

ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА ТРИПСИНА

Д. Р. Байдамшина¹, Е. Ю. Тризна¹, М. Г. Холявка², О. О. Логинова², С. М. Сазыкина²,
В. Г. Артюхов², А. Р. Каюмов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет

²Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 02.06.2016 г.

Аннотация. Показано отсутствие гено- и цитотоксичности трипсина, иммобилизованного на матрице кислоторастворимого средномолекулярного хитозана, что свидетельствует о перспективности его дальнейшего исследования с целью последующего применения в фармацевтической промышленности, ветеринарии и медицине.

Ключевые слова: иммобилизованные ферменты, гетерогенные препараты, трипсин, хитозан, цитотоксичность, генотоксичность.

Abstract. Absence genotoxicity and cytotoxicity of the trypsin immobilized on the matrix of an acid soluble middle molecular chitozan is shown that testifies to prospects of its further research for subsequent application in pharmaceutical industry, veterinary science and medicine.

Keywords: immobilized enzymes, heterogeneous preparations, trypsin, chitozan, cytotoxicity, genotoxicity.

Трипсин и другие протеолитические ферменты применяются в медицине для очистки ран, удаления фибрина и некротических масс, что способствует скорейшему ранозаживлению [1, 2]. Однако растворимые протеазы быстро инактивируются за счет автопротеолиза, ингибирования различными соединениями и биodeградации. Поэтому широкое развитие приобретают поисковые работы по получению ферментов, иммобилизованных на различных полимерных носителях природного происхождения, в частности на хитозане.

Хитозан, благодаря своим уникальным физико-химическим и биологическим свойствам, хорошо связывается со многими химическими соединениями и биологическими системами, в том числе холестеринами, жирами, белками, ионами металлов и даже опухолевыми клетками [3]. По

этой причине хитозан используется в различных сферах в качестве хелатирующего агента.

Производные хитозана применяются в ряде областей: при очистке сточных вод для удаления ионов тяжелых металлов и в процессах мембранной очистки, в пищевой промышленности (антихолестерин, консерванты, упаковочные материалы и кормовые добавки), в сельском хозяйстве в качестве удобрения и т.д. [4, 5]. Изготовленные из хитозана волокна используют в качестве рассасывающихся шовных материалов и средств для перевязки ран [6]. Иммобилизация протеаз на нерастворимом носителе позволяет решить несколько важных для медицины задач, таких как получение препаратов пролонгированного действия благодаря стабилизации и увеличению времени полужизни фермента, получение возможности адресной доставки препарата и решение проблемы его диффузии в организме, направленное регулирование

© Байдамшина Д. Р., Тризна Е. Ю., Холявка М. Г., Логинова О. О., Сазыкина С. М., Артюхов В. Г., Каюмов А. Р., 2016

оптимумов функционирования препарата (температурный оптимум, оптимум pH).

Целью работы являлась оценка мутагенных и цитотоксических свойств иммобилизованного на матрице хитозана трипсина для аргументации в пользу безопасности его применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые соединения

В работе использовался бычий трипсин (КФ 3.4.21.4) производства «MP biomedical». Трипсин был иммобилизован ранее на кислоторастворимом среднемoleкулярном (M_r = 200 кДа, СД 82%) хитозане (ЗАО «Биопрогресс», Россия) в лаборатории кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета [7, 8].

Используемые штаммы

Для проверки мутагенности соединений использовали штаммы *Salmonella typhimurium* TA98 (*hisD3052*, *rfa*, *uvr*-, *bio*-, *pkm101*) [9] и *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 [10]. Все бактериальные штаммы культивировали в среде LB (триптон – 10 г/л; дрожжевой экстракт – 5 г/л; NaCl – 5 г/л; pH 8.5) [11].

Оценка гено- и цитотоксичности

Мутагенность веществ оценивали в тесте Эймса. 5 мл ночной культуры *Salmonella typhimurium* TA98 переносили в 20 мл LB с ампициллином (25 мкг/мл) и инкубировали при 37 °С с качанием в течение 2 часов до достижения культурой экспоненциальной фазы роста. Затем клетки собирали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об/мин. Осадок ресуспендировали в однократном растворе солевой основы. Концентрация трипсина составляла 1 (планируемая фармацевтическая концентрация) и 10 мкг/мл, а концентрация его иммобилизованной формы – 75 мг/мл, что превышает планируемую фармацевтическую концентрацию в 10 раз. В качестве позитивного контроля использовался азид натрия (NaN₃). Тестируемое вещество считали мутагенным, если число колоний-ревертантов в опыте достоверно превышало таковое в контроле (растворителе) более чем в 2 раза.

ДНК-повреждающую активность соединений оценивали в SOS-хромостесте на штамме *S. typhimurium* TA1535/pSK1002. Культуру бактерий разводили в среде LB в 10 раз. Полученную культуральную жидкость разливали по 3 мл в пробирки и растили в течение 4 ч в присутствии исследуемых соединений в необходимых концентрациях. Затем клетки центрифугировали и определяли активность в них β-галактозидазы [12, 13].

Цитотоксичность соединений исследовали на линии MCF7 клеток рака молочной железы человека. Клетки инкубировали в 96-луночных планшетах на среде DMEM, дополненной глутамином, FBS, пенициллином и стрептомицином. В 96-луночные пластиковые планшеты (Cellstar Grenier bio-one No. 655 180) засеивали культуру клеток (4000 клеток на лунку) и вносили исследуемые соединения. Затем культуру клеток инкубировали 24 часа при температуре 37 °С и проводили MTS-тест. Этот тест основан на подавлении активности митохондриальной дегидрогеназы в присутствии токсичного соединения и способности окислять субстрат MTS (3-(4,5-диметил-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум) с использованием феназинметосульфата (PMS) в качестве электрон-связывающего реагента. MTS восстанавливается клетками до окрашенного растворимого продукта, который может быть измерен фотометрически.

Далее добавляли 100 мкл PMS раствора в 1 мл MTS непосредственно перед добавлением в культуральную жидкость, содержащую клетки. Аккуратно перемешивали и 10 мкл объединенного раствора MTS и PMS добавляли в каждую лунку 96-луночного аналитического планшета, содержащего 50 мкл клеток в культуральной среде. Планшет инкубировали в течение 1-4 часов при 37 °С в термостате с содержанием 5% CO₂ до образования коричневой окраски в контрольных лунках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка генотоксичности веществ

Установлено, что в тесте Эймса превышение количества ревертантов над контролем в концен-

Таблица 1.

Цитотоксичность растворимого и иммобилизованного трипсина в метаболическом MTS-тесте (остаточная активность, процент от контроля)

Концентрация трипсина, мкг/мл	1	10	100
Трипсин растворимый	135±15	97±14	119±21
Концентрация соединений, мг/мл	0.2	1	5
Хитозан кислоторастворимый среднемoleкулярный	105±14	131±14	127±19
Трипсин, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане	95±17	87±11	91±7

трации 10 и 100 мкг/мл у свободного трипсина составило 0.5 ± 0.03 и 0.4 ± 0.06 , а у иммобилизованного – 0.9 ± 0.12 и 1.1 ± 0.09 , что свидетельствует об отсутствии мутагенного действия. Ни одно соединение не проявило повышения SOS-ответа в ДНК-повреждающем тесте. Превышение активности β -галактозидазы над контролем у свободного трипсина составило 0.9 ± 0.03 и 1.2 ± 0.03 , а у иммобилизованного препарата – 0.6 ± 0.38 и 0.6 ± 0.12 .

Оценка цитотоксичности веществ

Результаты MTS-теста для растворимого фер-

мента, хитозана и трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, приведены в таблице. Ни одно из соединений не снижало активности митохондриальной дегидрогеназы, что свидетельствует об отсутствии их цитотоксичности.

Кроме MTS-теста, мы исследовали влияние свободного трипсина и его иммобилизованной формы на морфологию клеток MCF7. Клетки исследовали путем фазово-контрастной микроскопии на 1 и 2 сутки инкубации с исследуемыми веществами. В качестве контроля использо-

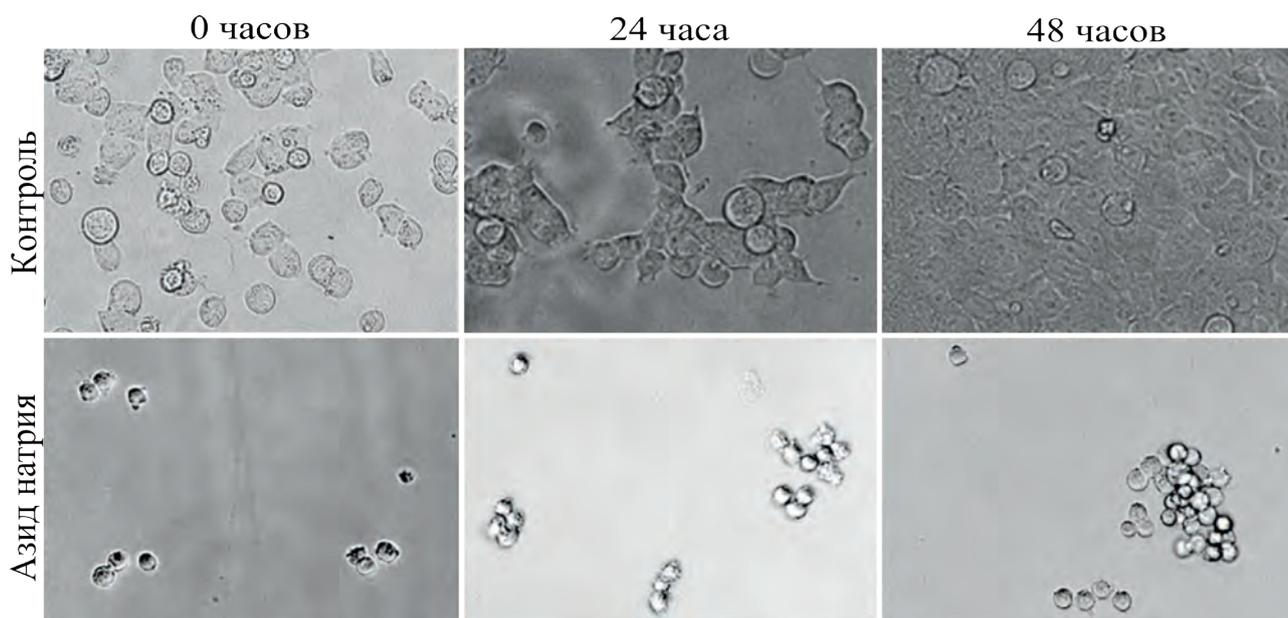


Рис. 1. Морфология клеток линии MCF7 в отсутствие исследуемых соединений (контроль) и после пролиферации в присутствии азид натрия (10 мг/мл) в качестве контроля на токсичность

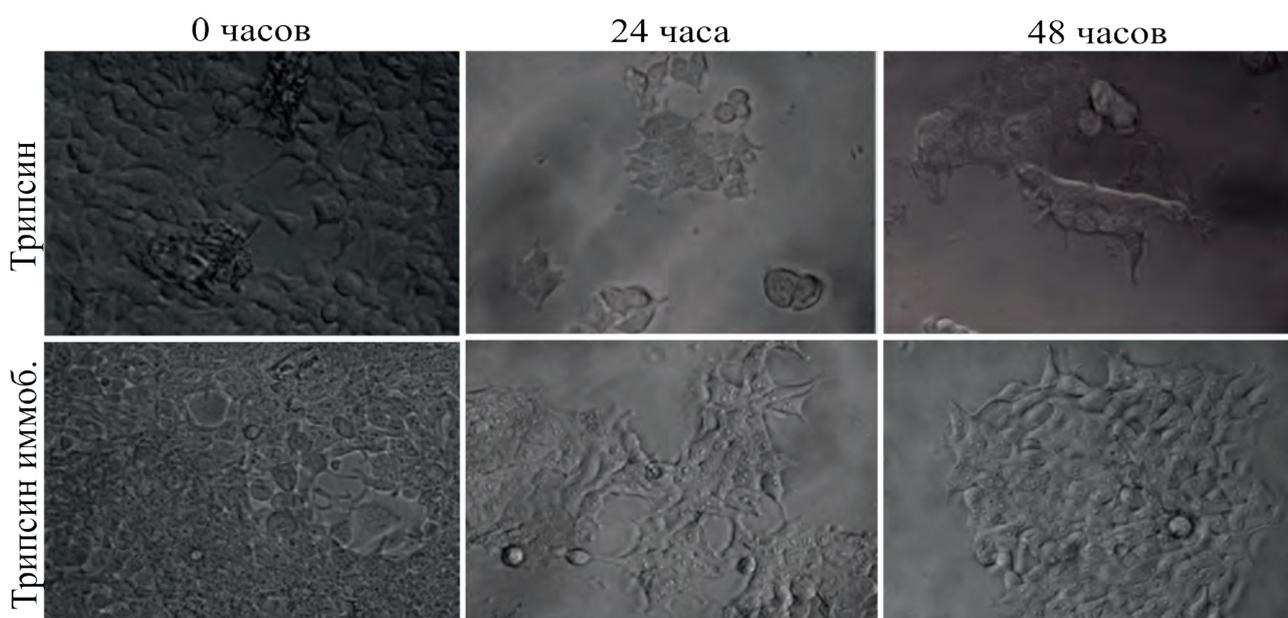


Рис. 2. Морфология клеток линии MCF7 в присутствии свободного и иммобилизованного на матрице хитозана трипсина

вали азид натрия – высокотоксичное вещество (рис. 1). Как видно из рисунка, в его присутствии клетки приобретали сферическую форму и не обнаруживали пролиферации. Имобилизованный трипсин активировал пролиферацию клеток, что может усилить ранозаживляющий эффект (рис. 2).

Проведена оценка гено- и цитотоксичности свободного и иммобилизованного на матрице хитозана трипсина, которая не выявила их токсичности и свидетельствует о необходимости их дальнейшего исследования в связи с возможностью применения в фармацевтической промышленности, ветеринарии и медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Проект №15-14-00046), Российского фонда фундаментальных исследований (Проект № 16-34-01141 мол. а) и в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Elchinger P.H. Immobilization of proteases on chitosan for the development of films with anti-biofilm properties / P.H. Elchinger, C. Delattre, S. Faure // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2015. — Vol. 72. — P. 1063–1068.
2. Klasen H.J. A review on the nonoperative removal of necrotic tissue from burn wounds / H.J. Klasen // *Burns.* — 2000. — Vol. 26. — P. 207–222.
3. Grenha A. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery / A. Grenha, B. Seijo, C. Remuñan-Lopez // *Eur. J. Pharm. Sci.* — 2005. — Vol. 37. — P. 427–437.
4. Krajewska B. Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials / B. Krajewska // *Separation Purification Technol.* — 2005. — Vol. 41. — P. 305–312.
5. Nakorn P. Chitin nanowhisker and chitosan nanoparticles in protein immobilization for biosensor applications / P. Nakorn, J. Metals // *Mater. Minerals.* — 2008. — Vol. 18. — P. 73–77.
6. Nakajima M. Development of absorbable sutures from chitin / M. Nakajima, K. Atsumi, K. Kifune // *Chitin, chitosan and related enzymes.* — 1984. — P. 407–410.
7. Разработка биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на хитозане / А.И. Сливкин [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2013. — Т. 13, № 1. — С. 53–59.
8. Логинова О.О. Физико-химические и кинетические свойства гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана / О.О. Логинова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов // *Биофармацевтический журнал.* — 2015. — Т. 7, № 2. — P. 13–16.
9. Ames B.N. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test / B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki // *Mutat Res.* — 1971. — Vol. 31. — P. 347–364.
10. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens / Y. Oda [et al.] // *Mutat Res.* — 1985. — Vol. 147. — P. 219–229.
11. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis // Cold Spring Harbor Laboratory Press. — 1989.
12. Miller J.H. Experiment in molecular genetics / J.H. Miller // New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. — 1972.
13. Transcription factor TnrA inhibits the biosynthetic activity of glutamine synthetase in *Bacillus subtilis* / F. Ksenia [et al.] // *FEBS Letter.* — 2013. — Vol. 587, № 9. — P. 1293–1298.

Казанский (Приволжский) федеральный университет

Байдашшина Д. Р., Магистр

Тел.: +7(843)2337802

E-mail: prosto-di@mail.ru

Тризна Е. Ю., Младший научный сотрудник

Тел.: +7(843)2337802

E-mail: trizna91@mail.ru

Kazan Federal University

Baidamshina D. R., Master student

Ph.: +7(843)2337802

E-mail: prosto-di@mail.ru

Trizna E. Y., Researcher

Ph.: +7(843)2337802

E-mail: trizna91@mail.ru

Каюмов А. Р., к.б.н., Доцент
Тел.: +7(843)2337802
E-mail: kairatr@yandex.ru

Kayumov A. R., Associated professor, Cand.Biol.Sci.
Ph.: +7(843)2337802
E-mail: kairatr@yandex.ru

Воронежский государственный университет
Холявка М. Г., Старший научный сотрудник,
доцент, к.б.н.
Тел.: +7(473)2208586
E-mail: holyavka@rambler.ru

Voronezh State University
Holyavka M. G., Senior researcher, associated
professor, Cand.Biol.Sci.
Ph.: +7(473)2208586
E-mail: holyavka@rambler.ru

Логинава О. О., Аспирант
Тел.: +7(473)2208586
E-mail: loginova00@gmail.ru,

Loginova O. O., PhD student
Ph.: +7(473)2208586
E-mail: loginova00@gmail.ru

Сазыкина С. М., Магистр
Тел.: +7(473)2208586
E-mail: sazykina.93@mail.ru

Sazykina S. M., Master student
Ph.: +7(473)2208586
E-mail: sazykina.93@mail.ru

Артюхов В. Г., доктор биологических наук,
профессор, заведующий кафедрой биофизики и
биотехнологии
Тел.: +7(473)2208981
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Artyukhov V. G., Head of biophysics and
biotechnology department, professor, doctor of
biological science
Ph.: +7(473)2208981
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru