

## ФОТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРИРОДНОГО ПОЛИСАХАРИДА ХИТОЗАНА И СУКЦИНАТА ХИТОЗАНА ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ФИЗИЧЕСКОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ТРИПСИНА НА ИХ МАТРИЦЕ

С.М. Панкова<sup>1,2</sup>, М.Г. Холявка<sup>1</sup>, В.А. Королева<sup>1,2</sup>, М.С. Кондратьев<sup>1,3</sup>, А.Н. Лукин<sup>1</sup>, В.Г. Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Воронежский государственный университет Воронеж, Россия

<sup>2</sup> Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко Воронеж, Россия

<sup>3</sup> Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской области, Россия

Трипсин (КФ 3.4.21.4) – фермент поджелудочной железы, относится к семейству S1 сериновых протеаз, расщепляющих пептидные связи белков, состоит из полипептидной цепи длиной 223 аминокислоты, в активном центре находятся остатки His57 и Ser195. Применение протеаз в свободной (растворимой) форме имеет ряд ограничений, например, их быстрая инактивация за счет процессов протеолиза. В основе стабилизации функциональной активности фермента путем иммобилизации лежит идея сохранения каталитически активной конформации его молекул. Хитозан – полиаминосахарид, получаемый из хитина путем N-деацетилирования. Он биосовместим, нетоксичен, а также биоразлагаем, широко применяется в различных областях биотехнологии. УФ-излучение инициирует свободно-радикальные фотопротекторные процессы в биомолекулах, которые приводят к нарушению структуры и инактивации фермента. 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.

В качестве объекта исследования был выбран трипсин из поджелудочной железы быка фирмы «MP biomedical», субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин фирмы «Sigma-Aldrich», носителями для иммобилизации – хитозаны, синтезированные ЗАО «Биопрогресс»: <100, 200 и 350 кДа, а также сукцинат хитозана. Иммобилизацию трипсина абсорбционным методом и путем включения в гель осуществляли по методикам, изложенным в статьях [1, 2]. Методика УФ-облучения образцов подробно изложена в работе [2]. УФ-облучение свободного и иммобилизованного трипсина проводили в диапазоне доз 151–6040 Дж/м<sup>2</sup> в присутствии фотосенсибилизатора – метиленового синего – в трёх концентрациях: 10<sup>-5</sup>, 5×10<sup>-5</sup> и 10<sup>-4</sup> моль/л.

Установлено, что УФ-облучение в дозах 3020, 4510 и 6040 Дж/м<sup>2</sup> 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/м<sup>2</sup> в присутствии фотосенсибилизатора – метиленового синего – в концентрации 10<sup>-4</sup> моль/л активность свободного трипсина снижается на 72 %. После иммобилизации стабильность ферментного комплекса возрастает и активность трипсина, иммобилизованного на матрице хитозанов с молекулярными массами 200 и 300 кДа, при названных условиях сохраняется на уровне порядка 75 %, после включения энзима в гель хитозана (<100 кДа) – до ~ 50 %, сукцината хитозана – до ~ 70 %. Методом молекулярного докинга установлено, 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, обеспечивает фотопротекторные свойства названных полисахаридов.

### Литература

1. Панкова С.М., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Лукин А.Н., Вышкворкина Ю.М. ИК-спектроскопия в исследовании процессов УФ-модификации иммобилизованного трипсина // Сорбционные и хроматографические процессы. 2019. № 4. Т. 19. С. 489–497.

2. Холявка М.Г., Панкова С.М., Вышкворкина Ю.М., Лукин А.Н., Кондратьев М.С., Артюхов В.Г. Хитозан и сукцинат хитозана как фотопротекторы для иммобилизованного на их матрице папаина // Радиационная биология. Радиоэкология. 2022. № 5. Т. 62. С. 532–542.