

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДЕКСТРАН СУЛЬФАТОМ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА С МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АСПАРТАТ АМИНОТРАНСФЕРАЗой

А.Э. Салем, М.В. Шолух, Ю.-П.Химанен\*

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

*\*Мемориальный онкологический центр Слоан-Кеттеринг, Нью-Йорк, США*

*e-mail: ankel2008@gmail.com; sholukh@bsu.by; juhhim@utu.fi*

### Введение

Наноматериалы находят всё более широкое применение в различных отраслях промышленности, в биологии и медицине. Они используются при производстве пластмасс, краски, косметики, зубной пасты, в диагностике, для иммобилизации белков, ферментов и антител, как инструменты целевой доставки лекарственных веществ, магнитных биосенсоров, получения биологических изображений и многого другого [1, 2, 3]. В последнее десятилетие было проведено множество исследований, направленных на определение токсичности созданных человеком наночастиц [4]. Оказалось, что многие из них способны легко проникать в организм человека через кожу, рот, дыхательные пути, накапливаться в различных органах и вызывать неблагоприятные последствия, в том числе и серьезные заболевания, в основе которых лежит взаимодействие наночастиц с белками, приводящее к агрегации последних [5, 6]. По такому сценарию может развиваться болезнь Альцгеймера. Особое место среди оксидов металлов занимают наночастицы диоксида титана (НЧ  $\text{TiO}_2$ ). Одним из его уникальных свойств является фотокаталитическое действие, проявляющееся при облучении ультрафиолетом с длиной волны 385 нм и выше. При этом образуются гидроксильный радикал, пероксид водорода, супероксид анион, которые способствуют гибели бактериальных клеток, вирусных частиц, опухолевых клеток [7]. В экспериментах на клеточных культурах было установлено, что свободно проникая в клетки, НЧ индуцируют образование активных форм кислорода и таким образом опосредуют своё действие на клеточные органоиды, белки, нуклеиновые кислоты, липиды [8]. С целью минимизировать негативные эффекты НЧ их покрывают инертными или заряженными биополимерами такими как декстран, полиэтиленгликоль, хитозан [9, 10]. Не смотря на кажущуюся инертность, такие покрытия способны к определенному взаимодействию с внутриклеточными белками и наряду с нативными наночастицами способны формировать на своей поверхности многослойное белковое покрытие, так называемую «корону» [11]. Изучению взаимодействия ферментов с НЧ  $\text{TiO}_2$  посвящены единичные работы, в которых в качестве модельных объектов использовались низкомолекулярные простые ферменты, например лизоцим [12]. Вместе с тем, глубокое понимание механизмов взаимодействия сложных олигомерных белков с немодифицированными и модифицированными НЧ, их фолдинга на поверхности НЧ, особенностей ферментативного катализа, условий сорбции и десорбции фермента с наночастицами и последующего разделения наночастиц и белка является основой успешной разработки технологии применения НЧ в биологии и медицине. Цель данной работы – изучить особенности условия взаимодействия митохондриальной аспартат аминотрансферазы (мАспАТ, КФ 2.6.1.1.) с нативными и покрытыми декстран сульфатом НЧ  $\text{TiO}_2$ , а также их влияние на каталитические свойства мАспАТ.

### Методы исследования

Митохондриальный изофермент АспАТ выделяли из сердца свиньи, как описано нами ранее [13] с некоторыми модификациями. С целью более эффективного выделения целевого продукта СМ-целлюлоза на первых двух стадиях очистки была заменена на более сильный катионообменник – SP-сефадекс С50. Фермент хранили в 50 ммоль/л К-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 0,5 ммоль/л ЭДТА, 20% глицерина и 0,05% тимерозола.

Приготовление раствора наночастиц диоксида титана проводили согласно Canesi и соавт. [14]. Навеску НЧ равную 7,3 мг суспендировали в 45 мл деионизированной воды с сопротивлением 18 Мом и подвергали ультразвуковой обработке в течение 60 мин при мощности 75 Вт (режим – 70 с вкл + 10 с выкл) при 40°C на ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin SONOPULS HD 3100. Затем суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант, содержащий наночастицы, отбирали и хранили в холодильнике при +6–8°C. Размеры наночастиц в растворе определяли на приборе Zetasizer nano («Malvern», США). В экспериментах по изучению взаимодействия НЧ TiO<sub>2</sub> с мАспАТ вначале суспензию НЧ центрифугировали при 12000 g 5 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, а к осадку НЧ добавляли мАспАТ в 6,25 ммоль/л или 50 ммоль/л фосфатном буфере, рН 7,0. НЧ тщательно суспендировали в растворе с мАспАТ и выдерживали 40 мин. После этого активность фермента определяли в данной смеси, в надосадочной жидкости после центрифугирования пробы при 10000 g 10 мин и в осадке, содержащем НЧ с адсорбированным на них ферментом. Осадок суспендировали в объеме равном первоначальному объему смеси.

На основании материала, изложенного Zhu и соавторами [15], в дальнейшем перед проведением каких-либо исследований исходный раствор наночастиц подвергали ультразвуковой обработке в течение 10 мин (50 Вт) на ледяной бане. Определение белка производили по методу Лоури в модификации Петерсона [16], используя в качестве стандарта БСА и по поглощению при 280 нм. Для мАспАТ использовали значение  $A_{280}^{1\%} = 14,0$  [17]. Активность мАспАТ определяли спектрофотометрическим методом [18], как описано нами ранее [19].

Каждый эксперимент ставился не менее чем в трёх независимых повторах. Результаты представлены как средняя арифметическая плюс/минус стандартная ошибка средней ( $X \pm Sx$ ) для выборки (за исключением специально отмеченных случаев). Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Excel 2000 и Stadia 6,0.

### **Результаты и обсуждение**

На первом этапе работы были получены и охарактеризованы растворы нативных и покрытых декстран сульфатом НЧ TiO<sub>2</sub>. Средний размер частиц нанопорошка (анатаз) был менее 25 нм. Содержание анатаза – 99,7%. На рисунке 1 представлены данные процентного распределения размеров наночастиц в водном растворе. Средний гидродинамический диаметр нативных и покрытых сульфатом декстрана наночастиц составил 190 нм и 373 нм соответственно. Увеличение размера наночастиц в водном растворе по сравнению с таковым в порошке связано с образованием агрегатов состоящих из нескольких НЧ и их последующей гидратацией. Следует также отметить практически двухкратное увеличение размера НЧ после их обработки декстран сульфатом. Эти результаты хорошо согласуются с данными других авторов [20].

Для оценки взаимодействия НЧ с мАспАТ суспензию нативных и покрытых декстран сульфатом НЧ TiO<sub>2</sub> освобождали от растворителя (деминерализованная вода), в котором они хранились, как описано в разделе Методы исследования. Полученный осадок НЧ суспендировали в препарате мАспАТ и инкубировали 40 мин, после чего центрифугировали при 10000 g 10 мин. Активность мАспАТ определяли в исходном препарате, в надосадочной жидкости и в осадке, полученными после центрифугирования. Осадок, содержащий как нативные, так и покрытые декстран сульфатом НЧ, с адсорбированной на них мАспАТ суспендировали в 6,25 моль/л фосфатном буфере, рН 7,0. Таким образом, взаимодействие мАспАТ с нативными и покрытыми декстран сульфатом НЧ TiO<sub>2</sub> оценивали по распределению активности фермента между надосадочной фракцией и осадком. Так, если фермент взаимодействовал с наночастицами, то он после центрифугирования образцов (рисунок 2) оказывался в осадке, где и определялась его активность.

Из результатов, представленных на рисунке 2 видно, что как нативные, так и покрытые декстран сульфатом НЧ TiO<sub>2</sub> практически не оказывали влияния на активность мАспАТ.

Однако, наночастицы с декстран сульфатом связывали почти 70% мАспАТ (рисунок 2, образец 3), тогда как на долю нативных НЧ приходилось до 20% (рисунок 2, образец 6).

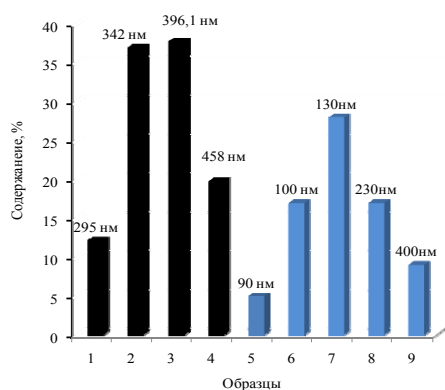
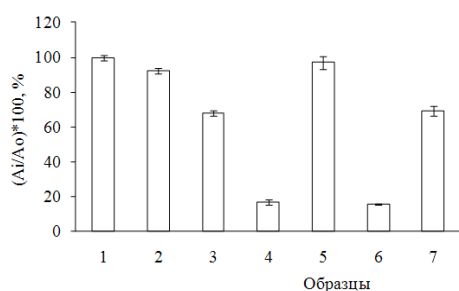


Рисунок 1 – Зависимость размера агрегатов НЧ TiO<sub>2</sub> от условий модификации поверхности

Примечание: 1, 2, 3, 4 – наночастицы диоксида титана покрытые сульфатом декстрана, 5, 6, 7, 8, 9 – нативные наночастицы диоксида титана.

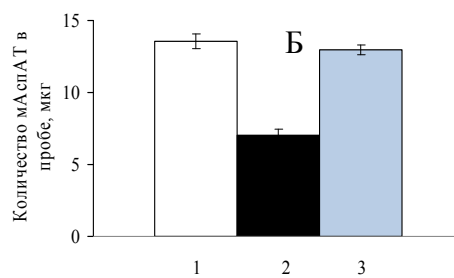
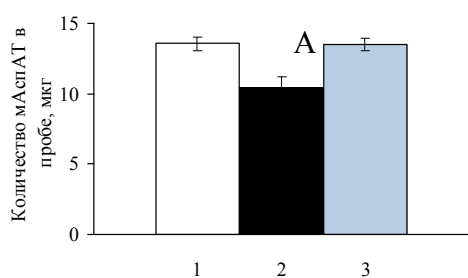


1) Контроль – активность мАспАТ в препарате без наночастиц; 2) активность мАспАТ в присутствии НЧ TiO<sub>2</sub> покрытых декстран сульфатом; 3) активность мАспАТ в осадке НЧ TiO<sub>2</sub> покрытых декстран сульфатом полученном после центрифугирования образца 2; 4) активность мАспАТ в супернатанте после центрифугирования образца 2; 5) активность мАспАТ в присутствии нативных НЧ TiO<sub>2</sub>; 6) активность мАспАТ в осадке нативных НЧ TiO<sub>2</sub> полученном после центрифугирования образца 5, 7) активность мАспАТ в супернатанте после центрифугирования образца 5. Все образцы приготовлены на 6,25 ммоль/л фосфатном буфере, рН 7,0. Концентрация мАспАТ в пробе – 5мкг/мл. Активность выражали в процентах к контролю (проба мАспАТ без наночастиц)

Рисунок 2 – Взаимодействие нативных и покрытых декстран сульфатом НЧ TiO<sub>2</sub> с мАспАТ

Примечание: каждая точка является средней пяти независимых экспериментов.

Основная же часть фермента с нативными НЧ не связывала и оставалась в супернатанте после осаждения наночастиц центрифугированием (рисунок 2, образец 7). Потери активности фермента после центрифугирования не наблюдалось. Для того, чтобы ответить на вопрос насколько прочно фермент связывается с НЧ TiO<sub>2</sub> и является ли это связывание обратимым, определяли количество белка связываемого с НЧ при разных концентрациях фосфатного буфера. Данные представлены на рисунке 3.



А – адсорбция мАспАТ на нативных НЧ TiO<sub>2</sub>: 1 – контроль (раствор мАспАТ без НЧ); 2 – мАспАТ+НЧ TiO<sub>2</sub> в 5 ммоль/л Na-фосфатном буфере, рН 6,8; 3 – мАспАТ+НЧ TiO<sub>2</sub> в 50 ммоль/л Na-фосфатный буфер, рН 6,8

Б – адсорбция мАспАТ на НЧ TiO<sub>2</sub> покрытых декстран сульфатом: 1 – контроль (раствор мАспАТ без НЧ); 2 – мАспАТ+НЧ TiO<sub>2</sub> покрытых декстран сульфатом в 5 ммоль/л Na-фосфатный буфер, рН 6,8; 3 – мАспАТ+НЧ TiO<sub>2</sub> покрытых декстран сульфатом в 50 ммоль/л Na-фосфатный буфер, рН 6,8

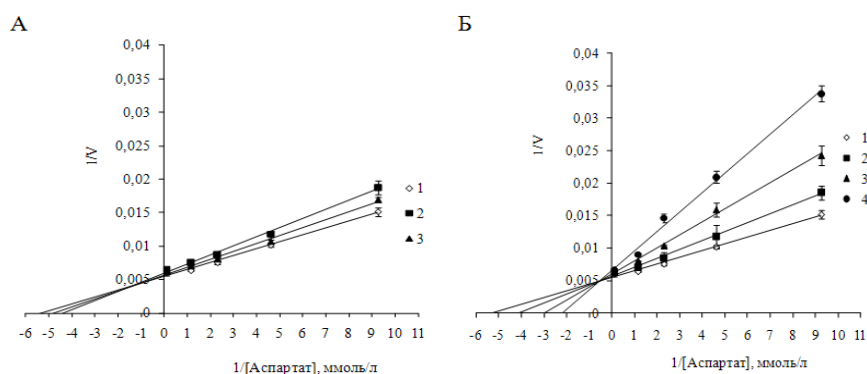
Рисунок 3–Зависимость адсорбции мАспАТ на НЧ TiO<sub>2</sub> от концентрации фосфатного буфера

Примечание: каждая точка является средней пяти независимых экспериментов.

Эксперимент проведён по следующей схеме. Фермент инкубировали с НЧ в 5 ммоль/л или 50 ммоль/л Na-фосфатном буфере pH 6,8. Наночастицы связавшие мАспАТ отделяли центрифугированием при 10000 g 10 мин и в супернатанте определяли оставшийся белок. Установлено, что инкубация мАспАТ с нативными НЧ  $\text{TiO}_2$  при концентрации буфера 5 ммоль/л, pH 6,8 приводит к сорбции на НЧ около 25% белка пробы, в то время как при увеличении концентрации Na-фосфатного буфера до 50 ммоль/л адсорбции мАспАТ на поверхности наночастиц практически не наблюдается (рисунок 3А). НЧ покрытые декстран сульфатом связывают более половины белка мАспАТ при инкубации в 5 ммоль/л Na-фосфатном буфере, pH 6,8. Однако, как и в случае с нативными НЧ, наночастицы модифицированные декстран сульфатом белок практически не связывают (рисунок 3Б). Полученные данные хорошо согласуются с результатами вышеописанного эксперимента по изучению влияния НЧ на активность мАспАТ (рисунок 2) и с данными других авторов. Так, например, при использовании немодифицированных НЧ  $\text{TiO}_2$  в качестве матрицы для рефолдинга денатурированных папаина, РНКазы и  $\alpha$ -химотрипсина было продемонстрировано практически полное восстановление активности ферментов [21]. Успешная элюция белков с помощью 100 ммоль/л NaCl позволила авторам [21] заключить, что взаимодействие белков с НЧ  $\text{TiO}_2$  является электростатическим по своей природе. Подтверждение важной роли электростатических взаимодействий мы находим в обзоре [22], хотя авторы рассматривают широкий спектр биофизикохимических взаимодействий на границе раздела нано-био. На основании полученных нами результатов об отсутствии потери активности при взаимодействии между мАспАТ и НЧ  $\text{TiO}_2$ , а также полной десорбции фермента в 50 ммоль/л Na-фосфатный буфер, pH 6,8 можно предположить, что оно имеет электростатическую природу и носит довольно «мягкий характер».

Вместе с тем есть сведения о значительных изменениях пространственной структуры (переход  $\alpha$ -спирали в  $\beta$ -складчатую структуру) и бактериолитической активности лизоцима при его взаимодействии с НЧ  $\text{TiO}_2$  [12]. На основании этих данных, а также приведённых выше результатах наших исследований можно предположить, что при взаимодействии мАспАТ с НЧ  $\text{TiO}_2$  произойдут конформационные изменения структуры мАспАТ, следствием которых явится нарушение кинетического поведения фермента.

Действие нативных и модифицированных декстран сульфатом НЧ  $\text{TiO}_2$  на кинетические параметры реакции переаминирования катализируемого мАспАТ представлено на рисунке 4.



А) Нативные НЧ  $\text{TiO}_2$ : 1 – контроль – мАспАТ без НЧ; 2 – мАспАТ+50 мг/л нативных НЧ  $\text{TiO}_2$ ; 3 – мАспАТ+25 мг/л нативных НЧ  $\text{TiO}_2$

Б) НЧ  $\text{TiO}_2$  покрытые декстран сульфатом: 1 – контроль – мАспАТ без наночастиц; 2 – мАспАТ+50 мг/л НЧ  $\text{TiO}_2$  покрытых декстран сульфатом; 3 – мАспАТ+25 мг/л НЧ  $\text{TiO}_2$ , покрытых декстран сульфатом; 4 – мАспАТ+12,5 мг/л НЧ  $\text{TiO}_2$ , покрытых декстран сульфатом

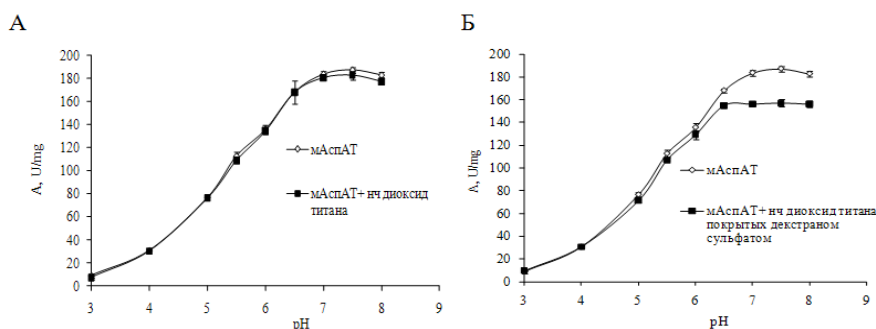
Фиксированная концентрация  $\alpha$ -кетоглутарата – 1 ммоль/л

Рисунок 4 – Смешанный тип ингибирования нативными и покрытыми декстран сульфатом наночастицами  $\text{TiO}_2$  ферментативного переаминирования катализируемого мАспАТ

Примечание: каждая точка является средней пяти независимых экспериментов.

Ингибирование активности мАспАТ наночастицами диоксида титана скорее всего можно отнести к ингибированию смешанного типа [23], так как здесь сочетается снижение  $V_{max}$  с одновременным увеличением  $K_m$ . Обращает на себя внимание тот факт, что в случае контакта с НЧ покрытыми декстраном величина  $K_m$  для аспартата превышает таковую у нативных почти в два раза. По всей видимости, связывание мАспАТ с сульфогруппами декстрана носит более «жесткий», вероятно, более многоточечный характер, что будет приводить к снижению конформационной гибкости апофермента, возможному затруднению поступления субстрата в активный центр фермента и, как следствие, к снижению  $V_{max}$  и подъёму  $K_m$ . Вместе с тем, полное отсутствие сорбции с сохранением активности при обработке комплекса НЧ-мАспАТ фосфатным буфером с концентрацией 50 ммоль/л позволяет предположить сохранение у фермента исходных кинетических параметров. Основанием для такого предположения служат сведения о выделении и очистке мАспАТ с применением SP-сефадекса и КМ целлюлозы [13, 19]. Используемые в данной работе НЧ  $TiO_2$  модифицированные декстран сульфатом можно отнести к наноразмерному ионообменнику, свойства которого предстоит изучить отдельно.

Одной из важнейших характеристик фермента является его оптимум pH. Для того, чтобы оценить возможное влияние наночастиц на зависимость скорости протекания реакции трансаминирования, катализируемого мАспАТ от pH, поступали следующим образом. Фермент предварительно диализовали против 5 ммоль/л цитратно-фосфатного буферного раствора соответствующего pH в течение 24 часов. Суспензию НЧ  $TiO_2$  (1000 мкл) центрифугировали при 2000 g 10 мин, удаляли супернатант, а к осадку добавляли 1000 мкл раствора мАспАТ с концентрацией белка 5 мкг/мл находящегося в 5 ммоль/л цитратно-фосфатном буферном растворе с соответствующим значением pH. Фермент инкубировали с НЧ при комнатной температуре в течение 40 минут. Активность мАспАТ измеряли по Кармен [17], при заданных значениях pH. Полученные нами результаты (рисунок 5) свидетельствуют, что взаимодействие фермента с нативными и покрытыми декстран сульфатом НЧ не повлияло на зависимость активности мАспАТ от pH. И хотя активность фермента в оптимальном диапазоне pH оказалась несколько ниже в образце мАспАТ инкубированного с НЧ.  $TiO_2$  модифицированными декстран сульфатом, pH оптимум реакции не изменился.



А – нативные наночастицы

Б – наночастицы покрытые декстран сульфатом

Рисунок 5 – Зависимость активности мАспАТ от pH в присутствии наночастиц  $TiO_2$

*Примечание:* каждая точка является средней пяти независимых экспериментов.

Таким образом, можно заключить, что нативные и модифицированные декстран сульфатом НЧ  $TiO_2$  не оказали влияния на характер зависимости скорости реакции переаминирования катализируемой мАспАТ от pH.

### Выводы

Методом ультразвуковой обработки водной суспензии нанопрошка  $TiO_2$  получены агрегаты нативных и покрытых декстран сульфатом НЧ со средним гидродинамическим диаметром 190 нм и 373 нм соответственно. НЧ  $TiO_2$  модифицированные декстран сульфатом связывают мАспАТ в 2 раза эффективнее нативных, однако при этом

наблюдается некоторое снижение активности фермента. При увеличении концентрации Натриосфатного буфера pH 6,8 с 5 ммоль/л до 50 ммоль/л происходит десорбция мАспАТ с НЧ с полным восстановлением каталитической активности фермента. По кинетическому механизму ингибирование мАспАТ наночастицами  $\text{TiO}_2$  можно отнести к ингибированию смешанного типа, которое в большей степени выражено у модифицированных НЧ. Нативные и покрытые декстран сульфатом НЧ  $\text{TiO}_2$  не оказывали влияния на характер зависимости скорости реакции переаминирования катализируемой мАспАТ от pH.

#### Список литературы

1. Mohanra, V.J. Nanoparticles – A Review / V.J. Mohanra // *Tropical J. of Pharmacy Res.* – 2006. – Vol. 5, № 1. – P. 561–573.
2. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Application / V. Arruebo [et al.] // *J. of Nanomaterials.* – 2007. – Vol. 12. – P. 1222–1229.
3. Biotests and Biosensors for Ecotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles [A] Minireview / A. Kahru [et al.] // *Sensors.* – 2008. – № 8. – P. 5153–5170.
4. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity / C. Buzea [et al.] // *Biointerphase.* – 2007. – № 2. – P. 17–71.
5. Regulation of Enzyme Activity through Interactions with Nanoparticles / Z. Wu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2009. – № 10. – P. 4198–4209.
6. Effect of nanoparticles on protein folding and Fibrillation / L. Fei [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2009. – Vol. 10. – P. 646–665.
7. Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cell / D.M. Blake [et al.] // *Separation And Purification Methods.* – 1999. – Vol. 28, № 1. – P. 1–50.
8. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems Annu. Rev. / A. Albanese [et al.] // *Biomed. Eng.* – 2012. – Vol. 14. – P. 1–16.
9. Preparation of magnetic nanowires modified with functional groups / Z. Wu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2009. – Vol. 10, № 10. – P. 4198–4209.
10. Leaching tests for synthesized magnetite nanoparticles used as adsorbent for metal ions from liquid solutions / E. Matei [et al.] // *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.* – 2011. – Vol. 6, № 4. – P. 1701–1708.
11. Protein-nanoparticle interactions / I. Lynch [et al.] // *NanoToday.* – 2008. – Vol. 3, № 12. – P. 40–47.
12. Interaction of nano- $\text{TiO}_2$  with lysozyme: insights in to the enzyme toxicity of nanosized particles / Z. Xu [et al.] // *Environ. Sci Pollut. Res.* – 2010. – Vol. 17. – P. 798–806.
13. Thermal inactivation, denaturation and aggregation of mitochondrial aspartate aminotransferase / N.V. Golub [et al.] // *Biophysical Chemistry.* – 2008. – Vol. 135. – P. 125–131.
14. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles ( $\text{C}_{60}$  fullerene,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ) on Mutilus hemocytes / L. Canesi [et al.] // *Aquatic Toxicology.* – 2010. – № 96. – P. 151–158.
15. Toxicity and bioaccumulation of  $\text{TiO}_2$  nanoparticle aggregates in *Daphnia magna* / X. Zhu [et al.] // *Chemosphere.* – 2010. – № 78. – P. 209–215.
16. Peterson, G.L. Determination of total protein / G.L. Peterson // *Methods in enzymology.* – 1983. – Vol. 91. – P. 95–119.
17. Karmen, A.A. Note on spectrophotometric assay of glutamic oxalocetic transaminase in human blood serum / A.A. Karmen // *J. Clin. Invest.* – 1955. – Vol. 34. – P. 131–135.
18. Large-scale purification and some properties of the mitochondrial aspartate aminotransferase from pig heart / D. Barra [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1976. – Vol. 64, № 23. – P. 519–526.
19. Взаимодействие митохондриального ихофермента аспарат-аминотрансферазы с наночастицами  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  / А.Э. Салем [et al.] // *Новости медико-биологических наук.* – 2013. – Т. 7, № 2. – С. 142–146.
20. Effects of surfactants and pH of medium on zeta potential and aggregation stability of titanium dioxide suspensions / R.S. Petryshyn [et al.] // *Colloidal journal.* – 2010. – Vol. 72, № 4. – P. 517–572.
21. Nanoparticles of unmodified titanium dioxide facilitate protein refolding / S. Raghava [et al.] // *J. Mater. Chem.* – 2009. – № 19. – P. 2830–2834.
22. Thompson, M. Understanding of biophysicochemical interactions at the nano-bio interface / M. Thompson [et al.] // *Nature Materials.* – 2009. – Vol. 8. – P. 543–557.
23. Уэбб, Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма / Л. Уэбб. – М., Мир. – 1966. – С. 156–163.