



УДК 541.(64+183.12)

Равновесие сорбции химотрипсина на наночастицах селена

Ершов Д.Ю., Киппер А.И., Боровикова Л.Н., Гаркушина И.С.,
Матвеева Н.А., Писарев О.А.

*Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН,
С.-Петербург*

Поступила в редакцию 8.09.2010 г.

Аннотация

Исследовано комплексообразование гидролитического фермента химотрипсина с наночастицами селена. Изучено влияние соотношения компонентов наноконплекса и pH на гидролитическую активность и молекулярные размеры иммобилизованного фермента.

Ключевые слова: селен, химотрипсин, наночастицы.

Complexation of the hydrolytic enzyme chymotrypsin with selen nanoparticles was investigated. Influence of the ratio components of nanocomplexes and pH on the hydrolytic activity and molecular sizes of immobilized enzyme were studied.

Keywords: selen, chymotrypsin, nanoparticles

Введение

В настоящее время одним из наиболее актуальных междисциплинарных направлений современной биотехнологии, химии, фармацевтики и медицины является проблема создания комплексных лекарственных форм, включающих модифицированные компоненты. Например, применение нативных ферментов затруднено из-за их инактивации во внутренних средах макроорганизма, ингибирования соответствующими системами крови и тканей. Модифицированные же препараты обладают рядом преимуществ по сравнению с нативными предшественниками [1,2].

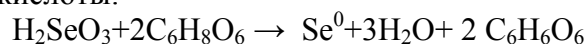
Основным недостатком известных методов иммобилизации ферментов полимерами является то, что полимерная матрица создает значительные стерические препятствия для диффузии субстрата к ферменту, резко снижая при этом каталитическую эффективность иммобилизованного препарата. Очень перспективной представляется идея модификации ферментов наночастицами биогенных элементов. Резкое увеличение удельной поверхности наночастиц (по сравнению с известными модификаторами) должно приводить к реализации многоточечного прочного взаимодействия фермента с наночастицей и, соответственно, к стабилизации его конформации и получению стабилизированных образцов гидролитических ферментов.

В качестве матрицы был выбран химотрипсин, так как он широко применяется в медицине и пищевой промышленности. В качестве носителя-наночастицы был выбран селен, представляющий исключительный интерес как биологически активное вещество с антиоксидантной, противовоспалительной и антиканцерогенной активностью [3,4].

Цель настоящей работы – исследование комплексобразования в системе химотрипсин – наночастицы селена и изучение ферментативных и молекулярно-конформационных свойств поликомплекса.

Обсуждение результатов

Реакция восстановления селена протекает согласно с образованием дегидроаскорбиновой кислоты:



Было показано, что восстановление H_2SeO_3 аскорбиновой кислотой в водной среде в отсутствие ХТ приводило к образованию золя Se^0 в форме светлого красно-оранжевого раствора. Золь не устойчив в растворе и выпадал в осадок через 24 часа, а через 7-10 суток селен из аморфной красной формы селен переходил в другую модификацию – серый металлический селен. Введение в реакцию химотрипсина (ХТ) приводило к образованию красного аморфного селена, который стабилен в растворе продолжительное время.

Для определения влияния на стабильность наноструктур рН среды в полученные системы добавлялся раствор гидроокиси натрия. При этом рН раствора изменялось и это изменение фиксировалось в течении 6 суток. Концентрация ХТ во всех пробах была постоянна ($C_{\text{ХТ}}=0.01\%$). Показано, что с увеличением концентрации селена в растворах, значение рН, при котором проходило фазовое разделение в системе находилось в интервале рН от 3 до 6,5. При увеличении значения рН система становилась стабильной. Это обстоятельство позволило определить интервалы рН использования иммобилизованного фермента. Следует отметить также, что даже при фазовом разделении не наблюдался переход красного аморфного селена в другую модификацию. Образование осадка при изменении рН в растворе приводило к полному или частичному разрушению образовавшейся наноструктуры нано- $\text{Se}^0 + \text{ХТ}$. Структура наноконплексов сохранялась только в отсутствие фазового разделения.

На рис. 1 представлены зависимости оптической плотности от длины волны для систем $\nu=1$, свободного ХТ и золя селена без ХТ. ν - отношение массы элементарного селена к массе ХТ.

Видно резкое изменение характера УФ-спектра ХТ, что свидетельствовало об образовании поликомплекса.

Методом эксклюзионной ВЭЖХ также показано образование поликомплекса наночастица селена - химотрипсин, причем полученные данные свидетельствуют о присутствии частиц как больших, так и меньших по размеру по сравнению со свободным ХТ, а так же указывают на наличие небольшой равновесной концентрации неадсорбированного ХТ. Малые частицы, по всей видимости, представляют собой продукт автолиза ХТ, а крупные соответствуют комплексу фермента с наночастицами селена.

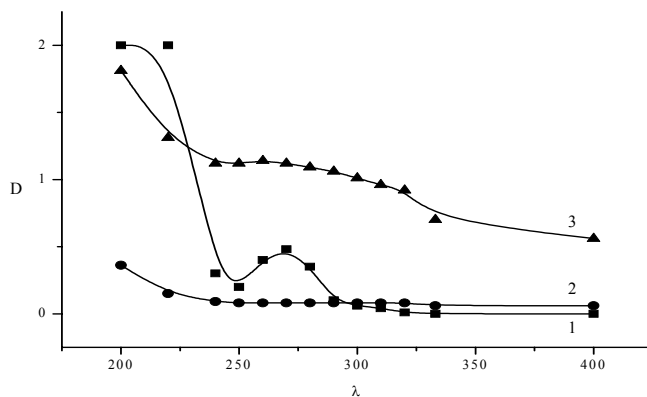


Рис. 1. Зависимость оптической плотности ХТ, Se-ХТ, Se от длины волны.
1 – свободный химотрипсин, $c = 0,01\%$, 2- золь Se, $c = 0.01\%$, 3 – комплекс Se-ХТ, $\nu = 1$, $C_{ХТ} = 0.01\%$

Модифицированным методом Кунитца было проведено измерение протеолитической активности ХТ, Se-ХТ $\nu = 1$ и 10 в широком диапазоне pH = 2,5-12 (рис. 2).

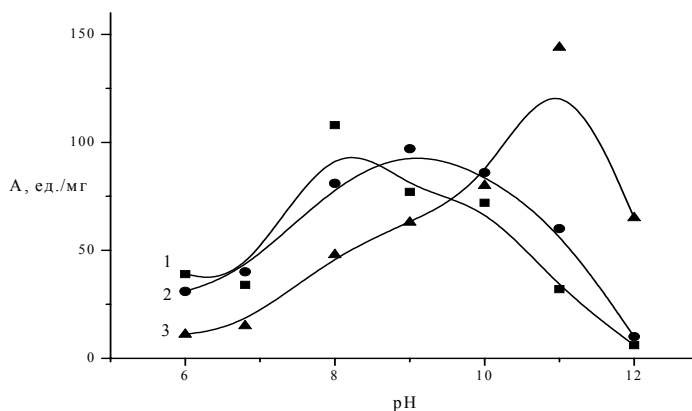


Рис. 2. Зависимость гидролитической активности ХТ, поликомплекса Se-ХТ ($\nu = 1, 10$) от pH среды. 1 – химотрипсин, 2 - Se-ХТ $\nu = 1$, 3 - Se-ХТ $\nu = 10$

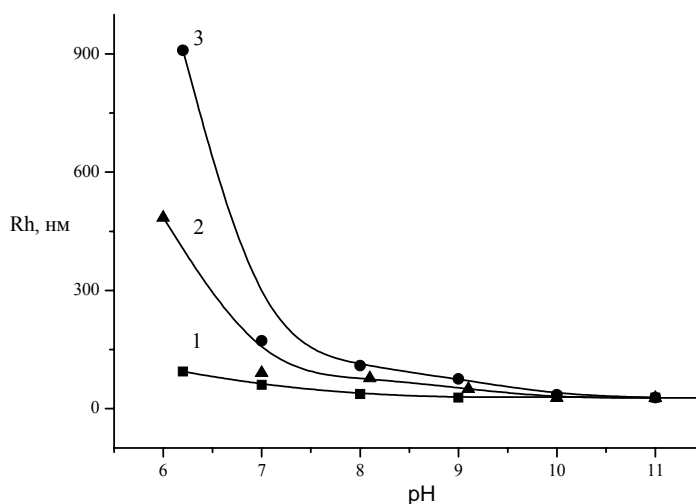


Рис. 3. Зависимость гидродинамического радиуса частицы от pH среды.
1 – $\nu = 1$, 2 – $\nu = 6$, 3 – $\nu = 10$. $C_{ХТ} = 0,01\%$

Видно смещение оптимума ферментативной активности поликомплекса Se-ХТ в щелочную область в сравнении со свободным ферментом. Величина смещения оптимума в щелочную область растет с увеличением доли элементарного селена в наноконпозите. По сравнению со свободным ферментом, показано существенное (~ в 2-10 раз) увеличение активности иммобилизованного фермента при рН>9.

Проведенные исследования влияния рН среды на гидродинамический радиус наночастиц указали на корреляцию между размерами наноконплекса и его гидролитической активностью(рис. 3).

Рост гидролитической активности наноконплекса Se-ХТ (рис. 3) в зависимости от дозировки продолжался до рН=11 и сопровождался при фиксированном рН уменьшением гидродинамического радиуса наноконплекса. Уменьшение гидролитической активности при рН > 11, вероятно, связано с потерей конформационной стабильности фермента.

Заключение

Показана возможность иммобилизации гидролитического фермента химотрипсина на наночастицах селена. Комплексообразование химотрипсина с наночастицами селена приводит к смещению рН-интервала гидролитической активности в щелочную область рН и росту величины максимальной ферментативной активности в сравнении со свободным ферментом. Увеличение активности фермента сопровождалось уменьшением гидродинамического радиуса наноконплекса.

Список литературы

1. Березин И.В., Клесов А.А., Швядас В.К. и др. Инженерная энзимология. М.: Высшая школа, 1987. 144 с
2. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. М.: Мир, 1983. 213 с. 27.
3. El-Bayoumy K., The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat. Res.* 2001. V. 475. №1. P. 123–139.
4. Zhang J.S., Gao X.Y, Zhang L.D. and Bao Y.P. Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors.* 2001. V.15. №1. P. 27–38.

Писарев Олег Александрович - зав. лаб. полимерных наносистем и биотехнологических продуктов, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

Pisarev Oleg A. - laboratory chief, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, S-Peterburg