



<https://doi.org/10.15407/cryo35.01.046>

УДК 57.086.13:577.15:547.458:544.77.022.822

І.П. Хала^{1, *}, С.В. Репіна¹, О.А. Нардід^{1, 2}, Є.Й. Науменко¹, Д.О. Мангасаров¹

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

² Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

* irynagor@gmail.com

ЧИ ЗБЕРІГАЄ ТЕМПЕРАТУРА -80°C АКТИВНІСТЬ ВБУДОВАНИХ У АЛЬГІНАТНІ МІКРОКАПСУЛИ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ?

Ключові слова: каталаза, супероксиддисмутаза, низькотемпературне зберігання, альгінатні мікрокапсули.

Серед широкого класу ферментів, що мають практичне значення у медицині та біотехнологіях, виділяються супероксиддисмутаза (СОД/SOD) та каталаза (КАТ/CAT), які є важливішими факторами антиоксидантного захисту [1, 10]. У сучасній роботі S. Anwar та співавт. [1] наголошується, що суттєвими перепонами до ще більш поширеного використання каталази у практичній медицині є недостатня стабільність, низька біодоступність та специфічність доставлення цього ферменту до тканин-мішеней. Підвищення/покращення цих показників, а також «довговічності» каталази зможе розкрити її повний терапевтичний потенціал. Одним зі шляхів вирішення цієї проблеми вважається вбудовування ферменту у різні мікроносії, зокрема на основі альгінату. Все вищеописане також стосується ферменту СОД [10], яка крім того володіє терапевтичними властивостями.

Широке використання вбудованих у гідрогелеві носії ферментів у біомедицині і біотехнологіях потребує розробки методів їх довгострокового зберігання зі збереженням ферментативної активності. В літературі наво-

дяться дані щодо зберігання гідрогелевих носіїв із вбудованими ферментами за температури 4°C [9], але на сьогодні недостатньо робіт присвячено зберіганню цих комплексів за низьких температур.

Багато уваги приділяється дослідженням, що стосуються заморожування та зберігання різних біооб'єктів за температури -80°C , зокрема моноклональні антитіла, різні ферменти, екстрацелюлярні везикули тощо [4–6, 8].

Сукупність отриманих результатів свідчить про перспективність зберігання біологічних речовин за температури -80°C зі збереженням їхніх властивостей для подальшого використання у медичній практиці та біотехнологіях. Проте залишається не вирішеним питання про можливість прямого поширення отриманих результатів на інші біооб'єкти.

Для змін характеристик гідрогелів на основі альгінату натрію зазвичай застосовують їх модифікування, зокрема, лапонітом — біосумісним наноматеріалом, що легко біорозкладається, покращує вбудовування білків та механічні властивості гідрогелів. Змінюючи

Цитування: Хала І.П., Репіна С.В., Нардід О.А., Науменко Є.Й., Мангасаров Д.О. Чи зберігає температура -80°C активність вбудованих у альгінатні мікрокапсули антиоксидантних ферментів? *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; (1): 46–49. <https://doi.org/10.15407/cryo35.01.046>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2025. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

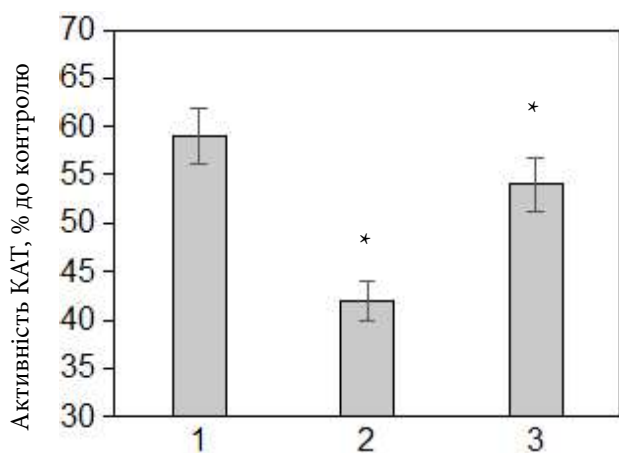


Рис. 1. Вплив зберігання за температури -80°C впродовж 30 діб на активність каталази. 1 — альгінатні капсули, 2 — альгінатні капсули з лапонітом, 3 — у буферному розчині. * — відмінності значущі порівняно з активністю КАТ в альгінатних капсулах, $p < 0,05$

вміст лапоніту у гідрогелях, можна налаштувати кінетику вивільнення білків [2].

Мета роботи — дослідження впливу зберігання за температури -80°C на активність білків-ферментів: супероксиддисмутази та каталази, вбудованих у альгінатні мікрокапсули та модифіковані наночастинками лапоніту альгінатні мікрокапсули.

У дослідженні використовували альгінат натрію (ChemCruz, США) низької в'язкості (2–4 сП); лапоніт RD (GMW, Німеччина), СОД (Sigma-Aldrich Chemical, Німеччина), КАТ (Sigma-Aldrich Chemical) та CaCl_2 (UkrChemGroup, Україна). Альгінатні мікрокапсули та модифіковані наночастинками лапоніту альгінатні мікрокапсули з вбудованими ферментами отримували, за методом І.Р. Khala та співавт. [7] з деякими змінами. Розчин альгінату натрію з ферментами готували наступним чином: 2 мл вихідного розчину ферменту (10 мг/мл для СОД і 20 мг/мл для КАТ) змішували з 300 мкл 2 %-го розчину альгінату натрію, доводили до 5 мл буфером Трис-НСІ (рН=7,8) та додавали у ванну з 2 %-м CaCl_2 у тому ж буфері — методом примусового відриву краплі від кінчика розпилювача за допомогою потоку повітря. Активність СОД і КАТ визначали за вищезазначеною методикою [7]. За контроль вважали активність ферментів у вихідному розчині. Подальші розрахунки активності проводили з урахуванням

розведення ферментів. Для оцінки ефективності вбудовування ферментів у гідрогелі та контролю за їх витоком вимірювали концентрацію ферментів спектрофотометрично (довжина хвилі 280 нм) у мікрокапсулах та надосаді після їх осадження. Спектри поглинання записували на спектрофотометрі «Pye Unicam SP 8000» (Pye Unicam Ltd, Велика Британія).

Для вивчення впливу температури -80°C на активність ферментів у складі мікрокапсул останні заморозували і зберігали у наднизькій температурній морозильній камері — «Haier DW-86W100J» (Haier Biomedical Co., Китай), за температури -80°C впродовж 30 діб. Відігрівали на водяній бані при 37°C .

Дані на рисунках наведено у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення. Статистичну обробку експериментальних результатів проводили за допомогою програми «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., США). Статистичну значущість відмінностей досліджуваних числових показників перевіряли за критерієм Манна-Уїтні. Відмінності вважали значущими при $p \leq 0,05$. Кількість експериментів у кожній серії дослідів була не менше п'яти.

З використанням іонотропного гелеутворення сформовано альгінатні, у тому числі й модифіковані наночастинками лапоніту, мікрокапсули діаметром 0,4–0,8 мм з інкапсульованими ферментами, які зберігають при цьому достатню активність порівняно з вихідним розчином.

Після 30 діб зберігання КАТ, вбудованої в гідрогелеві мікрокапсули, при -80°C активність ферменту знизилася порівняно з контролем (активність у вихідному розчині). При цьому, як можна бачити на рис. 1, активність КАТ, що зберігалася у складі альгінатних мікрокапсул, складала 59 %, що було дещо вище, ніж активність КАТ, після зберігання у буферному розчині (54 %). Зберігання протягом 30 діб за температури -80°C найбільш вплинуло на активність КАТ, вбудованої в модифіковані наночастинками лапоніту альгінатні мікрокапсули. Активність зменшилась до 42 %, що значно нижче цього показника для неімобілізованої КАТ (рис. 1).

Дослідження показали, що 30-добове зберігання СОД за температури -80°C практично не впливало на активність ферменту, вбудова-

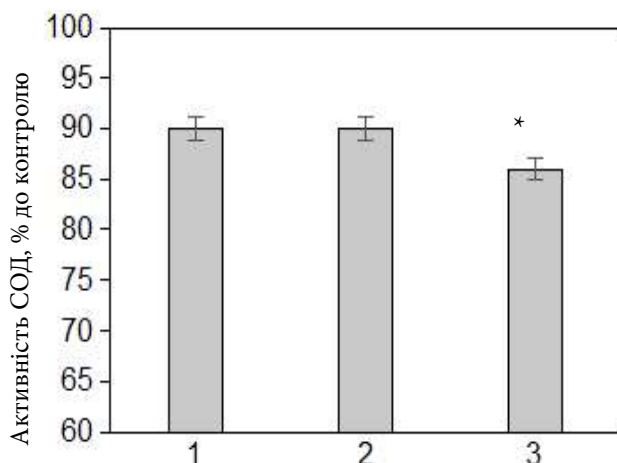


Рис. 2. Вплив зберігання за температури -80°C впродовж 30 діб на активність супероксиддисмутази. 1 — альгінатні капсули, 2 — альгінатні капсули з лапонітом, 3 — у буферному розчині. * — відмінності значущі порівняно з активністю СОД в альгінатних капсулах, $p < 0,05$

ного як у альгінатні мікрокапсули, так і в альгінатні мікрокапсули, модифіковані наночастинками лапоніту. Активність СОД в обох випадках складала близько 90 % від такої у вихідному розчині (рис. 2) і перевищувала активність СОД, що зберігалася у буферному розчині (86 %).

Показано, що зберігання при -80°C впливає на властивості антиоксидантних ферментів — каталазу і супероксиддисмутази. Що співвідноситься з даними отриманими J. Hartmann і F. Asch [4], які на прикладі антиоксидантних ферментів з тканин рису — аскорбатпероксидази, глутатіонредуктази та супероксиддисмутази, виявили різний вплив оточення, у якому проводили заморожування (екстракти тканин, буферні розчини), терміну зберігання та самої температури (-20 і -80°C) на збереженість активності цих ферментів. Крім того,

досліджувані нами ферменти суттєво відрізняються за молекулярними масами та конформацією (КАТ — тетрамер з чотирьох поліпептидних ланцюгів (250 кДа) та СОД — гомодимер (32,5 кДа)). Вірогідно, цей факт теж може пояснювати різний вплив зберігання за -80°C на активність вбудованих у альгінатні мікроносії ферментів.

Результати дослідження заморожування і зберігання моноклональних антитіл показали, що їх тривале зберігання у фосфатно-буферному розчині в замороженому стані за -80°C не призводить до додаткової агрегації порівняно з одним циклом заморожування-відтавання [5, 8]. Це показує, що деградація білка відбувається швидше за все під час заморожування-відтавання, а не після тривалого зберігання. Про порушення структури біоб'єктів у процесі повільного заморожування до -80°C свідчать також висновки роботи О.І. Gordiyenko та співавт. [3].

Таким чином, зберігання за температури -80°C сприяло збереженню активності вбудованої у альгінатні мікрокапсули СОД, але призводило до зниження активності КАТ. Слід відмітити, що модифікація альгінатних гідрогелів наночастинками лапоніту по-різному впливає на збереженість СОД і КАТ. Це може бути наслідком як безпосереднього впливу лапоніту на активність вбудованого ферменту, так і структури самого гідрогелю зміненої завдяки лапоніту.

Для розуміння цієї різниці необхідне проведення подальших порівняльних досліджень щодо зберігання вбудованих у альгінатні носії ферментів за температури -40°C .

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Anwar S, Alrumaihi F, Sarwar T, *et al.* Exploring therapeutic potential of catalase: strategies in disease prevention and management. *Biomolecules* [Internet]. 2024 June 19 [cited 2024 May 14]; 14(6): 697. Available from: <https://www.mdpi.com/2829608>
2. Gonzalez-Pujana A, Igartua M, Hernandez RM, Santos-Vizcaino E. Laponite nanoclays for the sustained delivery of therapeutic proteins. *Eur J Pharm Sci.* [Internet]. 2024 Oct 24 [cited 2024 Jul 19]; 201: 106858. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098724001702>
3. Gordiyenko OI, Kovalenko IF, Rogulska OY, *et al.* Theory-based cryopreservation mode of mesenchymal stromal cell spheroids. *Cryobiology.* [Internet]. 2024 May 27 [cited 2024 Jun 9]; 115: 104906. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224024000610>

- Hartmann J, Asch F. Extraction, storage duration, and storage temperature affect the activity of ascorbate peroxidase, glutathione reductase, and superoxide dismutase in rice tissue. *Biology (Basel)* [Internet]. 2019 Sep 24 [cited 2024 Aug 29]; 8(4): 70. Available from: <https://www.mdpi.com/539976>
- Hauptmann A, Hoelzl G, Loerting T. Distribution of protein content and number of aggregates in monoclonal antibody formulation after large-scale freezing. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2019 Jan 10 [cited 2018 Dec 17]; 20(2): 72. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-018-1281-z>
- Jeyaram A, Jay SM. Preservation and storage stability of extracellular vesicles for therapeutic applications. *AAPS J.* [Internet]. 2018 Nov 27 [cited 2018 Aug 8]; 20: 1. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-017-0160-y>
- Khala IP, Rozanova KD, Repina SV, *et al.* Low temperature influence on activity in alginate microcapsules incorporated-enzymes. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2023; 33(4): 263–7.
- Mezhebovsky T, Routhier E, Sass P, *et al.* Enabling freeze-thaw stability of PBS-based formulations of a monoclonal antibody. *BioPharm Int.* 2016; 8: 33–9.
- Weng Y, Wan A, Li Y, *et al.* Scalable manufacturing of enzyme loaded alginate particles with excellent thermal and storage stability for industrial applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* [Internet]. 2023 Apr 10 [cited 2023 Apr 7]; 667: 131412. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777572300496X>
- Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci Qassim.* 2018; 12(3): 88–93.

Надійшла 21.01.2025

Прийнята до друку 20.02.2025

I.P. Khala^{1*}, S.V. Repina¹, O.A. Nardid^{1,2}, Ye.Y. Naumenko¹, D.O. Mangasarov¹

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

*iryagor@gmail.com

DOES THE TEMPERATURE OF –80 °C PRESERVE THE ACTIVITY
OF ANTIOXIDANT ENZYMES EMBEDDED INTO ALGINATE MICROCAPSULES?

Key words: catalase, superoxide dismutase, low temperature storage, alginate microcapsules.