

УДК 577.325:577.15

## ХИТОЗАН КАК ФОТОПРОТЕКТОР ДЛЯ ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА ЕГО МАТРИЦЕ ПАПАИНА

© 2022 г. М.Г. Холявка\*, \*\*, С.М. Панкова\*, \*\*\*, Ю.М. Вышкворкина\*\*\*\*, А.Н. Лукин\*, М.С. Кондратьев\*\*\*\*\*, В.Г. Артюхов\*

\*Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1  
E-mail: holyavka@rambler.ru

\*\*Севастопольский государственный университет, 299053, Севастополь, Университетская ул., 33

\*\*\*Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, 394036, Воронеж, Студенческая ул., 10

\*\*\*\*Московский физико-технический институт, 117303, Москва, Керченская ул., 1а/1  
E-mail: yuliya.vyshkvorkina@phystech.edu

\*\*\*\*\* Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3  
E-mail: ma-ko@bk.ru

Поступила в редакцию 04.02.2022 г.

После доработки 04.02.2022 г.

Принята к публикации 14.03.2022 г.

Установлено, что при действии УФ-излучения в дозах 453–6040 Дж/м<sup>2</sup> наблюдается снижение каталитической активности папаина. Иммобилизация на матрице хитозана приводит к повышению стабильности молекул папаина по отношению к УФ-облучению в диапазоне доз от 151 до 6040 Дж/м<sup>2</sup> по сравнению со свободным ферментом. Модификации в ИК-спектрах иммобилизованного папаина практически не затрагивают полосы, обусловленные белковым компонентом системы – амид I, амид II и амид III. Поэтому можно постулировать, что матрица хитозана выступает в качестве фотопротектора для иммобилизованного на ней папаина. Полученные результаты могут быть полезны при разработке путей комплексного применения УФ-излучения, папаина и производных хитозана для сокращения сроков заживления кожных покровов, а также при подборе условий стерилизации УФ-светом лекарственных препаратов, содержащих папаин.

*Ключевые слова:* УФ-облучение, адсорбционная иммобилизация, папаин, хитозан.

DOI: 10.31857/S0006302922030061, EDN: ANESYX

УФ-излучение – один из общепризнанных факторов, оказывающих многостороннее воздействие на организмы как на клеточном, так и на молекулярном уровне. Особый интерес представляет изучение биофизических механизмов фототерапии, являющейся высокоэффективным вариантом для профилактики и терапии кожных заболеваний. При лечении ожоговых ран использование ультрафиолетового света коротковолнового спектра является эффективным способом благодаря его выраженному антибактериальному эффекту, отсутствию микроабсцессов и клеточной инфильтрации [1, 2]. Кроме того, влияние УФ-излучения на биоматериалы необходимо исследовать еще и потому, что оно часто используется при стерилизации препаратов для их последующего применения в медицинской практике [3, 4].

Папаин (КФ 3.4.22.2) относится к монотиоловым цистеиновым эндопротеазам, обладает противовоспалительными и антиоксидантными эффектами, бактерицидной, бактериостатической и дезинфицирующей активностями, способностью к гидролизу многих белков, в том числе коллагена. Фермент ускоряет заживление ран, трофических язв, пролежней, способствуя их очищению от некротических масс и патогенной микрофлоры. В последнее время папаин признан перспективным для косметического лечения шрамов и рубцов [5–9].

Основным недостатком растворимой формы протеолитических ферментов является их быстрая инактивация за счет протеолиза [10, 11]. Одним из способов повышения стабильности ферментов может служить их иммобилизация на полимерных носителях [12, 13]. Было предпринято множество попыток стабилизации структуры па-

паина, таких как ковалентная иммобилизация, взаимодействие с ионным металлом, сополимеризация с помощью глутарового альдегида, иммобилизация в агарозе, ковалентное связывание с полиэфирсульфоном, модификация янтарным ангидридом, простая адсорбция в Celite®, ионная адсорбция в КМ-целлюлозе (катионит) и QAE-Sephadex® (анионит) [14–16], включение в гель на основе крахмала [17]; включение в нитриловое волокно, обогащенное аминокеттогруппами [18]; иммобилизация на поверхность хлопчатобумажной ткани [19], сефарозы [20], наночастиц [21–23]; включение в нисомы, наносферы, липосомы [24–26]. Существуют и другие стратегии иммобилизации папаина – синтез пористых сшитых ферментных агрегатов [27], инкапсулирование в кремниевую матрицу [28], включение в состав магнитных золотых наноконструкций, модифицированных 3-(меркаптопропил)триметоксисиланом [29].

Разработаны глазные лекарственные пленки совместно иммобилизованными в поливиниловый спирт папаином и мочевиной с высокой протеолитической активностью, стабильные при хранении (полтора года) и стерилизации  $\gamma$ -облучением (15 кГр), предназначенные для ферментативной терапии роговицы ожогов глаз [30].

Перспективными носителями для иммобилизации лекарственных средств белковой природы являются хитозаны и их производные, которые обладают антибактериальной активностью, низкой аллергенностью и относительно низкой стоимостью. Хитозан является сополимером 2-амино-2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкозамина и 2-ацетиламино-2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкозамина, связанных  $\beta(1\rightarrow4)$ -связями. Полимер проявляет слабоосновные свойства:  $pK_a$  6.5, что близко к значению  $pK_a$  остатков D-глюкозамина [31–37]. Кроме того, были попытки протестировать хитозан в качестве носителя для фотосенсибилизаторов типа порфираза. Хитозан эффективно предотвращал фотодegradацию их макроциклов [38]. Из хитозана получают пористые структуры и тонкие пленки для использования при трансплантации клеток и регенерации тканей. В медицине и фармации хитозан применяется в составе бинтов, губок, мембран, искусственной кожи, контактных линз, средств для лечения заболеваний костей и хирургических швов [39–41]. Свойства хитозана могут быть модифицированы при воздействии ультрафиолетового облучения, несмотря на то, что сам хитозан не имеет полос поглощения в области 220–500 нм [42].

В связи с появлением и усиленным размножением бактерий, устойчивых к антибиотикам, эффекты УФ-облучения во взаимосвязи с терапией протеиназами следует исследовать как альтернативный подход к лечению инфекций. Комплекс-

ное использование действия УФ-излучения, протеаз и производных хитозана, возможно, будет способствовать более быстрому восстановлению раны или ожога и сокращению сроков заживления кожных покровов, поэтому целью нашей работы было изучить особенности воздействия УФ-излучения на процессы фотомодуляции свободного и иммобилизованного на матрице хитозана папаина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран папаин фирмы Sigma-Aldrich (США), субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин фирмы Sigma-Aldrich, носителями для иммобилизации – два вида хитозана, синтезированные ЗАО «Биопрогресс» (Щелково, Московская обл.): хитозан пищевой кислоторастворимый среднемoleкулярный ( $M_r = 200$  кДа), хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный ( $M_r = 350$  кДа).

Иммобилизацию папаина на матрице хитозанов осуществляли адсорбционным методом. К 1 г хитозана добавляли 20 мл раствора фермента в концентрации 1 мг/мл в 0.05 М глициновом буфере (рН 9.0), инкубировали в течение 4 ч с периодическим перемешиванием для среднемoleкулярного хитозана, а при использовании высокомолекулярного хитозана время сорбции составляло 5 ч. Суспензию центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин. Образовавшийся осадок промывали 0.05 М трис-НСl-буфером (рН 7.5) до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Санкт-Петербург) при  $\lambda = 280$  нм). Полученные образцы высушивали при комнатной температуре. Определение количества белка в препаратах и активности фермента проводили модифицированным методом Лоури [43].

Перед облучением к образцам фермента добавляли 0.05 М фосфатный буфер с рН 6.8 в соотношении 1 мг/мл для свободного и 50 мг/мл (что эквивалентно 1 мг/мл по белковой составляющей) для иммобилизованного на хитозане папаина. Процесс УФ-облучения происходил при непрерывном перемешивании соответственно раствора и суспензии в объеме 4 мл (толщина слоя в середине кюветы 7 мм) магнитной мешалкой в круглодонной термостатируемой кювете ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) 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 и 40 мин. Доза облучения составила соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup>.

Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов осуществляли на ИК-Фурье-спектрометре Vertex-70 (Bruker, Германия). Спектры снимали с неориентированных порошковых образцов, которые получали после УФ-облучения иммобилизованного папаина путем высушивания препаратов при комнатной температуре и измельчения до состояния пудры.

Диаметр молекул папаина измеряли на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (632.8 нм) собирали под углом  $173^\circ$  при температуре  $25^\circ\text{C}$ .

Подготовку структуры папаина для докинга выполняли по стандартной для пакета программ автоматизированного молекулярного докинга Autodock Vina схеме, описанной авторами пакета на сайте: из входного файла PDB были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя, буфера и лигандов. Перед проведением численных расчетов была выполнена расстановка зарядов на поверхности белков с помощью MGLTools. Центр молекулы и параметры бокса («ячейки») мы задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула протеазы полностью была внутри расчетной области пространства.

Модель структуры хитозана была нарисована в молекулярном конструкторе NupurChem, последовательно оптимизирована сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически в PM3. Лиганд в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановку зарядов на молекуле хитозана и ее протонирование/депротонирование осуществляли автоматически в пакете MGLTools 1.5.6.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5% с использованием  $t$ -критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При УФ-облучении раствора папаина в дозе  $453 \text{ Дж/м}^2$  наблюдалось уменьшение его каталитической активности на 32% по сравнению с контрольным (необлученным) образцом. При дальнейшем повышении дозы облучения фермент сохранял свою активность на относительно постоянном уровне.

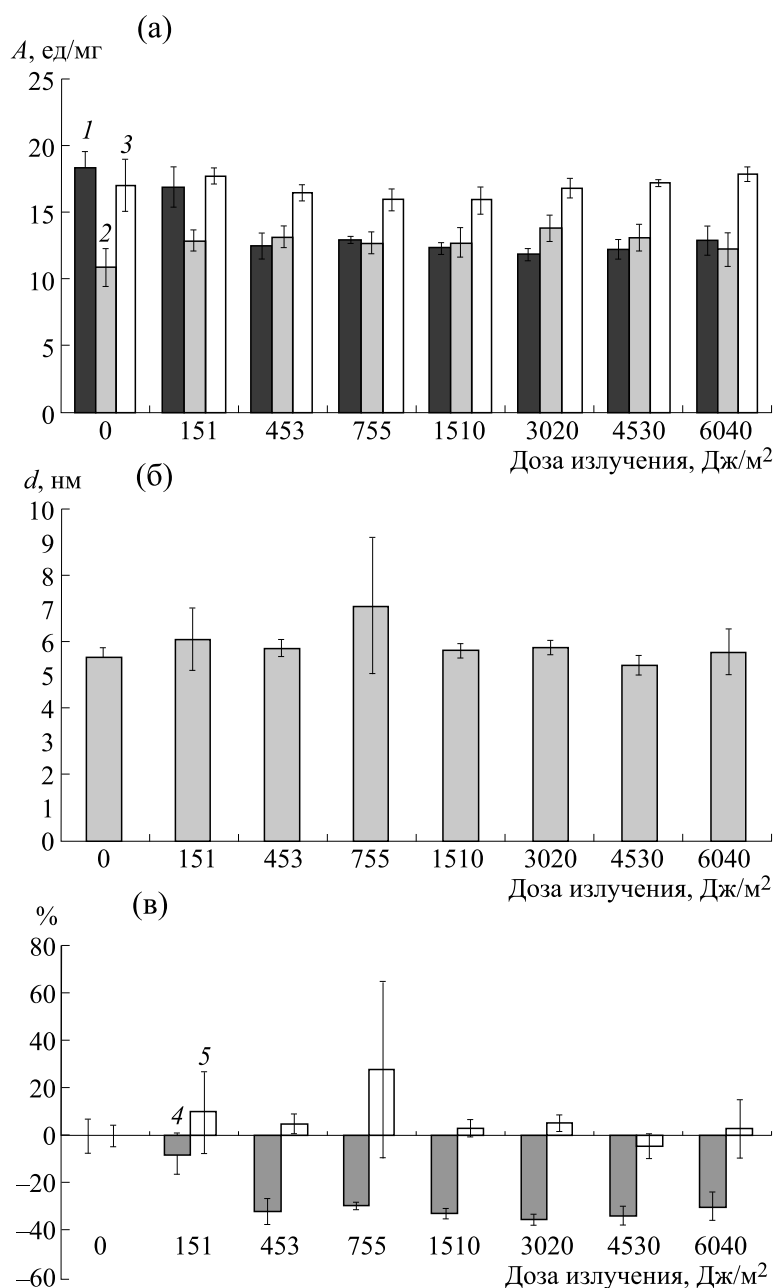
Известно, что за функционально активное поглощение УФ-света белковыми молекулами ответственны хромофорные группы, представляющие собой остаток ароматических аминокислот: прежде всего триптофана, в значительно меньшей степени тирозина и фенилаланина, а также цистина [44]. Механизм действия УФ-излучения на молекулу папаина достаточно сложный. По

данным работы [45] не очевидна простая корреляция между потерей активности фермента и разрушением любого аминокислотного остатка-хромофора для трех длин волн – 254, 280 и 313 нм. Установлено, что относительно низкая реакционная способность трех остатков цистина обусловлена сильным стабилизирующим действием нековалентных связей, а не маскированием остатков цистина другими группами.

После иммобилизации папаина на матрице среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов при воздействии доз в диапазоне от 151 до  $6040 \text{ Дж/м}^2$  не выявлено изменений в каталитической способности фермента.

Изменение размера молекул папаина при действии УФ-излучения не было детектировано во всем диапазоне используемых нами доз, однако, при облучении УФ-светом в дозе  $755 \text{ Дж/м}^2$  была выявлена тенденция к увеличению диаметра белковой глобулы при существенном расширении значений доверительных интервалов в данной точке, что косвенно может свидетельствовать о наличии в облучаемой системе одновременно нескольких конформационных форм фермента с различным размером молекулы (рис. 1).

В активный центр папаина входит цистеин (Cys25) – аминокислота, являющаяся хромофором для УФ-света, поэтому ниже мы приводим описание механизма каталитического действия этого фермента для понимания причин снижения его протеолитической активности после УФ-облучения. Для цистеиновых протеаз характерна консервативная структура гидрофобного ядра, состоящая из двух доменов –  $\alpha$ -спирального и  $\beta$ -складчатого типа, которые были названы L- и R-доменами [46]. Активный центр папаина расположен на границе L- и R-доменов в V-образной расщелине и образован цистеином (Cys25), гистидином (His159), аспарагином (Asn175) и остатком глутамина (Gln19), которые консервативны для всех папаин-подобных протеаз. Cys25 и His159 образуют карман для связывания с ионной парой (рис. 2), стабилизированный Asn175. Сульфгидрильная группа Cys25 выполняет функцию нуклеофильной атаки на карбонильный углерод пептидной связи субстрата, что приводит к образованию нестабильного тетраэдрического промежуточного соединения, которое разрушается, образуя свободный фермент и N-концевую часть субстрата. Другим важным остатком является Gln19, который, вероятно, помогает в образовании оксианионной дыры путем стабилизации тетраэдрического промежуточного продукта. Asn175 образует водородную связь с His159, но не является необходимым для катализа [47]. Trp177, который наряду с Cys25 является хромофором для УФ-света, хотя и не входит в состав активного центра папаина, но участвует в генерации нук-



**Рис. 1.** Влияние УФ-излучения на удельную каталитическую активность (а), диаметр молекул папаина (б) и их изменение в процентах (в). На рис. (а) свободный фермент обозначен цифрой 1, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане – 2, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане – 3. На рис. (в) изменение (в %) удельной каталитической активности папаина обозначено цифрой 4, изменение (в %) диаметра молекул фермента – 5.

леофильного характера ионной пары Cys25/His159 [48]. В работе [49] был показан существенный вклад фотоионизации остатка Trp 177 в процессы инактивации папаина.

На рис. 3 отражены связи и взаимодействия между молекулой папаина (PDB ID: 9PAP) и матрицей хитозана, возникающие в ходе иммобили-

зации фермента. Более высокую устойчивость к действию УФ-излучения иммобилизованного на хитозане папаина можно объяснить следующим образом: в процессе его адсорбции на матрице носителя принимают участие три аминокислотных остатка – хромофора для УФ-света: Trp61, Cys63 и Trp67. Кроме того, два остатка из активно-

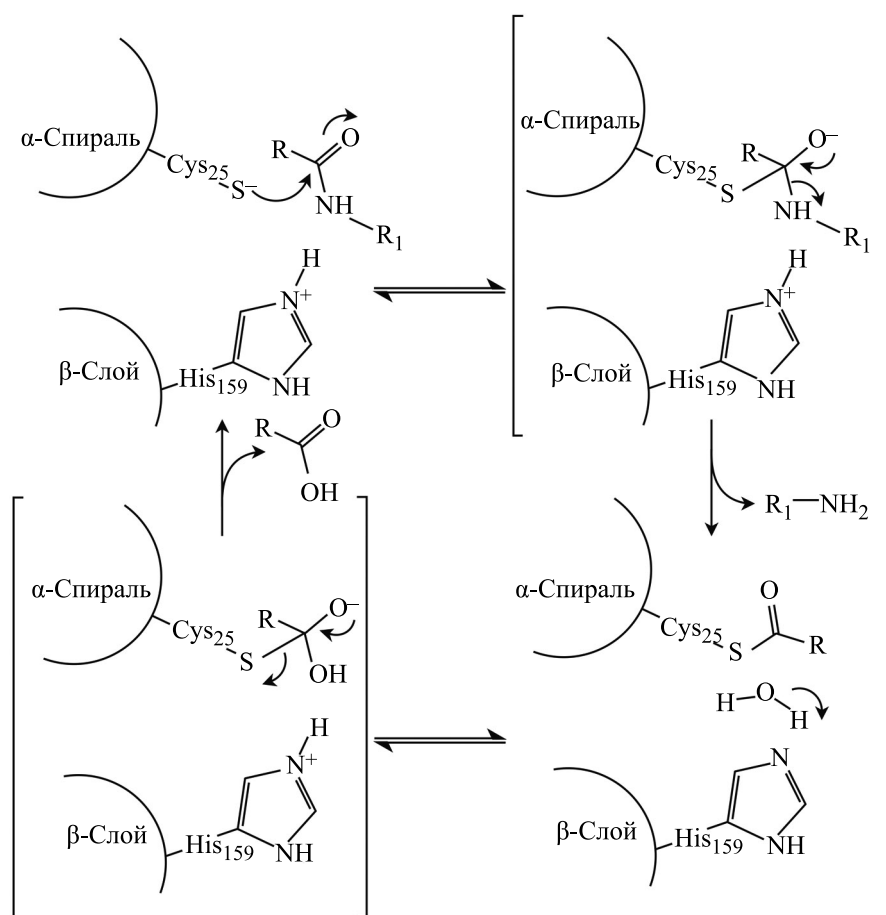


Рис. 2. Механизм разрыва пептидной связи под действием папаина по данным работы [48].

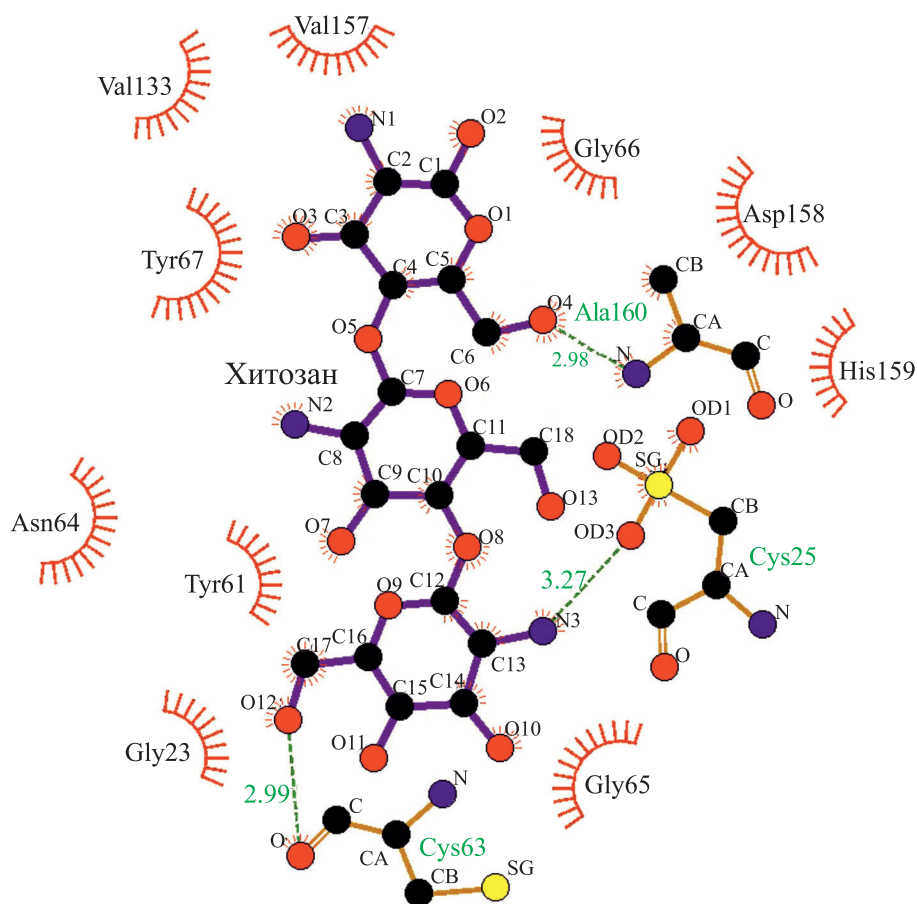
го центра папаина Cys25 и His159 также задействованы в процессах иммобилизации фермента на хитозане, что объясняет снижение его каталитической активности после адсорбции на поверхности носителя и повышение его устойчивости к действию УФ-излучения.

На рис. 4 показана ориентация хромофоров для УФ-света в молекуле папаина по отношению к его активному центру и аминокислотным остаткам, принимающим участие в образовании связей и осуществлении взаимодействий с матрицей хитозана. Из рисунка отчетливо видно, что, кроме перечисленных выше аминокислот, остатки Asn64, Val133, Asp158, Val157 и Ala160, которые образуют связи и взаимодействия с матрицей хитозана в ходе иммобилизации, находятся в непосредственной близости от активного центра фермента. Таким образом, адсорбция папаина на матрице хитозана оказывает значительное влияние на устойчивость иммобилизованного фермента к УФ-излучению, вероятно, за счет повышения жесткости структуры его активного цен-

тра, а также за счет возможного экранирования УФ-лучей от остатков Tyr61, Cys63 и Tyr67.

Для более полного обсуждения наблюдаемых эффектов мы зарегистрировали ИК-спектры папаина, свободного и иммобилизованного на матрице среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов, до и после облучения образцов УФ-светом в дозах 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup> (рис. 5 и 6).

ИК-спектр папаина имеет одну преобладающую над другими полосу при 3450–3225 см<sup>-1</sup> с максимумом при 3300 см<sup>-1</sup>, обусловленную растяжением связи N–H вторичного N-замещенного амида; пик 2981 см<sup>-1</sup>, связанный с растяжением связи C–H; максимум 1650 см<sup>-1</sup>, вызванный C=O-растяжением карбоксильной группы; полосу значительной интенсивности в области 1600–1500 см<sup>-1</sup>, обусловленную наличием C–C-связей; максимумы 1429 и 1321 см<sup>-1</sup>, вызванные деформацией C–H в алкильных радикалах аминокислотных остатков; пики 868 и 850 см<sup>-1</sup>, связанные



**Рис. 3.** Связи (обозначены пунктирными линиями с указанием длины в Å) и взаимодействия между молекулой папаина и матрицей хитозана, возникающие в ходе адсорбции фермента на носителе.

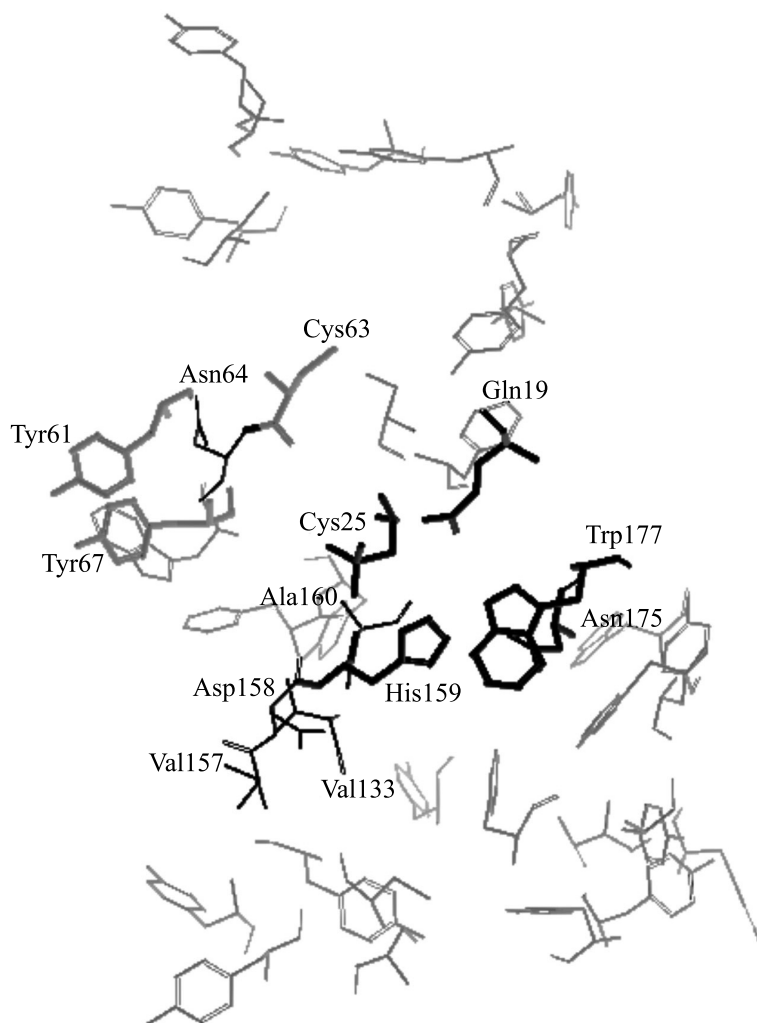
с процессами деформации ароматического кольца остатков триптофана и тирозина; максимумы при  $1150\text{--}1050$  и  $705\text{--}570\text{ см}^{-1}$ , обусловленные наличием C–S-связей [50, 51].

Для хитозанов характерны следующие пики на ИК-спектрах:  $3600\text{--}3100\text{ см}^{-1}$  (N–H, O–H),  $3100\text{--}2800\text{ см}^{-1}$  (растяжение C–H),  $1635\text{--}1630\text{ см}^{-1}$  (C–N, N–H),  $1558\text{--}1550\text{ см}^{-1}$  (C–N, N–H), двойной пик при  $1409\text{--}1406$  и  $1379\text{--}1316\text{ см}^{-1}$  (деформационные колебания O–H и C–H в пиранозном кольце),  $1200\text{--}1000\text{ см}^{-1}$  (растяжение C–O–C) [52, 53]. Среднемолекулярный хитозан под воздействием УФ-света претерпевает более существенные структурные модификации, чем высокомолекулярный хитозан: изменения в его ИК-спектре более выражены. В частности, наблюдается снижение интенсивности пика в области  $2880\text{--}2875\text{ см}^{-1}$  и смещение его максимума в сторону увеличения значений волновых чисел, что, вероятно, связано с модификацией некоторых –CN– и –CH связей.

После иммобилизации папаина на матрице среднемалекулярного хитозана существенных изменений максимумов и интенсивности полос амид I ( $1690\text{--}1630\text{ см}^{-1}$ ), амид II ( $1560\text{--}1520\text{ см}^{-1}$ ) и амид III ( $1250\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ ) при УФ-облучении образцов во всем диапазоне используемых нами доз не происходит (рис. 5).

После УФ-облучения в ИК-спектрах папаина, иммобилизованного на высокомолекулярном хитозане, наблюдаются следующие модификации: смещение пика от  $1649\text{ см}^{-1}$  (необлученный образец) в сторону уменьшения значений волновых чисел до  $1644\text{ см}^{-1}$  (после воздействия дозы  $6040\text{ Дж/м}^2$ ) и небольшое снижение интенсивности полосы амид I (рис. 6).

Как видно из рис. 5 и 6, изменения в ИК-спектрах иммобилизованного папаина практически не затрагивают полосы, обусловленные белковым компонентом системы: амид I, амид II и амид III. Поэтому можно констатировать, что матрица хитозана выступает в качестве фотопр-



**Рис. 4.** Хромофоры для УФ-излучения в молекуле папаина (PDB ID: 9PAP) (серые линии) по отношению к его активному центру (черные жирные линии) и аминокислотным остаткам, принимающим участие в образовании связей и осуществлении взаимодействий с матрицей хитозана (черные линии). Tyr 61, Cys 63 и Tyr 67 (серые жирные линии) одновременно являются хромофорами для УФ-света и принимают участие в процессе адсорбции фермента на носителе.

тектора для иммобилизованного на ней фермента.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При действии УФ-излучения в дозе 453 Дж/м<sup>2</sup> нами зарегистрировано снижение каталитической активности папаина, которая сохранялась на относительно постоянном уровне при дальнейшем облучении образцов фермента. Тенденция к увеличению диаметра молекулы папаина выявлялась после воздействия дозой 755 Дж/м<sup>2</sup>, при облучении в диапазоне доз 1510–6040 Дж/м<sup>2</sup> размеры молекул облученного и необлученного фермента практически совпадали.

Иммобилизация приводит к повышению стабильности структуры молекул гетерогенного биокатализатора по отношению к УФ-облучению по сравнению с его свободными молекулами. Матрица хитозана, вероятно, играет роль фотопротектора для иммобилизованного на ней фермента.

Полученные результаты следует учитывать при разработке препаратов антибактериального назначения, расширения и совершенствовании способов терапии гнойных ран путем сочетанного действия иммобилизованного папаина и УФ-облучения в терапевтических дозах.

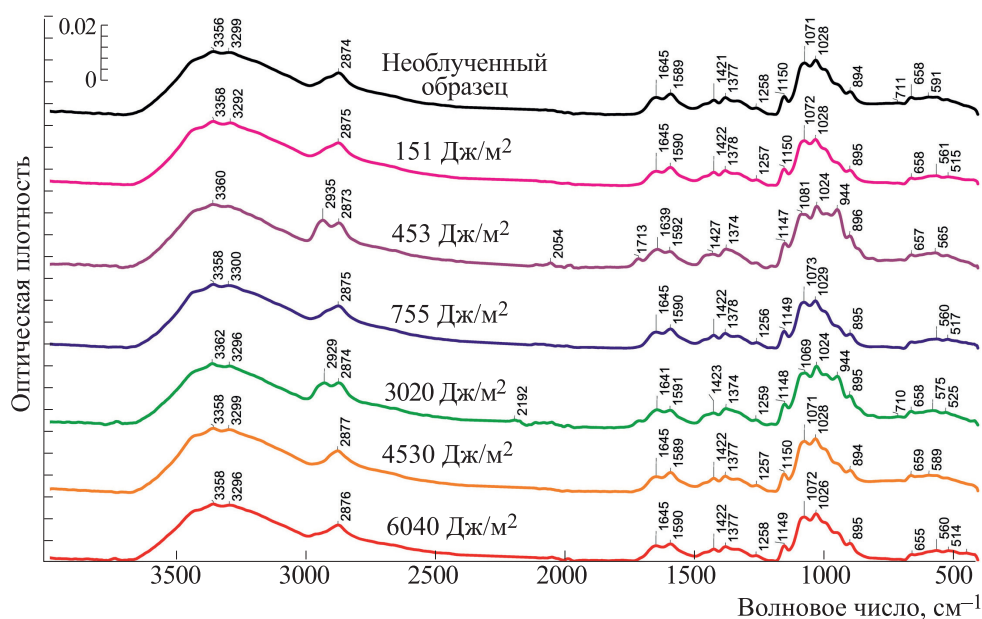


Рис. 5. ИК-спектры папаина, иммобилизованного на матрице среднемoleкулярного хитозана, до и после УФ-облучения в диапазоне доз 151–6040 Дж/м<sup>2</sup>.

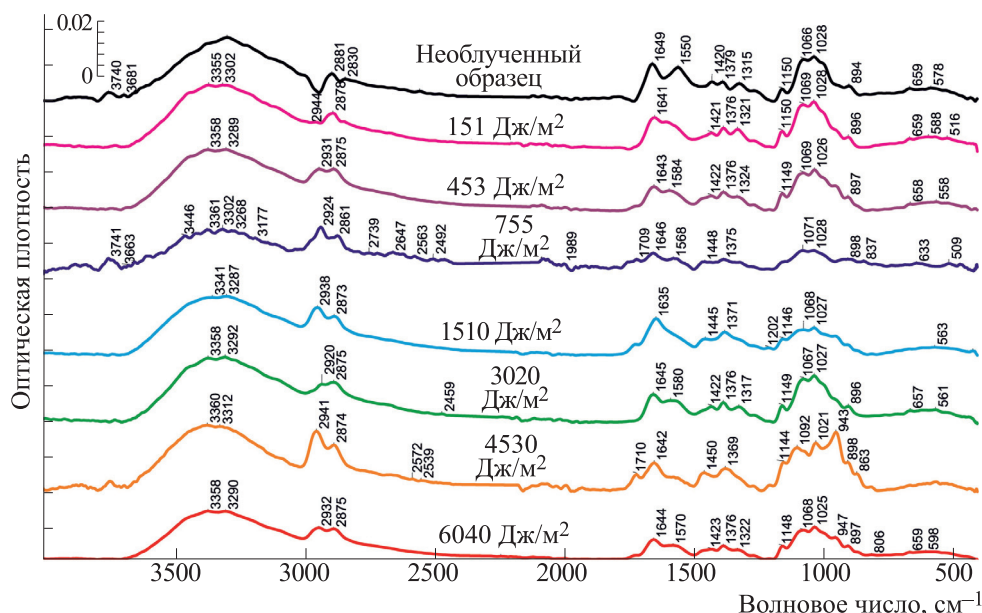


Рис. 6. ИК-спектры папаина, иммобилизованного на матрице высокомолекулярного хитозана, до и после УФ-облучения в диапазоне доз 151–6040 Дж/м<sup>2</sup>.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов осуществляли в Центре коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20053).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. И. Кисткин, Дис. ... канд. мед. наук (ГОУВПО «Мордовский государственный университет», 2009).
2. Н. В. Алипов, Саратовский науч.-мед. журн. **11** (3), 431 (2015).
3. T. Bintsis, E. Litopoulou-Tzanetaki, and R. K. Robinson, *J. Sci. Food Agric.* **80**, 637 (2000).
4. H. Mohr, U. Gravemann, A. Bayer, and T. H. Müller, *Transfusion* **49**, 1956 (2009).
5. T. Vij and Y. Prashar, *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **5** (1), 1 (2015).
6. G. Aravind, B. Debjit, S. Duraiavel, and G. Harish, *J. Med. Plants Studies* **1** (1), 7 (2013).
7. A. Manosroi, C. Chankhampan, K. Pattamapun, et al., *Chiang Mai J. Sci.* **41** (3), 635 (2014).
8. S. A. Ajlia, F. A. Majid, A. Suvik, et al., *Pak. J. Biol. Sci.* **13** (12), 596 (2010).
9. K. M. Pratap, K. Nandakumar, P. Sambashivarao, and P. S. Sandhya, *Ind. J. Dent. Adv.* **4**, 668 (2013).
10. H. J. Klasen, *Burns* **26**, 207 (2000).
11. B. Thallinger, E. N. Prasetyo, G. S. Nyanhongo, and G. M. Guebitz, *Biotechnology* **8**, 97 (2013).
12. G. D. Mogosanu and A. M. Grumezescu, *Int. J. Pharmaceut.* **463**, 127 (2014).
13. I. Benucci, C. Lombardelli, K. Liburdi, et al., *J. Food Sci. Technol.* **23**, 1 (2015).
14. Y. C. Sim, S. G. Lee, D. C. Lee, et al., *Biotechnol. Lett.* **22**, 137 (2000).
15. M. Li, E. Su, P. You, et al., *PLoS One* **5** (12), e15168 (2010). DOI: 10.1371/journal.pone.0015168
16. C. A. S. O. Pinto, P. S. Lopes, F. D. Sarruf, et al., *Braz. J. Pharmaceut. Sci.* **47**(4), 751 (2011).
17. K. Sangeetha and T. E. Abraham, *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* **38**, 171 (2006).
18. F. Y. Li, Y. J. Xing, and X. Ding, *Enzyme & Microb. Technol.* **40**, 1692 (2007).
19. Y. Xue, H. Nie, L. Zhu, et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 109 (2010).
20. A. A. Homaei, R. H. Sajedi, R. Sariri, et al., *Amino Acids* **38**, 937 (2010).
21. I. E. Moreno-Cortez, J. Romero-Garda, V. Gonzalez-Gonzalez, et al., *Mater. Sci. Engineer. C* **52**, 306 (2015).
22. B. J. Xin, S. F. Si, and G. W. Xing, *Chemistry – An Asian Journal* **5**, 1389 (2010).
23. C. Muller, G. Perera, V. Konig, and A. Bernkop-Schnurch, *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* **87**, 125 (2014).
24. A. Manosroi, C. Chankhampan, W. Manosroi, and J. Manosroi, *Eur. J. Pharm. Sci.* **48** (3), 474 (2013).
25. A. Manosroi, C. Chankhampan, W. Manosroi, and J. Manosroi, *J. Biomed. Nanotechnol.* **8** (5), 720 (2012).
26. Y. Y. Chen, Y. H. Lu, C. H. Ma, et al., *Biomedicine & Pharmacotherapy* **87**, 82 (2017).
27. M. Wang, C. Jia, W. Qi, et al., *Bioresource Technol.* **102**, 3541 (2011).
28. L. Zhou, C. Wang, Y. Jiang, and J. Gao, *Chinese J. Chem. Engineer.* **21**, 670 (2013).
29. B. Sahoo, S. K. Sahu, D. Bhattacharya, et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **101**, 280 (2013).
30. И. И. Романовская, С. С. Декина, Р. И. Чаланова и Е. П. Сотникова, *Хим.-фармацевт. журн.* **46** (3), 37 (2012).
31. A. Khalil, C. K. Saurabha, A. S. Adnan, et al., *Carbohydr. Polym.* **5**, 216 (2016).
32. R. L. Kumar, A. K. Narayan, S. Dhivya, et al., *Carbohydr. Polym.* **20**, 172 (2016).
33. A. Sionkowska, *Progr. Polym. Sci.* **36**, 1254 (2011).
34. J. Ji, S. Hao, D. Wu, et al., *Carbohydr. Polym.* **85**, 803 (2011).
35. A. Dincer, S. Becerik, and T. Aydemir, *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 815 (2012).
36. V. Zargar, M. Asghari, and M. Dashti, *Chem. Bio. Eng.* **2**, 204 (2015).
37. A. Sionkowska, A. Planecka, K. Lewandowska, and M. Michalska, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **140**, 301 (2014).
38. D. Chelminiak-Dudkiewicz, M. Ziegler-Borowska, M. Stolarska, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **181**, 1 (2018).
39. D. L. Nettles, S. H. Elder, and J. A. Gilbert, *Tissue Eng.* **8** (6), 1009 (2002).
40. M. H. Struszczyk, *Polymer* **47**, 396 (2002).
41. E. Marsano, E. Bianchi, S. Vicini, et al., *Polymery* **46**, 595 (2005).
42. A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, A. Planecka, and J. Kozłowska, *Polymer Degradation and Stability* **95**, 2486 (2010).
43. M. G. Holyavka, V. G. Artyukhov, S. M. Sazykina, and M. A. Nakvasina, *Pharmaceut. Chem. J.* **51** (8), 702 (2017).
44. В. Г. Артюхов, Т. А. Ковалева, М. А. Наквасина и др., *Биофизика* (Академический проект, М., 2009).
45. K. Dose and S. Risi, *Photochem. Photobiol.* **15**, 43 (1972).
46. M. Novinec and B. Lenardc, *Biomol. Concepts* **4**, 287 (2013).
47. T. Vernet, D. C. Tessier, J. Chatellier, et al., *J. Biol. Chem.* **270**, 16645 (1995).
48. J. Fernandez-Lucas, D. Castaneda, D. Hormigo, *Trends in Food Science & Technology* **68**, 91 (2017).
49. J.F. Baugher, L.I. Grossweiner, *Photochem. Photobiol.* **22**, 163 (1975).
50. M. Sharma, V. Sharma, A. K. Panda, et al., *Pharmaceut. Soc. Japan* **131** (5), 697 (2011).
51. M. Sharma, V. Sharma, A. K. Panda, and D. K. Majumdar, *Int. J. Nanomed.* **6**, 2097 (2011).
52. A. Sionkowska, B. Kaczmarek, M. Gnatowska, and J. Kowalonek, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **148**, 333 (2015).
53. A. P. P. Praxedes, A. J. C. da Silva, R. C. da Silva, et al., *J. Colloid Interface Sci.* **376**, 255 (2012).

## Chitosan as Photoprotector for Papain Immobilized on Its Matrix

M.G. Holyavka\*, \*\*, S.M. Pankova\*, \*\*\*, Yu.M. Vyshkvorkina\*\*\*\*, A.N. Lukin\*,  
M.S. Kondratyev\*\*\*\*\*, and V.G. Artyukhov\*

\*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

\*\* Sevastopol State University, Russian Federation, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

\*\*\* Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Studencheskaya ul. 10, Voronezh, 394036 Russia

\*\*\*\* Moscow Institute of Physics and Technology, Kerchenskaya ul. 1a/1, Moscow, 117303 Russia

\*\*\*\*\* Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

It has been demonstrated that exposure to 453–6040 J/m<sup>2</sup> of UV radiation results in a decrease in the catalytic activity of papain. Immobilization on chitosan matrix leads to the improved stability of papain molecules irradiated with doses of UV light ranging from 151 to 6040 J/m<sup>2</sup> compared to that of the free enzyme. Modifications in the IR spectra of immobilized papain practically do not affect the bands caused by the protein component of the system: amide I, amide II, and amide III. Therefore, it is hypothesized that the chitosan matrix acts as a photoprotector for papain immobilized on it. The results can help in developing approaches for the use of UV radiation, papain and chitosan derivatives in combination to speed up the healing process of the skin as well as in finding out the conditions for UV light sterilization of drugs containing papain.

*Keywords: UV radiation, adsorption immobilization, papain, chitosan*