

УДК 577.151.62

ПОЛУЧЕНИЕ ДВУХСЛОЙНОГО ПОЛИИОННОГО БИФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ 1 И КАТАЛАЗЫ МИНИМАЛЬНОГО РАЗМЕРА

М.А. Тагирова¹, Н.Л. Еремеев^{1*}, А.Н. Ванеев¹, Н.Г. Балабушевич¹,
А.Д. Алексахин¹, Е.А. Зайцева¹, Н.Л. Клячко^{1,2}

(¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; ² Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина; *email: nleremeev@gmail.com; nklyachko@gmail.com)

Изучены факторы, влияющие на размеры двухслойных полиионных биферментных конъюгатов СОД1/каталаза (природа и концентрация буфера, величина рН синтеза частиц, исходное мольное соотношение ферментов). Определены оптимальные условия для получения конъюгатов минимального размера. Полученные в этих условиях конъюгаты демонстрируют относительно высокую стабильность обоих ферментов при хранении.

Ключевые слова: Активные формы кислорода, нанозимы, супероксиддисмутаза (СОД1), каталаза, двухслойный полиионный биферментный комплекс, конъюгат.

Активные формы кислорода (АФК) – высоко-реакционноспособные химические частицы, к которым относят синглетный кислород, супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал, пергидроксильный радикал, пероксид водорода. АФК повреждают многие биологические молекулы путем их неспецифического окисления. Таким образом, даже при очень низких исходных концентрациях АФК свободные радикалы способны инициировать цепные реакции, что обуславливает развитие обширных повреждений биологических молекул [1, 2]. В настоящее время роль свободнорадикального окисления под действием АФК (окислительный стресс) доказана в патогенезе более чем 100 заболеваний и патологических состояний. У человека окислительный стресс становится причиной или важной составляющей многих серьезных заболеваний, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертония, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабет, аутоиммунные заболевания, различные воспалительные заболевания и др. [3–10].

Система антиоксидантной защиты организма включает неферментные и ферментные антиоксиданты, к которым относятся супероксиддисмутаза (СОД), дисмутирующая супероксид-радикал в кислород и пероксид водорода, а также каталаза, окисляющая пероксид водорода до молекулярного кислорода и воды. Развитие окислительного стресса при воспалительных заболеваниях обусловлено, прежде всего, снижением активности

естественных антиоксидантных ферментов и дефицитом природных антиоксидантов. В этой связи весьма перспективно совместное использование этих ферментов для снижения окислительного стресса при разных патологиях. При этом важно получение формуляций, предохраняющих включенные ферменты от действия защитных систем организма и способствующих их доставке в целевые органы и ткани [11].

Создание фермент-полиэлектролитных комплексов (нанозимов) [12] – одна из наиболее простых методик получения таких формуляций. В ее основе лежит самоорганизация комплексов между противоположно заряженными амфифильными полимерами и ферментами. Изменение состава полимерного ядра и морфологии подобных образований позволяет добиваться большей биодоступности и направленной доставки лекарственного средства при терапии различных заболеваний. Их стабилизация достигается ковалентным сшиванием комплексов в конъюгаты [13, 14].

В большинстве работ по созданию нанозимов на основе СОД [15–18] и каталазы [19] использовали различные поликатионы. Биферментные наночастицы, содержащие СОД и каталазу, были также получены путем комплексообразования с положительно заряженным блок-иономером полиэтиленимин-полиэтиленгликолем [20]. На модели крыс было показано, что двухслойное покрытие СОД полиэлектролитами (поликатион-полианион) улучшает свойства препарата при

лечении травмы спинного мозга [21]. Известно, что эффективность проникновения подобных формуляций в тонкие капилляры обусловлена размерами получаемых комплексов.

С учетом вышесказанного в настоящей работе была поставлена задача отработать условия получения стабильных двухслойных полиионных биферментных конъюгатов СОД1/каталаза минимального размера.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы: субстанция рекомбинантной СОД1 (ООО «НПП Ферментные технологии», Россия), блок-иономер полиэтиленгликоль₁₁₃-полиглутаминовая кислота₅₀ (ПЭГ-ПГ) («Alamanda Polymers», США), набор для определения белка «Micro BCA™ Protein Assay Kit» («Thermo Scientific», США), каталаза, протамин, H₂O₂ (0,196 М), глутаровый альдегид (ГА), соли и компоненты буферных растворов – все производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США).

Запасные растворы СОД1, каталазы, протамина и ПЭГ-ПГ (5 мг/мл) готовили в буферных растворах НЕРЕС или натрий-фосфатном (ФБ). Варьировали концентрацию (10 и 50 мМ) и pH (5,8–7,8) исходного буфера. Смешивали аликвоты запасных растворов ферментов, требующиеся для достижения необходимого мольного соотношения СОД1 и каталазы (от 1:1 до 1:5), конечный объем смеси 0,5 мл. Затем вносили 220 мкл раствора протамина и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Далее добавляли 250 мкл раствора ПЭГ-ПГ и инкубировали в течение 30 мин при 4 °С.

Для ковалентного сшивания белков с полимерами в смесь вносили 200 мкл 5%-го раствора ГА и выдерживали при перемешивании в течение 12–14 ч при 4 °С. Восстановление оснований Шиффа проводили добавлением по каплям 100 мкл свежеприготовленного водного раствора боргидрида натрия (1 мг/мл) при комнатной температуре. Побочные продукты и непрореагировавшие реагенты удаляли центрифугированием на центрифуге «Beckman Coulter Allegra X-30» с использованием фильтрующих систем «Amicon» (отсечение молекулярных масс 300 кДа). Смесь разводили 3 мл используемого буфера и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Раствор над фильтром переносили в новую пробирку, разводили 3 мл буфера и повторяли центрифугирование. Конечный раствор конъюгатов-СОД1/каталазы над фильтром переносили в пробирку и хранили при 4 °С.

За активностью нативной каталазы и фермента в составе конъюгата следили по разложению пе-

роксида водорода. В типичном эксперименте в кювету вносили 820–870 мкл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,0), 100 мкл (0,196 М) H₂O₂ и 30–80 мкл разведенного раствора фермента. Уменьшение поглощения субстрата регистрировали спектрофотометрически (длина волны 240 нм, комнатная температура). Активность (*A*, Ед/мл) и удельную активность каталазы (*A*_{уд.}, Ед/мг) рассчитывали по формулам (*E*_д – количество фермента, трансформирующего 1 мкМ субстрата в 1 мин при данных условиях):

$$A = [(\Delta A_{240} \cdot 1000) / (0,0436 \cdot V_{ал.})] \cdot P, \quad (1)$$

$$A_{уд.} = A / C_{кат.}, \quad (2)$$

где ΔA_{240} – изменение поглощения субстрата за 1 мин, о.е./мин; $C_{кат.}$ – весовая концентрация фермента в исходном анализируемом растворе, мг/мл; $V_{ал.}$ – объем аликвоты раствора каталазы в кювете, мкл; 0,0436 – изменение поглощения, соответствующее разложению 1 мкмоль H₂O₂ в 1 мин; P – разведение анализируемого раствора каталазы.

Анализ активности нативной СОД1 и фермента в составе конъюгата проводили с помощью метода, в основе которого лежит реакция ингибирования автоокисления пирогаллола [22]. Согласно данной методике, измерения проводили в 96-луночном планшете. Для одного образца использовали 8 лунок (один столбец). Последовательным разведением получали 8 точек объемом 20 мкл с концентрацией от 1000 до 0,45 мкг/мл фермента. Добавляли 160 мкл 50 мМ, Трис-буфера (pH 8,2) и 20 мкл раствора пирогаллола (раствор пирогаллола в ацетоне 5 мг/мл, затем разбавляли в 10 раз водой). Строили график зависимости скорости окисления пирогаллола от концентрации СОД1 в логарифмическом масштабе. С помощью программного обеспечения Origin 8.1 полученную зависимость аппроксимировали кривой «доза – ответ» и находили концентрацию, соответствующую 50%-му ингибированию (EC50, мкг/мл). Далее рассчитывали активность по формуле (3):

$$A = 1\,000\,000 / 20 \text{ EC}50. \quad (3)$$

Концентрацию СОД1, при которой наблюдалось 50%-е ингибирование реакции аутоокисления пирогаллола в реакционной среде, принимали за 1 Ед/мл.

Определение белка в растворе проводили с помощью набора «Micro BCA™ Protein Assay Kit». Измерения проводили по рекомендации производителя.

Определение размеров полиионного комплекса осуществляли на установке динамического лазерного светорассеяния «Zetasizer Nano ZS»

(«Malvern Instrument», Великобритания). Аликвоту раствора исследуемого образца разбавляли до концентрации 50–100 мкг/мл и пропускали через фильтр (0,2 мкм). Размер полученного полиионного комплекса измеряли до и после сшивки с 5%-м глутаровым альдегидом в нескольких повторях. Средние значения гидродинамического диаметра для всех образцов рассчитывали как минимум по трем измерениям, данные представляли как среднее значение ± среднеквадратичное отклонение.

Растворы СОД1, каталазы и полученных двухслойных биферментных конъюгатов хранили при 4 °С. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты растворов и определяли активность комплекса.

Результаты и их обсуждение

Анализ литературы показывает, что размер получаемых фермент-полиионных комплексов достаточно сильно зависит от таких условий комплексообразования, как рН среды, а также природы и концентрации используемого буферного раствора.

Наши предварительные эксперименты показали, что влияние на размеры биферментных комплексов оказывает и исходное мольное соотношение ферментов (табл. 1).

Ковалентное сшивание биферментных комплексов с использованием ГА приводило к увеличению размеров получаемых конъюгатов в 1,5–2 раза и увеличению индекса полидисперсности (табл. 2). Данный факт не отмечался ранее ни при получении биферментного комплекса

СОД1/каталаза с ПЭИ-ПЭГ [20], ни при получении двухслойных (поликатион-полианион) комплексов СОД1 [21].

Влияние природы и концентрации буферного раствора на размеры комплексов и конъюгатов СОД1/каталаза иллюстрирует рис. 1. Во-первых, при уменьшении концентрации буферных растворов наблюдается уменьшение размеров частиц. Это можно объяснить тем, что с уменьшением концентрации ионов в растворе происходит сужение двойного электрического слоя. Во-вторых, синтез частиц в буферном растворе НЕРЕС позволяет получать препараты с меньшими размерами частиц как в виде комплексов, так и в виде конъюгатов.

На рис. 2 представлены данные по влиянию величины рН при синтезе двухслойных полиионных биферментных конъюгатов на гидродинамический диаметр получаемых частиц. Эта зависимость имеет явно выраженный минимум при рН 7,4 вне зависимости от природы буфера. Однако при всех изученных величинах рН размеры конъюгатов, синтезированных в ФБ, достоверно больше по сравнению с размерами частиц, синтезированных в буферном растворе НЕРЕС.

Совокупность представленных выше результатов позволяет утверждать, что для получения двухслойных биферментных конъюгатов СОД1/каталаза минимального размера оптимально использовать буферный раствор НЕРЕС с концентрацией 10 мМ и рН 7,4. В этих условиях мы исследовали влияние исходных мольных соотношений ферментов на размеры синтезируемых комплексов и конъюгатов (табл. 3). Приведенные

Таблица 1

Гидродинамические размеры комплексов СОД1/каталаза при разных исходных мольных соотношениях ферментов (10 мМ ФБ; рН 6,8)

Мольное соотношение СОД1/каталаза	<i>d</i> , нм	PDI
2:1	182 ± 10	0,085
3:1	191 ± 10	0,151
4:1	195 ± 10	0,122

Таблица 2

Гидродинамические размеры комплексов и конъюгатов СОД1/каталаза (10 мМ НЕРЕС; рН 6,8)

Мольное соотношение СОД1/каталаза	До сшивания с ГА		После сшивания с ГА	
	<i>d</i> , нм	PDI	<i>d</i> , нм	PDI
2:1	136 ± 5	0,026	254 ± 6	0,196
3:1	144 ± 5	0,070	296 ± 6	0,252
4:1	145 ± 5	0,130	316 ± 6	0,276

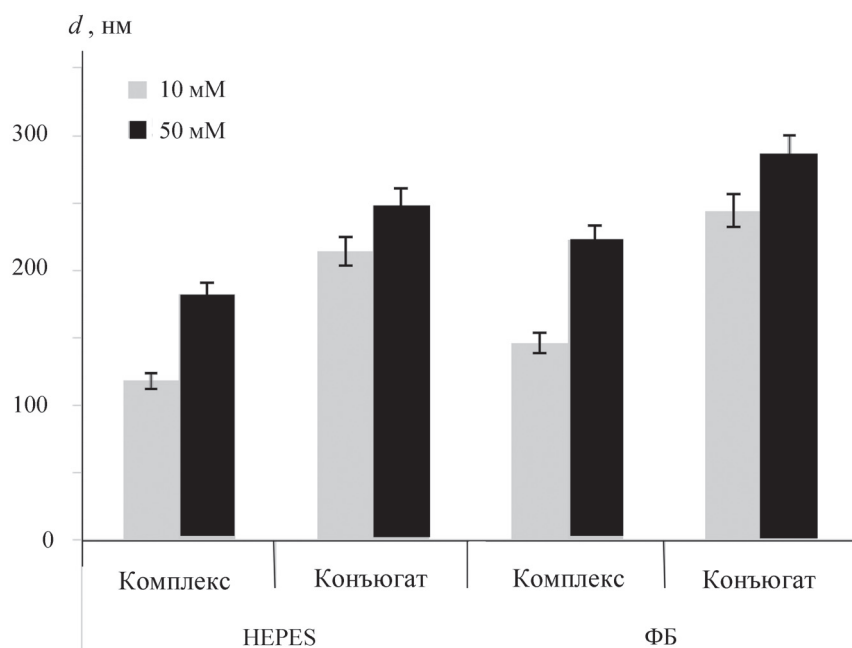


Рис. 1. Зависимость гидродинамических размеров комплексов и конъюгатов СОД1/каталаза от природы и концентрации буфера (рН 7,4; СОД1 : каталаза = 2:1)

в таблице данные показывают, что оптимальное мольное соотношение СОД1 / каталаза для получения минимальных размеров получаемых двухслойных биферментных частиц составляет 2:1.

Для изучения стабильности ферментов в полученных конъюгатах отбирали пробы через определенные промежутки времени и измеряли активность СОД1 и каталазы, хранившихся при температуре 4 °С. Следует отметить, что сшивание комплексов ГА (с последующим восстановлением оснований Шиффа) боргидридом натрия приводит к значительной инактивации ферментов (остаточная активность составляет 25–35% от исходной). Однако и СОД1, и каталаза в составе биферментного конъюгата сохраняют свою первоначальную активность как минимум в течение 48–60 ч. При дальнейшем хранении потеря активности стано-

вится заметной, причем каталаза инактивируется немного быстрее по сравнению с СОД1. Тем не менее, даже через 25 суток хранения наблюдаемая активность ферментов сохраняется на уровне 75–85% (рис. 3).

По результатам работы можно сделать следующие выводы. Размеры у двухслойных полиионных биферментных комплексов и конъюгатов СОД1 / каталаза значительно больше, чем у описанных в литературе. Сшивание комплексов ГА в 1,5–2 раза увеличивает размеры конъюгатов. Гидродинамический диаметр получаемых частиц зависит от природы и концентрации буфера, величины рН синтеза и исходного мольного соотношения ферментов. Конъюгаты минимального размера могут быть получены в результате синтеза в буферном растворе

Таблица 3

Гидродинамический диаметр комплексов и конъюгатов СОД1/каталаза при разных исходных мольных соотношениях ферментов (10 мМ HEPES; рН 7,4)

Мольное соотношение СОД1/каталаза	<i>d</i> , нм	
	комплекс	конъюгат
1:1	125 ± 10	225 ± 10
2:1	118 ± 5	214 ± 10
3:1	150 ± 10	230 ± 10
4:1	196 ± 8	255 ± 10
5:1	246 ± 10	325 ± 10

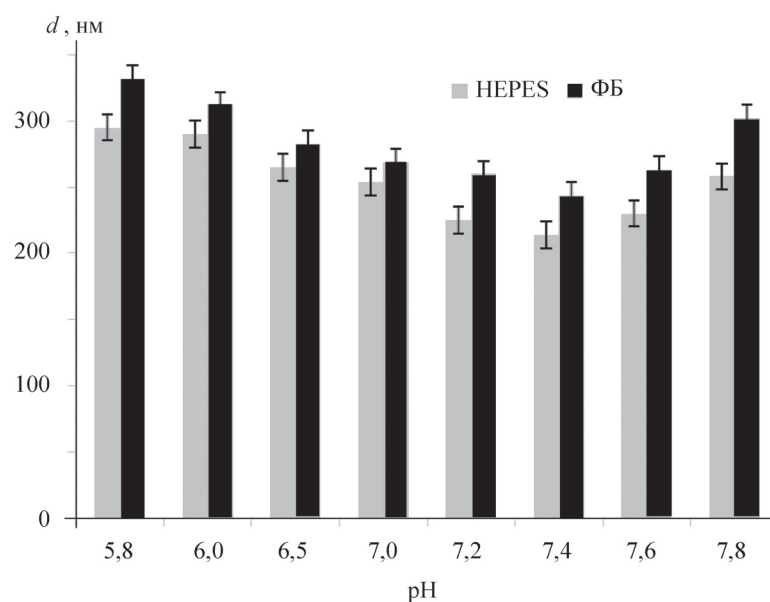


Рис. 2. Зависимость гидродинамического диаметра биферментных конъюгатов СОД1/каталаза от величины рН синтеза (концентрация буфера 10 мМ, мольное соотношение СОД1 : каталаза = 2:1)

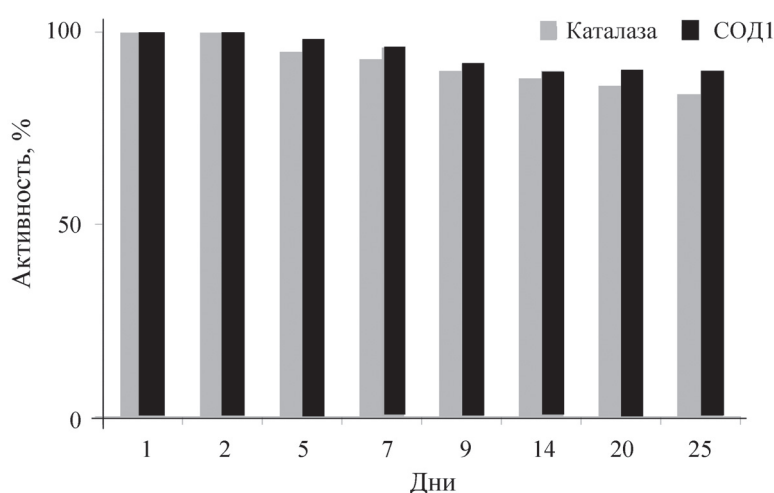


Рис. 3. Сохранение активности ферментов в составе биферментного двухслойного конъюгата СОД1/каталаза при 4 °С

HEPES (10 мМ, рН 7,4) при мольном соотношении СОД1 / каталаза, равном 2:1. Полученные в этих условиях конъюгаты демонстрируют относительно высокую стабильность обоих ферментов при хранении.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных

исследований (проекты № 17-54-33027 и № 18-29-09154), Госрегистрационной темы АААА-А16-116052010081-5. Использовано оборудование, закупленное по Программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова. Конфликта интересов нет. Дополнительные материалы нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bruce N.A., Mark K.S., Tory M.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1993. Vol. 9. P. 7915.
2. Rao A.V., Balachandran B. // Nutritional Neuroscience. 2002. Vol. 5. N 5. P. 291.
3. Daulatzai M.A. // Am. J. Neurodegener. Dis. 2016. Vol. 5. N 2. P. 102.
4. Moslemnezhad A., Mahjoub S., Moghadasi M. // Caspian J. Intern. Med. 2016. Vol. 7. N 2. P. 88.

5. *Narasimhan M., Rajasekaran N.S.* // *Front. Physiol.* 2016. Vol. 7. P. 241.
6. *Mohamed J., Nazratun Nafizah A.N., Zariyantey A.H., Budin S.B.* // *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 2016. Vol. 16. N 2. P. 132.
7. *Guo S.S., Cui X.L., Rausch W.D.* // *Am. J. Neurodegener. Dis.* 2016. Vol. 5. N 2. P. 131.
8. *Xie Y., Chen Y.* // *Front. Neurosci.* 2016. Vol. 10. P. 298.
9. *Dalmazi G.Di, Hirshberg J., Lyle D., Freij J.B., Caturegli P.* // *Auto Immun. Highlights.* 2016. Vol. 7. N 1. P. 11
10. *Yu C., Wang Z., Tan S., Wang Q., Zhou C., Kang X., Zhao S., Liu S., Fu H., Yu Z., Peng A.* // *Gastroenterol. Res. Pract.* 2016. Vol. 2016 (ID 6720575).
11. *Mitragotri S., Anderson D.G., Chen X., et al.* // *ACS Nano.* 2015. Vol. 9. N 7. P. 6644.
12. *Klyachko N.L., Manickam D.S., Brynskikh A.M., et al.* // *Nanomedicine.* 2012. Vol. 8. P. 119.
13. *Клячко Н.Л., Зайцева Е.А., Ефременко Е.Н. и др.* // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2014. Т. 55. № 3. С. 139.
14. *Зайцева Е.А., Головин Ю.И., Кост О.А. и др.* // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2016. Т. 57. № 4. С. 211.
15. *Savalia K., Manickam D.S., Rosenbaugh E.G., Tian J., Ahmad I.M., Kabanov A.V., Zimmerman M.C.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. Vol. 73. P. 299.
16. *Yi X., Manickam D.S., Brynskikh A., Kabanov A.* // *J. Control. Release.* 2014 Vol. 190 P. 637.
17. *Jiang Yu., Brynskikh A.M., Manickam D.S., Kabanov A.V.* // *J. Control. Release.* 2015. Vol. 213. P. 36.
18. *Saraswathi V., Ganesan M., Perriotte Olson C., Manickam D.S., Westwood R.A., Zimmerman M.C., Ahmad I.M., Desouza C.V., Kabanov A.V.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. Vol. 469. N 3. P. 495.
19. *Batrakova E.V., Li S., Reynolds A.D., Mosley R.L., Bronich T.K., Kabanov A.V., Gendelman H.E.* // *Bioconjugate Chem.* 2007. Vol. 18. N 5. P.1498.
20. *Угланова С.В., Попов М.В., Куркина В.С., Батракова Е.В., Манихам Д., Кабанов А.В., Клячко Н.Л.* // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2010. Т. 51. № 3. С. 227.
21. *Nikolova N.V., Aleksashkin A.D., Abakutova T.O., Morozova A.Y., Gubskiy I.L., Kirzhanova E.A., Abakutov M.A., Chekhonin V.P., Klyachko N.L., Kabanov A.V.* // *J. Control. Release.* 2018. Vol. 270. P. 226.
22. *Zimmerman M.C., Yang R., Tong J., Vinogradov S., Kabanov A.V.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 49. P. 548.

Поступила в редакцию 10.01.2020
Получена после доработки 12.01.2020
Принята к публикации 20.01.2020

OBTAINING A TWO-LAYER POLYIONIC BIENZYME COMPLEX OF SUPEROXIDE DISMUTASE 1 AND CATALASE OF MINIMAL SIZE

M.A. Tagirova¹, N.L. Ereemeev¹, A.N. Vaneev¹, N.G. Balabushevich¹, A.D. Aleksashkin¹, E.A. Zaitseva¹, N.L. Klyachko^{1,2}

(¹ Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, Lomonosov Moscow State University; ² G.R. Derzhavin Tambov State University; *e-mail: nleremeev@gmail.com; nklyachko@gmail.com)

The factors affecting the sizes of two-layer polyionic bienzyme SOD1 / catalase complex/conjugates (the nature and concentration of buffers, pH, enzymes initial molar ratios) were studied. The optimal conditions for obtaining conjugates of the minimal size are determined. The conjugates obtained under these conditions demonstrate a relatively high storage stability of both enzymes

Key words: Reactive oxygen species, nanozymes, superoxide dismutase (SOD1), catalase, two-layer polyionic bienzyme complex.

Сведения об авторах: *Тагирова Маишура Амиридиновна* – аспирант химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (mashxurat@mail.ru); *Еремеев Николай Леонидович* – вед. науч. сотр. Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, профессор (eremeev@enzyme.chem.msu.ru); *Ванеев Александр Николаевич* – аспирант химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (vaneev.alexandr@gmail.com); *Балабушевич Надежда Георгиевна* – ст. науч. сотр. химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, доцент, канд. хим. наук (nbalab2008@gmail.com); *Алексашкин Антон Дмитриевич* – аспирант химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (antond.aleksashkin@gmail.com); *Зайцева Елена Анатольевна* – вед. науч. сотр. химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (ezaitseva2008@gmail.com); *Клячко Наталья Львовна* – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, профессор (klyachko@enzyme.chem.msu.ru).