

УДК 541.64:547.96

УПРАВЛЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ТРИПСИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО В ПОЛИМЕРНОМ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОМ ГИДРОГЕЛЕ¹

© 2001 г. А. Л. Николаев, Д. С. Чичерин, В. А. Синани, О. В. Ноа,
И. В. Мелихов, Н. А. Платэ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Химический факультет
119899 Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 01.03.2000 г.
Принята в печать 28.06.2000 г.

Предложен новый способ дистанционного регулирования каталитической активности трипсина, иммобилизованного в термочувствительных гидрогелевых матрицах, при котором изменение его активности происходит в результате структурной перестройки гидрогелевых матриц при переходе системы через нижнюю критическую температуру смешения. В качестве фактора, обеспечивающего переход через нижнюю критическую температуру смешения, использован ультразвук малой интенсивности. Исследована ферментативная активность трипсина, ковалентно связанного в термочувствительном поли-*N,N*-диэтилакриламидном геле. Управление активностью иммобилизованного фермента осуществляли ультразвуком с частотой 2.64 МГц и интенсивностью 1 Вт/см². Получен эффект пятикратного изменения активности иммобилизованного трипсина при переходе системы через нижнюю критическую температуру смешения под действием ультразвука.

В последние годы полимерные гидрогели с включенными в них биологически активными веществами находят широкое применение в биохимии и фармакологии в качестве систем с контролируемым выделением активного компонента или систем с регулируемой активностью иммобилизованного вещества [1–4]. Одним из подходов к созданию систем с управляемой активностью иммобилизованного биологически активного вещества (БАВ) является метод, основанный на предварительной модификации молекул БАВ (например, белков) введением в их состав двойных связей C=C с последующей сополимеризацией ненасыщенных производных белков с гидрофильным мономером и спивающим агентом в водном растворе [5, 6]. Используя в качестве гидрофильных мономеров вещества, способные проявлять в растворах полимеров на их основе свойства систем с НКТС, можно получить полимерные термоуправляемые гидрогели с иммобилизованными БАВ [7]. Особенностью таких систем является

возможность регулирования активности иммобилизованного БАВ путем изменения температуры раствора. Однако в силу ряда ограничений изменение температуры в таких системах не представляется целесообразным. Мы обратились к другим методам дистанционного целенаправленного воздействия на такие термочувствительные гидрогели. В этом качестве может быть использован ультразвук, к преимуществам которого можно отнести дистанционность, контролируемость и безынерционность воздействия, а также избирательность, которую можно существенно повысить, вводя в состав системы модификаторы, коэффициенты поглощения ультразвука которых на несколько порядков больше, чем у окружающей среды [8].

Цель настоящего исследования – установление принципиальной возможности создания на основе матрицы термочувствительного гидрогеля каталитической системы, активностью которой можно управлять ультразвуком малой интенсивности.

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда “Университеты России – фундаментальные исследования” (проект 5576).



Рис. 1. Схема ячейки для исследования воздействия ультразвука на активность иммобилизованного трипсина в термочувствительном гидрогеле.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трипсин из поджелудочной железы быка ("Sigma", США). Ненасыщенные производные трипсина получали реакцией ацилирования хлорангидридом акриловой кислоты (**ХАК**) молекул трипсина по методике [9]. Мольное отношение белок : ХАК составляло 1 : 100. Ацилированный белок очищали гель-хроматографией на колонке, заполненной носителем Sefadex G-25F (1.5×20 см) и уравновешенной 0.05 М аммоний бикарбонатным буфером. Среднее содержание связей C=C в молекуле ненасыщенных производных трипсина, определенное титрованием оставшихся после ацилирования свободных аминогрупп белка тринитротолуолсульфокислотой по методике [10], составило две связи C=C на одну молекулу трипсина.

Гидрогели поли-N,N-диэтилакриламида (**ПДЭА**) или полиакриламида (**ПАА**) получали сополимеризацией N,N-диэтилакриламида (**ДЭА**) или акриламида соответственно с N,N'-метилен-бис-акриламидом (**БИС**) в водном растворе. В качестве инициатора использовали окислительно-восстановительную систему персульфат калия + N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (**ТМЭДА**), концентрация которых в растворе составляла по 0.5 мас. и об. % соответственно. Концентрация мономеров ДЭА или акриламида в реакционной смеси составляла 10% по массе, а концентрация БИС – 0.5 мас. % в смеси. Полимеризацию проводили при 18–20°C.

Гидрогели ПДЭА (или ПАА) с иммобилизованным в них трипсином получали аналогичным образом в водных растворах трипсина (включение трипсина в гель), а также в растворах ацилированного трипсина (ковалентное связывание трипсина с полимерной матрицей) разной концентрации (0–60 мкг/мл). Образцы полимерных гидрогелей в форме шариков имели объем, равный 2–10 мл. НКТС полимера на основе ПДЭА составляла 31°C.

Катализическую активность трипсина определяли по начальной скорости гидролиза N-бензоил-DL-аргинин-*n*-нитроанилида (**ВАРА**) согласно методике [11]. Кинетические параметры константу Михаэлиса K_m и v_{max} определяли из зависимости скорости реакции v от концентрации субстрата (ВАРА) S по методу Лануйвера–Берка [12]. Результаты обрабатывали с помощью программы SigmaPlot. Сопоставление v_{max} растворенного и иммобилизованного ферментов проводили при их одинаковой концентрации.

Активность иммобилизованного трипсина изучали на образцах трипсинсодержащих гидрогелей, равновесно набухших в течение 72 ч в 10 мл 0.001 М HCl.

С помощью УЗ-ячейки, представленной на рис. 1, изучали ферментативную активность трипсина в геле при воздействии ультразвука. При этом частота ультразвука была 2.64 МГц, интенсивность – 1 Вт/см².

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иммобилизация ферmenta в ПДЭА-гидрогеле методом механического включения при синтезе не приводит к созданию стабильно работающей катализической системы. Трипсин диффундирует из геля, в результате чего за несколько суток активность геля уменьшается в 20–30 раз. Предварительно же ацилированный трипсин, ковалентно связанный с матрицей гидрогеля в процессе синтеза, не вымывается из геля и сохраняет свою активность в течение длительного времени, не подвергаясь автолизу в течение года.

В табл. 1 представлены эффективные значения K_m и максимальной скорости реакции v_{max} трипсина и ацилированного трипсина. При вычислении кинетических параметров мы рассматривали нашу систему как безградиентный реактор. При этом мы исходили из следующих экспериментальных факторов.

1. Скорость ферментативной реакции иммобилизованного трипсина в геле не зависит от скорости потока субстрата, а степень превращения суб-

Таблица 1. K_M и v_{max} для трипсина

Фермент	K_M , ммоль/л	v_{max} , нмоль/л с
Нативный трипсин	16 ± 0.1	1250 ± 110
Ацилированный трипсин	1.6 ± 0.1	286 ± 31
Трипсин в ПДЭА-гидрогеле, 26°C	1.1 ± 0.1	10.3 ± 0.9
Трипсин в ПДЭА-гидрогеле, 37°C	0.53 ± 0.03	4.5 ± 0.3

страта за один оборот системы незначительна. Это свидетельствует об отсутствии внешнедиффузионных ограничений.

2. Независимость скорости реакции, катализируемой иммобилизованным трипсином, от размера образцов, а также ее уменьшение после сжатия геля ($T = 37^\circ\text{C}$) на фоне неизменной проницаемости геля по отношению к субстрату позволяют предположить отсутствие внутридиффузионного торможения.

Таким образом, при обеих температурах иммобилизованный фермент является равнодоступным для субстрата, и формально можно считать его равномерно распределенным по всему объему системы, независимо от состояния геля-носителя.

Из табл. 1 следует, что ацилирование трипсина приводит к уменьшению максимальной скорости модельной реакции гидролиза и эффективной K_M . Иммобилизованный ковалентно в ПДЭА-гидрогеле фермент, по сравнению с ацилированным трипсином, обладает значительно меньшей активностью, сохраняя при этом неизменное сродство к субстрату, определяемое величиной K_M . По-видимому, ковалентное связывание ацилированного фермента со структурными элементами ПДЭА приводит к конформационным изменениям глобулы фермента, отражающимся на его ак-

тивности и не затрагивающим область связывания субстрата.

Трипсин и ацилированный трипсин не изменяют своей активности в результате обработки ультразвуком с частотой 2.64 МГц и интенсивностью 1 Вт/см² в течение 60 мин.

Аналогичная картина наблюдается и при иммобилизации трипсина в ПАА-гидрогеле. Предполагаемые изменения в активности иммобилизованного в ПДЭА-гидрогеле трипсина должны быть связаны со структурным изменением термочувствительного геля в результате его перехода через НКТС. Этот переход вызван повышением температуры всей системы на несколько градусов, что в свою очередь может изменить активность иммобилизованного трипсина. Чтобы разделить эти эффекты, была исследована зависимость активности трипсина, иммобилизованного в акриламидном гидрогеле, от температуры в интервале перехода через НКТС. Акриламидный гель не является термочувствительным и при нагревании в интервале 24–40°C не изменяет свою структуру в той степени, в какой это происходит в случае ПДЭА-гидрогеля. В то же время по своей химической природе он близок к ПДЭА-гидрогелю. В связи с этим температурная зависимость активности иммобилизованного трипсина в первом приближении может быть использована для разделения структурных и температурных факторов, определяющих изменение активности трипсина, иммобилизованного в ПДЭА-гидрогель, при переходе последнего через НКТС.

Одновременно было оценено влияние температуры на активность нативного фермента. Из табл. 2 и рис. 2, 3 следует, что при нагревании от 26 до 37°C активность трипсина, иммобилизованного в ПАА-гидрогеле, и нативного трипсина увеличивается на 25–30%.

Учитывая отличительное свойство термочувствительного гидрогеля подвергаться структурной перестройке под воздействием внешних фак-

Таблица 2. Отношение активности при 37°C к активности при 26°C для разного количества иммобилизованного фермента.

Носитель	Значение δ при содержании иммобилизованного трипсина в гидрогеле (моль/л)			
	0.87×10^{-6}	1.74×10^{-6}	2.61×10^{-6}	4.35×10^{-6}
ПДЭА-гидрогель	0.40	0.47	0.47	0.4
ПАА-гидрогель	1.33	1.32	1.29	1.31
ПДЭА-гидрогель с учетом увеличения активности трипсина при нагревании	0.3	0.35	0.35	0.3

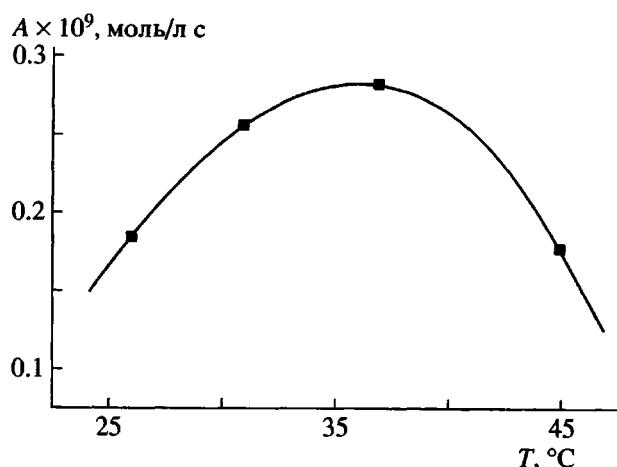


Рис. 2. Температурная зависимость активности A трипсина в растворе.

торов, необходимо было установить принципиальную возможность изменения каталитической активности фермента, ковалентно связанного с матрицей, в результате перехода гидрогеля через НКТС под воздействием ультразвука или нагревания. На рис. 4 показано изменение активности двух образцов трипсина, иммобилизованного в ПДЭА-гидрогеле, под действием в одном случае ультразвука, в другом – нагревания. В обоих случаях образцы ПДЭА-гидрогелей претерпевают переход через НКТС и уменьшаются в объеме в 1.7 раза.

При каждой из температур за время измерения скорость превращения субстрата оставалась постоянной. На рис. 4 это отражено горизонтальными линиями, ординаты которых соответствуют активности образцов. Штриховыми линиями отмечены участки экспериментально неопределенного изменения активности иммобилизованного фермента в ходе перехода геля-носителя через НКТС. Изменение активности при ультразвуковом или тепловом нагревании происходит за время, которое необходимо, чтобы в системе установилась заданная температура (37°C). Время определяется тепловыми характеристиками системы, а в случае ультразвукового воздействия – еще и его интенсивностью, и коэффициентом поглощения ультразвука. В наших условиях это время равно 4–5 мин. Время, за которое происходит увеличение активности, связанное со структурным изменением геля при его охлаждении до 26°C , определяется скоростью охлаждения системы и в нашем случае также составляет 4–5 мин.

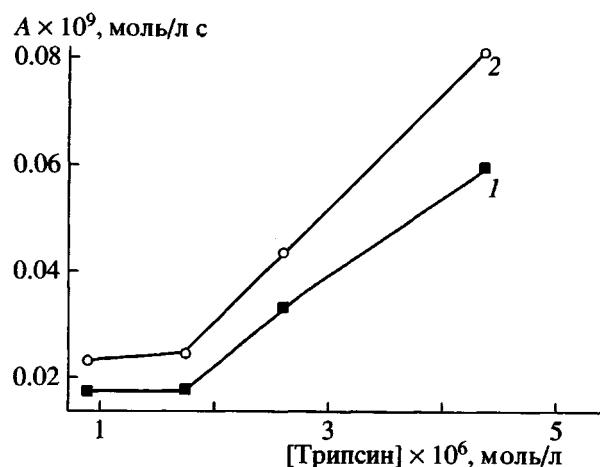


Рис. 3. Зависимость активности иммобилизованного в ПДЭА-гидрогеле трипсина от количества введенного трипсина при 26°C (1) и 37°C (2).

Из рис. 4 видно, что в обоих случаях активность иммобилизованного трипсина существенно (в 2–3 раза) уменьшается в условиях внешнего воздействия. После прекращения внешнего воздействия и охлаждения системы до 26°C активность фермента увеличивается.

Следует отметить, что значение активности, которое достигается иммобилизованным ферментом после прекращения первого ультразвуково-

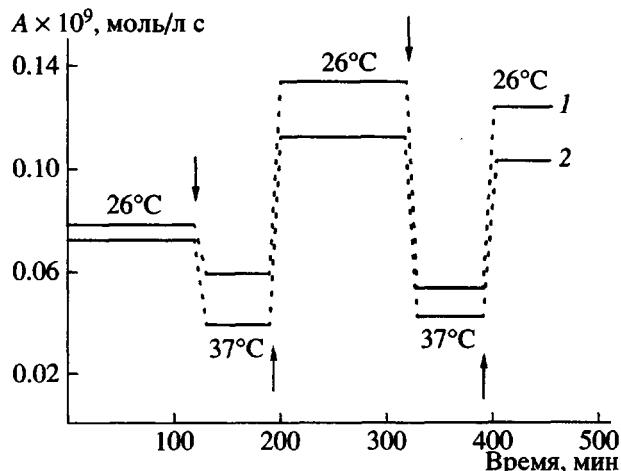


Рис. 4. Изменение активности иммобилизованного в ПДЭА-гидрогеле трипсина при воздействии ультразвука (1) и нагревателя (2). Стрелками показаны моменты включения (стрелки вниз) и выключения (стрелки вверх) ультразвука и нагревателя. Пунктиром обозначена экспериментально неопределенная активность трипсина при переходе гидрогеля через НКТС.

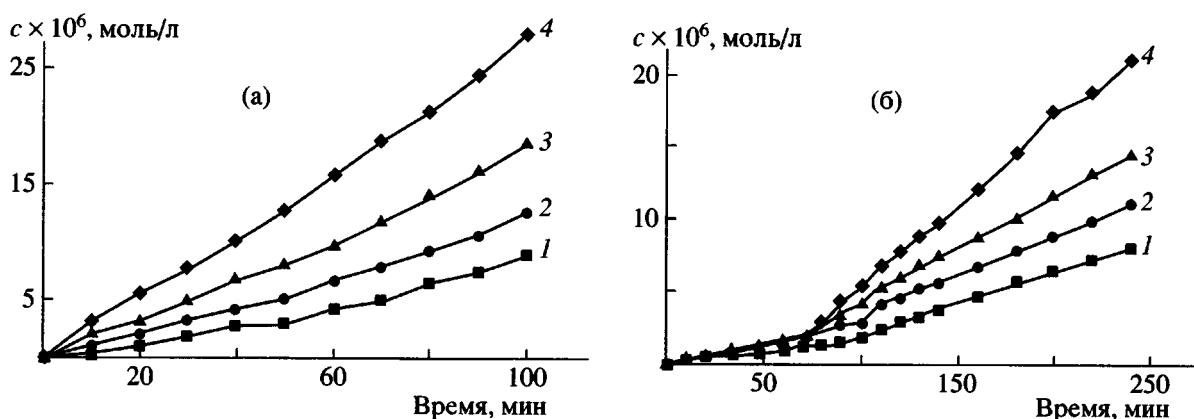


Рис. 5. Кинетика выделения *n*-нитроанилина при 26 (а) и 37°C (б). Концентрация иммобилизованного трипсина $c_r \times 10^6 = 0.87$ (1), 1.74 (2), 2.61 (3) и 4.35 моль/л (4).

вого воздействия или нагревания, превосходит начальное "стартовое" почти в 2 раза. После прекращения последующих воздействий активность трипсина возвращается к этому повышенному уровню, постепенно понижающемуся по мере увеличения числа циклов.

Приведенные на рис. 4 данные относятся к образцам с содержанием фермента 0.87×10^{-6} моль/л. Аналогичные измерения были проведены с образцами, содержащими различное количество трипсина. Из табл. 2 следует, что наблюдаемое изменение активности не зависит от количества фермента, иммобилизованного в матрице.

Учитывая, что активность связанного трипсина должна вырасти за счет нагревания образца во время перехода через НКТС, фактическое снижение активности иммобилизованного трипсина в результате внешнего воздействия достигает 3–5 раз. Примерно такое же изменение активности (с учетом ее увеличения с ростом температуры в 3.1 раза) определяется из зависимости $1/v$ от $1/S$.

Эффект снижения активности иммобилизованного в геле трипсина в результате коллапса геля, вызванного внешним воздействием, можно объяснить по крайней мере двумя причинами: возникновением внутридиффузационных осложнений из-за уплотнения геля; изменением конформации ковалентно связанных с матрицей геля молекул фермента в результате изменения структуры самой матрицы, вызванного переходом через НКТС, возможно, дополненного взаимодействием между собой молекул иммобилизованного фермента.

На рис. 5 приведены кинетические кривые образования *n*-нитроанилина как продукта ферментативной реакции для трипсина, иммобилизованного в ПДЭА-гидрогеле, при 26°C и для таких же образцов, нагретых до 37°C. В последнем случае

на кинетических кривых наблюдается участок с пониженной скоростью выделения продукта реакции. Сопоставление K_M для трипсина, находящегося в ПДЭА-гидрогеле при 26 и 37°C, указывает на ее небольшое уменьшение при переходе к более высокой температуре. Это обстоятельство может служить косвенным доказательством отсутствия внутридиффузационных ограничений при протекании ферментативной реакции в указанных условиях, поскольку их появление, как правило, приводит к увеличению K_M .

Таким образом, из двух возможных объяснений уменьшения активности ковалентно связанного с гелем трипсина при переходе через НКТС следует отдать предпочтение второму – активность меняется из-за конформационных изменений молекулы фермента, вызванных обратимыми структурными изменениями в матрице-носителе под влиянием ультразвука или небольшого нагревания.

Наблюданная задержка выделения продукта реакции на начальной стадии (рис. 5б) может быть объяснена повышенным поглощением продукта реакции (*n*-нитроанилина) ПДЭА-гидрогелем при 37°C по сравнению с 26°C. Такое повышение в свою очередь может быть объяснено изменением сорбционных характеристик гидрогеля при переходе через НКТС.

На рис. 6 представлены кинетические зависимости поглощения *n*-нитроанилина ПДЭА-гидрогелем при 26 и 37°C. Из приведенных данных следует, что связывание *n*-нитроанилина ПДЭА-гидрогелем происходит значительно более интенсивно после перехода геля через НКТС. Это не противоречит сделанному предположению об изменении сорбционных характеристик гидрогеля в результате его сжатия и указывает на то, что повышенное поглощение одного из продуктов сжатым гид-

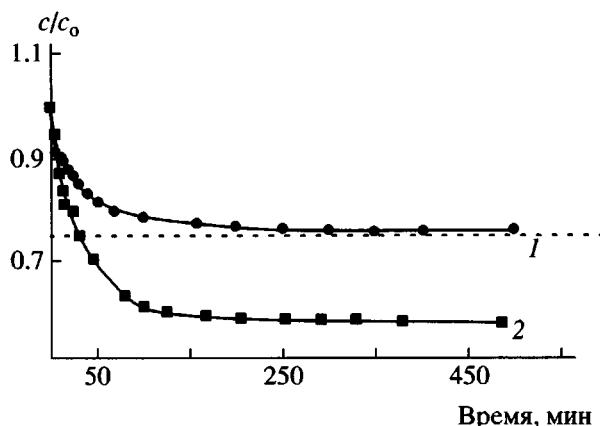


Рис. 6. Кинетические зависимости поглощения *n*-нитроанилина ПДЭА-гидрогелем при 26 (1) и 37°C (2), штриховая прямая соответствует равновесному распределению *n*-нитроанилина между гидрогелем и раствором. c_0 – начальная концентрация *n*-нитроанилина, равная 4×10^{-5} моль/л, c – текущая концентрация *n*-нитроанилина в растворе.

рогелем может быть вызвано как кинетическими, так и термодинамическими причинами. Очевидно, что влияние диффузионных и стерических вкладов в изменение каталитической активности иммобилизованных ферментов при переходе термочувствительных гелей через НТКС будет возрастать с увеличением размеров молекулы субстрата. Как показано в работе [13], для термочувствительных гидрогелей эти вклады могут стать определяющими при увеличении ММ субстрата до 70000.

Таким образом, при соответствующем выборе фермента и матрицы для его иммобилизации, подборе субстрата и способа внешнего воздействия возможно создание каталитических систем, быстро реагирующих на небольшие дозы такого воздействия значительным изменением каталитической активности. С этой точки зрения перспективным материалом матриц для иммобили-

зации биологических катализаторов являются термочувствительные гидрогели, а эффективным внешним воздействием, обеспечивающим возможность дистанционного управления активностью иммобилизованных ферментов, может служить ультразвук относительно невысокой интенсивности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peppas N.A. Hydrogels in Medicine and Pharmacy. Boca Raton: CRC Press, 1987. V. 1.
2. Yoshida R., Sakai K., Ukan T., Sakurai Y., Bae Y.H., Kirn S.W. // J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 1991. V. 3. № 2. P. 155.
3. Eremeev N.L., Kazanskaya N.F. // Russian J. Bioorg. Chem. 1998. V. 24 № 5. P. 314.
4. Hoffman A.S., Park K. // Controlled Drug Delivery. Washington DC: Am. Chem. Soc., 1997.
5. Платэ Н.А., Валуев Л.И., Егоров Н.С., Аль-Нури М.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1977. Т. 13. № 5. С. 673.
6. Синани В.А., Валуев Л.И., Чупов В.В., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. А. 1988. Т. 30. № 10. С. 2088.
7. Лебедева Т.Л., Мальчугова О.И., Валуев Л.И., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. А. 1992. Т. 34. № 9. С. 113.
8. Николаев А.Л., Горбачевский А.Я., Мелихов И.В. // Тез. докл. конф. "Мембранные-95". М., 1995. С. 134.
9. Платэ Н.А., Валуев Л.И., Вакула А.В., Лыс В.А., Федосеев В.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 1982. Т. 18. № 1. С. 81.
10. Snyder S.L., Sobocinsky P.Z. // Analit. Biochem. 1975. V. 64. P. 284.
11. Kakade M.L., Simons N., Lienea J.E. // Cereal. Chem. 1969. V. 46. № 5. P. 518.
12. Джексон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 1. С. 100.
13. Чупов В.В., Ноа О.В., Синани В.А., Платэ Н.А. // Тез. докл. конф. "Мембранные-95". М., 1995. С. 147.

Control of the Catalytic Activity of Trypsin Immobilized into a Polymeric Thermosensitive Hydrogel

A. L. Nikolaev, D. S. Chicherin, V. A. Sinani, O. V. Noa, I. V. Melikhov, and N. A. Platé

Department of Chemistry, Moscow State University,
Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

Abstract—A new approach to the remote control of the catalytic activity of trypsin immobilized into thermosensitive hydrogel matrixes was suggested. According to this approach, the catalytic activity of trypsin changes as a result of structural rearrangements of hydrogel matrixes, when a system passes through an LCST. A low-intensity ultrasound was used as a factor providing a transition through the LCST. The enzymatic activity of trypsin covalently bound in a thermosensitive poly(*N,N*-diethylacrylamide) gel was studied. The activity of the immobilized enzyme was governed by means of ultrasound with a frequency of 2.64 MHz and an intensity of 1 W/cm². When the system passed through the LCST under ultrasonic treatment, the activity of immobilized trypsin changed by a factor of five.