

На правах рукописи

Шишпарёнок Анастасия Николаевна

ИММОБИЛИЗАЦИЯ L-АСПАРАГИНАЗ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ ЦЕЛЛЮЛОЗУ ДЛЯ
ПОВЫШЕНИЯ ИХ СТАБИЛЬНОСТИ И ПРОЛОНГИРОВАНИЯ ДЕЙСТВИЯ

1.5.4. - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в лаборатории медицинской биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Жданов Дмитрий Дмитриевич

Официальные оппоненты:

Пометун Анастасия Александровна
доктор химических наук,
Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН (Институт
биохимии им. А.Н. Баха РАН), ведущий
научный сотрудник, заведующая
лабораторией молекулярной инженерии

Манухов Илья Владимирович
доктор биологических наук
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования «Московский физико-
технический институт (национальный
исследовательский университет)»
главный научный сотрудник, заведующий
лабораторией молекулярной генетики

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита состоится «15» октября 2026 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте www.ibmc.msk.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Учёный секретарь Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

L-аспарагиназа (L-АСНаза) или L-аспарагин аминогидролаза – это фермент, относящийся к классу гидролаз (КФ 3.5.1.1), который катализирует гидролиз L-аспарагина с образованием аспарагиновой кислоты и аммиака. В настоящее время L-АСНаза используется для лечения острых лимфобластных, миелобластных и миеломонобластных лейкозов, а также лимфосарком и лимфогрануломатоза (Tosta Pérez et al., 2023). Механизм терапевтического действия L-АСНазы основан на истощении запасов критически важной для некоторых опухолей аминокислоты L-аспарагина. В нормальных клетках уровень L-аспарагина, необходимый для клеточного метаболизма и деления, поддерживается ферментом аспарагинсинтетазой (АСНС) (Yuan et al., 2024). Однако в лейкозных и некоторых других опухолевых клетках уровень синтеза АСНС значительно снижен (Vertuccio et al., 2017), поэтому данные клетки зависят от поступления L-аспарагина из внеклеточного пространства. Истощение L-аспарагина L-АСНазой в сыворотке крови приводит к нарушению метаболизма, недостаточному белковому синтезу и, в конечном итоге, к гибели опухолевых клеток по пути апоптоза (Ali et al., 2016).

L-АСНазы, которые на данный момент используются в клинике, – это ферменты, полученные из *Escherichia coli* (*E. coli*, как свободная, так и её пэгилированная формы) и из *Dickeya dadantii* (ранее известная как *Erwinia chrysanthemi*, далее в тексте обозначена как *E. chrysanthemi* ввиду общепринятого упоминания этого видового названия в большинстве публикаций) (Van Trimpont et al., 2022). Терапевтическая эффективность наиболее часто используемого фермента из *E. coli* снижена из-за относительно высокой гидролитической активности L-глутамин, основной аминокислоты, участвующей в метаболизме аммиака. Высокая глутаминазная активность данного фермента приводит к развитию ряда побочных эффектов (Fonseca et al., 2021). Фермент из *E. chrysanthemi* и гомологичный фермент из *Pectobacterium carotovorum* (ранее известная как *Erwinia carotovora*, поэтому далее в тексте обозначена как *E. carotovora* ввиду общепринятого упоминания этого видового названия в публикациях) создавались как препараты второго ряда терапии при возникновении гиперчувствительности к L-АСНазе из *E. coli*. В то же время L-АСНаза *E. chrysanthemi* обладает меньшей токсичностью и, как следствие, меньшим числом побочных эффектов, однако менее стабильна по сравнению с ферментом *E. coli* (Modi & Gervais, 2022). Следует отметить, что L-АСНазы в нативной форме обладают низкой стабильностью, высокой иммуногенностью и коротким временем полужизни за счёт расщепления протеазами крови (Maggi et al., 2017). L-АСНазы обладают токсическим действием также в отношении некоторых солидных опухолей. Однако, низкая стабильность L-АСНаз *in vivo*, ограничивает применение данных ферментов для терапии солидных опухолей.

Вышеперечисленные недостатки, связанные с использованием свободной формы фермента, можно преодолеть путём иммобилизации L-АСНаз на различные носители. Иммобилизация способна минимизировать побочные эффекты фермента, такие как иммуногенность и токсичность и повысить стабильность. Первая стратегия иммобилизации основана на заключении фермента внутри защитной структуры или инкапсуляции в липосомы, эритроциты или микрокапсулы. Это позволяет снизить токсичность, продлить период полужизни *in vivo*, обеспечивает целевую доставку и контролируемое высвобождение фермента и не изменяет химическую структуру фермента (Talluri et al., 2023). Вторая стратегия включает

модификацию структуры фермента, такую как ковалентное связывание (конъюгация), адсорбция на носителе и поперечная сшивка фермента (Khan, 2021). Химическая модификация остатков изменяет гидрофобность и поверхностный заряд фермента, с одной стороны приводя к снижению активности фермента, с другой стороны – увеличению периода полужизни L-АСНаз и замедлению их выведения из организма.

Бактериальную целлюлозу (БЦ) можно использовать в качестве носителя для иммобилизации ферментов благодаря её биосовместимости, нетоксичности и высокой чистоте (Wu & Lia, 2008). БЦ обладает потенциалом в качестве носителя для доставки лекарств и локального высвобождения в месте применения. Так как нативные плёнки БЦ не обладают физико-химическими характеристиками, способствующими длительному высвобождению лекарств, актуальной является разработка её модификаций для иммобилизации L-АСНазы. Наряду с этим, включение функциональных групп в БЦ позволяет ковалентно иммобилизовать фермент для увеличения его стабильности и продолжительности действия. Использование БЦ для локализованной доставки L-АСНазы может быть перспективной стратегией для противоопухолевой терапии, обеспечивая длительное локальное воздействие фермента на опухолевые клетки.

Степень разработанности темы

На сегодняшний день эффективной стратегией для иммобилизации L-АСНаз является конъюгация с полиэтиленгликолем (ПЭГ). Однако конъюгаты L-АСНаз часто вызывают реакции гиперчувствительности и не обладают высокой цитотоксической активностью в отношении солидных опухолей (Kislyak et al., 2023). В качестве перспективных носителей для иммобилизации противоопухолевых препаратов значительное внимание исследователей привлекают биополимеры, в частности, БЦ (Liu et al., 2020). БЦ уже используется для иммобилизации различных биологически активных веществ для обработки ран и ожогов. На основе нативной БЦ были разработаны трансдермальные таргетные системы для доставки антител к CTLA-4 (Chung et al., 2022) и антител к 131I-αPD-L1 (Qi et al., 2022) в опухолевые клетки меланомы. Модифицированные формы БЦ разработаны для таргетных систем доставки доксорубина в перитонеально диссеминированные опухоли (Akagi et al., 2021), а также в опухоли молочной железы (Cacicedo et al., 2018). Однако в работах не рассматривалась возможность применения БЦ для иммобилизации ферментов, обладающих противоопухолевым действием. В то же время в исследованиях, посвященных использованию БЦ в качестве носителя для различных промышленных ферментов (липаз, лакказ, пероксидаз и др.), выявлено увеличение их стабильности после иммобилизации на БЦ. В связи с этим нами предложена разработка различных модификаций БЦ для иммобилизации L-АСНаз с целью увеличения их стабильности и продолжительности действия на клетки опухолей.

Цель исследования

Целью данной работы является увеличение стабильности и пролонгирование цитотоксического действия L-АСНаз путём иммобилизации на плёнки БЦ.

Задачи исследования

1. Иммобилизовать L-АСНазу на нативные плёнки БЦ различного времени выращивания, определить ферментативную активность и продолжительность высвобождения иммобилизованного фермента.
2. Разработать и охарактеризовать модификации плёнок БЦ для увеличения времени высвобождения L-АСНаз.

3. Разработать модификации плёнок БЦ для увеличения стабильности L-АСНаз и оценить влияние денатурирующих факторов на активность иммобилизованного фермента.

4. Определить цитотоксическую активность иммобилизованных L-АСНаз на клетках линий солидных опухолей.

Научная новизна

В работе впервые предложен новый носитель для L-АСНаз – плёнки БЦ. Оптимизирован подход для выращивания плёнок БЦ, со стандартизированными параметрами, пригодными для иммобилизации фермента. Разработаны методики модификации плёнок БЦ, позволяющие иммобилизовать L-АСНазы для увеличения их стабильности и продолжительности действия. Результаты данной работы позволяют использовать L-АСНазу для развития методов энзимотерапии, а именно, для индукции цитотоксичности в опухолевых клетках, изначально не чувствительных к действию этого фермента.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе представлены подходы по улучшению фармакологических свойств терапевтических L-АСНаз за счёт иммобилизации на плёнках БЦ. Разработаны модификации плёнок, способные увеличить продолжительность действия и стабильность фермента к денатурирующим факторам. Полученные модификации плёнок БЦ с иммобилизованным ферментом L-АСНазой могут использоваться для индукции гибели малочувствительных к действию фермента опухолевых клеток. Разработанные модификации плёнок БЦ и способы иммобилизации L-АСНаз применимы для увеличения продолжительности действия и стабилизации других терапевтически значимых белков. Представленные в работе подходы могут использоваться для выяснения физиологического действия L-АСНаз на малочувствительные клетки и увеличивают возможности применения данных ферментов в медицине.

Методология и методы исследования

Разработана методология получения нативных, модифицированных хитозаном и окисленных плёнок БЦ. Предложены подходы для физической адсорбции и ковалентной иммобилизации L-АСНаз на плёнках. Для анализа структуры и исследования физико-химических свойств полученных плёнок БЦ использованы методы ИК-спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Методы исследования ферментативной активности L-АСНаз использованы для определения продолжительности действия, профиля высвобождения, а также устойчивости фермента к денатурирующим факторам. Применены методики работы с линиями эукариотических клеток для определения цитотоксической активности иммобилизованных L-АСНаз.

Положения, выносимые на защиту

1. Иммобилизация L-АСНаз на плёнки БЦ, модифицированные хитозаном, позволяет увеличить время высвобождения L-АСНазы и пролонгировать действие на опухолевые клетки в два раза по сравнению с нативными плёнками.

2. Ковалентная иммобилизация L-АСНаз на плёнках БЦ, окисленных NaIO_4 , позволяет увеличить её стабильность и повысить цитотоксическую активность на опухолевые клетки, изначально слабо чувствительные к действию данного фермента.

Личный вклад автора

Соискателем была проанализирована отечественная и зарубежная литература по теме диссертации. Автором были предложены методы и осуществлено культивирование продуцента БЦ, проведены модификации плёнок БЦ для увеличения продолжительности действия L-АСНаз, проведены модификации плёнок БЦ для увеличения стабильности L-АСНаз. Автором проведена иммобилизация ферментов методом физической адсорбции и ковалентной сшивкой с БЦ. Автором осуществлено определение продолжительности действия, стабильности и цитотоксичности иммобилизованных L-АСНаз, а также кинетики высвобождения фермента. Автор принимал участие в проведении инфракрасной спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии, а также лично проводил статистический анализ результатов. Автор лично принимал участие в подготовке публикаций.

Степень достоверности

Достоверность результатов исследования подтверждена проведением независимых повторных экспериментов, а также статистического анализа. Данные получены с использованием современных методов исследования на сертифицированном оборудовании и реактивов надлежащей чистоты. Предложенные в работе новые методики были предварительно отработаны. Полученные данные не противоречат результатам, опубликованным в отечественной и зарубежной литературе. Результаты работы опубликованы в рецензируемых научных журналах.

Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены на 27-й Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2024), Всероссийской конференции с международным участием «Биомедицинская химия: наука и практика» (Москва, 2024), VI Международной конференции «ПОСТГЕНОМ'2024 XI, Российский симпозиум БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ» (Москва, 2024), 78-ой Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» с международным участием (Нижний Новгород, 2025).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 6 статей в рецензируемых научных журналах, из них 6 в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ и 4 работы в сборниках трудов научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы, который включает 299 источников. Работа изложена на 165 страницах и содержит 47 рисунков и 9 таблиц.

Финансирование

Диссертационная работа выполнена при поддержке программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение плёнок бактериальной целлюлозы. В качестве продуцента БЦ использовали штамм *Komagataeibacter hansenii* (*K. hansenii*), регистрационный номер ВКПМ В-11239 и штамм *K. hansenii* GH-1/2008, регистрационный номер ВКПМ В-10547 во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Нативные плёнки БЦ получали путём стационарного культивирования инокулята штаммов *K. hansenii* GH-1/2008 ВКПМ В-10547 или ВКПМ В-11239 в среде Хестрина-Шрамма в 24-луночных планшетах в течение 24–180 ч при 25 °С. Далее плёнки БЦ инкубировали в буфере для очистки, после чего промывали в дистиллированной воде и автоклавировали.

Иммобилизация L-аспарагиназы из *Erwinia carotovora* на нативные плёнки бактериальной целлюлозы. L-АСНаза из *Erwinia carotovora* (ЕwА) (595 МЕ/мг) была получена в лаборатории медицинской биотехнологии (Krasotkina et al. 2004). Иммобилизацию L-АСНазы ЕwА проводили стерильно в 0,05 М буфере HEPES-Na (рН 8,0). Плёнки БЦ погружали в раствор фермента (0,05 мг/мл, 28 МЕ/мл) и инкубировали при 4 °С в течение 12 ч. Количество иммобилизованной L-АСНазы определяли с помощью спектрофотометрии согласно Dawson и др. (Dawson et al., 1989).

Получение композита бактериальной целлюлозы и хитозана. Влажные плёнки БЦ помещали в 24-луночный планшет и к ним добавляли по 1 мл растворов хитозана в концентрациях 0,05; 0,1; 0,5 или 1% и инкубировали в течение 1, 2, 3 или 6 ч на шейкере при 37 °С и перемешивании. Далее к плёнкам БЦ-хитозан добавляли раствор 1% глутарового альдегида (рН 7,0) и инкубировали при 23 °С в течение 1, 2, 3 или 4 ч в статических условиях. Иммобилизацию ЕwА проводили, как описано для нативных плёнок БЦ.

Окисление плёнок бактериальной целлюлозы с помощью ТЕМПО. Плёнки БЦ помещали в 19 мМ раствор 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксила (ТЕМПО) и 12 мМ КВг и инкубировали при 4 °С в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Затем в реакционную смесь добавляли 5 мМ NaClO₄ и инкубировали при комнатной температуре в течение 80 мин, после чего промывали 96% этанолом в течение 1 мин и водой в течение 1 ч. Затем плёнки переносили инкубировали с 10 мМ буфером MES-Na (рН 5,0) в течение 30 мин. Далее плёнки, окисленные ТЕМПО (ТЕМПО-ОБЦ), инкубировали с раствором EDC/NHS (0,12 М/0,06 М) в буфере MES (рН 5,0) в течение 1 ч и промывали водой. Иммобилизацию L-АСНазы ЕwА проводили по процедуре, описанной для нативных плёнок БЦ.

Окисление плёнок бактериальной целлюлозы с помощью NaIO₄. Влажные плёнки БЦ инкубировали в растворе KCl/HCl (50 мМ раствора KCl + 0,2 М раствора HCl) при 25 °С на 24 ч. Далее образцы переносили в свежий раствор KCl/HCl, к которому добавляли NaIO₄ до конечной концентрации 1%. Реакцию окисления проводили в темноте при 45 °С при постоянном перемешивании в течение 5 ч. Затем плёнки промывали деионизированной водой. Иммобилизацию L-АСНаз, полученных в лаборатории медицинской биотехнологии, – ЕwА, *Rhodospirillum rubrum* (*R. rubrum*), *Thermococcus sibiricus* (*T. sibiricus*), а также коммерческого препарата *E. coli* («Веро-аспарагиназа») проводили по процедуре, описанной для нативных плёнок БЦ.

Инфракрасная спектроскопия плёнок бактериальной целлюлозы. Спектры предварительно лиофилизированных плёнок БЦ, БЦ-хитозан, ТЕМПО-ОБЦ, NaIO₄-ОБЦ и

плёнок с иммобилизованным ферментом были записаны в диапазоне 800–4000 см⁻¹ с использованием спектрофотометра МИКРАН-3. Спектральное разрешение составляло 4 см⁻¹ в режиме 40 сканирований.

Оценка морфологии нативных и модифицированных плёнок бактериальной целлюлозы. Образцы плёнок покрывали золотым напылением и исследовали с помощью настольного электронного микроскопа Hitachi TM3030. Изображения образцов были получены при ускоряющем напряжении 15 кВ и увеличении 500, 2500 и 5000.

Определение ферментативной активности L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* и подбор оптимального реакционного буфера. Ферментативную активность L-АСНазы EwA количественно определяли по скорости образования ионов аммония в реакции несслеризации. Активность EwA, адсорбированной на нативные плёнки БЦ, измеряли в буферных растворах (все 50 мМ, рН 8,0): натрий-боратном, Трис-НСl, HEPES-Na, пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота) (PIPES-Na) и 3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислоте (MOPS-Na) после инкубации в течение 20 мин при 37 °С в присутствии 40 мМ L-аспарагина.

Оценка скорости высвобождения L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* из плёнок бактериальной целлюлозы и бактериальной целлюлозы, модифицированной хитозаном. Плёнки с ферментом инкубировали в 25 мл буфера HEPES (50 мМ, рН 8,0) в течение 24 ч. Каждый час отбирали 300 мкл пробы, в которую добавляли L-аспарагин, инкубировали в течение 5 мин и определяли активность фермента методом несслеризации.

Кинетические модели высвобождения L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* из плёнок бактериальной целлюлозы и бактериальной целлюлозы, модифицированной хитозаном. Данные о количестве L-АСНазы EwA, высвободившейся из плёнок БЦ и БЦ-хитозан, использовали для построения кинетических моделей высвобождения (нулевого порядка, первого порядка, модели Хигучи, Корсмейера–Пеппаса и Хиксона–Кроуэлла). Для определения наиболее подходящей модели высвобождения L-АСНазы EwA для нативных плёнок БЦ и плёнок БЦ-хитозан был рассчитан коэффициент регрессии (R²).

Определение влияния денатурирующих факторов на стабильность L-аспарагиназ, иммобилизованных на плёнках окисленной бактериальной целлюлозы. Влияние повышенных температур на ферментативную активность EwA, иммобилизованной на плёнки ТЕМПО-ОБЦ или NaIO₄-ОБЦ исследовали в диапазоне 40–60 °С. Плёнки с ферментом предварительно нагревали в 50 мМ буфере HEPES-Na (рН 8,0) в течение 10–60 мин при 40–60 °С, после чего добавляли L-аспарагин до конечной концентрации 40 мМ и инкубировали в течение 5–240 мин. Для изучения влияния рН на активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки ОБЦ, фермент инкубировали в 15 мМ цитратно-фосфатно-боратном буфере, содержащем 15 мМ L-аспарагина в течение 1,5 ч в диапазоне рН от 4 до 11 при 37 °С. Влияние мочевины на активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки ОБЦ, определяли в 50 мМ буфере HEPES-Na (рН 8,0) при 37 °С. К плёнкам ОБЦ с иммобилизованным ферментом добавляли раствор 6 М мочевины и инкубировали в течение 5–55 мин. Затем к плёнкам добавляли 80 мМ L-аспарагина и инкубировали в течение 1,5 ч. Для изучения влияния трипсина на активность L-АСНаз растворы трипсина (21–210 МЕ/мл) добавляли в буфер к L-АСНазам, иммобилизованным на плёнки ОБЦ, и инкубировали в течение 5–125 мин при 37 °С. Затем к раствору добавляли 80 мМ L-аспарагина и инкубировали в течение 1,5 ч. Активность иммобилизованных L-АСНаз определяли методом несслеризации.

Определение кинетических параметров реакции L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, иммобилизованной на нативные и модифицированные плёнки бактериальной целлюлозы. Кинетические параметры определяли в буфере HEPES (pH 8,0), содержащем L-аспарагин в концентрации 100–1000 мкМ и концентрации L-АСНазы EwA 0,017–0,046 МЕ/мг. Для оценки параметров K_m и V_{max} использовали уравнение Лайнуивера-Берка (Tuzimski & Sugajski 2025).

Определение цитотоксической активности L-аспарагиназ. Клеточные линии опухолевых клеток A375, A875, melKor, MelJuso, B16F10, A431, A549, SW-620 и фибробласты WI-38 были получены из клеточной коллекции Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина. Клетки, за исключением WI-38, выращивали в полной среде RPMI-1640, а клетки WI-38 выращивали в полной среде DMEM при 37 °С в атмосфере с 5% CO₂ и влажностью 95%. Определение значения IC₅₀ осуществляли с помощью МТТ-теста. Для определения продолжительности действия иммобилизованных L-АСНаз, плёнки с ферментом последовательно инкубировали в течение 3 ч в лунках 24-луночного планшета, после чего плёнки переносили в новые лунки.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние времени культивирования продуцента бактериальной целлюлозы на толщину плёнок

При культивировании продуцента в 24-луночном планшете получены плёнки БЦ (рис. 1А) диаметром 16 мм. Для определения оптимальной толщины плёнок для иммобилизации L-АСНазы продуцент *K. hansenii* GH-1/2008 выращивали в течение 48–180 ч и оценивали толщину плёнок с помощью микрометра и измерения оптической плотности (ОП) в видимом спектре (рис. 2). Увеличение времени культивирования продуцента (рис. 2А) соответствовало увеличению ОП (рис. 2Б). Коэффициент корреляции между ОП и толщиной плёнки составил 0,907 ($p < 0,001$), поэтому далее измерение ОП использовали для быстрой стандартизации плёнок БЦ.

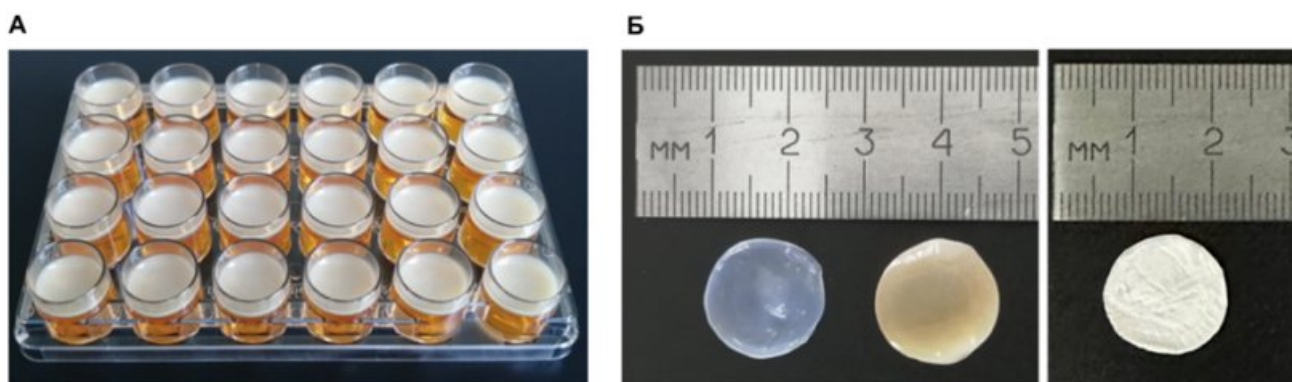


Рисунок 1. Фотографии плёнок БЦ. (А) Плёнки БЦ, растущие в 24-луночных планшетах. *K. hansenii* GH-1/2008 культивировали стационарно на среде Хестрина-Шрамма при 25 °С. (Б) Плёнка БЦ после очистки от бактерий и питательной среды (слева), до очистки (посередине) и очищенная лиофилизированная плёнка (справа).

Самую низкую активность L-АСНазы EwA наблюдали в буфере MOPS ($0,669 \pm 0,030$ МЕ/мл), тогда как в буфере HEPES активность EwA была максимальной $1,827 \pm 0,143$ МЕ/мл (рис. 3А), поэтому для иммобилизации фермента путём физической адсорбции далее использовали буфер HEPES при pH 8,0.

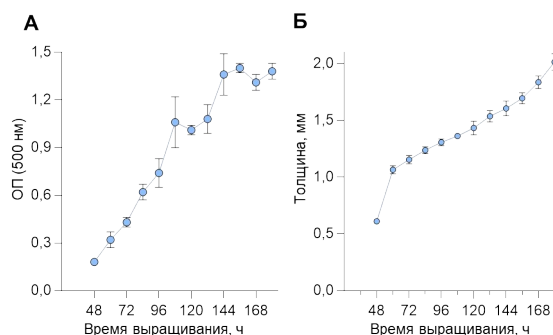


Рисунок 2. Влияние времени роста штамма-продуцента на толщину и ОП плёнок БЦ. (А) Толщина плёнок БЦ, измеренная с помощью цифрового микрометра. (Б) ОП плёнок, выращенных в течение 48–180 ч, измеренная при $\lambda=500$ нм. N = 4.

Для нативных плёнок БЦ, выращенных в течение 48 ч, количество адсорбированной L-АСНазы EwA составило $19,9 \pm 2,8\%$, в то время как при иммобилизации на плёнки БЦ, выращенные в течение 96 ч, количество адсорбированной L-АСНазы EwA увеличилось до $84,5 \pm 5,7\%$ (рис. 3Б). При этом количество иммобилизованной L-АСНазы не отличалось между плёнками, выращенными в течение 96 ч и 180 ч, что указывает на то, что способность плёнок адсорбировать фермент не зависит напрямую от времени культивирования продуцента БЦ.

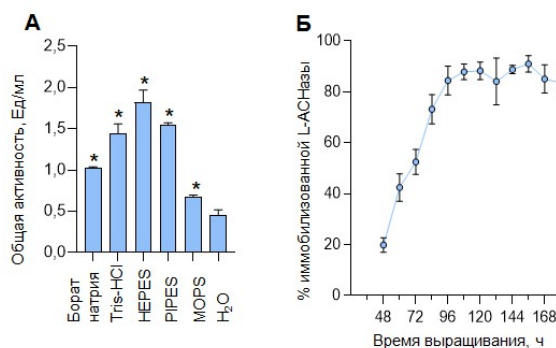


Рисунок 3. Активность адсорбированной L-АСНазы EwA в различных буферах и эффективность адсорбции L-АСНазы на плёнки различной толщины. (А) Общая активность EwA в различных буферах. Активность 0,1 мг фермента определяли по детекции ионов аммиака после инкубации в течение 3 мин в буферах (борат натрия, Tris-HCl, HEPES, PIPES, MOPS, pH 8,0) при 37 °С с помощью несслеризации. N = 4. * $p < 0,05$ относительно H₂O (one-way ANOVA с последующим тестом Тьюки). (Б) Процент адсорбированной L-АСНазы на нативные плёнки БЦ, выращенные в течение 48–184 ч.

2. Исследование морфологии плёнок бактериальной целлюлозы

Тип пористой структуры гидрогелей, в том числе плёнок, определяет скорость высвобождения загруженных лекарственных средств (Shoukat et al. 2021), поэтому было важно оценить структуру плёнок БЦ до и после модификации. Морфология нативных и модифицированных плёнок БЦ была проанализирована с помощью СЭМ (рис. 4, рис. 5). Нативные плёнки БЦ обладали трёхмерной сетчатой структурой (рис. 4А) с неравномерным распределением целлюлозных волокон. В отличие от нативных плёнок, у плёнок БЦ–хитозан формировалась более плотная структура с меньшим размером пор (рис. 4Б). Данное изменение могло повлиять на повышенную адсорбционную ёмкость плёнок БЦ–хитозан и сниженную

эффективность иммобилизации. Для оценки изменений в структуре плёнок БЦ после окисления ТЕМПО или NaIO_4 были получены микрофотографии поперечного среза плёнок БЦ. В отличие от нативных плёнок БЦ (рис. 5А), плёнки, окисленные ТЕМПО, обладали пористой структурой в виде пластин или плоских лент (рис. 5Б), а плёнки, окисленные NaIO_4 (рис. 5В), обладали высокой степенью агрегации фибрилл по сравнению с другими плёнками. Таким образом, при модификации БЦ путём окисления происходило значительное изменение их структуры, что может влиять на свойства иммобилизованной L-АСНазы.

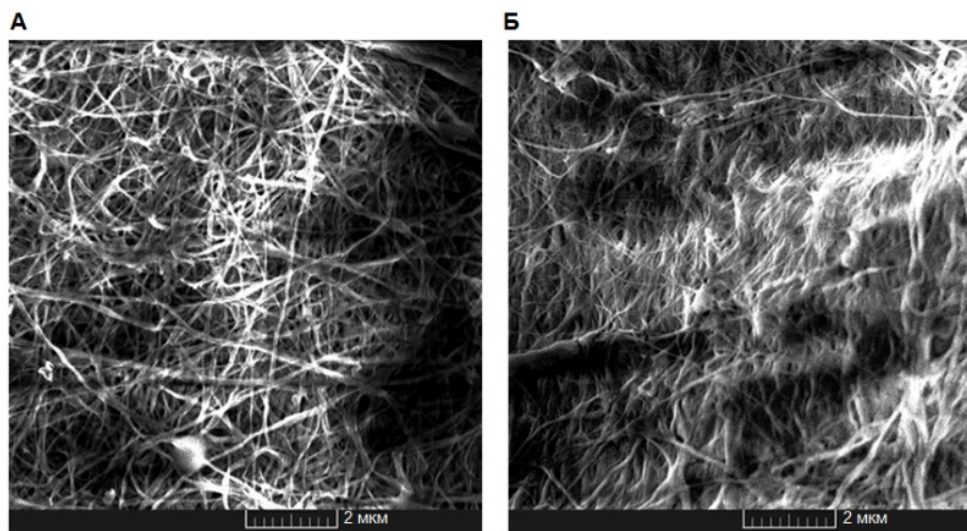


Рисунок 4. Морфология плёнок БЦ и БЦ–хитозан. (А) Микрофотографии СЭМ продольного среза нативных плёнок БЦ–хитозан. (Б) Микрофотографии СЭМ продольного среза плёнок БЦ–хитозан. Увеличение 20000×.

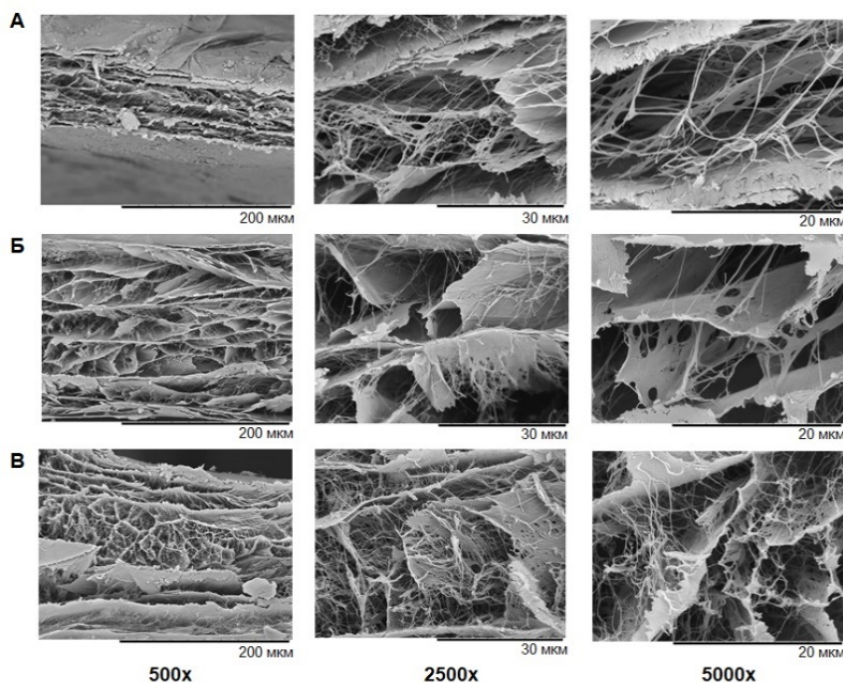


Рисунок 5. Морфология плёнок БЦ, ТЕМПО-ОБЦ и NaIO_4 -ОБЦ. Микрофотографии СЭМ поперечного среза (А) нативной плёнки БЦ, (Б) плёнок ТЕМПО-ОБЦ, (В) плёнок NaIO_4 -ОБЦ. Увеличение 500×, 2500× и 5000×.

3. Инфракрасная спектроскопия нативных и модифицированных плёнок бактериальной целлюлозы с иммобилизованной L-аспарагиназой

Для подтверждения химического состава нативных и модифицированных плёнок БЦ и иммобилизации L-АСНазы была проведена ИК-спектроскопия (рис. 6).

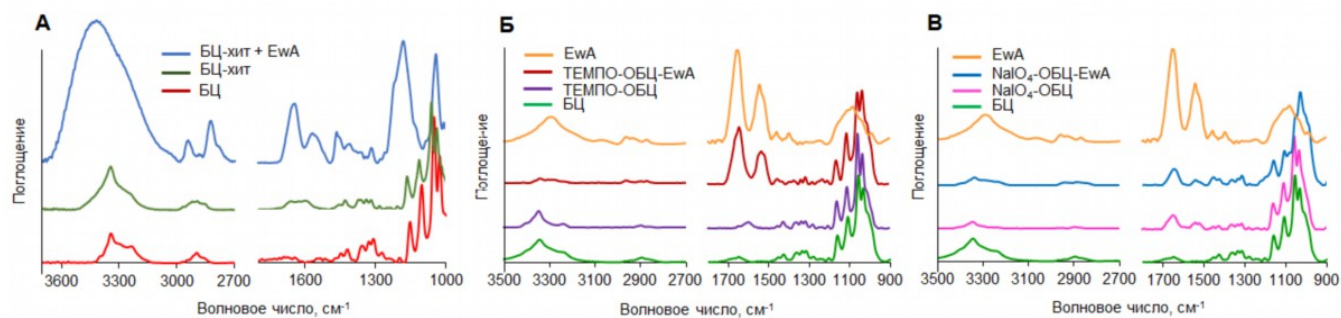


Рисунок 6. ИК-спектры нативных и модифицированных плёнок БЦ. (А) ИК-спектры плёнок БЦ–хитозан (БЦ–хит) и БЦ с L-АСНазой EwA, иммобилизованной путём физической адсорбции, в диапазоне 3700–2700 см^{-1} и 1800–1000 см^{-1} . (Б) ИК-спектры EwA, нативной плёнки БЦ, плёнок TEMPO-ОБЦ и TEMPO-ОБЦ с иммобилизованной L-АСНазой в диапазоне 3500–2700 см^{-1} и 1700–900 см^{-1} . (В) ИК-спектры EwA, нативной плёнки БЦ, плёнок NaIO₄-ОБЦ и NaIO₄-ОБЦ с иммобилизованной L-АСНазой в диапазоне 3500–2700 см^{-1} и 1700–900 см^{-1} .

Для нативных плёнок БЦ были характерны следующие полосы: 1) 3341 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям ОН групп, 2) 2895 см^{-1} (валентные колебания –CH₂– и –СН– групп), 3) 1203 см^{-1} (деформационные колебания –СН– групп), 4) 1033 см^{-1} (валентные колебания С–О-связи), 5) 1060 см^{-1} и 1103 см^{-1} (валентные колебания С–О–С-связи), 6) 1452 см^{-1} , соответствующая деформационным колебаниям –СН₂– групп (рис. 6А). Спектры БЦ–хитозан были подобны спектрам БЦ. Для плёнок БЦ и БЦ–хитозан были характерны следующие основные полосы: 1) 3335 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям ОН-групп; 2) 2876 см^{-1} , характерная для валентных колебаний –СН₂– групп; 3) 1435 см^{-1} , соответствующая деформационным колебаниям –СН– групп (рис. 5А). В спектре БЦ–хитозан присутствовали также новые полосы: 1) 1589 см^{-1} , соответствующая NH-группам хитозана; 2) 1682 см^{-1} , соответствующая –СН=N– группе хитозана. При иммобилизации L-АСНазы на плёнках БЦ–хитозан на спектре плёнок были видны характерные полосы для L-АСНаз: 1600–1700 см^{-1} (амид I) и 1500–1600 см^{-1} (амид II) (рис. 6А).

В результате окисления для плёнок TEMPO-ОБЦ были выявлены следующие изменения в спектре (рис. 6Б) по сравнению с нативными плёнками БЦ: 1) новые полосы при 1600 см^{-1} и 1400 см^{-1} , которые соответствуют валентным колебаниям –COOH-групп; 2) уменьшение полосы в области 3300 см^{-1} , соответствующей валентным колебаниям ОН-групп. Изменения в спектре (рис. 6В) были также выявлены для плёнок NaIO₄-ОБЦ: 1) появление новой полосы в области 1650 см^{-1} , соответствующей валентным колебаниям С=О-групп; 2) полосы валентных колебаний ОН- (3000–3500 см^{-1}) и –СН– (2900 см^{-1}) групп стали узкими; 3) уменьшились полосы при 1380 см^{-1} и 1040 см^{-1} , соответствующие деформационным колебаниям –СН₂– и С–О–С-связей. Для L-АСНазы, иммобилизованной на обоих типах плёнок ОБЦ, были выявлены новые полосы: амид I (1650 см^{-1}) и амид II (1535 см^{-1}). Таким образом, с помощью ИК-спектроскопии был подтверждён химический состав для всех типов плёнок БЦ и присутствие молекулы фермента.

4. Ферментативная активность L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, иммобилизованной на нативных плёнках бактериальной целлюлозы

Для оценки активности L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативные плёнки БЦ, плёнки с ферментом помещали в буфер с аспарагином и инкубировали в течение 180 мин (Рис. 7А).

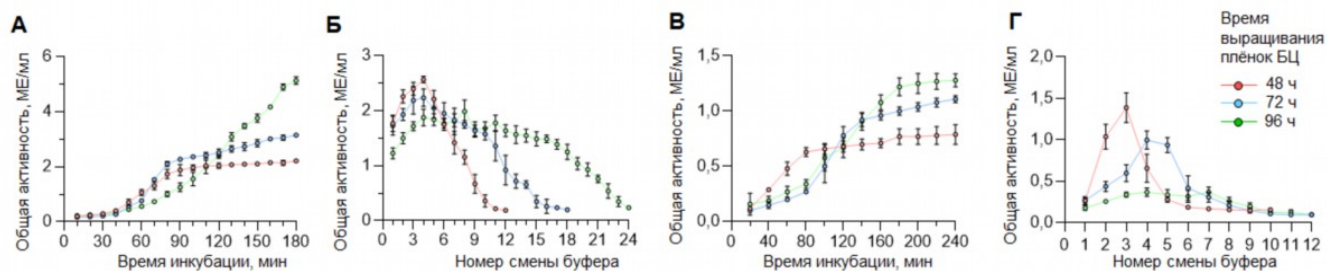


Рисунок 7. Активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативные плёнки БЦ. Плёнки БЦ были выращены в течение 48, 72 и 96 ч. (А) Изменение активности L-АСНазы, иммобилизованной на плёнки БЦ, при инкубации с L-аспарагином в течение 180 мин. (Б) Изменение активности L-АСНазы, иммобилизованной на плёнки БЦ, при смене буфера, содержащего L-аспарагин. (В) Активность L-АСНазы при высвобождении из плёнок БЦ в течение 240 мин инкубации без L-аспарагина. (Г) Активность L-АСНазы при высвобождении из плёнок БЦ при смене буфера без L-аспарагина. N = 4.

Наибольшую активность L-АСНазы EwA ($5,14 \pm 0,14$ МЕ/мл) через 180 мин наблюдали при иммобилизации на плёнки БЦ, выращенные в течение 96 ч. Чтобы определить способность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки БЦ, сохранять активность в присутствии субстрата после нескольких инкубаций, плёнки каждые 10 мин переносили в новый буфер, содержащий свежий субстрат (Рис. 7Б). При иммобилизации L-АСНазы на плёнки, выращенные в течение 96 ч, было также показано наиболее длительное время сохранения активности фермента – вплоть до 24-й смены буфера, что может быть связано с большей толщиной и массой этих плёнок. При длительной инкубации с субстратом L-АСНазы могут терять свою активность вследствие накопления продуктов реакции, закисления буфера или денатурации белка. В связи с этим был проведён эксперимент, в котором оценивали скорость высвобождения L-АСНазы EwA из плёнок БЦ, инкубируя плёнки с адсорбированным ферментом в течение 4 ч в отсутствие субстрата. Наиболее быструю скорость высвобождения L-АСНазы EwA наблюдали при иммобилизации на плёнки БЦ, выращенные в течение 48 ч. Максимальную скорость высвобождения фермента ($0,63 \pm 0,04$ МЕ/мл) наблюдали через 80 мин инкубации (рис. 7В). Плёнки, выращенные в течение 72 ч, показали умеренную скорость высвобождения L-АСНазы EwA. Наиболее медленную скорость высвобождения L-АСНазы EwA наблюдали при иммобилизации на плёнках БЦ, выращенных в течение 96 ч. Максимальную скорость высвобождения в данном случае наблюдали через 180 мин ($1,22 \pm 0,08$ МЕ/мл).

Для изучения поддержания скорости высвобождения L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативные плёнки БЦ, плёнки с ферментом каждые 20 мин переносили в свежий буфер без L-аспарагина (рис. 7Г). L-АСНаза EwA, иммобилизованная на плёнки БЦ, выращенные в течение 48 ч, показала наиболее быструю скорость высвобождения. При 3-й смене буфера её активность достигала максимума $1,39 \pm 0,18$ МЕ/мл, после чего происходило быстрое снижение активности фермента вплоть до 6-й смены буфера. Для L-АСНазы, иммобилизованной на плёнки БЦ,

выращенные в течение 72 ч, наблюдали среднюю скорость высвобождения. При иммобилизации L-АСНазы на плёнки, выращенные в течение 96 ч, наблюдали наиболее длительное постепенное время высвобождения. Максимальную активность иммобилизованной L-АСНазы наблюдали с 3 до 9-й смены буфера, после чего активность снижалась вплоть до 11-й смены буфера. Таким образом, скорость высвобождения иммобилизованной L-АСНазы EwA также напрямую зависела от толщины пленок БЦ.

5. Высвобождение L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* из нативных плёнок бактериальной целлюлозы и бактериальной целлюлозы, модифицированной хитозаном

Для создания плёнок БЦ–хитозан нами были проведены эксперименты для подбора оптимальных условий, таких как время выращивания плёнок БЦ, концентрация хитозана, время инкубации с хитозаном и время инкубации с 1% глутаровым альдегидом (рис. 8). Максимальной скоростью высвобождения фермента обладали плёнки БЦ, выращенные в течение 72 ч (рис. 8А). Наилучшую скорость высвобождения фермента показали плёнки БЦ-хитозан с концентрацией хитозана 0,05% (рис. 8Б). Было установлено, что оптимальное время инкубации БЦ и хитозана составляет 2 ч (рис. 8В). Оптимальное время инкубации композита БЦ–хитозана и глутарового альдегида были получены для плёнок, инкубированных с глутаровым альдегидом в течение 1 ч (рис. 8Г). Для сравнения скорости высвобождения L-АСНазы EwA, иммобилизованной путём физической адсорбции, на нативные плёнки БЦ и плёнки БЦ–хитозан, оценивали изменение активности иммобилизованной L-АСНазы в буфере в течение 24 ч. В первые 8 ч скорость высвобождения фермента была в 2 раза быстрее из нативных плёнок БЦ, чем из плёнок БЦ-хитозан (рис. 8Б), что говорит о том, что модификация плёнок БЦ хитозаном позволяет избежать резкого скачка высвобождения L-АСНазы в первые часы. Через 24 ч скорость высвобождения с плёнок БЦ и БЦ–хитозан была практически одинаковой.

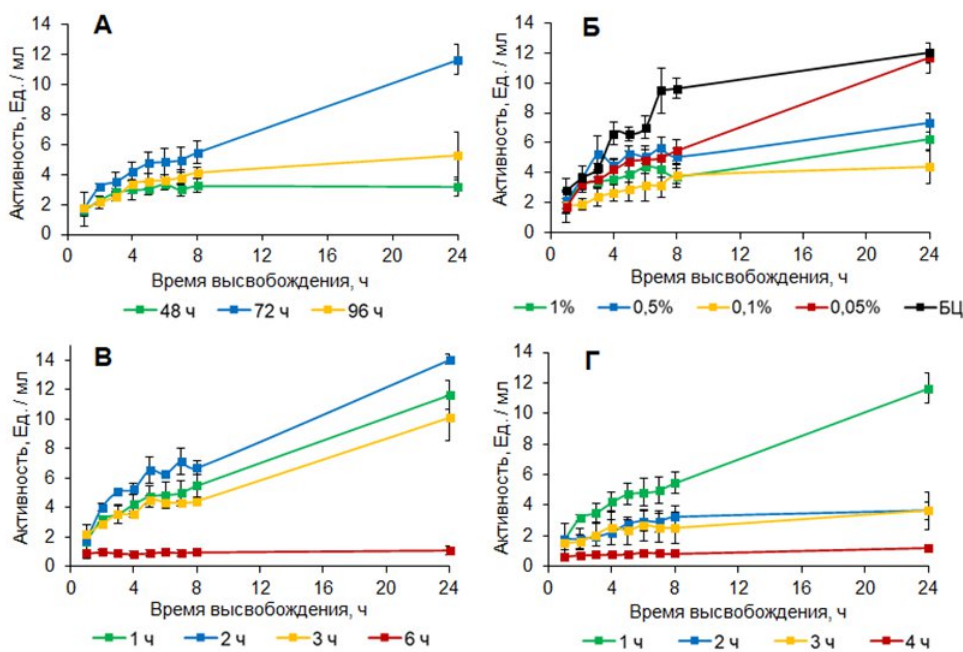


Рисунок 8. Влияние состава и условий разработки композита БЦ-хитозан на высвобождение L-АСНазы EwA в течение 24 ч. (А) Время выращивания БЦ (48, 72 или 96 ч); (Б) Концентрация хитозана (0,05; 0,1; 0,5 или 1%); (В) Время инкубации БЦ с хитозаном (1, 2, 3 или 6 ч); (Г) Время инкубации БЦ-хитозан с глутаровым альдегидом (1, 2, 3 или 4 ч). N = 4.

Данные о скорости высвобождения EwA из плёнок БЦ и БЦ–хитозан использовали для построения кинетических моделей высвобождения фермента (рис. 9).

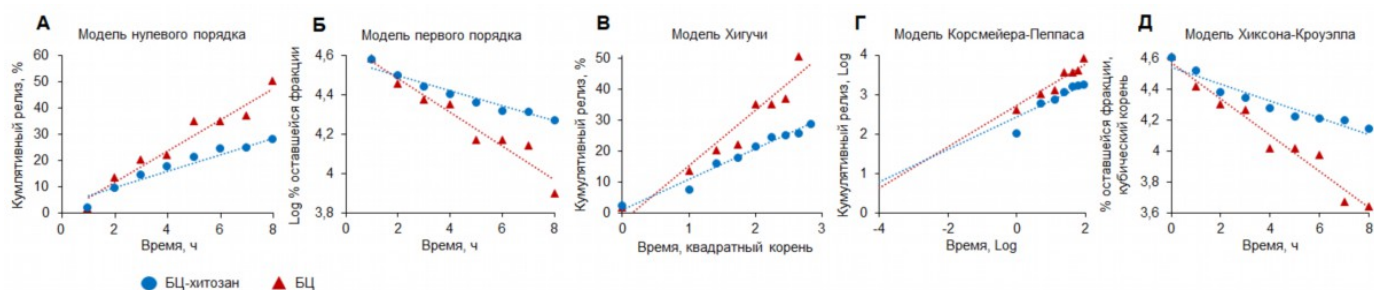


Рисунок 9. Кинетические модели высвобождения L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнке БЦ-хитозан или БЦ. Модель (А) нулевого порядка; (Б) первого порядка; (В) Хигучи; (Д) Корсмейера-Пеппаса; (Е) Хиксона-Кроуэлла.

Высвобождение из композита БЦ-хитозан соответствовало кинетической модели Хигучи ($R^2 = 0,971$; рис. 9В), для которой высвобождение препарата определяется диффузией и зависит от концентрации загруженного препарата (Ojagh et al., 2021). Высвобождение L-АСНазы EwA из нативных плёнок БЦ соответствовало кинетической модели Корсмейера-Пеппаса ($R^2 = 0,985$; рис. 9Г), для которой высвобождение препарата определяется свойствами матрицы (БЦ).

6. Влияние иммобилизации на кинетические параметры реакции, катализируемой L-аспарагиназой *Erwinia carotovora*

Для оценки K_m , V_{max} и удельной активности L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативные и модифицированные плёнки БЦ, оценивали кажущиеся кинетические параметры. Кинетические кривые гидролиза L-аспарагина L-АСНазой EwA представлены на рис. 10. Рассчитанные кажущиеся удельная активность, K_m и V_{max} для иммобилизованной L-АСНазы представлены в Табл. 1.

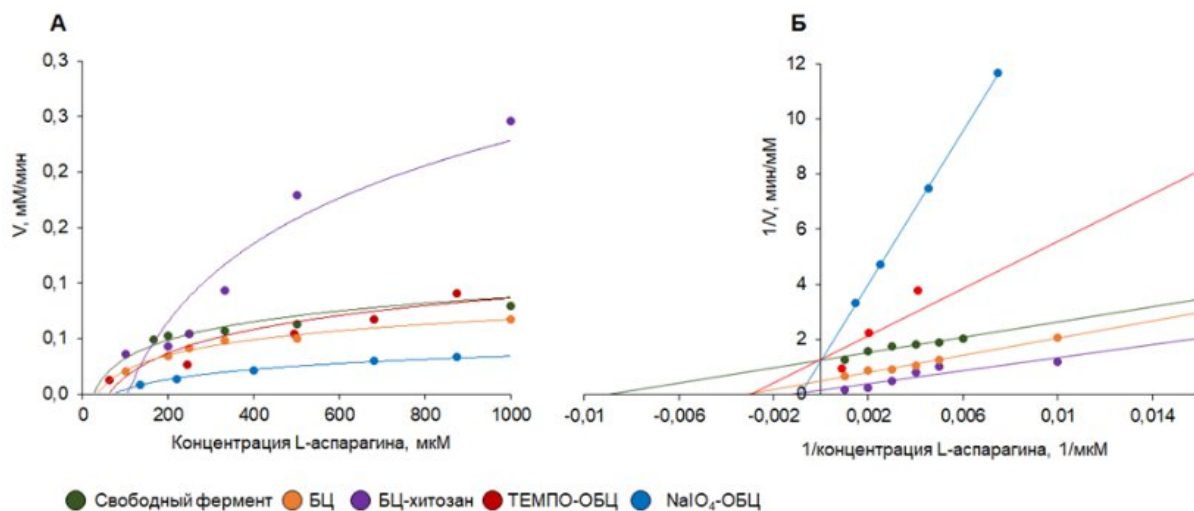


Рисунок 10. Графики зависимости скорости реакции свободной L-АСНазы и её иммобилизованных форм от концентрации субстрата (L-аспарагина), используемые для определения K_m и V_{max} . (А) Кривая Михаэлиса для нативной и иммобилизованной L-АСНазы; (Б) Линеаризация кривой Михаэлиса в виде графика Лайнуивера-Берка. Показаны исходные данные экспериментов, без учёта количества использованного фермента и времени инкубации.

Таблица 1. Кажущиеся кинетические параметры реакций, катализируемых L-АСНазой EwA в свободной и иммобилизованной формах.

Параметр	Свободная форма	БЦ-EwA	БЦ-хитозан-EwA	ТЕМПО-ОБЦ-EwA	NaIO ₄ -ОБЦ-EwA
K _m , мкМ	110	315	719	336	1131
V _{max} , мМ/мин *	7,3	2,42	3,61	0,78	0,69
Удельная активность, МЕ/мг	595	342	433	474	322

* Представлены данные после пересчёта на 1 МЕ фермента.

По сравнению со свободной формой L-АСНазы EwA значения кажущейся K_m при иммобилизации на нативные плёнки БЦ были выше в 2,9 раз, в 3,0 раза – при иммобилизации на плёнки ТЕМПО-ОБЦ, в 6,5 раза – при иммобилизации на плёнки БЦ-хитозан и в 10,3 раза – при иммобилизации на плёнки NaIO₄-ОБЦ. Значения кажущейся V_{max} при иммобилизации EwA на нативные плёнки БЦ снижались в 3,0 раза по сравнению со свободным ферментом, в 2,0 раза – при иммобилизации на плёнки БЦ-хитозан, в 9,4 раза – при иммобилизации на плёнки ТЕМПО-ОБЦ и в 10,6 раз – при иммобилизации на плёнки NaIO₄-ОБЦ. Кажущаяся удельная активность для L-АСНазы EwA, иммобилизованной на все типы плёнок БЦ, незначительно снижалась по сравнению с нативной формой EwA. Изменение кинетических параметров реакции для иммобилизованных L-АСНаз можно объяснить тем, что по сравнению со свободными ферментами, иммобилизованные ферменты часто проявляют сниженную активность из-за ограниченного доступа субстрата, что приводит к повышению у ферментов значений K_m и снижению V_{max}.

7. Влияние денатурирующих факторов на стабильность L-аспарагиназ, иммобилизованных на плёнках окисленной бактериальной целлюлозы

Одним из ключевых факторов применения терапевтических ферментов является их стабильность в различных физико-химических условиях. Немодифицированные ферменты не обладают достаточной стабильностью *in vivo*, поэтому устойчивость L-АСНаз к денатурирующим факторам служит показателем её потенциала для использования в организме. В работе применяли ковалентную иммобилизацию L-АСНаз на плёнках БЦ, окисленных ТЕМПО или NaIO₄. Было установлено, что L-АСНаза EwA, иммобилизованная на плёнки ОБЦ, обладает повышенной термостабильностью по сравнению со свободным ферментом (рис. 11).

При иммобилизации фермента на плёнки ТЕМПО температура инактивации увеличивалась с 45 °С до 55 °С (рис. 11Г), а при иммобилизации на плёнки NaIO₄-ОБЦ – с 45 °С до 60 °С (рис. 11Д). Диапазон оптимального рН для L-АСНазы, иммобилизованной на плёнки ОБЦ, был шире (6–11), чем у свободного фермента (7–9) (рис. 12). Кроме того, L-АСНаза EwA, иммобилизованная на плёнки NaIO₄-ОБЦ и была устойчива к действию мочевины (рис. 13) и трипсина (рис. 14).

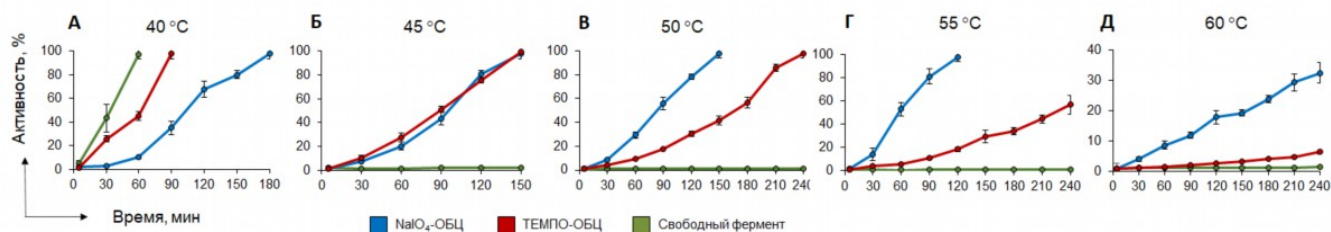


Рисунок 11. Влияние температуры на ферментативную активность EwA, иммобилизованной на плёнке ОБЦ. Плёнки ОБЦ с ферментом погружали в буфер без L-аспарагина на 10 мин и инкубировали при температуре (А) 40 °С, (Б) 45 °С, (В) 50 °С, (Г) 55 °С или (Д) 60 °С. Затем к плёнкам добавляли раствор L-аспарагина (40 мМ) и инкубировали при температуре 40–60 °С в течение 5–240 мин. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартного отклонения. N = 4. Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки; значимыми считали различия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (свободной L-АСНазой).

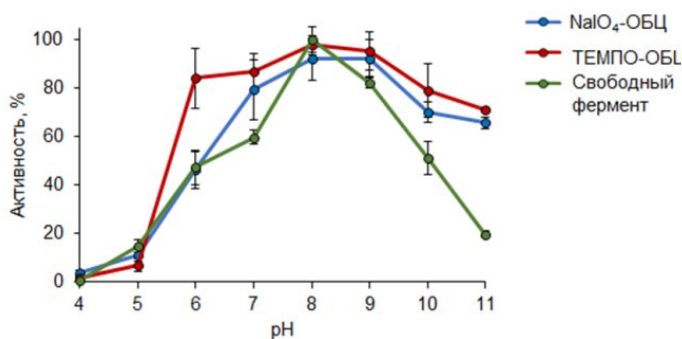


Рисунок 12. Зависимость активности EwA от pH. L-АСНазу, иммобилизованную на плёнке ОБЦ и фермент в свободной форме инкубировали при различных значениях pH (4–11) в цитратно-фосфатно-боратном буфере (15 мМ), содержащем 15 мМ L-аспарагина в при 37 °С. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартного отклонения. N = 4. Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки; значимыми считали различия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (свободной L-АСНазой).

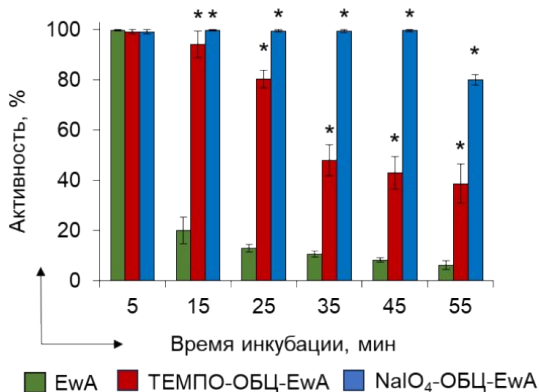


Рисунок 13. Влияние мочевины на ферментативную активность EwA, иммобилизованной на ОБЦ. EwA инкубировали с 2,5 М мочевины в течение 55 мин с последующим измерением активности. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. N = 4.

Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки; значимыми считали различия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (свободной L-АСНазой).

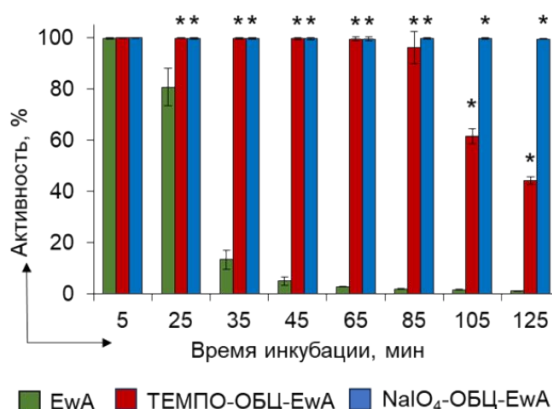


Рисунок 14. Влияние трипсина на ферментативную активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнках ОБЦ. EwA инкубировали с 21 МЕ/мл трипсина в течение 5-125 мин, затем добавляли 80 мМ L-аспарагин и через 1,5 ч измеряли активность фермента. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. N = 4. *Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки; значимыми считали различия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (свободной L-АСНазой).

Так как при иммобилизации L-АСНазы EwA на плёнки NaIO₄-ОБЦ наблюдали значительное повышение термостабильности фермента, плёнки NaIO₄-ОБЦ далее использовали для иммобилизации других L-АСНаз для оценки влияния иммобилизации на термостабильность. Температуры инактивации свободных форм L-АСНаз составили 73 °C (*E. coli*), 63 °C (*R. rubrum*) и 100 °C (*T. sibiricus*) после 10 мин инкубации (Табл. 2). При инкубации L-АСНаз, иммобилизованных на плёнки NaIO₄-ОБЦ при температуре инактивации для свободных форм было показано, что все три L-АСНазы сохраняли свою активность. Вероятно, иммобилизация различных L-АСНаз на плёнки NaIO₄-ОБЦ стабилизирует их структуру, что, в свою очередь, предотвращает агрегацию и сохраняет функциональность ферментов.

Таблица 2. Активность L-АСНаз, иммобилизованных на плёнки NaIO₄-ОБЦ, после воздействия температуры инактивации.

L-АСНаза	Температура инактивации свободного фермента, °C	Активность NaIO ₄ -ОБЦ-L-АСНазы (%) при температуре инактивации свободного фермента
<i>E. coli</i>	73	91,3 \pm 4,4
<i>T. sibiricus</i>	100	97,7 \pm 3,9
<i>R. rubrum</i>	63	90,4 \pm 2,4

Для того, что определить устойчивость к трипсину других L-АСНаз, иммобилизованных на плёнки NaIO₄-ОБЦ, провели эксперимент, в котором на плёнки NaIO₄-ОБЦ были также иммобилизованы L-АСНазы из *E. coli*, *T. sibiricus* и *R. rubrum* (рис. 15). При добавлении даже

низких концентраций трипсина (21 МЕ/мл) активность всех L-АСНаз в свободной форме значительно снижалась, при этом остаточная активность после 125 мин инкубации с трипсином сохранялось только у L-АСНаз *E. coli* (29%) и *T. sibiricus* (34%). При добавлении трипсина (210 МЕ/мл) активность также сохранялась только у L-АСНазы *T. sibiricus* (23%). В то же время активность иммобилизованных L-АСНаз не снижалась даже при добавлении очень высокой концентрации трипсина (210 МЕ/мл). Таким образом, иммобилизация на плёнки NaIO₄-ОБЦ приводит к повышению устойчивости L-АСНаз к действию трипсина.

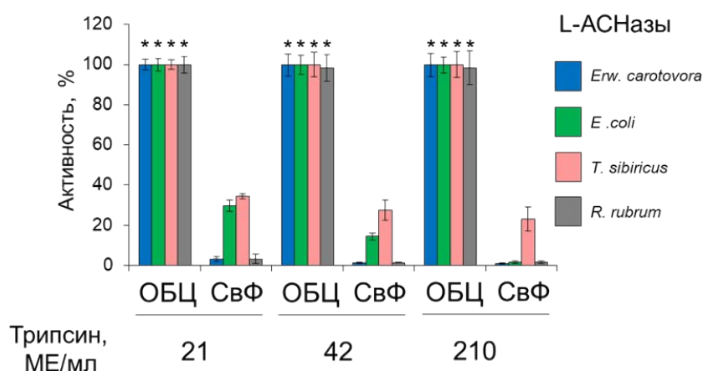


Рисунок 15. Влияние трипсина на ферментативную активность свободных L-АСНаз и L-АСНаз (*ErwA*, *E. coli*, *T. sibiricus*, *R. rubrum*), иммобилизованных на плёнках NaIO₄-ОБЦ. СвФ – свободный фермент (контроль). Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. N = 4. Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки. Значимость считали при p < 0,05 относительно контроля (свободной L-АСНазой).

8. Цитотоксическое действие иммобилизованных L-аспарагиназ на клетки опухолей

В нашем исследовании использовали иммобилизацию *ErwA* на плёнках БЦ путём физической адсорбции или ковалентного связывания для увеличения цитотоксического действия на клетки различных линий солидных опухолей. Для оценки чувствительности опухолевых клеток к действию L-АСНазы *ErwA* в свободной форме протестировали несколько клеточных линий. Значения IC₅₀ для клеточных линий после обработки *ErwA* представлены в таблице 3. Наиболее чувствительной опухолевой клеточной линией к действию L-АСНазы *ErwA* была A875 (IC₅₀ = 0,03 МЕ/мл), а наиболее резистентной – линия A375 (IC₅₀ = 0,35 МЕ/мл). Все остальные клеточные линии обладали средней чувствительностью к действию L-АСНазы.

Таблица 3. Значения IC₅₀ для клеточных линий после обработки *ErwA*.

Клеточная линия	IC ₅₀ , МЕ/мл
A375	0,35
B16F10	0,25
MelKor	0,20
MelJuso	0,13
A431	0,18
SW620	0,21
A549	0,10
A875	0,03
WI-38	8,22

Далее клетки линии А875 инкубировали с ферментом, иммобилизованным путём физической адсорбции на нативные плёнки БЦ, выращенные в течение 96 ч. Выживаемость клеток А875 снижалась каждые 24 ч (рис. 16) и через 72 ч составляла $6,09 \pm 2,47\%$ от контроля. Таким образом, при физической адсорбции L-АСНазы на плёнки БЦ сохранялась цитотоксическая активность фермента. Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной применимости БЦ для целевой доставки L-АСНазы к опухолевым клеткам, чувствительным к её действию.

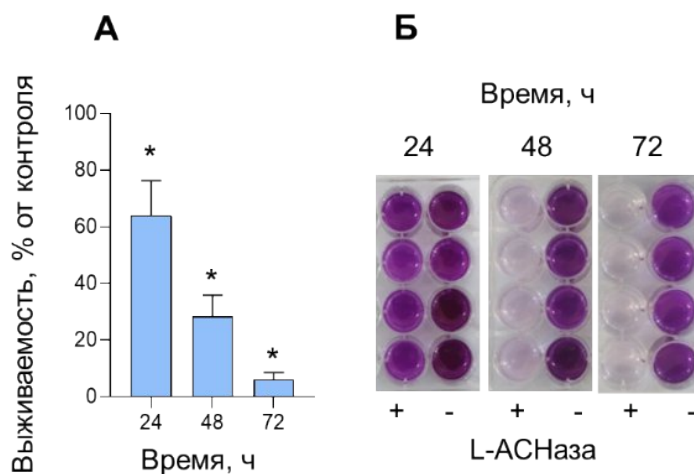


Рисунок 16. Цитотоксическая активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнках БЦ, выращенных в течение 96 ч, в отношении клеточной линии А875. Клетки инкубировали в 24-луночных планшетах с плёнками БЦ с иммобилизованным ферментом (L-АСНаза +) или без него (L-АСНазы -). МТТ-тесты проводили каждые 24 ч. (А) Выживаемость клеток после 24, 48 или 72 ч инкубации. (Б) Репрезентативная фотография МТТ-теста для клеток после 72 ч инкубации с L-АСНазой EwA. Контролем были клетки, инкубированные с нативными плёнками БЦ без L-АСНазы. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. N = 4. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем по t-критерию Стьюдента.

Для сравнения продолжительности действия L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки БЦ или БЦ-хитозан, плёнки последовательно переносили каждые 3 ч в новые ячейки с клетками меланомы А875 (рис. 17А) или фибробластами WI-38 (рис. 17Б). Как и при длительной инкубации в буфере (рис. 8Б), при инкубации с клетками, L-АСНаза EwA, иммобилизованная на плёнки БЦ-хитозан, высвобождалась медленнее, чем из нативных плёнок БЦ. При иммобилизации на нативные плёнки БЦ L-АСНаза EwA не сохраняла цитотоксическую активность в отношении клеток А875 уже после первого переноса. И, напротив, L-АСНаза, иммобилизованная на плёнки БЦ-хитозан, обладала пролонгированной в 2 раза цитотоксической активностью на клетки А875 (рис. 17А). После 2 последовательных инкубаций (6 ч) выживаемость опухолевых клеток составляла около 50%, а после четырех последовательных инкубаций с клетками (12 ч) – 80%. L-АСНаза EwA, иммобилизованная путём физической адсорбции на плёнки БЦ и БЦ-хитозан, не обладала цитотоксической активностью в отношении фибробластов WI-38 (рис. 17Б), что, вероятно, связано с низкой чувствительностью этих клеток к действию L-АСНазы ($IC_{50} = 8,22$). Тем самым, иммобилизация L-АСНазы на плёнки БЦ-хитозан приводит к увеличению продолжительности цитотоксического действия фермента на опухолевые клетки и не влияет на выживаемость нормальных клеток.

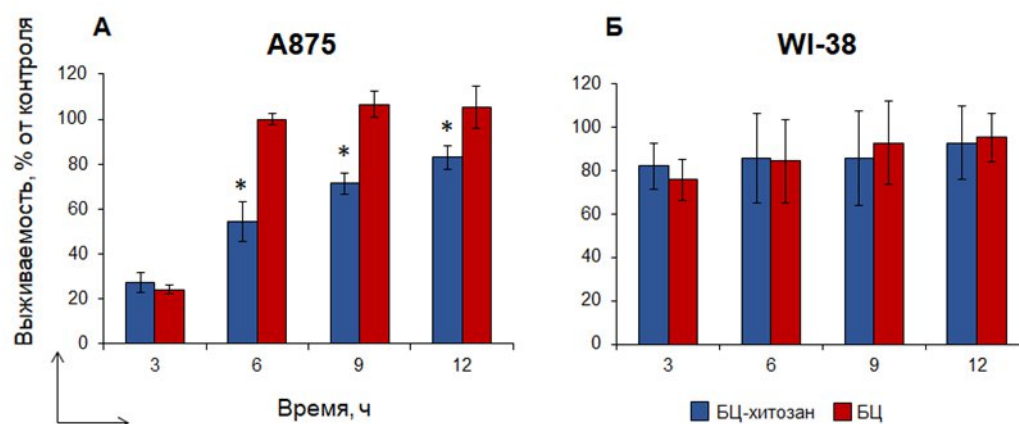


Рисунок 17. Цитотоксическая активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнках БЦ-хитозан и БЦ в отношении клеточных линий меланомы A875 и фибробластов WI-38. Плёнки с адсорбированным ферментом инкубировали по 3 ч с опухолевыми клетками, после чего переносили в новые ячейки 24-луночного планшета. Через 72 ч оценивали выживаемость клеток с помощью МТТ-теста. (А) Выживаемость клеток A875 после инкубации с L-АСНазой, иммобилизованной на плёнки БЦ-хитозан и БЦ. (Б) Выживаемость клеток WI-38 после инкубации с L-АСНазой, иммобилизованной на плёнки БЦ-хитозан и БЦ. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. N = 3. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем (нативными плёнками БЦ с иммобилизованной L-АСНазой) по t-критерию Стьюдента.

Для оценки цитотоксической активности L-АСНазы EwA, ковалентно иммобилизованной на плёнки ОБЦ, проведено пять последовательных инкубаций плёнок с опухолевыми клетками и фибробластами WI-38 по 3 ч. L-АСНаза EwA, иммобилизованная на плёнки NaIO₄-ОБЦ, показала наиболее выраженную цитотоксическую активность в отношении различных клеточных линий опухолей, в том числе наиболее резистентной к L-АСНазе линии A375 (рис. 18, табл. 3). После пятой инкубации выживаемость опухолевых клеток составляла от 16,6% (клеточная линия A375) до 45,8% (клеточная линия A875). L-АСНаза EwA, иммобилизованная на плёнки ТЕМПО-ОБЦ, показала значительно более низкую цитотоксичность. После пятой инкубации выживаемость опухолевых клеток составила от 56,3% (клеточная линия A549) до 90% (клеточные линии A375, A431, SW-620). Для L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативных плёнках БЦ, наблюдали наиболее быструю потерю цитотоксичности. Фибробласты WI-38 проявили чувствительность к L-АСНазе EwA, иммобилизованной на обоих типах ОБЦ, только при первых двух инкубациях (рис. 18E). Таким образом, L-АСНаза EwA, иммобилизованная на плёнки NaIO₄-ОБЦ, обладала самой высокой цитотоксической активностью в отношении всех линий опухолевых клеток, что может быть обусловлено ограничением конформационной гибкости L-АСНазы вследствие ковалентной иммобилизации.

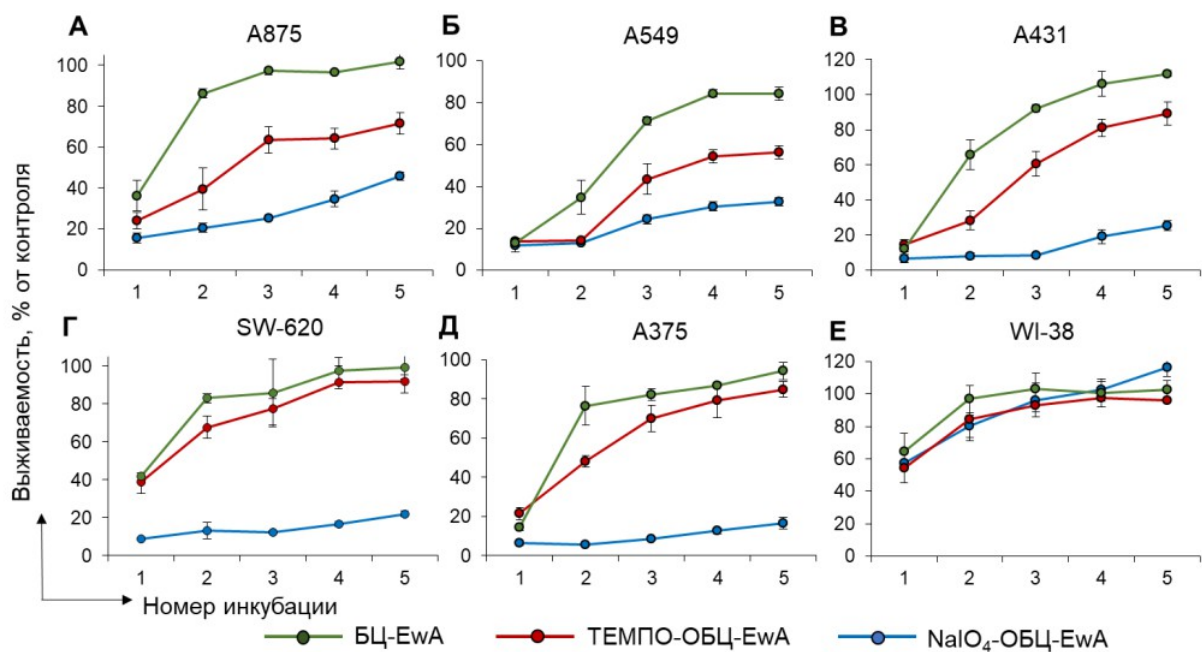


Рисунок 18. Цитотоксическая активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнках БЦ, ТЕМПО-ОБЦ или NaIO₄-ОБЦ, в отношении клеточных линий солидных опухолей человека и фибробластов. Плёнки инкубировали с клетками в 24-луночном планшете, а затем переносили в новые лунки с интервалом 3 ч. Выживаемость клеток измеряли через 72 ч с помощью МТТ-теста. (А) Меланома А875; (Б) Карцинома лёгкого А549; (В) Меланома А431; (Г) Колоректальный рак SW-620; (Д) Меланома А375; (Е) Фибробласты WI-38. Контрольные клетки инкубировали с плёнками ОБЦ без L-АСНазы. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения. N = 4. Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки; значимыми считали различия при p < 0,05 по сравнению с контролем (свободной L-АСНазой).

Чтобы проверить влияние иммобилизации на плёнки NaIO₄-ОБЦ на цитотоксическую активность других L-АСНаз (*E. coli*, *T. sibiricus*, *R. rubrum*), был проведен эксперимент, аналогичный вышеописанному. В качестве клеточной линии выбрали наиболее устойчивую к действию EwA (табл. 8) линию меланомы А375. При оценке цитотоксичности L-АСНаз была выявлена значительная разница для выживаемости опухолевых клеток после 2 переноса в зависимости от типа добавленной L-АСНазы (рис. 19). Наибольшей цитотоксичностью обладала L-АСНаза *E. coli*, вызывая гибель ~ 90% опухолевых клеток даже после 5 инкубации. В то же время, L-АСНазы *T. sibiricus* и *R. rubrum* обладали меньшей цитотоксичностью, вызывая гибель 43% и 35% опухолевых клеток А375, соответственно. Различия в цитотоксичности иммобилизованных L-АСНаз EwA и *E. coli* по сравнению с L-АСНазами *T. sibiricus* и *R. rubrum* могут быть связаны с особенностями структуры ферментов и различным механизмом действия на опухолевые клетки.

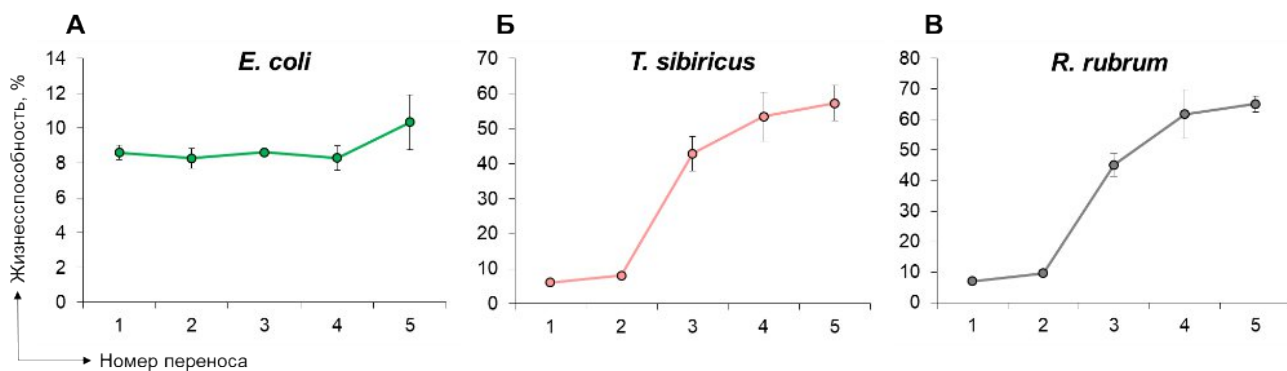


Рисунок 19. Цитотоксическая активность L-АСНаз, иммобилизованных на плёнках NaIO₄-ОБЦ, в отношении клеточной линии меланомы A375. (А) *E. coli*; (Б) *T. sibiricus*; (В) *R. rubrum*. Плёнки инкубировали с клетками в 24-луночном планшете, а затем переносили в новые лунки с интервалом 3 ч. Выживаемость клеток измеряли через 72 ч с помощью МТТ-теста. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БЦ является перспективным носителем для доставки различных препаратов благодаря биосовместимости, нетоксичности и возможности непрерывной локализованной доставки в опухоль. Ранее плёнки БЦ не использовались для иммобилизации L-АСНаз, однако, многие противоопухолевые препараты были иммобилизованы на БЦ. В данной работе впервые для увеличения стабильности и пролонгирования действия L-АСНаз были использованы плёнки БЦ и разработаны четыре модификации плёнок. Для нековалентной иммобилизации L-АСНаз использовали нативные плёнки БЦ и плёнки БЦ-хитозан. Впервые показано, что иммобилизованная на нативные плёнки L-АСНаза EwA сохраняла ферментативную активность и обладала высокой цитотоксичностью в отношении линии клеток меланомы человека A875. При иммобилизации на плёнки БЦ-хитозан фермент обладал пролонгированной в 2 раза цитотоксической активностью на клетки меланомы A875 по сравнению с L-АСНазой, иммобилизованной на нативные плёнки БЦ. Для ковалентной иммобилизации L-АСНаз плёнки БЦ были окислены ТЕМПО или NaIO₄. По сравнению со свободной формой фермента, при иммобилизации на плёнки NaIO₄-ОБЦ L-АСНазы (*EwA*, *E. coli*, *T. sibiricus*, *R. rubrum*) обладали повышенной термостабильностью и были устойчивы к действию трипсина. При оценке цитотоксичности L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки NaIO₄-ОБЦ выявлено, что фермент сохраняет цитотоксическую активность даже после пяти последовательных инкубаций на всех линиях опухолевых клеток, в том числе изначально мало чувствительных к действию фермента. На нормальные клетки L-АСНаза EwA, иммобилизованная как на все типы плёнок не оказывала цитотоксического воздействия. Эти результаты расширяют возможности потенциального применения L-АСНаз не только для лечения ОЛЛ, и подчеркивают, что плёнки ОБЦ являются перспективной платформой для иммобилизации L-АСНаз для лечения солидных опухолей. Плёнка ОБЦ с ковалентно иммобилизованной L-АСНазой может быть перспективным вариантом для уничтожения оставшихся опухолевых клеток после операции. В будущем планируется продолжение исследований формуляции NaIO₄-ОБЦ, где ОБЦ будет гомогенизирована, и будут изучены различные пути доставки L-АСНазы, иммобилизованной на NaIO₄-ОБЦ *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Плёнки БЦ, выращенные в течение 96 ч, способны адсорбировать наибольшее количество L-АСНазы при сохранении наибольшей ферментативной активности и наибольшего времени высвобождения.

2. Модификация плёнок БЦ хитозаном приводит к формированию более упорядоченной пористой структуры плёнок, увеличивает их адсорбционную ёмкость и понижает скорость высвобождения фермента в два раза.

3. Ковалентная иммобилизация L-АСНаз на плёнки БЦ, окисленные NaIO_4 , увеличивает температуру инактивации фермента до 60 °С, расширяет диапазон рН действия фермента до 6—11, повышает устойчивость к действию мочевины в 8 раз и приводит к устойчивости к действию трипсина.

4. L-АСНазы, иммобилизованные на нативные плёнки БЦ и плёнки БЦ, модифицированные хитозаном, сохраняют активность в отношении клеток солидных опухолей. Ковалентная иммобилизация L-АСНаз на плёнки БЦ, окисленные NaIO_4 , пролонгирует активность ферментов и вызывает гибель клеток, изначально слабо чувствительных к действию свободных форм L-АСНаз.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных журналах

1. **Shishparenok A.N.**, Gladilina Yu.A., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Kraevsky S.V., Ivanov Yu.D., Kozlov A.F., Zlotnikov I.D., Kudryashova E.V., Atroshenko D.L., Zhdanov D.D., Immobilization of L-asparaginase on oxidized bacterial cellulose to enhance stability and cytotoxic activity // *International Journal Biological Macromolecules*. – 2026. – V. 339(1). – 149992.

2. **Shishparenok A.N.**, Koroleva S.A., Dobryakova N.V., Gladilina YA, Gromovykh T.I., Solopov A.B., Kudryashova E.V., Zhdanov D.D. Bacterial cellulose films for L-asparaginase delivery to melanoma cells // *International Journal Biological Macromolecules*. – 2024. – V. 276(1). – 133932.

3. **Шишпарёнок А.Н.**, Петряев Е.Р., Королёва С.А., Добрякова Н.В., Злотников И.Д., Комедчикова Е.Н., Колесникова О.А., Кудряшова Е.В., Жданов Д.Д. Композит бактериальной целлюлозы и хитозана для пролонгированного действия L-аспарагиназы на клетки меланомы // *Биохимия*. – 2024. Т. 89(10). – С. 1649–1667.

Shishparenok A.N., Petryaev E.R., Koroleva S.A., Dobryakova N.V., Zlotnikov I.D., Komedchikova E.N., Kolesnikova O.A., Kudryashova E.V., Zhdanov D.D. Bacterial Cellulose-Chitosan Composite for Prolonged-Action L-Asparaginase in Treatment of Melanoma Cells // *Biochemistry Moscow*. – 2024. – V. 89(10). – 1727–1743.

4. **Шишпарёнок А.**, Королёва С., Злотников И., Гладиллина Ю., Покровская М., Александрова С., Жданов Д. Иммобилизация на окисленной бактериальной целлюлозе L-аспарагиназы для улучшения термостабильности фермента // *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. – 2024. – Т. 7(3). – e00234.

5. **Shishparenok A.N.**, Furman V.V., Dobryakova N.V., Zhdanov D.D. Protein Immobilization on Bacterial Cellulose for Biomedical Application // *Polymers*. – 2024. – V. 16(17). – 2468.

6. **Shishparenok A.N.**, Gladilina Y.A., Zhdanov D.D. Engineering and Expression Strategies for Optimization of L-Asparaginase Development and Production // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – V. 24(20). – 15220.

Материалы конференций

7. **Шишпарёнок А.Н.**, Гладиллина Ю.А., Жданов Д.Д. Иммобилизация L-аспарагиназы на окисленной бактериальной целлюлозе для доставки в клетки солидных опухолей // Сборник тезисов 78-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» с международным участием, Нижний Новгород. – 2025. – 293 С.

8. Петряев Е.Р., Королёва С.А., **Шишпарёнок А.Н.**, Жданов Д.Д. Композиты на основе бактериальной целлюлозы и хитозана для доставки L-аспарагиназы в опухолевые клетки // Сборник тезисов 27-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века», Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН. – 2024. – С. 144.

9. **Шишпарёнок А.Н.**, Петряев Е.Р., Королёва С.А., Добрякова Н.В., Злотников И.Д., Комедчикова Е.Д., Колесникова О.А., Кудряшова Е.В., Жданов Д.Д. Модификация бактериальной целлюлозы хитозаном для пролонгированного действия L-аспарагиназы на опухолевые клетки // Сборник научных трудов Всероссийской конференции с международным участием «Биомедицинская химия: наука и практика», Москва: Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича. – 2024. – С.54.

10. **Шишпарёнок А.Н.**, Королёва С.А., Добрякова Н.В., Кудряшова Е.В., Гладиллина Ю.А., Жданов Д.Д. Биокompозит бактериальной целлюлозы для доставки L-аспарагиназы к клеткам меланомы // Сборник тезисов докладов VI Международной конференции «ПОСТГЕНОМ'2024», XI Российского симпозиума «Белки и пептиды» и Российско-китайского конгресса в области наук о жизни, Москва: «Перо». – 2024. – С. 318.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность за помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы научному руководителю, заведующему лаборатории медицинской биотехнологии ИБМХ, д.б.н., доценту Жданову Дмитрию Дмитриевичу, а также коллективу лаборатории медицинской биотехнологии ИБМХ.

Автор выражает искреннюю благодарность за предоставление плёнок штамма *K. hansenii* GH-1/2008 д.б.н., профессору кафедры «ХимБиотех» факультета химической технологии и биотехнологии Московского Политехнического Университета Громовых Татьяне Ильиничне.

Автор выражает искреннюю благодарность за лиофилизацию плёнок БЦ ведущему инженеру лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ Козлову Андрею Фёдоровичу.

Автор выражает искреннюю признательность за предоставление ИК-спектров плёнок БЦ коллективу НИЛ кинетики и механики ферментативных процессов химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автор выражает искреннюю признательность за получение микрофотографий сканирующей электронной микроскопии ведущему инженеру лаборатории № 5 «Институт нефтехимического синтеза имени А.В. Топчиева» Солопову Алексею Борисовичу.