

И. А. Красовицкая (ст. преп.), С. В. Холодаева (магистрант), Н. В. Котова (к. х. н., доц.)

СОРБЦИЯ КОКАРБОКСИЛАЗЫ В СТАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ НА СОРБЕНТАХ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, кафедра биотехнологии
197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14; e-mail: krasovizkaya.irina@pharminnotech.com

I. A. Krasovitskaya, S. V. Kholodaeva, N. V. Kotova

SORPTION OF COCARBOXYLASE BY VARIOUS SORBENTS IN STATIC CONDITIONS

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University

14, Prof. Popova Str., 197376, St. Petersburg, Russia; e-mail: krasovizkaya.irina@pharminnotech.com

Представлены объединенные результаты исследований процесса сорбции кокарбоксилазы на катионитах и анионитах различной структуры с целью подбора эффективного и доступного сорбента для разработки технологии выделения и очистки кокарбоксилазы. Установлено, что сорбенты ABER HPR 1100, MN-500, КУ-2-20, S950, A-847, A-100, A-600 превосходят традиционный КУ-23 по большинству показателей. Наиболее перспективным для создания импортонезависимой технологии является применение сульфокатионита отечественного производства КУ-2-20.

Ключевые слова: анионит; диабет; изотерма; катионит; кокарбоксилаза; сердечно-сосудистые заболевания; сорбент; сорбция; тиаминдифосфат; тиаминпирофосфат.

Кокарбоксилаза (тиаминдифосфат, ТДФ, тиаминпирофосфат, ТПФ) – дифосфорный эфир витамина В1 (тиамина). ТДФ является составной частью целого ряда ферментов в организме, его дефицит способствует развитию кетоацидоза, приводит к нарушениям периферической чувствительности, невралгиям, слабости сердечной мышцы^{1,2}. Кокарбоксилазу в форме гидрохлорида применяют в составе комплексной терапии для лечения диабетической полиневропатии у пациентов с сахарным диабетом, при нарушениях сердечного ритма, недостаточности коронарного кровообращения³; показана возможность применения кокарбоксилазы в терапии онкологии^{4,5}. Сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, рак являются основной причиной смертности населения в мире, в связи с чем Всемирная организация здравоохранения стимулирует и поддерживает принятие мер по улучшению обеспечения насе-

The paper presents the combined results of experience to study the cocarboxylase sorption process on cation and anion exchangers of various structures in order to select an effective and affordable sorbent for cocarboxylase isolation and purification technology development. The sorbents ABER HPR 1100, MN-500, KU-2-20, S950, A-847, A-100, A-600 surpass the traditional KU-23 in most indicators. The use of domestically produced sulfonic cation exchanger KU-2-20 is the most promising for an import-independent technology creation.

Key words: anion exchanger; cardiovascular diseases; cation exchanger; cocarboxylase; diabetes isotherm; sorbent; sorption; thiamine diphosphate; thiamine pyrophosphate.

ления лекарственными препаратами для лечения данных заболеваний⁶⁻¹⁰.

Согласно традиционной технологии кокарбоксилазу получают путем фосфорилирования тиамин с помощью пирофосфорной кислоты и фосфорного ангидрида. В результате фосфорилирования образуется смесь, содержащая близкие по структуре соединения: тиамин, моно-, ди- и трифосфорные эфиры тиамин. Выделение дифосфорного эфира (кокарбоксилазы) из данной смеси проводят хроматографическим методом на полимерном сорбенте – сульфокатионите КУ-23¹¹. Данная технология характеризуется рядом недостатков: низкий выход целевого продукта; сорбент КУ-23 не производится на территории России, и в настоящее время его поставки в Россию затруднены. Актуальным является поиск путей усовершенствования традиционной технологии.

В настоящее время на рынке присутствует большое количество высокоэффективных сорбентов, в том числе отечественного производства,

Дата поступления 06.02.23

применение которых для выделения кокарбоксиллазы изучено недостаточно. Многие из них обладают сходной структурой и свойствами с КУ-23, предположительно могут превосходить его по большинству показателей и послужить эффективной заменой труднодоступного сорбента на производстве.

Цель настоящей работы – подбор сорбента для разработки сорбционно-хроматографической технологии выделения и очистки кокарбоксиллазы.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали следующие сорбенты: макропористый сульфокатионит MN-500, макропористый хелатный сорбент S950, сульфокатиониты гелевой структуры ABER HPR 1100 и КУ-2-20, аниониты: гелевый А-847, макропористый А-100 (функциональные группы – третичный амин) и гелевый А-600 (функциональные группы – четвертичный аммоний). Исследование проводили на модельном растворе кокарбоксиллазы, полученном из субстанции производства ООО «Компания «ДЕКО», и модельном растворе тиамина (Sigma-Aldrich).

В статических условиях сорбцию кокарбоксиллазы проводили при соотношении 2 мг сорбента на 1 мл раствора, температуре 20–22 °С, постоянном перемешивании на шейкере BioSan ES-20/60 в течение 24 ч. Для подбора условий предварительно провели процесс при концентрации исходного раствора 12 мг/мл и значениях pH раствора 0.0–12.0. Определяли равновесную концентрацию кокарбоксиллазы в растворах ($C_{равн}$, мг/мл), рассчитывали емкость сорбции (Q , мг/г) и строили графики зависимости $Q = f(pH)$.

Исследование равновесных параметров сорбции кокарбоксиллазы на анионитах проводили при концентрации исходного раствора кокарбоксиллазы 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, мг/мл и pH = 7.5. Определяли равновесную концентрацию кокарбоксиллазы в растворах, рассчитывали емкость сорбции и строили изотермы сорбции в координатах $Q = f(C_{равн})$. Рассчитывали коэффициент распределения (K_d , мл/г) как тангенс угла наклона секущей к точке изотермы сорбции, соответствующей максимальной емкости сорбции при равновесии.

Кинетику сорбции исследовали в аналогичных условиях, концентрация исходного раствора кокарбоксиллазы составляла 12 мг/мл. Отбирали пробы раствора для определения концентрации кокарбоксиллазы через 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 мин от начала эксперимента, рассчитывали степень завершенности процесса F и строили кинетические кривые – зависимости степени

завершенности от времени процесса в координатах $F = f(\sqrt{t})$. Рассчитывали коэффициент диффузии ($\bar{D}$, м²/с) по формуле:

$$\bar{D} = A \cdot \tan \alpha \cdot d_q^2,$$

где A – числовой коэффициент, зависящий от формы зерна сорбента ($A = \pi/144$);

α – угол наклона начального прямолинейного участка кинетической кривой;

d_q – диаметр частицы сорбента, м.

Сорбцию кокарбоксиллазы и тиамина из модельных растворов в динамических условиях проводили при исходных концентрациях растворов 12 мг/мл на колонке 1.5×10 см, температура составляла 20–22 °С. При сорбции на катионитах использовали следующие условия: pH сорбции 0.0, раствор для промывки колонки после нанесения пробы – 1 н. HCl, элюент – буферный раствор ацетата аммония pH = 5.5 (согласно заводской технологии). Условия при сорбции на анионитах: pH сорбции 7.5, раствор для промывки колонки – буферный раствор Трис-HCl (pH = 7.5), элюент – 0.05 М раствор NaCl в Трис-HCl-буфере. Скорость пропускания раствора составляла 1.5 мл/мин. На выходе из колонки отбирали фракции по 2 мл, определяли в них концентрацию кокарбоксиллазы и тиамина.

Определение концентрации кокарбоксиллазы и тиамина в растворах проводили спектрофотометрически на основании калибровочной зависимости концентрации вещества от оптической плотности раствора при длине волны 245 нм. Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр СФ-2000.

Проведена статистическая обработка всех экспериментальных данных, далее указаны значения с соответствующими доверительными интервалами, рассчитанными по критерию Стьюдента. Все эксперименты проводились не менее чем в трех повторностях. Для подтверждения воспроизводимости и достоверности результатов рассчитывали стандартное отклонение среднего результата и контрольный критерий однородности выборки. Значение доверительной вероятности составило 0.95.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены зависимости емкости сорбции кокарбоксиллазы на анионитах от pH раствора.

Из рис. 1 следует, что сорбцию кокарбоксиллазы на исследуемых анионитах необходимо проводить при pH = 7.5, так как в этом случае емкость сорбции наибольшая.

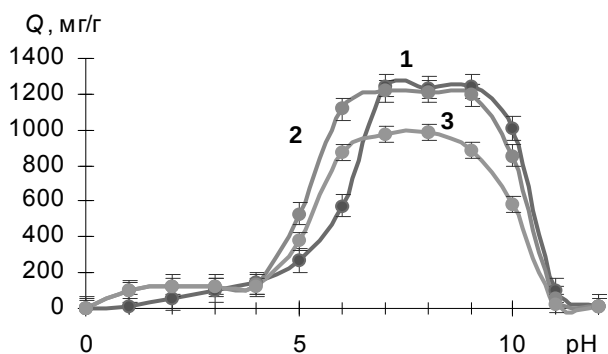


Рис. 1. Зависимость емкости сорбции кокарбоксилазы от pH раствора: 1 – A-847; 2 – A-100; 3 – A-600

На основании анализа равновесных и кинетических параметров сорбции кокарбоксилазы на различных катионитах нами были отобраны четыре сорбента, обладающие высокой емкостью, избирательностью и скоростью сорбции и превосходящие используемый в традиционной технологии КУ-23 по большинству показателей, а также сульфокатиониты ABER HPR 1100, MN-500, КУ-2-20 и макропористый хелатный сорбент S950. В настоящей работе также представлены результаты аналогичных исследований сорбции также и на анионообменных сорбентах, поскольку предполагается изучение возможности хроматографического разделения тиамин и его эфиров в производственных условиях за счет различного количества фосфатных групп в их молекулярной структуре.

В результате исследования равновесных параметров сорбции кокарбоксилазы на анионитах были получены изотермы, представленные на рис. 2.

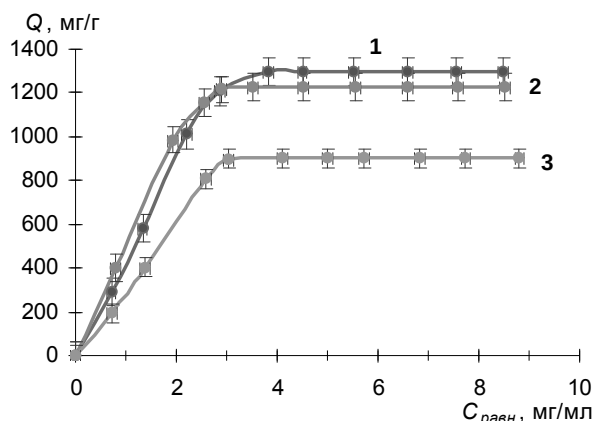


Рис. 2. Изотермы сорбции кокарбоксилазы на сорбентах: 1 – A-847; 2 – A-100; 3 – A-600

Из рис. 2 видно, что изотермы, полученные при сорбции кокарбоксилазы на сорбентах A-847, A-100, A-600 имеют вид изотерм Ленгмюра¹², что говорит о статистическом распределении молекул на сорбенте: каждая молекула сорбируется на отдельном сорбционном центре, молекулы располагаются плотно друг к другу, но при этом не взаимодействуют между собой.

В табл. 1 представлены максимальные емкости исследуемых анионитов и рассчитанные коэффициенты распределения.

Таблица 1

Результаты экспериментов по изучению равновесных параметров сорбции кокарбоксилазы

Сорбент	Максимальная емкость сорбции Q_s , мг/г	Коэффициент распределения K_d , мл/г
ABER HPR 1100	1420.24 ± 71.00	314.20 ± 0.50
MN-500	1364.31 ± 68.20	177.18 ± 0.50
A-847	1296.57 ± 64.80	287.92 ± 0.50
A-100	1229.32 ± 61.50	350.23 ± 0.50
S950	963.10 ± 48.20	115.27 ± 0.50
A-600	901.15 ± 45.10	219.26 ± 0.50
КУ-2-20	622.33 ± 31.12	105.30 ± 0.50
КУ-23	290.64 ± 14.50	36.38 ± 0.50

Коэффициент распределения K_d характеризует избирательность сорбции¹³, оценка которой важна для данного исследования, поскольку необходимо подобрать сорбент для эффективного разделения веществ, близких по строению к кокарбоксилазе. Показано, что все исследуемые сорбенты обладают более высокой емкостью и избирательностью сорбции, чем используемый в настоящее время КУ-23. Наибольшие значения емкости и коэффициента распределения характерны для ABER HPR 1100, A-847 и A-100.

Результаты исследования кинетики процесса сорбции представлены в виде кинетических кривых на рис. 3 и рассчитанных значений коэффициента диффузии в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что исследуемые сорбенты обладают сравнимыми значениями коэффициентов диффузии. Наибольшее значение коэффициента получено для КУ-2-20, следовательно, данный сорбент обладает наиболее высокой скоростью сорбции¹². Коэффициенты диффузии для сорбентов S950, A-847, A-100, ABER HPR 1100, A-600 на один, а для MN-500 – на два порядка ниже, чем у КУ-23.

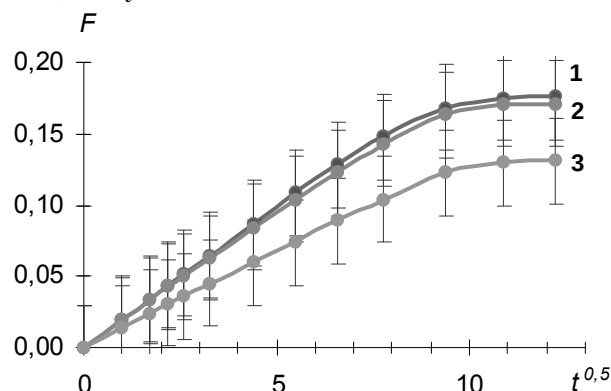


Рис. 3. Кинетические кривые сорбции кокарбоксилазы на сорбентах: 1 – A-847; 2 – A-100; 3 – A-600

Исследован процесс сорбции кокарбоксилазы и тиаминиз из модельных растворов в динамических условиях. На рис. 4 приведены выборочные выходные кривые сорбции на катионитах (рис. 4а) и анионитах (рис. 4б). Внутри групп сорбентов, сходных по заряду, графики выглядели аналогично.

Таблица 2

Результаты экспериментов по изучению кинетики сорбции кокарбоксилазы

Сорбент	Коэффициент диффузии $\bar{D}$, м ² /с
КУ-2-20	$(1.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-10}$
КУ-23	$(4.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-11}$
S950	$(3.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-12}$
A-847	$(3.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-12}$
A-100	$(3.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-12}$
ABER HPR 1100	$(2.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-12}$
A-600	$(1.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-12}$
MN-500	$(8.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-13}$

Сорбция кокарбоксилазы и тиаминиз из модельных растворов на исследуемых сорбентах соответствует теоретическим закономерностям. При сорбции на катионитах первым выходит пик кокарбоксилазы (тиаминдифосфата), на анионитах – пик тиаминиз, что связано с разностью заряда: молекула тиаминиз не имеет в своем составе отрицательно заряженных группировок, вследствие чего сродство тиаминиз к катионообменным сорбентам больше, а к анионообменным – меньше, чем у кокарбоксилазы. На хроматограмме наблюдается четкое разделение пиков, таким образом, на исследуемых сорбентах можно проводить процесс отделения тиаминиз от продуктов реакции фосфорилирования.

Анализ полученных экспериментальных данных показал, что сульфокатиониты ABER HPR 1100, MN-500, КУ-2-20, макропористый хелатный сорбент S950 и аниониты A-847, A-100,

A-600 обладают более высокой емкостью и избирательностью сорбции, чем традиционный сорбент КУ-23.

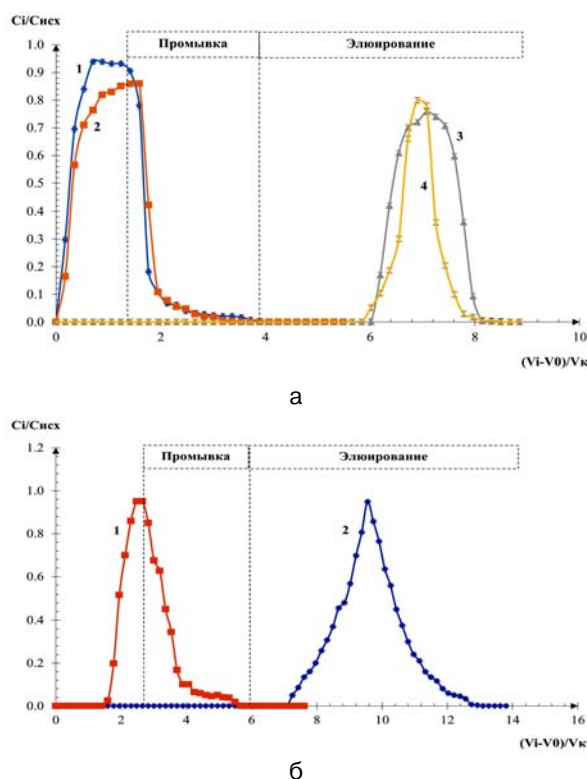


Рис. 4. Выходные кривые процесса динамической сорбции кокарбоксилазы и тиаминиз из модельных растворов на сорбентах:

а: – 1 – КУ-2-20, кокарбоксилаза; 2 – ABER HPR 1100, кокарбоксилаза; 3 – ABER HPR 1100, тиамин; 4 – КУ-2-20, тиамин;

б: 1 – A-847, тиамин; 2 – A-847, кокарбоксилаза

Среди исследуемых сорбентов только КУ-2-20 превосходит КУ-23 по показателю скорости сорбции. Следует отметить, что сорбент КУ-2-20 производится в России. Таким образом, для разработки отечественной импортонезависимой сорбционно-хроматографической технологии наиболее перспективен выбор сульфокатионита КУ-2-20.

Литература

1. Мкртумян А. М., Маркова Т. Н., Подачина С. В. Возможность применения препарата Кокарнит при лечении диабетической полинейропатии // Эффективная фармакотерапия. – 2016. – №(37). – С.6-11.
2. Матюха Л., Гавалко Ю., Гавалко А. Возможности применения препарата «Кокарбоксилаза-форте» в клинической практике // Библиотека семейного врача и семейной медсестры. – 2014. – №2(47). – С.8-12.
3. Кокарбоксилаза [Электронный ресурс] // Большая советская энциклопедия. – Режим доступа: <http://bse.sci-lib.com/article062606.html>.

References

1. Mkrtumyan A. M., Markova T. N., Podachina S. V. *Vozmozhnost' primeneniya preparata Kokarnit pri lechenii diabeticheskoy polineuropatii* [The possibility of using Cocarnit in the treatment of diabetic polyneuropathy]. *Effektivnaya farmakoterapiya* [Effective pharmacotherapy. Endocrinology], 2016, no.(37), pp.6-10.
2. Matyukha L., Gavalko Yu., Gavalko A. *Vozmozhnosti primeneniya preparata «Kokarboksilaza-forte» v klinicheskoy praktike* [Possibilities of using the drug «Cocarbonylase-forte» in clinical practice]. *Biblioteka semeynogo lekarya i semeynoy medsestry* [Family Physician and Family Nurse Library], 2014, no.2(47), pp. 8-12.

4. Bunik V. I., Aleshin V. A., Xiaoshan Zhou, Tabakov V. Y., Karlsson A. Activation of Mitochondrial 2-Oxoglutarate Dehydrogenase by Cocarboxylase in Human Lung Adenocarcinoma Cells A549 Is p53/p21-Dependent and Impairs Cellular Redox State, Mimicking the Cisplatin Action // *International Journal of Molecular Sciences*.– 2020.– №21(11).– 23 p.
5. Aleshin V. A., Xiaoshan Zhou, Shuba Krishnan, Karlsson A., Bunik V. I. Interplay Between Thiamine and p53/p21 Axes Affects Antiproliferative Action of Cisplatin in Lung Adenocarcinoma Cells by Changing Metabolism of 2-Oxoglutarate/Glutamate // *Frontiers in Genetics*.– 2021.– №12.– 658446.
6. Куликов А. Н., Береснева О. Н., Парастаева М. М., Оковитый С. В., Иванова Г. Т., Ивкин Д. Ю., Ивкина А. С., Левыкина Е. Н., Зарайский М. И., Карпов А. А., Кучер А. Г., Зубина И. М., Галкина О. В., Каюков И. Г. Влияние эмпаглифлозина на состояние почек у нормогликемических крыс с сердечной недостаточностью // *Нефрология*.– 2017.– Т.21, №2.– с. 83-92.
7. Казаченко А. А., Оковитый С. В., Куликов А. Н., Ивкин Д. Ю., Шустов Е. Б. Экспериментальное моделирование хронической сердечной недостаточности // *Биомедицина*.– 2013.– №3.– С.41-48.
8. Беляева И. А., Овсянникова А. К., Рымар О. Д. Роль сахарного диабета типа MODY в структуре гестационного сахарного диабета // *Доктор.Ру*.– 2021.– №20(11).– С.68-72.
9. Диабет [Электронный ресурс] // Информационные бюллетени Всемирной организации здравоохранения.– 2022.– Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
10. Сердечно-сосудистые заболевания [Электронный ресурс] // Информационные бюллетени Всемирной организации здравоохранения.– 2017.– Режим доступа: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
11. Патент №2041229, РФ. Способ получения фосфорных эфиров тиамин / Поляченко В. М., Юркевич А. М., Махкамов Х. М., Леонтьева Л. И., Ядгаров Э. Г. [Электронный ресурс] // Оpubл. 09.08.1995.
12. Сухова А. А., Меленевский А. Т., Павлова Е. Н., Никифорова Е. С., Демин А. А. Кинетико-динамические параметры процесса сорбции и основные характеристики композиционного целлосорбента с включенной микродисперсией наноалмазов в качестве сорбирующего материала // *Сорбционные и хроматографические процессы*.– 2013.– Т.13., Вып. 6.– С.850-857.
13. Кокотов Ю. А., Пасечник В. А. Равновесие и кинетика ионного обмена.– Санкт-Петербург: «Химия», 1970.– 336 с.
3. *Kokarboksilaza* [Cocarboxylase]. Available at: <http://bse.sci-lib.com/article062606.html>
4. Bunik V. I., Aleshin V. A., Xiaoshan Zhou, Tabakov V. Y., Karlsson A. [Activation of Mitochondrial 2-Oxoglutarate Dehydrogenase by Cocarboxylase in Human Lung Adenocarcinoma Cells A549 Is p53/p21-Dependent and Impairs Cellular Redox State, Mimicking the Cisplatin Action]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, no.21(11), 23 p.
5. Aleshin V. A., Xiaoshan Zhou, Shuba Krishnan, Karlsson A., Bunik V. I. [Interplay Between Thiamine and p53/p21 Axes Affects Antiproliferative Action of Cisplatin in Lung Adenocarcinoma Cells by Changing Metabolism of 2-Oxoglutarate/Glutamate]. *Frontiers in Genetics*, 2021, no.12, art.658446.
6. Kulikov A. N., Beresneva O. N., Parastaeva M. M., Okovityi S. V., Ivanova G. T., Ivkin D. Yu., Ivkina A. S., Levykina E. N., Zarskiy M. I., Karpov A. A., Kucher A. G., Zubina I. M., Galkina O. V., Kaiukov I. G. *Vliyanie empagliflozina na sostoyanie pochech u normoglikemicheskikh kryis s serdechnoy nedostatochnost'yu* [Influence of empagliflozin on the kidneys in normoglycemic rats with heart failure]. *Nefrologiya* [Nephrology], 2017, vol.21, no.2, pp.83-92.
7. Kazachenko A. A., Okovityi S. V., Kulikov A. N., Ivkin D. Yu., Shustov E. B. *Ekspierimental'noe modelirovanie khronicheskoy serdechnoy nedostatochnosti* [Experimental modeling of chronic warm insufficiency]. *Biomeditsina* [Biomedicine], 2013, no.3, pp.41-48.
8. Belyaeva I. A., Ovsiannikova A. K., Rymar O. D. *Rol' sakharnogo diabeta tipa MODY v strukture gestatsionnogo sakharnogo diabeta* [Maturity-Onset Diabetes of the Young and the Structure of Gestational Diabetes Mellitus]. *Doktor.Ru*, 2021, no.20(11), pp.68-72.
9. *Diabet* [Diabetes]. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>. (accessed 2022)
10. *Serdechno-sosudistye zabolevaniya* [Cardiovascular diseases]. Available at: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). (accessed 2017)
11. Poliachenko V. M., Iurkevich A. M., Makhkamov Kh. M., Leont'eva L. I., Iadgarov E. G. *Sposob polucheniya fosfornykh efirov tiamina* [Obtaining method of thiamine phosphoric esters]. Patent RF no.2041229, 1995.
12. Sukhova A. A., Melenevskiy A. T., Pavlova E. N., Nikiforova E. S., Demin A. A. *Kinetiko-dinamicheskie parametry protsessy sorbtzii i osnovnye kharakteristiki kompozitsionnogo tsellosorbenta s vkluchennoi mikrodispersiei nanoalmazov v kachestve sorbiriushchego materiala* [Kinetic-dynamic parameters of sorption process and the main characteristics of composite cellosorbent with included nanodiamond microdispersion as a sorbent material]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy* [Sorption and chromatography processes], 2013, vol.13, no.6, pp.850-857
13. Kokotov Yu. A., Pasechnik V. A. *Ravnovesie i kinetika ionnogo obmena* [Equilibrium and kinetics of ion exchange]. Saint-Petersburg, «Khimiya2 Publ., 1970, 336 p.