

ДЕЙСТВИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА СВОБОДНЫЕ И ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ТРИПСИН И КОЛЛАГЕНАЗУ

Панкова С.М., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет

Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: sazykina.93@mail.ru

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. Исследованы механизмы воздействия УФ-света в диапазоне доз 151-6040 Дж/м² на трипсин и коллагеназу, свободные и иммобилизованные на матрице кислоторастворимых средномолекулярного (200 кДа) и высокомолекулярного (350 кДа) хитозанов. Ферментативная активность молекул свободных протеаз под воздействием УФ-света подвержена изменению в большей степени, чем в иммобилизованном состоянии. Иммобилизация приводит к повышению стабильности гетерогенных биокатализаторов по отношению к УФ-облучению по сравнению со свободными энзимами, возможно, за счет образования комплекса фермент-носитель, белки становятся более устойчивыми к такому физическому агенту как УФ-свет. Приведенные в работе данные свидетельствуют о фотопротекторном эффекте матрицы хитозана, который может быть обусловлен следующими причинами: молекулы трипсина и коллагеназы при взаимодействии с матрицей хитозана образуют фоторезистентные комплексы; молекулы хитозана экранируют активные фотопродукты свободнорадикальной природы, предотвращая фотоокисление определенного числа аминокислот указанных ферментов при воздействии УФ-облучения.

Ключевые слова: УФ-излучение, трипсин, коллагеназа, иммобилизация, хитозан.

В настоящее время большое внимание уделяется проблеме изучения фотодеструктивных реакций, протекающих в биологических системах под действием света ультрафиолетовой (УФ) области спектра. Это связано, прежде всего, с важной ролью фотопрощесом в реализации фототоксических и фотоканцерогенных эффектов в коже человека при действии солнечного излучения и поиском эффективных эндогенных фотозащитных систем, уменьшающих повреждающее действие ультрафиолетового излучения на биологические системы. Основной задачей исследователей остается изучение и анализ механизмов трансформации энергии УФ-излучения, поглощенной живыми системами различных уровней организации. Это, в первую очередь, связано с тем, что УФ-свет выступает в качестве тонкого регуляторного агента, позволяющего исследовать биофизические основы взаимосвязей сетей, обеспечивающих поддержание различных типов гомеостатических процессов организма [1, 2]. Немаловажной задачей является изучение структуры и физико-химических свойств ферментов, иммобилизованных на полимерных носителях. Сорбентом природного происхождения является хитозан, который представляет собой продукт деацетилирования хитина. Данный полимер обладает биосовместимостью, низкой токсичностью и неиммуногенностью, что обуславливает широкое применение этого катионного биополимера в медицине и фармакологии – от покрытий на раны и ожоги до систем направленной доставки лекарств в микрочастицах [3]. Особую значимость приобретают работы по выявлению типов взаимодействий энзимов с различными соединениями на молекулярном уровне, способствующие пониманию механизмов действия полиферментных систем и разработке путей регуляции активности биокатализаторов. Наиболее широко используемыми в медицинской практике являются протеолитические ферменты. Характерной чертой протеаз является избирательное расщепление денатурированных белков некротических тканей при отсутствии воздействия на живые участки, т.е. при помощи ферментативного лизиса из организма в основном удаляются белки омертвевших тканей.

Коллагеназа (КФ 3.4.24.3) – фермент, способный гидролизовать нативный коллаген при физиологических значениях pH и температуры. В настоящее время известно 7 видов коллагеназы, синтезируемой возбудителем газовой гангрены *Clostridium histolyticum*. Все коллагеназы *C. histolyticum* представляют собой одноцепочечные белки. Молярные массы ферментов варьируют от 68 до 130 кДа. Они используются в диагностических и лабораторных целях: для удаления некротических тканей из ран на микроскопическом уровне, лечения заболеваний глаз в офтальмологии, после операционных спаек, морщин, ускорения рассасывания швов из кетгута и рубцовых образований [4-6].

Трипсин (КФ 3.4.21.4) – фермент класса гидролаз, расщепляющий пептиды и белки; обладает также эстеразной (гидролиз сложных эфиров) активностью. Трипсин синтезируется в поджелудочной железе в виде неактивного предшественника (профермента) трипсиногена. Молекулярная масса трипсина составляет 25 кДа. Трипсин используют для изготовления лекарств. Препараты трипсина обладают противовоспалительным и противоотечным действием (при внутривенном и внутримышечном введении); способны избирательно расщеплять ткани, подвергшиеся некрозу. В медицине трипсин применяют для лечения ран, ожогов, тромбозов, часто в сочетании с другими ферментами и с антибиотиками [7].

Известен способ лечения ожоговых ран путем воздействия светом от источника ультрафиолетового излучения, прошедшим предварительно через полимерную пленку, расположенную на расстоянии 15-20 см от раневой поверхности. Данный метод обладает бактерицидным эффектом, способствует стимуляции репаративных процессов и ускорению эпителизации, что приводит к уменьшению сроков госпитализации [2, 4].

Облучение ожоговых ран ультрафиолетовым светом коротковолнового спектра является эффективным способом их лечения, благодаря выраженному антибактериальному эффекту ультрафиолетового излучения, а также его поверхностному действию, в итоге было зафиксировано отсутствие микроабсцессов и клеточной инфильтрации [2].

Таким образом, комплексное использование действия УФ-излучения, трипсина и/или коллагеназы, возможно, будет способствовать более быстрому восстановлению раны или ожога и сокращению сроков заживления кожных покровов. В связи с этим целью нашей работы стало изучение действия УФ-излучения на свободные и иммобилизованные протеазы.

В качестве объекта исследования был выбран трипсин быка фирмы “MP biomedical”, коллагеназа из *Clostridium histolyticum* фирмы “Sigma-Aldrich”, субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы “Sigma-Aldrich”, носителями для иммобилизации – два вида хитозана, синтезированных ЗАО “Биопрогресс”: хитозан пищевой кислоторастворимый среднемoleкулярный ($M_r = 200$ кДа, степень деацетилирования (СД) 82%) и хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный ($M_r = 350$ кДа, СД = 94,85%).

Иммобилизацию ферментов на хитозане осуществляли адсорбционным методом. 1 г носителя помещали на 1 ч при комнатной температуре в 10 мл фосфатного буфера (рН 5.8). Далее к суспензии хитозана добавляли 5 мл раствора трипсина и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 2 ч при температуре 25 °С. Полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин при 1500 g, осадок промывали буфером (рН 5,8) до отсутствия белка в промывных водах. Контроль за содержанием белка осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при 280 нм.

Определение количества белка в препаратах и активности протеаз проводили модифицированным методом Лоури [8,9].

УФ-облучение растворов свободных и иммобилизованных трипсина и коллагеназы проводили при их непрерывном перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете (20 ± 1 °С) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм в течение 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 мин. Доза облучения составила соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м².

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

При УФ-облучении свободного трипсина в дозах 151 и 453 Дж/м² мы наблюдали тенденцию к увеличению активности фермента, начиная с дозы облучения 1510 Дж/м², происходит незначительное снижение его каталитической способности, которое становится статистически значимым при дозах 3020, 4530, 6040 Дж/м². При указанных выше дозах облучения активность трипсина снижается на 28,3, 31,7, 48,6% соответственно.

При УФ-облучении трипсина, иммобилизованного на матрице пищевого кислоторастворимого среднемoleкулярного хитозана, в дозе 453 Дж/м² выявляется тенденция к увеличению активности препарата. При дозах 4530 и 6040 Дж/м² зарегистрировано снижение каталитической способности энзима, которое составляет соответственно 6,3 и 10,7% (рис. 1).

После УФ-облучения трипсина, иммобилизованного на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана, в диапазоне доз 1510-4530 Дж/м² фермент сохраняет свою активность на первоначальном уровне. Снижение каталитической способности энзима происходит только после воздействия дозой 6040 Дж/м² (рис. 1).

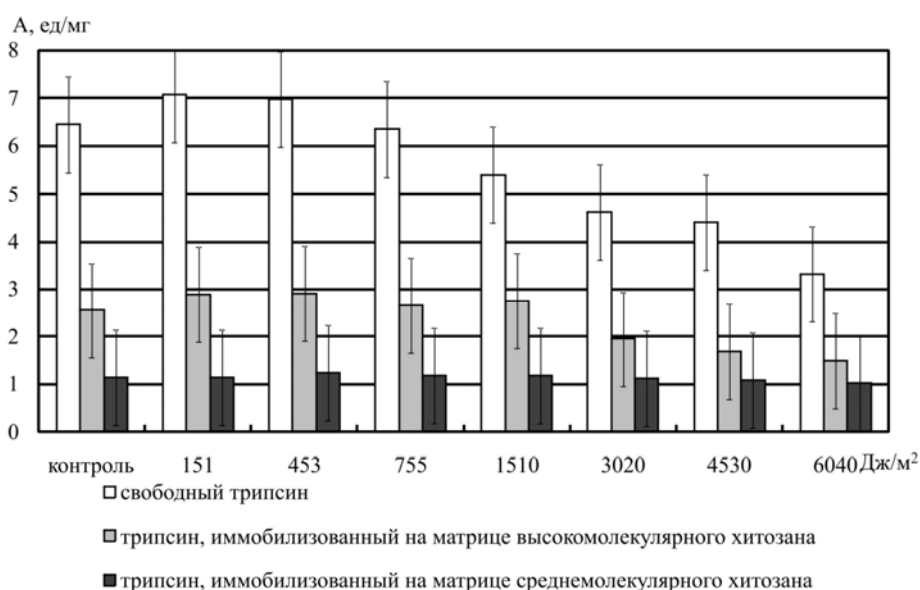


Рисунок 1. Влияние УФ-излучения на удельную каталитическую активность (ед/мг белка) трипсина, свободного и иммобилизованного на матрицах высокомолекулярного и среднемoleкулярного хитозанов

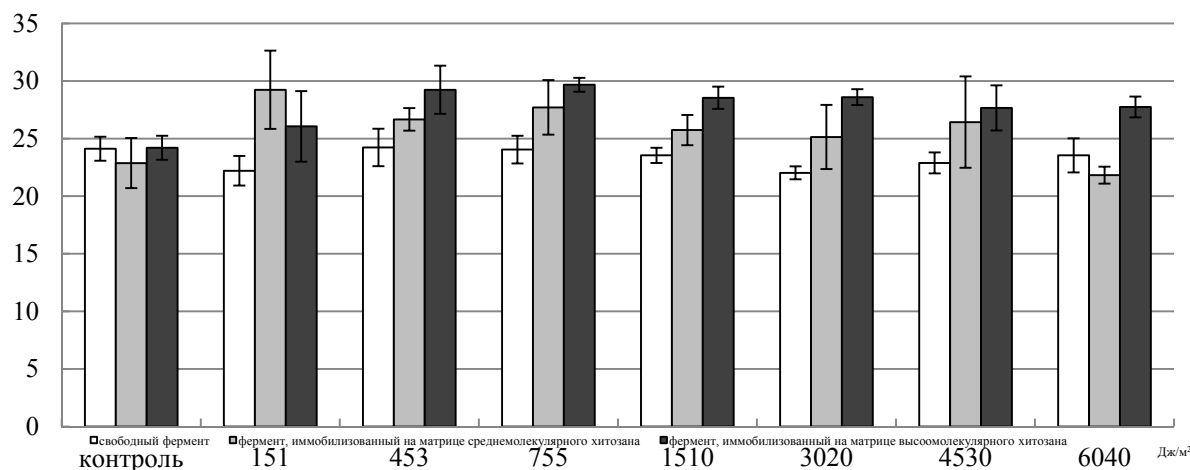


Рисунок 2. Влияние УФ-излучения на удельную каталитическую активность (ед/мг белка) коллагеназы, свободной и иммобилизованной на матрицах высокомолекулярного и среднемoleкулярного хитозанов

При УФ-облучении свободной коллагеназы в дозах 151-1510 Дж/м² изменение удельной каталитической активности фермента не зарегистрировано, энзим сохранял свою активность на относительно постоянном (первоначальном) уровне. Снижение каталитической способности свободного препарата на 8,7% происходило только после воздействия дозой 3020 Дж/м²

После иммобилизации коллагеназы на матрице пищевого кислоторастворимого среднемoleкулярного хитозана при УФ-облучении в дозе 151 Дж/м² наблюдалось увеличение активности фермента на 27,8%, возможно, это связано с молекулярными перестройками в третичной структуре молекулы. При использовании доз 1510-6040 Дж/м² активность коллагеназы возвращалась на первоначальный уровень.

После иммобилизации коллагеназы на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана при УФ-облучении в дозах 453 и 755 Дж/м² зарегистрировано увеличение каталитической активности фермента на 20,9 % и 22,6 % соответственно. При дальнейшем УФ-облучении с повышением дозы изменение активности коллагеназы не выявлено (рис. 2).

Таким образом, ферментативная активность молекул свободных протеаз под воздействием УФ-света подвержена изменению в большей степени, чем в иммобилизованном состоянии. Иммобилизация приводит к повышению стабильности гетерогенных биокатализаторов по отношению к УФ-облучению по сравнению со свободными энзимами, возможно, за счет образования комплекса фермент-носитель, белки становятся более устойчивыми к действию УФ-света.

Приведенные выше данные свидетельствуют о фотопротекторном эффекте матрицы хитозана, который может быть обусловлен следующими причинами: молекулы трипсина и коллагеназы при взаимодействии с матрицей хитозана образуют фоторезистентные комплексы; молекулы хитозана экранируют активные фотопродукты свободнорадикальной природы, предотвращая фотоокисление определенного числа аминокислот изученных ферментов при воздействии УФ-облучения.

Список литературы / References:

1. Пиняскина Е.В. Реактивирующее и протекторное действие красного света на дрожжевые клетки, инактивированные УФ-излучением. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2011, т. 13, № 1 (5), с. 1137-1139. [Pinyaskina E.V. The reactive and protective effect of red light on yeast cells inactivated by UV radiation. *Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2011, vol. 13, no. 1 (5), pp. 1137-1139. (In Russ.)]
2. Реброва Г.А., Василевский В.К., Ребров Л.Б., Осипова Л.А., Быков В.А. Биохимическое и фотометрическое исследование модификации структуры коллагена при УФ-облучении. *Биомедицинская химия*, 2007, т. 53, № 4, с. 442-453. [Rebrova G.A., Vasilevskij V.K., Rebrov L.B., Osipova L.A., Bykov V.A. Biochemical and photometric studies of the modification of collagen structure under UV irradiation. *Biomedicinskaya himiya*, 2007, vol. 53, no. 4, pp. 442-453. (In Russ.)]
3. Костина Н.Ю., Горшкова М.Ю., Изумрудов В.А. Водорастворимые полиплексы модифицированного хитозана. *Высокомолекулярные соединения. Серия А*, 2011, т. 53, № 10, с. 1767-1775. [Kostina N.Yu., Gorshkova M.Yu., Izumrudov V.A. Water-soluble polyplexes of modified chitosan. *High molecular weight compounds. Series A*, 2011, vol. 53, no. 10, pp. 1767-1775. (In Russ.)]
4. Jung W., Winter H. Considerations for the Use of *Clostridial Collagenase* in Clinical Practice. *Journal of Clinical Drug Investigation*, 1998, vol. 15, no. 3. DOI: 10.2165/00044011-199815030-00009.

5. Peacock Jr. E.E., Collagenolysis M.D. The Other Side of the Equation World. *World Journal of Surgery*, 1980, vol. 4. DOI: 10.1007/BF02393385.
6. Watanabe K. Collagenolytic proteases from bacteria. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, vol. 63. DOI: 10.1007/s00253-003-1442-0.
7. Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М. Исследование процессов УФ-модификации свободного и иммобилизованного трипсина. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2017, т. 57, № 1, с. 66-70. DOI: 10.7868/S0869803117010064. [Holyavka M.G., Artyuhov V.G., Sazykina S.M. Investigation of the processes of UV modification of free and immobilized trypsin. *Radiation biology. Radioecology*, 2017, vol. 57, no. 1, pp. 66-70. (In Russ.)]
8. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. Разработка методики получения гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана. *Фундаментальные исследования*, 2013, № 11-3, с. 484-487. [Loginova O.O., Holyavka M.G., Artyuhov V.G., Development of a method for producing a heterogeneous biocatalyst based on trypsin immobilized on a chitosan matrix. *Basic Research*, 2013, no. 11-3, pp. 484-487. (In Russ.)]
9. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. Подбор методики количественного определения трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, и его каталитической активности. *Вестн. ВГУ. Серия: "Химия. Биология. Фармация"*, 2013, № 2, с. 116-119. [Loginova O.O., Holyavka M.G., Artyuhov V.G., Belenova A.S. Selection of methods for the quantitative determination of trypsin immobilized on a chitosan matrix and its catalytic activity. *Vestn. VSU. Series: "Chemistry. Biology. Pharmacy"*, 2013, no. 2, pp. 116-119. (In Russ.)]

ACTION OF UV RADIATION ON FREE AND IMMOBILIZED TRIPSINE AND COLLAGENASE

Pankova S.M., Holyavka M.G., Artyukhov V.G.

Voronezh State University

University Square 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: sazykina.93@mail.ru

Abstract. The mechanisms of exposure to UV light in the dose range of 151-6040 J/m² on trypsin and collagenase free and immobilized on a matrix of acid-soluble medium molecular weight (200 kDa) and high molecular weight (350 kDa) chitosans were studied. The enzymatic activity of molecules of free proteases under the influence of UV light is subject to change to a greater extent than in the immobilized state. Immobilization leads to an increase in the stability of heterogeneous biocatalysts with respect to UV irradiation compared to free enzymes, possibly due to the formation of an enzyme – carrier complex, proteins become more resistant to such a physical agent as UV light. The data presented in this paper testify to the photoprotective effect of the chitosan matrix, which may be due to the following reasons: trypsin and collagenase molecules interact with the chitosan matrix to form photoresistant complexes; Chitosan molecules screen active photoproducts of a free radical nature, preventing the photo-oxidation of a certain number of amino acids of these enzymes when exposed to UV light.

Key words: UV radiation, trypsin, collagenase, immobilization, chitosan.