

СОРБЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА ГИАЛУРОНИДАЗЫ ИЗ СЕМЕННИКОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Я.В. Мельникова

аспирант, кафедра биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет (СПХФУ)
E-mail: yana.melnikova@pharminnotech.com

А.Д. Яштубаева

магистр, кафедра биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет (СПХФУ)

Н.В. Глазова

к.х.н., доцент, кафедра биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет (СПХФУ)

Проведен сорбционно-хроматографический процесс очистки фермента гиалуронидазы в статических и динамических условиях на различных макропористых сорбентах. Показано, что оптимальным (перспективным) сорбентом является макропористый сорбент Nuvia™ S, который может быть использован в дальнейшем для выделения и очистки гиалуронидазы из экстракта семенников крупного рогатого скота

Ключевые слова: гиалуронидаза, макропористые сорбенты, очистка, сорбционно-хроматографический метод.

Для цитирования: Мельникова Я.В., Яштубаева А.Д., Глазова Н.В. Сорбционно-хроматографическая очистка гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(4):29–34. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-04-05>

Гиалуронидаза – фермент, расщепляющий кислые мукополисахариды, составляющие основу соединительной ткани. Она увеличивает проницаемость тканей и облегчает движение жидкости в межтканевых пространствах.

Обобщение и анализ литературных данных ряда авторов [1], а также сравнительный анализ свойств гиалуронидаз из различных источников сырья, проведенный на кафедре биотехнологии СПХФУ [2], показал, что гиалуронидазы, выделенные из различных источников сырья, обладают разными физико-химическими характеристиками, такими как молекулярная масса, диапазон энзиматической деятельности, стабильность и др. Поэтому выбор сырья во многом определяет особенности выделения и очистки фермента гиалуронидазы. В данной работе в качестве сырья выбраны семенники крупного рогатого скота, поскольку в настоящее время только это сырье используется для получения гиалуронидазы в промышленных масштабах.

Исследования особенностей ионообменной сорбции гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота показали, что фермент избирательно сорбируется на макропористом сульфокатионите КУ-23 [3, 4]. Использование этого сорбционно-хро-

матографического метода позволило заменить экологически небезопасный традиционный метод выделения гиалуронидазы с использованием органических растворителей. Однако ионит КУ-23 на сегодняшний день коммерчески недоступен, поэтому подбор современного сорбента для выделения и очистки гиалуронидазы является актуальной задачей.

Цель исследования – разработка сорбционно-хроматографического метода очистки гиалуронидазы из модельного раствора с использованием современных сорбентов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – гиалуронидаза в составе «Лидаза, субстанция» (ООО «Самсон-Мед», Санкт-Петербург), представляет собой модельный раствор гиалуронидазы с концентрацией белка 10 мг/мл и рН, доведенным до значения 4,0–4,5.

В работе использованы ионообменные макропористые сорбенты (табл. 1), а также:

1. *Методика определения белка с использованием биуретового реактива* [5].
2. *Методика определения гиалуронидазной активности в растворе* [6].
3. *Метод подготовки сорбентов к работе* [7, 8].

Таблица 1. Характеристика исследуемых сорбентов

Наименование	Производитель	Функциональная группа	Тип матрицы
KY-23	–	Сульфогруппа	Сополимер стирола и сульфодивинилбензола
Purolite® C160	Пьюролайт Интернешнл Лтд	Сульфогруппа	Сополимер полистирола и дивинилбензола
ReliSorb™ SP 400	ЗАО «БиоХимМак СТ»	Сульфогруппа	Гидрофильный сополимер метакрилата
DIAION UBK500	ЗАО «БиоХимМак СТ»	Сульфогруппа	Сополимер полистирола
Диасфер-АК-СП	ЗАО «БиоХимМак СТ»	Сульфопропильная группа	Гидрофильный акриловый сополимер метакрилата
Nuvia™ S	ООО «Био-Рад Лаборатории»	Сульфогруппа	Нет информации
MacroPrep® High S	ООО «Био-Рад Лаборатории»	Сульфогруппа	
UNOsphere™ S	ООО «Био-Рад Лаборатории»	Сульфогруппа	

4. Метод проведения сорбционно-хроматографического процесса в статических условиях. К навеске сорбента массой 100 мг добавляли 5 мл модельного раствора гиалуронидазы; сорбцию вели 24 ч при постоянном перемешивании. Определяли концентрацию белка в растворах для построения изотерм сорбции. При проведении процесса десорбции сорбент отделяли от раствора методом декантации, к каждой навеске приливали по 5 мл аммиачного раствора с рН 10,0–11,0, оставляли при перемешивании на 2 ч. Определяли концентрацию белка в растворах.

5. Метод проведения сорбционно-хроматографического процесса в динамических условиях. Процесс проводили на лабораторной колонке диаметром 0,6 см. Стадии процесса: насыщение 1–2 М раствором натрия хлорида; промывка стартовым ацетатным буферным раствором с рН 4,0–4,5; сорбция модельного раствора; промывка стартовым буферным раствором; десорбция аммиачным раствором с рН 10,0–11,0; регенерация. Операции десорбции и регенерации выполняли со скоростью 0,5 мл/мин, остальные операции – со скоростью 1 мл/мин. Осуществляли сбор фракций объемом 1 мл и определяли концентрацию белка и гиалуронидазную активность в растворах.

Для построения выходной кривой сорбции–промывки–десорбции–регенерации использовали относительные координаты, представленные в уравнениях:

$$\frac{C_i}{C_{\text{исх}}} = f\left(\frac{V_i - V_0}{V_{\text{кол}}}\right),$$

$$\frac{A_i}{A_{\text{исх}}} = f\left(\frac{V_i - V_0}{V_{\text{кол}}}\right),$$

где C_i и $C_{\text{исх}}$ – концентрация белка в i -й пробе и в исходном модельном растворе гиалуронидазы со-

ответственно, мг/мл; A_i и $A_{\text{исх}}$ – гиалуронидазная активность i -й пробы и исходного модельного раствора соответственно, УЕ/мл; V_i – объем i -й пробы, в которой проводили измерение белка, мл; V_0 – свободный объем колонки, мл; $V_{\text{кол}}$ – объем колонки, мл.

Статистический анализ данных выполняли с помощью программы Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что важнейшим параметром, характеризующим эффективность процесса сорбции вещества, является величина коэффициента распределения вещества K_d , который может быть вычислен по изотермам сорбции. По полученным значениям K_d можно прогнозировать выбор сорбента.

Изотермы сорбции представляют собой зависимость между равновесной концентрацией белка в фазе сорбента (\bar{C} , мг/г сорбента) и равновесной концентрацией белка в фазе раствора (C_p , мг/мл). Изотермы сорбции гиалуронидазы из модельного раствора, полученные на различных макропористых сорбентах (табл. 1), представлены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, изотермы имеют различный вид. Так, изотерма сорбции на KY-23 имеет форму изотермы Ленгмюра, на DIAION UBK500 – изотермы БЭТ, на остальных сорбентах наблюдается кооперативная изотерма.

Коэффициент распределения рассчитывали по тангенсу угла наклона секущей в точке изотермы при концентрации 3,6 мг/мл, которая соответствует равновесной концентрации гиалуронидазы в экстракте семенников крупного рогатого скота. Коэффициенты распределения, а также выход общего белка на стадии сорбции и десорбции в статических условиях представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, наименьшие коэффициенты распределения вещества K_d и выход общего белка на стадии сорбции и десорбции в статических условиях имеют сорбенты Purolite® C160 и DIAION UBK500. Поэтому они могут быть исключены из списка перспективных сорбентов для выделения гиалуронидазы.

Проведен сорбционно-хроматографический процесс очистки гиалуронидазы в динамических условиях. Выход на стадиях сорбции и десорбции для каждого исследованного сорбента представлен в табл. 3. Согласно приведенным результатам, в динамических условиях наибольший выход общего белка на стадии десорбции имеют сорбенты: КУ-23 (более 90%), Nuvia™ S и MacroPrep® High S (более 60%).

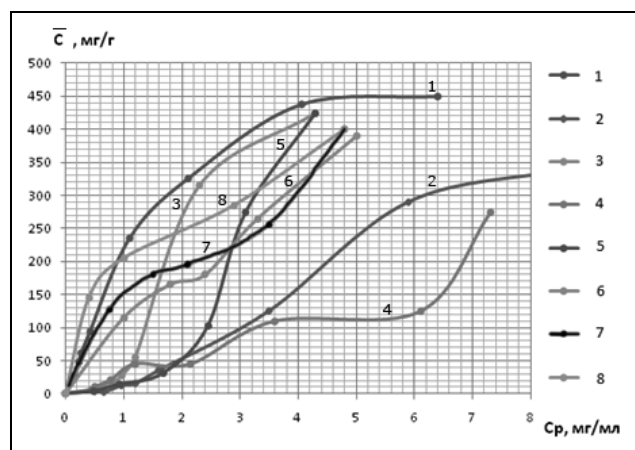


Рис. 1. Изотермы сорбции на различных сорбентах (нумерация справа соответствует нумерации в табл. 1)

Таблица 2. Коэффициент распределения и выход общего белка на стадиях сорбции и десорбции

№ п/п	Сорбент	Коэффициент распределения K_d , мл/г (при $C_p = 3,6$ мг/мл)	Выход общего белка, %	
			на стадии сорбции	на стадии десорбции
1	КУ-23	116,7	88	46
2	Purolite® C160	36,1	69	11
3	ReliSorb™ SP 400	109,7	85	53
4	DIAION UBK500	30,6	55	23
5	Диасфер-АК-СП	95,8	85	45
6	Nuvia™ S	80,6	78	33
7	MacroPrep® High S	73,6	80	48
8	UNOsphere™ S	90,3	88	45

Таблица 3. Выход общего белка на стадиях сорбции и десорбции

№ п/п	Сорбент	Выход общего белка, %	
		на стадии сорбции	на стадии десорбции
1	КУ-23	5	91
2	ReliSorb™ SP 400	39	26
3	Диасфер-АК-СП	26	35
4	Nuvia™ S	59	67
5	MacroPrep® High S	11	63
6	UNOsphere™ S	45	49

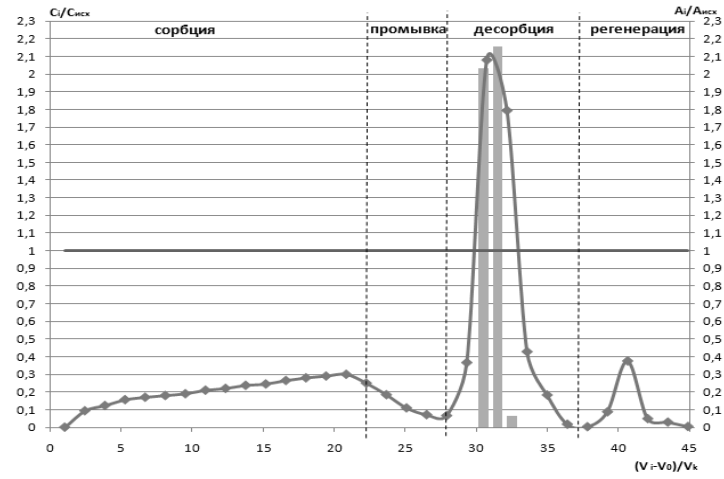
Для дальнейшей отработки хроматографического процесса в динамических условиях были выбраны следующие сорбенты:

КУ-23 – имеет высокий коэффициент распределения и выход на стадии сорбции в статических условиях, высокий выход на стадии десорбции в динамических условиях;

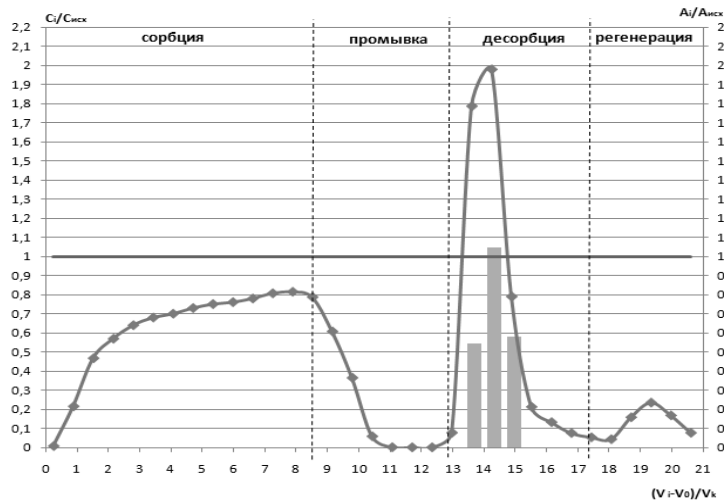
ReliSorb™ SP 400 – имеет высокий коэффициент распределения в статических условиях;

Nuvia™ S – показал высокий выход на стадии сорбции и десорбции в динамических условиях.

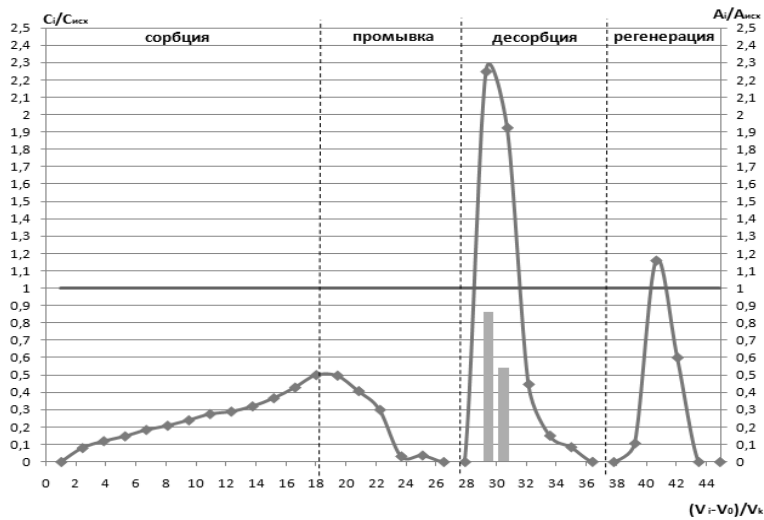
На рис. 2,а–в представлены выходные кривые сорбции – промывки – десорбции – регенерации гиалуронидазы из модельного раствора на сорбентах Nuvia™ S, КУ-23 и ReliSorb™ SP 400 соответственно. Как видно из рис. 2, сорбент Nuvia™ S позволяет осуществить концентрирование целевого продукта по общему белку и по активности.



а)



б)



в)

Рис. 2. Выходная кривая сорбции – промывки – десорбции – регенерации гиалуронидазы из модельного раствора по общему белку (кривая) и активности (столбчатая диаграмма) на сорбентах: а – Nuvia™ S; б – KY-23; в – ReliSorb™ SP 400

Таблица 4. Выход общего белка и гиалуронидазной активности на стадиях сорбции и десорбции на сорбентах КУ-23, ReliSorb™ SP 400 и Nuvia™ S (n=3)

Сорбент	Выход общего белка, %		Выход гиалуронидазной активности на стадии десорбции, %	Удельная гиалуронидазная активность элюата, у.е./мг белка
	на стадии сорбции	на стадии десорбции		
КУ-23	8±4	88±3	7,5±3,2	3524
ReliSorb™ SP 400	41±2	38±12	13,7±5,1	2895
Nuvia™ S	59±0,6	54±13	68,6±16,0	7257

В табл. 4 для каждого из исследуемых сорбентов представлен выход общего белка на стадии сорбции (количество сорбированного белка от исходного) и на стадии десорбции (количество десорбированного белка от сорбированного), выход гиалуронидазной активности на стадии десорбции (количество десорбированного белка от исходного), а также удельная гиалуронидазная активность элюата.

Как видно из табл. 4, наибольший выход общего белка и гиалуронидазной активности наблюдается при использовании сорбента Nuvia™ S. Наибольшая удельная гиалуронидазная активность элюата также отмечается при использовании сорбента Nuvia™ S. Результаты, полученные в ходе работы, защищены патентом [9].

ВЫВОДЫ

Изучение сорбционно-хроматографического процесса очистки гиалуронидазы на различных макропористых сорбентах в статических и динамических условиях показало, что оптимальным сорбентом, обеспечивающим наибольший выход общего белка и гиалуронидазной активности, является сорбент Nuvia™ S производства ООО «Био-Рад Лаборатории». Данный сорбент может быть использован в дальнейшем для выделения и очистки гиалуронидазы из экстракта семенников крупного рогатого скота, что дает возможность заменить традиционную технологию с использованием органических растворителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мельникова Я.В., Глазова Н.В. Свойства и биологическая роль гиалуронидаз из различных источников сырья // Сб. материалов VIII Всеросс. науч. конф. студентов и аспирантов с международным участием «Молодая Фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 23.04.18–24.04.18. СПб.: СПХФУ. 2018. С. 259–263.
2. Заинкова Н.В. Получение и сравнительный анализ свойств гиалуронидаз из различных источников: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. СПб. 1998. 142 с.
3. Игонина Л.М. Хроматографическое выделение и изучение свойств фермента гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота: Автореф. дис. ...канд. хим. наук: 03.00.04. СПб. 1996. 134 с.
4. Igonina L.M., Glazova N.V., El'kin G.E., Zainkova N.V. Sorption of hyaluronidase to macroporous sorbents // Applied Biochemistry and Microbiology. 1998. V. 34. № 5. 442–445.
5. Государственная Фармакопея XIII. Т. 1. М.: ФЭМБ. 2015. 1469 с.
6. Патент № 2417097 (РФ). Фармацевтическая композиция, содержащая гиалуронидазу и липосомы для наружного применения / В.Л. Багирова, Н.В. Глазова, М.Д. Дулькис, В.Н. Иванов. 27.04.11.
7. ГОСТ 20298-74. Смолы ионообменные. Катиониты. Технические условия (с Изменениями № 1-5). М.: Издательство стандартов. 1991. 13 с.
8. UNOsphere™ S and Q, Macro-Prep®, Nuvia™ S and Q High-Capacity Ion Exchange Media Instruction manual. Bio-Rad Laboratories Inc.
9. Патент № 2658605 (РФ). Способ получения гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота / Н.В. Глазова, А.М. Элиханов, О.В. Чайка, Я.В. Мельникова, О.Г. Дудник. 21.06.18.

Поступила после доработки 26 января 2019 г.

CHROMATOGRAPHIC PURIFICATION OF BOVINE TESTICULAR HYALURONIDASE

© Authors, 2019

I.V. Melnikova

Post-graduate Student, Department of Biotechnology, St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University
E-mail: yana.melnikova@pharminnotech.com

A.D. Yash tubaeva

Master Student, Department of Biotechnology, St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University

N.V. Glazova

Ph.D. (Chem.), Associate Professor, Department of Biotechnology, St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University

Hyaluronidase is an enzyme that breaks down the acidic mucopolysaccharides which are the basis of connective tissue. Integration and analysis of the literature data of different authors, that presented in the article [1], and comparative analysis of the properties of hyaluronidase from different sources, that was carried out at the Department of Biotechnology SPCPU [2], showed that hyaluronidases isolated from various sources possess different physicochemical characteristics such as molecular weight, the range of enzymatic activities, stability etc. Therefore, the choice of raw materials determines the approaches to hyaluronidase isolation and purification. In this investigation the bovine testes were chosen as a raw material, since currently only this raw material is used to produce hyaluronidase on an industrial scale.

Studies of ion exchange sorption of hyaluronidase from the bovine testes showed that the enzyme is selectively sorbed on macroporous sulfocationite KU-23 [3, 4]. The use of this chromatographic method made it possible to replace the unsustainable conventional method of isolating hyaluronidase using organic solvents. However, ionite KU-23 is currently commercially unavailable, that's why the selection of modern sorbent for the isolation and purification of hyaluronidase is a crucial task.

The aim of this investigation was to develop a chromatographic procedure of hyaluronidase purification from test solution with the use of modern macroporous sorbents.

Materials and methods. The object of research – hyaluronidase in active pharmaceutical ingredient «Lidaza», which is manufactured by «Samson-Med». The object of research is a test solution of hyaluronidase with a protein concentration 10 mg / ml and pH 4.0-4.5. Methods: method for determination of protein with the use of biuret reagent [5]; method for determination of hyaluronidase activity in solution [6]; method for preparation of sorbents [7, 8]; method of chromatographic procedure under static and dynamic condition.

Conclusion. The study of chromatographic purification of hyaluronidase under static and dynamic conditions with the use of macroporous sorbents revealed that the optimal sorbent is Nuvia™ S (Bio-Rad Laboratories, Inc). That sorbent provides for the maximum of the protein and hyaluronidase activity yield. Hereafter Nuvia™ S can be used for isolation and purification of hyaluronidase from the orchic extract. New technology can replace conventional technology that uses organic solvents.

Key words: *hyaluronidase, macroporous sorbents, purification, chromatographic method.*

For citation: Melnikova I.V., Yashtubaeva A.D., Glazova N.V. Chromatographic purification of bovine testicular hyaluronidase. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(4):29–34. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-04-05>

REFERENCES

- Mel'nikova Ya.V., Glazova N.V. Svoystva i biologicheskaya rol' gialuronidaz iz razlichnyh istochnikov syr'ya // Sb. materialov VIII Vseross. nauch. konf. studentov i aspirantov s mezhdunarodnym uchastiem «Molodaya Farmaciya – potencial budushchego» (Sankt-Peterburg, 23.04.18–24.04.18). SPb.: SPHFU. 2018. S. 259–263.
- Zainkova N.V. Polucheniye i sravnitel'nyy analiz svoystv gialuronidaz iz razlichnyh istochnikov: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk: 03.00.04. SPb. 1998. 142 s.
- Igonina L.M. Hromatograficheskoye vydeleniye i izucheniye svoystv fermenta gialuronidazy iz semennikov krupnogo rogatogo skota: Avtoref. dis. ...kand. him. nauk: 03.00.04. SPb. 1996. 134 s.
- Igonina L.M., Glazova N.V., El'kin G.E. et al. Sorption of hyaluronidase to macroporous sorbents // Applied Biochemistry and Microbiology. V. 998. № 5. 442–445
- Gosudarstvennaya Farmakopeya XIII. T. 1. M.: FEHMB. 2015. 1469 s.
- Patent № 2417097 (RF). Farmaceuticheskaya kompozitsiya, sodержashchaya gialuronidazu i liposomy dlya naruzhnogo primeneniya / V.L. Bagirova, N.V. Glazova, M.D. Dul'kis, V.N. Ivanov. 27.04.11.
- GOST 20298-74. Smoly ionoobmennyye. Kationity. Tekhnicheskiye usloviya (s Izmeneniyami N 1-5). Vzamen GOST 13505-68, GOST 5.1428-72. Vved. 1976-01-01. M.: Izdatel'stvo standartov. 1991. 13 s.
- UNOsphere™ S and Q, Macro-Prep®, Nuvia™ S and Q High-Capacity Ion Exchange Media Instruction manual. Bio-Rad Laboratories Inc.
- Patent № 2658605 (RF). Sposob polucheniya gialuronidazy iz semennikov krupnogo rogatogo skota / N.V. Glazova, A.M. Elikhanov, O.V. Chajka, Ya.V. Mel'nikova, O.G. Dudnik. 21.06.18.