

ЗМІНИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПРООКСИДАНТНОЇ Й АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМ У ТИМУСІ МОРСЬКИХ СВИНОК ЗА УМОВ ФОРМУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО АЛЬВЕОЛІТУ ТА КОРЕКЦІЯ ЇХ ТІОТРИАЗОЛІНОМ

У роботі встановлено коригувальний вплив антиоксиданта тіотриазоліну на вміст у тимусі морських свинок дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду й активність СОД і каталази при експериментальному алергічному альвеоліті.

Ключові слова: експериментальний алергічний альвеоліт, тіотриазолін, дієнові кон'югати, малоновий діальдегід, супероксиддисмутаза, каталаза.

CHANGES IN THE FUNCTIONAL STATE OF PRO-OXIDANT AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN GUINEA PIGS THYMUS UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ALLERGIC ALVEOLITIS AND THEIR CORRECTION WITH THIOTRIAZOLINE

Corrective effect of the antioxidant thiothiazolin on the content of diene conjugates, malonic dialdehyde and superoxide dismutase and catalase activity in guinea pigs thymus in experimental allergic alveolitis was established in the work.

Key words: experimental allergic alveolitis, thiothiazolin, diene conjugates, malonic dialdehyde, superoxide dismutase, catalase.

УДК 665.58.002.39(088.8)

І. І. Романовська, канд. хім. наук,

Ю. А. Шестеренко,

О. В. Севастьянов, канд. хім. наук

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ТИРОЗИНАЗИ В МОДИФІКОВАНИЙ ПОЛІ-N-ВІНІЛПРОЛІДОН

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса

Тирозиназа (КФ 1.14.18.1) — фермент класу оксидоредуктаз, каталізує утворення меланіну й інших поліфенольних сполук у тваринних і рослинних організмах [1]. Тирозиназа грибів *Agaricus bisporus* нині широко вивчається як біокаталізатор синтезу біологічно активних сполук — антиоксидантів (гідрокситирозол) [2], L-ДОФА [3], а також куместролу і кавової кислоти [1]. Даний фермент каталізує процес приєднання фенольних сполук і білків до хітозану з утворенням модифікованого полімеру, що показав цікаві результати застосування як штучної шкіри та матриці для контрольованого вивільнення лікарських засобів [1]. Тирозиназа також може бути використана при створенні біосенсорів для визначення фенольних сполук і ароматичних амінів [4], при розробці нових технологій очищення стічних вод від високотоксичних фенольних поліюгантів [5].

Однак застосування ферменту обмежене високою вартістю комерційних препаратів, нестабільністю, тому доцільно одержання частково очищених іммобілізованих ферментних препаратів.

Відомі способи закріплення тирозинази на різних носіях (альгінат міді, агароза, желатин, співполімер полівінілового спирту і полівінілпіролідону, вугільні матеріали, оксид алюмінію та ін.), однак у деяких випадках відзначалася значна втрата ферментативної активності; при іммобілізації використовувалися токсичні агенти, крім того, кратність застосування інколи була незадовільною [6].

Метою даної роботи було одержання біокаталізатора багаторазового використання на основі тирозинази грибів *Agaricus bisporus*, іммобілізованої в полі-N-вінілпіролідон (ПВП), модифікований золем полікремнієвої кислоти (ПКК).

Матеріали та методи дослідження

Частково очищений препарат тирозинази з грибів *Agaricus bisporus* виділяли згідно з методом Коена, модифікованому нами додаванням полікапроаміду [7]. У ферментному препараті визначали вміст білку методом Лоурі в модифікації Хартрі [8], фенолоксидазну активність за тирозином [5].

Вплив золю ПКК і тирозинази на віскозиметричні характеристики розчинів ПВП визначали, вимірюючи в'язкість водних розчинів полімеру в діапазоні концентрацій 0,05–0,15 %, і в'язкість розчинів ПВП при додаванні відповідної кількості золю і ферменту за допомогою віскозиметра Оствальда (діаметр капіляра 0,73 мм).

Характеристичну в'язкість визначали з використанням графіка залежності приведеної в'язкості розчину полімеру від

його концентрації за відрізком, що відтинається екстрапольованою прямою на осі ординат.

Модифікацію ПВП проводили за розробленою методикою [9]. До 3,5 см³ 7,7 % розчину ПВП додавали лимонну кислоту (38 мг в 1 см³ дистильованої води) і 0,63 см³ тріетиленгліколю. Після перемішування вводили 0,5 см³ 25 % розчину аміаку й 1,45 см³ золю ПМК. Імобілізацію тирозинази здійснювали, додаючи 15,5 мг ферменту до отриманого розчину, суміш виливали у форму, яку тримали відкритою до формування гідрогелю з 50 % вмістом води у плівці.

Визначення термостабільності ферментного препарату проводили, інкубуючи однакові за активністю проби вільної та іммобілізованої тирозинази в Na-фосфатному буферному розчині (0,05 моль/дм³, рН 6,5) при температурі 50 °С протягом 90 хв, з наступним визначенням фенолоксидазної активності. Константи термоінактивації знаходили за тангенсом кута нахилу прямої графіка залежності натурального логарифма величин залишкової активності препаратів тирозинази від часу методом лінійної регресії.

Ступінь біоконверсії фенолу визначали за його зникненням спектрофотометрично 4-аміноантипіриновим методом [10].

рН-Оптимальність фенолоксидазної активності вільної та іммобілізованої тирозинази знаходили, використовуючи однакові за активністю проби та буферні розчини з різними значеннями рН (4–10). Температурний оптимум вивчали в інтервалі 2–70 °С при рН 6,5 і концентрації субстрату 0,5 ммоль/дм³.

Окиснення фенолу (0,5–10,0 ммоль/дм³), що каталізується іммобілізованою тирозиназою (50–1000 од./см³), вивчали в реакторі періодичної дії при рН 6,5, температурі 25 °С протягом 1 год.

Результати дослідження та їх обговорення

Із грибів *Agaricus bisporus* виділений частково очищений препарат тирозинази з виходом білка 0,67 мг/г грибів, вмістом міди 0,19 %, питомою активністю 500 од./мг білка·хв (за тирозином). Метод виділення модифікований нами додаванням полікапроаміду, який зв'язує продукти окиснення поліфенольних сполук (інгібітори тирозинази), що дозволило збільшити активність препарату втричі [7].

Перспективною матрицею для іммобілізації ферментів (лізоцим, лужна протеаза) [9] є високомолекулярний ПВП (М. м. 2 млн), модифікований золю ПМК. Отриманий полімерний гідрогелевий матеріал — орґано-неорґанічний гібрид — продукт об'єднання кремнієвмісної сполуки й високомолекулярного ПВП у цілісну структуру. Створенню матриці сприяє утворення водневих зв'язків між киснем карбонільної групи лактамного кільця ПВП і воднем силанольної групи золю ПМК (підтвержене методом ІК-спектроскопії) [9].

У результаті іммобілізації тирозинази були отримані однорідні нерозчинні у воді гідрогелеві полімерні плівки з 80%-вим збереженням вихідної фенолоксидазної активності.

Для вивчення взаємодії ферменту з носієм були визначені віскозиметричні характеристики розчинів полімеру при додаванні тирозинази і золю ПМК. З даних, наведених у таблиці, випливає, що характеристична в'язкість полімеру в присутності тирозинази зростає, взаємодія трьох компонентів (ПВП-фермент-золь ПМК) приводить до ще більшого її підвищення. Певно, іммобілізація тирозинази здійснюється за рахунок невалентних взаємодій з макромолекулами носія, однак не виключе-

на можливість фізичного включення в структуру модифікованого ПВП.

Для оптимізації умов застосування отриманого іммобілізованого препарату тирозинази були вивчені його фізико-хімічні властивості. Виявлено, що рН-оптимум активності іммобілізованого ферменту не відрізняється від такого для вільного біокатализатора і становить 6,0–7,0, однак показано розширення рН-профілю активності тирозинази в область лужних значень, що свідчить про утворення більш сприятливого рН-мікрооточення ферменту в процесі іммобілізації.

При вивченні залежності активності тирозинази від температури виявлено, що термооптимум вільної та іммобілізованої форми тирозинази становить 40 °С (рис. 1).

Результати проведених досліджень свідчать про стабілізацію активності іммобілізованої тирозинази в умовах високої температури (к термоінактивації становили для вільного та іммобілізованого препарату 1,87 · 10⁻² і 0,49 · 10⁻² хв⁻¹ відповідно), що, найімовірніше, обумовлене обмеженням конформаційної рухливості глобули білка.

Імобілізація ферменту дозволяє багаторазово використовувати отриманий біокатализатор. У розроблених умовах у реакторі періодичної дії за допомогою отриманого препарату було здійснено кількісне окиснення

Таблиця
Вплив тирозинази і золю полікремнієвої кислоти на характеристичну в'язкість полі-N-вінілпіролідону

| Зразок | Характеристична в'язкість, ×10 ² , см ³ /г |
|------------------------------|--|
| ПВП | 2,31 |
| ПВП + ТИР | 2,53 |
| ПВП + ТИР + SiO ₂ | 2,76 |

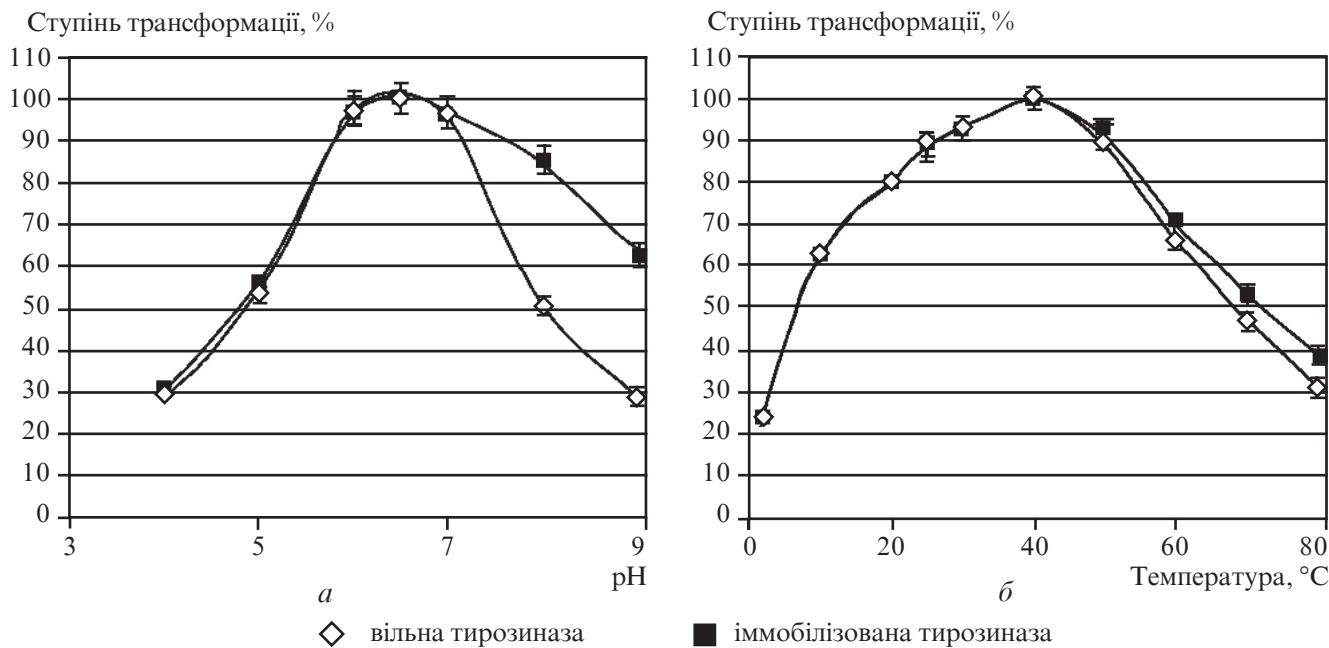


Рис. 1. Залежність активності вільного й іммобілізованого препаратів тирозинази від рН (а) і температури (б) інкубаційного середовища

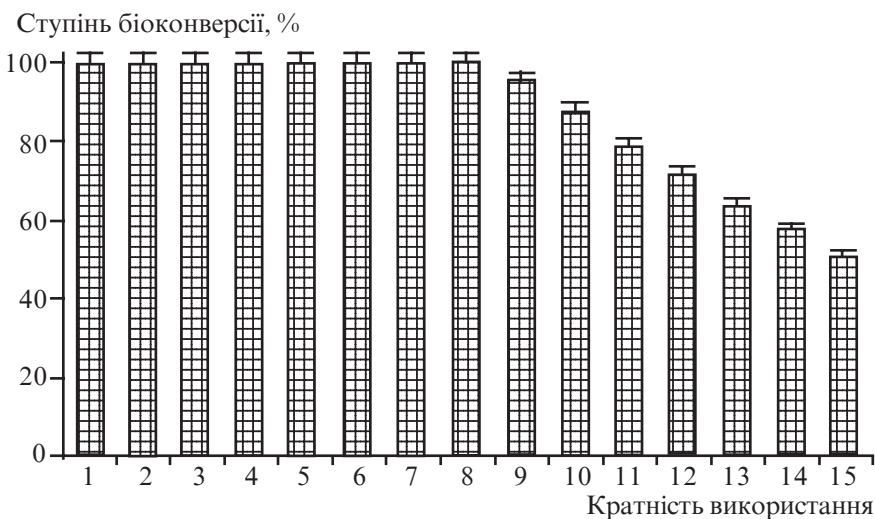


Рис. 2. Кратність використання тирозинази, іммобілізованої в модифікований ПВП для конверсії субстрату

фенолу (0,5–10 ммоль/дм³) протягом 8 циклів використання, а загальна кількість циклів зі збереженням високого ступеня трансформації субстрату досягає 15 (рис. 2).

Таким чином, розроблений спосіб одержання біокатализатора на основі тирозинази грибів *Agaricus bisporus*, іммобілізованої в полі-N-вінілпіролідон, модифікований золем ПКК, отриманий препарат характеризується підвищеною стабільністю в умовах високих темпера-

тур і можливістю багаторазового використання.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications* / S. Halaoui, M. Asther, J.-C. Sigoillot [et al.] // *J. Appl. Microbiol.* — 2006. — Vol. 100, N 2. — P. 219–232.
2. *Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst* / J. C. Espin, C. Soler-Rivas, E. Cantos [et al.] // *J. Agric. Food.* — 2001. — Т. 49, N 3. — P. 1187–1193.
3. *Seetharam G. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite* / G. Seetharam, B. A. Saville

// *Enzym. Microb. Technol.* — 2002. — Vol. 31, N 6. — P. 747–753.

4. *Freire R. S. Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices* / R. S. Freire, N. Durana, L. T. Kubota // *J. Braz. Chem. Soc.* — 2002. — Vol. 13, N 4. — P. 456–462.

5. *Ikehata K. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols* / K. Ikehata, J. Nicell // *Biotechnol. Prog.* — 2000. — Vol. 16, N 4. — P. 533–540.

6. *Application of laccase and tyrosinase (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review* / N. Duran, M. A. Rosa, A. D'Annibale, L. Gianfreda // *Enzyme Microbial. Technol.* — 2002. — Vol. 31. — P. 907–931.

7. *Дослідження складу частково очищеного препарату тирозинази з грибів Agaricus bisporus* / І. І. Романовська, Ю. А. Шестеренко, О. В. Севастьянов, В. А. Топтіков // *Медична хімія.* — 2008. — Т. 10, № 2. — С. 79–82.

8. *Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response* / E. F. Hartree // *Anal. Biochem.* — 1972. — Vol. 48, N 1. — P. 422–427.

9. *Романовская И. И. Иммунизация щелочной протеазы и лизоцима в модифицированный поли-N-винилпирролидон* / И. И. Романовская, С. С. Декина, И. И. Пашкин // *Химико-фармацевтический журнал.* — 2009. — Т. 43, № 11. — С. 26–29.

10. *Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений* / И. М. Коренман. — М.: Химия, 1975. — 368 с.

УДК 665.58.002.39(088.8)

І. І. Романовська, Ю. А. Шестеренко, О. В. Севастьянов
ІММОБІЛІЗАЦІЯ ТИРОЗИНАЗИ В МОДИФІКОВАНИЙ ПОЛІ-N-ВІНІЛПІРОЛІДОН

На основі виділеної тирозинази грибів *Agaricus bisporus*, іммобілізованої в полі-N-вінілпіролідон, модифікований золев полікремнієвої кислоти, був отриманий біокатализатор, придатний для гетерогенного каталізу, з підвищеною стабільністю в умовах високих температур. У розроблених умовах (рН 6,5, температура 25 °С, час трансформації — 1 год, фенолоксидазна активність — 50–1000 ОД/см³) препарат каталізував повне окиснення субстрату в реакторі періодичної дії протягом 8 циклів, зі збереженням високого ступеня його трансформації в наступні 7 циклів.

Ключові слова: тирозиназа грибів, полі-N-вінілпіролідон, іммобілізація, біокатализатор.

UDC 665.58.002.39(088.8)

I. I. Romanovska, Yu. A. Shesterenko, O. V. Sevastyanov
TYROSINASE IMMOBILIZATION IN MODIFIED POLY-N-VINYLPYRROLIDONE

Based on isolated *Agaricus bisporus* fungi tyrosinase, immobilized in poly-N-vinylpyrrolidone, modified by polysilicic acid sol, the biocatalyst was obtained, being suitable for heterogeneous catalysis, with increased stability at elevated temperature conditions. Under conditions developed (pH 6.5, temperature 25 °C, time of transformation — 1 h, phenoloxidase activity 50–1000 U/cm³) the preparation had catalyzed total substrate oxidation in batch reactor during 8 cycles with high level of its transformation retaining during the next 7 cycles.

Key words: fungi tyrosinase, poly-N-vinylpyrrolidone, immobilization, biocatalyst.

УДК 616.341-008.6-085.322+612.33.014-015.32.085.1

О. В. Сторчило, канд. біол. наук, доц.

ОЦІНКА ВПЛИВУ СУМАРНОГО ЕКСТРАКТУ ПЛОДІВ РОЗТОРОПШІ ПЛЯМИСТОЇ НА АКТИВНІСТЬ ГЛЮКОЗНОЇ ТРАНСПОРТНОЇ СИСТЕМИ У ХРОНІЧНОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ *IN VIVO* НА ФУНКЦІОНУЮЧІЙ ДІЛЯНЦІ ТОНКОЇ КИШКИ ЩУРІВ

Одеський національний медичний університет

Вступ

Внаслідок забруднення довкілля виникають зміни в обміні речовин в організмі людини, в її адаптаційних і регуляторних механізмах [1]. Для корекції цих порушень часто використовують фітопрепарати, серед яких усе більшу увагу приділяють розторопші плямистій [2–4]. Через високий вміст у плодах силімарину розторопша є основою для створення цілої низки гепатопротекторів, але її ефекти не обмежуються тільки мембранопротекторними властивостями цього компонента [2–4]. Тому виникла думка дослідити вплив сумарного екстракту розторопші, що містить як водо-, так і жиророзчинні активні компоненти, на функціональну активність тонкої кишки. Реперною для її оцінки є система транспорту глюкози, в оцінюванні активності якої вирішальну роль відіграє рівень методичного підходу: так, редуковані

системи дозволяють досліджувати механізми функціонування систем, які мало залежать від вищих рівнів регуляції організму, отже, вони надають уявлення про роботу базових, фундаментальних механізмів [5]. Але реальні умови існування організму передбачають тонку регуляцію його функцій. У цьому процесі беруть участь вищі рівні регуляції — нейрогуморальна й ендокринна системи. Оцінити їх внесок у регуляцію функціональної активності тонкої кишки можливо тільки за умов цілісного організму *in vivo*. Нами було розроблено оригінальну методику формування ділянок тонкої кишки, що безпосередньо включена до системи травлення і зберігає іннервацію, кровопостачання та пасаж хімуса і дозволяє досліджувати функціональну активність тонкої кишки у хронічному експерименті на ненаркотизованих тваринах за умов відсутності операційної травми і стресу [6–7].

Раніше нами було показано вплив сумарного екстракту розторопші та його окремих фракцій (водо- та жиророзчинної) на транспорт глюкози в тонкій кишці щурів за умов *in vitro* [8]. З'ясувалося, що для кожної фракції є характерними власні ефекти на глюкозну транспортну систему. Але найкращий нормалізуючий і стабілізуючий вплив на її роботу справляв саме сумарний екстракт, який містить як водо-, так і жиророзчинні компоненти [8]. Тому метою роботи стало визначення впливу сумарного екстракту розторопші на активність системи транспорту глюкози в функціонуючій ділянці тонкої кишки щурів у хронічному експерименті *in vivo*.

Матеріали та методи дослідження

Експерименти проведено на щурах-самцях породи Вістар масою 170–180 г, що утримувалися на стандартному раціоні