

## **ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ ПЛАЗМОЗАМЕНТЕЛЕЙ (ЭЛЕКТРОЛИТОВ И СОРБИТА), НА АКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ**

**В.В. Паентко<sup>1</sup>, А.К. Матковский<sup>1</sup>, Ю.В. Матрунчик<sup>2</sup>, Ю.Л. Зуб<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины  
ул. Генерала Наумова, 17, Киев 03164 Украина, paentko@mail.ru*

<sup>2</sup>*Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси  
ул. Сурганова, 9, Минск 220072 Беларусь*

*Изучено влияние компонентов, входящих в состав таких плазмозаменителей как Сорбилакт и Реосорбилакт, на активность иммобилизованной холинэстеразы (ХЭ). Закрепление фермента осуществлялось путем его включения в структуру кремнеземного геля в процессе золь-гель превращения в присутствии гидроаккумулирующего комплекса (полиакриловая кислота/поливиниловый спирт). Показано, что в отличие от ранее описанных свойств компонентов плазмозаменителей активировать нативные холинэстеразы, в случае иммобилизованной ХЭ увеличение концентрации сорбита в системе в 2 раза снижает активность фермента в 1,5 раза.*

### **Введение**

Холинэстеразы (ХЭ) – группа ферментов, которая содержится в крови (бутирилхолинэстераза – в сыворотке, ацетилхолинэстераза – в эритроцитах). Изменение свойств крови, вызванное стрессом, отравлением организма, термическим воздействием и рядом заболеваний, вызывает падение активности ХЭ. В медицинской практике используется инфузионная терапия, суть которой состоит во введении тех или иных сред (например, плазмозаменителей, кровезаменителей), одной из функций которых является активация имеющихся в крови ферментов, в том числе и холинэстераз. Фактором, влияющим в этом случае на активность ХЭ, является электролитный состав вводимой среды. Присутствие сорбита в упомянутых выше средах обусловлено его способностью влиять на реологические свойства крови [1, 2]. Необходимость подобного рода активации иммобилизованных ХЭ часто связана с подбором оптимальных условий протекания ферментативного процесса как во время лечебной практики, когда методика требует выполнения манипуляций вне организма, так и в аналитических исследованиях.

Целью исследования было изучение возможности целенаправленно регулировать активность иммобилизованной холинэстеразы печени курицы домашней *Gallus gallus*. В настоящей работе изучалось влияние на активность холинэстеразы двух плазмозаменителей – Сорбилакта и Реосорбилакта, а также сорбита. Оба препарата обладают одинаковым электролитным составом (хлориды натрия, калия, магния и кальция), но содержат разное количество сорбита (200 и 60 г/л соответственно [1, 2]).

### **Экспериментальная часть**

Для синтеза композитов использовали следующие реактивы: силикат натрия (хч), гидратированная кремниевая кислота (ч) (Реахим), гомогенат печени *Gallus gallus*, гидроаккумулирующий комплекс на основе поливинилового спирта и полиакриловой кислоты, Сорбилакт (Юрия–фарм), Реосорбилакт (Юрия–фарм), сорбит (фарм.), 1н раствор HCl (хч).

**Методика получения гомогената печени *Gallus gallus*.** Для приготовления гомогенатов образцы тканей печени (0,5 г) промывали дистиллированной водой, измельчали, растирали в ступке со стеклянным песком и небольшим количеством дистиллированной воды до получения однородной массы. Растертую массу переносили в колбу, доводили объем жидкости до 40 см<sup>3</sup> и оставляли на 30–60 мин. для экстракции. Полученный гомогенат фильтровали через два слоя фильтровальной бумаги. Фильтрат использовался для определения активности и получения иммобилизованных препаратов. Гомогенат готовили в день исследования и хранили на льду [3].

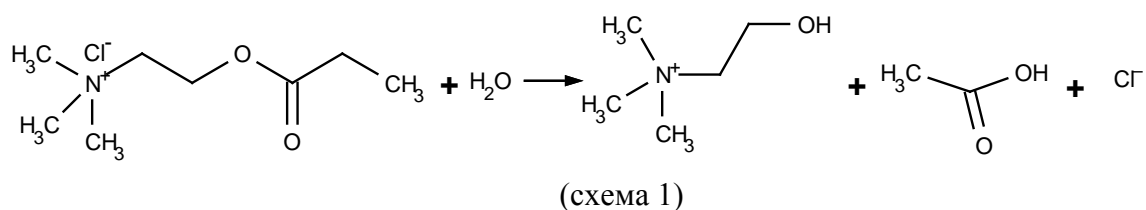
**Полимерный комплекс на основе полиакриловой кислоты (ПАК) и поливинилового спирта (ПВС) [4,5].** Для получения полимерной оболочки ферментативного препарата использовался комплекс с соотношением ПАК: ПВС = 10:1, причем величина рН его дисперсий в плазмозаменителях при разведении 1:200 и растворах сорбита той же концентрации составляла 6, что соответствует условию сохранению наибольшей активности ХЭ при иммобилизации.

**Синтез композитных материалов с иммобилизованной ХЭ.** Зо́ль SiO<sub>2</sub>, полученный из силиката натрия и гидратированной кремниевой кислоты [6, 7, с. 149–156], разбавляли водой в соотношениях, указанных в табл. 1, и подкисляли хлористоводородной кислотой до рН=6. При синтезе образцов 1 и 3 в систему добавляли дисперсию гомогената в полимерной оболочке в растворе сорбита с концентрацией 0,3 и 1 г/л соответственно. При получении образцов 2 и 4 вместо раствора сорбита вводились плазмозаменители в разведении 1:200 (табл. 1). Образование гелей наблюдалось в течение примерно 30 мин. Полученные препараты сушили при 25 °С до воздушно-сухого состояния и хранили при 4°С.

**Таблица 1.** Условия синтеза композитных материалов

Образец	V золя, см <sup>3</sup>	V воды, см <sup>3</sup>	Раствор сорбита или соответствующий плазмозаменитель	V (дисперсии сшитого полимера), см <sup>3</sup>	V гомогената, см <sup>3</sup>	рН реакционной смеси
1	10	10	Раствор сорбита, 0,3 г/л	10	10	6
2	10	10	Реосорбилакт (1:200)	10	10	6
3	10	10	Раствор сорбита, 1 г/л	10	10	6
4	10	10	Сорбилакт (1:200)	10	10	6

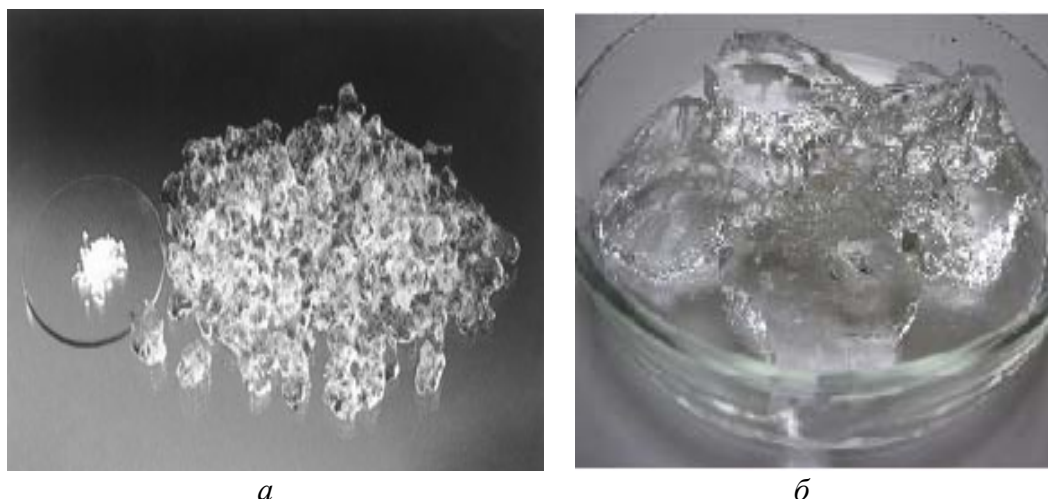
**Определение активности нативной и иммобилизованной холинэстеразы (ХЭ) в реакции расщепления ацетилхолинхлорида.** Каталитическая активность всех полученных образцов изучалась в реакции гидролиза ацетилхолинхлорида (оптимального субстрата ХЭ) [8, 9]. Раствор субстрата 4 мМ готовили непосредственно перед исследованием в 350 см<sup>3</sup> дистиллированной воды с добавлением 10 см<sup>3</sup> 1,6 М MgCl<sub>2</sub> и 40 см<sup>3</sup> 1 М NaCl. Потом его инкубировали 10 мин. при 37°С, после чего рН доводили до 8,3 добавлением 0,02 н NaOH. Затем вводили 0,4 см<sup>3</sup> раствора фермента либо 0,030–0,033 г ферментсодержащего препарата. Фиксировали время реакции, за которое величина рН достигает значение, равное 8,0 Активность ХЭ определяли по количеству образовавшегося продукта реакции – уксусной кислоты (см. схему 1) за единицу времени. Количество выделившейся кислоты за соответствующие промежутки времени устанавливали методом потенциометрического титрования 0,02н раствором NaOH на высокоточном титраторе АТП-02 (“Аквилон”, РФ). За единицу активности принимается количество прогидролизовавшего субстрата в течении 1 мин при рН 8.0 и 37°С [8, 9].



### Результаты и их обсуждение

В литературе достаточно широко описано применение природных компонентов в качестве оболочки, создающей для ферментативного препарата условия, близкие к *in vivo*. Однако, несмотря на хорошую совместимость биополимеров с ферментами, они не отличаются стабильностью состава. Поэтому не всегда можно ожидать воспроизводимости свойств иммобилизованных препаратов. В этом отношении синтетические полимеры имеют значительное преимущество, но только в том случае, если они способны обеспечить такое же благоприятное окружение для фермента, как и природное.

К таким полимерам можно отнести полимерный комплекс ПАК/ПВС, который способен аккумулировать большое количество воды и/или водных растворов (до 2000 г воды/г сухого полимера) (см. рис. 1) и биосовместим. Последнее свойство гидроаккумулирующего комплекса ранее было подтверждено при проращивании семян моркови *Carota sp.* в питательной среде микроэлементов, входящей в состав комплекса [10]. Ранее [11] нами исследовано влияние природы полимерной оболочки на активность иммобилизованной ХЭ. Результаты показали, что при использовании комплекса ПАК/ПВС он способствует наибольшему сохранению активности фермента по сравнению с желатином и поливиниловым спиртом различных степеней полимеризации. Вводя в состав композитов одинаковое количество гидроаккумулирующего комплекса, мы предполагали одинаковую степень его влияния на активность иммобилизованного препарата.



**Рис. 1.** Полимерный комплекс на основе полиакриловой кислоты и поливинилового спирта: *а* - изменение объема полимерного материала в процессе набухания; *б* - полимерный комплекс с поглощенным плазмозаменителем и гомогенатом.

В этой работе комплекс использован в качестве полимерной оболочки ферментативного препарата (ПАК/ПВС=10:1, рН = 6). На рис. 1 *а* изображено изменение объема полимерного материала в процессе набухания, а на рис. 1 *б* – полимерный комплекс с поглощенным плазмозаменителем и гомогенатом.

Во всех случаях на начальной стадии синтеза фермент был предварительно включен в гидроаккумулирующий комплекс на основе полиакриловой кислоты и поливинилового спирта с последующим его внедрением в кремнеземную матрицу золь-гель методом.

В предыдущей работе [6], где нами в качестве полимерной оболочки применялся желатин, также отмечалось влияние электролитов, выделяющихся в процессе осаждения кремнеземной матрицы и входящих в состав используемого буферного раствора, на активность иммобилизованной ХЭ. Было показано, что величина активности возрастает при достаточно высокой концентрации электролитов, при которой (согласно данным [12]) возрастает транспортная способность субстрата к активному центру фермента. В используемых плазмозаменителях концентрация электролитов достаточно высока и их соотношения подобраны таким образом, чтобы максимально возобновлять активность находящихся в организме ферментов, в том числе ХЭ.

Активность нативной ХЭ, установленная по приведенной в [9] методике, составляла  $1,14 \pm 0,01$  ед\мг. В табл. 2 приведены значения активности препаратов с иммобилизованной ХЭ в зависимости от содержания плазмозаменителей и сорбита. Плазмозаменители (Реосорбилакт и Сорбилакт) содержат разное количество сорбита. В связи с этим можно предположить, что их влияние на активность фермента будет различным, так как их электролитный состав одинаковый.

**Таблица 2.** Холинэстеразная активность иммобилизованной холинэстеразы

Образец	Раствор сорбита или плазмозаменитель	Содержание сорбита (г) в пересчете на 1г композита	Активность иммобилизованной холинэстеразы (ед\мг)
1	Раствор сорбита (0,3 г/л)	0,0115	$2,31 \pm 0,01$
2	Реосорбилакт (1:200)	0,0115	$4,38 \pm 0,01$
3	Раствор сорбита (1 г/л)	0,0200	$1,25 \pm 0,14$
4	Сорбилакт (1:200)	0,0200	$3,28 \pm 0,01$

При синтезе образцов 2 и 4 в реакционную смесь плазмозаменители вводили при разведении 1:200, что обуславливало при синтезе однородное гелеобразование. В других случаях добавлялись растворы сорбита, содержание которого соответствовало таковому в плазмозаменителях, (образцы 1 и 3), однако в этом случае отсутствовал электролит.

Как видно из табл. 2, все полученные образцы с иммобилизованной ХЭ обладают более высокой активностью по сравнению с нативной. Наиболее высокое значение активности наблюдается у образца 2, содержащего Реосорбилакт. В случае введения Сорбилакта (образец 4) величина активности несколько ниже. Когда дополнительным компонентом системы является сорбит, то наблюдается снижение активности иммобилизованной ХЭ, причем оно более существенно с увеличением содержания сорбита (ср. образцы 1 и 3). Это позволило предположить, что активность иммобилизованных препаратов определяется содержанием электролитов.

## Выводы

Разработана методика получения композитных материалов на основе золя  $\text{SiO}_2$ , гидроаккумулирующего комплекса, плазмозаменителей, сорбита и гомогената печени *Gallus gallus*, обладающих холинэстеразной активностью. На примере реакции гидролиза ацетилхолинхлорида показано, что каталитическая активность полученных гетерогенизированных препаратов определяется микроокружением ферментативного

препарата, а именно наличием электролитов плазмозаменителей и содержанием сорбита. Очевидно, что варьирование концентрации электролита и сорбита позволяет регулировать активность композитных материалов с иммобилизованной ХЭ.

### Литература

1. Гаврилов О. К. Справочник по переливанию крови и кровезаменителей. – М.: Медицина, 1982.–392с.
2. Использование растворов многоатомных спиртов (препаратов «Сорбилакт» и «Реосорбилакт») в интенсивной терапии при тяжелой политравме: Метод. Рекомендации/Сост. И.П.Шлапак, И.Р.Малыш, Л.В. Згржебловская. – К.:2003.— 29с.
3. Малинин О.А. Определение фосфорорганических пестицидов // Ветеринария.– 1979.–№1.– с.72–77.
4. Матрунчик Ю.В. Гидроаккумулирующий полимерный комплекс на основе полиакриловой кислоты и поливинилового спирта // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2008. – № 4. – С. 81–84.
5. Матрунчик Ю.В., Воробьева Е.В., Крутько Н.П. Гидроаккумулирующие материалы на основе полимерных комплексов // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: тез. докл. – Москва, 23-28 сентября. 2007. – Т. 3. – С. 328.
6. Паентко В.В., Матковский А.К., Юрченко Г.Р., Зуб Ю.Л.Получение золь-гель методом композитов на основе кремнезема, желатина и гомогената печени курицы домашней Gallus gallus // Хімія, фізика і технологія поверхні.–2012.–Т.3.–№1.– С. 108-113
7. Шабанова Н.А.,Саркисов П.Д. Основы золь-гель технологии нанодисперсного кремнезема.- Москва:ИКЦ «Академкнига»,2004.-208с.
8. Яковлев В.А.Кинетика ферментативного катализа. – М.: Химия .–1965.–458с
9. Enzymatic Assay of CHOLINESTERASE, ACETYL (EC 3.1.1.7) //Reagent Chemicals ACS Specifications –1993.–. –85 p
10. Матрунчик Ю.В., Воробьева Е.В., Крутько Н.П., Басальга И.И. Степень набухания гидроаккумулирующего комплекса на основе полиакриловой кислоты в растворах солей // Докл. Нац. акад. навук Беларусі.–2009.–Т.53.–№5.–с.59-62
11. Паентко В.В., Матковский А.К., Матрунчик Ю.В, Юрченко Г.Р., Воробьева Е.В., Зуб Ю.Л. Композиты на основе кремнезема, содержащие холинэстеразу // ПОЛИКОМТРИБ-2011: Тез. докл. междунар. науч.-техн. Конф. — Гомель: ИММС НАНБ, 2011. — 169 с.
12. Стойкова Е.Е. Экспресс-определение загрязнителей окружающей среды с помощью ферментативных колориметрических тестов:автореф. дис. канд. хим. Наук.- Казань,1997. – 20с.

**ВПЛИВ КОМПОНЕНТІВ, ЯКІ ВХОДЯТЬ ДО СКЛАДУ ПЛАЗМОЗАМІННИКІВ  
(ЕЛЕКТРОЛІТІВ І СОРБИТУ), НА АКТИВНІСТЬ  
ІММОБІЛІЗОВАНОЇ ХОЛІН ЕСТЕРАЗИ**

**В.В. Паєнтко<sup>1</sup>, О.К. Матковський<sup>1</sup>, Ю.В. Матрунчик<sup>2</sup>, Ю.Л. Зуб<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України  
вул. Генерала Наумова 17, Київ, 03164, Україна*

*Інститут загальної та неорганічної хімії Національної академії наук Білорусі  
9, корп. 1, вул. Сурганова, Мінськ 220072 Білорусь*

*Вивчено вплив компонентів, які входять до складу таких плазмо замінників, як Сорбілакт і Реосорбілакт, на активність іммобілізованої холінестерази (ХЕ). Закріплення фермента здійснювалось шляхом його включення в структуру кремнеземного гелю в процесі золь-гель перетворень у присутності гідроакумуючого комплексу (поліакрилова кислота/полівініловий спирт). Показано, що на відміну від раніше описаних властивостей компонентів плазмозамінників активувати нативні холінестерази, у випадку іммобілізованої ХЕ збільшення концентрації сорбіту в системі у 2 рази знижує активність фермента в 1,5 рази*

**THE INFLUENCE OF COMPONENTS IN PLASMASUBSTITUTES ON THE  
ACTIVITY OF IMMOBILIZED CHOLINESTERASE**

**V.V. Payentko<sup>1</sup>, A.K. Matkovsky<sup>1</sup>, Yu.V. Matrunchik<sup>2</sup>, Yu.L. Zub<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Chuiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine  
17 General Naumov street, Kyiv 03164 Ukraine*

<sup>2</sup>*The Institute of General and Inorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus  
1/9 Surganov Street, Minsk BY-220072, Republic of Belarus*

*It has been studied how the cholinesterase activity of immobilized cholinesterase is influenced by components containing in such plasmasubstitutes as Sorbilact and Reosorbilact. Fixation of ferments has been carried out by it's introduction in the silica gel structure during sol-gel transformation in the presence of hydroaccumulating complex (polyacryl acid polyvinyl alcohol). Differently from earlier described characteristics of components of plasmasubstitutes to activate the native cholinesterase, the times 1.5 decrease in activity of ferment with the twice increasing of sorbitol concentration for immobilized cholinesterase has been shown.*