

УДК 577.344.2

ФОТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ХИТОЗАНА И СУКЦИНАТА ХИТОЗАНА ПО ОТНОШЕНИЮ К ТРИПСИНУ ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТА НА ИХ МАТРИЦЕ

© 2025 г. С.М. Панкова*, **, М.Г. Холявка*, ***, #, М.С. Кондратьев*, ****,
А.Н. Лукин*, В.Г. Артюхов*

*Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия

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

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

****Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский
научный центр биологических исследований РАН»,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.08.2024 г.

После доработки 16.02.2025 г.

Принята к публикации 19.02.2025 г.

Установлено, что УФ-облучение в дозах 3020, 4510 и 6040 Дж/м² приводит к снижению уровня удельной активности свободного трипсина на 28, 32 и 49% соответственно. Адсорбционная иммобилизация на матрице хитозанов с молекулярными массами 200 и 350 кДа, включение в гель хитозана (<100 кДа) и сукцината хитозана способствуют сохранению активности молекулы трипсина на уровне ~90% и выше. При УФ-облучении в диапазоне доз до 6040 Дж/м² в присутствии фотосенсибилизатора — метиленового синего — в концентрации 10⁻⁴ моль/л активность свободного трипсина снижается на 72%. После иммобилизации стабильность ферментного комплекса при названных условиях возрастает: активность трипсина, иммобилизованного на матрице хитозанов с молекулярными массами 200 и 300 кДа, сохраняется на уровне порядка 75%, после включения фермента в гель хитозана (<100 кДа) — до ~50%, сукцината хитозана — до ~70%. Методом молекулярного докинга выявлено, что в образовании связей и взаимодействий между молекулой трипсина и матрицами хитозана и сукцината хитозана принимает участие ряд остатков триптофана, тирозина и фенилаланина, а также два цистина, что, вероятно, предопределяет фотопротекторные свойства названных полисахаридов. С помощью метода ИК-спектроскопии установлено, что после УФ-облучения в присутствии метиленового синего и без него в спектрах трипсина, иммобилизованного на матрицах хитозана и сукцината хитозана, существенных изменений значений волнового числа в области полос амид I, II и III не выявлено, что свидетельствует о поддержании стабильности структуры фермента в составе комплексов с названными полисахаридами.

Ключевые слова: УФ-облучение, трипсин, хитозан, сукцинат хитозана, адсорбционная иммобилизация, включение в гель.

DOI: 10.31857/S0006302925020049, EDN: LACZLL

Протеолитические ферменты играют важную роль во многих физиологических процессах, таких как пищеварение, всасывание питательных веществ, иммунологическая защита, рост клеток и их гибель, в том числе апоптоз. Согласно Международной системе классификации ферментов, протеазы относятся к классу 3 — гидролазы. В зависимости от состава аминокислот, входящих в активный центр ферментов, они могут быть дополнительно разделены на: цистеиновые, аспаргиновые, сериновые, металлопротеазы, смешан-

ные и протеазы неизвестного типа [1, 2]. Среди всех этих типов протеаз сериновые протеазы являются одними из наиболее изученных [3].

Трипсин (КФ 3.4.21.4) — фермент поджелудочной железы, относится к семейству S1 сериновых протеаз, расщепляющих пептидные связи белков, специфически гидролизует пептидную связь с карбоксил-концевой (С-концевой) стороны положительно заряженных аминокислотных остатков — аргинина и лизина [2]. Фермент секретируется поджелудочной железой в виде неактивного

профермента трипсиногена. Трипсин, благодаря своей высокой специфичности и селективности, обладает значительными преимуществами для пищевой промышленности, прикладных биомедицинских и фундаментальных исследований [4, 5]. Он играет важную роль в качестве специфического биомаркера для диагностики некоторых важных заболеваний, таких как панкреатит, рак поджелудочной железы, муковисцидоз [6], билиарный цирроз печени [7].

Трипсин состоит из полипептидной цепи длиной 223 аминокислоты, в активном центре которой находятся остатки His57 и Ser195. Молекула трипсина представляет собой относительно жесткий эллипсоидный белок размером 30–50 Å [8]. Молекулярная масса составляет 23.3 кДа, изоэлектрическая точка — 10.8 [9, 10].

Применение ферментов в свободной (растворимой) форме имеет ряд ограничений, например, из-за их быстрой инактивации за счет процессов протеолиза [11]. На сегодняшний день в целях повышения устойчивости ферментов масштабно применяют методы их иммобилизации на различных полимерных носителях. С помощью иммобилизации можно придать ферментам новые свойства и сделать их устойчивыми даже к относительно жестким условиям (в том числе высоким дозам УФ-радиации [12]).

В основе стабилизации функциональной активности ферментов путем иммобилизации лежит идея сохранения каталитически активной конформации их молекул [13]. Адсорбция является самым простым из физических методов иммобилизации биомакромолекул. Удержание адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя может обеспечиваться за счет неспецифических ван-дер-ваальсовых взаимодействий, электростатических взаимодействий, водородных связей и гидрофобных эффектов между носителем и поверхностными группами белка. Относительный вклад каждого из типов связывания зависит от химической природы носителя и функциональных групп на поверхности молекулы фермента [14]. Сущность иммобилизации ферментов путем их включения в гели состоит в том, что молекулы белка включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не покидает полимерную матрицу и не выходит в окружающий раствор, т.е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный вклад в удерживание фермента в сетке геля могут вносить также ионные и водородные связи, а также ряд слабых физических взаимодействий между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями [15, 16]. Как при адсорбции, так и при

включении в гели структура фермента изменяется в меньшей степени, чем при ковалентном связывании, кроме того преимуществом названных методов иммобилизации является простота и возможность моделирования процессов образования комплексов и их распада в различных структурах клетки [17–19].

Хитозан — полиаминосахарид, получаемый из хитина путем *N*-деацетилирования. Он биосовместим, нетоксичен, а также биоразлагаем [20], широко применяется в различных областях фармакологии (с целью доставки лекарств) и медицины (для лечения раневых поверхностей) [21, 22], обладает выраженными фотопротекторными свойствами [13].

УФ-излучение инициирует свободно-радикальные фотопроцессы в биомолекулах, которые приводят к нарушению структуры и инактивации фермента [23, 24]. Метиленовый синий относится к группе фенотиазиновых красителей. Он широко применяется в медицинской практике для инактивации патогенов, находящихся в плазме крови, и для очистки свежемороженой плазмы, а также используется в рамках метода фотодинамической терапии злокачественных новообразований и ряда патологий неопухолевого происхождения [25–33]. В фотохимических реакциях метиленовый синий является генератором $^1\text{O}_2$ и действует как фотосенсибилизатор на различные мишени, например в белках он вызывает повреждение путем фотоокисления. Показано, что прямое УФ-облучение триптофана может привести к образованию радикалов определенной природы, где сама аминокислота выступает в качестве эндогенного сенсибилизатора [34, 35]. В результате фотоокисления молекул триптофана образуются его фотопродукты: триптамины, *N*-формилкинурины, кинурины и 3-ОН-кинурины, которые также вносят вклад в инактивацию белка [36, 37].

Изучение теоретических основ действия УФ-излучения на биомакромолекулы, в особенности на белковые глобулы, остается актуальным вопросом по настоящее время. Закономерности действия ультрафиолетового света на биосистемы, а именно протеолитические ферменты, в условиях различного микроокружения, остаются до конца не исследованными, поэтому изучение физико-химических свойств молекул трипсина в различных конформационных состояниях под действием УФ-света необходимо развивать и детализировать. В связи с этим целью работы явилось исследование действия УФ-излучения в присутствии фотосенсибилизатора метиленового синего и без него на изменение активности трипсина, свободного и иммобилизованного путем адсорбции на хитозанах различной молекулярной

массы и путем включения в гель хитозана и сукцината хитозана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран трипсин из поджелудочной железы быка фирмы MP biomedicals (США), субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин фирмы Sigma-Aldrich (США), носителями для иммобилизации — хитозаны, синтезированные в ЗАО «Биопрогресс» (Россия): <100, 200 и 350 кДа, а также сукцинат хитозана.

Иммобилизацию трипсина на матрице хитозанов с молекулярными массами 200 и 350 кДа осуществляли адсорбционным методом [38]. Включение трипсина в гель хитозана с молекулярной массой <100 кДа и сукцината хитозана проводили по методике, изложенной в статье [39].

Определение количества белка в образцах осуществляли модифицированным методом Лоури. Сущность модификации заключалась в том, что на первом этапе анализа осуществляли разрушение связей между матрицей носителя и молекулой фермента. Для этого иммобилизованный трипсин обрабатывали раствором К,Na-тарtrate (в концентрации 20 мг/мл, или 0.7 М), приготовленным на 1 М NaOH, при 50°C в течение 10 мин [21]. Ранее нами было показано, что трипсин в данных условиях десорбируется полностью. Отсутствие процессов разрушения трипсина контролировали путем регистрации и анализа его спектра поглощения на спектрофотометре UV-2550PC (Shimadzu, Япония).

Для определения протеолитической активности трипсина в качестве субстрата использовали бычий сывороточный альбумин (66.4 кДа) в концентрации 100 мкМ, растворенный в 0.1 М фосфатном буфере (pH 6.5), гидролиз субстрата осуществляли в течение 30 мин при 37°C. Далее пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 11700 g для удаления иммобилизованного трипсина. О протеолитической активности образцов судили по разности концентрации альбумина в растворе до начала реакции гидролиза и в надосадочной жидкости после протекания реакции [40]. За единицу активности свободного и иммобилизованного трипсина принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ альбумина за 1 мин.

Методика УФ-облучения образцов подробно изложена в работе [41]. УФ-облучение свободного и иммобилизованного трипсина проводили в присутствии фотосенсибилизатора — метиленового синего — в трех концентрациях: 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} моль/л в диапазоне доз 151–6040 Дж/м².

Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов осуществляли в Центре коллективного

пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета с помощью ИК-Фурье-спектрометра Vertex-70 (Bruker, Германия). Образцы представляли собой сухие тонкодисперсные порошки, особенности пробоподготовки изложены в работе [42]. Диапазон регистрации спектра составлял 700–4000 см⁻¹. Спектр накапливали в течение четырех циклов регистрации по 72 сканирования в каждом. Эксперимент повторяли как минимум трижды на разных образцах. Суммарная погрешность измерения сдвигов полос поглощения в опыте по сравнению с контролем составляла 0.1–0.5 см⁻¹ в зависимости от ширины и интенсивности полосы.

Применяемые нами методики отрисовки структур носителей и молекулярного докинга подробно изложены в работах [43, 44].

Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по *t*-критерию Стьюдента (при $p < 0.05$, $n = 8$), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением. Полученные данные представлены в виде средних значений \pm доверительный интервал.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что при УФ-облучении трипсина в растворе в дозах 151 и 453 Дж/м² наблюдается тенденция к увеличению активности фермента. Незначительное снижение его активности происходит, начиная с дозы облучения 1510 Дж/м², и усиливается по мере увеличения времени экспозиции: УФ-излучение в дозах 3020, 4510 и 6040 Дж/м² приводит к снижению удельной активности свободного трипсина на 28, 32 и 49% соответственно [41].

Иммобилизация трипсина на матрице хитозана обеспечивается наличием достаточного количества активных аминогрупп в структуре полимера, которые индуцируют взаимодействия «фермент–носитель» и способствуют сохранению удельной активности биокатализатора при воздействии неблагоприятных факторов [41].

После иммобилизации путем включения в гель хитозана массой менее 100 кДа и сукцината хитозана, а также после адсорбции трипсина на хитозане массой 350 кДа значимых изменений в уровне каталитической способности фермента не зарегистрировано во всем диапазоне используемых нами доз УФ-облучения. Снижение протеолитической активности трипсина наблюдалось только для комплекса с хитозаном массой 200 кДа: на 11% при дозе 6040 Дж/м² (рис. 1).

Снижение активности свободного трипсина после УФ-облучения с фотосенсибилизатором

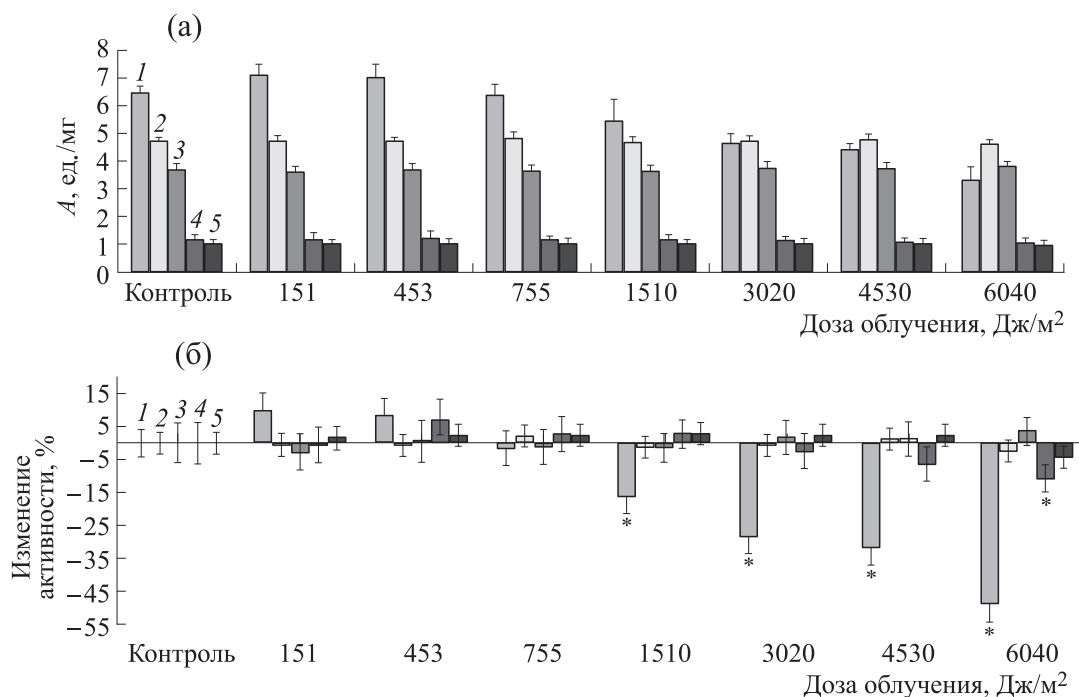


Рис. 1. Удельная каталитическая активность (в ед./мг) трипсина (а) и уровень ее изменения (в %) (б) после воздействия УФ-излучения на свободный фермент (в растворе) (1), включенный в гель сукцината хитозана (2) и хитозана <100 кДа (3), а также адсорбированный на хитозане 200 (4) и 350 кДа (5). За 100% принята активность свободного и иммобилизованного трипсина, измеренная у образцов, не подвергнутых воздействию УФ-излучения.

метиленовым синим носит линейный характер как в зависимости от значения дозы УФ-света в диапазоне 151–6040 Дж/м², так и от концентрации фотосенсибилизатора: 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} моль/л.

При облучении свободного трипсина в присутствии метиленового синего достоверное снижение значений удельной протеолитической активности было выявлено уже при минимальной из изучаемых нами доз УФ-облучения (151 Дж/м²) и соответствовало 15, 25 и 23% при концентрациях фотосенсибилизатора 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} моль/л. При увеличении дозы до 6040 Дж/м² влияние концентрации метиленового синего было более выражено: потеря каталитической активности трипсина варьировала в пределах от 53 до 72% при увеличении концентрации фотосенсибилизатора от 10^{-5} до 10^{-4} моль/л (рис. 2а). Значительное снижение активности фермента можно объяснить тем, что основной вклад в процессы инактивации молекулы трипсина вносит фотоокисление дисульфидной связи и остатка триптофана [24, 37].

Далее нами была проведена серия экспериментов по выявлению действия фотосенсибилизатора метиленового синего в концентрациях 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} моль/л при УФ-облучении ад-

сорбированного и включенного в гели хитозана и сукцината хитозана трипсина.

После адсорбционной иммобилизации трипсина на матрице хитозана с массой 200 кДа при УФ-облучении в присутствии фотосенсибилизатора в концентрации 10^{-4} моль/л снижение его активности на 14% выявлено после применения дозы 151 Дж/м². Потеря каталитической способности на 13 и 22% зафиксирована при дозе облучения 6040 Дж/м² с метиленовым синим в концентрациях $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} моль/л (рис. 2б).

После иммобилизации трипсина на матрице хитозана с молекулярной массой 350 кДа снижение удельной активности на 9% было выявлено при дозе 755 Дж/м² и концентрации фотосенсибилизатора 10^{-5} моль/л (рис. 2в). Применение дозы облучения 6040 Дж/м² совместно с сенсибилизатором в концентрации 10^{-4} моль/л привело к снижению протеолитической активности фермента на 25%. Таким образом, иммобилизация трипсина на матрицах хитозанов с молекулярными массами 200 и 350 кДа способствовала сохранению его активности на уровне порядка 75% после УФ-облучения фермента в присутствии фотосенсибилизатора в интервале доз 151–6040 Дж/м²

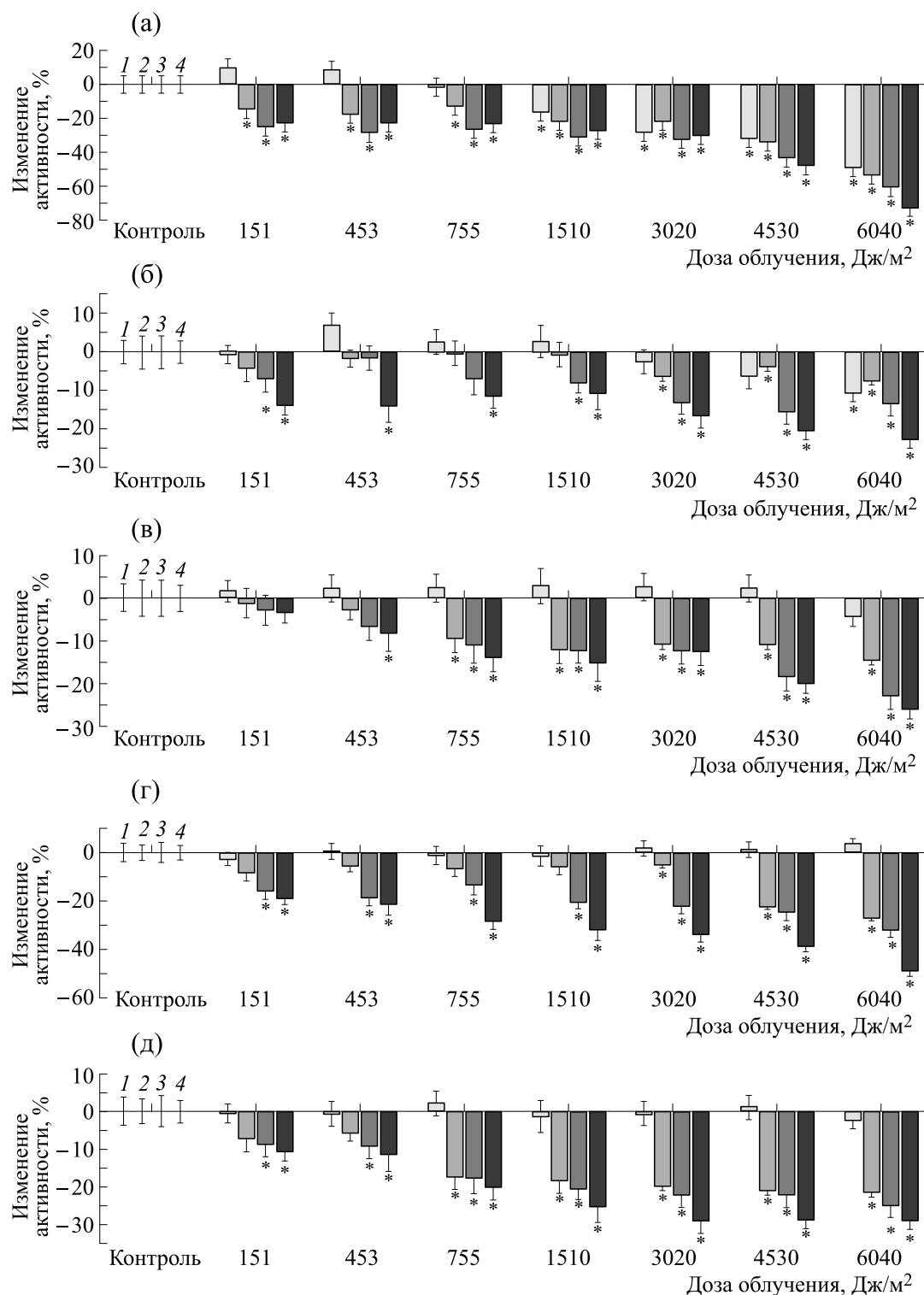


Рис. 2. Уровень изменения удельной каталитической активности (в %) свободного трипсина (а); трипсина, адсорбированного на хитозане 200 кДа (б) и 350 кДа (в); трипсина, включенного в гель хитозана <100 кДа (г) и гель сукцината хитозана (д). Пробы после воздействия УФ-излучения без фотосенсибилизатора (1) и с добавлением метиленового синего в концентрациях 10^{-5} моль/л (2), $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л (3) и 10^{-4} моль/л (4); за 100% принята протеолитическая активность, измеренная у образцов, не подвергнутых воздействию УФ-излучения.

и в диапазоне концентраций метиленового синего 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} моль/л.

После включения трипсина в гель хитозана с молекулярной массой <100 кДа снижение удельной активности при его УФ-облучении в присутствии метиленового синего в концентрациях $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} моль/л носило статистически достоверный характер, начиная с дозы 151 Дж/м^2 . Максимальное снижение активности — на 49% — зарегистрировано после применения дозы УФ-света 6040 Дж/м^2 и концентрации фотосенсибилизатора 10^{-4} моль/л (рис. 2г).

При включении трипсина в гель сукцината хитозана значимое снижение активности на 14% было зафиксировано при дозе 1510 Дж/м^2 и концентрации фотосенсибилизатора 10^{-5} моль/л, а при концентрациях $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} моль/л достоверное угнетение каталитической активности было выявлено уже после применения дозы 151 Дж/м^2 (рис. 2д).

При фотоокислении органических молекул с метиленовым синим обычно наблюдаются два типа фотореакций. При первом типе реакций образуется полувосстановленный радикал (MC^\bullet) метиленового синего, при втором типе реакций образуется синглетный кислород ($^1\text{O}_2$). На рис. 3 представлена схема возможных фотопревращений трипсина при сочетанном действии метиленового синего и УФ-света. Метиленовый синий при воздействии УФ-лучей подвергается ряду фотохимических превращений с образованием активного радикала кислорода: реакции (1)–(6). Далее под действием УФ-света и метиленового синего происходит фотоионизация триптофана, тирозина, фенилаланина и цистина, входящих в состав молекулы трипсина, с образованием сольватированного электрона и катион-радикала: реакции (7) и (8). В дальнейшем и сольватированный электрон, и катион-радикал могут вступать в превращения, в результате которых могут образовываться конечные стабильные фотопродукты, приводящие к конформационным изменениям в молекуле белка с последующей потерей его активности [25–28].

Исходя из полученных данных, можно отметить, что адсорбционная иммобилизация трипсина и включение его в гели хитозана и сукцината хитозана способствуют стабилизации функциональных свойств фермента, которая проявляется в сохранении удельной протеолитической активности за счет образования нековалентных связей и взаимодействий между молекулой трипсина и матрицей носителя при высоких дозах УФ-облучения и концентрациях фотосенсибилизатора.

Для изучения молекулярных особенностей формирования связей между ферментом и матрицей носителя, которые могут повлиять на изменение активности трипсина при действии УФ-излучения на иммобилизованный препарат, мы применили метод молекулярного докинга.

Молекула трипсина (PDB ID: 3UY9) включает 4 остатка триптофана, 10 остатков тирозина и 5 остатков фенилаланина. Кроме того, сериновые протеазы семейства химотрипсинов содержат три консервативные дисульфидные связи: Cys42–Cys58, Cys168–Cys182 и Cys191–Cys220, из которых последняя необходима для поддержания высокой активности трипсина, а также три неконсервативные связи: Cys22–Cys157, Cys128–Cys232, Cys136–Cys201 [45].

На рис. 4 отражены связи и взаимодействия между молекулой трипсина быка (PDB ID: 3UY9) и матрицами хитозана и сукцината хитозана, возникающие в ходе иммобилизации фермента. Высокую устойчивость к действию УФ-излучения иммобилизованных препаратов трипсина можно объяснить тем, что в процессе адсорбции на хитозане принимают участие следующие хромофоры УФ-света: Tyr59, Tyr94, Tyr99, Trp215, Cys42–Cys58, Cys191–Cys220. При включении в гель сукцината хитозана взаимодействия с матрицей носителя формируют Tyr59, Tyr94, Tyr99, Trp215, Tyr228, Phe41, Phe174, Phe227, Cys42–Cys58, Cys191–Cys220. При этом аминокислотные остатки His57 и Ser195, входящие в состав активного центра трипсина, участвуют в образовании связей и взаимодействий как с матрицей хитозана, так и с сукцинатом хитозана, что также объясняет повышение устойчивости фермента к УФ-свету. Более детальное рассмотрение моделей указывает на образование водородных связей и других типов взаимодействий между хромофорными аминокислотными остатками трипсина и матрицами носителей, что может модулировать конформацию и каталитическую активность трипсина (табл. 1).

Для более детального исследования конформационных изменений при действии УФ-света в молекуле трипсина, свободного и иммобилизованного на хитозане и сукцинате хитозана, мы зарегистрировали ИК-спектры названных образцов после воздействия УФ-облучения в дозах 151 – 6040 Дж/м^2 . Наиболее важными для анализа белковых молекул являются следующие полосы поглощения: амид I $\sim 1650 \text{ см}^{-1}$, вызванная валентными колебаниями $\text{C}=\text{O}$; амид II ($\sim 1550 \text{ см}^{-1}$), обусловленная деформационными колебаниями $\text{N}-\text{H}$; амид III ($\sim 1250 \text{ см}^{-1}$), детерминированная валентными колебаниями $\text{C}-\text{N}$. Характеристики полос ИК-спектров трипсина, хитозана и сукцината хитозана представлены в табл. 2 [46–51].

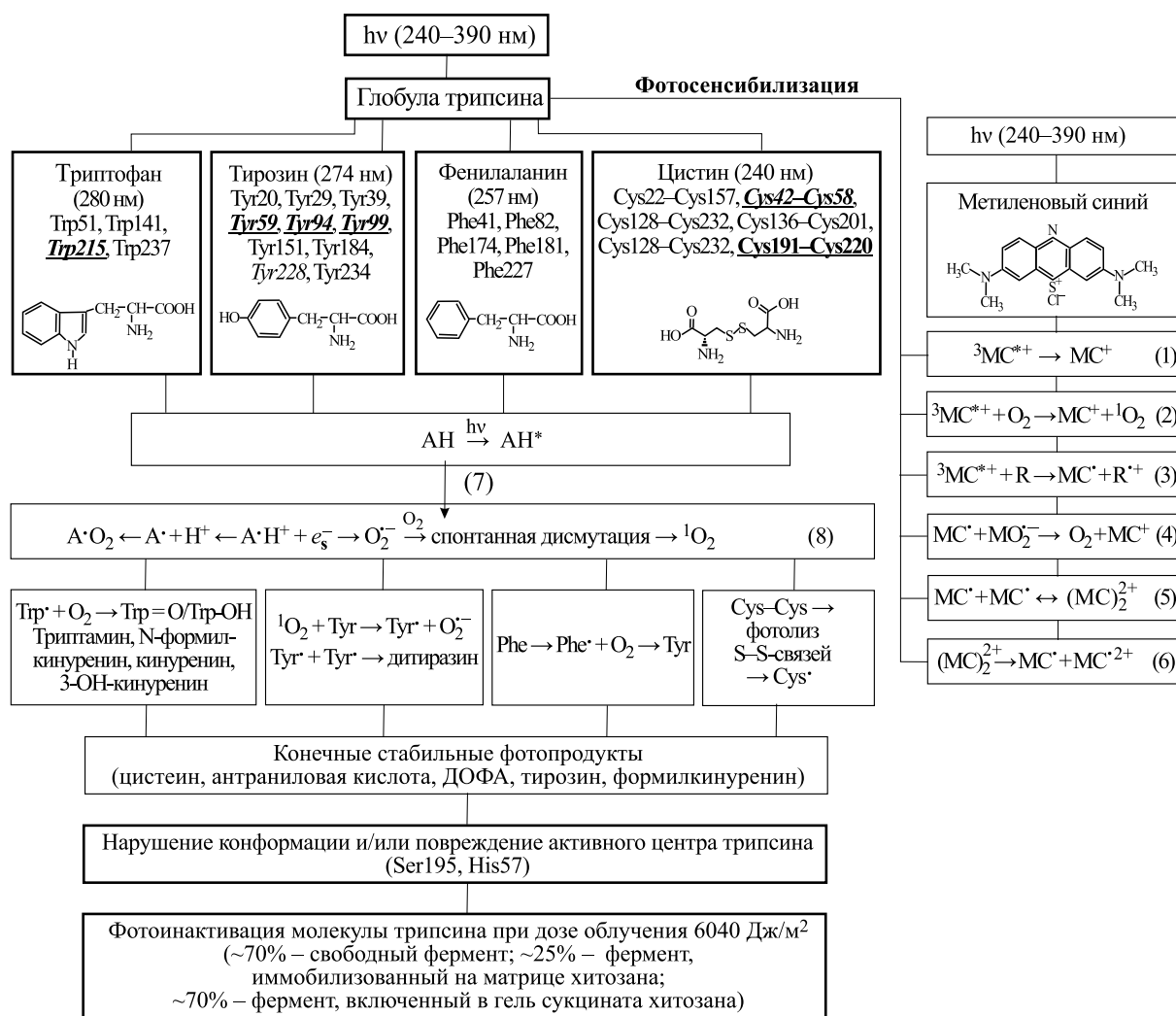


Рис. 3. Схема возможных фотопревращений трипсина при сочетанном действии метиленового синего и УФ-света. Обозначения: MC^+ – основное состояние метиленового синего, ${}^3MC^{*+}$ – его триплетное возбужденное состояние, MC^{\bullet} – полувосстановленный радикал, $MC^{\bullet+}$ – полуокисленный радикал, $(MC)_2^{2+}$ – димер метиленового синего, O_2 – молекулярный кислород, $O_2^{\bullet-}$ – супероксидный анион-радикал, 1O_2 – синглетный кислород, AH – молекула аминокислоты, AH^+ – молекула аминокислоты в возбужденном состоянии, $A^{\bullet}H^+$ – ее катион-радикал, A^{\bullet} – нейтральный радикал, e_s^- – сольватированный электрон, R – радикал, $R^{\bullet+}$ – катион-радикал. Обычным шрифтом (например, Trp51) обозначены аминокислотные остатки, входящие в состав свободного трипсина, курсивом (*Tyr228*) выделены остатки, вступающие во взаимодействие с матрицей сукцината хитозана, полужирным подчеркнутым курсивным шрифтом (*Tyr59*) выделены аминокислотные остатки, вступающие во взаимодействие с матрицей хитозана, и с матрицей сукцината хитозана. Реакции (1)–(6) [25] представляют собой пути дезактивации триплетного возбужденного состояния и радикальных форм метиленового синего: реакция (1) – самопроизвольный распад триплетного возбужденного состояния, реакция (2) – взаимодействие ${}^3MC^{*+}$ с молекулярным кислородом, реакции (3) – окислительно-восстановительные реакции с тушением ${}^3MC^{*+}$, реакция (4) – окисление MC^{\bullet} с образованием супероксидного анион-радикала $O_2^{\bullet-}$, реакция (5) – образование димера $(MC)_2^{2+}$, реакция (6) – окислительно-восстановительная реакция с распадом $(MC)_2^{2+}$. Реакции (7) и (8) представляют собой совокупность первичных фотохимических реакций, где (7) – реакции образования катион-радикала $A^{\bullet}H^+$, (8) – реакции его дальнейших превращений. Результаты собственных исследований обведены рамкой большей толщины.

В ИК-спектре трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана с молекулярной массой 200 кДа, появляются полосы поглощения в области 3286, 3358, 3412 см^{-1} после облучения дозой

151 Дж/м², 1254 и 1245 см^{-1} – при дозах 755 и 3020 Дж/м² соответственно, 867–892 см^{-1} – после воздействия УФ-света в дозах 755–6040 Дж/м². При УФ-облучении зафиксирован

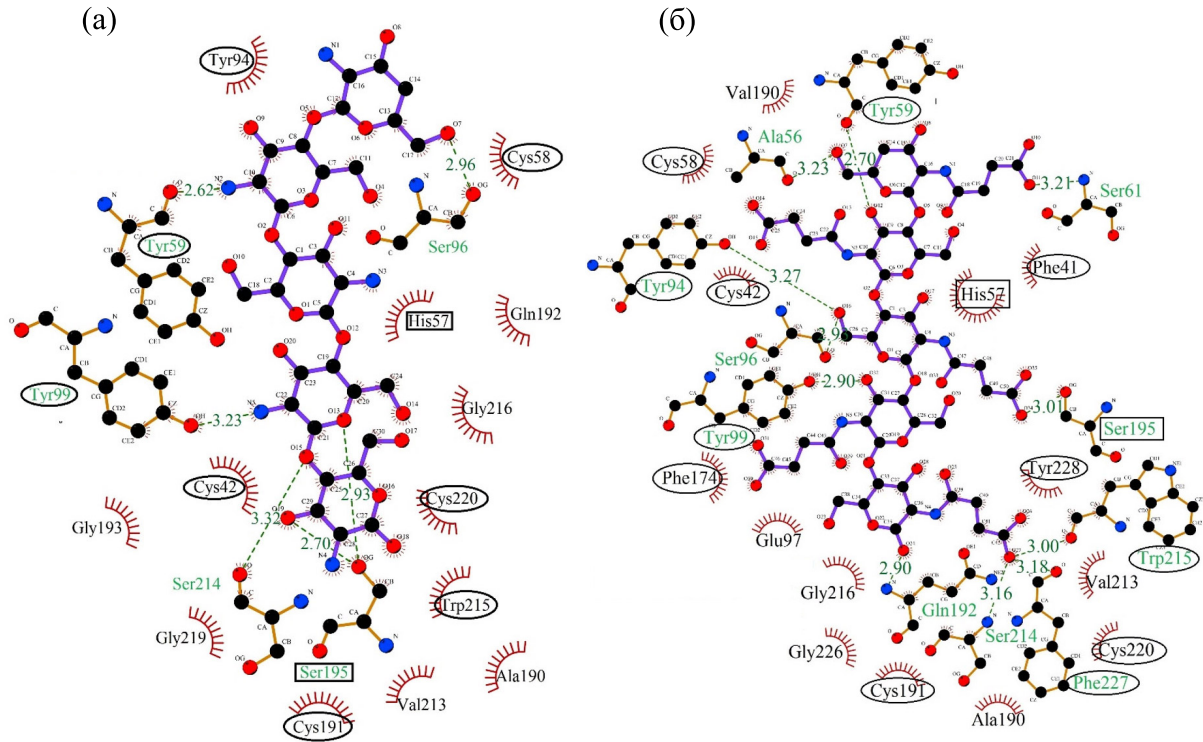


Рис. 4. Связи (обозначены пунктирными линиями с указанием длины в Å) и взаимодействия между молекулой трипсина и матрицами хитозана (а) и сукцината хитозана (б), возникающие в ходе иммобилизации фермента; овалом выделены аминокислотные остатки, являющиеся хромофорами УФ-света, прямоугольником обозначены остатки, входящие в активный центр трипсина.

Таблица 1. Аминокислотные остатки трипсина, образующие связи и взаимодействия с матрицей хитозана и сукцината хитозана

Остатки, образующие водородные связи и их длина, Å	Остатки, вступающие в различные типы физических взаимодействий
Матрица хитозана	
Tyr59 , 2.62 Tyr99 , 3.23 Ser195 , 2.93 и 2.70 Ser214, 3.32	Cys42–Cys58 , His57 , Tyr94 , Ala190, Cys191–Cys220 , Gln192, Gly193, Val213, Trp215, Gly216, Gly219,
Матрица сукцината хитозана	
Ala56, 3.23 Tyr59, 2.7 Ser61, 3.21 Tyr94, 3.27 Ser96, 2.93 Tyr99, 2.90 Gln192, 2.90 Ser195 , 3.01 Ser214, 3.16 Phe227 , 3.18	Phe41 , Cys42–Cys58 , His57 , Gly97, Phe174 , Val190, Ala190, Cys191–Cys220 , Val213, Trp215 , Gly216, Gly226, Tyr228

Примечание. В рамку помещены аминокислотные остатки, входящие в активный центр трипсина, жирным шрифтом выделены остатки, которые являются хромофорами УФ-света.

Таблица 2. Характерные полосы поглощения на ИК-спектрах трипсина и полисахаридов

Полосы поглощения в спектре свободного трипсина, см ⁻¹	Характеристика	Полосы поглощения в спектре хитозана и сукцината хитозана, см ⁻¹	Характеристика	Полосы поглощения в спектре метилового синего, см ⁻¹	Характеристика
3434–3440	Обусловлена неплоскими деформационными колебаниями NH ₂ -групп и асимметричными валентными колебаниями NH ₂ -групп	3600–3100	Обусловлена колебаниями связей N–H и O–H	3652	Вызвана свободными колебаниями O–H
3120–3130	Обусловлена наличием NH ₂ -групп аминокислот, валентными колебаниями NH ₃ ⁺	3100–2800	Вызвана растяжением связей C–H	3440	Вызвана связанными колебаниями O–H
2871–2879	Вызвана асимметричными и симметричными колебаниями групп –CH и –CH ₂	1635–1630	Вызвана колебаниями связей C–N и N–H		
2270–2285	Вызвана колебаниями связи –CN и –CH	1558–1550	Обусловлена колебаниями связей C–N и N–H		
1650	Вызвана растяжением C=O-связи в карбоксильной группе	1409–1406 и 1379–1316	Вызваны деформационными колебаниями O–H и C–H в пиранозном кольце		
1542–1586	Обусловлена деформационными колебаниями групп –NH ₃ и –C–NH ₂	1200–1000	Обусловлена растяжением связей C–O–C		
1378	Вызвана плоскими и неплоскими деформационными колебаниями NH-групп				
1250	Обусловлена валентными колебаниями C–N				
1032–1080	Вызвана валентными колебаниями –CN-групп				
800–900	Обусловлена колебаниями пиранозного цикла				

незначительный сдвиг максимума полосы 1080 см⁻¹, который соответствует деформационным колебаниям –NH-групп фермента. При анализе ИК-спектров трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана с молекулярной массой 350 кДа, после воздействия УФ-света дозами 4530–6040 Дж/м² в полосе 3120–3130 см⁻¹, обусловленной наличием NH₂-групп аминокислот, зарегистрировано незначительное смещение зна-

чений волнового числа. Форма и положение полос в областях 1630–1700, 1500–1600, 1200–1300 и 1000–1100 см⁻¹ сохраняются, что свидетельствует о поддержании стабильности структуры иммобилизованного белка в составе комплекса с носителем. После облучения дозами 151, 453, 1510 и 3020 Дж/м² в полосе поглощения 820–870 см⁻¹ появляются новые максимумы, что обусловлено изменением степени колебания пиранозного цикла. Вышеприведенные данные могут

Таблица 3. Характерные полосы поглощения на ИК-спектрах иммобилизованного трипсина после сочетанного действия УФ-излучения и фотосенсибилизатора метиленового синего в концентрации 10^{-4} моль/л

Полосы поглощения, см^{-1}	Причина возникновения на спектре	Изменения в спектре образца			
		Трипсин, иммобилизованный на хитозане с молекулярной массой 200 кДа	Трипсин, иммобилизованный на хитозане с молекулярной массой 350 кДа	Трипсин, включенный в гель хитозана с молекулярной массой менее 100 кДа	Трипсин, включенный в гель сукцината хитозана
3100–3300	Валентные колебания NH_2 -групп	Смещение максимума полосы в сторону увеличения значений	Смещение максимума полосы в сторону уменьшения значений	Незначительные колебания значений максимумов полосы	Незначительные колебания значений максимумов полосы
2800–3100	Асимметричные и симметричные колебания групп $-\text{CH}-$ и $-\text{CH}_2-$	Смещение максимума полосы в сторону уменьшения значений	Смещение максимума полосы в сторону уменьшения значений	Незначительные колебания значений максимумов полосы	Незначительные колебания значений максимумов полосы
1600–1700	Валентные колебания $\text{C}=\text{O}$	Значимых изменений не зарегистрировано	Значимых изменений не зарегистрировано	Смещение максимума полосы в сторону увеличения значений	Смещение максимума полосы в сторону увеличения значений
1550–1600	Деформационные колебания группировок $-\text{NH}$ и $-\text{C}-\text{NH}_2-$	Значимых изменений не зарегистрировано	Смещение максимума полосы в сторону уменьшения значений	Значимых изменений не зарегистрировано	Значимых изменений не зарегистрировано

свидетельствовать об изменениях в структуре молекулы трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана с молекулярными массами 200 и 350 кДа, приводящих к снижению активности препарата при использовании высоких доз УФ-облучения.

После включения трипсина в гель хитозана с массой <100 кДа в ИК-спектре образца детектировано снижение значений волнового числа в области $3282\text{--}3284\text{ см}^{-1}$ после УФ-облучения дозами 3020 и 6040 Дж/м^2 ; повышение значений волнового числа в полосе $1636\text{--}1640\text{ см}^{-1}$ при дозах $151\text{--}6040\text{ Дж/м}^2$ и зафиксированы незначительные изменения в полосе $1589\text{--}1587\text{ см}^{-1}$.

В ИК-спектре трипсина, иммобилизованного путем включения в гель сукцината хитозана, изменение значений волнового числа в сторону его повышения зарегистрировано в полосе $3282\text{--}3284\text{ см}^{-1}$ при дозах $151\text{--}6040\text{ Дж/м}^2$, а в полосах $2871\text{--}2870$, $1587\text{--}1588$, $1376\text{--}1375\text{ см}^{-1}$ значимые изменения не выявлены во всем диапазоне используемых доз. Таким образом, после включения трипсина в гели пищевого хитозана и сукци-

ната хитозана при УФ-облучении значимые изменения в ИК-спектрах в областях амид I и амид II не зарегистрированы, что свидетельствует о стабильности структуры молекул трипсина в названных комплексах.

Далее мы регистрировали ИК-спектры трипсина, адсорбированного и включенного в гели хитозана и сукцината хитозана, после сочетанного действия УФ-излучения и фотосенсибилизатора метиленового синего в концентрациях 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} моль/л. Для детального анализа конформационных изменений были выбраны ИК-спектры препаратов биокатализатора, полученных после УФ-облучения и использования концентрации фотосенсибилизатора 10^{-4} моль/л, так как при этих условиях были зафиксированы наиболее значимые изменения удельной активности фермента (табл. 3).

В ИК-спектрах трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана с массой 200 кДа, при сочетанном воздействии УФ-света в дозе 6040 Дж/м^2 и метиленового синего в концентрации 10^{-4} моль/л наблюдалось смещение некоторых полос

поглощения, а именно: максимума в области 2878 см^{-1} до значения 2869 см^{-1} и максимума 3282 см^{-1} до значения 3257 см^{-1} .

В ИК-спектрах трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана с массой 350 кДа, после действия УФ-света и добавления метиленового синего выявлены смещения волнового числа в полосах $3282\text{--}3280$ и $2876\text{--}2874\text{ см}^{-1}$. В области амид I (1645 см^{-1}) зарегистрировано смещение максимума в сторону уменьшения значений волнового числа после применения дозы УФ-излучения 151 Дж/м^2 .

После включения трипсина в гель хитозана с массой менее 100 кДа в ИК-спектрах зафиксированы колебания максимумов полос в областях $3344\text{--}3013$ и $2924\text{--}2883\text{ см}^{-1}$ и смещение максимума полосы $1628\text{--}1631\text{ см}^{-1}$ в сторону увеличения значений волнового числа после облучения дозой $755\text{--}6040\text{ Дж/м}^2$.

В ИК-спектре трипсина, включенного в гель сукцината хитозана, детектированы колебания волнового числа в области полос $3434\text{--}3435$, $3366\text{--}3365$, $2933\text{--}2927\text{ см}^{-1}$. В области амид I после действия УФ-света смещаются значения волнового числа от 1664 до 1667 см^{-1} . Изменения в описанных выше полосах могут свидетельствовать о трансформациях в валентных колебаниях NH_3^+ , асимметричных и симметричных колебаниях —CH и —CH_2 -групп, колебаниях группы O—H , неплоских деформационных колебаниях NH_2 -групп и асимметричных валентных колебаниях NH_2 -групп, что указывает на изменение числа водородных связей между ферментом и носителем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами выявлены фотопротекторные свойства хитозана и сукцината хитозана по отношению к трипсину при разных способах иммобилизации фермента на их матрице. При УФ-облучении свободного трипсина снижение его удельной активности на 28, 32 и 49% зарегистрировано при дозах 3020, 4530 и 6040 Дж/м^2 . Адсорбционная иммобилизация трипсина на матрицах хитозана и его включение в гель хитозана и сукцината хитозана способствуют сохранению уровня каталитической способности фермента до ~90% и выше во всем диапазоне используемых нами доз. После добавления фотосенсибилизатора метиленового синего в концентрациях от 10^{-5} до 10^{-4} моль/л за счет фотопротекторных свойств используемых нами полисахаридов активность фермента сохраняется до ~25% после адсорбции на матрице хи-

тозана и до ~50% после включения в гели хитозана и сукцината хитозана.

С помощью метода молекулярного докинга изучены связи и взаимодействия между трипсином и полисахаридом, которые могут вносить вклад в изменение каталитической способности гетерогенного препарата при действии УФ-излучения. Установлено, что при адсорбционной иммобилизации на хитозане в образовании водородных связей и слабых физических взаимодействий с матрицей носителя принимают участие 8 аминокислотных остатков, являющихся хромофорами УФ-света, а при включении в гель сукцината хитозана — 12 таких остатков. Данное распределение хромофоров объясняет более высокий процент сохранения активности трипсина после включения в гель сукцината хитозана (97%) по сравнению с адсорбционной иммобилизацией (90%).

Методом ИК-спектроскопии выявлены конформационные изменения в молекуле свободного трипсина и в условиях его различного микроокружения при иммобилизации. Установлено, что после адсорбции на матрице хитозанов сохраняется форма и положение полос в областях амид I, амид II, амид III, однако, после УФ-облучения дозами 1510 и 3020 Дж/м^2 наблюдались незначительные изменения в области колебаний пиранозного цикла, что может объяснить снижение удельной активности препаратов. После включения в гели хитозана и сукцината хитозана существенные изменения значений волнового числа в области полос амид I, II и III не обнаружены, что свидетельствует о стабильности структуры фермента в составе проанализированных комплексов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023—2025 годы (проект № FZGU-2023-0009).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rawlings N. D. and Barrett A. J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.*, **290**, 205–218 (1993). DOI: 10.1042/bj2900205
- Kaur J. and Singh P. K. Trypsin detection strategies: a review. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **52** (5), 949–967 (2022). DOI: 10.1080/10408347.2020.1846490
- Barrett A. J. and Rawlings N. D. Families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 247–250 (1995). DOI: 10.1006/abbi.1995.1227
- Chen J. S. and Maniwa M. Influence of trypsin on the biological bonding of cartilaginous surface to bone in rabbits. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, **120** (10), 587–591 (2000). DOI: 10.1007/s004020000139
- Jamal G. A., Jahangirian E., Hamblin M. R., Mirzaei H., Tarahimofrad H., and Alikowsarzadeh N. Proteases, a powerful biochemical tool in the service of medicine, clinical and pharmaceutical. *Prepar. Biochem. Biotechnol.*, **55** (1), 1–25 (2024). DOI: 10.1080/10826068.2024.2364234
- Dandona P., Hodson M., Bell J. Ramdial L., Beldon I., and Batten J. C. Serum immunoreactive trypsin in cystic fibrosis. *Thorax*, **36**, 60–62 (1981). DOI: 10.1136/thx.36.1.60
- Fonseca V., Epstein O., and Katrak A. Serum immunoreactive trypsin and pancreatic lipase in primary biliary cirrhosis. *Clin. Pathol. J.*, **39**, 638–640 (1986). DOI: 10.1136/jcp.39.6.638
- Bode W. Aktivierung, aktivität und inhibierung des rindertrypsins. *Naturwissenschaften*. **66** (5), 251–258 (1979). DOI: 10.1007/bf00571605
- Walsh K. A. Versatility of Proteins. *Methods Enzymol.*, **19**, 41–63 (1970).
- Evnouchidou I. and Endert P. Peptide trimming by endoplasmic reticulum aminopeptidases: Role of MHC class I binding and ERAP dimerization. *Hum. Immunol.*, **80**, 290–295 (2019). DOI: 10.1016/j.humimm.2019.01.003
- Klasen H. J. A review on the nonoperative removal of necrotic tissue from burn wounds. *Burns*, **26** (3), 207–222 (2000). DOI: 10.1016/s0305-4179(99)00117-5
- Панкова С. М., Холявка М. Г., Кондратьев М. С., Вышкворкина Ю. М., Лукин А. Н. и Артюхов В. Г. Матрица хитозана как фотомодулятор для бромелина. *Радиаци. биология. Радиоэкология*, **61** (5), 451–459 (2021). DOI: 10.31857/S0869803121050088
- Tischer W. and Wedekind F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Topics Curr. Chem.*, **200**, 96–100 (1999). DOI: 10.1007/3-540-68116-7_4
- Jesionowski T., Zdarta J., and Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, **20**, 801–821 (2014). DOI: 10.1007/s10450-014-9623-y
- Imam H. T., Marr P. C., and Marr A. C. Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. *Green Chem.*, **23** (14), 4980–5005 (2021). DOI: 10.1039/d1gc01852c
- Pierre A. C. The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatalysis and Biotransformation*, **22** (3), 145–170 (2004). DOI: 10.1080/1024240412331283314
- Приворотская Е. А. *Получение стабилизированных форм гидролитических ферментов технического и фармацевтического назначения*. Дис. ... канд. хим. наук (РХТУ им. Д.И. Менделеева, М., 2017).
- Кудряшова Е. В. *Функционирование и структура белков на поверхностях раздела фаз. Новые методы исследования* (Palmarium Acad. Publ., 2013).
- Холявка М. Г. и Артюхов В. Г. *Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение* (Воронеж, 2017).
- Biro E., Nemeth A. S., and Sisak C. Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, **70** (6), 1240–1246 (2008). DOI: 10.1016/j.jprot.2007.11.005
- Панкова С. М., Сакибаев Ф. А., Холявка М. Г., Вышкворкина Ю. М., Лукин А. Н. и Артюхов В. Г. Исследование процессов взаимодействия трипсина с ионообменными волокнами и хитозаном. *Биоорг. химия*, **47** (3), 400–412 (2021). DOI: 10.31857/S0132342321030143
- Baidamshina D. R., Trizna E. Y., Agafonova M. N., Chirkova M. N., Vasileva O. S., Akhmetov N., Shubina V. V., Porfiryev A. G., Semenova E. V., Sachenkova O. A., Baltina T. V., Kayumov A. R., Koroleva V. A., Pankova S. M., Artyukhov V. G., Holyavka M. G., and Bogachev M. I. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized ficin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **164**, 4205–4217 (2020). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.030
- Владимиров Ю. А. и Потапенко А. Я. *Физико-химические основы фотобиологических процессов* (Высшая школа, М., 1989).
- Рощупкин Д. И. и Артюхов В. Г. *Основы фотобиофизики* (Воронеж, 1997).
- Tardivo J. P., Del Giglio A., de Oliveira C. S., Gabrielli D. S., Junqueira H. C., Tada D. B., and Baptista M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **2** (3), 175–191 (2005). DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9
- Jang M., Ko D., Choi Y., Yan B., Jin X., Kim D. K., and Piao Y. Self-organized hierarchically porous carbon coated on carbon cloth for high-performance freestanding supercapacitor electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **895**, 115532 (2021). DOI: 10.1016/j.jelechem.2021.115532
- Pecci L., Montefoschi G., and Antonucci A. Formation of nitrotyrosine by methylene blue photosensitized oxidation of tyrosine in the presence of nitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289** (1), 305–309 (2001). DOI: 10.1006/bbrc.2001.5971
- Tacal O., Li B., Lockridge O., and Schopfer L. M. Resistance of human butyrylcholinesterase to methylene blue-catalyzed photoinactivation; mass spectrometry analysis

- of oxidation products. *Photochem. Photobiol.*, **89** (2), 336–348 (2013). DOI: 10.1111/php.12016
29. Ragàs X., He X., Agut M., Roxo-Rosa M., Gonsalves A., Serra A., and Nonell S. Singlet oxygen in antimicrobial photodynamic therapy: Photosensitizer-dependent production and decay in *E. coli*. *Molecules*, **18** (3), 2712–2725 (2013). DOI: 10.3390/molecules18032712
30. Wei X., Wang W., and Chen K. ZnO: Er, Yb, Gd particles designed for magnetic-fluorescent imaging and near-infrared light triggered photodynamic therapy. *J. Phys. Chem. C*, **117** (45), 23716–23729 (2013). DOI: 10.1021/jp4071696.
31. Qin M., Hah H. J., and Kim G. Methylene blue covalently loaded polyacrylamide nanoparticles for enhanced tumor-targeted photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **10** (5), 832–841 (2011). DOI: 10.1039/c1pp05022b
32. Silman I., Roth E., and Paz A., The specific interaction of the photosensitizer methylene blue with acetylcholinesterase provides a model system for studying the molecular consequences of photodynamic therapy. *Chemicobiol. Interactions*, **203** (1), 63–66 (2013). DOI: 10.1016/j.cbi.2012.10.021
33. Tardivo J. P., Giglio A. D., and Oliveira C. S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagn. Photodynamic Therapy*, **2**, 175–191 (2005). DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9
34. McCormick J. P., Fischer J. R., Pachlatko J. P., and Eisenstark A. Characterization of a cell-lethal product from the photooxidation of tryptophan: hydrogen peroxide. *Science*, **191**, 468–469 (1976). DOI: 10.1126/science.1108203
35. Vorobey V. and Pinchuk S. V. Formation and photosensitizing activity of protein tryptophan photochemical breakdown products in isolated erythrocyte membranes. *Biofizika*, **40**, 342–346 (1995).
36. Catalfo A., Bracchitta G., and De Guidi G. Role of aromatic amino acid tryptophan UVA-photoproducts in the determination of drug photosensitization mechanism: a comparison between methylene blue and naproxen. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **8** (10), 1467–1475 (2009). DOI: 10.1039/b9PP00028c
37. Владимиров Ю. А. Инактивация ферментов ультрафиолетовым облучением. *Соросовский образоват. журн.*, **2**, 20–27 (2001).
38. Панкова С. М., Холявка М. Г., Артюхов В. Г., Лукин А. Н. и Вышкворкина Ю. М. ИК-спектроскопия в исследовании процессов УФ-модификации иммобилизованного трипсина. *Сорбционные и хроматографические процессы*, **19** (4), 489–497 (2019). DOI: 10.17308/sorpchrom.2019.19/788
39. Холявка М. Г., Панкова С. М., Вышкворкина Ю. М., Лукин А. Н., Кондратьев М. С. и Артюхов В. Г. Хитозан и сукцинат хитозана как фотопротекторы для иммобилизованного на их матрице папаина. *Радиационная биология. Радиоэкология*, **62** (5), 532–542 (2022). DOI: 10.31857/S086980312205006X
40. Логинова О. О., Холявка М. Г., Артюхов В. Г. и Беленова А. С. Подбор методики количественного определения трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, и его каталитической активности. *Вестн. ВГУ. Сер.: Химия. Биология. Фармация*, **2**, 116–119 (2013).
41. Холявка М. Г., Артюхов В. Г. и Сазыкина С. М. Исследование процессов УФ-модификации свободного и иммобилизованного трипсина. *Радиационная биология. Радиоэкология*, **57** (1), 66–70 (2017). DOI: 10.7868/S0869803117010064
42. Холявка М. Г., Панкова С. М., Вышкворкина Ю. М., Лукин А. Н., Кондратьев М. С. и Артюхов В. Г. Хитозан как фотопротектор для иммобилизованного на его матрице папаина. *Биофизика*, **67** (3), 467–476 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922030061
43. Sorokin A. V., Goncharova S. S., Lavlinskaya M. S., Holyavka M. G., Faizullin D. A., Kondratyev M. S., Kanykin S. V., Zuev Yu. F., and Artyukhov V. G. Carboxymethyl cellulose-based polymers as promising matrices for ficin immobilization. *Polymers*, **15** (3), 649 (2023). DOI: 10.3390/polym15030649
44. Малыгина Н. В., Олышанникова С. С., Холявка М. Г., Сорокин А. В., Лавлинская М. С., Артюхов В. Г., Файзуллин Д. А. и Зувев Ю. Ф. Получение комплексов фицина с карбоксиметилхитозаном и *n*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном и изучение их структурных особенностей. *Биоорганическая химия*, **49** (1), 93–104 (2023). DOI: 10.31857/S0132342322060173
45. Várallyay E., Lengyel Z., and Gráf L. The role of disulfide bond C191–C220 in trypsin and chymotrypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230** (3), 592–596 (1997). DOI: 10.1006/bbrc.1996.6009
46. Andrady A., Torikai A., and Kobatake T. Spectral sensitivity of chitosan photodegradation. *J. Appl. Polymer Sci.*, **62** (9), 1465–1471 (1996). DOI: 10.1002/(SICI)1097-4628(19961128)62:9<1465::AID-APP16>3.0.CO;2-Y
47. Praxedes A. P. P., Silva A. J. C., and Silva R. C. Effects of UV irradiation on the wettability of chitosan films containing dansyl derivatives. *J. Colloid Interface Sci.*, **376** (1), 255–261 (2012). DOI: 10.1016/j.jcis.2012.02.056
48. Ильина А. В. и Варламов В. П. Нейтрализация активных форм кислорода хитозаном и его производными *in vitro/vivo* (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, **52** (1), 5 (2016). DOI: 10.7868/S0555109916010062
49. Тарасевич Б. Н. *ИК спектры основных классов органических соединений* (МГУ, М., 2012).
50. Черных С. В., Овчинников О. В., Воробьева Р. П., Латышев А. Н., Алпатов Д. В., Утехин А. Н., Еелев А. Б., Смирнов М. С. Исследование особенностей ассоциации молекул метиленового голубого в растворах по инфракрасным спектрам поглощения. *Вестн. ВГУ. Сер.: Физика. Математика*, **1**, 97–101 (2006).

Photoprotective Properties of Chitosan and Chitosan Succinate Against Trypsin at Different Methods of Enzyme Immobilization on Their Matrix

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

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

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

****Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia*

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

UV irradiation at doses of 3020, 4510, and 6040 J/m² was found to decrease the level of specific activity of free trypsin by 28, 32, and 49%, respectively. Adsorption immobilization on the matrix of chitosans with molecular masses of 200 and 350 kDa, inclusion of chitosan (<100 kDa) and chitosan succinate in the gel contribute to the preservation of trypsin molecule activity at the level of ~90% and higher. Under UV irradiation in the dose range of up to 6040 J/m² in the presence of a photosensitizer, methylene blue, at a concentration of 10⁻⁴ mol/l, the activity of free trypsin decreases by 72%. After immobilization, the stability of the enzyme complex under the above conditions increases: the activity of trypsin immobilized on the matrix of chitosans with molecular masses of 200 and 300 kDa is maintained at the level of about 75%, after inclusion of the enzyme in the chitosan gel (<100 kDa) – up to ~50%, chitosan succinate – up to ~70%. The molecular docking method revealed that a number of tryptophan, tyrosine and phenylalanine residues, as well as two cystines, take part in the formation of bonds and interactions between the trypsin molecule and the matrices of chitosan and chitosan succinate, which probably predetermines the photoprotective properties of the named polysaccharides. IR spectroscopy showed that after UV irradiation in the presence of methylene blue and without it, no significant changes in the wave number values in the region of the amide I, II and III bands were detected in the spectra of trypsin immobilized on chitosan and chitosan succinate matrices, which indicates that the stability of the enzyme structure in the complexes with the named polysaccharides is maintained.

Keywords: UV irradiation, trypsin, chitosan, chitosan succinate, adsorption immobilization, inclusion in gel