

mgr Agnieszka Małgorzata Pudlarz

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

Badania 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 nadtlenku 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*.

Summary

All living organisms breathing with oxygen are exposed on reactive oxygen species (ROS) which are generated under physiological conditions during respiratory processes and in pathological conditions or under the influence of external factors. Reactive oxygen species are dangerous because of their ability to react with many organic compounds and lead to peroxidation of lipids, oxidation of proteins and DNA in cells. To maintain the balance in the cells of oxygen breathing organisms the antioxidant systems have developed. They include antioxidant enzymes like catalase and superoxide dismutase and low molecular weight antioxidants. Superoxide dismutase reduce superoxide radical to hydrogen peroxide. Then catalase catalyzes reduction of hydrogen peroxide to water and oxygen.

Many diseases are characterized by increased synthesis of reactive oxygen species. Use of the antioxidant enzymes as therapeutic agents seems to be a good way of treatment. However enzymes as proteins can be easily removed from organism or can induce immune response. Use of nanoparticles as the delivery system of therapeutics is one of solutions. Such delivery systems facilitates delivery of therapeutics, improved their availability, reduce proteolysis of proteins, reduce toxicity or side effects.

Many types of nanoparticles are used as drug delivery system. The materials used for nanoparticles have to fulfill several features like biocompatibility, non-toxicity and biodegradability. Such carriers include liposomes, polymer nanoparticles, carbon nanotubes, superparamagnetic nanoparticles, gold and silver nanoparticles. Thanks to their characteristic properties each type of nanoparticles finds application as a transport platform for therapeutic particles.

Gold and silver nanoparticles distinguish from other carriers because of their specific optical, physicochemical, and biological properties. Surface to volume ratio of those nanoparticles is very beneficial what allows on immobilization of large amount of proteins on the surface. Those nanoparticles can react with many substrates what allows on immobilization of many different molecules on the surface.

The sufficient amount of protein is necessary to create conjugate nanoparticle-protein, which can be obtained in bacterial expression system. In such a system proteins, including human recombinant proteins, can be produced in relatively large amount for therapeutic treatment.

The aim of the work was to produce recombinant human antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase in bacterial expression system. Immobilization of the enzymes on silver and gold nanoparticles, checking their activity and investigating *in vivo* research. Silver and gold nanoparticles were synthesized with chemical methods in several variants of sizes (13, 20, 31, 45, 52 nm for gold and 13, 27, 33, 45 nm for silver). Proteins were immobilized on the surface of nanoparticles in three variants of coverage 66, 100 and 133%. Then activity of immobilized enzymes was investigated and compared with activity of enzyme in water solution with the same concentration. The solutions were stored at room temperature for 10 and 18 days respectively for catalase and superoxide dismutase. During this time the activity was measured several times for comparison activity of colloids and enzymes in water solutions.

The obtained results show that catalase and superoxide dismutase were immobilized on gold and silver nanoparticles in variety of coverage on all nanoparticles sizes. The enzymes have maintained the activity after immobilization. However activity of catalase on gold nanoparticles has decreased in comparison to the activity of the enzyme in water solution. Enzymes immobilized on gold and silver nanoparticles preserve activity for 10 and 18 days irrespectively of nanoparticles coverage. After 10 days of storage in room temperature activity of catalase immobilized on 13 and 20 nm gold nanoparticles was higher in comparison to the enzyme in water solution. Highest activity was observed in colloids with highest surface coverage of nanoparticles (133%). It has been found out that SOD activity on nanoparticles with 43 nm dimension was highest in comparison to other colloids with SOD immobilized on gold nanoparticles. Immobilization of SOD on silver nanoparticles has not been confirmed, therefore we cannot unambiguously determine whether the obtained result arise from the interaction of the nanoparticles with a free or immobilized enzyme.

The obtained nanoparticles with immobilized antioxidant enzymes were used on animal model of burned skin with UV radiation. The results show the influence of the immobilized enzymes on reduction of level of the oxidative stress markers and improvement of functioning antioxidant systems in rat skin cells. Application of catalase and superoxide dismutase simultaneously have greater influence on reduction of harmful effects of UV radiation and elevation of the activity of antioxidant enzymes in comparison to enzymes applied individually.

The results described in the following work show that production of active recombinant enzymatic proteins in bacterial expression system is efficient method of obtaining significant amount of protein. It has been also demonstrated that immobilization of the antioxidant enzymes on gold and silver nanoparticles is possible, however it affect enzymatic activity. At the same time the results presents that type and size of nanoparticles and grade of surface coverage has impact on colloids activity. Application of immobilized enzymes in animal model of burned skin with UV radiation help in removing harmful products of reactive oxygen species and stimulates antioxidant system present in cells. This work gives basis for further studies on interactions between proteins and nanoparticles, as well as for in vitro and in vivo studies.