

mgr Agnieszka Małgorzata Pudlarz

**Analiza aktywności biologicznej nanocząstek srebra i złota
z unieruchomionymi enzymami antyoksydacyjnymi
in vitro i *in vivo*.**

Praca na stopień doktora nauk medycznych
wykonana w Zakładzie Biochemii Medycznej,
Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Położnictwa
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi



Promotor: prof. dr hab. n. med. Janusz Szemraj

Łódź 2019

Streszczenie

Wszystkie organizmy żywe oddychające tlenem są narażone na reaktywne formy tlenu (RFT), które powstają w warunkach fizjologicznych podczas procesów oddechowych jak i w warunkach patologicznych lub pod wpływem czynników zewnętrznych. Reaktywne formy tlenu są bardzo niebezpieczne, ponieważ mogą reagować z wieloma związkami organicznymi i uszkadzać znajdujące się w komórkach lipidy, białka oraz DNA. Aby zachować równowagę w komórkach organizmów tlenowych wykształciły się systemy antyoksydacyjne, należą do nich enzymy antyoksydacyjne m.in.: katalaza i dysmutaza ponadtlenkowa oraz niskocząsteczkowe antyoksydanty. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) usuwa rodnik ponadtlenkowy, przekształcając go do nadtlenu wodoru. Ten natomiast jest przekształcany do wody i tlenu w reakcji katalizowanej przez katalazę.

Wiele chorób charakteryzuje się zwiększoną syntezą reaktywnych form tlenu. Dlatego zastosowanie enzymów antyoksydacyjnych jako terapeutyków wydaje się być dobrą drogą leczenia. Jednak enzymy jako białka mogą łatwo zostać usunięte z organizmu lub mogą wywoływać odpowiedź immunologiczną. Zastosowanie nanocząstek jako nośników cząstek terapeutycznych jest jednym z rozwiązań. Zastosowanie takich nośników ułatwia dostarczanie leków, poprawia dostępność terapeutyków, ogranicza proteolizę białek, zmniejsza toksyczność oraz efekty uboczne.

Wiele rodzajów nanocząsteczek jest wykorzystywanych jako nośniki leków. Materiał z którego są zbudowane musi spełniać kilka podstawowych warunków jak biokompatybilność, nietoksyczność oraz biodegradowalność. Do takich nośników zaliczamy liposomy, nanocząstki polimerowe, nanotubki węglowe, nanocząstki superparamagnetyczne, nanocząstki srebra i złota. Dzięki swoim charakterystycznym właściwościom każdy rodzaj nanocząstek znajduje zastosowanie jako platforma transportująca dla cząstek terapeutycznych.

Nanocząstki srebra i złota wyróżniają się spośród innych nośników dzięki swoim specyficznym właściwościom optycznym, fizykochemicznym oraz biologicznym. Posiadają bardzo korzystny stosunek masy do objętości co pozwala na unieruchomienie dużych ilości białka na powierzchni. Reagują z wieloma substratami co pozwala na umieszczeniu na ich powierzchni wielu różnych cząsteczek.

Do stworzenia koniugatu nośnik-białko niezbędna jest odpowiednia ilość białka, którą można uzyskać w bakteryjnym systemie ekspresji. W takim systemie można wyprodukować stosunkowo duże ilości białka w tym rekombinowane białka ludzkie do celów terapeutycznych.

Celem pracy było wyprodukowanie rekombinowanych ludzkich enzymów antyoksydacyjnych katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej w bakteryjnym systemie ekspresji, unieruchomienie ich na nanocząstkach srebra i złota, zbadanie ich aktywności *in vitro* oraz *in vivo*. Nanocząstki złota i srebra zostały wyprodukowane metodami chemicznymi w kilku wariantach wielkości (13, 20, 31, 45, 52 nm dla złota oraz 13, 27, 33, 45 nm dla srebra). Białko na powierzchni zostało unieruchomione w trzech wariantach pokrycia 66, 100 oraz 133%. Następnie zbadano aktywność enzymów unieruchomionych na nanocząstkach i porównywano ją z aktywnością enzymów w roztworze wodnym o takim samym stężeniu. Preparaty były przechowywane w temperaturze pokojowej przez 10 i 18 dni odpowiednio dla katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej. W tym czasie badano jak zmienia się aktywność enzymatyczna koloidów w porównaniu do enzymów w roztworze wodnym.

Wyniki wskazują, że katalaza i dysmutaza ponadtlenkowa zostały unieruchomione na nanocząstkach złota i srebra w różnych wariantach pokrycia nanocząstek. Enzymy zachowały aktywność po unieruchomieniu. Jednak na nanocząstkach złota katalaza miała niższą aktywność w porównaniu do enzymu w roztworze wodnym. Unieruchomione enzymy na nanocząstkach złota jak i srebra zachowały aktywność przez 10 i 18 dni niezależnie od stopnia pokrycia nanocząstek. Po 10 dniach przechowywania immobilizowanej katalazy na nanocząstkach złota o średnicy 13 i 20 nm aktywność enzymu była wyższa w porównaniu do enzymu w wodzie. Najwyższą aktywność wykazywały preparaty gdzie pokrycie nanocząstek było najwyższe 133%. Stwierdzono także że aktywność SOD na nanocząstkach złota o średnicy 43 nm jest najwyższa w porównaniu do pozostałych preparatów SOD ze złotem. Unieruchomienie SOD na nanocząstkach srebra niestety nie zostało potwierdzone, dlatego nie możemy jednoznacznie stwierdzić czy uzyskane wyniki wynikają z oddziaływań nanocząstek na wolny czy immobilizowany enzym.

Uzyskane nanocząsteczki z unieruchomionymi enzymami antyoksydacyjnymi zostały wykorzystane w badaniach na zwierzęcym modelu poparzenia skóry wywołanego promieniowaniem UV. Wyniki wskazują na wpływ unieruchomionych enzymów antyoksydacyjnych na obniżenie poziomu markerów stresu oksydacyjnego oraz poprawę

działania systemów antyoksydacyjnych w komórkach skóry szczurów. Zastosowanie katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej jednocześnie znacznie bardziej wpływa na obniżenie szkodliwych efektów promieniowania UV oraz podwyższenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych w porównaniu do enzymów zastosowanych pojedynczo.

Wyniki opisane w poniższej pracy wskazują iż produkcja aktywnych rekombinowanych białek enzymatycznych w bakteryjnym systemie ekspresji jest skuteczną metodą uzyskiwania dużych ilości białka. Wykazano także iż unieruchamianie enzymów antyoksydacyjnych na nanocząstkach złota i srebra jest możliwe, jednak wpływa ono na aktywność enzymatyczną białek. Jednocześnie wyniki pokazują, że rodzaj i wielkość nanocząstek jak i stopień ich pokrycia także mają wpływ na aktywność preparatów. Zastosowanie immobilizowanych enzymów w zwierzęcym modelu poparzenia skóry promieniowaniem UV pomaga w usuwaniu szkodliwych produktów reaktywnych form tlenu i stymuluje systemy antyoksydacyjne obecne w komórkach. Praca ta daje podstawy do dalszych badań nad interakcjami między białkami a nanocząstkami, a także do dalszych badań *in vitro* jak i *in vivo*.