

## ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ РАЗМЕРОВ И УДЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОЛЕКУЛ ТРИПСИНА ПОСЛЕ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ

С. М. Панкова<sup>1,2</sup>, Ф. А. Сакибаев<sup>1</sup>, М. Г. Холявка<sup>1,3</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

2 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»

3 – ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Поступила в редакцию 01.06.2021 г.

**Аннотация.** В настоящее время достижения энзимологии находят все большее применение в профилактике, диагностике и лечении болезней. В современной фармакологии широко используются ферментные препараты, при этом разработка энзимных технологий требует многочисленных исследований физико-химических характеристик биокатализаторов в различных условиях проведения реакции, например, после УФ-облучения. Трипсин (КФ 3.4.21.4) – протеолитический фермент с эстеразной активностью, относящийся к группе сериновых протеаз. В фармакологии и медицине энзим нашел свое применение при лечении ран и ожогов, его используют как вспомогательное средство для облегчения течения воспалительных заболеваний дыхательных путей (трахеиты, бронхиты).

В представленной работе была изучена динамика изменения размеров глобулы и активности молекул трипсина после УФ-облучения в диапазоне доз 151-6040 Дж/м<sup>2</sup>. Для определения каталитической активности препаратов применяли метод Лоури с модификацией – без добавления в реакционную среду сульфата меди. Процесс УФ-облучения происходил при непрерывном перемешивании раствора магнитной мешалкой в круглодонной термостатируемой кювете (20±1 °С) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм. Размеры молекул нативного и облученного трипсина измеряли на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments).

При дозе облучения 1510 Дж/м<sup>2</sup> зафиксировано снижение каталитической способности энзима на 18 %, использование дозы 6040 Дж/м<sup>2</sup> привело к инактивации трипсина примерно наполовину. Для объяснения полученных результатов нами был проведен анализ размеров молекул нативного и облученного трипсина. Для необлученного образца выявлено поочередное преобладание частиц, диаметр которых соответствует или меньше нативной молекулы трипсина. Величина дисперсии среднего значения количества агрегатов снижалась с увеличением дозы облучения. Одновременно наблюдалось сокращение максимального количества частиц данной размерной группы и соответствующих по размеру нативной форме энзима на фоне роста значения данного показателя для продуктов автолиза. Указанные данные могут свидетельствовать о снижении способности трипсина образовывать надмолекулярные комплексы с возрастанием дозы его облучения УФ-светом.

**Ключевые слова:** трипсин, УФ-облучение, удельная активность, продукты автолиза, агрегация

Системная энзимотерапия – это самостоятельное направление медикаментозного лечения, основанное на использовании сбалансированных смесей протеолитических ферментов животного (трипсин) и растительного (папаин, бромелин) происхождения. Энзимы, входящие в состав таких препаратов, при пероральном применении оказывают системное воздействие на основные физиологические и

патофизиологические процессы в организме. Энзимотерапия помогает решить типичные проблемы в клинической практике, а именно оптимизировать течение общей и местной воспалительной реакции, отёка и, как следствие, уменьшить интенсивность болевых ощущений, восстановить процессы репарации. При этом энзимы являются безопасными для пациентов [1, 2]. На сегодняшний день широкое распространение получили лекарственные препараты из протеолитических ферментов (трипсина,

© Панкова С. М., Сакибаев Ф. А., Холявка М. Г., Артюхов В. Г., 2021

химотрипсина, папаина, бромелина), которые применяются в клинической практике в виде лекарств местного и системного использования. Лекарственные средства, включающие в свой состав трипсин, такие, как «Микразим» и «Вобензим», используются в гастроэнтерологии, а «Феруг-2», «Коллитин» – в качестве ранозаживляющих материалов [3, 4].

Трипсин (КФ 3.4.21.4) – протеолитический фермент класса гидролаз, синтезируемый из профермента трипсиногена в двенадцатиперстной кишке [5, 6]. Он относится к группе сериновых протеаз и представляет собой бесцветное кристаллическое вещество. Молекулярная масса составляет 23-25 кДа, оптимум каталитической активности находится в диапазоне pH 7.5-8.0. Молекула этого белка состоит из 223 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь [7-9]. Фермент избирательно гидролизует связи, образованные карбоксильными группами аргинина и лизина [9, 10]. Для медицины и фармакологии трипсин интересен своими свойствами – оказывает выраженное противовоспалительное и противоотечное, а также регенерирующее действие, избирательно деградирует некротизированные ткани, разжижает сгустки крови, снижает резистентность гнойной микрофлоры к антибиотикам, тем самым ускоряя процесс заживления гнойных ран [10, 11].

В качестве антимикробного агента, помимо протеаз, может выступать ультрафиолетовое излучение. Оно способно стимулировать компоненты иммунной системы и активировать иммуноциты [12-15].

В связи с этим целью работы было исследовать динамику изменения размеров и удельной активности молекул трипсина после УФ-облучения в диапазоне доз 151-6040 Дж/м<sup>2</sup>.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран трипсин быка фирмы «MP biomedical», субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Sigma-Aldrich».

Определение количества белка в образцах проводили методом Лоури [16]. Для выявления каталитической активности препаратов мы также применяли метод Лоури, но с модификацией – без добавления в реакционную среду сульфата меди [17]. Ранее в процессе сравнения ряда методик определения количества белка в растворе мы установили, что данный метод незначительно «реагирует» на отдельные аминокислоты, в частности изолейцин, а его применение позволяет минимизировать реакции автолиза трипсина [18].

Процесс УФ-облучения происходил при не-

прерывном перемешивании раствора в объеме 4 мл (толщина слоя в середине кюветы 7 мм) магнитной мешалкой в круглодонной термостатируемой кювете (20±1 °С) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм в течение 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 минут. Доза облучения составляла соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup>.

Размеры молекул нативного и облученного трипсина измеряли на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (632.8 нм) собирали под углом 173° при температуре 25 °С [19]. Было выделено 3 группы частиц с диаметром: 1) меньшим, чем размер молекулы трипсина; 2) соответствующим нативной молекуле трипсина; 3) превосходящим таковой для трипсина и, таким образом, соответствующим агрегатам его молекул. За диаметр нативного трипсина принимали диапазон между 3 и 5 нм [20]. Для каждой из размерных групп было рассчитано среднее значение количества частиц, на основе которого построены зависимости данного показателя от дозы облучения и времени инкубации образцов после облучения в 0.1 М фосфатном буфере с pH 6.5 при температуре 25° С.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента. Все экспериментальные исследования осуществляли минимум в 8-кратной повторности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При УФ-облучении свободного трипсина в дозе 755 Дж/м<sup>2</sup> наблюдалось незначительное уменьшение его активности. Начиная с дозы облучения 1510 Дж/м<sup>2</sup>, происходило снижение каталитической способности фермента, которая статистически значимо уменьшалась на 28, 31 и 49 % при дозах 3020, 4530, 6040 Дж/м<sup>2</sup> соответственно (рис. 1).

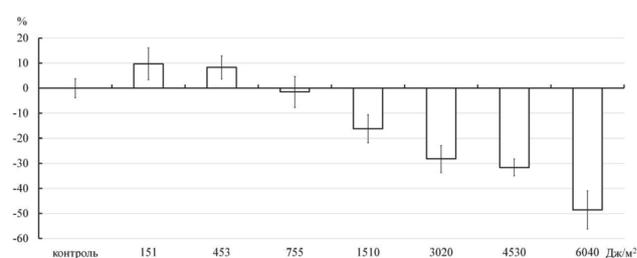


Рис. 1. Изменение удельной активности трипсина (в процентах) после УФ-излучения в дозах 151-6040 Дж/м<sup>2</sup>. За 100 % принималась активность необлученного образца

После инкубации в течение 1 часа в 0.1 М фосфатном буфере, рН 6.5, при температуре 25° С необлученного и облученного различными дозами УФ-излучения (151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup>) трипсина в концентрации 5×10<sup>-5</sup> моль/л наблюдалась высокая дисперсия в значениях количества частиц всех размерных групп.

Для необлученного трипсина выявлено поочередное преобладание частиц, соответствующих по размеру нативному ферменту и продуктам его автолиза (рис. 2, 3). В данном случае частицы, размер

которых составляет 3-5 нм, могут также являться агрегатами продуктов автолиза, образовавшимися вследствие сохранения трипсином активности на достаточно высоком уровне. Среднее количество частиц, соответствующих по размеру одиночной молекуле трипсина, после УФ-облучения дозами 155-755 Дж/м<sup>2</sup> не превышало 10-12 %. Воздействие дозой 1510 Дж/м<sup>2</sup> привело к увеличению числа частиц с размером 3-5 нм, до 14 %, также при данной дозе выявлено увеличение количества продуктов автолиза до 20 %. При облучении дозами

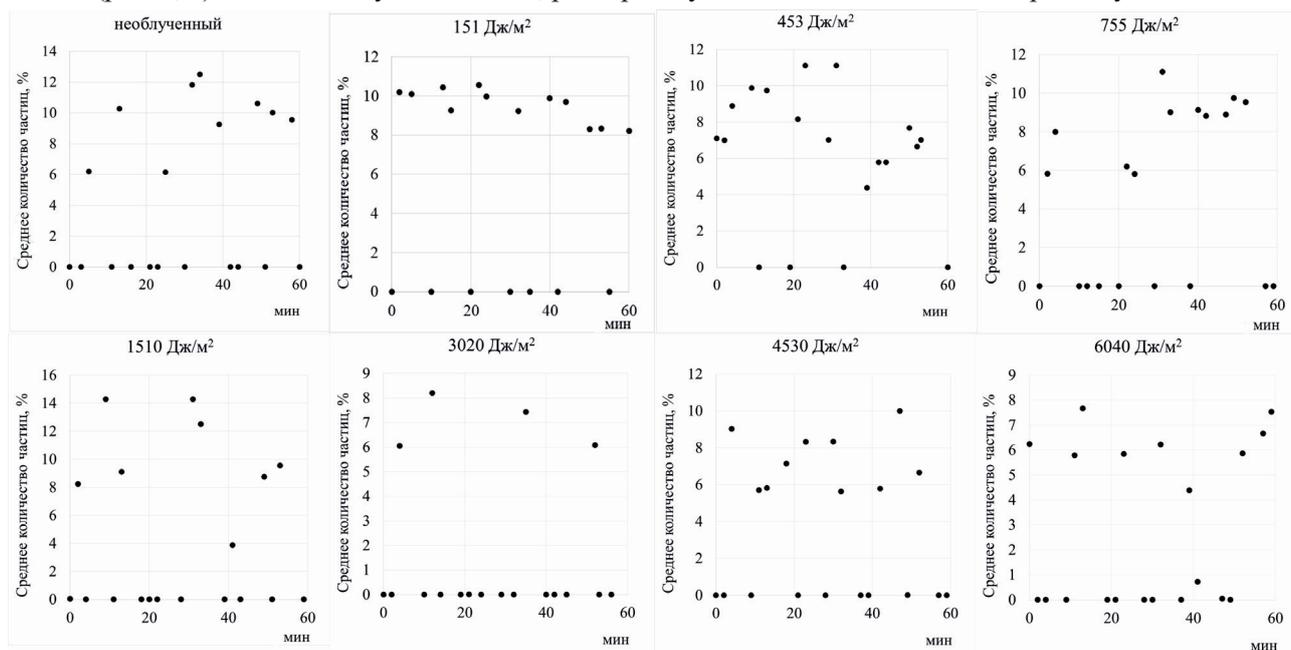


Рис. 2. Количество частиц, соответствующих по размеру нативной молекуле трипсина (%), после УФ-облучения дозами 151-6040 Дж/м<sup>2</sup> в 0.1 М фосфатном буфере, рН 6.5, при температуре 25°С

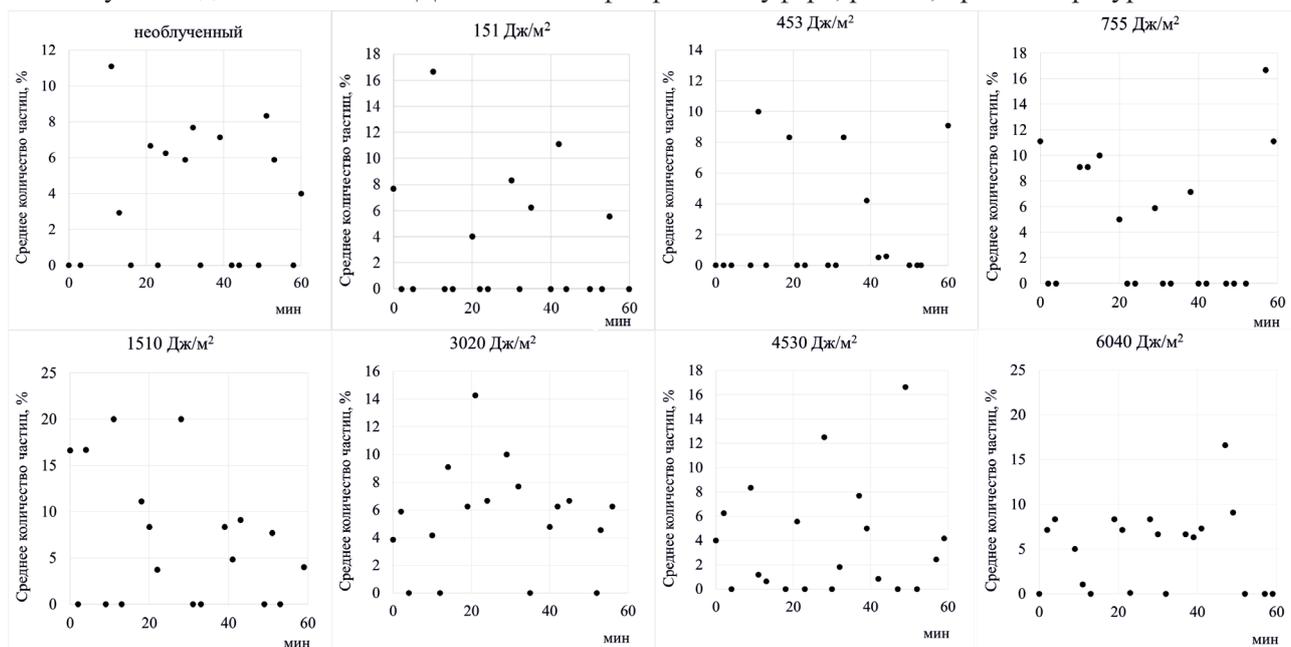


Рис. 3. Количество частиц, соответствующих по размеру продуктам автолиза трипсина (%), после УФ-облучения дозами 151-6040 Дж/м<sup>2</sup> в 0.1 М фосфатном буфере, рН 6.5, при температуре 25°С

3020-6040 Дж/м<sup>2</sup> процент частиц, соответствующих по размеру нативному трипсину, снизился до 9 %. Количество агрегатов трипсина при использовании дозы 453 Дж/м<sup>2</sup> снизилось в ~ 4.5 раза по сравнению с необлученным образцом и в ~ 3 раза по сравнению с трипсином, облученным в дозе 151 Дж/м<sup>2</sup>, и далее не повышалось с увеличением дозы облучения (рис. 4).

Анализ дисперсии среднего значения количества частиц показал, что величина данного показателя снижалась для агрегатов трипсина с увеличением дозы облучения (рис. 5). Одновременно наблюдалось сокращение максимального количества частиц данной размерной группы и соответствующих по

размеру нативной форме энзима на фоне роста значения этого показателя для продуктов автолиза с увеличением дозы облучения (рис. 6). Указанные данные могут свидетельствовать о снижении способности трипсина образовывать надмолекулярные комплексы с возрастанием дозы его облучения УФ-светом. При этом уменьшение дисперсии размеров частиц может быть обусловлено как низким содержанием агрегатов, так и увеличением их стабильности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что с увеличением дозы облучения УФ-светом каталитическая способность трипсина уменьшается практически вдвое при

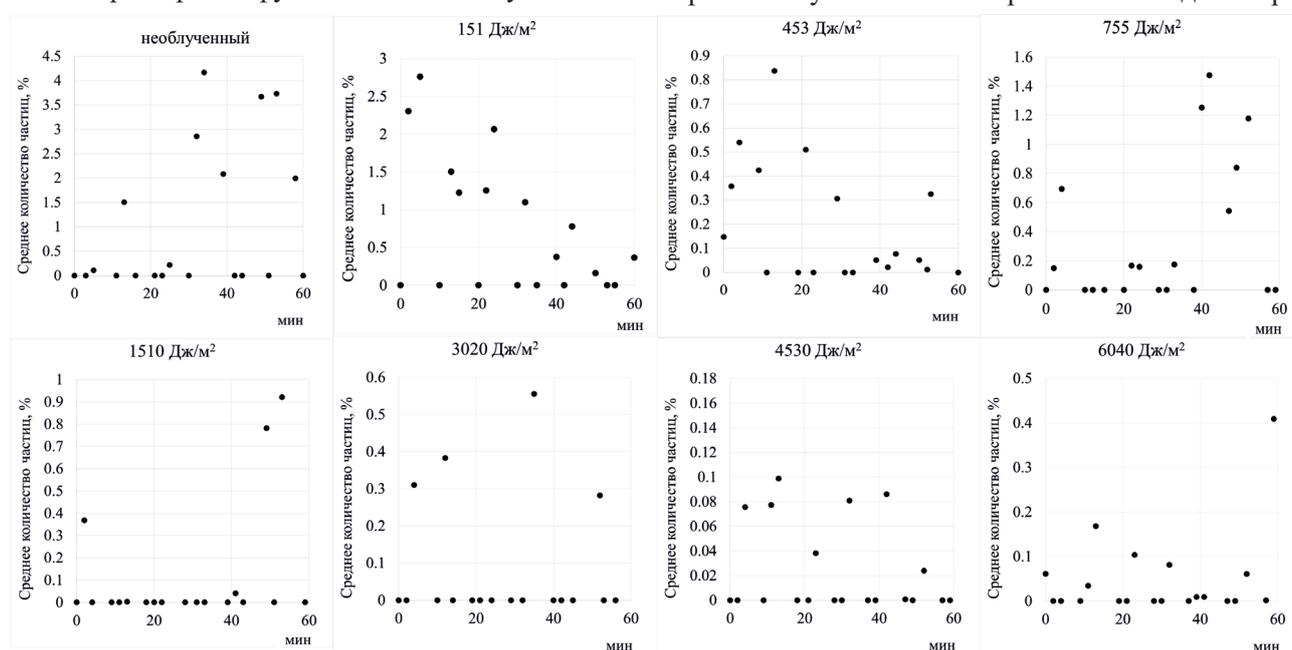


Рис. 4. Количество частиц, соответствующих по размеру агрегатам трипсина (%), после УФ-облучения дозами 151-6040 Дж/м<sup>2</sup> в 0.1 М фосфатном буфере, рН 6.5, при температуре 25°C

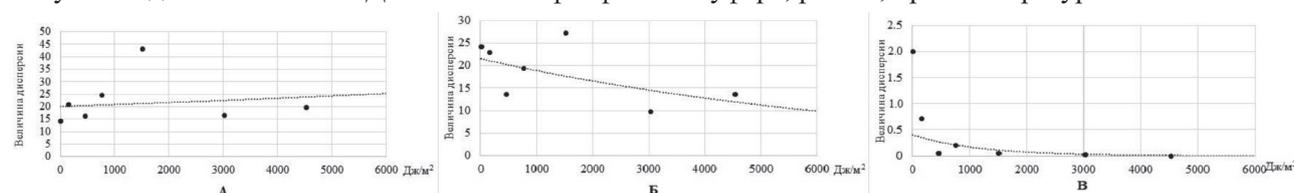


Рис. 5. Зависимость дисперсии размеров частиц, соответствующих продуктам автолиза (А), нативной молекуле трипсина (Б) и её агрегатам (В), от дозы облучения

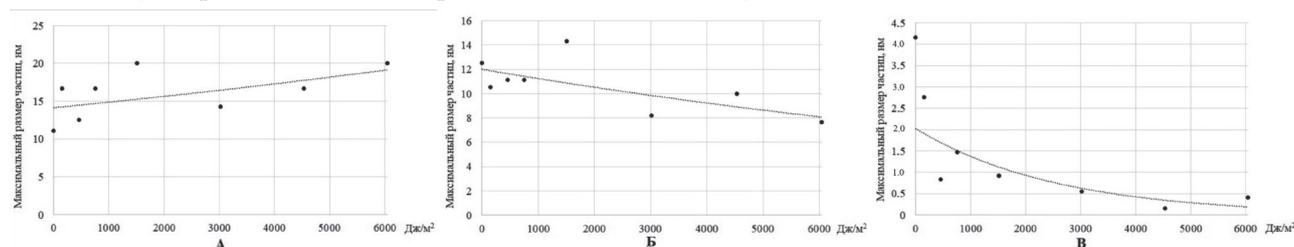


Рис. 6. Зависимость максимального количества частиц, соответствующих продуктам автолиза (А), нативной молекуле трипсина (Б) и её агрегатам (В), от дозы облучения

использовании дозы 6040 Дж/м<sup>2</sup>. При этом анализ динамики изменения размеров частиц в растворе показывает снижение способности трипсина образовывать надмолекулярные комплексы с возрастанием дозы его облучения УФ-светом, причем уменьшение дисперсии размеров частиц может быть обусловлено как низким содержанием агрегатов, так и увеличением их стабильности.

*Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стернин Ю.И. // Авиценна. 2020. № 61. С. 18-22.
2. Ремезов А.П., Кнорринг Г.Ю. // Лечащий врач. 2003. № 9. С. 74-75.
3. Бледнов А.В. // Новости хирургии. 2006. Т. 14. № 1. С. 9-19.
4. Михайлов И.Б., Стернин Ю.И. // Архив внутренней медицины. 2012. №1. С.15-19.
5. Holyavka M., Pankova S., Koroleva V., Vyshkvorkina Yu., Lukin A., Kondratyev M., Artyukhov V. // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2019. Т. 201. С. 111681.
6. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. Москва, Наука, 1971, 404 с.
7. Панкова С.М., Сакибаев Ф.А., Холявка М.Г., Вышкворкина Ю.М., Лукин А.Н., Артюхов В.Г. // Биоорганическая химия. 2021. Т. 47. № 3. С. 400-412.
8. Холявка М.Г., Сазыкина С.М. // «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» Материалы II Всероссийской XIII Межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов, 2015, № 1 (15). С. 294.
9. Байдамшина Д.Р., Тризна Е.Ю., Холявка М.Г., Логинова О.О., Сазыкина С.М., Артюхов В.Г., Каюмов А.Р. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2016. № 3. С. 53-57.
10. Суханова С.М., Петручук Е.М., Генералов А.А. // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018. Т. 18. № 2. С. 106-113.
11. Сливкин А.И., Беленова А.С., Холявка М.Г., Богачев М.И., Логвинова Е.Е. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013. Т. 13. № 1. С. 53-59.
12. Наквасина М.А., Попова Л.И., Артюхов В.Г., Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2015. № 3. С. 82-89.
13. Рошупкин Д.И., Артюхов В.Г. Основы фотобиофизики. Воронеж, ВГУ, 1997, 116 с.
14. Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 1. С. 66-70.
15. Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М., Наквасина М.А. // Химико-фармацевтический журнал. 2017. Т. 51. № 8. С. 39-43.
16. Folin O., Ciocalteau V. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 73, pp. 627-650.
17. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // Биофарм. журн. 2015. № 2. С.13-16.
18. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. // Вестник. ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2013. № 2. С. 116-119.
19. Kharat S.J. // Journal of Molecular Liquids. 2008. Vol. 140, pp. 10-14.
20. Luo Z. // Scientific reports. 2016. Vol. 6, pp.1-6.

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

\*Панкова С. М., ассистент кафедры нормальной физиологии, м.н.с. кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета

E-mail: sazykina.93@mail.ru

Воронежский государственный университет  
Сакибаев Ф. А., аспирант кафедры биофизики и биотехнологии

E-mail: farkhatlukum@gmail.com

Voronezh State Medical University N.N. Burdenko

\*Pankova S. M., Assistant Professor, Department of Normal Physiology, junior researcher Department of Biophysics and Biotechnology of Voronezh State University

E-mail: sazykina.93@mail.ru

Voronezh State University  
Sakibaev F. A., post-graduate student, Department of Biophysics and Biotechnology

E-mail: farkhatlukum@gmail.com

Холявка М. Г., д.б.н., доцент кафедры биофизики и биотехнологии; профессор кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет

E-mail: holyavka@rambler.ru

Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Holyavka M. G., PhD., DSci., Associate Professor, Biophysics and Biotechnology Department; Full Professor of Physics Department, Sevastopol State University

E-mail: holyavka@rambler.ru

Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

## STUDY OF DYNAMICS CHANGE FOR SIZE AND SPECIFIC ACTIVITY OF THE TRYPSIN MOLECULE AFTER UV IRRADIATION

S. M. Pankova<sup>1,2</sup>, F. A. Sakibaev<sup>1</sup>, M. G. Holyavka<sup>1,3</sup>, V. G. Artyukhov<sup>1</sup>

*1 – Voronezh State University*

*2 – Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko*

*3 – Sevastopol State University*

**Abstract.** Currently, the achievements of enzymology are increasingly used in the prevention, diagnosis and treatment of diseases. Enzyme preparations are widely used in modern pharmacology, while the development of enzyme technologies requires numerous studies of the physicochemical characteristics of biocatalysts under various reaction conditions, for example, after UV irradiation. Trypsin (EC 3.4.21.4) is a proteolytic enzyme with esterase activity, belonging to the group of serine proteases. In pharmacology and medicine, the enzyme has found its use in the treatment of wounds and burns, it is used as an adjuvant to alleviate the course of inflammatory diseases of the respiratory tract (tracheitis, bronchitis).

In this work, the size of the globule and the activity of trypsin after UV irradiation in the dose range 151-6040 J/m<sup>2</sup> were studied. We have established a direct relationship between the loss of the specific activity of the enzyme preparation with an increase in the radiation dose. At doses of 151-755 J/m<sup>2</sup>, a tendency to a decrease in the catalytic ability of the enzyme was recorded; the use of a maximum dose of 6040 J/m<sup>2</sup> led to 49% inactivation of trypsin. To explain the results obtained, we analyzed the molecular sizes of native and irradiated trypsin. For unirradiated trypsin, an alternate predominance of particles was revealed; after UV irradiation, a decrease in the maximum number of particles and an increase in autolysis products were recorded. Analysis of the variance of the average value of the number of particles showed that the value of this indicator decreases for aggregates. These data may indicate a decrease in the ability of trypsin to form supramolecular complexes with an increase in the time of its irradiation with UV light.

**Keywords:** trypsin, UV irradiation, specific activity, autolysis products, aggregation

### REFERENCES

1. Sternin Y.I., J. Avicenna, 2020, No. 61, pp. 18-22.
2. Remezov A.P., Knorring G.Yu., Lechashhij vrach, 2003, No. 9, pp. 74–75.
3. Blednov A.V., J. Novosti xirurgii, 2006, Vol. 14, No. 1, pp. 9-19.
4. Mixajlov I.B., Sternin Yu.I., J. Arxiv`vnutrennej mediciny`, 2012, No. 1, pp.15-19.
5. Holyavka M., Pankova S., Koroleva V., Vyshkvorkina Yu., Lukin A., Kondratyev M., Artyukhov V., J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2019, Vol. 201. p. 111681.
6. Mosolov V.V. Proteoliticheskie fermenty`. Moscow, Nauka Publ., 1971, 404 p.
7. Pankova S.M., Sakibaev F.A., Holyavka M.G., Vy`shkvorkina Yu.M., Lukin A.N., Artyukhov V.G., Russian journal of bioorganic chemistry, 2021, Vol. 47, No. 3, pp. 400-412.
8. Holyavka M.G., Sazykina S.M., «Sovremennye resheniya aktual'nyh nauchnyh problem v medicine» Materialy II Vserossijskoj XIII Mezhhregional'noj s mezhdunarodnym uchastiem nauchnoj sessii molodyh uchenyh i studentov, 2015, № 1 (15), p. 294.
9. Bajdamshina D.R., Trizna E.Yu., Holyavka M.G., Loginova O.O., Sazy`kina S.M., Artyukhov V.G., Kayumov A.R., Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Ximiya. Biologiya. Farmaciya, 2016, No. 3, pp. 53-57.

10. Suxanova S.M., Petruchuk E.M., Generalov A.A., Biopreparaty`. Profilaktika, diagnostika, lechenie, 2018, Vol. 18, No. 2, pp. 106-113.
11. Slivkin A.I., Belenova A.S., Holyavka M.G., Bogachev M.I., Logvinova E.E., Sorbcionny`e i xromatograficheskie processy`, 2013, Vol. 13, No. 1, pp. 53-59.
12. Nakvasina M.A., Popova L.I., Artyukhov V.G., Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Ximiya. Biologiya. Farmaciya, 2015, No. 3, pp. 82-89.
13. Roshhupkin D.I., Artyukhov V.G. Osnovy` fotobiofiziki. Voronezh, VGU, 1997, 116 p.
14. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazy`kina S.M., J. Radiacionnaya biologiya. Radioe`kologiya, 2017, Vol. 57, No. 1, pp. 66-70.
15. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazy`kina S.M., Nakvasina M.A., Ximiko-farmaceuticheskij zhurnal, 2017, Vol. 51, No. 8, pp. 39-43.
16. Folin O., Ciocalteau V., J. Biol. Chem, 1951, Vol. 73, pp. 627-650.
17. Loginova O.O., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. Biofarm. zhurn, 2015, No. 2, pp. 13-16.
18. Loginova O.O., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Belenova A.S. Vestnik. VGU. Seriya: Ximiya. Biologiya. Farmaciya, 2013, No. 2, pp. 116-119.
19. Kharat S.J., J. of Molecular Liquids, 2008, Vol. 140, pp. 10-14.
20. Luo Z., J. Scientific reports, 2016, Vol. 6, pp.1-6.