

УДК 541.64:547.466

ХИМОТРИПСИН – СТАБИЛИЗАТОР НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА

Панов Д.А., Пысларь Е.В.

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия
E-mail: panovda@crimea.edu*

Синтезированы водорастворимые наночастицы селена в присутствии протеолитического фермента α -химотрипсина в качестве стабилизатора. Особенностью получения нанокompозита является переход селена из ионизированной окисленной формы в молекулярное состояние путем взаимодействия водного раствора селенита натрия с цистеином в щелочной среде. Спектрофотометрическим методом изучены зависимость агрегативной устойчивости полученного нанокompозита от массового соотношения селен–фермент и времени хранения растворов.

Ключевые слова: химотрипсин, цистеин, наночастицы, селенит натрия, спектрофотометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Создание композитов биогенных элементов является перспективным направлением нанобиотехнологии. В последние годы возрастает интерес к микроэлементу селену, который входит в состав антиоксидантной системы защиты организма. В отличие от ионных форм наноразмерный селен (Se) менее токсичен и обладает повышенной биодоступностью, причем он не только предотвращает, но и приостанавливает развитие злокачественных опухолей. Наночастицы селена, в отличие от антибиотиков, способны оказывать свое действие постоянно [1, 2]. Однако их целенаправленное использование связано с гарантированной агрегативной устойчивостью в течение длительного времени. Валуева С.В. [3, 4] с сотрудниками изучали процессы формирования наноселена при восстановлении селенистой кислоты аскорбиновой кислотой в присутствии ряда синтетических высокомолекулярных соединений (поливинилпирролидон, оксиэтилцеллюлоза, полиметакриловая кислота и др.). В растворе полимера при pH 3,3 в зависимости от массового соотношения селен/полимер в интервале от 0,01–0,2 формируется агрегативно устойчивые наночастицы красного аморфного селена с радиусом 0,57 нм и формой близкой к сферической.

В настоящее время для стабилизации наночастиц селена, полученных ранее описанным методом, используют протеолитический фермент α -химотрипсин (ХТ). Однако, этот фермент достаточно активен в интервале pH 7,6–8,2. Восстановление селена из селенистой кислоты протекает при pH 2,8–3,5. В интервале pH 4,0–6,5 образующиеся наночастицы быстро агрегируются и выпадают в осадок. И только при pH > 6,5 образуется водорастворимый нанокompозит селена с химотрипсином [5–7].

В работах [8–10] рассмотрен синтез наночастиц селена путем восстановления селенита натрия аминокислотой L-цистеином (Cys), которая входит в состав химотрипсина (рН 7,5–8,5). В отсутствие полимера-стабилизатора полученные наночастицы селена диаметром до 100 нм обладают весьма низкой агрегативной устойчивостью.

Целью данной работы явилось изучение влияния химотрипсина на стабильность частиц наноселена, полученных путем восстановления селенита натрия цистеином в щелочной среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы L-цистеин, производства «Synex Pharma», α -химотрипсин («ООО и Самсон-Мед») и селенит натрия (х.ч.). Растворы L-цистеина нестойкие, окисляются кислородом воздуха с выпадением осадка (цистин). Водные растворы селенита натрия малоустойчивы. Растворы цистеина и селенита натрия пригодны для работы в день приготовления. α -Химотрипсин – протеолитический фермент представляет собой чешуйки или белый порошок хорошо растворимый в воде. Молекулярный вес 25 кДа, изоэлектрическая точка наблюдается при рН 8,6.

Для измерения рН растворов использовали универсальный иономер ЭВ-74 со стеклянным индикаторным электродом и хлорсеребряным электродом сравнения. Измерение оптической плотности растворов индивидуальных веществ и нанокомпозитов селена с химотрипсином проводили на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) в кварцевых кюветах ($l=1$ см) при температуре 23 °С в интервале длин волн 200–600 нм. Контроль за агрегативной устойчивостью полученного наноселена осуществляли фотометрическим методом по изменению оптической плотности полосы поглощения при длине волны 315 нм на фотоколориметре КФК-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектами исследования служили селеносодержащие наноструктуры, получаемые восстановлением селенита натрия цистеином в присутствии стабилизатора химотрипсина. Наночастицы селена получали следующим образом: к раствору химотрипсина с концентрацией 0,005–0,25% добавляли раствор селенита натрия с постоянной концентрацией селена 0,005%, перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин., затем в колбу вводили восстановитель – цистеин и снова перемешивали. Селенит натрия взаимодействует с цистеином в соотношении 1:4. В результате реакции образуется красновато-оранжевого цвета аморфный наноселен. На рис. 1 представлены спектры поглощения: химотрипсина и нанокомпозита селена в присутствии химотрипсина, в области длин волн 200–600 нм. Растворы селенита натрия и цистеина практически не поглощают в области 200–600 нм. Максимум полосы поглощения химотрипсина наблюдается при длине волны 290 нм. Из литературных данных известно, что максимум полосы поглощения аморфного наноселена расположен в области 300–320 нм, поэтому при измерении оптической плотности раствора нанокомпозита селена с химотрипсином в качестве раствора сравнения использовали раствор чистого химотрипсина. Интенсивный максимум поглощения нанокомпозита наблюдался при длине волны

305 нм, что свидетельствует о существовании селена в этом растворе в нуль-валентном состоянии [3].

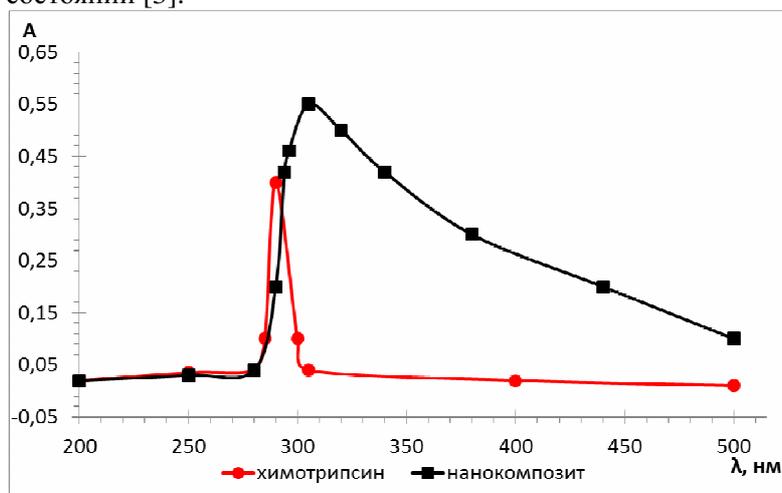


Рис. 1. Зависимость оптической плотности растворов химотрипсина ($C = 0,005\%$), наноккомпозита селена с химотрипсином ($C_{Se}/C_{ХТ}=0,1$) от длины волны.

На процесс формирования и стабильность наноструктур существенное влияние оказывает массовое соотношение компонентов наноккомпозита селен-химотрипсин ($v=C_{Se}/C_{ХТ}$). Были приготовлены ряд растворов при различных массовых соотношениях селен/фермент, равных: 0,02; 0,04; 0,08; 0,10; 0,50; 1,00. Концентрация селена выдерживалась постоянной во всех случаях и составляла 0,005%, а менялась концентрация фермента. Затем измеряли оптическую плотность полученных растворов в области длин волн 200–600 нм (Рис. 2).

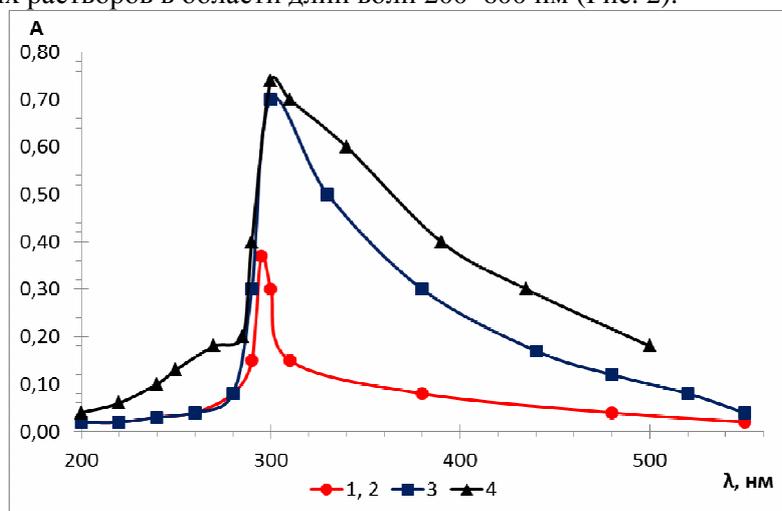


Рис. 2. Изменение оптической плотности селеносодержащих композитов в присутствии химотрипсина в зависимости от длины волны.

Из рис. 2 видно, что максимальная оптическая плотность наблюдается для растворов с массовым соотношением $\nu(C_{Se}/C_{ХТ})=0,1$ (Рис. 2, кривая 3). Аналогичная картина наблюдается в интервале $\nu=0,1-1,0$. Для сравнения был снят спектр поглощения восстановленного наноселена в отсутствие химотрипсина (Рис. 2, кривая 4). При соотношении $\nu(C_{Se}/C_{ХТ})=0,02-0,08$ наблюдается неполное восстановление селенита натрия цистеином в присутствии химотрипсина.

Агрегативную устойчивость образующихся наночастиц селена в присутствии химотрипсина определяли по изменению оптической плотности и рН растворов. Измерение оптической плотности проводили на фотоколориметре КФК-2 при длине волны 315 нм через определенные промежутки времени в течение двух месяцев. Параллельно в этих же растворах определяли рН. В результате проведенных исследований было установлено, что в течение данного периода наблюдалось стабильное состояние наноконструкций селена с химотрипсином при соотношении 0,1–1,0. «Защитное действие» химотрипсина связано с его адсорбцией на поверхности наночастиц селена и, соответственно, с гидрофилизацией их поверхности за счет ионизированных групп белка, а гидрофильные коллоиды намного стабильнее в водных растворах.

В последние годы развивается новый подход к получению терапевтических препаратов, основанных на иммобилизации лекарственных средств на полимерных носителях. Модифицированные препараты обладают рядом преимуществ по сравнению с нативными предшественниками. В ряде работ [11, 12] гидролитический фермент химотрипсин был иммобилизован наночастицами селена, полученными путем восстановления селенистой кислоты аскорбиновой кислотой при рН 2,8–3,3 с дальнейшим подщелачиванием раствора. Следовательно, предложенный метод получения наноселена путем восстановления селенита натрия цистеином в щелочной среде может быть использован для иммобилизации фермента химотрипсина. Таким образом, разработанный способ получения водорастворимых наноконструкций селена в матрице химотрипсина может быть положен в основу создания новых безопасных и эффективных медицинских и ветеринарных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучено восстановление селенита натрия цистеином в присутствии стабилизатора – химотрипсина в щелочной среде.
2. Спектрофотометрическим методом установлено, что наибольшая агрегативная устойчивость наноконструкций селена с химотрипсином наблюдается при соотношении $\nu(C_{Se}/C_{ХТ})=0,1-1,0$.
3. В присутствии химотрипсина наночастицы селена сохраняли свою агрегативную устойчивость в течение двух месяцев.

Список литературы

1. Решетняк Л.А. Селен и здоровье человека (обзор литературы) / Л.А. Решетняк, Е.О. Парфенова // Экология моря. – 2000. – № 59. – С. 20–25.
2. Селен. Некоторые аспекты химии, экологии и участия в развитии патологии (обзор) /

- В.В. Вапиров, М.Э. Шубина, Н.В. Вапирова [и др.]. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2000. – 68 с.
3. Самоорганизация и структура селеносодержащих биологически активных наночастиц / С.В. Валуева, Т.Е. Суханова, Л.Н. Боровикова [и др.] // Электр. жур. «Структура и динамика молекулярных систем». – 2011. – № 10 А. – С. 3–11.
 4. Валуева С.В. Влияние соотношения компонентов комплекса селен: поливинилпирролидон на формирование и морфологические характеристики наноструктур / С.В. Валуева, Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер // Журнал физической химии. – 2008. – Т. 82, № 6. – С. 1131–1136.
 5. Влияние условий синтеза и pH среды на размерные характеристики наноконплексов селена с химотрипсином / Д.Ю. Ершов, А.И. Киппер, Л.Н. Боровикова [и др.] // Журнал физической химии. – 2013. – Т. 87, № 12. – С. 2116–2118.
 6. Стабилизация наночастиц селена химотрипсином, влияние pH и концентрационного соотношения частица-фермент наноконплексов / Л.Н. Боровикова, А.В. Титова, Н.А. Матвеева [и др.] // Журнал физической химии. – 2013. – Т. 87, № 6. – С. 1009–1012.
 7. Ферментативные и бактерицидные свойства комплексов химотрипсина с наночастицами серебра / Д.Ю. Ершов, Т.М. Ворошилова, А.С. Плешков [и др.] // Шестая всероссийская Каргинская конференция «Полимеры-2014»: [Сборник тезисов, 27–31 января 2014 г.]. – Москва (Россия), 2014. Т. 2, ч. 1. – С. 490.
 8. Facile and controllable one-step fabrication of selenium nanoparticles assisted by L-cysteine / Q. Li, T. Chen, F. Yang [et al.] // Materials letters. – 2010. – Vol. 64, № 5. – P. 614–617.
 9. Пат. 84626 МПК6 А 61 К 33/38, А 61 К 31/00. Спосіб отримання водорозчинної композиції наночастинок, яка містить наночастинки селену / Юркова І.М., Панова Е.П., Панов Д.О., Омельченко О.В.; заявитель и патентообладатель Таврический национальный университет. – № 201305453 ; заявл. 26.04.13 ; опубл. 25.10.13. Бюл. № 20.
 10. Панова Э.П. Исследование взаимодействия селенита натрия с L-цистеином потенциометрическим методом / Э.П. Панова, А.А. Османова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия: "Биология, химия". – 2014. – Т. 27(66), № 1. – С. 292–298.
 11. Модификация химотрипсина наночастицами селена / Л.Н. Боровикова, Н.Н. Матвеева, К.В. Титова [и др.] // V Всероссийская научная конференция «Физикохимия процессов переработки полимеров. Полимер-2013»: [Тезисы докладов, 16–19 сентября 2013 г.]. – Иваново (Россия), 2013. – С. 77.
 12. Валуева С.В. модификация полиэлектролитных комплексов наночастицами селена / С.В. Валуева, Л.Н. Боровикова, Т.Е. Суханова // V Всероссийская научная конференция «Физикохимия процессов переработки полимеров. Полимер-2013»: [Тезисы докладов, 16–19 сентября 2013 г.]. – Иваново (Россия), 2013. – С. 80–81.

CHYMOTRYPSIN - STABILIZER OF SELENIUM NANOPARTICLES

Panov D.A., Pyslar E.V.

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: panovda@crimea.edu*

The creation of biogenic elements composites is a promising direction of nanobiotechnology. Unlike ionic forms nanosize selenium (Se) is less toxic and has an increased bioavailability, and it not only prevents but also suspends development of malignant tumors.

To stabilize the selenium nanoparticles, using a number of synthetic macromolecular compounds at pH 3.3. However, the use of a proteolytic enzyme α -chymotrypsin (CT), the

synthesis can be carried out at $\text{pH} > 6.5$ at the same time produce the aggregation stable soluble nanocomposites selenium with chymotrypsin.

The purpose of this work was to study the effect of chymotrypsin on the stability of nanoselenium obtained by reduction of sodium selenite with cysteine in alkaline medium.

Selenium nanoparticles obtained by mixing together solutions of chymotrypsin ($C = 0,005\text{--}0,25\%$), sodium selenite at a constant concentration of 0.005% selenium, and adding, after 30 min., a reductant – cysteine. Sodium selenite reacts with cysteine in the ratio 1:4. The reaction produced a reddish-orange amorphous nanoselenium. Intensive absorption maximum of nanocomposite observed at a wavelength of 305 nm, which indicates the existence of selenium in the solution in the zero-valent state.

On process of formation and stability nanostructures is significantly affected by the weight ratio of the nanocomposite components selenium-chymotrypsin ($\nu = C_{\text{Se}}/C_{\text{CT}}$). At a ratio of $\nu(C_{\text{Se}}/C_{\text{CT}}) = 0.1\text{--}1.0$ has the highest aggregate stability of nanocomposites selenium with chymotrypsin.

Determination of aggregate stability during prolonged storage solutions was determined by the change in optical density and the pH of solutions over two months. In this period there was a stable state nanocomposites selenium with chymotrypsin at a ratio $\nu(C_{\text{Se}}/C_{\text{CT}}) = 0,1\text{--}1,0$.

A method for producing water soluble selenium nanocomposites in the matrix of chymotrypsin can be used as a basis to create new safe and effective medical and veterinary drugs was designed. In addition, the resulting nanoselenium in alkaline medium may also be used to immobilize the enzyme chymotrypsin, has several advantages compared to the native precursor

Keywords: chymotrypsin, cysteine, sodium selenite, nanoparticles, spectrophotometry.

Reference

1. Reshetnyak L.A., Parfenov E.O. Selenium and human health (review), *Ecology Sea*, **59**, 20 (2000).
2. Vapirov V.V., Shubin M.E., Vapirova N.V., Belichenko V.I., Shubin I.V. *Selenium. Some aspects of the chemistry, ecology, and participation in the development of pathology (review)*, 68 p. (Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, 2000).
3. Valueva S.V., Sukhanov T.E., Borovikova L.N., Vylegzhanina M.E., Matveeva N.A., Gelfond M.L. Self-organization and structure of biologically active selenium nanoparticles, *Structure and dynamics of molecular systems*, **10 (A)**, 3 (2011).
4. Valuev S.V., Borovikova L.N., Kipper A.I. Effect of the ratio of components selenium polyvinylpyrrolidone on the formation and morphological characteristics of nanostructures, *Journal of Physical Chemistry*, **82 (6)**, 1131 (2008).
5. Ershov D.J., Kipper A.I., Borovikova L.N., Pisarev O.A. Influence of the synthesis conditions and pH on the dimensional characteristics of selenium nanocomplexes with chymotrypsin, *Journal of Physical Chemistry*, **(12)**, 2116 (2013).
6. Borovikova L.N. Titova A.V., Matveeva N.A., Pisarev O.A. Stabilization of selenium nanoparticles chymotrypsin: the influence of pH and concentration ratio of nanoparticle-enzyme stability nanocomplexes, *Journal of Physical Chemistry*, **87 (6)**, 1009 (2013).
7. Ershov D.J., Voroshilov T.M., Pleshkov A.C., Kipper A.I., Borovikova L.N., Pisarev O.A., Enzymatic and bactericidal properties chymotrypsin complexes with silver nanoparticles, *Abstracts of Sixth All-Russian Kargin'skaya Conference "Polymers 2014"*, (Moscow, 2014), P. 490.
8. Q. Li, T. Chen, F. Yang, J. Liu, W. Zheng Facile and controllable one-step fabrication of selenium nanoparticles assisted by L-cysteine, *Materials letters*, **64 (5)**, 614 (2010).

9. Jurkova I.M., Panova E.P., Panov D.O., Omelchenko O.V. Pat. 84626 МПК6 А 61 К 33/38, А 61 К 31/00. A process for water-soluble nanoparticles compositions containing selenium nanoparticles / applicant and patenteeTavrida national university. - № 201305453; appl. 26/04/13; publ. 10.25.13. Bull. Number 20.
10. Panova E.P., Osmanova A.A. Study of interaction sodium selenite with l-cysteine by potentiometric method, *Scientific Notes of Taurida National V. I. Vernadsky University – Series: Biology, Chemistry.*, **27** (1), 292 (2014).
11. Borovikova L.N., Matveeva N.A., Titova A.V., Ershov D.J., Pisarev O.A. Modification of selenium nanoparticles chymotrypsin, *Abstracts of V All-Russian Scientific Conference "Physical chemistry of polymer processing. Polymer-2013 "*, Kuleznev V.N. (Ivanovo, 2013), P. 77.
12. Valueva S.V., Borovikova L.N., Sukhanov T.E Modification of polyelectrolyte complexes of selenium nanoparticles, *Abstracts of V All-Russian Scientific Conference "Physical chemistry of polymer processing. Polymer-2013 "*, Kuleznev V.N. (Ivanovo, 2013), P. 80.

Поступила в редакцию 30.10.2014 г.