов (табл. 1). Уменьшение вязкости раствора желатина с лизоцимом и ее увеличение в случае раствора Na-КМЦ:лизоцим свидетельствуют о конфор-

Таблица 1
Реологические характеристики растворов полимеров с лизоцимом*

Раствор полимера	Кинематическая вязкость (ν), $\text{м}^2/\text{с} \cdot 10^{-6}$, $\text{M} \pm m$
Желатин	$2,21 \pm 0,07$
Желатин + лизоцим	$1,83 \pm 0,06$
Na-КМЦ	$2,15 \pm 0,08$
Na-КМЦ + лизоцим	$2,48 \pm 0,09$

* $P > 0,001$ при $n = 10$.

мационных изменениях белковой глобулы фермента в результате взаимодействия с полимерами.

Исследование гидролитической активности лизоцима в растворах полимеров показало ее количественное сохранение вне зависимости от массовых отношений фермент:носитель. Так, активность свободного лизоцима составляет 62000 ± 4000 ед/мг фермента, а лизоцима, включенного в растворы полимеров, – $57970 \pm 2700 \div 61860 \pm 3090$ ед/мг фермента.

Из данных литературы известно, что в водных растворах лизоцим образует олигомерные структуры за счет нековалентных взаимодействий (ван-дер-ваальсовы, электростатические, гидрофобные взаимодействия, водородные связи и др.), участвуя в молекулярных механизмах агрегатообразования [4, 5].

Методом МАЛДИ подтверждено наличие ассоциатов лизоцима в водном растворе, при этом молекула фермента представлена как мономером с молекулярной массой (м. м.) $\approx 14,250$ кДа, так и олигомерными формами от димера с м. м. $\approx 28,500$ кДа до октамера с м. м. $\approx 114,800$ кДа (рис. 1, а, рис. 2, а).

Показано, что в процессе иммобилизации лизоцима в желатин при увеличении массового отношения фермент:носитель наблюдается распад олигомерных ассоциатов на субъединицы (рис. 1, б–г), аналогичная ситуация отмечена и в случае Na-КМЦ (рис. 2).

В ходе масс-спектрометрического эксперимента не изменяется его разрешающая способность (не происходит уширения пиков). Это свидетельствует об одинаковой кинетической энергии (с которой молекулы попадают в зону дрейфа масс-спектрометра) лизоцима и его олигомеров вне зависимости от полимерной матрицы. Таким образом, полученный результат не является отражением затруднен-

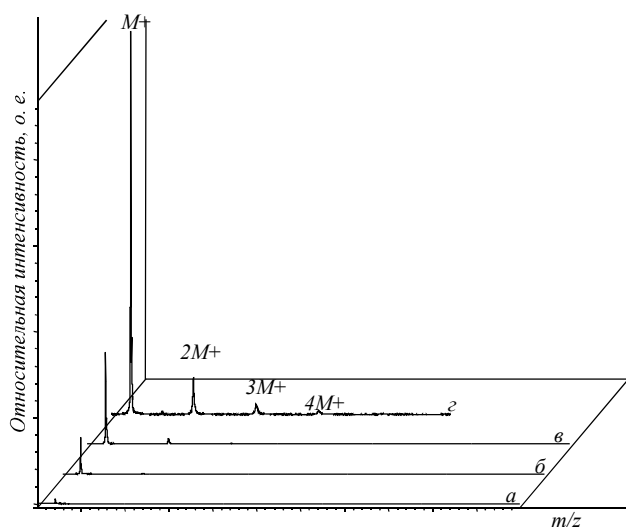


Рис. 1. МАЛДИ-спектр лизоцима с желатином при соотношении: а – 1:600; б – 1:150; в – 1:50; з – свободный лизоцим

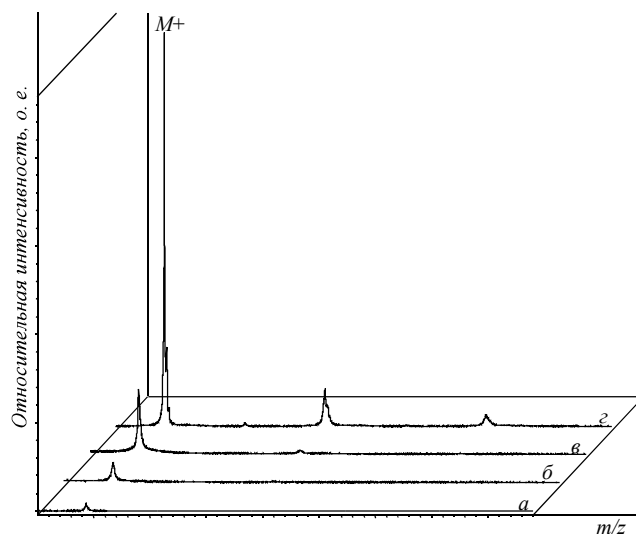


Рис. 2. МАЛДИ-спектр лизоцима (интерпретация пиков на рис. 1) с Na-КМЦ при соотношении: а – 1:600; б – 1:150; в – 1:50; з – свободный лизоцим

Таблица 2

Соотношение относительных интенсивностей пиков структур лизоцима, образующихся в водных растворах полимеров

Массовые соотношения фермент: полимер	Мономер: димер	Мономер: тример	Мономер: тетрамер
Лизоцим	5,6	15,2	41,8
Лизоцим:желатин (1:50)	17,3	111,6	412,3
Лизоцим:желатин (1:150)	62,7	–	–
Лизоцим:желатин (1:600)	–	–	–
Лизоцим:Na-КМЦ (1:50)	15,8	66,7	–
Лизоцим:Na-КМЦ (1:150)	17,7	–	–
Лизоцим:Na-КМЦ (1:600)	47,7	–	–

ного выхода белковых олигомеров из полимерной матрицы.

Из данных табл. 2 следует, что увеличение концентрации полимера в растворе приводит к возрастанию отношения интенсивности пиков мономера лизоцима к димеру и тримеру. При этом меньшее количество олигомерных структур лизоцима в случае Na-КМЦ можно объяснить более прочными взаимодействиями, нежели с желатином, что, по-видимому, способствует усилению пролонгированности гидролитического действия лизоцима при получении его мукоадгезивных пленочных форм.

Полученные результаты, затрагивающие молекулярные механизмы дезагрегации ассоциатов ли-

зоцима, индуцируемой процессом иммобилизации в исследуемые полимеры, могут быть использованы при разработке эффективных препаратов лизоцима пролонгированного действия, что актуально при решении биотехнологических и медицинских задач.

Выводы. Иммобилизация лизоцима за счет нековалентных взаимодействий в растворы желатина и Na-КМЦ приводит к диссоциации олигомерных структур фермента, при этом отмечено более прочное связывание лизоцима с Na-КМЦ.

S. S. Dekina, I. I. Romanovska, T. Yu. Gromovoy¹

Influence of polymers on lysozyme molecules association

A. V. Bogatsky's Physico-chemical Institute, NAS of Ukraine
86, Lustdorfskaya dor., Odessa, Ukraine, 65080

¹A. A. Chuyko Institute of Surface Chemistry, NAS of Ukraine
17, Generala Naumova Str., Kyiv, Ukraine, 03164

Summary

Aim. Study of lysozyme molecules behaviour at immobilization in gelatin and carboxymethyl cellulose sodium salt solutions by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI). **Methods.** Determination of the activity of lysozyme, both free and entrapped in gelatin and carboxymethyl cellulose sodium salt (Na-CMC) solutions, was conducted by bacteriolytic method. The enzyme interaction with polymers was confirmed by viscometry and mass-spectrometry methods. **Results.** The occurrence of lysozyme associates in aqueous solution in monomeric and oligomeric forms was shown. A non-valent interaction of the enzyme with solutions of polymers results in the dissociation of oligomeric associates into subunits, which depends on the support nature

and mass ratio of lysozyme to polymer. The quantitative retention of immobilized lysozyme hydrolytic activity was established, which favours obtaining mucoadhesive film forms with bacteriolytic action.

Conclusions. The lysozyme immobilization by non-valent interactions in gelatin solution and Na-CMC solutions causes dissociation of the enzyme oligomeric structures; a stronger lysozyme coupling with Na-CMC was noted.

Keywords: lysozyme, oligomers, dissociation, gelatin, carboxymethyl cellulose sodium salt, MALDI.

С. С. Декіна, І. І. Романовська, Т. Ю. Громовай

Вплив полімерів на процеси асоціації молекул лізоциму

Резюме

Мета. Дослідити поведінку молекул лізоциму при іммобілізації в розчині желатину і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) методом матрично активованої лазерної десорбції/іонізації (МАЛДІ). **Методи.** Гідролітичну активність вільного і включеного в розчин желатину та Na-КМЦ-лізоциму визначали бактеріолітичним методом. Взаємодію ферменту з полімерами підтверджено методами віскозиметрії і мас-спектрометрії. **Результати.** Показано наявність лізоциму у водному розчині у вигляді мономера та олігомерних форм. Нековалентна взаємодія ферменту з розчинами полімерів призводить до дисоціації олігомерних структур на субодиниці, що залежить від природи носія і масових співвідношень лізоцим:полімер. Встановлено кількісне збереження гідролітичної активності іммобілізованого лізоциму, що сприяє отриманню мукоадгезивних пліткових форм з бактеріолітичною дією. **Висновки.** Іммобілізація лізоциму за рахунок нековалентної взаємодії в розчині желатину і Na-КМЦ спричиняє дисоціацію олігомерних структур ферменту, при цьому відзначено міцніше зв'язування лізоциму з Na-КМЦ.

Ключові слова: лізоцим, олігомери, дисоціація, желатин, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, МАЛДІ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

1. Romanovskaya I. I., Davidenko T. I., Dekina S. S., Pashkin I. I., Andronati S. A. Immobilization of biologically active substances with an aim of potential diagnostic and medicinal means creation // J. Organic and Pharmaceutical Chemistry. – 2009. – 7, N 3 (27). – P. 69–78.
2. Punitha S., Girish Y. Polymers in mucoadhesive buccal drug delivery system – a review // Int. J. Res. Pharm. Sci. – 2010. – 1, N 2. – P. 170–186.
3. Kharenko E. A., Larionova N. I., Demina N. B. Mucoadhesive drug delivery systems (Review) // Pharmaceutical Chem. J. – 2009. – 43, N 4. – P. 21–29.
4. Dai G. L., Yu Y., Kang Q., Hu W. R. Studying aggregate in lysozyme solution by atomic force microscope // Chinese Chem. Lett. – 2004. – 15, N 10. – P. 1237–1240.
5. Artemova N. V., Kasakov A. S., Bumagina Z. M., Lyutova E. M., Gurvits B. Y. Protein aggregates as depots for the release of biologically active compounds // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – 377, N 2. – P. 595–599.
6. Levitsky A. P. Lysozyme instead of antibiotics. – Odessa: KP OGT, 2005. – 74 p.
7. Bartenev G. M., Frenkel S. Y. Physics of polymers. – Leningrad: Khimiya, 1990. – 332 p.
8. Binkley S. L., Ziegler C. J., Herrick R. S., Rowlett R. S. Specific derivatization of lysozyme in aqueous solution with $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3(+)$ // Chem. Commun. (Camb). – 2010. – 46, N 8. – P. 1203–1205.
9. Veis A. The macromolecular chemistry of gelatin. – Moscow: Pishchevaya promyshlennost', 1971. – 480 p.
10. Mikhailov O. V. Low-temperature template synthesis in metall-geksatcianoferrat (II) gelatin-immobilized matrix systems (review) // Russ. Chem. J. – 2000. – 44, N 3. – P. 70–79.

UDC 577.15 (088.8)

Received 15.04.11