ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ/PHYSICAL CHEMISTRY

DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.174

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦЕРИЯ В СРЕДАХ С РАЗЛИЧНОЙ КИСЛОТНОСТЬЮ

Научная статья

Лапина П.К.[1, *], Смольникова Е.Н.[2], Бажукова И.Н.[3], Мышкина А.В.[4]
[3] ORCID : 0000-0001-7958-4296;
[4] ORCID : 0000-0002-1750-3910;
[1, 2, 3, 4] Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (pln.lpn99[at]gmail.com)

Аннотация

Наночастицы диоксида церия являются перспективным материалом с точки зрения биомедицинских применений благодаря своей способности выполнять функции различных ферментов. Исследование особенностей проявления разных типов ферментативной активности позволяет объяснить механизмы протекания разных реакций и влияние на них окружающей среды. В работе изучены пероксидазная и оксидазная активности наночастиц диоксида церия, покрытых стабилизирующей мальтодекстриновой оболочкой, в зависимости от условий среды. Обнаружено, что ингибирование пероксидазоподобной реакции наблюдается при уменьшении объема субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Выполнена оценка значения константы Михаэлиса для пероксидазного типа активности и показано, что наночастицы диоксида церия проявляет сродство к хромогенному субстрату 3,3',5,5'-тетраметилбензидину, достаточное для их использования наряду с пероксидазой хрена в иммунологических тестах.

Ключевые слова: наноматериалы, оксид церия, мальтодекстрин, свободные радикалы, пероксидаза, оксидаза, каталитическая активность.

ENZYMATIC ACTIVITY OF CERIUM OXIDE NANOPARTICLES IN MEDIA WITH DIFFERENT ACIDITY

Research article

Lapina P.K.[1, *], Smolnikova Y.N.[2], Bazhukova I.N.[3], Mishkina A.V.[4]
[3] ORCID : 0000-0001-7958-4296;
[4] ORCID : 0000-0002-1750-3910;
[1, 2, 3, 4] Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

* Corresponding author (pln.lpn99[at]gmail.com)

Abstract

Cerium dioxide nanoparticles are promising materials for biomedical applications due to their ability to perform the functions of various enzymes. The study on the peculiarities of different types of enzymatic activity helps one to explain the mechanisms of different reactions and the influence of the environment on them. In this work we studied the peroxidase and oxidase activities of cerium dioxide nanoparticles coated with stabilizing maltodextrin shells depending on the environmental conditions. The inhibition of the peroxidase-like reaction was found to be observed when the volume of the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate is reduced. The value of the Michaelis constant for the peroxidase type of activity was assessed. The cerium dioxide nanoparticles were shown to exhibit an affinity for the chromogenic 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate, which is sufficient for their use along with horseradish peroxidase for immunological tests.

Keywords: cerium oxide, maltodextrin, peroxidase, oxidase, catalytic activity.

Введение

Проблема продления нормальной жизнедеятельности организма была актуальна во все времена. На биохимическом уровне секрет долголетия кроется в наличие антиоксидантной защиты организма, обеспечивающей контроль свободно-радикальных реакций. Ключевым фактором в поддержании достаточного уровня резистентности организма в условиях окислительного стресса, участвующего в патогенезе многих заболеваний, играют особые вещества – антиоксиданты [1].

Нанокристаллический диоксида церия проявляет химические свойства подобно энзимам, участвующим в реакциях нейтрализации экзогенных активных форм кислорода (АФК) в живых системах. С точки зрения физико-химических свойств данного соединения, эффект в системах in vitro и in vivo может быть обусловлен наличием кислородных вакансий в его структуре, а также двух стабильных степеней окисления [2]. При переходе от макроразмерного к наноразмерному диоксиду церия параметр элементарной ячейки увеличивается, что связано с удаление протонированного кислорода в форме воды с поверхности решетки с образованием кислородных вакансий [3], [4]. Происходит частичное восстановление атомов церия до степени окисления Ce^{3+}. Устойчивость наночастиц к внутренней среде организма и совместимость с ней обеспечивается наличием мальтодекстриновой оболочки [5]. Механизм протекания реакций с участием наночастиц диоксида церия (НДЦ) в качестве энзима зависит от параметров среды, которую необходимо подобрать таким образом, чтобы ее показатели были оптимальны для более активного проявления ферментативной активности наночастиц.

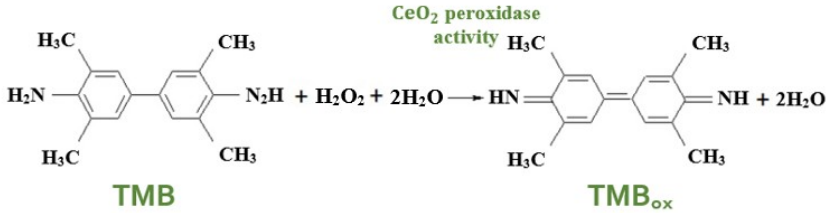
Поэтому целью данной работы стало исследование физико-химических свойств наночастиц оксида церия, стабилизированных мальтодекстрином, путем оценки их ферментативной активности в средах различной кислотности.

Для этого была исследована мультиферментативная активность НДЦ в зависимости от водородного показателя буферного раствора.

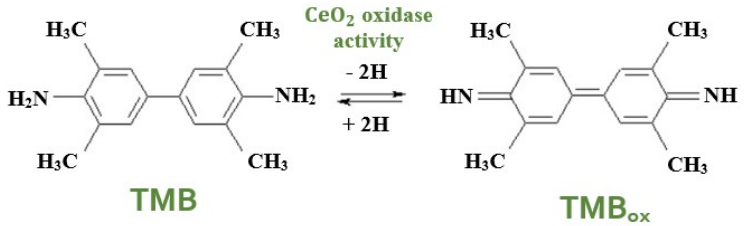
Детали эксперимента

Наночастицы диоксида церия были получены из раствора соли хлорида гептагидрата церия (III) путем химического осаждения. Для стабилизации НДЦ использовался мальтодекстрин, позволяющий получать устойчивые и нетоксичные золи [5]. Далее проводилась диспергация водных золей наночастиц (концентрация наночастиц в золе – 200 мкг/мл) с помощью ультразвука в течение 40 минут [6].

В основу изучения биологической активности наночастиц диоксида церия легла изображенная на рис.1 реакция окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), выступающего в роли субстрата, под действием пероксида водорода (a) в случае изучения пероксидазной активности и под действием кислорода (b) в ситуации, когда НДЦ выступают в качестве оксидазы.



а



б

Рисунок 1 - Механизм действия пероксидазы (*а*) и оксидазы (*б*) на субстрат ТМБ
DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.174.1

Нейтральный и кислый pH для моделирования внутренней среды живого организма были выбран, исходя из значений кислотности большинства биологических жидкостей организма человека (pH ≈ 6,7–7,3) и повышенной кислотности опухолевых клеток (pH ≈ 5,1–6,0) соответственно [7].

Для анализа пероксидазной активности наночастиц CeO_2 были измерены временные зависимости оптической плотности субстрата ТМБ после добавления в кювету пероксида водорода H_2O_2 [4]. Для оценки оксидазной активности были получены зависимости оптической плотности ТМБ от времени в смеси без пероксида водорода, а затем с его добавлением. При этом происходит окисление молекул субстрата ТМБ супероксид-анионом, который образуется в результате взаимодействия кислорода с оксидом церия.

Регистрация кривых оптической плотности окисленного субстрата ТМБ проводилась в течение 10 минут с использованием спектрофотометра ПЭ-5400УФ («Экросхим»), состоящего из источников излучения, оптической системы, формирующей рабочие пучки, монохроматора, кюветного отделения, фотоприемника и электронно-регистрирующей микропроцессорной системы. Управление прибором производилось с внешнего компьютера. Измерения проводились на длине волны 652 нм.

По полученным данным были построены графики зависимостей концентрации продуктов окисления ТМБ от времени, пересчитанные по закону Бугера–Ламберта–Бера (1).

$$A = \varepsilon \cdot L \cdot C, \tag{1}$$

где A – оптическая плотность;

ε – коэффициент молярного поглощения;

L – толщина кюветы, равная 1 см.

Зависимости концентрации субстрата от скорости реакции, определенной по наклону касательной к графику концентрации продукта от времени, соответствуют модели Михаэлиса–Ментен (2).

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \tag{2}$$

Константа Михаэлиса, рассчитанная в ходе работы для оценки активности НДЦ, может быть определена по графику уравнения Лайнуивера–Берка (3), который получается путем линеаризации уравнения Михаэлиса–Ментен.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \left(\frac{1}{[S]} + \frac{1}{K_m}\right) \quad (3)$$

Пересечение прямой с осью 1/[C] в отрицательной области дает значение, равное $-1/K_m$, по которому определяется величина константы Михаэлиса.

Результаты эксперимента и их обсуждение

Химизм реакций, протекающих с участием НДЦ, и, как следствие, их роль в биологических процессах организма, а именно взаимодействия энзима с субстратом, зависит от параметров окружающей среды, в том числе и водородного показателя раствора, в котором протекает реакция. Анализ влияния pH среды на биологическую активность НДЦ был проведен на основе кривых оптической плотности продуктов реакции окисления 3,3’,5,5’-тетраметилбензидина (ТМБ) в дистиллированной воде (pH = 7,0) и ацетатном буферном растворе (pH = 5,1). В случае последнего оценка свойств велась посредством построения разностных графиков зависимостей оптической плотности от времени. Выбор данного буферного раствора обусловлен наибольшей степенью сходства его химического состава с внутренней средой биообъекта.

При увеличении доли ионов Ce^{3+} свыше 40 % относительно валентного отношения Ce^{3+}/Ce^{4+} НДЦ проявляют пероксидазную активность вследствие наличия на поверхности кристаллической решетки ионов Ce^{3+}. Для пероксидазы субстратом является не только пероксид водорода, но и неорганические или молекулы органического и неорганического происхождения, которые окисляются пероксидом водорода в его присутствии [6].

Каталитическое восстановление пероксида водорода в присутствии молекулы ТМБ (наиболее распространенный субстрат пероксидазы), являющегося донором электронов, происходит в среде с нейтральным pH. В процессе реакции ТМБ окисляется в продукт, имеющий бирюзовую окраску и максимум оптического поглощения при 652 нм. Зависимость скорости каталитической реакции от концентрации субстрата имеет гиперболическую форму и соответствует уравнению ферментативной кинетики модели Михаэлиса-Ментен: реакция очень быстро протекает в первые минуты, после чего наступает этап субстратного насыщения, так называемое плато, что показано на рис. 2. На рис. 3 продемонстрировано применение способа линеаризации Лайнуивера-Берка.

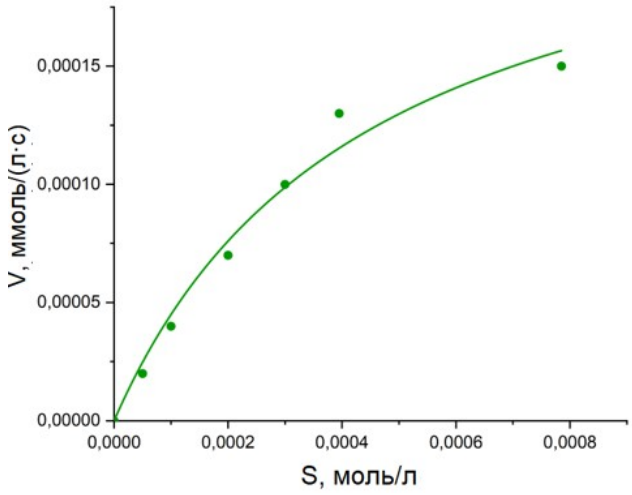


Рисунок 2 - Кривая зависимости концентрации субстрата ТМБ от скорости реакции, подчиняющаяся уравнению Михаэлиса-Ментен

DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.174.2

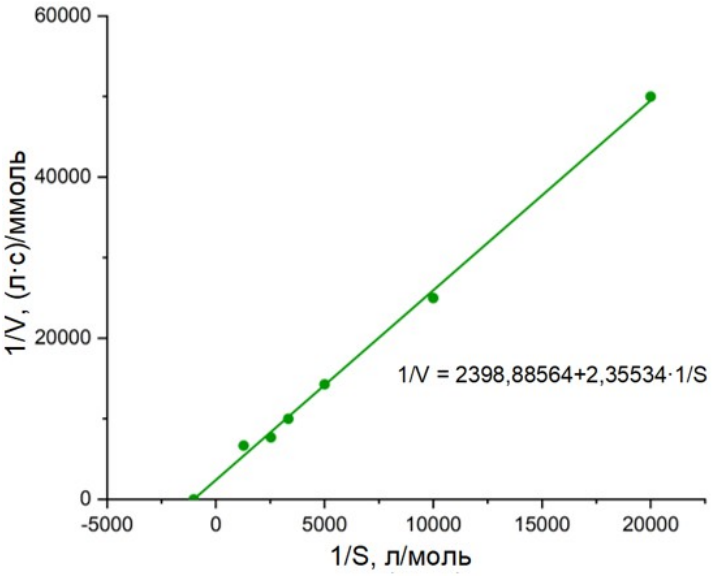


Рисунок 3 - Кривая субстратного насыщения в обратных координатах
DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.174.3

Для оценки сродства фермента к субстрату необходимо оценить константу Михаэлиса – кинематический параметр, равный концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции составляет половину от ее максимальной величины, при этом половина исходного количества НДЦ находится в состоянии фермент-субстратного комплекса. Полученное в ходе расчета значение составило K_m=0,98 ммоль/л. Значение K_m изменяется в диапазоне 1 – 10^{-8} моль/л, т. е. в данном случае НДЦ проявляет сродство к хромогенному субстрату ТМБ, достаточное для использования НДЦ наряду с пероксидазой хрена в иммунологических тестах.

Как видно из рис. 4, по мере увеличения концентрации субстрата наблюдается смещение кинетических кривых в сторону больших значений концентраций продукта реакции. При достижении объема ТМБ порядка 80 мкл (концентрация ТМБ – 10 мг/мл) зафиксировано снижение значения оптической плотности, что указывает на то, что определенная концентрация вводимого субстрата препятствует пероксидазной активности НДЦ. Дальнейшее увеличение объема вводимого раствора ТМБ приводит к перенасыщению раствора и выпадению осадка, активность НДЦ в качестве пероксидазы начинает падать.

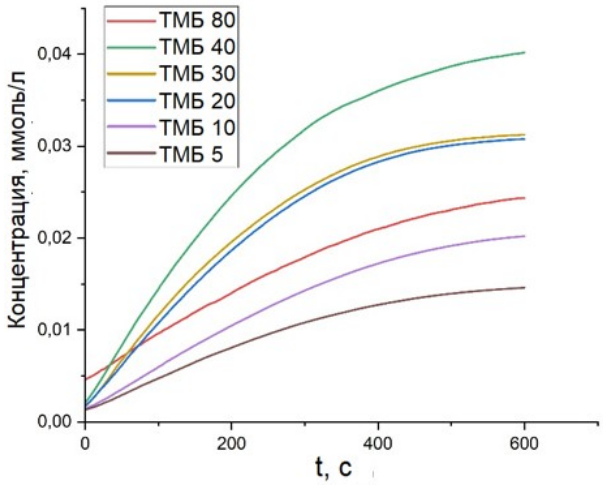


Рисунок 4 - Кинетические кривые зависимости окисленного ТМБ от времени при разных объемах вводимого субстрата
DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.174.4

При проведении реакции в ацетатном буфере (pH = 5,1) были зарегистрированы графики оптической плотности продукта реакции на длине волны 652 нм. Проявление активности НДЦ в отсутствии пероксида водорода H_2O_2 свидетельствует о возникновении конкурирующих реакций, катализируемых оксидазой и пероксидазой, в случае введения в раствор H_2O_2. Поведение разностных кривых зависит от объема добавленного субстрата: при его уменьшении заметно ингибирование реакции, катализируемой пероксидазой (рис. 5). Разложение пероксида водорода H_2O_2 в присутствии НДЦ происходит в цикле окисления-восстановления: ионы Ce^{3+}, находящиеся на поверхности кристаллической решетки, окисляются, после чего взаимодействие H_2O_2 с ионами Ce^{3+} приводит к разложению

молекулы до воды и кислорода. Эффективность восстановления НДЦ в кислой среде снижена, таким образом падает и скорость разложения H_2O_2 [8].

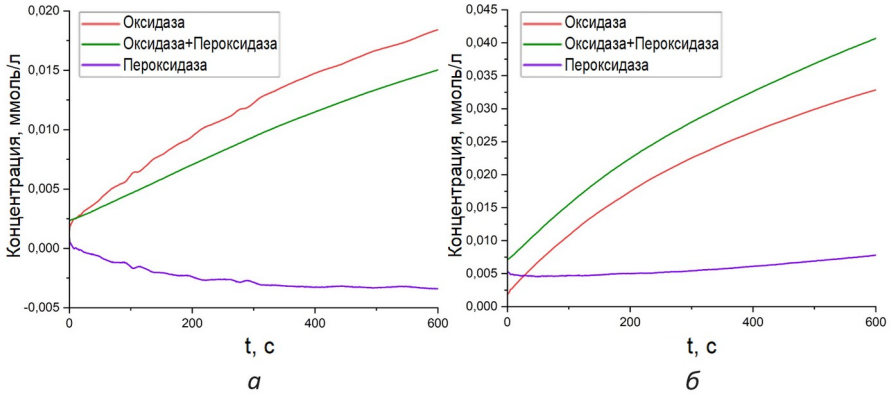


Рисунок 5 - Кривые оптической плотности продукта для конкурирующих реакций при добавлении субстрата: *а* – 5 мкл ТМБ; *б* – 40 мкл ТМБ

DOI: https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.174.5

Заключение

Результаты исследования показали, что наночастиц оксида церия способны выполнять функции ферментов пероксидазы и оксидазы. Проявление пероксидазного и оксидазного типов активностей сильно зависит от кислотности среды. Так, имитация поведения фермента пероксидазы наиболее активно происходит в среде с нейтральным pH, в то время как при снижении pH среды для наночастиц оксида церия характерны скорее оксидазоподобные свойства. В работе проанализированы особенности конкурирующих реакций, катализируемых наночастицами при имитации поведения ферментов оксидазы и пероксидазы. Обнаружено влияние объема субстрата на характер его окисления. Так, при уменьшении объема субстрата ТМБ обнаружено ингибирование реакции, катализируемой пероксидазой.

Проведена оценка значения константы Михаэлиса для пероксидазного типа активности и показано, что наночастицы диоксида церия проявляет сродство к хромогенному субстрату ТМБ, достаточное для их использования наряду с пероксидазой хрена в иммунологических тестах.

Полученные результаты могут являться основой для уточнения механизма механизмов мультиферментативной активности наночастиц оксида церия, особенно в условиях разной кислотности биологических сред.

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

1. Чанчаева Е.А. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека / Е.А. Чанчаева, Р.И. Айзман, А.Д. Герасев // Экология человека. — 2013. — №. 7. — С. 50-58.
2. Singh K. Cerium oxide nanoparticles: properties, biosynthesis and biomedical application / K. Singh, V. Nayak, T. Sarkar et al. // RSC Advances. — 2020. — Vol.10. — № 45. — P. 27194-27214.
3. Nelson B.C. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine / B.C. Nelson, M.E. Johnson, M.L. Walker et al. // Antioxidants. — 2016. — Vol. 5. — № 15. — P. 1-21.
4. Ходыкина Н.В. Острая токсичность наночастиц диоксида церия / Н.В. Ходыкина, Л.П. Точилкина, О.Н. Новикова и др. // Токсикологический вестник. — 2019. — № 3(156). — С. 55-62.
5. 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.
6. Ivanov V.K. Structure-sensitive properties and biomedical applications of nanodispersed cerium dioxide / V.K. Ivanov, A.B. Shcherbakov, A.V. Usatenko // Russian chemical reviews. — 2009. — Vol. 78. — №. 9. — P. 855.
7. Bazhukova I.N. Catalytic activity of cerium oxide nanoparticles / I.N. Bazhukova, I.A. Zvonareva, A.V. Myshkina at al. // NANOCON Conference Proceedings — International Conference on Nanomaterials. — 2020. — Vol. 2020. — P. 348-352.
8. Baksheev E.O. Synthesis and study physicochemical properties of nanocrystalline ceria / E.O. Baksheev, M.O. Pronina, M.A. Mashkovtsev at al. // AIP Conference Proceedings. — 2019. — Vol. 2174. — №. 1. — P. 020156.

9. Shcherbakov A.B. Synthesis and antioxidant activity of biocompatible maltodextrin-stabilized aqueous sols of nanocrystalline ceria / A.B. Shcherbakov, N.M. Zholobak, V.K. Ivanov et al. // Russian Journal of inorganic chemistry. — 2012. — Vol. 57. — P. 1411—1418.

10. Касьянова В.В. Наночастицы диоксида церия как потенциальные антиоксиданты / В.В. Касьянова, И.Н. Бажукова // Актуальные проблемы развития естественных наук. Сборник статей участников XXII Областного конкурса научно-исследовательских работ «Научный Олимп» по направлению «Естественные науки». — Екатеринбург, 2020. — С. 82-88.

11. Gerweck L.E. Tumor pH: implications for treatment and novel drug design / L.E. Gerweck // Seminars in radiation oncology. — 1998. — Vol. 8. — № 3. — P. 176-182.

12. Богданов А.А. Алкализация опухолевого микроокружения: есть ли перспективы в качестве мишени терапии? / А.А. Богданов, Ан.А. Богданов, В.М. Моисеенко // Практическая онкология. — 2022 — Т. 23. — №3 — С. 143-159.

13. Щербаков А.Б. Синтез и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия / А.Б. Щербаков, О.С. Иванова, Н.Я. Спивак и др. — Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2016. — 474 с.

14. Asati A. Oxidase-like activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles / A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis et al. // Angewandte Chemie International Edition. — 2009. — Vol. 48. — № 13. — P. 2308-2312.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Chanchaeva E.A. Sovremennoe predstavlenie ob antioksidantnoj sisteme organizma cheloveka [Current understanding of the antioxidant system of the human body] / E.A. Chanchaeva, R.I. Ajzman, A.D. Gerasev // Jekologija cheloveka [Human ecology]. — 2013. — №. 7. — P. 50-58. [in Russian]

2. Singh K. Cerium oxide nanoparticles: properties, biosynthesis and biomedical application / K. Singh, V. Nayak, T. Sarkar et al. // RSC Advances. — 2020. — Vol.10. — № 45. — P. 27194-27214.

3. Nelson B.C. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine / B.C. Nelson, M.E. Johnson, M.L. Walker et al. // Antioxidants. — 2016. — Vol. 5. — № 15. — P. 1-21.

4. Hodykina N.V. Ostraja toksichnost' nanochastic dioksida cerija [Acute toxicity of cerium dioxide nanoparticles] / N.V. Hodykina, L.P. Tochilkina, O.N. Novikova et al. // Toksikologicheskij vestnik [Toxicological Bulletin]. — 2019. — № 3(156). — P. 55-62. [in Russian]

5. 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.

6. Ivanov V.K. Structure-sensitive properties and biomedical applications of nanodispersed cerium dioxide / V.K. Ivanov, A.B. Shcherbakov, A.V. Usatenko // Russian chemical reviews. — 2009. — Vol. 78. — №. 9. — P. 855.

7. Bazhukova I.N. Catalytic activity of cerium oxide nanoparticles / I.N. Bazhukova, I.A. Zvonareva, A.V. Myshkina at al. // NANOCON Conference Proceedings — International Conference on Nanomaterials. — 2020. — Vol. 2020. — P. 348-352.

8. Baksheev E.O. Synthesis and study physicochemical properties of nanocrystalline ceria / E.O. Baksheev, M.O. Pronina, M.A. Mashkovtsev at al. // AIP Conference Proceedings. — 2019. — Vol. 2174. — №. 1. — P. 020156.

9. Shcherbakov A.B. Synthesis and antioxidant activity of biocompatible maltodextrin-stabilized aqueous sols of nanocrystalline ceria / A.B. Shcherbakov, N.M. Zholobak, V.K. Ivanov et al. // Russian Journal of inorganic chemistry. — 2012. — Vol. 57. — P. 1411—1418.

10. Kas'janova V.V. Nanochasticy dioksida cerija kak potencial'nye antioksidanty [Cerium dioxide nanoparticles as potential antioxidants] / V.V. Kas'janova, I.N. Bazhukova // Aktual'nye problemy razvitija estestvennyh nauk [Actual problems of development of natural sciences] Collection of articles of participants of the XXII Regional competition of research works "Scientific Olympus" in the direction of "Natural Sciences". — Yekaterinburg, 2020. — P. 82-88. [in Russian]

11. Gerweck L.E. Tumor pH: implications for treatment and novel drug design / L.E. Gerweck // Seminars in radiation oncology. — 1998. — Vol. 8. — № 3. — P. 176-182.

12. Bogdanov A.A. Alkalizacija opuholevogo mikrookruzhenija: est' li perspektivy v kachestve misheni terapii? [Alkalization of the tumor microenvironment: are there prospects as a target of therapy?] / A.A. Bogdanov, An.A. Bogdanov, V.M. Moiseenko // Prakticheskaja onkologija [Practical Oncology]. — 2022 — Vol. 23. — №3 — P. 143-159. [in Russian]

13. Shherbakov A.B. Sintez i biomedicinskie primenenija nanodispersnogo dioksida cerija [Synthesis and biomedical applications of nanodispersed cerium dioxide] / A.B. Shherbakov, O.S. Ivanova, N.Ja. Spivak et al. — Tomsk: Publishing House of Tomsk State University, 2016. — 474 p. [in Russian]

14. Asati A. Oxidase-like activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles / A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis et al. // Angewandte Chemie International Edition. — 2009. — Vol. 48. — № 13. — P. 2308-2312.