

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ / PHYSICAL CHEMISTRY

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.176>

ОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦЕРИЯ

Научная статья

Офицерова Н.Ю.^{1,*}, Бажукова И.Н.², Таланкина Л.М.³, Лапина П.К.⁴, Смольникова Е.Н.⁵

¹ORCID : 0000-0001-8840-9908;

²ORCID : 0000-0001-7958-4296;

^{1, 2, 3, 4, 5} Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (n.ofitserova[at]mail.ru)

Аннотация

Наночастицы оксида церия представляют собой перспективный материал для биомедицинского применения благодаря своей способности выполнять функции различных ферментов. В работе продемонстрирована возможность наночастиц имитировать поведение фермента оксидазы. Оксидазная активность наночастиц оксида церия была исследована с использованием буферного раствора и хромогенного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). В ходе работы были количественно оценены параметры ферментативной кинетики для процесса окисления ТМБ под действием наночастиц CeO₂, обладающих оксидазной миметической активностью: определены значения максимальной скорости реакции, константы Михаэлиса, каталитической константы. Показано, что оксидазная активность стабилизированных мальтодекстрином наночастиц диоксида церия зависит от водородного показателя среды.

Ключевые слова: оксидаза, катализ, наночастицы диоксида церия, ферментативная активность, каталитическая эффективность.

OXIDASE ACTIVITY OF CERIUM OXIDE NANOPARTICLES

Research article

Ofitserova N.Y.^{1,*}, Bazhukova I.N.², Talankina L.M.³, Lapina P.K.⁴, Smolnikova Y.N.⁵

¹ORCID : 0000-0001-8840-9908;

²ORCID : 0000-0001-7958-4296;

^{1, 2, 3, 4, 5} Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

* Corresponding author (n.ofitserova[at]mail.ru)

Abstract

Cerium oxide nanoparticles are a promising material for biomedical applications due to their ability to perform enzyme functions. The present research demonstrates the nanoparticle ability to imitate oxidase enzyme. The oxidase activity of cerium dioxide nanoparticles was studied by using a buffer solution and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine chromogenic substrate (TMB). The kinetic parameters values of the TMB oxidation process (Michaelis constant, maximum reaction rate, catalytic constant) were calculated. The results of a study in the oxidase activity of maltodextrin-coated cerium oxide nanoparticles are presented. This activity strongly depends on the solution pH.

Keywords: oxidase, catalysis, cerium dioxide nanoparticles, enzyme activity, catalytic efficiency.

Введение

В настоящее время ключевую роль среди наноэнзимов играют наноматериалы на основе диоксида церия. Наночастицы диоксида церия (НДЦ) вызывают большой интерес из-за широкого спектра применения в различных областях, таких как топливные элементы [1], датчики газа [2], поглотители ультрафиолета [3], и биомедицинские приложения [4]. НДЦ представляют интерес для медицины благодаря своей способности участвовать в процессах окисления-восстановления, обусловленной кислородной нестехиометрией. Именно присущая НДЦ кислородная нестехиометрия, образующаяся при удалении кислорода с поверхности, отвечает за его уникальную биологическую активность.

В зависимости от водородного показателя среды НДЦ проявляют как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства. Уникальность НДЦ заключается в возможности селективного уничтожения опухолевых клеток, которые характеризуются более кислым значением pH по сравнению со здоровыми. С одной стороны, в нейтральной среде наночастицы демонстрируют антиоксидантные свойства, что приводит к уменьшению окислительного стресса. С другой стороны, с уменьшением pH НДЦ наиболее активно проявляют прооксидантные свойства. В этом случае производство АФК увеличивается, а значит, гибель опухолевых клеток происходит эффективнее [5].

В литературе большое внимание уделяется исследованию антиоксидантных и прооксидантных свойств наночастиц CeO₂, а также изучению его мультиферментативной активности, т.е. способности выполнять функции ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и оксидазы [6].

Однако в литературе в настоящее время отсутствуют результаты комплексных исследований влияния кислотности среды на оксидазную активность наночастиц оксида церия. Более тщательное изучение этой темы, установление зависимости между этими параметрами позволит использовать НДЦ в качестве терапии для избирательного уничтожения злокачественных образований.

Методы и принципы исследования

Наночастицы оксида церия CeO_2 в мальтодекстриновой оболочке были получены методом осаждения согласно методике, представленной в работе [7]. Концентрация приготовленной суспензии наночастиц составила 10 мг/мл. С целью предотвращения образования агломератов частиц приготовленная суспензия подвергалась 30-минутной ультразвуковой обработке в ванне ПСБ-Галс. Для моделирования кислотности среды были приготовлены уксусно-ацетатные растворы трех значений pH: 4,0; 5,0; 6,0. Величина pH растворов контролировалась с помощью лабораторного иономера И-160МИ.

Оксидазная активность наночастиц церия была исследована с использованием буферного раствора и хромогенного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). В работе проведена серия опытов с разными значениями pH среды. Таблица 1 содержит список реагентов с указанием объемов и концентраций.

Таблица 1 - Объемы и концентрации реагентов

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.176.1>

Реагент	Буфер, pH=4,0; 5,0; 6,0	НДЦ	ТМБ
Концентрация, мг/мл	-	10	5
Объем, мкл	4000	80	10; 20; 40; 60; 80

Измерения зависимостей оптической плотности растворов от времени были проведены с использованием спектрофотометра ПЭ-5400УФ на длине волны 652 нм в течение 300 секунд. Затем из значений оптической плотности растворов была рассчитана концентрация продукта окисления ТМБ в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, при этом коэффициент молярного поглощения взят равным $39000 \text{ (моль/л)}^{-1}\text{см}^{-1}$ [8].

Согласно модели Михаэлиса – Ментен, при увеличении концентрации субстрата до определенного уровня скорость реакции достигает максимума:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{[S] + K_M} \quad (1)$$

где v – скорость реакции при определенной концентрации субстрата;

v_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции;

$[S]$ – концентрация субстрата;

K_M – константа Михаэлиса.

Путем линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен можно получить уравнение Лайнуивера-Берка (2):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (2)$$

где $1/v_{max}$ – пересечение с осью ординат;

K_M / v_{max} – тангенс угла наклона прямой;

$1 / K_M$ – отрезок, отсекаемый на оси абсцисс.

Основные результаты и обсуждение

Приготовленные растворы с различными значениями pH: 4,0; 5,0; 6,0 и одинаковым количеством ТМБ (0,8 ммоль/л) имеют различный оттенок, что говорит о разной оксидазной активности фермента. Из рисунка 1 следует, что в более щелочной среде активность фермента уменьшается.

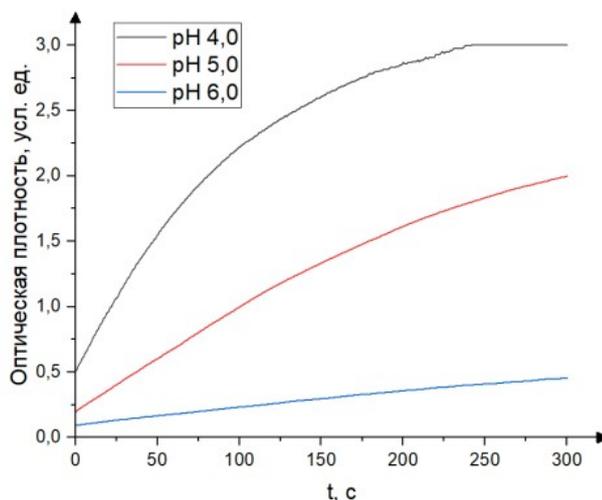


Рисунок 1 - Зависимость оптической плотности окисленного ТМБ от времени при концентрации субстрата ТМБ 0,8 ммоль/л на длине волны 652 нм в присутствии НДЦ при pH 4,0; 5,0; 6,0
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.176.2>

Для дальнейшего расчета констант были измерены кинетические кривые образцов при одинаковых концентрациях наночастиц оксида церия (CeO_2), но различных концентрациях субстрата (ТМБ: 0,1 ммоль/л, 0,2 ммоль/л, 0,4 ммоль/л, 0,6 ммоль/л, 0,8 ммоль/л). Полученные кривые приведены на рисунках 2-4.

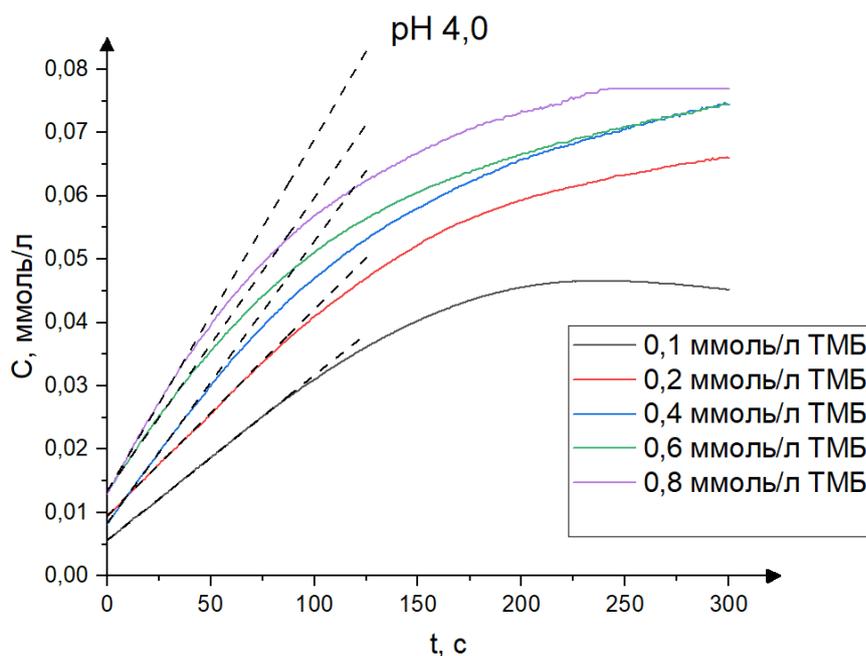


Рисунок 2 - Кинетика протекающей реакции окисления ТМБ при pH=4,0
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.176.3>

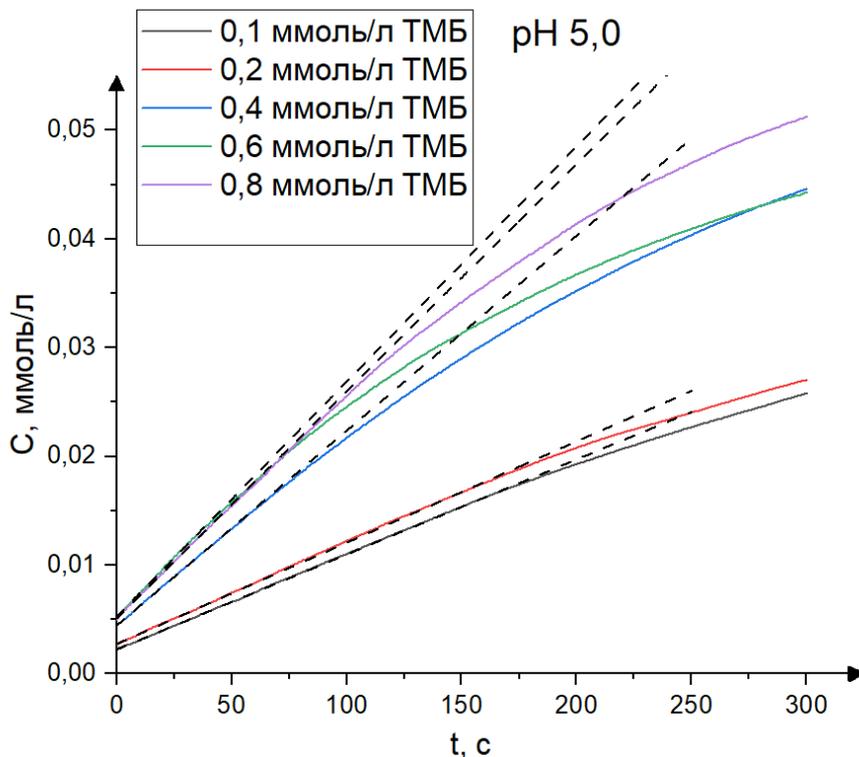


Рисунок 3 - Кинетика протекающей реакции окисления ТМБ при рН=5,0
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.176.4>

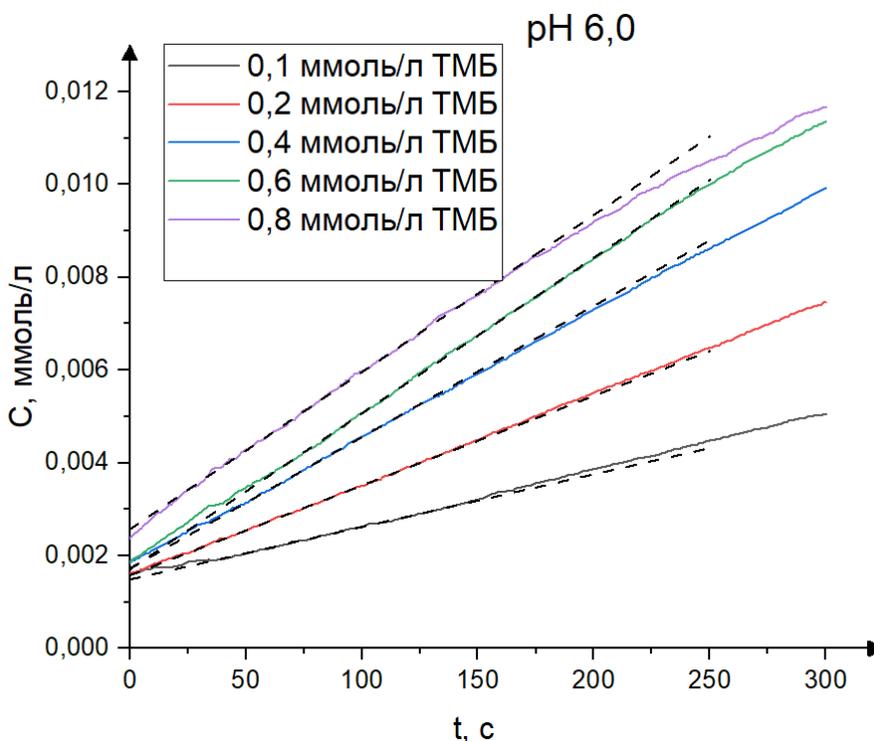


Рисунок 4 - Кинетика протекающей реакции окисления ТМБ при рН=6,0
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.176.5>

Далее была произведена обработка полученных кинетик по модели Лайнуивера-Берка, для этого были определены тангенсы углов наклона начальных участков графиков для кинетических кривых. Построенные в обратных координатах зависимости начальных скоростей реакции от концентрации субстрата ТМБ при разных значения рН среды представлены на рисунках 5-7.

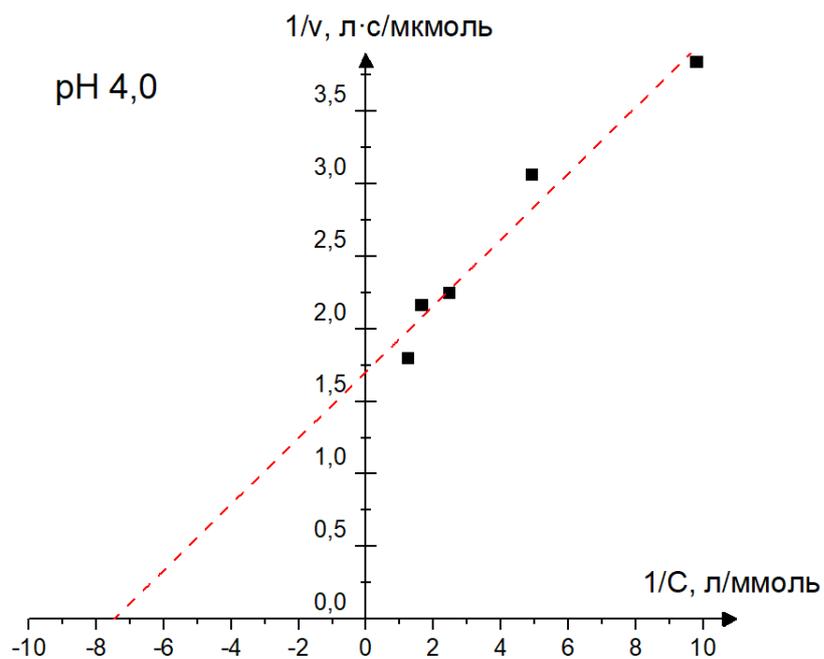


Рисунок 5 - График Лайнуивера-Берка при рН=4,0
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.176.6>

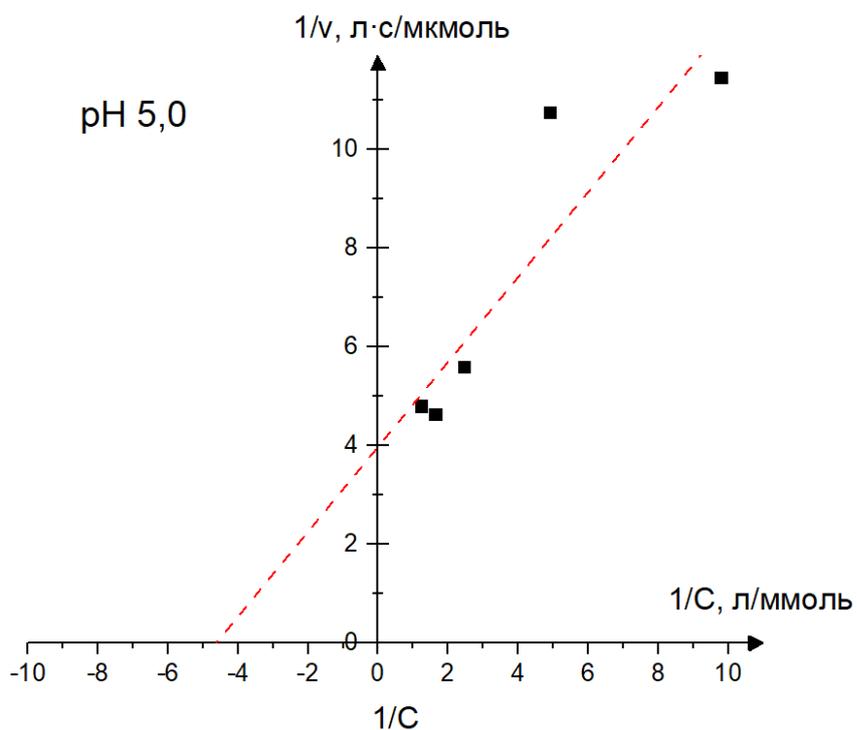


Рисунок 6 - График Лайнуивера-Берка при рН=5,0
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.176.7>

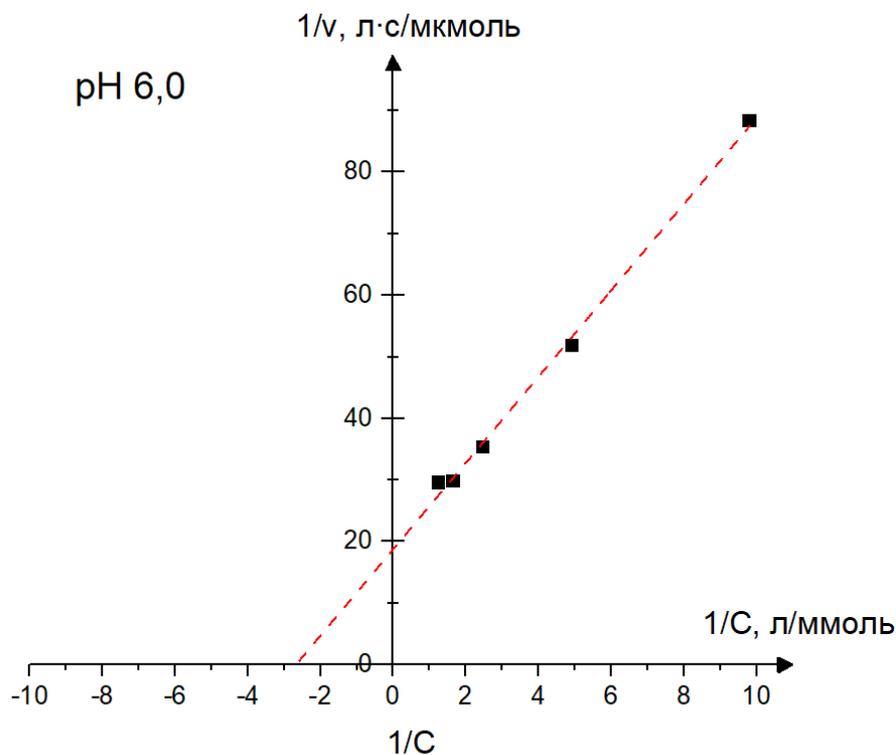


Рисунок 7 - График Лайнуивера-Берка при pH=6,0
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.176.8>

Рассчитанные по построенным графикам значения кинетических параметров приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Основные кинетические параметры процесса окисления ТМБ

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.176.9>

Кинетический параметр	pH=4,0	pH=5,0	pH=6,0
[E], ммоль/л	0,408		
K_M , ммоль/л	0,134	0,216	0,373
v_{max} , мкмоль/л с	0,587	0,252	0,053
k_{cat} , 10^{-3} с^{-1}	1,436	0,616	0,130
k_{cat}/K_M , л/с моль	10,739	2,848	0,349

где [E] – концентрация наночастиц CeO_2 ;

K_M – константа Михаэлиса;

v_{max} – максимальная скорость реакции;

k_{cat} – каталитическая константа,

где $k_{cat} = v_{max}/[E]$;

k_{cat}/K_M характеризует каталитическую эффективность нанoenзима.

Из таблицы видно, что значение K_M наименьшее при pH среды равном 4,0. Как известно, более низкое значение константы Михаэлиса свидетельствует о более быстром и предпочтительном связывании субстрата с ферментом, т. е. о более высоком сродстве фермента к данному субстрату. Наибольшая скорость реакции и каталитическая эффективность также наблюдается при pH=4,0.

Таким образом, окисление хромогенного субстрата ТМБ в присутствии оксида церия свидетельствует об оксидазной активности наночастиц, при этом с уменьшением pH среды данный тип активности увеличивается.

Заключение

В данной работе было проведено исследование оксидазной активности наночастиц CeO_2 , стабилизированных мальтодекстрином, в зависимости от условий внешней среды, а именно – от величины кислотности среды. Установлено, что ферментативная активность наночастиц CeO_2 сильно зависит от pH среды. Показано, что наночастицы наиболее активно проявляют оксидазные свойства в кислой среде, а при увеличении pH их активность снижается.

Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали прооксидантные свойства наночастиц оксида церия, которые в значительной степени зависят от условий внешней среды. Возможное использование наночастиц CeO₂ в медицине в качестве прооксидантов требует дальнейшего глубокого исследования их свойств и биологической активности.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

- Jacobs G. Low-temperature water-gas shift: in-situ DRIFTS- reaction study of a Pt/CeO₂ catalyst for fuel cell reformer applications / G. Jacobs, L. Williams, U. Graham et al. // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2003. — № 107. — P. 10398-10404.
- Jasinski P. Nanocrystalline undoped ceria oxygen sensor / P. Jasinski, T. Suzuki, H.U. Anderson // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2003. — № 95. — P. 73-77.
- Dao N.N. UV absorption by cerium oxide nanoparticles/epoxy composite thin films / N.N. Dao, M.D. Luu, Q.K. Nguyen et al. // *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. — 2011. — № 2. — P. 045013.
- Younce C.W. Hyperglycaemia-induced cardiomyocyte death is mediated via MCP-1 production and induction of a novel zinc-finger protein MCP-1P / C.W. Younce, K. Wang, P.E. Kolattukudy // *Cardiovascular research*. — 2010. — № 87. — P. 665-674.
- Saifia M.A. Nanoceria, the versatile nanoparticles: Promising biomedical applications / M.A. Saifia., S. Seal, C. Godugu // *Journal of Controlled Release*. — 2021. — № 338. — P. 164-189.
- Офицерова Н.Ю. Мультиферментативная активность наночастиц оксида церия, стабилизированных мальтодекстрином / Н.Ю. Офицерова, И.Н. Бажукова // *Актуальные проблемы развития естественных наук: сборник статей участников XXIV Областного конкурса научно-исследовательских работ «Научный Олимп» по направлению «Естественные науки»*. — Екатеринбург : Уральский федеральный университет, 2021. — С. 129-134.
- Пронина М.О. Синтез и исследование физико-химических свойств нанокристаллического диоксида церия / М.О. Пронина, Е.О. Бакшеев, М.А. Машковцев и др. // *Физика. Технологии. Инновации: тезисы докладов VI Международной молодежной научной конференции, посвященной 70-летию основания Физико-технологического института УрФУ*. — 2019. — Т. 2174. — С. 020156.
- Vinothkumar G. Size-and defect-controlled anti-oxidant enzyme mimetic and radical scavenging properties of cerium oxide nanoparticles / G. Vinothkumar, P. Arunkumar, A. Mahesh et al. // *New Journal of Chemistry*. — 2018. — № 42. — P. 18810-18823.
- Gupta A. Controlling the surface chemistry of cerium oxide nanoparticles for biological application / A. Gupta, S. Das, C. Neal et al. // *Journal of Materials Chemistry B*. — 2016. — Vol. 4. — № 19. — P. 3195-3202.
- Balamurugan A. Hydrothermal synthesis of samarium (Sm) doped cerium oxide (CeO₂) nanoparticles: Characterization and antibacterial activity / A. Balamurugan, M. Sudha, S. Surendhiran // *Materials Today: Proceedings*. — 2019. — Vol. 26. — № 1. — P. 1-7.
- Vinothkumar G. Ionic radii and concentration dependency of RE³⁺ (Eu³⁺, Nd³⁺, Pr³⁺, and La³⁺)-doped cerium oxide nanoparticles for enhanced multienzyme-mimetic and hydroxyl radical scavenging activity / G. Vinothkumar, S. Rengaraj, P. Arunkumar et al. // *The Journal of Physical Chemistry C*. — 2018. — Vol. 123. — № 1. — P. 541-553.

Список литературы на английском языке / References in English

- Jacobs G. Low-temperature water-gas shift: in-situ DRIFTS- reaction study of a Pt/CeO₂ catalyst for fuel cell reformer applications / G. Jacobs, L. Williams, U. Graham et al. // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2003. — № 107. — P. 10398-10404.
- Jasinski P. Nanocrystalline undoped ceria oxygen sensor / P. Jasinski, T. Suzuki, H.U. Anderson // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2003. — № 95. — P. 73-77.
- Dao N.N. UV absorption by cerium oxide nanoparticles/epoxy composite thin films / N.N. Dao, M.D. Luu, Q.K. Nguyen et al. // *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. — 2011. — № 2. — P. 045013.
- Younce C.W. Hyperglycaemia-induced cardiomyocyte death is mediated via MCP-1 production and induction of a novel zinc-finger protein MCP-1P / C.W. Younce, K. Wang, P.E. Kolattukudy // *Cardiovascular research*. — 2010. — № 87. — P. 665-674.
- Saifia M.A. Nanoceria, the versatile nanoparticles: Promising biomedical applications / M.A. Saifia., S. Seal, C. Godugu // *Journal of Controlled Release*. — 2021. — № 338. — P. 164-189.
- Oficerova N.Ju. Mul'tifermentativnaja aktivnost' nanochastich oksida cerija, stabilizirovannyh mal'todekstrinom [Multi-enzymatic activity of maltodextrin-coated cerium oxide nanoparticles] / N.Ju. Oficerova, I.N. Bazhukova // *Aktual'nye problemy razvitiya estestvennyh nauk [Actual problems of the development of natural sciences]: a collection of articles by*

participants of the XXIV Regional scientific research competition "Scientific Olympus" in the field of "Natural Sciences". — Ekaterinburg : Ural Federal University, 2021. — P. 129-134. [in Russian]

7. Pronina M.O. Sintez i issledovanie fiziko-himicheskikh svojstv nanokristalicheskogo dioksida cerija [7 Synthesis and study physicochemical properties of nanocrystalline ceria] / M.O. Pronina, E.O. Baksheev, M.A. Mashkovcev et al. // Fizika. Tehnologii. Innovacii [Physics. Technologies. Innovations]: abstracts of the VI International Youth Scientific Conference dedicated to the 70th anniversary of the founding of the UrFU Institute of Physics and Technology. — 2019. — Vol. 2174. — P. 020156. [in Russian]

8. Vinothkumar G. Size-and defect-controlled anti-oxidant enzyme mimetic and radical scavenging properties of cerium oxide nanoparticles / G. Vinothkumar, P. Arunkumar, A. Mahesh et al. // New Journal of Chemistry. — 2018. — № 42. — P. 18810-18823.

9. Gupta A. Controlling the surface chemistry of cerium oxide nanoparticles for biological application / A. Gupta, S. Das, C. Neal et al. // Journal of Materials Chemistry B. — 2016. — Vol. 4. — № 19. — P. 3195-3202.

10. Balamurugan A. Hydrothermal synthesis of samarium (Sm) doped cerium oxide (CeO₂) nanoparticles: Characterization and antibacterial activity / A. Balamurugan, M. Sudha, S. Surendhiran // Materials Today: Proceedings. — 2019. — Vol. 26. — № 1. — P. 1-7.

11. Vinothkumar G. Ionic radii and concentration dependency of RE³⁺ (Eu³⁺, Nd³⁺, Pr³⁺, and La³⁺)-doped cerium oxide nanoparticles for enhanced multienzyme-mimetic and hydroxyl radical scavenging activity / G. Vinothkumar, S. Rengaraj, P. Arunkumar et al. // The Journal of Physical Chemistry C. — 2018. — Vol. 123. — № 1. — P. 541-553.