

## ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА КАК СТАБИЛИЗИРУЮЩИЙ АГЕНТ ДЛЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БРОМЕЛИНА

М. Г. Холявка<sup>1,2</sup>, С. М. Панкова<sup>1,3</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»

Поступила в редакцию 03.09.2020 г.

**Аннотация.** Вопросы стабилизации биологически активных соединений белковой природы широко обсуждаются в медицине, фармацевтике, косметологии. Статья посвящена изучению низкомолекулярной (300 кДа), среднемолекулярной (500 кДа) и высокомолекулярной (800 кДа) гиалуроновой кислоты как консервирующего агента жидкого ферментного препарата на основе бромелина.

Стабилизацию фермента осуществляли путем растворения его навески в водном растворе гиалуроновой кислоты в концентрации 1.5 % с последующим перемешиванием при комнатной температуре, в качестве контрольных образцов служил бромелин в 0.05 М трис-НСl буфере (рН 7.5). После инкубации препаратов при 4 и 25 °С в течение различных временных интервалов (до 21 суток) осуществляли их посев на плотную питательную среду методом «газона». Определение количества жизнеспособных клеток проводили путем посева на питательные среды (чашечный метод Коха).

У всех проб, прошедших инкубацию при 4 °С, на 21 день наблюдалось меньшее микробное число (7-10 КОЕ/мл), чем у образцов, хранившихся при 25 °С (30-80 КОЕ/мл). Кроме того, при инкубации в холодильнике (4 °С) препараты бромелина в растворах гиалуроновой кислоты различной молекулярной массы (300, 500, 800 кДа) в течение трех недель характеризуются меньшим бактериальным загрязнением (количеством колониеобразующих единиц), чем при комнатной температуре. При 25 °С на 14 и 21 сутки образцы бромелина в 0.05 М трис-НСl буфере (рН 7.5) и в растворе низкомолекулярной гиалуроновой кислоты (300 кДа) оказались более загрязненными (~80 КОЕ/мл) по сравнению с пробами энзима в средне- (500 кДа) и высокомолекулярной гиалуроновой кислоте (800 кДа). Результаты исследования свидетельствуют о перспективности применения ферментного препарата бромелина в растворах среднемолекулярной (500 кДа) и высокомолекулярной (800 кДа) гиалуроновой кислоты в медицине, фармацевтике, косметологии, благодаря их более высокой устойчивости к микробному загрязнению по сравнению с буферными растворами.

**Ключевые слова:** бромелин, гиалуроновая кислота, ферментный препарат, консервирующий агент

Бромелин (КФ 3.4.22.4) представляет собой эндопептидазу, выделяемую из *Ananas comosus*, и является одноцепочечным гликозилированным ферментом [1, 2]. Оптимальный диапазон рН составляет 6-7, оптимальный диапазон температур – 50-60 °С, диапазон молекулярной массы – 26-28 кДа [3-7]. Бромелин известен с 1875 года и используется в качестве фитомедицинского соединения [8]. Фермент проявляет фибринолитические, противоотечные, антитромботические и противовоспалительные свойства *in vitro* и *in vivo*.

Бромелин обладает широким спектром терапевтического действия: вызывает обратимое ингибирование агрегации тромбоцитов, используется при лечении синуситов, последствий хирургических травм [9], тромбозов, пиелонефритической стенокардии, бронхита [10], характеризуется повышенной абсорбцией лекарств, особенно антибиотиков [11, 12]. Выявлена его антибактериальная активность против различных микроорганизмов, в частности, обитающих в ротовой полости [13].

Гиалуроновая кислота или гиалуронат – органическое соединение, относящееся к группе не-

сульфатированных глюкозаминогликанов. Данное соединение представляет собой анионный линейный полисахарид, молекулярная масса которого зависит от способа его получения [14]. Благодаря уникальным многообразным свойствам и высокой биосовместимости средств на основе гиалуроновой кислоты, они находят применение в различных областях стоматологии, в том числе для лечения заболеваний пародонта, эрозивно-язвенного поражения слизистой оболочки рта, рецидивирующего афтозного стоматита [15-17].

Одна из наиболее перспективных задач современной медицинской биотехнологии – создание биокатализаторов на основе ферментов для применения в лечебных и фармацевтических целях. Установлено, что препараты гиалуроновой кислоты способствуют снижению концентрации пародонтопатогенных микроорганизмов в области послеоперационной раны даже при первичном бактериальном загрязнении, что оптимизирует заживление послеоперационных ран и снижает количество осложнений [18]. На основе гиалуроновой кислоты создаются гемостатические губки, обладающие стабилизирующим тромбин эффектом [19].

Известно, что гиалуроновая кислота вступает в специфическое взаимодействие с белками, например, с гепарин- и фибринсвязывающим доменом на N-концевом участке фибронектина [20].

Целью исследования явилось изучение низкомолекулярной (300 кДа), средномолекулярной (500 кДа) и высокомолекулярной (800 кДа) гиалуроновой кислоты как консервирующего агента жидкого ферментного препарата на основе бромелина.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования был выбран бромелин фирмы «Sigma-Aldrich», субстратом для гидролиза служил азоказеин фирмы «Sigma-Aldrich». В качестве консервирующих агентов применяли три вида гиалуроновой кислоты (ООО «Лаборатория Гиалика») с молекулярной массой 300 (НМГК), 500 (СМГК) и 800 (ВМГК) кДа.

Стабилизацию бромелина осуществляли путем растворения его навески массой 10 мг в 2 мл водного раствора гиалуроновой кислоты в концентрации 1.5 % с последующим перемешиванием при комнатной температуре.

Посев на плотную питательную среду осуществляли методом «газона». Предварительно расплавленную среду разливали по 10-12 мл в стерильные чашки Петри. На застывшую питательную среду

посев микроорганизмов производился равномерным распределением бактериальной культуры по поверхности стерильным шпателем. После посева чашки выдерживали 3 суток в термостате при температуре 37 °С [21]. Бактерии были выращены в соответствии с ISO 11133-1-2011 в питательной среде следующего состава (на 1 л воды): триптон 5 г, дрожжевой экстракт 5 г, сукцинат натрия 1 г и гептагидрат сульфата магния 1 г. Для приготовления твердых питательных сред добавляли 20 г бактериологического агара на 1 л.

Определение количества жизнеспособных клеток осуществляли путем посева на питательные среды (чашечный метод Коха). При расчете количества клеток микроорганизмов в 1 мл исходной суспензии сопоставляли результаты высевов из одного и того же разведения и определяли среднее количество колоний для данного разведения. Согласно ASTM D5465-93 (2012) (Российский государственный стандарт 26670-91) были рассмотрены чашки Петри с числом КОЕ от 30 до 300. Полученные данные подставляли в формулу:

$$M = a \cdot 10^n / V,$$

где M – количество клеток в 1 мл; a – среднее количество колоний при высевах из данного разведения; V – объем суспензии в мл, взятой для посева; 10 – коэффициент разведения; n – порядковый номер разведения [22].

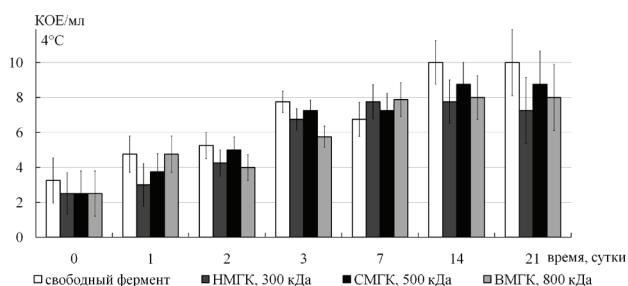
При оценке степени микробного загрязнения образцов рассматривались значения выше 10-15 КОЕ, так как это допустимый микробный фон для воздуха и воды.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для проверки стабилизирующего (консервирующего) действия низкомолекулярной (300 кДа), средномолекулярной (500 кДа) и высокомолекулярной (800 кДа) гиалуроновой кислоты нами была проведена серия экспериментов для оценки устойчивости к бактериальному загрязнению ферментных препаратов на основе бромелина в 0.05 М трис-НСl буфере (рН 7.5) и в 1.5 % растворах гиалуроновой кислоты различной молекулярной массы.

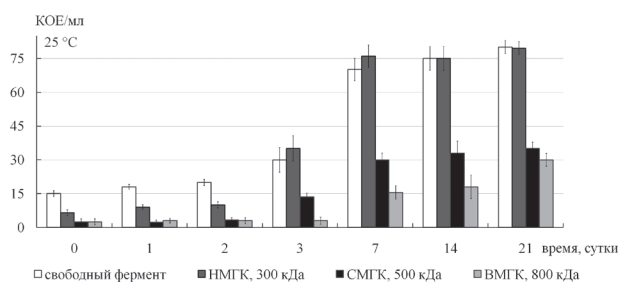
На рис. 1 представлена диаграмма количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на бактериологическом посевах бромелина в растворах гиалуроновой кислоты различных молекулярных масс после инкубации при 4 °С. С первых дней инкубации в холодильнике при 4 °С (кроме 7 дня) наибольшее микробное число было у препарата бромелина, растворенного в 0.05 М трис-НСl буфере

(рН 7.5). На 7 сутки наблюдалась тенденция к повышению микробного числа у образцов с гиалуроновой кислотой, по сравнению с ферментом в буферном растворе. У бромелина в растворе 0.05 М трис-НСI буфера образовалось наибольшее число микробных колоний на 14 и 21 день инкубации в холодильнике (~10 КОЕ/мл).



**Рис. 1.** Диаграмма количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на бактериологическом посеве препаратов бромелина в растворе гиалуроновой кислоты различной молекулярной массы после инкубации при 4 °С

На рис. 2 представлена диаграмма количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на бактериологическом посеве бромелина в растворах гиалуроновой кислоты различных молекулярных масс после инкубации при 25 °С. У бромелина в трис-НСI буфере и в растворе низкомолекулярной гиалуроновой кислоты резкое возрастание количества колоний происходило на 3 день инкубации (30 и 35 КОЕ/мл соответственно). На 14 и 21 дни наибольшая бактериальная загрязненность наблюдалась у препаратов бромелина в буфере и в растворе низкомолекулярной гиалуроновой кислоты (~80 КОЕ/мл).



**Рис. 2.** Диаграмма количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на бактериологическом посеве препаратов бромелина в растворе гиалуроновой кислоты различной молекулярной массы после инкубации при 25 °С

У всех проб, прошедших инкубацию при 4 °С, на 21 день было меньшее микробное число (7-10 КОЕ/мл), чем у образцов после хранения при 25 °С (30-80 КОЕ/мл).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При хранении в холодильнике (4 °С) образцы бромелина в растворе гиалуроновой кислоты различной молекулярной массы (300, 500, 800 кДа) в течение трех недель характеризуются меньшим бактериальным загрязнением (количеством колониеобразующих единиц), чем при комнатной температуре. При 25 °С на 14 и 21 сутки препараты бромелина в буфере и в растворе низкомолекулярной гиалуроновой кислоты (300 кДа) оказались более загрязненными (~80 КОЕ/мл) по сравнению с пробами фермента, растворенными в средне- (500 кДа) и высокомолекулярной гиалуроновой кислоте (800 кДа). Таким образом, специфическое взаимодействие гиалуроновой кислоты (500-800 кДа) с бромелином увеличивает срок хранения фермента и, вероятно, поддерживает его антибактериальный эффект. В дальнейшем будет проанализирована динамика образования комплекса гиалуроновой кислоты различной молекулярной массы с бромелином, будут выявлены функциональные группы, ответственные за поддержание связей между ферментом и полисахаридом. Так как гиалуроновая кислота не ингибирует активность бромелина, в дальнейшем возможно совместное использование этих веществ в препаратах различного назначения в косметологии и медицине.

*Мы благодарим сотрудников фирмы ООО "Лаборатория гиалика" и ее учредителя Павловца Вячеслава Викторовича за любезно предоставленные образцы гиалуроновой кислоты с различной молекулярной массой.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith-Marshall J., Golden K.D. // *Sci Res.* 2012. Vol. 4, pp. 445-456. DOI:10.3329/JSR.V4I2.8125
2. Tochi B.N., Wang Z., Xu S.Y., Zhang W. // *Nutrition.* 2008. Vol. 7, pp. 513-520. DOI:10.3923/pjn.2008.513.520
3. Harrach T., Eckert K., Maurer H.R., Machleidt I., Machleidt W., Nuck R. // *Protein Chem.* 1998. Vol.17, pp. 351-361.
4. Gautam S.S., Mishra S.K., Dash V., Goyal A.K., Rath G. // *Thai J Pharm.* 2010. Vol. 34, pp. 67-76.
5. Xue Y., Wu C., Branford-White C.J., Ning X., Nie H., Zhu L. // *MolCatal.B-Enzym.* 2010. Vol. 63, pp. 188-193. DOI:10.1016/J.MOLCATB.2010.01.018
6. Grzonka Z., Kasprzykowski F., Wiczak W. // *Industrial Enzymes.* Springer. 2007, pp. 181-195.

7. Kumar S., Hemavathi A.B., Hebbar H.U. // *Process Biochem.* 2011. Vol. 46, pp. 1216-1220.
8. Taussig J., Batkin S. // *Ethnopharmacology.* 1988. Vol. 22, pp.191–203.
9. Livio M., De. Gaetano G., Donati M.B. // *Drugs under Experimental and Clinical Research.* 1978. Vol. 1, pp. 49–53.
10. Neubauer R. A. // *Experimental Medicine and Surgery.* 1961. Vol. 19, pp. 143–160.
11. Renzini G., Varego M. // *Arzneimittel-Forschung Drug Research.* 1972. Vol. 2, pp. 410–412.
12. Maurer H.R. // *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2001. Vol. 58, pp. 1234–1245. DOI: 10.1007/PL00000936.
13. Kleef R., Delohery T.M., Bovbjerg, D.H. // *Pathobiology.* 1996. Vol. 64, pp. 339–346.
14. Новикова Р.В., Сазанов А.В., Козвонин В.А., Товстик Е.В. // *Вестник современных исследований.* 2019. № 1.2 (28). С. 55-57.
15. Нагаева М.О., Мирошниченко В.В., Петров И.М., Фролова О.И., Дзюба Е.В. // *Проблемы стоматологии.* 2019. Т. 15. № 1. С. 38-43.
16. Косюга С.Ю., Воинова С.О. // *Клиническая стоматология.* 2018. № 3. С. 44-46.
17. Косюга С.Ю., Воинова С.О. // "Молодые ученые - развитию Ивановской области", Материалы IV всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, XIV областной фестиваль, 9-12 апреля 2018 г., Иваново, 2018, с. 507-510.
18. Ушаков Р.В., Царев В.Н., Ушаков А.Р., Дьяконова Д.С. // *Возможности стоматологии сегодня.* 2013, №1. С. 38-40.
19. Меллер Л., Девантиер К., Вулфф Т., Сабра М.К. Патент РФ, №2007104938, 2005.
20. Nakamura M., Mishima H., Nishida T., Otori T. // *Cell. Physiol.* 1994. Vol.159, pp. 415-422.
21. Лысак В.В. *Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов.* Мн. БГУ. 2002, 100 с.
22. Панаскина Л.А. *Лабораторный практикум по дисциплине «Микробиология, санитария и гигиена в пищевом производстве».* Брянск, 2015, 58 с.

*Воронежский государственный университет*  
\*Холявка М.Г., д.б.н., доцент кафедры биофизики и биотехнологии, профессор кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет

E-mail: holyavka@rambler.ru

*Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии*

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

*Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко*

*Панкова С.М., ассистент кафедры нормальной физиологии*

E-mail: sazykina.93@mail.ru

*Voronezh State University*

*Holyavka M. G., PhD (Biology), DSci., associated professor of the Department of Biophysics and Biotechnology, professor, of the Department of Physics, Sevastopol State University*

E-mail: holyavka@rambler.ru

*Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology*

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

*Voronezh State Medical University. N.N. Burdenko Pankova S.M., assistant at the Department of Normal Physiology*

E-mail: sazykina.93@mail.ru

## HYALURONIC ACID AS A STABILIZING AGENT FOR BROMELAIN-BASED ENZYME PREPARATION

M. G. Holyavka<sup>1,2</sup>, S. M. Pankova<sup>1,3</sup>, V. G. Artyukhov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Voronezh State University

<sup>2</sup> Sevastopol State University

<sup>3</sup> Voronezh State Medical University N.N. Burdenko

**Abstract.** The stabilization of biologically active compounds of a protein nature is widely discussed in medicine, pharmaceuticals and cosmetology. The article is devoted to the study of low molecular weight (300 kDa), medium molecular weight (500 kDa) and high molecular weight (800 kDa) hyaluronic acid as a preservative agent for a liquid enzyme preparation based on bromelain.

The enzyme was stabilized by dissolving its weighed portion in an aqueous solution of hyaluronic acid at a concentration of 1.5%, followed by stirring at room temperature. Bromelain in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) served as control samples. After incubation of the preparations at 4 and 25 °C for different time intervals (up to 21 days), they were inoculated onto a dense nutrient medium using the "lawn" method. Determination of the number of viable cells was carried out by plating on nutrient media (Koch plate method).

All samples incubated at 4 °C showed a lower microbial count on day 21 (7-10 CFU/ml) than samples stored at 25 °C (30-80 CFU/ml). In addition, when incubated in a refrigerator (4 °C), bromelain preparations in hyaluronic acid solutions of various molecular weights (300, 500, 800 kDa) for three weeks are characterized by less bacterial contamination (the number of colony-forming units) than at room temperature. At 25 °C on days 14 and 21, bromelain samples in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) and in a solution of low molecular weight hyaluronic acid (300 kDa) turned out to be more contaminated (~ 80 CFU/ml) compared to the enzyme samples in medium (500 kDa) and high molecular weight hyaluronic acid (800 kDa). The results of the study indicate that the use of the enzyme preparation bromelain in solutions of medium molecular weight (500 kDa) and high molecular weight (800 kDa) hyaluronic acid in medicine, pharmaceuticals, cosmetology is promising, due to their higher resistance to microbial contamination compared to buffer solutions.

**Keywords:** bromelain, hyaluronic acid, enzyme preparation, preservative agent

### REFERENCES:

1. Smith-Marshall J., Golden K.D., Sci Res., 2012, Vol. 4, pp. 445-456. DOI:10.3329/JSR.V4I2.8125
2. Tochi B.N., Wang Z., Xu S.Y., Zhang W., Nutrition., 2008, Vol. 7, pp. 513-520. DOI:10.3923/pjn.2008.513.520
3. Harrach T., Eckert K., Maurer H.R., Machleidt I., Machleidt W., Nuck R., Protein Chem, 1998, Vol.17, pp. 351-361.
4. Gautam S.S., Mishra S.K., Dash V., Goyal A.K., Rath G., Thai J. Pharm, 2010, Vol. 34, pp. 67-76.
5. Xue Y., Wu C., Branford-White C.J., Ning X., Nie H., Zhu L., MolCatal. B-Enzym, 2010, Vol. 63, pp. 188-193. DOI:10.1016/J.MOLCATB.2010.01.018
6. Grzonka Z., Kasprzykowski F., Wiczek W., Industrial Enzymes, Springer, 2007, pp. 181-195.
7. Kumar S., Hemavathi A.B., Hebbar H.U., Process Biochem, 2011, Vol. 46, pp. 1216-1220.
8. Taussig J., Batkin S., Ethnopharmacology, 1988, Vol. 22, pp.191-203.
9. Livio M., De. Gaetano G., Donati M.B., Drugs under Experimental and Clinical Research, 1978, Vol. 1, pp. 49-53.
10. Neubauer R. A., Experimental Medicine and Surgery, 1961, Vol. 19, pp. 143-160.
11. Renzini G., Varego M., Arzneimittel-Forschung Drug Research, 1972, Vol. 2, pp. 410-412.
12. Maurer H.R., Cellular and Molecular Life Sciences, 2001, Vol. 58, pp. 1234-1245. DOI: 10.1007/PL00000936.
13. Kleef R., Delohery T.M., Bovbjerg, D.H., Pathobiology, 1996, Vol. 64, pp. 339-346.
14. Novikova R.V., Sazanov A.V., Kozvonin V.A., Tovstik E.V., Vestnik sovremennyh issledovanij, 2019, No. 1.2 (28), pp. 55-57.
15. Nagaeva M.O., Miroshnichenko V.V., Petrov I.M., Frolova O.I., Dzyuba E.V., Problemy stomatologii, 2019, Vol. 15, No 1, pp. 38-43. DOI: 10.18481/2077 7566 2018 15 1-38-43
16. Kosyuga S.YU., Voinova S.O., Klinicheskaya stomatologiya, 2018, No 3, pp. 44-46.
17. Kosyuga S.YU., Voinova S.O., "Young Scientists - Development of the Ivanovo Region", Materials of the IV All-Russian Conference of Students and Young Scientists from the International Scientific Conference, XIV Regional Festival, April 9-12, 2018, Ivanovo, 2018, pp. 507-510.
18. Ushakov R.V., Carev V.N., Ushakov A.R., D'yakonova D.S., Vozmozhnosti stomatologii segodnya, 2013, No 1, pp. 38-40.
19. Meller L., Devantier K., Vulff T., Sabra M.K. Patent RF, no. 2007104938, 2005.
20. Nakamura M., Mishima H., Nishida T., Otori T., Cell. Physiol., 1994, Vol.159, pp. 415-422.
21. Lysak V. Microbiology: guidelines for laboratory studies and control of students' independent work. Mn. BSU. 2002, 100 p.
22. Panaskina L.A. Laboratory workshop on the discipline "Microbiology, sanitation and hygiene in food production." Bryansk, 2015, 58 p.