

УДК 577.15.08+606.61

О.Э.Маленко, А.И.Коротаева, А. А. Белов, А. А.Фенин

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1
E-mail: ABelov2004@yandex.ru

ВЛИЯНИЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ В СТЕРИЛИЗУЮЩЕЙ ДОЗЕ НА ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ПРЕПАРАТЫ ФЕРМЕНТОВ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КРАБА

Исследовано действие гамма-облучения в стерилизующей дозе (25 кГрей) на протеолитические ферменты и их природные комплексы. Установлено повреждающее действие гамма-облучения на биологическую активность исследованных препаратов. Имобилизация на целлюлозные носители (целлюлоза, диальдегидцеллюлоза) содержащие и несодержащие хитозан в своем составе, не предохраняет от инактивирующего действия гамма-облучения.

Ключевые слова: протеиназы, гамма-облучение, имобилизация, инактивация.

Действие ионизирующего излучения на органические вещества приводит к образованию реакционноспособных частиц – ионов, возбужденных молекул, свободных радикалов, ион-радикалов. Образование таких частиц является лишь первым актом в цепи превращений и деградации энергии в веществе, поглотившем дозу ионизирующего излучения. При этом, чем сложнее строение и выше организация облученного объекта, тем длительнее и сложнее цепь происходящих в нем радиационно-химических процессов. Поэтому в органических, а особенно в биологических макромолекулах между актом поглощения энергии ионизирующего излучения и первичными радиационно-химическими превращениями с одной стороны и конечным результатом может лежать длительный период времени, исчисляемый иногда годами. Отдаленные последствия действия ионизирующего излучения представляют собой результат последовательного ряда реакций окисления и восстановления, образования и разрыва химических связей, сшивки или деструкции полимерных цепей, изменения вторичной структуры и конформации макромолекул. При действии на полимеры ионизирующих излучений может происходить как деструкция, так и сшивка макромолекул. Принадлежность к той или иной группе определяется, прежде всего, химической структурой макромолекул. При этом существенными особенностями химического строения, от которых зависит соотношение скоростей сшивки и деструкции, является возможность миграции свободной валентности за счет перескока водорода от одного соседнего атома углерода к другому. Миграция свободной валентности облегчает макромолекулярную рекомбинацию и образование поперечных сшивок макромолекул [1,2].

Облучение является методом стерилизации, который применяется для изготовления

медицинской продукции и может быть использован в промышленном масштабе. Стерилизацию кристаллических и иммобилизованных препаратов, запаянных в полиэтиленовые пакеты, осуществляли на гамма-установке РХМ-γ-20 при 293К в дозе 25 кГр. Одним из требований, которым должны отвечать биологически активные соединения при использовании для их стерилизации ионизирующих излучений, является их радиационная устойчивость или радиорезистентность. Это не означает, что проникающая радиация не вызывает в таких веществах никаких изменений, однако после облучения радиорезистентные препараты должны соответствовать нормативным требованиям как по физико-химическим, так и по санитарно-гигиеническим свойствам, в том числе по отсутствию токсических и аллергических воздействий, с одной стороны, и сохранению специфического, например, лечебного эффекта, с другой стороны [1,2].

В работе использовали протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба (ТУ 9281-004-11734126-00, НПО "Биопрогресс" МО г. Щелково, Россия), хитозан производства НПО "Биопрогресс" (г. Щелково, МО, РФ) (влажность препарата 10%, ТУ 9289-067-00472124-03, степень деацелирования 80.0%; кинематическая вязкость не менее 383.7 сСт; молекулярная масса 478 кДа). Все остальные реактивы отечественного производства, квалификации не ниже "ХЧ".

Активацию целлюлозного носителя в виде тканых полотен (медицинской марли) проводили периодом натрия, в результате чего получали диальдегидцеллюлозу (ДАЦ) требуемой степени модификации вторичных спиртовых групп [1,3]. Количество альдегидных групп на носителях определяли аналогично [1,4] либо окислением последних раствором йода в слабощелочной среде (0,1N. раствор $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), либо с помощью 3,5-динитросалициловой кислотой (ДНСК) [5] и

выражали в мМ/г с учетом влажности носителя [6] (указана в скобках). После химической модификации носителя следует стадия иммобилизация ПК на модифицированном текстильном носителе аналогично [1]. Содержание Хт на носителе составляло 20-30 мг/г носителя, содержание ПК составило 2-7 мг/г носителя. Ферментативные активности препаратов определяли с использованием в качестве субстрата

азоколл [1,7], раствора казеина [1,7,8], ВосAlaONp [9], либо паранитроанилида N-бензоил-D,L-аргинина (BArpNA) аналогично [1,10].

Мы исследовали действие гамма-облучения на препараты ПК и некоторых панкреатических ферментов, а так же на их иммобилизованные формы. Полученные данные представлены в таблицах 1 - 4.

Таблица 1

Действие гамма-облучения в дозе 25 кГрей на ферментативную активность нативного ПК

Субстрат	$A\gamma/A_0$	Методика определения
Казеин	0,64±0,10	[1,7,8]
Азоколл	0,84 ±0,15	[1,7]
BzArgpNA	0,78±0,10	[1,10]
ВосAlaONp	0,76±0,06	[9]

Таблица 2

Действие гамма облучения в дозе 25 кГрей на ферментативные активности трипсина (Тр), коллитина (Кл) и панкреатической эластазы (Эл) [1]

Субстрат	$A\gamma/A_0$ Кл	$A\gamma/A_0$ Эл	$A\gamma/A_0$ Тр
Казеин	0,83±0,10	0,87±0,10	0,80±0,05
Азоколл	0,86±0,10	0,86±0,10	0,87±0,10
Денатурированный коллаген	0,89±0,10	—	—
BzArgpNA	0,87±0,10	0,88±0,12	0,84±0,10
BzArgOEt	0,78±0,15	—	0,84±0,15
BzTyrOEt	0,98±0,20	—	—
ВосAlaONp	0,83±0,15	0,79±0,10	—

Коллитин - смесь протеиназ поджелудочной железы свиньи

Накопленный обширный экспериментальный материал показал, что многие лекарственные препараты довольно устойчивы к действию стерилизующих доз ионизирующих излучений, особенно, если облучение их проводится в твердой фазе. В водных растворах более высокая радиочувствительность тех же веществ связана с инактивирующим действием продуктов радиолиза воды. В настоящее время достаточно подробно исследованы радиационно-химические превращения практически всех классов высокомолекулярных соединений. Для полимеров, использованных нами в качестве носителей при иммобилизации ферментов, известны следующие изменения под действием ионизирующих излучений. Общим эффектом радиолиза целлюлозы является падение

прочностных свойств, связанное с преимущественным протеканием процесса деструкции. Степень деструкции зависит от мощности дозы облучения. Эту зависимость можно объяснить тем, что с повышением мощности дозы концентрация короткоживущих свободных радикалов повышается и соответственно возрастает число случаев их рекомбинации за единицу времени. Свободные радикалы при облучении целлюлозы могут образовываться либо в результате дегидрогенизации и дегидроксилизации макромолекул, либо за счет их разрыва. Вид образующихся радикалов и скорость их рекомбинации зависят от присутствия в полимере воды [2,3].

Таблица 3

Действие гамма-облучения в дозе 25 кГр на ферментативную активность иммобилизованных форм ПК

№	Препарат	Субстрат	$A\gamma/A_0$	Метод
1	Ц (0,0155)-Хт-ПК	азоколл	0,58	[1,7]
		BArpNa	0,97	[1,10]
		Казеин	0,70	[1,7,8]
2	ДАЦ(0,56)-Хт-ПК	азоколл	0,64	[1,7]
		BArpNa	0,73	[1,10]
		казеин	0,68	[1,7,8]
3	ДАЦ(1,29)-Хт-ПК	азоколл	0,85	[1,7]
		BArpNa	0,46	[1,10]
		казеин	0,58	[1,7,8]

Таблица 4

Действие гамма-облучения в дозе 25 кГр на ферментативную активность иммобилизованных форм ПК

№	Препарат	Субстрат	$A\gamma/A_0$	Метод
1	ДАЦ(0,50)-Хт-ПК	азоколл	0,70	[1,7]
		ВАрNa	0,47	[1,10]
		казеин	0,52	[1,7,8]
2	ДАЦ(0,50)-Хт-Гл(5%)-ПК	азоколл	0,97	[1,7]
		ВАрNa	0,26	[1,10]
		казеин	0,56	[1,7,8]

За 100% принята ферментативная активность образцов до облучения.

— - измерения не проводились.

Результатом действия излучений на белки является повреждение первичной структуры, которое затем реализуется в виде изменения физико-химических или биологических свойств. Первичные процессы радиационных и фото-превращений белков включают на начальных стадиях реакции: перенос атома водорода и электрона, присоединение активных частиц, отрыв атомов водорода. Ферментативный катализ осуществляется в основном в результате электронных донорно-акцепторных и протонных донорно-акцепторных превращений, поэтому белки содержат большой набор остатков с ионными, полярными и неполярными группами. Наличие столь разнообразных группировок и полипептидной цепи приводит к тому, что белки способны реагировать практически со всеми активными частицами фотолиза и радиолита и являются начальными «ловушками» активных частиц. При ионизирующем излучении начальные повреждения могут затрагивать большое количество групп и, по-видимому, остатки алифатических аминокислот: аланина, валина, лейцина и изолейцина - модифицируются в наибольшей степени. Теоретически следовало бы считать, что разрыв хотя бы одной ковалентной связи в макромолекуле делает ее модифицированной, отличной по своим свойствам от нативных макромолекул. Однако, как правило, в случае такой «точечной» модификации не происходит сколько-нибудь значительных изменений ферментативной активности и других свойств белка. Немаловажную роль, кроме того, играет возможность накопления устойчивой глобулой большого числа повреждений без их видимых проявлений. Лишь прямая модификация активного центра фермента или центра связывания субстратов приводит к изменению каталитической активности [1,11,12].

При образовании комплексов белков с полисахаридами резко падает трансляционная и вращательная подвижность макромолекул и в то же время возрастает вероятность реакций внутри комплексов, в том числе и реакций передачи свободной валентности [11,12].

Радиационно-химические выходы образования свободных радикалов в порошкообразных белках составляют 3-5 радикал/100эВ при комнатной

температуре [1,12]. Механизм образования сшивок (радиационно-индуцированное связывание) белков с другими молекулами – как с низкомолекулярными, так и с полимерами, должен включать в себя конкурентные реакции образования свободных радикалов белка и второго компонента, реакции рекомбинации и диспропорционирования свободных радикалов, реакции радикалов с белком и вторым компонентом. В результате многочисленных первичных и вторичных процессов, протекающих в белках при облучении, происходит разрыв отдельных пептидных связей, образование внутри- и межмолекулярных сшивок, модификация аминокислотных остатков, появляются новые группы, выделяются низкомолекулярные вещества. Установлено, что при действии ионизирующего облучения в белках разрушаются многие, если не все, остатки аминокислот [12]. Действие излучения приводит к необратимой инактивации ферментов. Различные аминокислоты белков неравноценны для осуществления ими каталитических функций. В простейших случаях различают четыре группы аминокислотных остатков по степени важности их для ферментативного катализа [13]:

1 - группа «контактных» аминокислот, локализованных на расстоянии около 2Å от молекулы субстрата;

2 - группа «дополнительных» аминокислот, которые могут и не находиться в прямом контакте с субстратом, но определяют в какой-то мере свойства и структуру активного центра;

3 - группа «вспомогательных» аминокислот, не участвующих непосредственно в катализе, но образующих стабильный «каркас» активного центра; 4 - группа «вспомогательных» аминокислот, которые не принимают даже косвенного участие в катализе.

В работе [14] показано, что поскольку радиационно-химические превращения в облученных образцах протекают в течение длительного времени, возможно, изменение активности ферментсодержащих материалов при хранении. Исследования активности нативных и иммобилизованных разными способами ферментов, подвергнутых облучению стерилизующей дозой – 25 кГр, показали, что

отношения ПА облученных и необлученных образцов ферментов иммобилизованных на исследованных носителях в процессе хранения не меняется. Аналогичные данные получены и нами [1].

Маленко Олеся Эдуардовна студент кафедры биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева

Коротаева Алина Игоревна студент кафедры биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева

Белов Алексей Алексеевич д.т.н., доцент кафедры биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева

Фенин Анатолий Александрович к.х.н., ассистент кафедры химии высоких энергий и радиоэкологии РХТУ им. Д. И. Менделеева

Литература

8. Белов А.А. Текстильные материалы, содержащие иммобилизованные гидролазы для медицинских и косметологических целей. Получение. Свойства. Применение. - LAP LAMBERT: Acad. Pub., GmbH &Co. KG, Germany, 2012.- 242 с.
9. Филатов В.Н., Рыльцев В.В. Биологически активные текстильные материалы. - М.:Информэлектро, 2002. – 248 с.
10. *Роговин З.А.* Химия целлюлозы. - М.: Химия, 1972. - С.125-244.
11. Rutherford H.A., Minor F.W., Martin A.R. and Harris M. Oxidation of cellulose: the reaction of cellulose with periodic acid //J. of res. of the N. B. S.-1942. -Vol. 29. - P. 131-143.
12. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Anal. Chem. - 1959, Vol.31, №3.- P. 426- 428.
13. Кузнецов А.К., Захарова И.М. Лабораторный практикум по курсу «Физико-химия полимеров», ГОУ ВПО Ивановский гос. хим.-технол. ун-т, Иваново, 2007.- С.66-72.
14. *Белов А.А., Рыльцев В.В., Игнатюк Т.Е.* Методы определения протеолитической активности в промышленных образцах иммобилизованных протеиназ // Хим.-фармацевт. журн., 1992, №11-12.- С. 101-103.
15. *Kunitz M.* Crystalline soybean trypsin inhibitor //J. Gen. Physiol, 1947, vol. 30, №1, p.291-310.
16. Vesser L., Blout E.R. The use of p-nitrophenyl-N-tretbutyl-oxycarbonyl-L-alaninate as substrate for elastase // Biochem. Biophys. Acta. - 1972.- Vol.268. - № 1. - P. 257-260.
17. *Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W.* The preparation and properties of two new chromomeric substrates of trypsin //Arch. Biochem. Biophys.- 1961.- №2.- Vol.95- P. 271-278.
18. *Варфоломеев С.Д.* Химическая энзимология. - М.: Академия, 2005.- 472 с.
19. *Сапежинский И.И.* Биополимеры: кинетика радиационных и фотохимических превращений. - М.: Наука, 1988.- 215 с.
20. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. М.: Мир, 1983.- 1120 с.
21. *Юданова Т.Н.* Полимерные раневые покрытия с ферментативным и антимикробным действием: дис. ... д-ра хим. наук. - М., 2004.- 329 с.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, ГК 16.552.11.7046

Malenko Olesya Eduardovna, Korotaeva Alina Igorevna, Belov Alexey Alexeevich, Fenin Anatoliy Alexandrovich*

D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia.

*e-mail: ABelov2004@yandex.ru

THE INFLUENCE OF GAMMA-IRRADIATION IN STERILIZING DOSE ON IMMOBILIZED ENZYME PRODUCTS OF GEPATOPANKREASA CRAB

Abstract

Investigated the effect of gamma irradiation in sterilizing dose (25 кGRA) on proteolytic enzymes and their natural complexes. Set the damaging effect of gamma radiation on the biological activity of drugs studied. Immobilization of cellulose media (cellulose, dialdehydecellulose) and containing nesuderinama chitosan in its composition, does not protect against inactivating action of gamma-irradiation.

Key words: chitosan, gamma-irradiation, dialdehydecellulose, immobilization, glycerol.