



## НОВЫЙ СПОСОБ КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЛИЗОЦИМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

© 2019 г. П. А. Левашов\*, \*\*, #, Д. А. Матолыгина\*, \*\*, Е. Д. Овчинникова\*\*\*,  
И. Ю. Адамова\*\*\*\*, О. А. Дмитриева\*\*\*, Н. С. Покровский\*\*, \*\*\*\*\*, Н. Л. Еремеев\*

\*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет,  
Россия, 119234, Москва, Ленинские Горы, 1, стр. 3

\*\*Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана, Межотраслевой инженеринговый  
центр композиционных материалов, Россия, 105005, Москва, Лефортовская наб., 1

\*\*\*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства Здравоохранения РФ,  
Институт экспериментальной кардиологии, Россия, 121359, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А

\*\*\*\*Научно-Производственная Фирма ПОКАРД, Россия, 121359, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А

\*\*\*\*\*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины,  
Россия, 119991, Москва, Ломоносовский пр-т., дом 27, корп. 1

Поступила в редакцию 08.08.2018 г.

После доработки 20.08.2018 г.

Принята к публикации 29.08.2018 г.

Проведено сравнение разных методов ковалентной иммобилизации лизоцима с целью выбора оптимального подхода к получению материала, пригодного для медицинского применения в процедурах экстракорпоральной терапии. Предложен новый способ иммобилизации лизоцима на полимерной агарозной матрице, обеспечивающий одновременно эффективное действие лизоцима на бактериальные клетки и отсутствие утечки фермента из материала. Полученный иммобилизованный лизоцим проявлял бактериолитическую активность в отношении грамположительных бактерий *Micrococcus luteus* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*. Продемонстрировано явление уширения рН-оптимума активности фермента при его иммобилизации. Показана совместимость иммобилизованного лизоцима с цельной кровью человека.

*Ключевые слова:* иммобилизованный лизоцим, бактериолитическая активность, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, экстракорпоральная терапия

DOI: 10.1134/S0132342319020052

### ВВЕДЕНИЕ

Бактериолитический фермент лизоцим известен давно и широко применяется в медицине и биотехнологии. В последнее время в связи с появлением новых устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий все больший интерес привлекают бактериолитические ферменты как альтернатива антибиотикам [1–3]. Получение и использование препаратов иммобилизованного лизоцима является важной задачей, расширяющей спектр возможностей применения данного фермента. Актуально создание препаратов иммобилизованного лизоцима, пригодных для процедур экстракорпоральной терапии при очистке плазмы крови и цельной крови пациентов. В настоящее время существуют различные способы нековалентной иммобилизации лизоцима [4–8], однако все они предполагают возможность утечки лиганда из по-

лучаемых материалов, что исключает их применение в экстракорпоральной терапии. Примеры ковалентной иммобилизации лизоцима также существуют [8–10], однако остаются непроработанными вопросы совместимости полученных таким образом материалов с плазмой крови и цельной кровью, а также возможности масштабирования подобных технологий для практического применения в медицине. Отдельной важной задачей является более глубокая проработка вопросов эффективности действия иммобилизованного лизоцима на целые клетки бактерий, а не на синтетические субстраты.

В нашем исследовании была поставлена цель разработки простой методики иммобилизации, удобной для внедрения в производство, не требующей дорогостоящих реагентов, а также максимально исключаящей утечку лиганда из материала. В качестве матрицы для иммобилизации лизоцима мы выбрали материал на основе сшитой

# Автор для связи (тел: +7 (916) 67-14-704, эл. почта: levashov@yahoo.com).

**Таблица 1.** Количество иммобилизованного лизоцима и выход реакции иммобилизации при использовании разных методов активации агарозной матрицы

Метод иммобилизации*	1	2	3
Количество иммобилизованного лизоцима, мг/мл матрицы	14.4 ± 0.2	13.8 ± 0.2	14.8 ± 0.2
Выход иммобилизации, %	96	92	99

\* Описание методов 1–3 см. текст.

агарозы с размером гранул 200 мкм (Work Beads 200 SEC), подобный сорбентам, для которых ранее уже была показана совместимость с плазмой крови и с цельной кровью [11]. Для испытания антибактериального действия нового материала нами выбраны в качестве субстратов клетки грамположительных бактерий *Micrococcus luteus* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для присоединения лизоцима к нерастворимой углеводной полимерной матрице мы использовали аминокруппы боковых радикалов трех остатков лизина, не участвующих в катализе и экспонированных на поверхности молекулы белка [12]. Для иммобилизации лизоцима применили три метода:

(1) Присоединение лизоцима к матрице, активированной BrCN. При активации из гидроксильных групп полисахарида получается цианат R-O-CN, который затем реагирует с аминокруппами лизоцима с образованием производных изомочевины R-O-CNH-NH-L.

(2) Присоединение лизоцима к матрице, окисленной NaIO<sub>4</sub> до получения альдегидных групп из диольных группировок полисахарида, которые способны взаимодействовать с аминокруппами поверхности белка с получением оснований Шиффа, далее восстанавливаемых с помощью NaBH<sub>4</sub>.

(3) Присоединение лизоцима к аминированной агарозной матрице конденсацией с участием глутарового альдегида с получением оснований Шиффа, которые затем восстанавливаются с помощью NaBH<sub>4</sub>. Аминированная матрица предварительно получается аналогично способу (2) присоединением по альдегидным группам окисленной матрицы диаминогексана. Лизоцим в методе (3) присоединен к матрице молекулярным спейсером –NH-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-NH-C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>-NH–, где первые 2 NH-группы слева принадлежат диаминогексану, присоединенному к матрице, а аминокруппа справа – принадлежит боковому радикалу остатка лизина на поверхности лизоцима, связанного через остаток глутарового альдегида, восстановленного боргидридом в составе оснований Шиффа, образованных им с аминокруппой диаминогексана и ε-аминокруппой лизина (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>).

Согласно данным табл. 1, лизоцим практически количественно включается в матрицу. Однако дополнительные исследования смывов с препаратов иммобилизованного лизоцима выявили то, что в случае фермента, иммобилизованного с помощью BrCN, при хранении препарата имеет место утечка лизоцима до 0.5 мкг с 1 мл матрицы в неделю (около 0.003% от иммобилизованного количества фермента). Эта утечка обнаруживается только по активности, так как пригодные для нашей работы методы определения белка не позволяют достоверно определять количества менее 1 мкг/мл. Утечка иммобилизованного фермента продолжалась с каждой отмывкой препарата. Утечки лизоцима не было обнаружено в случае активации матрицы окислением NaIO<sub>4</sub>. Мы связываем явление утечки лиганда с матрицы, активированной BrCN, меньшей стабильностью получаемых этим способом связей с белком.

На рис. 1 представлены сравнительные данные по активности различных типов иммобилизованного лизоцима. На данном рисунке для сравнения приведена также активность растворимого лизоцима. Для того чтобы активности можно было сравнивать в одних координатах, растворимый лизоцим брали в концентрации 0.1 мкг/мл, а иммобилизованный лизоцим добавляли в количестве 35 мкл на 1 мл смеси. При соизмеримых с растворимым ферментом уровнях активности, только малая часть лизоцима, иммобилизованного в полимерных гранулах, стерически доступна и взаимодействует с субстратом. 35 мкл иммобилизованного фермента содержат около 525 мкг лизоцима, что в 5250 раз больше количества растворимого лизоцима, взятого в эксперименте для сравнения. Эта ситуация неудивительна ввиду большого размера субстрата (бактериальных клеток). В любом случае, лизоцим является коммерчески доступным веществом, поэтому необходимость иммобилизации избыточных количеств не должна стать серьезным препятствием для технологического применения. Как видим из рис. 1, лизоцим, иммобилизованный методом (1) – активации матрицы BrCN, и лизоцим, иммобилизованный методом (3) – активации матрицы окислением NaIO<sub>4</sub> с последующим присоединением дополнительного молекулярного спейсера, практически одинаково эффективно действуют как на клетки

*M. luteus*, так и на клетки *E. coli*. Соотношение эффективностей в отношении двух видов бактерий у этих вариантов иммобилизованного лизоцима сходно с таковым для растворимого фермента. В то же время препарат иммобилизованного лизоцима, полученный методом (2) — без дополнительного спейсера, имеет существенно более низкую активность по отношению к грамположительным клеткам *M. luteus*. Вероятно, в этом случае иммобилизованный фермент распределяется в матрице таким образом, что возникают дополнительные стерические препятствия для его взаимодействия с бактериальными клетками.

В дальнейшей работе мы использовали вариант лизоцима, иммобилизованного методом (3). В этом варианте проявляется высокая эффективность действия фермента как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактериальные клетки, а также не происходит утечки лиганда при хранении.

Иммобилизованный лизоцим характеризуется меньшей зависимостью активности от pH и уширением оптимума (рис. 2). Это явление особенно заметно в отношении клеток *M. luteus*. Явление сглаживания зависимости активности от pH может быть связано, на наш взгляд, либо с искажениями конформации фермента при иммобилизации, либо с наложением кинетики массопереноса (диффузии) на ферментативную кинетику. В любом случае, для медицинского применения расширенный диапазон pH эффективного действия иммобилизованного фермента даже предпочтительней. Явления изменения профиля зависимости активности от pH при иммобилизации были также отмечены в работах, посвященных нековалентному включению лизоцима в криогель [4], сорбции лизоцима на наночастицах целлюлозы [5], ковалентной и нековалентной иммобилизации лизоцима на хитозане [8].

В табл. 2 представлены результаты по снижению обсемененности жидкости, пропускаемой через колонку с иммобилизованным лизоцимом при физиологических значениях ионной силы и pH. После трехкратного пропускания суспензии клеток было лизировано (разрушено) 40% бактерий. Количество лизированных клеток после 12 пропусканий составило уже 75%, что демонстрирует эффективность действия иммобилизованной формы фермента в данном эксперименте.

Результаты проверки гемосовместимости препарата иммобилизованного лизоцима приведены в табл. 3. Почти все исследуемые параметры являются незначительными. Немного изменяется показатель по концентрации тромбоцитов, однако параметры имеют допустимый уровень, не выходящий за рамки нормы [13]. Следовательно, можно утверждать, что сорбент с иммобилизованным лизоцимом совместим с цельной кровью.

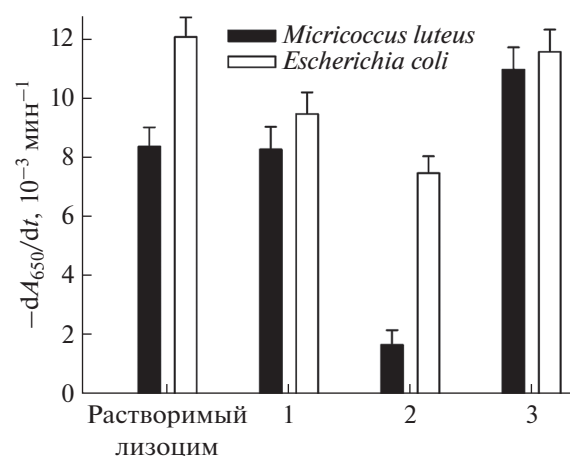


Рис. 1. Сравнение активности растворимого лизоцима и различных препаратов иммобилизованного лизоцима, полученных методами 1–3.

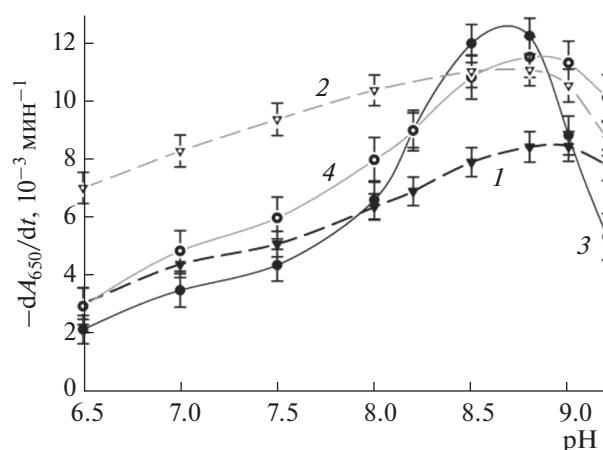


Рис. 2. Сравнение зависимости активности от pH для растворимого (1, 3) и иммобилизованного лизоцима (2, 4) на клетках *M. luteus* (1, 2), на клетках *E. coli* (3, 4).

Таким образом, настоящее исследование позволило подобрать методику иммобилизации лизоцима, исключая утечку лиганда и одновременно обеспечивающую эффективное бактериолитическое действие как на грамположительные клетки *M. luteus* так и на грамотрицательные клетки *E. coli*. То, что новый сорбционный материал обладает совместимостью с цельной кровью, еще больше расширяет возможности его применения в медицине. Дальнейшая оптимизация структурно функциональных свойств материалов с иммобилизованным лизоцимом может дополнительно улучшить их характеристики. В дальнейших разработках активность иммобилизованного лизоцима можно будет повысить с помощью: а) иммобилизации большего количества фермента; б) увеличения размера и подвижности молекулярного спейсера для увеличения стерической доступности лизо-

**Таблица 2.** Изменение концентрации клеток *M. luteus* при пропускании бактериальной суспензии через колонку с иммобилизованным лизоцимом\*

Количество циклов пропускания через колонку	$A_{650}$	Объем суспензии клеток, мл	Концентрация клеток бактерий, $10^7$ /мл	Снижение обсемененности по сравнению с исходной, %
0	0.502	10	2.5	0
3	0.216	14	1.5	40
6	0.125	18	1.1	55
9	0.07	22	0.8	69
12	0.05	25	0.6	75

\* Сорбент получен по методу 3.

**Таблица 3.** Параметры крови после контакта крови с иммобилизованным лизоцимом

Параметры	Контроль	После контакта с сорбентом*
Эритроциты, $10^{12}$ кл/л	$5.1 \pm 0.2$	$4.8 \pm 0.3$
Средний объем эритроцита, фл	$81.0 \pm 3.1$	$81.5 \pm 2.9$
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	$25.8 \pm 1.6$	$24.9 \pm 1.8$
Тромбоциты, $10^9$ кл/л	$210 \pm 26$	$161 \pm 18$
Средний объем тромбоцитов, фл	$7.7 \pm 1.1$	$7.5 \pm 1.0$
Лейкоциты, $10^9$ кл/л	$5.4 \pm 0.4$	$4.5 \pm 0.5$
Лимфоциты, $10^9$ кл/л	$1.5 \pm 0.3$	$1.4 \pm 0.3$
Моноциты, $10^9$ кл/л	$0.55 \pm 0.11$	$0.45 \pm 0.12$

\* Сорбент получен по методу 3.

цима; в) выбора матрицы с более крупными порами в гранулах.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и оборудование.** В работе использованы следующие реактивы: лизоцим из куриных яиц, *M. luteus* (лиофилизированные клетки), ВгСN, диоксан, 2-аминоэтанол, 1,2-диаминоэтан,  $\text{NaIO}_4$ , 1,6-диаминогексан, ацетат натрия,  $\text{NaNH}_4$ ,  $\text{NaN}_3$ , EDTA, MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота), ацетат натрия, Трис (Sigma, США); KOH, NaOH,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , HCl, дрожжевой экстракт (Хеликон, Россия); агар (Ferk, Германия); полимерная матрица WorkBeads 200SEC (Bio-Works, Швеция); глутаровый альдегид (Panreac, Испания); гепарин (фармакологическая субстанция) (Bio-iberica, Испания), уксусная кислота (Реахим, Россия). В работе использован музейный штамм *E. coli* JM109, предоставленный Dr. J. Messing (Waksman Institute, New Jersey, США). В работе использовалась бидистиллированная вода. Было использовано следующее оборудование: спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu, Япония), термо-

стат суховоздушный ТВ-80-1 (МедЛайф, Россия), термостат водяной LT-105a (LOIP, Россия), гем-анализатор Elite3 (Erba Mannheim, Чехия), весы аналитические OH-PA64 (Ohaus, США), шейкер-ротатор Multi Bio RS-24 (BioSan, Латвия), центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия).

**Подготовка субстратов.** Рост клеток *E. coli* проводили в соответствии со стандартной методикой [14]. Суспензию клеток (приблизительно  $10^9$  клеток в мл) в растворе 0.15 М NaCl замораживали жидким азотом и хранили при температуре  $-70^\circ\text{C}$  не более 3 недель. Образцы клеток *E. coli* размораживали непосредственно перед экспериментом. Препарат клеток *M. luteus* готовили добавлением 5 мг высушенных клеток в 10 мл буферной смеси 0.01 М Tris-MES-ацетат с pH 8.8 при температуре  $20^\circ\text{C}$ . Перед использованием суспензии клеток *E. coli* и *M. luteus* центрифугировали в течение 5 мин при скорости 500 об./мин при температуре  $5^\circ\text{C}$  и ресуспендировали в первоначальной буферной смеси.

**Иммобилизация лизоцима при помощи активации матрицы ВгСN (метод 1).** При иммобилизации за основу была взята стандартная методика акти-

вазии с помощью BrCN [15]. Матрицу WorkBeads 200SEC (30 мл) промывали на стеклянном фильтре при температуре 5°C водой (150 мл), затем раствором, содержащим 4 М КОН и 1.6 М  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  (150 мл). Матрицу переносили в закрывающуюся емкость, добавляли раствор, содержащий 4 М КОН и 1.6 М  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  (30 мл), туда же добавляли раствор BrCN в диоксане (1 г/мл, 3.6 мл). Смесь выдерживали на ледяной бане 10 мин при помешивании. Активированную матрицу помещали на стеклянный фильтр, промывали при температуре 5°C водой (150 мл) и затем буферной смесью 0.2 М  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -NaOH, pH 8.0 (150 мл). Затем матрицу переносили в заранее подготовленную закрытую емкость, добавляли раствор лизоцима в буферной смеси 0.2 М  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -NaOH, pH 8.0 (30 мл, концентрация 10 мг лизоцима в 1 мл). Смесь выдержали в течение 3 ч при температуре 20°C при помешивании на шейкере-ротаторе (5 об./мин). Препарат иммобилизованного лизоцима промывали на стеклянном фильтре водой (150 мл), затем для блокировки непрореагировавших групп добавили раствор 1 М этаноламина (30 мл, pH 8.0 доведен 4 М раствором HCl), выдерживали при температуре 20°C в течение 2 ч. Препарат промывали на стеклянном фильтре водой (150 мл), затем буферной смесью А: 10 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7.0, содержащей 130 мМ NaCl (150 мл).

**Иммобилизация лизоцима на матрицу, активированную с помощью периодата натрия (метод 2). Амнирование агарозной матрицы (для метода 3).** За основу брали стандартную методику [16]. Матрицу промывали водой, затем добавляли двукратный объем 2% раствора  $\text{NaIO}_4$ , инкубировали 2 ч при температуре 20°C на шейкере-ротаторе (5 об./мин) и промывали 20-кратным объемом дистиллированной воды. К активированной матрице добавляли либо раствор лизоцима (для метода 2) в буферной смеси 30 мМ  $\text{NaHCO}_3$ -NaOH, pH 10.0 (15 мг фермента на 1 мл геля) либо однократный объем 2 М раствора 1,6-диаминогексана (для амнирования матрицы для метода 3). Смесь инкубировали 2 ч при температуре 25°C на шейкере-ротаторе (5 об./мин). К полученному препарату добавляли двукратный объем свежеприготовленного 0.5% водного раствора  $\text{NaNH}_4$  и инкубировали 30 мин, при перемешивании. Обработку  $\text{NaNH}_4$  повторяли дважды. Далее препарат промывали 5-кратным объемом 1 М раствора NaCl и 10-кратным объемом буферной смеси А.

**Иммобилизация лизоцима на амнированную матрицу с использованием глутарового альдегида (метод 3).** К 10 мл 50% суспензии амнированной матрицы в буферной смеси 30 мМ  $\text{NaHCO}_3$ -NaOH, pH 10.0, добавляли 0.56 мл 25% раствора глутарового альдегида и перемешивали в течение 30 мин на шейкере-ротаторе (5 об./мин) при 25°C. Затем

гель промывали на стеклянном фильтре 50 мл исходного буферного раствора, переносили в отдельную емкость, добавляли 10 мл раствора лизоцима в том же буферном растворе (концентрация лизоцима 7.5 мг/мл). Смесь инкубировали 1 ч на шейкере-ротаторе (5 об./мин) при 25°C. Полученный сорбент обрабатывали 10 мл 0.5% водного раствора  $\text{NaNH}_4$  дважды. Время каждой инкубации с раствором составило 20 мин. После каждой блокировки сорбент промывали 200 мл дистиллированной воды. По окончании препарат промывали буферной смесью А (150 мл).

**Количество иммобилизованного лизоцима** определяли по разнице между добавленным количеством и количеством в надосадочной жидкости после процедуры иммобилизации. Концентрацию лизоцима определяли спектрофотометрически по оптическому поглощению раствора при длине волны 280 нм.

**Препарат иммобилизованного лизоцима хранили** при температуре 5°C в виде 50% суспензии (содержащей 50% осадка по объему) в буферной смеси А. Перед экспериментами препарат промывали на стеклянном фильтре 10-кратным объемом той же буферной смеси. При хранении препарата более 2 недель, добавляли в буферную смесь  $\text{NaN}_3$  до концентрации 0.3% по массе. Активность иммобилизованного лизоцима не менялась в пределах погрешности эксперимента в течение 3 месяцев хранения.

**Определение активности растворимого лизоцима на клетках.** Бактериолитическую активность лизоцима определяли турбидиметрическим методом по падению оптического поглощения суспензии клеток при длине волны 650 нм. Скорость изменения оптического поглощения прямо пропорциональна скорости лизиса клеток [17, 18]. Измерения проводились в буферной смеси 0.01 М Tris-MES-ацетат с pH 8.8 при температуре 37°C, если не указано иное. Количество добавляемых в реакционную смесь бактериальных клеток подбирали таким образом, чтобы начальное оптическое поглощение было 0.5–0.55. Измерения оптического поглощения проводили в кюветах с притертой крышкой объемом 0.5 мл. В экспериментах по измерению активности лизоцима его концентрация была 0.1 мкг/мл раствора, если не указано иное. После добавления фермента в кювету прописывали кинетику изменения оптического поглощения в течении 5–7 мин, определяли начальные скорости на участке 2–3 мин. Для учета поправки скорости лизиса на фоновое изменение оптического поглощения ставили контрольные эксперименты без добавления фермента. Скорость ферментативного лизиса клеток пропорциональна концентрации фермента в диапазоне до 2 мкг/мл.

**Определение активности иммобилизованного лизоцима на клетках.** Аналогично, как и в случае растворимого лизоцима, измеряли падение оптического поглощения суспензии клеток при длине волны 650 нм. Измерения проводились в той же буферной смеси и той же температуре, если не указано иное. Количество добавляемых в реакционную смесь бактериальных клеток подбирали таким образом, чтобы начальное оптическое поглощение было 0.5–0.55. В смесь добавляли препарат иммобилизованного лизоцима в расчете 35 мкл на 1 мл раствора. Реакционную смесь инкубировали в пробирках (по 10 мл) в термостате на шейкере-ротаторе при 10 об./мин (при скоростях вращения более 14 об./мин появляется эффект разрушения клеток без действия фермента, вероятно, вследствие механического воздействия гранул препарата). Отбирали из смеси образцы по 1 мл каждые 2 мин, при этом оставляли дальше инкубироваться остальную смесь. Отобранные образцы объемом по 1 мл помещали в пробирки, давали осесть частицам иммобилизованного фермента (0.5 мин), затем измеряли оптическое поглощение надосадочной жидкости (суспензии клеток без иммобилизованного фермента). Строили зависимость изменения оптического поглощения во времени в течение 16 мин, по наклону зависимости определяли скорость изменения оптического поглощения во времени. Для учета поправки скорости лизиса на фоновое изменение оптического поглощения ставили контрольные эксперименты, добавляя в смесь матрицу без лизоцима вместо препарата иммобилизованного фермента. Скорость ферментативного лизиса клеток пропорциональна количеству препарата иммобилизованного фермента в диапазоне до 70 мкл/мл смеси.

**Исследование смыва иммобилизованного лизоцима с гелей препаратов.** В колонку высотой 5 см и сечением 1 см<sup>2</sup> помещали 2 мл 50% суспензии сорбента. Собирали выходящий самотеком смыв с сорбента. Далее аналогично процедуре измерения активности растворимого лизоцима измеряли скорость лизиса бактериальных клеток *M. luteus* при добавлении к ним полученного на выходе из колонки смыва. Строили калибровочную зависимость активности от концентрации лизоцима, измеренной в буферной смеси, в которой хранился иммобилизованный фермент. По уровню активности определяли количество лизоцима в смывах.

**Изучение лизиса бактериальных клеток при пропусках их через колонку с иммобилизованным лизоцимом при физиологических значениях ионной силы и pH.** Использовали 10 мл суспензии клеток *M. luteus* в буферной смеси А и колонку высотой 5 см и сечением 0.8 см<sup>2</sup>, с 4 мл иммобилизованного лизоцима, промытого той же буферной сме-

сью. Через колонку многократно пропускали суспензию клеток, после 3-го, 6-го, 9-го и 12-го пропускания вытесняли из колонки остатки препарата суспензии клеток с помощью дополнительной порции буферной смеси объемом 4 мл. Изменяли оптическое поглощение раствора содержащего клетки ( $A_{650}$ ), с учетом разведения рассчитывали остаточную концентрацию неразрушенных клеток из расчета, что  $A_{650}$  при значениях менее 1 пропорционально концентрации клеток, 1 единице оптического поглощения при длинах волн 600–650 нм соответствует приблизительно  $5 \times 10^7$  клеток в мл [19].

**Исследование гемосовместимости сорбента.** Кровь доноров брали в пробирки объемом 50 мл с добавлением гепарина до его конечной концентрации 2.5 Ед./мл (1 “единица действия” соответствует физиологической активности (препятствию свертывания крови) 0.077 мг эталонного гепарина). Операции с сорбентом проводили при температуре 20°C. Сорбент (200 мкл) в микроколонке с фильтром с 133-мкм порами промывали 2 мл физиологического раствора (0.15 М NaCl), снизу на колонку надевали силиконовый шланг диаметром 0.5 мм для увеличения времени контакта крови с сорбентом. Проводили самотеком хроматографию каждой порции сорбента с 4 мл крови, время контакта составляло от 25 до 30 мин. Кровь после хроматографии собирали в пробирку объемом 15 мл. В качестве отрицательного контроля использовали колонку без сорбента. В кровь после колонки добавляли EDTA до конечной концентрации 10 мМ, помещали в пробирку по 1 мл и проводили измерения на геманализаторе, определяя параметры эритроцитов, тромбоцитов, лимфоцитов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана в рамках Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” по теме “Создание новых медицинских сорбционных материалов для экстракорпоральных методов лечения сепсиса, сочетающих противомикробное действие и способность к сорбции бактериальных токсинов”. Шифр заявки 2017-14-576-0053-142. Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57417X0181. Соглашение № 14.574.21.0181.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Donovan D.M.* // Recent Pat Biotechnol. 2007. V. 1. P. 113–122.
2. *Fischetti V.A.* // Curr. Opin. Microbiol. 2008. V. 11. P. 393–400.

3. *Love M.J., Bhandari D., Dobson R.C.J., Billington C.* // *Antibiotics*. 2018. V. 7. P. 1–25.
4. *Dekina S.S., Romanovskaya I.I., Ovsepyan A.M., Molo-daya A.L., Pashkin I.I.* // *Biotechnol. Acta*. 2014. V. 7. P. 69–73.
5. *Bayazidi P., Almasi H., Asl A.K.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 107. P. 2544–2255.
6. *Kao K.Ch., Lin T.S., Mou Ch.Y.* // *J. Phys. Chem. C*. 2014. V. 118. P. 6734.
7. *Jiang S.S., Qin Ya., Yang J., Li M., Xiong L., Sun Q.J.* // *Food Chem.* 2017. V. 221. P. 1507.
8. *Lian Z.X., Ma Zh.S., Wei J., Liu H.* // *Proc. Biochem.* 2012. V. 47. P. 201–208.
9. *Wu Y., Daeschel M.A.* // *J. Food Sci.* 2007. V. 72. P. M369–M374.
10. *Minier M., Salmain M., Yacoubi N., Barbes L., Méthivier C., Zanna S., Pradier C.M.* // *Langmuir*. 2005. V. 21. P. 5957–5965.
11. *Левашов П.А., Овчинникова Е.Д., Фрид Д.А., Азьмуко А.А., Афанасьева М.И., Коткина Т.И., Афанасьева О.И., Адамова И.Ю., Покровский С.Н.* // *Био-орган. химия*. 2015. Т. 41. С. 553–558. [*Levashov P.A., Ovchinnikova E.D., Fried D.A., Azmuko A.A., Afanasjeva M.I., Kotkina T.I., Afanasjeva O.I., Adamova I.Yu., Pokrovsky S.N.* // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 494–499.]
12. *Kleopina G.V., Kravchenko N.A., Kaverzneva E.D.* // *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR. Division of chemical science*. 1965. V. 14. P. 806–812.
13. *Zaninetti C., Biino G., Noris P., Melazzini F., Civaschi E., Balduini C.L.* // *Haematologica*. 2015. V. 100. P. 338–340.
14. *Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
15. *Porath J., Axén R.* // *Methods Enzymol.* 1976. V. 44. P. 19–45.
16. *Guisán J.M.* // *Enzyme and Microbial Technology*. 1988. V. 10. P. 375–382.
17. *Levashov P.A., Sedov S.A., Belogurova N.G., Levashov A.V., Shlpovskov S.* // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 2161–2163.
18. *Матольгина Д.А., Душутина Н.С., Овчинникова Е.Д., Еремеев Н.Л., Белогурова Н.Г., Атрошенко Д.Л., Смирнов С.А., Савин С.С., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А.* // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2018. Т. 59. С. 125–131. [*Matolygina D.A., Dushutina N.S., Ovchinnikova E.D., Eremeev N.L., Belogurova N.G., Atroshenko D.L., Smirnov S.A., Savin S.S., Tishkov V.I., Levashov A.V., Levashov P.A.* // *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2018. V. 73. P. 47–52.]
19. *Matsuura K., Asano Y., Yamada A., Naruse K.* // *Sensors*. 2013. V. 13. P. 2484–2493.

## A New Method of Covalent Lysozyme Immobilization: Preparation of Composite Material for Medical Application

**P. A. Levashov\*<sup>\*, \*\*</sup>, D. A. Matolygina\*<sup>\*, \*\*</sup>, E. D. Ovchinnikova\*\*\*, I. Yu. Adamova\*\*\*\*, O. A. Dmitrieva\*\*\*, N. S. Pokrovsky\*\*<sup>\*, \*\*\*\*</sup>, and N. L. Eremeev\***

<sup>#</sup>Phone: +7 (916) 67-14-704, e-mail: levashov@yahoo.com

\*Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1, str. 3, Moscow, 119234 Russia

\*\*Bauman Moscow State Technical University, Interindustry Engineering Center for Composite Materials, Lefortovskaya nab. 1, Moscow, 105005 Russia

\*\*\*Ministry of Healthcare of the Russian Federation, National Medical Research Center of Cardiology, Institute of Experimental Cardiology, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15A, Moscow, 121359 Russia

\*\*\*\*POKARD Ltd., 3-ya Cherepkovskaya ul. 15A, Moscow, 121359 Russia

\*\*\*\*\*Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Lomonosovsky prosp. 27, korp. 1, Moscow, 119991 Russia

Different methods of covalent lysozyme immobilization were compared to choose suitable material for medical application in procedures of extracorporeal therapy. A new method of lysozyme immobilization on a polymer agarose matrix was proposed, providing both the effective action of lysozyme on bacterial cells and the absence of leakage of the enzyme from the material. A new material exhibits bacteriolytic activity against Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* and Gram-negative bacteria *Escherichia coli*. An immobilized enzyme demonstrates broader pH activity optimum. New immobilized lysozyme preparation was shown to be compatible with human whole blood.

*Keywords: endotoxin sorption, sepsis, immobilized lysozyme*