

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТЕАЗ ПАНКРЕАТИНА И ТРИПСИНА ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНОМ ГИДРОЛИЗЕ КОЛЛАГЕНА

Л.Л. Семенычева¹, М.Н. Егорихина², В.О. Часова¹,
Н.Б. Валетова¹, А.В. Митин¹, Ю.Л. Кузнецова¹

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
г. Нижний Новгород, Россия

² Приволжский исследовательский медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород, Россия

Проведен анализ молекулярно-массовых характеристик (ММХ) (молекулярной массы (ММ) и коэффициента полидисперсности (КП)) гидролизата высокомолекулярного рыбного коллагена (РК) в процессе ферментативного гидролиза двумя протеолитическими ферментами: панкреатином и трипсином при комнатной температуре. Показана высокая эффективность ферментов: основная часть РК гидролизуеться в течение первой минуты как в случае панкреатина, так и трипсина, при этом образуется несколько фракций гидролизата РК. В случае трипсина наблюдается небольшая олигомерная фракция. Коэффициент полидисперсности M_w/M_n для фракций в процессе гидролиза имеет значения преимущественно не более 1,2, что свидетельствует об однородности фракций коллагена по ММ. Исходный нативный РК с ММ ~ 300 кДа во фракциях гидролизата отсутствует. Эти данные свидетельствуют о высокой скорости гидролиза в присутствии указанных ферментов. Для обоих ферментов наблюдается образование двух низкомолекулярных фракций гидролизата с близкими значениями ММ ~ 17 кДа и ~ 9 кДа, причем доля последней фракции в растворе больше 80 %. Последующий контроль ММХ показал, что происходит медленное уменьшение доли всех фракций до практически полного исчезновения за трое суток, кроме низкомолекулярной фракции с ММ ~ 9 кДа, содержание которой постепенно увеличивается. Вид кривых молекулярно-массового распределения (ММР) для разных ферментов практически одинаков, однако наблюдается небольшое различие в соотношениях фракций гидролизатов на разных стадиях гидролиза при использовании указанных ферментов, связанное с незначительной разницей в эффективности использованных ферментов, которое может отразиться на строении скаффолда в процессе его формирования. Различия в значениях ММ и соотношении фракций с разной ММ свидетельствуют о влиянии природы ферментов на процесс гидролиза высокомолекулярного коллагена. Представленные результаты хорошо согласуются с известными литературными данными о природе ферментов панкреатина. Протеолитические ферменты, входящие в состав панкреатина, – трипсин, пепсин и химотрипсин – катализируют гидролиз пептидных связей, образованных остатками аминокислот аргинина и лизина. Ярко выраженная ограниченная субстратная специфичность ферментов приводит к практически количественному образованию в процессе гидролиза узкодисперсного олигомера с ММ ~ 9 кДа. В совокупности с результатами исследований действия ферментов на другие компоненты конструкции скаффолдов, а также биомиметическими испытаниями они позволят моделировать состав, строение и важнейшие характеристики скаффолдов с оптимизированными свойствами. Это особенно важно, если в процессе формирования скаффолдов и биомедицинских клеточных продуктов используются реакции ферментативного гидролиза, так как получаемая в результате клеточная матрица формируется не из нативных молекул, а из их гидролизатов.

Ключевые слова: биополимеры, скаффолды, высокомолекулярный рыбный коллаген, панкреатин, трипсин, эффективность гидролиза.

Введение

Развитие реконструктивной медицины на базе тканевой инженерии связано прежде всего с созданием новых материалов высокой функциональности, способных имитировать биологические, структурные и физические функции естественных тканей организма. В настоящее время

существует высокая потребность в продуктах тканевой инженерии, в том числе в продуктах скаффолд-технологий. Основная технология использования скаффолдов – заселение клетками непосредственно перед имплантацией или во время нее [1–7]. В то же время одной из ключевых проблем при использовании даже идеального источника клеточного материала является необходимость создания подходящего искусственного биомиметического матрикса. В связи с этим основной задачей тканевой инженерии является создание клеточных матриц (скаффолдов) с последующим образованием сложных клеточных композиций, подобных ткани или органу, для дальнейшей трансплантации их пациенту взамен поврежденных или утраченных. Для создания скаффолдов предлагают использовать природные и синтетические полимеры. Чаще других в случае биополимеров используют белки, такие как коллаген, фибрин, фиброин шелка и др. При получении скаффолдов применяют протеолитические ферменты [8–11], гидролизующие пептидную связь белков с целью образования новых связей уже в скаффолде, при этом отмечается влияние молекулярно-массовых характеристик (ММХ) используемого полимера на свойства получаемых матриц [12–14]. Изменения молекулярных и надмолекулярных параметров биополимеров клеточных матриц при формировании скаффолдов, влияние этих параметров на биомиметические свойства при построении тканеинженерных конструкций зависят не только от природы используемого белкового материала, но и от природы фермента [15, 16]. Варьирование фермента может позволить при построении тканеинженерных конструкций моделировать характеристики скаффолдов.

Разрабатываемые клеточные матрицы, имитирующие естественный внеклеточный матрикс, должны обеспечивать достаточную временную механическую поддержку для развития ткани и обладать физиологической активностью, достаточной для развития межклеточных контактов, но в то же время подвергаться естественной резорбции с трансформацией в натуральный внеклеточный матрикс [3, 17]. Использование коллагена I типа широко распространено при создании скаффолдов, так как он имеет несколько преимуществ, позволяющих использовать данный биополимер для получения продуктов тканевой инженерии: биосовместимость, волокнистая структура, хорошая сочетаемость с другими материалами, биodeградируемость [2, 3, 18, 19].

Однако нативный коллаген представляет собой быстро разлагаемый биополимер из-за своей фибриллярной волокнистой структуры. Но в сочетании с другими синтетическими и природными полимерами этот недостаток с легкостью устраняется, более того, наблюдается увеличение жесткости и упругости гибридного материала в условиях ферментативного разрушения нативных молекул белка [13, 20, 21]. Ранее было установлено, что при гидролизе нативного высокомолекулярного коллагена I типа, выделенного из кожных покровов разных животных, в стандартных условиях в присутствии панкреатина происходит гидролиз с достаточно высокой скоростью [22].

Целью данного исследования является сравнение ММХ рыбного коллагена (РК) в процессе гидролиза в присутствии многокомпонентного фермента панкреатина, в состав которого входят протеолитические ферменты трипсин, пепсин, и химотрипсин, а также только трипсина в условиях, близких к условиям формирования скаффолдов [23]. Главной задачей при этом стал контроль ММХ гидролизата коллагена в течение длительного времени.

Экспериментальная часть

В работе использовали коммерческие ферменты: панкреатин [Хубей Максфарм Индастриз Ко. Лтд (Китай)], трипсин [ООО НПП «ПанЭко»], АсОН (ХЧ). Высокомолекулярный рыбный коллаген (РК) выделяли по методу [24].

При проведении ферментативного гидролиза использовали 1%-ный раствор РК. К раствору высокомолекулярного РК добавляли 1М NaOH для достижения нейтральной среды и доводили дистиллированной водой до определенного объема. Гидролиз в присутствии ферментов проводили при фермент-субстратном соотношении коллаген: фермент = 10:1, добавляя к полученной смеси фермент. Из реакционной среды брали пробы (1 мл) через определенные промежутки времени после добавления фермента. Для прерывания гидролиза в пробы приливали 4%-ный раствор АсОН.

Молекулярно-массовые характеристики проб гидролизата РК определяли методом ГПХ с применением высокоэффективного жидкостного хроматографа фирмы Shimadzu CTO20A/20AC (Япония) с программным модулем LC-Solutions-GPC. Разделение проводили с

применением колонки Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWxl с диаметром пор 5 мкм. В качестве детектора применяли низкотемпературный светорассеивающий детектор ELSD-LT II. Элюентом служил 0,5 М раствор уксусной кислоты. Скорость потока 0,8 мл/мин. Для калибровки использовали узкодисперсные образцы декстрана с диапазоном молекулярных масс (ММ) 1 000–410 000 Да (Fluca).

Обсуждение результатов

В соответствии с поставленной в исследовании целью проводили анализ ММХ (ММ и КП) гидролизата РК в процессе ферментативного гидролиза при комнатной температуре. Оказалось, что основная часть высокомолекулярного РК гидролизуется в течение первой минуты как в случае панкреатина, так и трипсина (рис. 1). При использовании панкреатина образуется три фракции гидролизата РК с ММ менее 70 кДа (13–15 %), с ММ ~ 17,5 кДа (2,0–3,5 %) и ММ ~ 9 кДа (83–84 %), в случае же трипсина наблюдается еще небольшая олигомерная фракция (~ 1,0 %) с ММ ~ 300 Да, а фракция исходного нативного РК с ММ ~ 300 кДа отсутствует. То есть действие панкреатина и трипсина приводит к полному разрушению исходного нативного РК до низкомолекулярных фракций уже в течение первой минуты, что свидетельствует о высокой эффективности гидролиза в присутствии указанных ферментов.

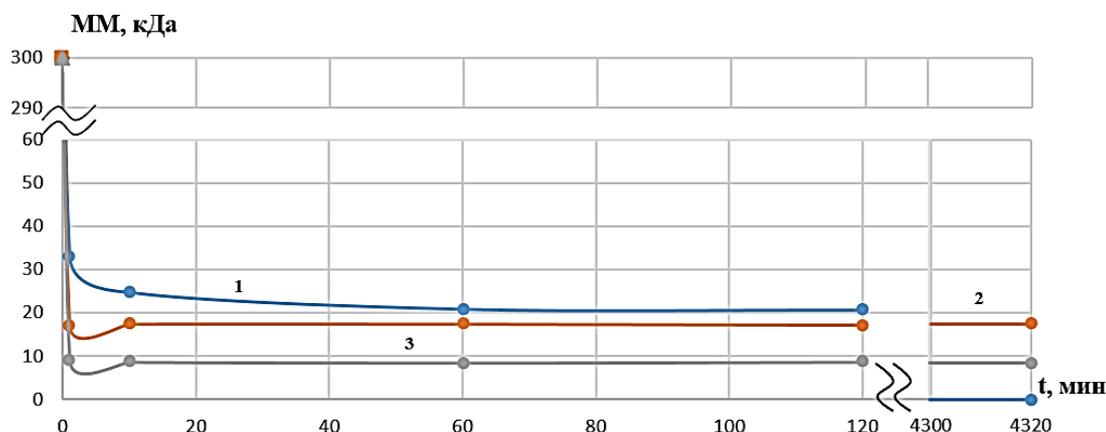


Рис. 1. Изменение молекулярной массы разных фракций при гидролизе РК панкреатином: 1 – фракция с ММ выше 17 кДа; 2 – фракция с ММ ~ 17 кДа; 3 – фракция с ММ ~ 9 кДа

Интересно отметить, что наблюдается образование двух низкомолекулярных фракций гидролизата со значениями ММ ~ 17 кДа и ~ 9 кДа для обоих ферментов, причем доля последней фракции в растворе больше 80 % (рис. 1, 2). Последующий контроль ММХ в течение трех часов показал (см. рис. 1, 2), что происходит медленное уменьшение первой фракции с ММ выше 17 кДа до полного исчезновения за трое суток (кривые 1 на рис. 3, 4), содержание второй фракции с ММ ~ 17 кДа немного увеличивается вначале и для панкреатина, и для трипсина, хотя концентрация фракции немного различается в образцах гидролизата разными ферментами (кривые 2 на рис. 3, 4), а затем изменяется мало, содержание низкомолекулярной фракции с ММ ~ 9 кДа постепенно увеличивается (кривые 3 на рис. 1, 2). Олигомерная фракция в растворе с трипсином со временем исчезает, видимо, за счет разрушения до неконтролируемых методом аминокислот (кривая 4 на рис. 4). В образцах через трое суток в растворе с панкреатином остается только гидролизат РК с ММ ~ 9 кДа (см. рис. 1) в случае гидролиза трипсином доля его составляет ~ 90 % (~ 10 % РК с ММ ~ 17 кДа). То есть наблюдается разрушение исходного высокомолекулярного коллагена с образованием двух низкомолекулярных фракций (рис. 5, 6). Обращает на себя внимание небольшое различие в соотношениях фракций гидролизатов на разных стадиях гидролиза при использовании указанных ферментов, которое может отразиться на строении скаффолда в процессе его формирования (рис. 1, 2). В табл. 1, 2 приведены значения ММ и КП в процессе гидролиза, свидетельствующие об однородности фракций – коэффициенты полидисперсности (КП) имеют значения преимущественно не более 1,2.

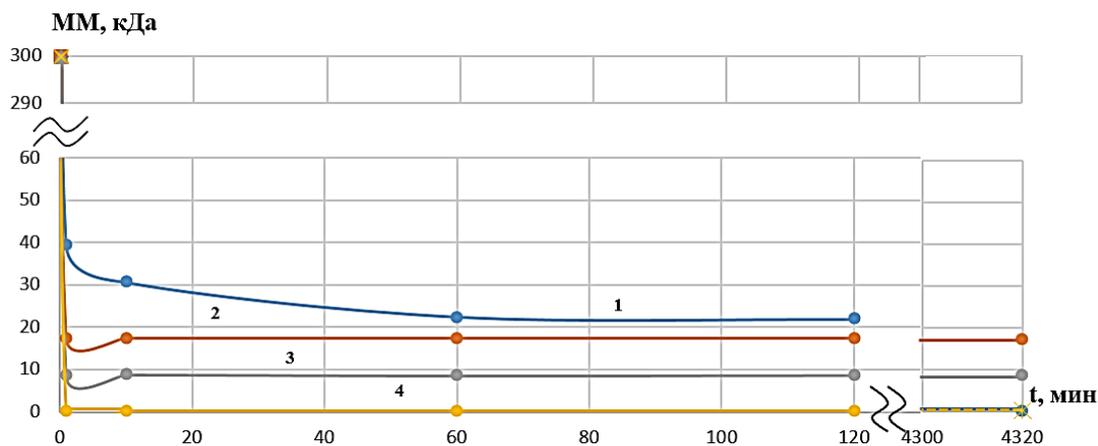


Рис. 2. Изменение молекулярной массы разных фракций при гидролизе РК трипсином: 1 – фракция с ММ выше 17 кДа; 2 – фракция с ММ ~ 17 кДа; 3 – фракция с ММ ~ 9кДа; 4 – олигомерная фракция с ММ ~ 0,3 кДа

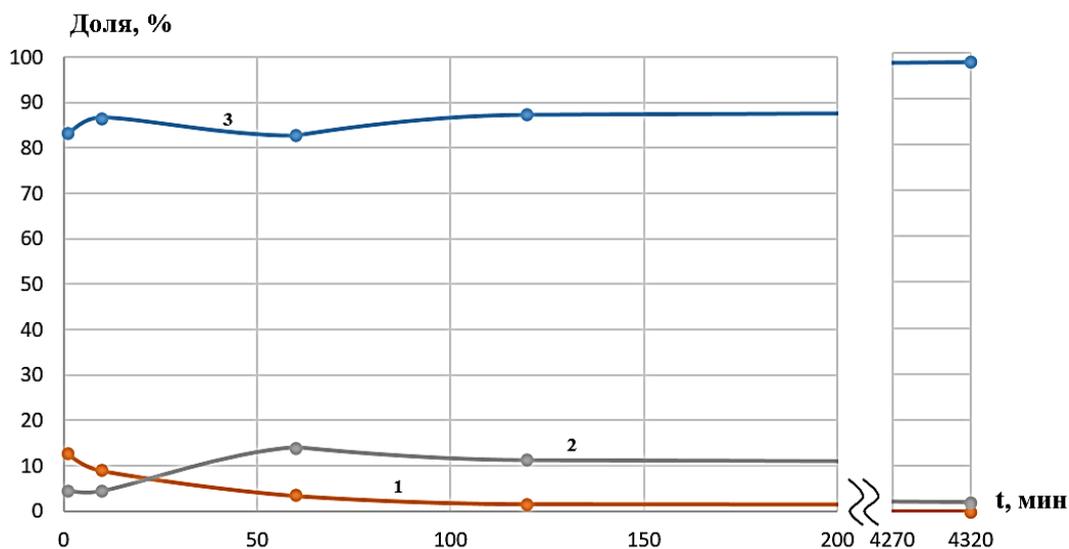


Рис. 3. Доля разных фракций при гидролизе РК панкреатином: 1 – фракция с ММ выше 17 кДа; 2 – фракция с ММ ~ 17 кДа; 3 – фракция с ММ ~ 9кДа

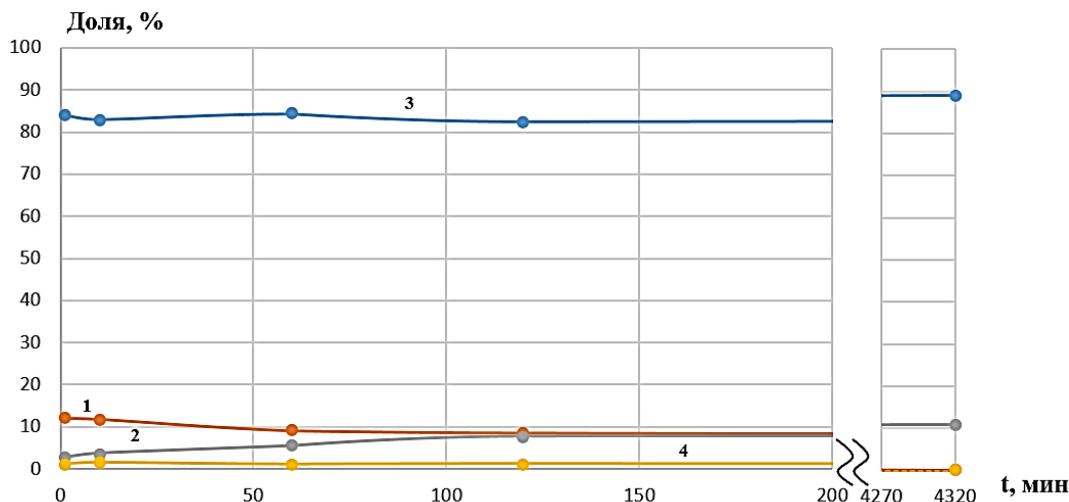


Рис. 4. Доля разных фракций при гидролизе РК трипсином: 1 – фракция с ММ выше 17 кДа; 2 – фракция с ММ ~ 17 кДа; 3 – фракция с ММ ~ 9кДа; 4 – олигомерная фракция с ММ ~ 0,3кДа

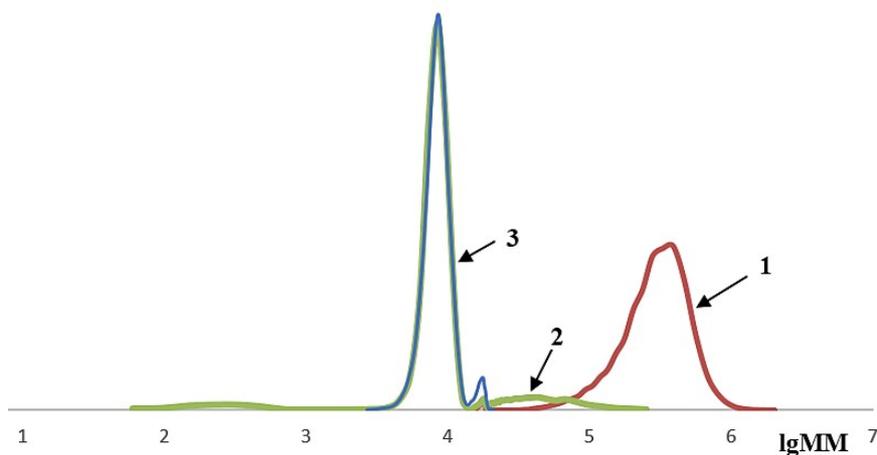


Рис. 5. Кривые MMP коллагена из кожи трески с трипсином: 1 – исходный, 2 – после 1 минуты, 3 – конечный

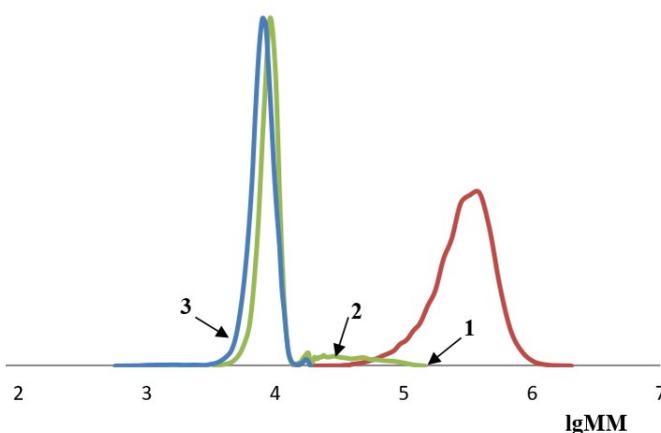


Рис. 6. Кривые MMP коллагена из кожи трески с панкреатином: 1 – исходный, 2 – после 1 минуты, 3 – конечный

Таблица 1
Молекулярно-массовые параметры РК при ферментативном гидролизе панкреатином в течение 3 суток

№ п/п	Значения ММХ во время гидролиза									
	мин								3 суток	
	1		10		60		120			
$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	
1	33,1	1,2	24,9	1,1	21	1,0	20,8	1,0	–	–
2	17,5	1,0	17,5	1,0	17,3	1,0	17,5	1,0	17,2	1,0
3	9,2	1,0	8,7	1,0	8,5	1,0	8,7	1,0	8,3	1,0

Таблица 2
Молекулярно-массовые параметры высокомолекулярного коллагена при ферментативном гидролизе трипсином в течение 3 суток

№ п/п	Значения ММХ во время гидролиза									
	мин								3 суток	
	1		10		60		120			
$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n	
1	39,5	1,3	30,7	1,2	22,5	1,0	21,9	1,0	–	–
2	17,4	1,0	17,4	1,0	17,4	1,0	17,4	1,0	17,1	1,0
3	8,6	1,0	8,8	1,0	8,6	1,0	8,7	1,0	8,6	1,0
4	0,3	1,4	0,3	1,5	0,3	1,3	0,3	1,3	–	–

Различия в значениях ММ и соотношении фракций с разной ММ свидетельствуют о влиянии природы ферментов на процесс гидролиза высокомолекулярного коллагена. Представленные результаты хорошо согласуются с известными литературными данными о природе ферментов панкреатина (в его составе протеолитические ферменты трипсин, пепсин и химотрипсин), которые катализируют гидролиз пептидных связей, образованных остатками аминокислот аргинина и лизина [25]:



где **R** и **R₁** – аминокислотные последовательности фрагментов коллагена.

Эта ярко выраженная ограниченная субстратная специфичность ферментов приводит к практически количественному образованию (более 80 % от исходного) в процессе гидролиза узкодисперсного (КП ~ 1,1) низкомолекулярного полимера с ММ ~ 9 кДа и небольшого количества его димера – олигомера с М_w ~ 17–18 кДа (КП ~ 1,1). Незначительные различия в значениях ММ первой, более высокомолекулярной в сравнении с олигомерными, фракции в присутствии двух разных ферментов связаны, видимо, с различиями в природе и эффективности, связанной с расположением аминокислот каталитических центров ферментов, что характерно для катализаторов любого происхождения [25].

Заключение

Таким образом, проведен ферментативный гидролиз коллагена, выделенного из покровных тканей трески, в условиях, близких к таковым при формировании скаффолдов, разными ферментами – панкреатином, трипсином. Анализ молекулярно-массовых характеристик гидролизатов коллагена методом гель-проникающей хроматографии в течение трех суток процесса показал, что разрушение белка происходит с образованием двух низкомолекулярных фракций сразу после 1-й минуты гидролиза, ММ которых независимо от природы фермента имеют значения М_w ~ 9 кДа (М_w/М_n ~ 1,1) (более 80 % в смеси) и М_w ~ 17–18 кДа (М_w/М_n ~ 1,1). Высокая эффективность панкреатина и трипсина приводит к тому, что в растворе сразу после первой минуты отсутствует высокомолекулярная фракция, ферменты разрушают коллаген до фрагментов не более 40 кДа. Однако заметно небольшое различие в характеристиках продуктов гидролиза и их соотношении, что обусловлено природой каталитических центров ферментов. Полученные данные представляют интерес для разработки матриц на основе коллагена в присутствии ферментов разной природы. В совокупности с результатами исследований действия ферментов на другие компоненты конструкции скаффолдов, а также биомиметическими испытаниями они позволят моделировать состав, строение и важнейшие характеристики скаффолдов с оптимизированными свойствами. Это особенно важно, если в процессе формирования скаффолдов и биомедицинских клеточных продуктов используются реакции ферментативного гидролиза и получаемая в результате клеточная матрица формируется не из нативных молекул, а из их гидролизатов.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» НИИХ ННГУ.

Литература

1. Lu, T. Techniques for Fabrication and Construction of Three-dimensional Scaffolds for Tissue Engineering / T. Lu, Y. Li, T. Chen // *Int. J. Nanomedicine*. – 2013. – № 8. – P. 337–350. DOI: 10.2147/IJN.S38635.
2. Introduction to Tissue Engineering and Application for Cartilage Engineering / N. de Isla, C. Huselstein, N. Jessel et al. // *Biomed. Mater. Eng.* – 2010. – V. 20, № 3. – P. 127–133. DOI: 10.3233/BME-2010-0624.
3. Zhang, L. The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration / L. Zhang, J. Hu, K.A. Athanasiou // *Crit Rev. Biomed. Eng.* – 2009. – V. 37, № 1. – P. 1–57.
4. Rajangam, T. Fibrinogen and Fibrin Based Micro and Nano Scaffolds Incorporated with Drugs, Proteins, Cells and Genes for Therapeutic Biomedical Applications / T. Rajangam, S.S.A. An // *Int. J. Nanomedicine*. – 2013. – V. 8. – P. 3641–3662. DOI: 10.2147/IJN.S43945.

5. Fibrin Scaffold as a Carrier for Mesenchymal Stem Cells and Growth Factors in Shoulder Rotator Cuff Repair / A. Voss, McCarthy M. Beth, D. Allen et al. // *Arthrosc. Tech. Arthroscopy Association of North America*. – 2016. – V. 5, № 3. – P. e447–e451. DOI: 10.1016/j.eats.2016.01.029.
6. Osathanon, T. Immobilization of Alkaline Phosphatase on Microporous Nanofibrous Fibrin Scaffolds for Bone Tissue Engineering / T. Osathanon, C.M. Giachelli, M.J. Somerman // *Biomaterials*. – 2009. – V. 30, № 27. – P. 4513–4521. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.022.
7. Riopel, M. Fibrin, a Scaffold Material for Islet Transplantation and Pancreatic Endocrine Tissue Engineering / M. Riopel, M. Trinder, W. Rennian // *Tissue Eng. Part B Rev.* – 2015. – V. 21, № 1. – P. 33–44. DOI: 10.1089/ten.teb.2014.0188.
8. Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering / Y. Li, H. Meng, Y. Liu, B.P. Lee // *Sci. World J.* – 2015. – № 2015. – P. 1–10. DOI: 10.1155/2015/685690.
9. Терещенко, В.П. Матрицы-носители в тканевой инженерии костной ткани / В.П. Терещенко, И.А. Кирилова, П.М. Ларионов // *Успехи современного естествознания*. – 2015. – № 8. – С. 66–70.
10. Yan, M. Purification and Structural Aspects of Type I Collagen from Walleye Pollock (Theragra chalcogramma) / M. Yan, S. Qin, B. Li // *J. Aquat. Food Prod. Technol.* – 2017. – V. 26, № 10. – P. 1166–1174. DOI: 10.1080/10498850.2015.1011797
11. Effect of Enzymatic Hydrolysis on Surface Activity and Surface Rheology of Type I Collagen / A. Kezwoń, I. Chromińska, T. Fraczyk, K. Wojciechowski // *Colloids Surf., B.* – 2016. – № 137. – P. 60–69. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.05.017.
12. Соколова, А.И. Зависимость биологических свойств скаффолдов из фиброина шелка и желатина от состава и технологии изготовления / А.И. Соколова, М.М. Боброва, Л.А. Сафронова // *Современные технологии в медицине*. – 2016. – Т. 8, № 3. – С. 6–15. DOI: 10.17691/stm2016.8.3.01.
13. Incorporation of Fibrin into a Collagen-glycosaminoglycan Matrix Results in a Scaffold with Improved Mechanical Properties and Enhanced Capacity to Resist Cell-mediated Contraction / C.M. Brougham, T.J. Levingstone, S. Jockenhoevel et al. // *Acta Biomater.* – 2015. – № 26. – P. 205–214. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.08.022.
14. Bio-printing of Collagen and VEGF-releasing Fibrin Gel Scaffolds for Neural Stem Cell Culture / Y.B. Lee, S. Polio, W. Lee et al. // *Exp. Neurol.* – 2010. – V. 223, № 2. – P. 645–652. DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.02.014.
15. Константиновская, М.А. Подбор условий получения ферментативного гидролизата из бульона, образующегося при производстве костной муки / М.А. Константиновская, А.А. Красноштанова // *Техника и технология пищевых производств*. – 2014. – № 4 (35). – С. 32–33.
16. Закономерности гидролиза сывороточных белков экзо- и эндопротеазами / Т.Н. Головач, Н.В. Гавриленко, Н.К. Жабанос, В.П. Курченко // *Труды БГУ*. – 2008. – Т. 3 (1). – С. 85–98.
17. Ma, P.X. Biomimetic Materials for Tissue Engineering / P.X. Ma // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – № 60. – P. 184–198. DOI: 10.1016/j.addr.2007.08.041.
18. Biocompatibility of Hydrogel-based Scaffolds for Tissue Engineering Applications / S. Naahidi, M. Jafari, M. Logan et al. // *Biotechnol. Adv. Elsevier*. – 2017. – V. 35, № 5. – P. 530–544. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.05.006
19. Zhu, J. Biomimetic Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering / J. Zhu // *J. Biochips Tissue Chips*. – 2012. – V. 2, № 43. – P.1000e119. DOI: 10.4172/2153-0777.1000e119
20. Viscoelastic, Physical, and Bio-degradable Properties of Dermal Scaffolds and Related Cell Behaviour / V. Sharma, N. Patel, N. Kohli et al. // *Biomed. Mater.* – 2016. – V. 11, № 5. – P. 1–12. DOI: 10.1088/1748-6041/11/5/055001.
21. Rowe, S.L. Microstructure and Mechanics of Collagen-fibrin Matrices Polymerized Using Ancrod Snake Venom Enzyme / S.L. Rowe, J.P. Stegemann // *J. Biomech. Eng.* – 2009. – V. 131, № 6. – P. 061012. DOI: 10.1115/1.3128673.
22. Молекулярно-массовые параметры коллагена из разного сырья и динамика их изменения при ферментативном гидролизе панкреатином / Л.Л. Семеньева, Н.Б. Валетова, В.О. Часова и др. // *Все материалы. Энцикл. Справочник*. – 2019. – № 4. – С. 27–33. DOI: 10.31044/1994-6260-2019-0-4-27-33
23. Пат. 2653434 Российская Федерация. Способ создания биорезорбируемого клеточного скаффолда на основе фибрина плазмы крови / М.Н. Егорихина, Г.Я. Левин, И.Н. Чарыкова,

Д.Я. Алейник, Л.Н. Соснина; заявитель и патентообладатель ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения РФ. – № 2017112424; заявл. 11.04.2017; опубл. 08.05.2018, Бюл. № 13. – 13 с.

24. Пат. 2567171 Российская Федерация. Способ получения укусной дисперсии высокомолекулярного рыбного коллагена / Л.Л. Семенычева, М.В. Астанина, Ю.Л. Кузнецова, Н.Б. Валетова, Е.В. Гераськина, О.А. Таранкова; заявитель и патентообладатель ООО «Системы качества жизни». – № 2014140300/13; заявл. 06.10.2014; опубл. 10.11.2015, Бюл. № 31. – 11 с.

25. Бендер, М. Биоорганическая химия ферментативного катализа / М. Бендер, Р. Бергерон, М. Комияма. – М.: Мир, 1987. – 352 с.

Семенычева Людмила Леонидовна – доктор химических наук, доцент, зав. лабораторией нефтехимии НИИ химии, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23. E-mail: llsem@yandex.ru

Егорихина Марфа Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИИ ЭОиБМТ, Приволжский исследовательский медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. 603950, ГСП-470, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1. E-mail: egorihina.marfa@yandex.ru

Часова Виктория Олеговна – студент химического факультета, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23. E-mail: tchasowa.vika@yandex.ru

Валетова Наталья Борисовна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории нефтехимии НИИ химии, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 603950, г. Нижний Новгород, пр. им. Ю.А. Гагарина, 23. E-mail: nata-bor-2005@mail.ru

Митин Александр Вячеславович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, руководитель Центра коллективного пользования НИИ химии, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Россия, 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23. E-mail: ckr@ichem.unn.ru

Кузнецова Юлия Леонидовна – кандидат химических наук, доцент кафедры органической химии, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23. E-mail: kyul@yandex.ru

Поступила в редакцию 30 октября 2019 г.

DOI: 10.14529/chem200108

EFFICACY OF PANCREATIN AND TRYPSIN PROTEASES IN ENZYMATIC HYDROLYSIS OF COLLAGEN

L.L. Semenycheva¹, llsem@yandex.ru

M.N. Egorihina², egorihina.marfa@yandex.ru

V.O. Chasova¹, tchasowa.vika@yandex.ru

N.B. Valetova¹, nata-bor-2005@mail.ru

A.V. Mitin¹, ckr@ichem.unn.ru

Yu.L. Kuznetsova¹, kyul@yandex.ru

¹ Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

² Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

The analysis of molecular-mass characteristics (MMC) / molecular mass (MM) and polydispersity coefficient (PC) of high molecular weight fish collagen (FC) hydrolysate has been carried out in the process of enzymatic hydrolysis by two proteolytic enzymes: pancreatin and trypsin at room temperature. High efficiency of enzymes has been shown: the main part of FC is hydrolyzed within the first minute in the case of both pancreatin and trypsin. As a result, several frac-

tions of FC hydrolysate are formed. A small oligomeric fraction is observed in the case of trypsin. The values of the polydispersity coefficient M_w / M_n for fractions in the hydrolysis process are typically no more than 1.2. This indicates the homogeneity of collagen fractions in MM. The original native FC with MM ~ 300 kDa is absent in the hydrolysate fractions. These data indicate a high hydrolysis rate in the presence of these enzymes. Formation of two low-molecular fractions of hydrolysate with close values of MM ~ 17 kDa and ~ 9 kDa has been observed for both enzymes, and the share of the latter fraction in the solution is more than 80 %. Further control of MMC has shown that there is a slow decrease in the proportion of all fractions, to almost complete disappearance in three days, except for the low-molecular fraction with MM ~ 9 kDa, the content of which gradually increases. The type of molecular weight distribution curves for different enzymes is almost the same. However, there is a small difference in the ratio of hydrolysate fractions at different stages of hydrolysis with the use of these enzymes, due to a minor difference in the efficiency of the enzymes used, which may affect the structure of the scaffold during its formation. Differences in the MM values and the ratio of fractions with different MM indicate the influence of the enzyme nature on hydrolysis of high-molecular collagen. The presented results are in good agreement with the known literature data on the nature of pancreatin enzymes (it contains the proteolytic enzymes: trypsin, pepsin and chymotrypsin). These three proteases catalyze the hydrolysis of peptide bonds formed by residues of the amino acids arginine and lysine. The strongly pronounced limited substrate specificity of enzymes leads to practically quantitative formation of a narrowly dispersed oligomer with MM ~ 9 kDa in the process of hydrolysis. In combination with the results of research on the effect of enzymes upon other components of the scaffold design, as well as biomimetic tests, these will model the composition, structure, and major characteristics of scaffolds with the optimized properties. This is especially important if the enzymatic hydrolysis reactions are used in formation of scaffolds and biomedical cell products, because the resulting cell matrix is formed not from the native molecules, but from their hydrolysates.

Keywords: biopolymers, scaffolds, high molecular weight fish collagen, pancreatin, trypsin, hydrolysis efficiency.

References

1. Lu T., Li Y., Chen T. Techniques for Fabrication and Construction of Three-dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Int. J. Nanomedicine.*, 2013, no. 8, pp. 337–350. DOI: 10.2147/IJN.S38635.
2. de Isla N., Huseltein C., Jessel N., Pinzano A., Decot V., Magdalou J., Bensoussan D., Stoltz J.F. Introduction to Tissue Engineering and Application for Cartilage Engineering. *Biomed. Mater. Eng.*, 2010, vol. 20, no. 3, pp. 127–133. DOI: 10.3233/BME-2010-0624.
3. Zhang L., Hu J., Athanasiou K.A. The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration. *Crit Rev. Biomed. Eng.*, 2009, vol. 37, no. 1, pp. 1–57.
4. Rajangam T., An S.S.A. Fibrinogen and Fibrin Based Micro and Nano Scaffolds Incorporated with Drugs, Proteins, Cells and Genes for Therapeutic Biomedical Applications. *Int. J. Nanomedicine*, 2013, vol. 8, pp. 3641–3662. DOI: 10.2147/IJN.S43945.
5. Voss A., McCarthy M.B., Allen D., Cote M.P., Beitzel K., Imhoff A.B., Mazzocca A.D. Fibrin Scaffold as a Carrier for Mesenchymal Stem Cells and Growth Factors in Shoulder Rotator Cuff Repair. *Arthrosc. Tech. Arthroscopy Association of North America.*, 2016, vol. 5, no. 3, pp. e447–e451. DOI: 10.1016/j.eats.2016.01.029.
6. Osathanon T., Giachelli C.M., Somerman M.J. Immobilization of Alkaline Phosphatase on Microporous Nanofibrous Fibrin Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials.*, 2009, vol. 30, no. 27, pp. 4513–4521. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.022.
7. Riopel M., Trinder M., Rennan W. Fibrin, a Scaffold Material for Islet Transplantation and Pancreatic Endocrine Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2015, vol. 21, no. 1, pp. 33–44. DOI: 10.1089/ten.teb.2014.0188.
8. Li Y., Meng H., Liu Y., Lee B.P. Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering. *Sci. World J.*, 2015, no. 2015, pp. 1–10. DOI: 10.1155/2015/685690.
9. Tereshchenko V.P., Kirilova I.A., Larionov P.M. [Matrix Carriers in Bone Tissue Engineering]. *Successes of modern natural science*, 2015, no. 8, pp. 66–70. (in Russ.)
10. Yan M., Qin S., Li B. Purification and Structural Aspects of Type I Collagen from Walleye Pollock (Theragra chalcogramma). *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 2017, vol. 26, no. 10, pp. 1166–1174. DOI: 10.1080/10498850.2015.1011797.

11. Kezwoń A., Chromińska I., Fraczyk T., Wojciechowski K. Effect of Enzymatic Hydrolysis on Surface Activity and Surface Rheology of Type I Collagen. *Colloids Surf., B.*, 2016, no. 137, pp. 60–69. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.05.017.
12. Sokolova A.I., Bobrova M.M., Safronova L.A. [Dependence of Biological Properties of Scaffolds from Fibroin Silk and Gelatin on Composition and Manufacturing Technology]. *Modern technologies in medicine*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 6–15. (in Russ.) DOI: 10.17691/stm2016.8.3.01.
13. Brougham C.M., Levingstone T.J., Jockenhoevel S., Flanagan T.C., O'Brien F.J. Incorporation of Fibrin into a Collagen-glycosaminoglycan Matrix Results in a Scaffold with Improved Mechanical Properties and Enhanced Capacity to Resist Cell-mediated Contraction. *Acta Biomater.*, 2015, no. 26, pp. 205–214. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.08.022.
14. Lee Y.B., Polio S., Lee W., Dai G., Menon L., Carroll R.S., Yoo S.S. Bio-printing of Collagen and VEGF-releasing Fibrin Gel Scaffolds for Neural Stem Cell Culture. *Exp. Neurol.*, 2010, vol. 223, no. 2, pp. 645–652. DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.02.014.
15. Konstantinovskaya M.A., Krasnoshtanova A.A. [Selection of Conditions for Obtaining Enzymatic Hydrolysate from Broth Formed in the Production of Bone Meal]. *Technique and technology of food production*, 2014, no. 4 (35), pp. 32–33. (in Russ.)
16. Golovach T.N., Gavrilenko N.V., Zhabanos N.K., Kurchenko V.P. [Regularities of Serum Protein Hydrolysis by Exo- and Endoproteases]. *Proceedings of the Belarusian state University*, 2008, vol. 3 (1), pp. 85–98. (in Russ.)
17. Ma P.X. Biomimetic Materials for Tissue Engineering. *Adv. DrugDeliv. Rev.*, 2008, no. 60, pp. 184–198. DOI: 10.1016/j.addr.2007.08.041.
18. Naahidi S., Jafari M., Logan M., Wang Y., Yuan Y., Bae H., Dixon B., Chen P. Biocompatibility of Hydrogel-based Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Biotechnol. Adv. Elsevier.*, 2017, vol. 35, no. 5, pp. 530–544. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.05.006
19. Zhu J. Biomimetic Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering. *J. Biochips Tissue Chips.*, 2012, vol. 2, no. 43, 1000e119 p. DOI: 10.4172/2153-0777.1000e119
20. Sharma V., Patel N., Kohli N., Ravindran N., Hook L., Mason C., García-Gareta E. Viscoelastic, Physical, and Bio-degradable Properties of Dermal Scaffolds and Related Cell Behaviour. *Biomed. Mater.*, 2016, vol. 11, no. 5, pp. 1–12. DOI: 10.1088/1748-6041/11/5/055001.
21. Rowe S.L., Stegemann J.P. Microstructure and Mechanics of Collagen-fibrin Matrices Polymerized Using Anrod Snake Venom Enzyme. *J. Biomech. Eng.*, 2009, vol. 131, no. 6, 061012 p. DOI: 10.1115/1.3128673.
22. Semenycheva L.L., Valetova N.B., Chasova V.O., Podguzkova M.V., Zaharycheva N.S., Egorihina M.N., Astanina M.V., Kuznetsova Yu.L. [Molecular-mass Parameters of Collagen Made from Various Raw Materials and Dynamics of Parameter Change in Enzymic Hydrolysis with Pancreatine]. *Polymer Science. Series D.*, 2019, no. 4, pp. 27–33. (in Russ.) DOI: 10.31044/1994-6260-2019-0-4-27-33.
23. Egorikhina M.N., Levin G.Y., Charykova I.N., Alejnik D.Y., Sosnina L.N. *Sposob sozdaniya bioresorbiruemogo kletchnogo skaffolda na osnove fibrina plazmy krovi* [Method for Creating a Bioresorbable Cellular Scaffold Based on Fibrin of Blood Plasma]. Patent RF, no. 2653434, 2018.
24. Semenycheva L.L., Kuznetsova J.L., Valetova N.B., Geras'kina E.V., Tarankova O.A. *Sposob polucheniya uksusnoj dispersii vysokomolekulyarnogo rybnogo kollagena* [Method for Producing of Acetic Dispersion of High Molecular Fish Collagen]. Patent RF, no. 2567171, 2015.
25. Bender M., Bergeron R., Komiyama M. *Bioorganicheskaya himiya fermentativnogo kataliza* [Bioorganic chemistry of enzymatic catalysis]. Moscow, Mir, 1987. 352 p. (in Russ.)

Received 30 October 2019

ОБРАЗЕЦ ЦИТИРОВАНИЯ

Эффективность протеаз панкреатина и трипсина при ферментативном гидролизе коллагена / Л.Л. Семенычева, М.Н. Егорихина, В.О. Часова и др. // Вестник ЮУрГУ. Серия «Химия». – 2020. – Т. 12, № 1. – С. 66–75. DOI: 10.14529/chem200108

FOR CITATION

Semenycheva L.L., Egorihina M.N., Chasova V.O., Valetova N.B., Mitin A.V., Kuznetsova Yu.L. Efficacy of Pancreatin and Trypsin Proteases in Enzymatic Hydrolysis of Collagen. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Chemistry*. 2020, vol. 12, no. 1, pp. 66–75. (in Russ.) DOI: 10.14529/chem200108