

**Санкт-Петербургский политехнический университет  
Петра Великого  
Институт биомедицинских систем и биотехнологий**

На правах рукописи

**Плющенко Анна Викторовна**

**Супрамолекулярные комплексы химотрипсина с наночастицами биогенных  
элементов (селена и серебра)**

Направление подготовки 06.06.01 Биологические науки

---

*Код и наименование*

Направленность 06.06.01\_02 Биофизика

---

*Код и наименование*

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Автор работы: Плющенко А.В.  
Научный руководитель: проф., к.х.н.,  
Писарев О.А.

Санкт Петербург – 2019

Научно-квалификационная работа выполнена на кафедре «Медицинская физика» Института биомедицинских систем и биотехнологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Директор ИБСиТ:

*Власова Ольга Леонардовна  
д.ф.-м.н., доцент,  
зав.кафедрой.*

Научный руководитель:

*Писарев Олег Александрович,  
к.х.н., доцент., профессор*

Рецензент:

*Скорик Юрий Андреевич, к.х.н.,  
доцент., вед.н. сотр. ИВС РАН*

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

Общая характеристика работы.....	2
Содержание работы.....	7
Результаты и их обсуждение.....	8
Заключение.....	21
Список литературы.....	22
Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации).....	24

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы

Изучение процессов самоорганизации гибридных органо-неорганических наноконплексов, закономерностей формирования наночастиц нуль-валентных металлов и неметаллов, решение проблемы их стабилизации и получения частиц заданного размера являются фундаментальными задачами современной химии наноматериалов. Вместе с тем, создание наноконплексов, в которых каждая составляющая обеспечивает различную биологическую активность, представляет в настоящее время одно из наиболее актуальных направлений разработки новых лекарственных средств.

Актуальность предлагаемой работы определяется следующими обстоятельствами.

С одной стороны, актуальными являются решение задачи стабилизации наночастиц биогенных элементов ферментами, разработка методов синтеза гибридных супрамолекулярных наноконплексов, а также изучение их физико-химических и биологических свойств. Такие исследования очень актуальны для выяснения закономерностей образования наночастиц в присутствии биологически активных веществ [1, 2].

С другой стороны, применение нативных ферментов затруднено из-за их инактивации при изменении физико-химических условий среды (температура, pH, ионная сила и т.д.). Модифицированные препараты обладают рядом преимуществ по сравнению с нативными предшественниками. Однако, известные методы иммобилизации ферментов, использующие в качестве носителя полимеры, обладают общим недостатком. Полимерная матрица создаёт значительные стерические препятствия для диффузии субстрата к активному центру фермента, при этом достигаемое при иммобилизации на полимерах повышение стабильности фермента сопровождается значительным понижением его каталитической активности. Это обстоятельство сдерживает широкое применение иммобилизованных ферментов в практической медицине. Поэтому достаточно

перспективна разработка методов иммобилизации ферментов на наночастицах биогенных элементов [3-9]. Можно полагать, что резкое увеличение удельной поверхности наночастиц (в сравнении с известными носителями) должно приводить, с одной стороны, к реализации многоточечного прочного межмолекулярного взаимодействия фермента с наночастицей, с другой стороны – к улучшению кинетики адсорбции субстрата в активном центре фермента.

Кроме того, если осуществлять иммобилизацию ферментов на наночастицах, обладающих собственной биологической активностью, то появляется возможность совмещения различных полезных биологических свойств в одном супрамолекулярном органо-неорганическом комплексе. Очевидно, что такие исследования являются физико-химической основой для создания полифункциональных лекарственных средств с широким спектром действия.

### **Цель и задачи исследования**

Цель исследования состояла в разработке методов синтеза и исследовании физико-химических и биологических свойств супрамолекулярных гибридных органо-неорганических наноконплексов на основе протеолитического фермента химотрипсина (ХТ) и наночастиц биогенных элементов: селена (НЧ-Se) и серебра (НЧ-Ag).

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

1. Разработаны методы синтеза наноконплексов на основе ХТ и НЧ-Se и НЧ-Ag.
2. Исследованы спектральные и размерные свойства синтезированных наноконплексов.
3. Исследована ферментативная кинетика ХТ, иммобилизованного на НЧ-Se и НЧ-Ag, в сравнении с нативным ферментом.
4. Изучены бактерицидные свойства НЧ-Ag, стабилизированных ХТ.

### **Научная новизна**

Научная новизна выпускной квалификационной работы состоит в том, что в ней впервые изучены наноструктурированные гибридные формы протеолитического фермента ХТ. На основе этих исследований проведена оптимизация условий синтеза

супрамолекулярных комплексов фермента с НЧ-Se и НЧ-Ag, а также изучены их физико-химические и биологические свойства. В работе впервые:

1. Разработаны методы синтеза гибридных органо-неорганических наноконплексов на основе ХТ и биогенных НЧ-Se и НЧ-Ag.

2. Методами УФ- и видимой спектрофотометрии, динамического светорассеяния и просвечивающей электронной микроскопии изучены спектральные и размерные свойства синтезированных супрамолекулярных наноконплексов.

3. Изучена зависимость размерных характеристик НЧ-Ag от времени введения ХТ в реакционную смесь после начала реакции синтеза.

4. Показано, что иммобилизация ХТ на НЧ-Se приводила к повышению его протеолитической активности в сильно щелочной среде, а иммобилизация на НЧ-Ag – к повышению его протеолитической активности в кислой и сильно щелочной среде по сравнению с нативным ферментом.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результатом проведенных исследований является разработка основ направленного синтеза новых биоматериалов с использованием наноразмерных молекулярных систем: агрегативно стабильных супрамолекулярных комплексов ХТ с наночастицами биогенных элементов. Синтезированные супрамолекулярные комплексы на основе ХТ и НЧ-Ag являются основой для получения раневого покрытия, обладающего как бактерицидной, так и протеолитической активностью, для гидролиза некротизированных тканей и уменьшения вязкости раневого отделяемого.

### **Апробация работы**

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на следующих конференциях: конференция с международным участием «Неделя науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2010, 2011, 2012, 2015, 2016, 2017, 2018); Четвертый и Шестой Всероссийский форум студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах» (Санкт-Петербург, 2010, 2012); Вторая Всероссийская молодежная научно-техническая конференция с международным

участием «Инновации в материаловедении» (Москва, 2015); Международный симпозиум «Химия для биологии, медицины, экологии и сельского хозяйства» ISCHEM 2015 (Санкт-Петербург, 2015); VI Международная конференция с элементами научной школы для молодежи "Функциональные материалы и высокочистые вещества" (Суздаль, 2016); 12-я и 14-я Международная Санкт-Петербургская конференция молодых ученых "Современные проблемы науки о полимерах" (Санкт-Петербург, 2016, 2018); 9-ый Международный Симпозиум «Молекулярная подвижность и порядок в полимерных системах» (Санкт-Петербург, 2017).

### **Публикации**

По результатам научно-квалификационной работы опубликовано 25 научных работ, в том числе 6 статей, входящих в перечень ВАК, а также 19 статей, из них 18 по материалам конференций в изданиях, не вошедших в перечень ВАК.

### **Представление научного доклада: основные положения**

В результате исследования были сформулированы следующие основные положения:

1. Синтез стабильных НЧ-Se в присутствии ХТ осуществлялся только в кислой среде (рН 2.8–3.5), когда ХТ обладал «развернутой» конформацией и для межмолекулярного взаимодействия с НЧ-Se были доступны гидрофобные домены молекулы белка.

2. НЧ-Se, стабилизированные ХТ, представляли собой сферические наночастицы со средним диаметром ~ 45 нм в диапазоне от ~ 5 до ~ 91 нм.

3. Исследование влияния рН на агрегативную стабильность синтезированных наноконплексов показало, что наноконплексы Se-ХТ стабильны в кислой (рН 2.8–3.7) и щелочной рН (7.1–10.5) средах. Значения рН, при которых наблюдалось полное фазовое разделение системы, находились в интервале рН от 3.7–4.0 до 6.5–7.0. Показан электростерический характер стабилизации НЧ-Se.

4. Имобилизации ХТ на НЧ-Se приводила к сдвигу оптимума рН протеолитической активности фермента в щелочную область. При рН 11.0 ферментативная реакция гидролиза белкового субстрата в присутствии

иммобилизованного фермента осуществлялась быстрее, чем нативного. Повышение содержания Se в наноконплексе также приводило к ускорению ферментативной реакции гидролиза и повышению протеолитической активности фермента.

5. Варьирование времени введения ХТ в реакцию синтеза НЧ-Ag позволяло регулировать размерные характеристики наночастиц и наноконплексов.

6. Окислительно-восстановительная реакция синтеза и формирование НЧ-Ag завершались в течение 1 часа. Средний гидродинамический радиус наноконплексов, полученных путем введения ХТ через 1 час после начала реакции синтеза, составлял  $\sim 30$  нм.

7. НЧ-Ag в составе наноконплексов, полученных путем введения ХТ через 1 час после начала реакции синтеза, представляли собой квазисферические частицы со средним диаметром  $\sim 8$  нм в диапазоне от  $\sim 2$  до  $\sim 40$  нм, а значение диаметра НЧ-Ag, полученных при введении ХТ одновременно с другими реагентами, не превышало 5 нм.

8. Агрегативная стабильность наноконплексов Ag-ХТ в диапазоне рН от 3.0 до 12.0 сохранялась в течение по меньшей мере одного месяца.

9. В сравнении с нативным ферментом иммобилизация ХТ на НЧ-Ag приводила к повышению его протеолитической активности в кислой (рН 6.0) и сильно щелочной (рН 11.0) средах. При этом наибольшую активность в этих условиях проявлял наноконплекс, полученный путем введения ХТ через 1 час после начала реакции синтеза НЧ-Ag.

10. Минимальная концентрация препарата НЧ-Ag, стабилизированных ХТ, при которой наблюдалось подавление роста микроорганизмов, составляла 0.1 мг/мл.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработаны методы синтеза супрамолекулярных наноконплексов на основе химотрипсина (ХТ) и наночастиц (НЧ) биогенных элементов (Se и Ag). Методами УФ- и видимой спектрофотометрии, динамического светорассеяния и просвечивающей электронной микроскопии изучены спектральные и размерные свойства синтезированных наноконплексов. Исследована агрегативная стабильность наноконплексов в широком диапазоне рН среды и определены рН интервалы для их практического использования. Изучена зависимость размерных характеристик НЧ-Ag от времени введения ХТ в реакционную смесь после начала реакции синтеза. Исследована протеолитическая активность ХТ, иммобилизованного на НЧ-Se и НЧ-Ag, при рН 6.0, 8.0 и 11.0. Показано, что в сравнении с нативным ферментом иммобилизация ХТ на НЧ-Se приводила к сдвигу оптимума рН протеолитической активности фермента в сильно щелочную область, а иммобилизация ХТ на НЧ-Ag – к повышению его протеолитической активности в кислой и сильно щелочной средах. Определена минимальная концентрация НЧ-Ag, стабилизированных ХТ (0.01 масс. %), при которой наблюдалось подавление роста микроорганизмов.

### **Объекты, (предмет) и методы исследования**

**Объектом** исследования выпускной квалификационной работы аспиранта являлись супрамолекулярные органо-неорганические комплексы ХТ с наночастицами биогенных элементов (Se и Ag).

**Предметом** исследования выпускной квалификационной работы являлись особенности формирования, а также спектральные, размерные, протеолитические и бактерицидные свойства наноконплексов на основе ХТ и НЧ-Se и НЧ-Ag.

При выполнении выпускной квалификационной работы применялись следующие **методы**: УФ- и видимая спектрофотометрия, динамическое рассеяние света, просвечивающая электронная микроскопия, рН-метрия, методы исследования ферментативной и бактерицидной активности наноконплексов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Синтез наноконплексов Se-ХТ*

Агрегативно стабильные наноконплексы на основе ХТ и НЧ-Se (Se-ХТ) были синтезированы путём проведения реакции восстановления селенистой кислоты аскорбиновой кислотой в кислой водной среде (рН 2.8–3.5) при 20<sup>0</sup>С и атмосферном давлении. Показано, что при этих условиях проведения реакции восстановления ХТ являлся эффективным стабилизатором НЧ-Se в растворе. При проведении реакции восстановления селенистой кислоты в щелочной среде (рН 9.0-10.5) с использованием 2-меркаптоэтанола в качестве восстановителя стабилизации НЧ-Se ферментом не наблюдалось и наночастицы выпадали в осадок. Таким образом, синтез агрегативно стабильных НЧ-Se в присутствии ХТ в реакционной смеси осуществлялся только в кислой среде, когда ХТ обладал «развернутой» конформацией и для межмолекулярного взаимодействия с НЧ-Se были доступны гидрофобные домены молекулы белка [10].

Введение ХТ в качестве стабилизатора в реакцию образования НЧ-Se при кислых значениях рН также способствовало росту константы скорости образования наноконплексов (рис. 1).

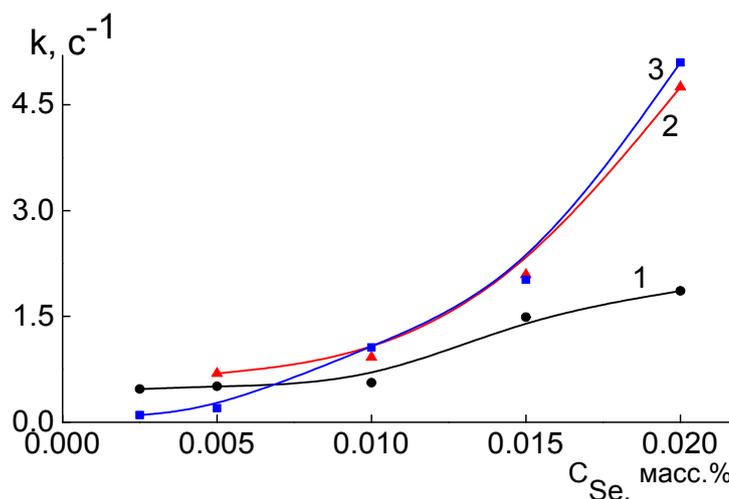


Рис. 1. Зависимости константы скорости реакции образования красного аморфного Se без ХТ (1) и в присутствии 0.1 масс. % (2) и 0.01 масс. % ХТ (3).

*Спектральные и размерные характеристики наноконплексов Se-ХТ*

На рис. 2 представлены оптические спектры поглощения для ХТ, НЧ-Se и наноконплексов Se-ХТ ( $C_{Se} = C_{ХТ} = 0.01$  масс. %,  $\nu = C_{Se}/C_{ХТ}$ ). Максимум оптической плотности наноконплексов соответствовал  $\lambda = 270$  нм, а нативного ХТ – 280 нм. Таким образом, гипсохромный сдвиг максимума поглощения ХТ свидетельствовал об образовании наноконплекса. Агрегативная стабильность синтезированных наноконплексов сохранялась в течение по меньшей мере одного месяца.

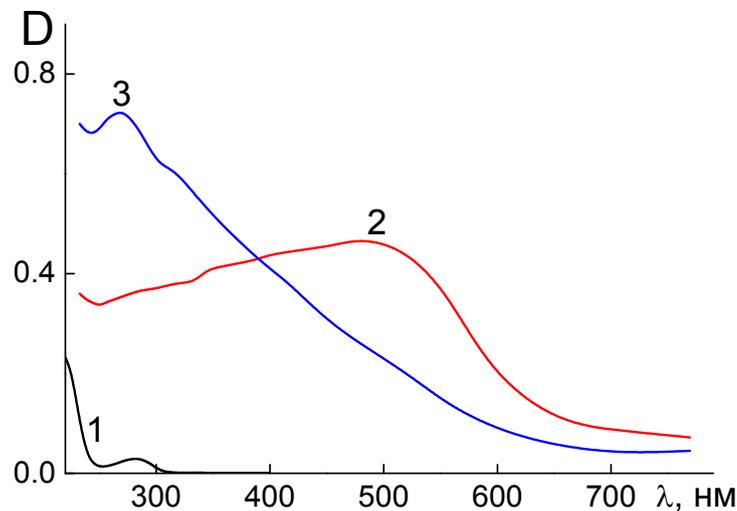


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от длины волны для ХТ (1), НЧ-Se (2) и наноконплексов Se-ХТ (3)

Размерные свойства синтезированных наночастиц были изучены методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Согласно ПЭМ-изображению (рис. 3), НЧ-Se в составе наноконплексов Se-ХТ представляли собой квазисферические частицы, изолированные друг от друга.

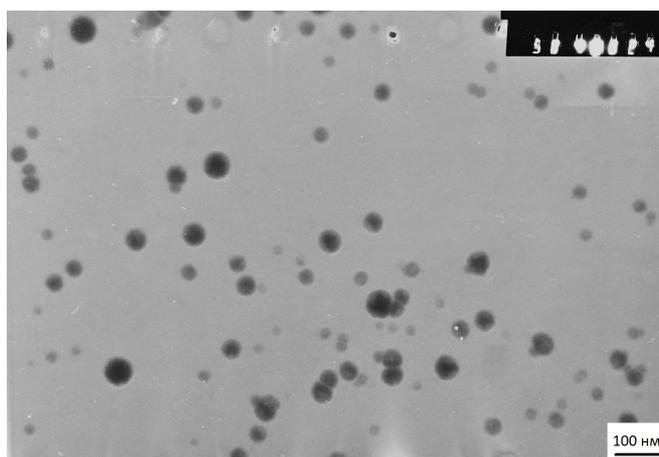


Рис. 3. ПЭМ изображение НЧ-Se составе наноконплексов Se-ХТ ( $\nu = 1$ )

На рис. 4 представлена гистограмма распределения по размерам НЧ-Se, стабилизированных ХТ. Она получена в результате обработки ПЭМ-изображения при помощи программы ImageJ 1.51j8. Диаметр НЧ-Se изменялся в пределах от  $\sim 5$  до  $\sim 91$  нм, при этом среднее значение диаметра наночастиц составляло  $45 \pm 4$  нм.

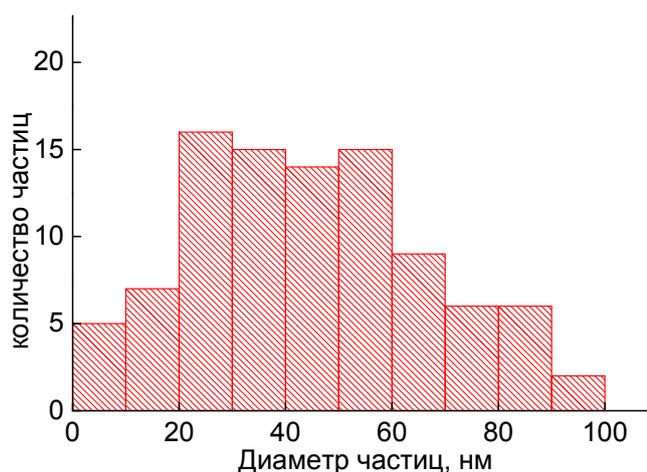


Рис. 4. Гистограмма распределения по размерам НЧ-Se, стабилизированных ХТ ( $\nu = 1$ ), полученная в результате обработки ПЭМ-изображения в программе ImageJ 1.51j8

*Влияние pH и концентрационного соотношения наночастица-фермент на агрегативную стабильность наноконплексов Se-ХТ*

Было исследовано влияние pH на агрегативную стабильность наноконплексов Se-ХТ, синтезированных в кислой среде (pH 2.8–3.5) при различном содержании Se в наноконплексе. Концентрация ХТ поддерживалась постоянной ( $C_{ХТ} = 0.01$  масс.%), а концентрация Se варьировалась. Величина параметра  $\nu = C_{Se}/C_{ХТ}$  изменялась в

пределах от 0.5 до 10.0. Значение рН среды изменялось путём добавления в растворы наноконплексов различного количества 1 н NaOH.

Синтезированные наноконплексы сохраняли агрегативную стабильность в кислой (рН 2.8–3.75) и щелочной (рН 7.1–10.5) средах. Значения рН, при которых наблюдалось полное фазовое разделение системы, находились в интервале рН от 3.75–4.0 до 6.5–7.0. Следует отметить, что рН интервалы областей фазового разделения системы практически не зависели от содержания Se в наноконплексе, и только при высоких концентрациях Se ( $v = 8$  и  $v = 10$ ) появлялась дополнительная область полного фазового разделения системы при рН  $> 11.0$ . Можно полагать, что при сохранении постоянства  $C_{ХТ}$  увеличение концентрации Se до  $v = 8$  и  $v = 10$  приводило к недостаточной «плотности» упаковки молекул ХТ на НЧ-Se. Взаимодействие «незакрытых» молекулами ХТ участков НЧ-Se приводило к их агрегации и фазовому разделению системы.

#### *Протеолитическая активность ХТ, иммобилизованного на НЧ-Se*

В экспериментах по исследованию протеолитической активности ХТ, иммобилизованного на НЧ-Se,  $C_{ХТ}$  составляла 2 мг/мл, а  $C_{Se} = 0.2$  мг/мл ( $v = 0.1$ ) и 2 мг/мл ( $v = 1$ ). Исследования проводились при значениях рН, равных 6.0, 8.0 и 11.0.

В табл. 1 представлены значения удельных протеолитических активностей для нативного ХТ и наноконплексов Se-ХТ при рН 6.0, 8.0 и 11.0.

Таблица 1

Влияние рН на удельную протеолитическую активность нативного ХТ и наноконплексов Se-ХТ

Исследованный образец	$A_{удел.}, \text{Ед.} \times \text{мг}^{-1}$		
	рН 6.0	рН 8.0	рН 11.0
ХТ	<b>0.88</b>	<b>3.22</b>	1.76
Se-ХТ ( $v = 1$ )	0.58	2.27	<b>4.05</b>
Se-ХТ ( $v = 0.1$ )	0.76	2.61	2.69

Как видно из табл. 1, при рН 6.0 и 8.0 наибольшую протеолитическую активность проявлял нативный ХТ. Так, при рН 8.0 удельная активность нативного ХТ превышала эту величину для наноконплексов Se-ХТ ( $v = 1$ ) и Se-ХТ ( $v = 0.1$ ) на

~29% и ~19%, а при pH 6.0 – на ~34% и ~14%, соответственно. Однако, при 11.0 максимальной активностью обладал наноконкомплекс Se-ХТ ( $\nu = 1$ ). Удельная активность этого наноконкомплекса превышала соответствующую величину для нативного ХТ и наноконкомплекса Se-ХТ ( $\nu = 0.1$ ) на ~57% и ~34%, соответственно.

Была изучена также кинетика накопления продукта ферментативной реакции для нативного и иммобилизованного ферментов (рис. 5).

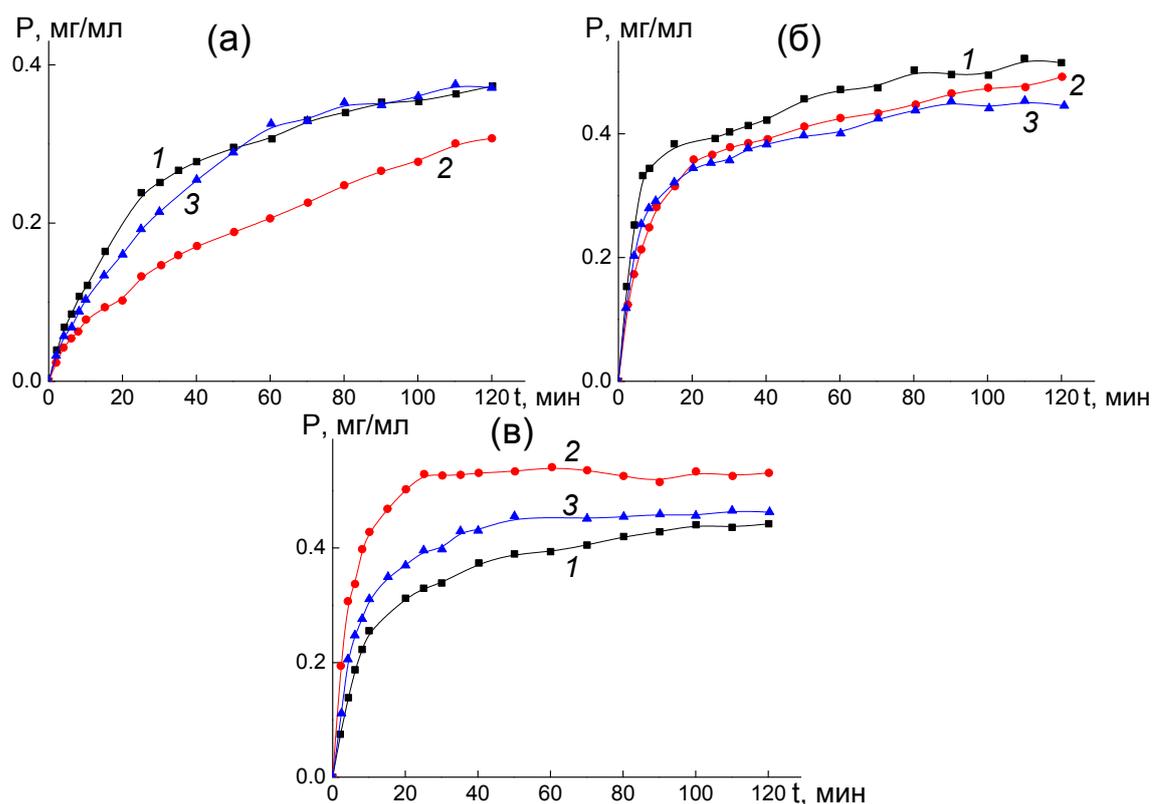


Рис. 5. Влияние концентрации Se на кинетику накопления продукта ферментативной реакции для наноконкомплексов Se-ХТ (в сравнении с нативным ХТ) при pH 6.0 (а), pH 8.0 (б) и pH 11.0 (в): 1 – ХТ; 2 – Se-ХТ ( $\nu = 1$ ); 3 – Se-ХТ ( $\nu = 0.1$ )

В случае нативного фермента конечное содержание продукта реакции гидролиза субстрата превышало эту величину для наноконкомплекса Se-ХТ ( $\nu = 1$ ) при pH 8.0 на ~4%, а при pH 6.0 – на ~18%. В случае использования наноконкомплекса Se-ХТ ( $\nu = 0.1$ ) при pH 8.0 наблюдалось снижение величины конечного содержания продукта реакции гидролиза в сравнении с нативным ХТ на ~13%, а при pH 6.0 – данные величины практически совпадали. Следовательно, иммобилизация ХТ на НЧ-Se не приводила к значительному снижению его протеолитической активности при pH 6.0 и 8.0.

В сравнении с нативным ХТ при рН 11.0 использование наноконплексов приводило к повышению как удельной активности, так и конечного содержания продукта реакции гидролиза. При этом наибольшую протеолитическую активность проявлял наноконплекс Se-ХТ ( $v = 1$ ). Так, конечное содержание продукта реакции для наноконплекса Se-ХТ ( $v = 1$ ) превышало это значение при рН 11.0 для нативного ХТ на ~17%. Для наноконплекса Se-ХТ ( $v = 0.1$ ) эта величина составляла ~13%. При этом повышение удельной активности наноконплексов Se-ХТ ( $v = 1$ ) и Se-ХТ ( $v = 0.1$ ) на начальном этапе реакции на ~60% и ~13%, соответственно, в сравнении с нативным ХТ приводило к тому, что максимальное количество продукта реакции наблюдалось после ~25 мин гидролиза казеината натрия наноконплексом Se-ХТ ( $v = 1$ ), после ~50 мин – наноконплексом Se-ХТ ( $v = 0.1$ ), и после ~80 мин – нативным ХТ. Следовательно, в сравнении с нативным ферментом, иммобилизованный на НЧ-Se ХТ при рН 11.0 действовал более эффективно. Об этом свидетельствовало как увеличение удельной протеолитической активности фермента, так и конечного содержания продукта реакции гидролиза. Кроме того, повышение содержания Se в наноконплексе приводило к ускорению ферментативной реакции и повышению протеолитической активности иммобилизованного фермента рН 11.0.

Таким образом, иммобилизации ХТ на НЧ-Se приводила к сдвигу оптимума рН протеолитической активности фермента в щелочную область. В сравнении с нативным ХТ при рН 11.0 ферментативная реакция гидролиза белкового субстрата в присутствии иммобилизованного фермента осуществлялась быстрее. Повышение содержания Se в наноконплексе также приводило к ускорению ферментативной реакции гидролиза и повышению протеолитической активности фермента.

#### *Синтез наноконплексов Ag-ХТ*

Синтез агрегативно стабильных наноконплексов ХТ с НЧ-Ag (Ag-ХТ) был осуществлен путём введения ХТ в реакцию синтеза НЧ-Ag. Для приготовления растворов наноконплексов с концентрацией Ag ( $C_{Ag}$ ) 0.005 масс.% и концентрацией ХТ ( $C_{ХТ}$ ) 0.1 масс.% в реакционную колбу помещалось 0.5 мл 0.1575 масс.%  $AgNO_3$ , 0.2 мл 2.1 масс.%  $NaBH_4$ , 1 мл 1.0 масс.% ХТ и 8.3 мл дистиллированной воды. ХТ

добавляли в реакционную среду как одновременно с другими реагентами ((метод синтеза I, наноконкомплекс Ag-ХТ-I), так и через заданный промежуток времени после начала реакции синтеза (метод синтеза II, наноконкомплекс Ag-ХТ-II).

*Спектральные и размерные характеристики наноконкомплексов Ag-ХТ-I*

На рис. 6 представлены спектры поглощения нативного ХТ, нестабилизированных НЧ-Ag и наноконкомплексов Ag-ХТ-I. Максимум поглощения нативного ХТ соответствовал  $\lambda=280$  нм, а пик поверхностного плазмонного резонанса (ППР) нестабилизированных НЧ-Ag находился в области  $\lambda=400$  нм. Спектры оптического поглощения наноконкомплексов Ag-ХТ-I характеризовались двумя пиками поглощения: первый (при  $\lambda=275$  нм) соответствовал максимуму поглощения ХТ, а второй (при  $\lambda \sim 420$  нм) соответствовал ППР НЧ-Ag, стабилизированных ХТ. Таким образом, наблюдался гипсохромный сдвиг пика поглощения ХТ на  $\sim 5$  нм (максимум поглощения нативного ХТ соответствует 280 нм) и батохромный сдвиг полосы ППР НЧ-Ag на  $\sim 15-20$  нм. Это свидетельствовало об образовании наноконкомплексов Ag-ХТ.

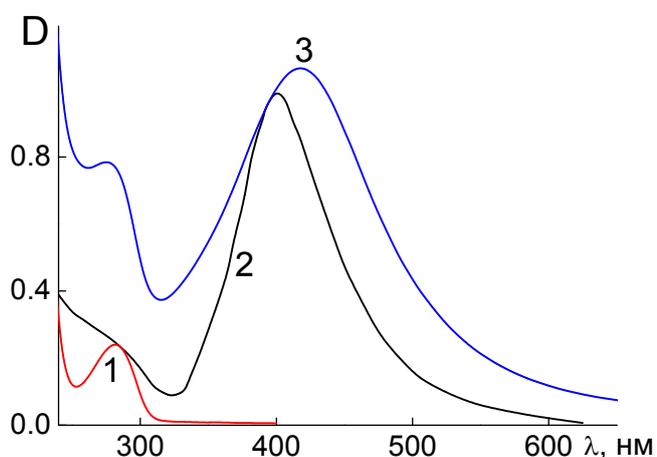


Рис. 6. Спектры оптического поглощения ХТ (1), нестабилизированных НЧ-Ag (2) и наноконкомплексов Ag-ХТ-I (3)

Согласно данным ПЭМ, основная часть НЧ-Ag в составе наноконкомплексов Ag-ХТ-I представляла собой частицы с диаметром до 5 нм (рис. 7), количество частиц с диаметром более 10 нм было незначительным.

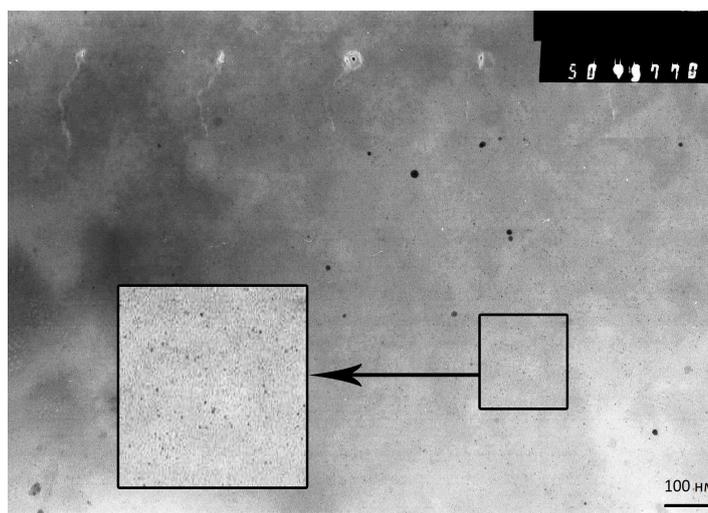


Рис. 7. ПЭМ-изображение НЧ-Аг в составе наноконплексов Аг-ХТ-I

Таким образом, при разработанном методе синтеза ХТ стабилизировал НЧ-Аг, препятствуя их агрегации и осаждению.

#### *Влияние рН на агрегативную стабильность наноконплексов Аг-ХТ-I*

Для исследования влияния рН среды на агрегативную стабильность наноконплексов Аг-ХТ-I растворы наноконплексов, полученные в результате синтеза, доводили до рН 3.0 -12.0 при помощи универсального буферного раствора. Во всем исследованном диапазоне рН выпадение осадка не наблюдалось, система сохраняла агрегативную стабильность в течение по меньшей мере одного месяца. При этом форма спектров поглощения и положение ППР сохранялись. Таким образом, ХТ, образуя комплексы с НЧ-Аг, препятствовал их агрегации.

#### *Спектральные и размерные характеристики наноконплексов Аг-ХТ-II*

Для синтеза наноконплексов Аг-ХТ-II ХТ добавляли в реакционную среду синтеза НЧ-Аг через определённые промежутки времени после начала реакции. На рис. 8 представлены спектры поглощения наноконплексов Аг-ХТ-II. Пик ППР НЧ-Аг в наноконплексах соответствовал  $\lambda=405$  нм независимо от времени добавления ХТ в реакционную среду после начала реакции.

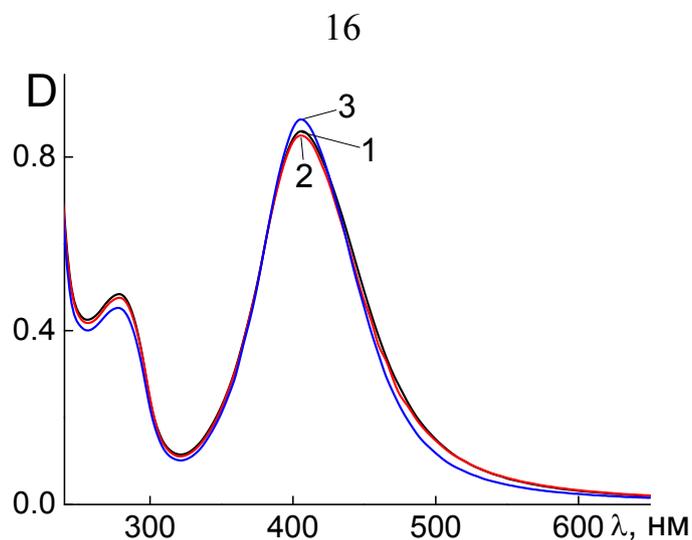


Рис. 8. Спектры поглощения наноконплексов Ag-ХТ-II. ХТ был добавлен в реакционную среду через 30 мин (1), 1 час (2) и 4 часа (3) после начала реакции синтеза

На рис. 9 представлена зависимость среднего гидродинамического радиуса (измеренного методом динамического рассеяния света, ДРС) наноконплексов Ag-ХТ-II от времени введения ХТ в реакционную смесь после начала реакции синтеза НЧ-Ag. Увеличение продолжительности реакции синтеза НЧ-Ag в отсутствие ХТ от 5 мин до 1 часа приводило к постепенному увеличению размеров наноконплексов Ag-ХТ-II. По-видимому, введение ХТ в реакционную смесь в этот промежуток времени, когда окислительно-восстановительная реакция не завершена, приводило к стабилизации не полностью сформировавшихся НЧ-Ag. Дальнейшее увеличение продолжительности реакции синтеза НЧ-Ag до добавления ХТ (более 1 часа) не приводило к значительному изменению размеров образующихся наноконплексов. Значение среднего гидродинамического радиуса составляло  $\sim 30$  нм. Таким образом, окислительно-восстановительная реакция синтеза и формирование НЧ-Ag завершались в течение 1 часа. В связи с этим введение стабилизатора через 1 час после начала реакции синтеза представляется оптимальным.

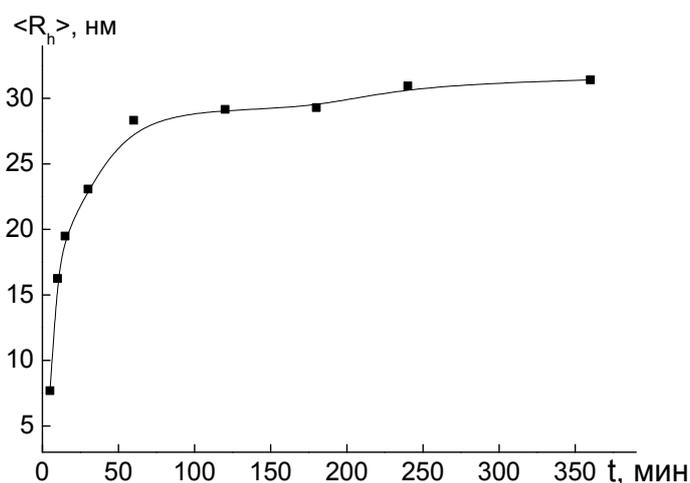


Рис. 9. Зависимость среднего гидродинамического радиуса наноконплексов Ag-ХТ-II от времени введения ХТ в реакцию смесь после начала реакции синтеза НЧ-Ag

Показано, что размеры сформировавшихся в первые сутки наноконплексов сохранялись в течение по меньшей мере одного месяца.

Исследование ПЭМ-изображений НЧ-Ag, стабилизированных ХТ, позволило определить их морфологические и размерные характеристики (рис. 10). НЧ-Ag представляли собой квазисферические частицы, равномерно распределенные по поверхности подложки и изолированные друг от друга.

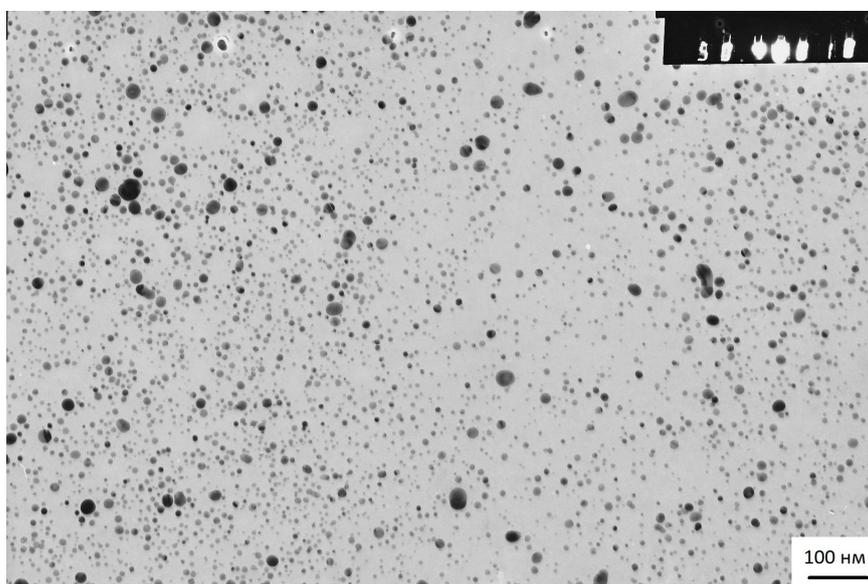


Рис. 10. ПЭМ-изображение НЧ-Ag, стабилизированных ХТ. ХТ был добавлен в реакцию среду через 1 час после начала реакции синтеза

На рис.11 представлена гистограмма распределения по размерам НЧ-Ag, полученная в результате обработки ПЭМ-изображения в программе ImageJ 1.51j8.

Анализ полученной гистограммы позволил установить, что диаметр НЧ-Ag изменялся от  $\sim 2$  до  $\sim 40$  нм, а его среднее значение составляло  $8 \pm 1$  нм.

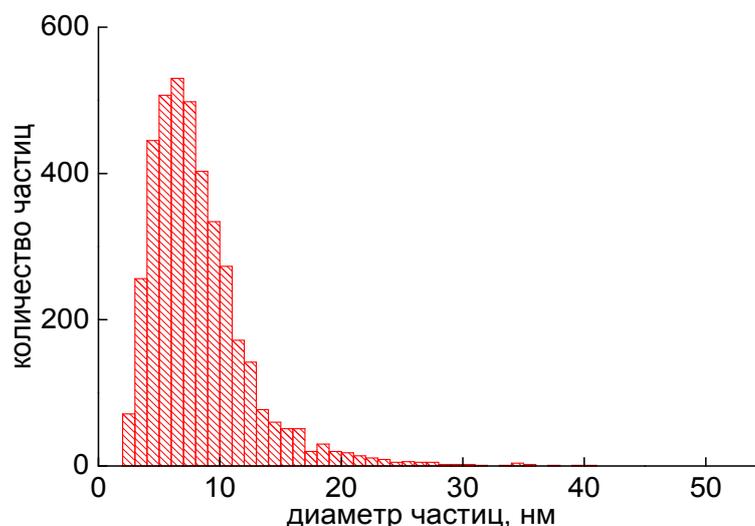


Рис. 11. Гистограмма распределения по размерам НЧ-Ag, полученная в результате обработки ПЭМ-изображения в программе ImageJ 1.51j8

#### *Протеолитическая активность ХТ, иммобилизованного на НЧ-Ag*

В экспериментах по исследованию протеолитической активности ХТ, иммобилизованного на НЧ-Ag, концентрация ХТ ( $C_{ХТ}$ ) составляла 2 мг/мл, а Ag ( $C_{Ag}$ ) – 0.1 мг/мл. Была исследована протеолитическая активность наноконплексов Ag-ХТ-I и наноконплексов Ag-ХТ-II, которые были получены путём введения ХТ в реакцию синтеза НЧ-Ag через 1 час после начала реакции. В табл. 2 представлены значения удельных протеолитических активностей для нативного ХТ и наноконплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II при pH 6.0, 8.0 и 11.0.

Таблица 2

Влияние pH на удельную протеолитическую активность нативного ХТ и наноконплексов Ag-ХТ

Исследованный образец	$A_{удел.}, \text{Ед.} \times \text{мг}^{-1}$		
	pH 6.0	pH 8.0	pH 11.0
ХТ	2.40	<b>3.45</b>	1.62
Ag-ХТ-I	2.22	2.87	1.43
Ag-ХТ-II	<b>2.87</b>	2.73	<b>2.42</b>

Из табл. 2 следует, что при рН 8.0 наибольшую протеолитическую активность проявлял нативный ХТ ( $3.45 \text{ Ед.} \times \text{мг}^{-1}$ ), превышая удельную активность наноконплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II на  $\sim 17\%$  и  $\sim 21\%$ , соответственно. Однако, при рН 6.0 и 11.0 наибольшей активностью обладал наноконплекс Ag-ХТ-II. Так, его удельная активность превышала соответствующую величину для ХТ и наноконплекса Ag-ХТ-I при рН 6.0 на  $\sim 17\%$  и  $\sim 25\%$ , соответственно, а при рН 11.0 – на  $\sim 33\%$  и  $\sim 41\%$ , соответственно.

Для получения целостной картины исследуемых процессов была изучена кинетика накопления продукта ферментативной реакции для нативного и иммобилизованных ферментов (рис. 12).

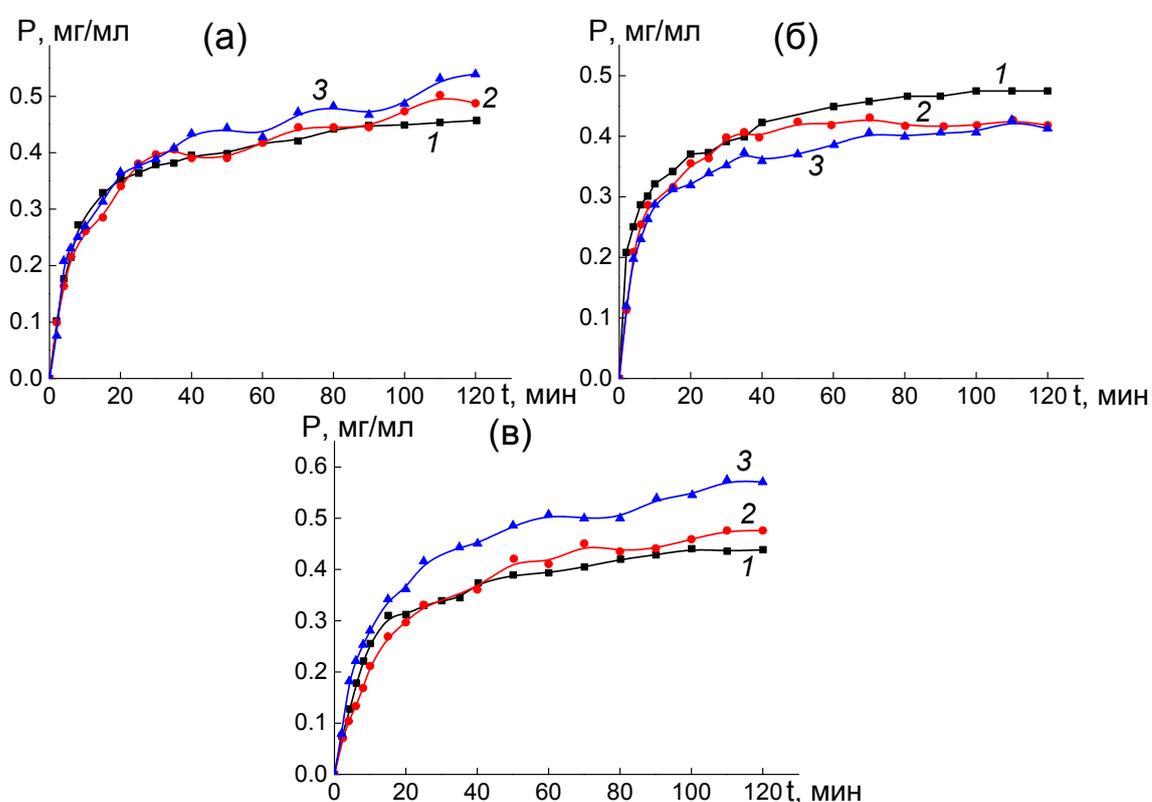


Рис. 12. Влияние способа синтеза наноконплексов Ag-ХТ на кинетику накопления продукта ферментативной реакции для наноконплексов Ag-ХТ (в сравнении с нативным ХТ) при рН 6.0 (а), рН 8.0 (б) и рН 11.0 (в): 1 – ХТ; 2 – Ag-ХТ-I; 3 – Ag-ХТ-II

При рН 8.0 конечное содержание продукта реакции гидролиза субстрата при использовании нативного фермента превышало эту величину для наноконплексов на  $\sim 13\%$  вне зависимости от метода синтеза. Следовательно, иммобилизация ХТ на наночастицах Ag не приводила к значительному снижению его ферментативной активности при рН 8.0. При этом максимальное количество



S. aureus		+	+	-	+	+	-
K. pneumoniae		+	+	-	+	+	-
P. aeruginosa		+	+	-	+	+	-
E. faecalis		+	-	-	+	+	-
E. coli		+	+	-	+	+	-

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны методы синтеза наноконплексов на основе ХТ и НЧ-Se, а также ХТ и НЧ-Ag. Установлено, что стабилизация НЧ-Se ХТ осуществляется только в кислой среде, когда ХТ обладает «развернутой» конформацией и для межмолекулярного взаимодействия с НЧ-Se доступны гидрофобные домены молекулы белка. Введение ХТ в качестве стабилизатора в реакцию образования НЧ-Se приводило к увеличению константы скорости их образования. Методом ПЭМ показано, что НЧ-Se, стабилизированные ХТ, представляли собой квазисферические частицы со средним диаметром  $\sim 45$  нм. Для наноконплексов с различным содержанием Se определены интервалы рН, в которых наноконплексы Se-ХТ сохраняли агрегативную стабильность. Показано, что при иммобилизации ХТ на НЧ-Se наблюдался сдвиг оптимума рН протеолитической активности фермента в сильно щелочную область. При этом повышение содержания Se в наноконплексе приводило к ускорению ферментативной реакции гидролиза и повышению протеолитической активности фермента.

Исследование наноконплексов ХТ с НЧ-Ag показало, что изменение времени введения ХТ в реакцию синтеза НЧ-Ag позволяет регулировать размерные характеристики наночастиц и наноконплексов. Установлено, что окислительно-восстановительная реакция синтеза и формирования НЧ-Ag завершались в течение 1 часа. Средний гидродинамический радиус наноконплексов, полученных путем введения ХТ через 1 час после начала реакции синтеза, составлял  $\sim 30$  нм. При этом размеры сформировавшихся в первые сутки наноконплексов сохранялись в течение

по меньшей мере одного месяца. Методом ПЭМ показано, что НЧ-Ag в составе таких наноконплексов представляли собой квазисферические частицы со средним диаметром  $\sim 8$  нм. Установлено, что иммобилизация ХТ на НЧ-Ag приводила к повышению его протеолитической активности в кислой и сильно щелочной средах, т.е. в неоптимальных условиях для функционирования нативного фермента. Исследование бактерицидных свойств НЧ-Ag, стабилизированных ХТ, показало, что минимальная концентрация препарата НЧ-Ag, при которой наблюдалось подавление роста исследованных микроорганизмов, составляла 0.1 мг/мл.

Полученные результаты являются физико-химической основой для создания новых полифункциональных лекарственных препаратов с широким спектром действия.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A Review of Stabilized Silver Nanoparticles – Synthesis, Biological Properties, Characterization, and Potential Areas of Applications / B. Zewde [et al] // JSM Nanotechnol. Nanomed. – 2016. – V. 4, № 2. – P. 1043-1056.
2. Ravindran, A. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects / A. Ravindran, P. Chandran, S. S. Khan // Colloids Surf. B. Biointerfaces. – 2013. – V. 105. – P. 342-352.
3. Algar, W. R. Small Surface, Big Effects, and Big Challenges: Toward Understanding Enzymatic Activity at the Inorganic Nanoparticle-Substrate Interface / W. R. Algar, T. Jeen, M. Massey, W. J. Peveler, J. Asselin // Langmuir. – 2019. – V. 35. – P. 7067-7091.
4. Arsalan, A. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles / A. Arsalan, H. Younus // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – V. 118, Pt B. – P. 1833-1847.
5. A two-enzyme immobilization approach using carbon nanotubes/silica as support / K. Du [et al] // Biotechnol. Prog. – 2015. – V. 31, № 1. – P. 42-47.
6. Enzyme immobilisation on amino-functionalised multi-walled carbon nanotubes: structural and biocatalytic characterisation [Электронный ресурс] / M. L. Verma [et al] //

PLOS One. – 2013. – V. 8, № 9. – 73642. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073642>.

7. Ansari, S. A. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review / S. A. Ansari, Q. Husain // *Biotechnol. Adv.* – 2012. – V. 30, № 3. – P. 512-523.

8. Enzyme immobilisation on amino-functionalised multi-walled carbon nanotubes: structural and biocatalytic characterisation [Электронный ресурс] / M. L. Verma [et al] // PLOS One. – 2013. – V. 8, № 9. – 73642. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073642>.

9. Saifuddin, N. Carbon nanotubes: a review on structure and their interaction with proteins [Электронный ресурс] / N. Saifuddin, A. Z. Raziah, A. R. Junizah // *J. Chem.* – 2013. – V. 2013. – 676815. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/676815>.

10. Березин, И. В. Практический курс химической и ферментативной кинетики / И. В. Березин, А. А. Клесов. – Москва : МГУ, 1976. – 320 с.

**Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной  
работы (диссертации)**

**Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК**

1. Боровикова Л.Н. Стабилизация наночастиц селена химотрипсином: влияние рН и концентрационного соотношения наночастица–фермент на стабильность наноконплексов / Л.Н. Боровикова, А.В. Титова (Плющенко), Н.А. Матвеева, О.А. Писарев // Журн.Физ. Химии. – 2013. – Т.87. – №6. – С.1008-1011.
2. Боровикова Л.Н. Влияние температуры синтеза на спектральные и размерные характеристики наноконплексов селен-химотрипсин / Л.Н. Боровикова, А.В. Титова (Плющенко), А.И. Киппер, О.А. Писарев // Журн.Физ.Химии. – 2015. – Т.89. – №.3. – С.467-469.
3. Писарев О.А. Иммобилизация химотрипсина на наночастицах серебра / О.А. Писарев, А.В. Титова (Плющенко), Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер, Т.М. Ворошилова, Е.Ф. Панарин // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2016. – № 3. – С. 790-793.
4. Плющенко А.В. Протеолитическая активность химотрипсина, иммобилизованного на наночастицах селена / А.В. Плющенко, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – №4. – С. 362-365.
5. Плющенко А.В. Поверхностный плазмонный резонанс и агрегативная стабильность комплексов наночастиц серебра с химотрипсином / А.В. Плющенко, К.А. Митусова, Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер, О.А. Писарев // Оптика и спектроскопия. – 2018. – Т. 125. – №2. – С. 234-239.
6. Плющенко А.В. Влияние способа синтеза наноконплексов на протеолитическую активность химотрипсина, иммобилизованного на наночастицах серебра / А.В. Плющенко, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – №5. – С. 460-464.

**Публикации в других изданиях**

1. Titova (Плющенко) А. Immobilization of chymotrypsin on selenium nanoparticles / A. Titova (Plyushchenko), L. Borovikova, A. Kipper, O. Pisarev // Chemistry Research Journal. – 2017. – V.2. – №5. – P. 204-214.
2. Титова (Плющенко) А.В. Наноструктурирование ферментов биогенными элементами. Агрегативная стабильность наноструктурных комплексов селена с химотрипсином / А.В. Титова, Л.Н. Боровикова, Н.А. Матвеева, О.А. Писарев // Нанотехнологии функциональных материалов (НФМ'12): Труды международной научно-технической конференции. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2012. – С.130-134.
3. Титова (Плющенко) А.В. Ферментативная кинетика наноконпозитов селена с химотрипсином / А.В. Титова, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Вторая Всероссийская молодежная научно-техническая конференция с международным участием "Инновации в материаловедении": сб. материалов / Ин-т металлургии и

материаловедения им. А.А. Байкова РАН – М. : ООО "Ваш полиграфический партнер", 2015. – С.136-137.

4. Титова (Плющенко) А.В. Ферментативная кинетика химотрипсина, иммобилизованного на наночастицах селена / А.В. Титова, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Неделя науки СПбПУ: материалы научного форума с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2015. – С.478-480.
5. Кученкова Л.Д. Иммобилизация химотрипсина на наночастицах серебра: влияние рН на стабильность наноконструктов / Л.Д. Кученкова, Л.Н. Боровикова, А.В. Титова (Плющенко), О.А. Писарев // Неделя науки СПбПУ: материалы научного форума с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2015. – С. 452-454.
6. Титова (Плющенко) А.В. Синтез наноконструктов на основе химотрипсина и наночастиц серебра и их стабильность в широком диапазоне рН // Сборник материалов VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 25-26 апреля 2016 г. – СПб. : Изд-во СПХФА, 2016. – С. 314-316.
7. Титова (Плющенко) А.В. Влияние рН и концентрации селена на ферментативную кинетику наноконструктов химотрипсина с наночастицами селена / А.В. Титова, К.А. Митусова, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // VI Международная конференция с элементами научной школы для молодежи "Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества". Суздаль, 3-7 октября 2016 г. / Сборник материалов. – М. : ИМЕТ РАН. – С. 189-190.
8. Митусова К.А. Агрегативная стабильность наноконструктов химотрипсина с наночастицами серебра / К.А. Митусова, А.В. Титова (Плющенко), Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // VI Международная конференция с элементами научной школы для молодежи "Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества". Суздаль, 3-7 октября 2016 г. / Сборник материалов. – М. : ИМЕТ РАН. – С. 138-139.
9. Титова (Плющенко) А.В. Стабилизация наночастиц селена биологически активными синтетическими и природными полимерами / А.В. Титова, Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер, О.А. Писарев // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2016. – С. 510-512.
10. Титова (Плющенко) А.В. Влияние рН среды на спектральные и размерные характеристики наноконструктов серебра с химотрипсином / А.В. Титова (Плющенко) // XIV Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов». Москва. 17-20 октября 2017 г. / Сборник трудов. – М. :ИМЕТ РАН, 2017. – С. 257-258.
11. Плющенко А.В. Стабилизация наночастиц селена и серебра протеолитическим ферментом химотрипсином / А.В. Плющенко, К.А. Митусова, Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер, О.А. Писарев // Неделя науки СПбПУ: материалы научной

- конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2017. – С. 495-498.
12. Митусова К.А. Исследование формирования наночастиц серебра в присутствии химотрипсина / К.А. Митусова, Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер, О.А. Писарев // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2017. – С. 489-492.
  13. Плющенко А.В., Митусова К.А. Протеолитическая активность нанок комплексов на основе химотрипсина и наночастиц серебра // Сборник материалов VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 23-24 апреля 2018 г. – СПб. : Изд-во СПХФУ, 2018. С. 284-286.
  14. Плющенко А.В., Митусова К.А., Боровикова Л.Н., Писарев О.А. Влияние типа стабилизации на размерные характеристики наночастиц серебра // Физико-химические проблемы адсорбции в нанопористых материалах: Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием, 21-25 мая 2018 года, Москва-Клязьма, Россия. – М. : ИФХЭ РАН, 2018. – С. 214-216.
  15. Плющенко А.В. Влияние способа синтеза на размерные характеристики нанокompозитов на основе химотрипсина и наночастиц серебра // XV Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов». Москва. 16-19 октября 2018 г. / Сборник трудов. – М. : ИМЕТ РАН, 2018. – С. 288-290.
  16. Плющенко А.В., Митусова К.А., Боровикова Л.Н., Писарев О.А. Синтез нанокompозитов на основе химотрипсина и наночастиц серебра // Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием "Новые материалы и перспективные технологии". Москва. 27-30 ноября 2018 г. / Сборник материалов. Том I – М. : ООО «Буки Веди», 2018. – С. 425-428.
  17. Плющенко А.В., Митусова К.А., Боровикова Л.Н., Писарев О.А. Размерные характеристики и механизм формирования наночастиц серебра, стабилизированных химотрипсином // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием, 19-24 ноября 2018 г. Институт биомедицинских систем и технологий. – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2018. – С. 170-173.
  18. Митусова К.А., Плющенко А.В., Боровикова Л.Н., Киппер А.И., Писарев О.А. Оптимизация условий синтеза нанокompозитов серебра с химотрипсином // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием, 19-24 ноября 2018 г. Институт биомедицинских систем и технологий. – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2018. – С. 144-147.
  19. Плющенко А.В., Боровикова Л.Н., Писарев О.А. Синтез и размерные характеристики наночастиц селена, стабилизированных химотрипсином // Инновационные материалы и технологии: материалы докладов Международной научно-технической конференции молодых ученых. – Минск: БГТУ, 2019. – С. 386-388.

Аспирант \_\_\_\_\_ / Плющенко А.В./