РАДИАЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ. РАДИОЭКОЛОГИЯ, 2019, том 59, № 1, с. 63–67

НЕИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ

УДК 577.1:576.3:614.875

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ УФ-МОДИФИКАЦИИ СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА КОЛЛАГЕНАЗЫ

© 2019 г. М. Г. Холявка[1,*], С. М. Панкова[1], Ю. М. Вышкворкина[2], А. Н. Лукин[1], В. Г. Артюхов[1]

[1] *Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия*

[2] *Московский физико-технический институт, Москва, Россия*

* *E-mail: holyavka@rambler.ru*

Поступила в редакцию 26.07.2018 г.

Каталитическая активность молекул свободной коллагеназы из *Clostridium histolyticum* под воздействием УФ-света в дозах 151–6040 Дж/м^2 подвергалась модуляции в большей степени, чем в иммобилизованном на матрице хитозана состоянии. После УФ-облучения раствора энзима в дозе 3020 Дж/м^2 наблюдалось снижение его активности на ~9%, при иммобилизации коллагеназы на матрице кислоторастворимого среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов изменение активности фермента не было выявлено во всем диапазоне применяемых нами доз. Адсорбция на хитозане приводит к повышению стабильности гетерогенных биокатализаторов по отношению к УФ-облучению по сравнению со свободной формой бактериальной коллагеназы. Образование связей между энзимом и матрицей как среднемолекулярного, так и высокомолекулярного хитозанов оказывает значительное влияние на устойчивость иммобилизованного препарата к УФ-излучению, вероятно, за счет повышения жесткости третичной структуры коллагеназы в ходе адсорбции.

Ключевые слова: УФ-свет, адсорбционная иммобилизация, коллагеназа, хитозан

DOI: 10.1134/S0869803119010041

Знание механизмов первичных стадий фотобиологических процессов необходимо для понимания трансформации энергии поглощенных квантов света в таких явлениях, как фотосинтез, зрение, повреждающее (фотолиз) и лечебное действие (фототерапия) ультрафиолетового (УФ) и лазерного излучений. Выяснение путей регуляции начальных этапов трансформации энергии электронного возбуждения и сопровождающих ее молекулярных превращений, включая изменения в хромофорных группах, их белковых носителях и окружающей мембране, представляет собой одну из основных задач фотобиофизики и радиационной биологии. Эта проблема связана с выяснением роли и механизмов участия электронно-возбужденных состояний в процессах, протекающих в жизненно важных биологических системах, в частности, белках-ферментах и их комплексах [1, 2].

Описан ряд возможностей для применения белка коллагена в качестве терапевтического агента. В последние годы интерес ученых направлен на разработку биоматериалов с множественными функциями, такими как коллагены и их пептидные фрагменты, поэтому коммерческое использование фермента коллагеназы находит широкое применение [3–6].

Коллагеназа (КФ 3.4.24.7) является уникальной протеазой, которая способна избирательно гидролизовать коллаген, входящий в состав соединительной ткани живого организма. Расщепляя крайне устойчивые к действию других ферментов коллагеновые волокна, коллагеназа выполняет в организме человека и животных важнейшие функции, участвует в превращениях соединительной ткани при росте и морфогенезе, а также в устранении некоторых патологических процессов. К настоящему времени разработаны препараты медицинского и ветеринарного назначения на основе коллагеназы [7–9], в том числе включающие коллагеназу из *Clostridium histolyticum* [10], *Streptomyces lavendulae* [11], сериновые коллагенолитические протеиназы [12]. Выявлено литическое действие подобных фармацевтических композиций на струп ожоговой раны. При гнойных ранах фермент способствует быстрому удалению нежизнеспособных тканей и экссудата, раннему появлению грануляционной ткани, эпителизации. Применение коллагеназы предупреждает развитие грубых рубцов, при этом сохраняется подвижность кожи и мягких тканей [13].

Экспериментальные данные показывают, что продукты расщепления коллагена после лечения бактериальной коллагеназой могут способствовать миграции и усилению активности макрофагов, фибробластов и кератиноцитов. Выявлено участие клеточных матричных взаимодействий в

экспрессии коллагеназы в кератиноцитах и фибробластах. Локализация фермента в ожоговых ранах – как внутри клеток, так и внутри раневой области – предполагает, что фермент непосредственно участвует в механизмах заживления. Коллагеназы обладают уникальной способностью разрушать нативный коллаген, который полностью устойчив к действию других протеаз. Они играют важную роль во время заживления кожи, где происходят обширная деградация, ресинтез и ремоделирование коллагена [3, 5].

Основным недостатком растворимой формы ферментов является их быстрая инактивация за счет протеолиза. Подобные препараты лабильны и требуют постоянного их внесения в виде раствора [14, 15]. Одним из способов повышения стабильности энзимов является их иммобилизация на полимерных носителях. Этот подход позволяет увеличить время полужизни фермента, упрощает доставку препарата к пораженному органу или ткани и дает возможность быстро его удалить [16, 17]. Перспективными носителями для иммобилизации лекарственных средств белковой природы являются хитозаны и их производные, которые обладают антибактериальной активностью, низкой аллергенностью и относительно низкой стоимостью [18, 19].

Известен способ лечения ожоговых ран путем воздействия светом от источника УФ-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 больных [2, 4].

Облучение ожоговых ран УФ-светом коротковолнового спектра является эффективным способом их лечения, благодаря выраженному антибактериальному эффекту УФ-излучения, а также его поверхностному действию, которое приводит к отсутствию микроабсцессов у пациентов и клеточной инфильтрации [5, 6].

Комплексное использование действия УФ-излучения, бактериальной коллагеназы 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 и закономерности воздействия УФ-излучения на процессы фотомодуляции свободной и иммобилизованной на матрице хитозана коллагеназы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования была выбрана 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 среднемолекулярный (Mr = 200 кДа, степень деацетилирования (СД) 82%), хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный (Mr = = 350 кДа, СД = 94.85%).

Иммобилизацию коллагеназы на хитозане проводили адсорбционным методом [20, 21]. Определение количества белка в препаратах и каталитической активности фермента осуществляли модифицированным методом Лоури [22].

УФ-облучение растворов свободной и иммобилизованной коллагеназы проводили при их непрерывном перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете (20 ± 1°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, 40 мин. Доза облучения составила соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м^2.

Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов осуществляли в Центре коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета с помощью ИК-Фурье спектрометра Bruker Vertex-70 (Германия). Спектры снимались с неориентированных порошковых образцов.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента, различия признавали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При УФ-облучении свободного фермента в дозах 151, 453, 755 и 1510 Дж/м^2 изменение удельной активности коллагеназы не было зарегистрировано, фермент сохранял свои каталитические свойства на относительно постоянном (первоначальном) уровне, который был характерен для необлученных (контрольных) образцов. Снижение активности свободного препарата на ~9% происходило только при воздействии дозой 3020 Дж/м^2.

После иммобилизации коллагеназы на матрице пищевого кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана при УФ-облучении в дозе 151 Дж/м^2 наблюдалось увеличение активности фермента на ~28%, возможно, это связано с перестройками в третичной структуре молекулы белка. При использовании доз 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м^2 каталитическая активность коллагеназы возвращалась на первоначальный уровень.

После иммобилизации коллагеназы на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хи-

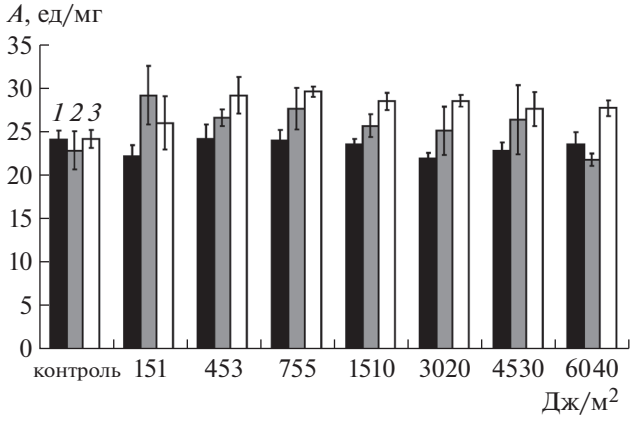

Рис. 1. Влияние УФ-облучения на удельную каталитическую активность (ед/мг белка) свободной и иммобилизованной на матрице хитозана коллагеназы: *1* – свободный фермент, *2* – коллагеназа, иммобилизованная на матрице среднемолекулярного хитозана, *3* – коллагеназа, иммобилизованная на матрице высокомолекулярного хитозана.

тозана при УФ-облучении в дозах 453 и 755 Дж/м^2 зарегистрировано увеличение каталитической активности фермента на ~21 и 23% соответственно. При дальнейшем УФ-облучении с повышением дозы изменение активности коллагеназы не выявлено (рис. 1).

Для более полного анализа наблюдаемых эффектов мы зарегистрировали ИК-спектры коллагеназы, иммобилизованной на матрице средне- и высокомолекулярного хитозанов, до и после облучения образцов УФ-светом в дозах 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м^2 (рис. 2, 3). При воздействии УФ-излучения во всем диапазоне исследуемых нами доз на комплекс коллагеназы и кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана происходит смещение пика 602 см$^{-1}$ в сторону уменьшения значений волновых чисел, а при дозе 755 Дж/м^2 и выше в спектре образца появляется пик 1257 см$^{-1}$ (оба пика обусловлены взаимодействием νCN и νCO). Кроме того, полоса в области 1408 см$^{-1}$ при воздействии УФ-света во всем диапазоне доз расщепляется на две – 1378–1382 и 1414–1418 см$^{-1}$. Полосы в этой области соотносятся с угловой деформацией и осевым растяжением групп C–H [23].

При облучении комплекса коллагеназы с матрицей кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана в дозе 151 Дж/м^2 возрастает интенсивность пиков 1027 и 1063 см$^{-1}$, обусловленных взаимодействием νCN и νCO. При воздействии

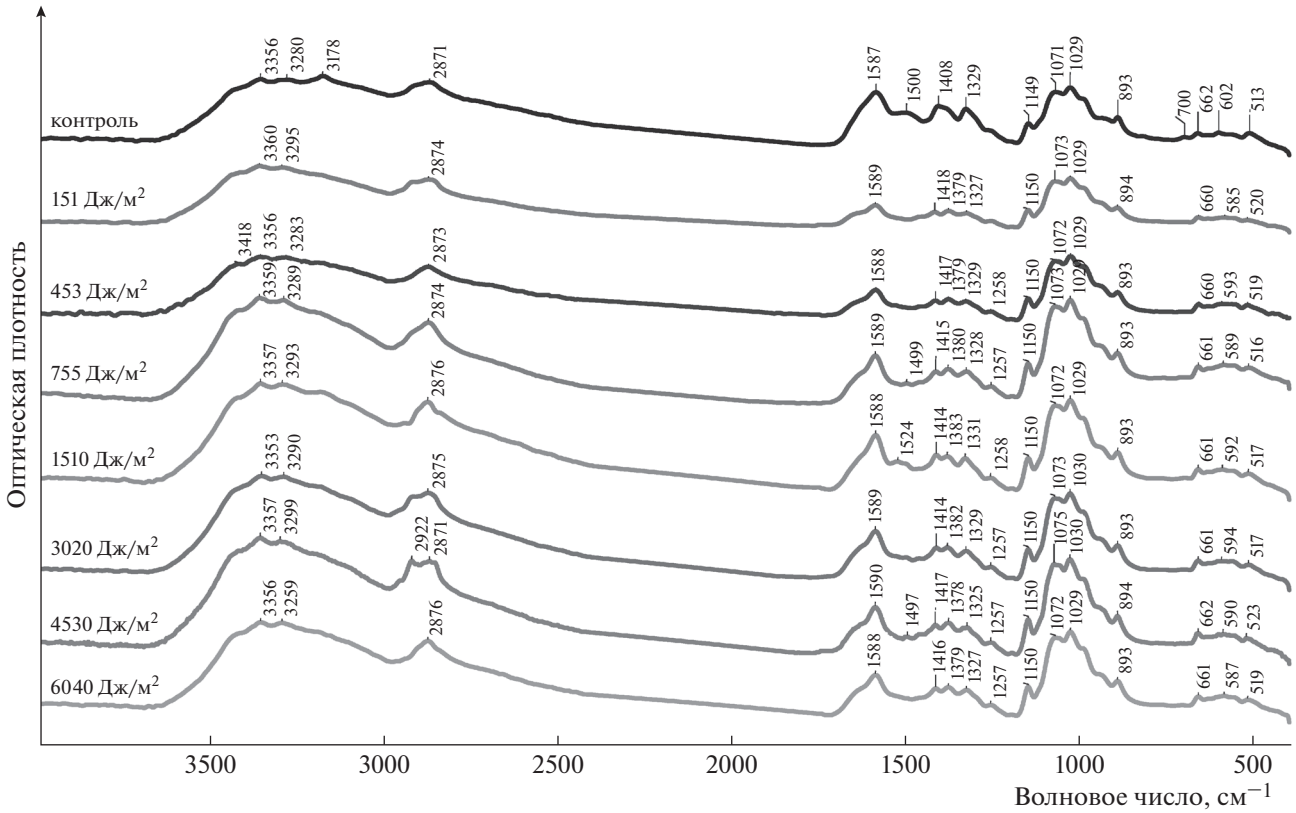

Рис. 2. ИК-спектры коллагеназы, иммобилизованной на матрице кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана, до (контроль) и после воздействия УФ-света (дозы облучения указаны на спектрах).

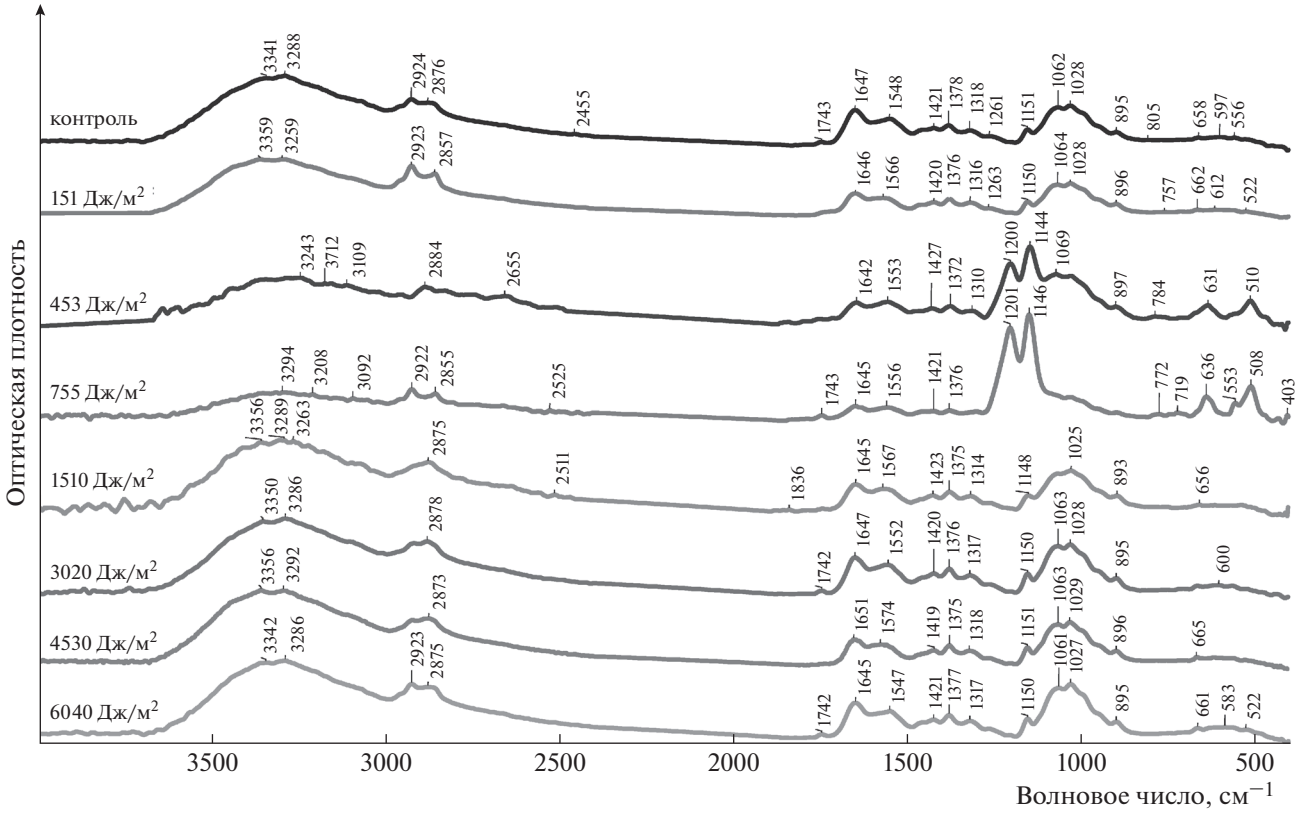

Рис. 3. ИК-спектры коллагеназы, иммобилизованной на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана, до (контроль) и после воздействия УФ-света (дозы облучения указаны на спектрах).

на образец доз 453, 755 и 1510 Дж/м^2 (рис. 3) выявляется снижение интенсивности пиков 1025–1028, 1372–1375, 1552–1566, 1642–1646, 2875–2884, 2922–2960 см$^{-1}$ (δNH + νCN, δO = C–N, δNH, νNH). Пик 1068 см$^{-1}$ полностью исчезает при облучении образцов в дозах 755 и 1510 Дж/м^2, но при 453 Дж/м^2 появляются пики 2655 и 2827 см$^{-1}$. Выше отмечалось, что при дозах 453 и 755 Дж/м^2 происходит увеличение каталитической активности иммобилизованной коллагеназы на 21–23%. При увеличении дозы облучения до 3020 Дж/м^2 и выше интенсивность пиков принимает значения, примерно равные значениям для необлученных образцов (как и каталитическая активность ферментного препарата).

ВЫВОДЫ

Каталитическая активность свободной коллагеназы в водном растворе под воздействием УФ-света модулируется в большей степени, чем в иммобилизованном состоянии. Иммобилизация приводит к увеличению стабильности гетерогенных биокатализаторов по отношению к УФ-облучению по сравнению со свободными энзимами. Образование связей между коллагеназой и матрицей как среднемолекулярного, так и высокомолекулярного хитозанов в значительной мере повышает фотоустойчивость иммобилизованного фермента, вероятно, за счет возрастания жесткости третичной структуры коллагеназы при адсорбции на хитозане. Эффекты совместного действия УФ-излучения и коллагеназы из *Clostridium histolyticum*, иммобилизованной на матрице средне- и высокомолекулярного хитозанов, следует учитывать при терапии гнойных ран и ожогов, осложненных бактериальной инфекцией, так как после образования комплекса с хитозаном фермент не снижает своей каталитической активности при воздействии УФ-света в дозах до 6040 Дж/м^2. Подобное сочетание терапевтических агентов (УФ-излучение, хитозан и иммобилизованная на нем коллагеназа) может выступать в перспективе как эффективный метод вкупе с антибиотиками и химиопрепаратами при лечении ожогов, ран и раневых инфекций, в том числе устойчивых к действию антибиотиков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальные исследования были проведены с использованием научно-технической базы ЦКПНО ВГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Пиняскина Е.В.* Реактивирующее и протекторное действие красного света на дрожжевые клетки, инактивированные УФ-излучением // Изв. Самарского науч. центра РАН. 2011. Т. 13. № 1 (5). С. 1137–1139.
2. *Реброва Г.А., Василевский В.К., Ребров Л.Б. и др.* Биохимическое и фотометрическое исследование модификации структуры коллагена при УФ-облучении // Биомед. химия. 2007. Т. 53. № 4. С. 442–453.
3. *Jung W., Winter H.* Considerations for the use of clostridial collagenase in clinical practice // Clin. Drug Invest. 1998. V. 15 (3). C. 245–252.
4. *Peacock Jr. E.E.* Collagenolysis: the other side of the equation world // J. Surg. 1980. V. 4. № 3. P. 297–302.
5. *Watanabe K.* Collagenolytic proteases from bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 63. P. 520–526.
6. *Lebertz H., Andreesen J.R.* Glycine fermentation by *Clostridium histolyticum* // Arch. Microbiol. 1988. V. 150. P. 11–14.
7. Патент RU 2129862, МПК A61K 9/06, A61K 47/36, опубл. 10.05.1999.
8. Патент RU 2139044, МПК A61K 9/06, A61K 38/48; опубл. 10.10.1999.
9. Патент RU 2127128, МПК A61L 15/32, опубл. 10.03.1999.
10. Патент RU 2174389, МПК A61K 9/06, A61K 38/43, A61P 17/02, опубл. 10.10.2001.
11. Патент RU 2166950, МПК A61K 35/74, C12Q 1/37, опубл. 20.05.2001.
12. Патент RU 2149644, МПК A61K 38/48, опубл. 27.05.2000.
13. Патент RU 2093166, МПК A61K 35/39, опубл. 20.10.1997.
14. *Klasen H.J.* A review on the non-operative removal of necrotic tissue from burn wounds // Burns. 2000. V. 26. P. 207–222.
15. *Thallinger B., Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.* Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms // Biotechnol. 2013. V. 8. P. 97–109.
16. *Mogosanua G.D., Grumezescub A.M.* Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing // Int. J. Pharmaceutics. 2014. V. 463. P. 127–136.
17. *Benucci I., Lombardelli C., Liburdi K. et al.* Immobilised native plant cysteine proteases: packed-bed reactor for white wine protein stabilization // J. Food Sci. Technol. 2015. V. 23. P. 1–16.
18. *Khalil A., Saurabha C.K., Adnan A.S. et al.* A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications // Carbohydr. Polym. 2016. V. 5. P. 216–226.
19. *Logith Kumar R., Keshav Narayan A., Dhivya S. et al.* A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering // Carbohydr. Polym. 2016. V. 20. P. 172–188.
20. *Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.* Физико-химические и кинетические свойства гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана // Биофарм. журн. 2015. № 2. С. 13–16.
21. *Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С.* Разработка методики получения гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана // Фундам. исследования. 2013. № 11 (часть 3). С. 484–487.
22. *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. Сер. “Химия. Биология. Фармация”. 2013. № 2. С. 116–119.
23. *Pereira F.S., da Agostini D.L.S., Job A.E., Gonzalez E.R.P.* Thermal studies of chitin-chitosan derivatives // J. Therm. Anal. Calorim. 2013. V. 114. P. 321–327.

Investigation of UV Modification for Free and Immobilized on the Chitosan Matrix Collagenase

M. G. Holyavka[a,#], S. M. Pankova[a], Yu. M. Vyshkvorkina[b], A. N. Lukin[a], and V. G. Artyukhov[a]

[a] *Voronezh State University, Voronezh, Russia*

[b] *Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia*

[#] *E-mail: holyavka@rambler.ru*

The catalytic activity of free collagenase from *Clostridium histolyticum* under the influence of UV light at the doses of 151–6040 J/m^2 was modulated to a greater extent than in the immobilized on the chitosan matrix condition. After UV irradiation of the enzyme solution with a dose of 3020 J/m^2, its activity decreased by ~9%. After immobilization of collagenase on the matrix of acid-soluble medium-molecular and high-molecular chitosans, no change in the enzyme activity was detected in the entire range of the doses used by the authors. Absorption on chitosan leads to an increase in the stability of heterogeneous biocatalysts with respect to UV irradiation in comparison with the free form of bacterial collagenase. The formation of bonds between the enzyme and matrix of both medium-molecular and high-molecular chitosans has a significant effect on the stability of the immobilized preparation towards UV radiation, probably due to an increase in the rigidity of the tertiary structure of collagenase during adsorption.

Keywords: UV light, adsorption immobilization, collagenase, chitosan