



УДК 547.458.65:612.396.19

Разработка биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на хитозане

Сливкин А.И.¹, Беленова А.С.¹, Холявка М.Г.¹,
Богачев М.И.², Логвинова Е.Е.¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж

²Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им.В. И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 10.05.2012 г.

Аннотация

Осуществлена адсорбционная иммобилизация трипсина на хитозане, подобрана методика иммобилизации энзима, определены оптимальные условия для проявления каталитической активности данного ферментного препарата. Исследованы кинетические аспекты реакции гидролиза субстрата свободным и иммобилизованным трипсином.

Ключевые слова: трипсин, хитозан, адсорбционная иммобилизация

Trypsin has been carried out on hytozan by adsorption method. It was defined the optimum conditions for display catalitically activity of this fermental preparations. Kinetic aspects of substratum hydrolysis reaction are investigated for free and immobilized trypsin.

Keywords: trypsin, hytozan, adsorption immobilization

Введение

Трипсин - фермент класса гидролаз, расщепляющий пептиды и белки; обладает эстеразной (гидролиз сложных эфиров) активностью, в также противовоспалительным и противоотёчным действием (при внутривенном и внутримышечном введении); способен избирательно расщеплять ткани, подвергшиеся некрозу [1].

Однако широкое использование нативных препаратов протеиназ сдерживается высокой ценой энзимов, сложностями в создании оптимальных условий гидролиза пептидных связей, низкой термостабильностью и невысокими скоростями реакций в условиях, отличающихся от оптимальных. Преодолеть эти недостатки удастся посредством иммобилизации ферментов на различных природных и синтетических носителях. Трипсин нашел свое применение при лечении ран, ожогов, тромбозов, часто в сочетании с другими ферментами и антибиотиками. Его применяют как вспомогательное средство для облегчения удаления вязких секретов и экссудатов при воспалительных заболеваниях дыхательных путей (трахеиты, бронхиты, бронхоэктатическая болезнь, пневмонии, послеоперационный ателектаз легких).

Трипсин - протеолитический фермент с широкой субстратной специфичностью – избирательно деградирует некротизированные ткани, разжижает сгустки крови, снижает резистентность гнойной микрофлоры к антибиотикам, тем самым ускоряя процесс заживления гнойных ран, что позволяет использовать его в раневых покрытиях преимущественно сорбционного типа [2, 3].

Современные полимерные раневые покрытия с биологически активными веществами отличаются от традиционных текстильных материалов и представлены гелями, гидроколлоидами, пленками, пленкообразующими композициями и др. [4, 5]. Поскольку в настоящее время установлено, что процесс репарации раны является ферментативным с необходимым присутствием влажной среды, актуальна разработка нерастворимых в физиологических условиях неадгезивных полимерных гидрогелевых покрытий с иммобилизованными протеолитическими ферментами. Последние способны размягчать и лизировать некротические образования, обладают антимикробной активностью и охлаждающим действием, хорошо моделируются и не травмируют рану, позволяют визуально контролировать ее состояние [6].

В этой связи создание новых фармацевтических веществ на основе иммобилизации определяет более высокую пролонгированность действия и снижение риска побочных эффектов. При этом возникает необходимость изучения применения таких методов иммобилизации, которые не предполагают использования токсичных химических соединений, высокой температуры и других денатурирующих факторов. Подбор носителей при иммобилизации ферментов для клинического применения представляет собой определенную экспериментальную задачу, так как к подобного рода подложкам, кроме основных требований, предъявляются еще и ряд специальных установок, учитываемых фармакологической безопасностью и особенностями доклинических и клинических испытаний.

Поэтому мы осуществили адсорбционную иммобилизацию трипсина на хитозане.

Эксперимент

Объектом исследований является фермент трипсин. В качестве носителей использовали низкомолекулярный хитозан ($1 \pm 0,2$ кДа), полученные на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного университета.

Адсорбционную иммобилизацию трипсина осуществляли следующим образом: 1 г носителя оставляли на 1 час при комнатной температуре в 10 мл фосфатного буфера (рН 5,8). 5 мл раствора трипсина ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) добавляли к суспензии носителя и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 2 часов при температуре 25°C. Полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин, осадок промывали буфером (рН 5,8) до отсутствия белка в промывных водах, контроль осуществляли на спектрофотометре Hitachi при 280 нм.

Определение количества белка в препарате свободного трипсина осуществляли методом Лоури, в иммобилизованном ферменте – модифицированным методом Лоури [7].

Каталитическую активность свободного и иммобилизованного трипсина определяли при помощи стандартной методики. За единицу протеолитической активности принимают такое количество препарата, которое за одну минуту при температуре 37 °С катализирует расщепление казеина до неосаждаемых кислотой

трихлоруксусной продуктов гидролиза, эквивалентных одному микромолю тирозина.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи t-критерия Стьюдента.

Обсуждение результатов

В настоящее время особую значимость приобретают работы по изучению возможности использования хитозана в качестве парафармацевтика – природного вещества с выраженной фармакологической активностью [8, 9, 10]. Поэтому нами была проведена адсорбционная иммобилизация трипсина на хитозане.

При исследовании зависимости количества сорбированного белка от состава буферной среды (табл. 4) были использованы следующие буферные системы: фосфатная, ацетатная, сукцинатная, фосфатно-цитратная (рН 5.8).

Показано, что содержание белка в препаратах иммобилизованных ферментов при использовании фосфатного буфера наиболее высокое и составляет 2,76 мг/г носителя, при использовании ацетатного и сукцинатного буфера количество сорбированного белка также было достаточно высоким и составляло 1,16 и 1,2 мг/г носителя, соответственно. В то же время значение каталитической активности полученных ферментных препаратов при использовании фосфатного буфера максимальное (1,69 ед/г), применение же ацетатного и сукцинатного буферов приводит к резкому снижению каталитической активности.

Максимальное количество сорбированного белка соответствует рН 3,5 для ацетатного буфера и 5,8 для фосфатного буфера. В то же время каталитическая активность препарата полученного с использованием ацетатного буфера составляет только 19,5% от активности препарата полученного на основе фосфатного буфера.

Наши опыты показали, что трипсин, иммобилизованный хитозане ($1 \pm 0,2$ кДа), сохраняет 94% активности нативного фермента.

Причиной снижения активности энзима при иммобилизации могут быть диффузионные затруднения, препятствующие доступу субстрата к активному центру фермента, а также возможное ограничение конформационной подвижности белка вследствие его многоточечного связывания с поверхностью носителя.

И.И. Романовской (2009) показано, что включение трипсина в пленки поливинилпирролидона приводит к потере 24,4% каталитической активности фермента. Иммобилизация трипсина в пленках из фторопласта ведет к снижению каталитической активности энзима на 33%, в гидрогелевых пленках хитозана, модифицированного додецилсульфатом натрия – на 58%. [11, 12, 13].

При создании гетерогенных ферментных препаратов на основе иммобилизованного трипсина необходимо изучить физико-химические свойства полученных комплексов энзим - носитель.

В этой связи нами были исследованы зависимости каталитической активности свободного и иммобилизованного трипсина от температуры гидролиза казеина (рис. 1). При иммобилизации фермента на хитозане оптимальная температура гидролиза смещается в сторону более высоких значений и составляет 37 °С.

С. Rocha et al. показано, что при иммобилизации трипсина на отходах зерновой промышленности происходит увеличение оптимальной температуры гидролиза [14].

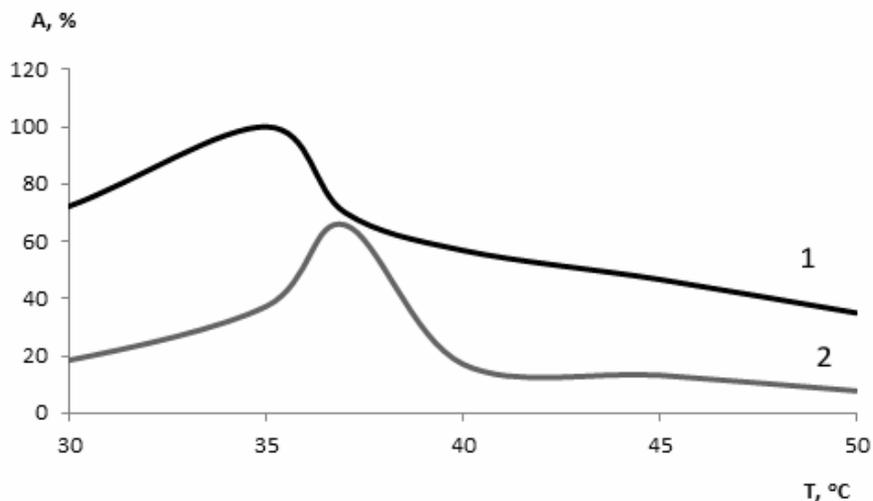


Рис. 1. Зависимость каталитической активности свободного (1) и иммобилизованного на хитозане трипсина (2) от температуры гидролиза

Вероятно, повышение оптимальной температуры реакции превращения субстрата различных ферментов при иммобилизации обусловлено тем, что присоединение к носителю ведет к фиксации его каталитически активной конформации. Чем больше образовано связей между носителем и ферментом, тем выше оптимальная температура ферментативной реакции.

Так как при иммобилизации молекула попадает в микроокружение, отличающееся от водного раствора фермента, что обусловлено наличием функциональных группировок матрицы носителя, необходимо исследовать зависимость каталитической активности связанного с носителем фермента от рН субстрата.

Установлено (рис. 2), что кривая зависимости величины каталитической активности от значений концентрации ионов водорода для данного фермента имеет максимум в диапазоне рН 8–9, что соответствует данным М. Kunitz et al. [15]. При иммобилизации имеет место сужение диапазона оптимальных значений рН. Оптимальным рН для иммобилизованного фермента является 8,0.

Это позволяет нам сделать предположение, что при адсорбционной иммобилизации трипсина на хитозане могут происходить изменения в состоянии ионизации отдельных компонентов ферментативной реакции.

Исследование кинетико-термодинамического поведения ферментов, связанных с носителем адсорбционным или ковалентным методами, создает возможности выявления молекулярных механизмов функционирования ферментов *in vivo*. В этой связи нами была изучена зависимость скорости ферментативной реакции гидролиза белков от концентрации субстрата для свободного и иммобилизованного трипсина.

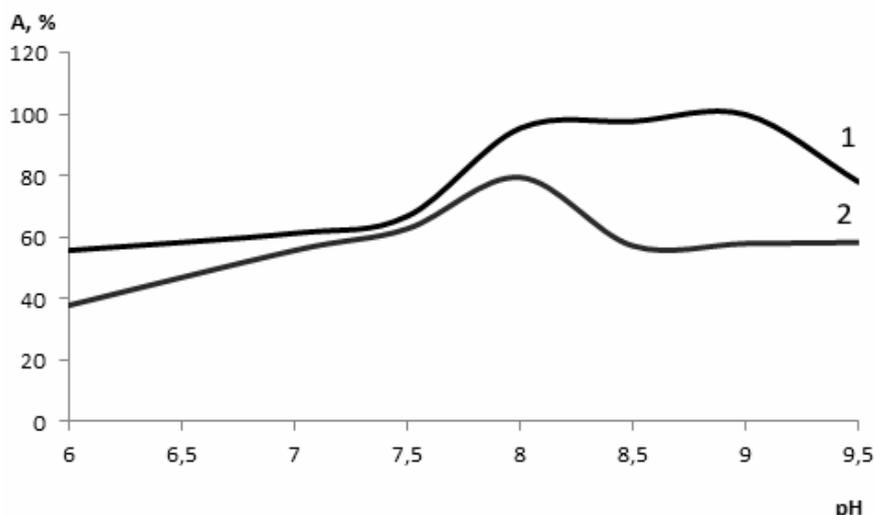


Рис. 2. Зависимость каталитической активности свободного (1) и иммобилизованного трипсина (2) от pH среды

Установлено, что кинетика процесса расщепления субстрата соответствует уравнению Михаэлиса (рис. 3).

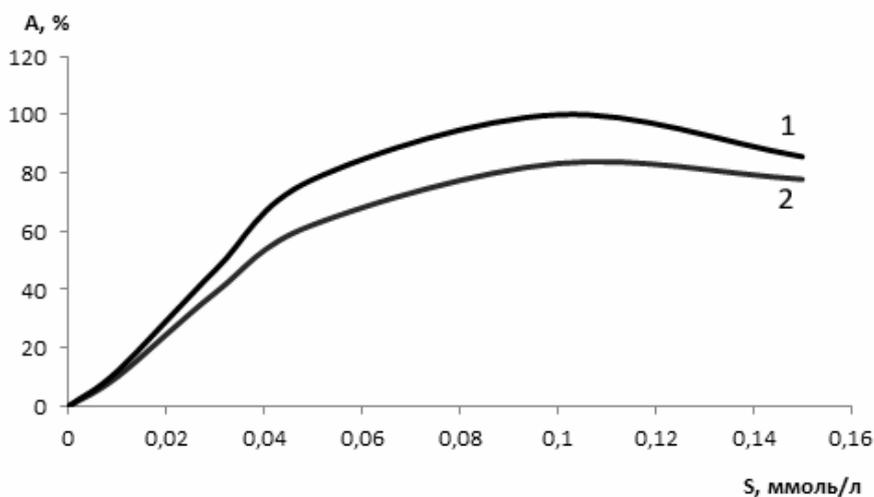


Рис. 3. Зависимость каталитической активности свободного (1) и иммобилизованного трипсина (2) от концентрации субстрата

Анализируя зависимость каталитической активности свободного и иммобилизованного трипсина от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка, Хейнса и Иди-Хофсти были определены K_m и V_{max} реакции гидролиза триглицеридов свободным ферментном и кажущиеся V_{max}' и K_m' для иммобилизованных энзимов (табл. 1).

Таблица 1. Кинетические параметры реакции гидролиза казеина свободным и иммобилизованным трипсином

Ферментный препарат	K_m (K_m'), ммоль/л	V_{max} (V_{max}'), мкмоль/мг·мин
Свободный трипсин	0.032	2.6
Иммобилизованный трипсин	0.032	2.2

Показано, что иммобилизация приводит к уменьшению значений максимальной скорости реакции по сравнению с нативным энзимом, константа Михаэлиса при этом не изменяется. Проведенные кинетические исследования позволяют в определенной степени прогнозировать скорость лизиса некротических образований и необходимую дозу препарата.

Таким образом, получен высокоактивный препарат трипсина, иммобилизованного на хитозане. Подобраны оптимальные условия иммобилизации энзима на исследуемом носителе, а так же изучены некоторые физико-химические свойства свободного и иммобилизованного фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" (Государственное соглашение № 14.В37.21.0175)

Список литературы

1. Northrop J. H. Crystalline trypsin // J Gen Physiol. – 1932. – . – V. 16, № 2. – P.295-311.
2. Эфендиев А.И. и др. Местная пролонгированная энзимотерапия гнойных ран // Хирургия. – 1991. – № 7. – С. 48–50.
3. Назаренко Г.И., Сугурова И.Ю., Глянцев С.П. Рана. Повязка. Больной.– Москва: Медицина, 2002. – 472 с.
4. Юданова Т.Н., Решетов И.В. Современные раневые покрытия: получение и свойства: Обзор //Хим.-фарм. журн. – 2006. – 40, № 2. – С. 24–31.
5. Валуев Л.И., Валуева Т.А., Валуев И.Л. и др. Полимерные системы для контролируемого выделения биологически активных соединений // Успехи химии. – 2003. – 43, № 2. – С. 307–328.
6. Пат. РФ 2198685 С1. Медицинский полимерный гелевый материал и лечебные средства на его основе / И.И. Пашкин, В.Ю. Богачев, В.П. Зубов. – No 2001134048/14; Заявл. 18.12.01; Оpubл. 20.02.03.
7. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent// J Biol Chem. – 1951. – V.193, №1. – P. 265 - 275.
8. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. - М: Наука, 2002. - 368 с.
9. Хитин и хитозан: природа, получение и применение / под редакцией М. SC. Ana de Abram. – Издательство Российского Хитинового общества. – 2010. – 292 с.
10. Сливкин А.И. и др. Хитозан для медицины и фармации // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2011. - № 2. – С. 214-232.
11. Вирник А.Д., Гостищев В.К., Кильдеева Н.Р. и др. Получение пленок и волокон, содержащих протеолитические ферменты // Прикл. биохимия и микробиология. – 1987. – 23, № 2. – С. 78–83.
12. Кильдеева Н. Р., Бабак В. Г., Меркович Е.А. и др. Включение ферментов в оболочки из ПАВ-полиэлектrolитных комплексов на основе хитозана // Материалы VI Междунар. конф. “Новые достижения в исследовании хитина и хитозана”. – Москва: ВНИРО, 2001. – С. 350–352.
13. Романовская И.И. Потенциальное раневое покрытие с трипсином, иммобилизованным в модифицированный поли-N-винилпирролидон // Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. – 2009. – № 9. – С. 182-187.

14. Rocha C. et al. Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis // Process Biochemistry . – 2011. – V. 46. – P. 505–511.

15. Kunitz M., Northrop J.H. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound // J Gen Physiol.– 1936. – V 19, № 6. – P. 991–1007.

Сливкин Алексей Иванович – д.ф.н., проф., Воронежский государственный университет, Воронеж, тел.: 8 (4732) 55-47-76

Беленова Алена Сергеевна - Воронежский государственный университет, Воронеж

Холявка Марина Геннадьевна - Воронежский государственный университет, Воронеж

Богачев Михаил Игоревич - Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург

Логвинова Елизавета Евгеньевна - Воронежский государственный университет, Воронеж

Slivkin Aleksei I. - Doctor of Pharmacy, professor, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: office@pharm.vsu.ru

Belenova Alena S. - Voronezh State University, Voronezh

Holiavka Marina G. - Voronezh State University, Voronezh

Bogachev Michail I. - Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg

Logvinova Elizaveta E. - Voronezh State University, Voronezh