

## НЕИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ

УДК 577.325:577.15:614.875

### ХИТОЗАН И СУКЦИНАТ ХИТОЗАНА КАК ФОТОПРОТЕКТОРЫ ДЛЯ ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА ИХ МАТРИЦЕ ПАПАИНА

© 2022 г. М. Г. Холявка<sup>1,2,\*</sup>, С. М. Панкова<sup>1,3</sup>, Ю. М. Вышкворкина<sup>4</sup>, А. Н. Лукин<sup>1</sup>,  
М. С. Кондратьев<sup>5</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

<sup>3</sup> Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

<sup>4</sup> Московский физико-технический институт, Москва, Россия

<sup>5</sup> Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

\*E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 26.01.2022 г.

После доработки 25.06.2022 г.

Принята к публикации 29.06.2022 г.

Установлено, что УФ-излучение в дозах 453–6040 Дж/м<sup>2</sup> приводит к снижению удельной активности свободного папаина. Адсорбционная иммобилизация на матрице среднемолекулярного (200 кДа), высокомолекулярного (350 кДа), пищевого (<100 кДа) хитозанов и сукцината хитозана способствует повышению стабильности молекул папаина по отношению к УФ-облучению в диапазоне доз до 6040 Дж/м<sup>2</sup> по сравнению со свободным энзимом. Изменения, зарегистрированные в ИК-спектрах иммобилизованного папаина, практически не затрагивают полосы, обусловленные белковым компонентом системы: амид I, амид II, амид III, следовательно, можно признать фотопротекторный эффект матриц хитозана и сукцината хитозана для иммобилизованного на них папаина. Полученные результаты могут быть полезны для фармакологии и медицины при разработке препаратов, способствующих ускоренному заживлению кожных покровов, а также при подборе условий стерилизации УФ-светом лекарственных препаратов, содержащих папаин.

**Ключевые слова:** УФ-облучение, адсорбционная иммобилизация, включение в гель, папаин, хитозан, сукцинат хитозана

**DOI:** 10.31857/S086980312205006X

Ультрафиолетовое (УФ) излучение – постоянно действующий фактор, который может влиять на живые организмы как на клеточном, так и на молекулярном уровне. Это излучение оказывает как положительные, так и негативные эффекты на биообъекты, поэтому особый интерес представляет изучение механизмов действия УФ-света и перспектив его применения в медицинской практике [1, 2].

УФ-излучение имеет волновую природу и на шкале электромагнитных волн находится в диапазоне от 10 нм до 380 нм. Облучение УФ-светом в диапазоне волн 200–380 нм вызывает электронные переходы с нижних энергетических уровней молекулы на верхние, и таким образом запускаются первичные механизмы фотобиологических процессов, например, в белках первичной фотохимической реакцией является фотоионизация ароматических аминокислот или фотодиссоциация -S-S-связи цистина. При этом образуются

свободные радикалы и запускается каскад реакций, заканчивающихся нарушением структуры молекулы и изменением каталитической активности фермента [3, 4].

Папаин (КФ 3.4.22.2) относится к моноиоловым цистеиновым эндопротеазам, содержащимся в плодах папайи (*Carica papaya*). Молекула фермента массой 23–25 кДа состоит из 212 аминокислотных остатков, где N-концевым остатком является изолейцин, C-концевым остатком – аспарагин. В медицине и фармакологии энзим нашел применение благодаря своим противовоспалительным и антиоксидантным эффектам, а также бактерицидным и бактериостатическим свойствам [5–9].

Использование растворимой формы ферментов имеет свои недостатки, одним из которых является их быстрая инактивация за счет протеолиза [10, 11]. В настоящее время для повышения стабильности ферментов широко применяется

метод иммобилизации на различных полимерных носителях [12, 13]. К известным способам стабилизации структуры папаина относятся: ковалентная иммобилизация, взаимодействие с ионом металла, сополимеризация с помощью глутарового альдегида, иммобилизация в агарозе, ковалентное связывание с полиэфирсульфоном, модификация янтарным ангидридом, простая адсорбция в Celite®, ионная адсорбция на КМ-целлюлозе (катионит) и QAE-Sephadex® (анионит) [14–16], включение в гель на основе крахмала [17], включение в нитриловое волокно, обогащенное аминогруппами [18], иммобилизация на поверхность хлопчатобумажной ткани [19], сепфарозу [20], наночастицы [21–23], включение в ниосомы, наносферы, липосомы [24–26].

Среди множества носителей для иммобилизации энзимов перспективными являются хитозаны и их производные. По химической структуре хитозан является сополимером *D*-глюкозамина и *N*-ацетил-*D*-глюкозамина. Полимер проявляет слабоосновные свойства:  $pK_a = 6,5$ , что близко к значению  $pK_a$  остатков *D*-глюкозамина. Молекула хитозана содержит большое количество свободных аминогрупп, благодаря которым определяется его способность связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд. Таким образом, полимер является универсальным сорбентом для широкого спектра веществ органической и неорганической природы, в том числе и ферментов. Сукцинат хитозана представляет собой соль деацетилизованного хитина и янтарной кислоты. Он хорошо растворим в воде, его деацетилированные и замещенные группы при значениях  $pH < 7$  приобретают положительный заряд, т.е. хитозановый гель представляет собой поликатион, который соответственно связывается с отрицательно заряженными молекулами [31–37].

При создании медицинских препаратов учитываются такие свойства хитозанов и их производных, как высокая биологическая совместимость, низкая токсичность. Хитозан был протестирован как носитель для фотосенсибилизаторов типа порфирина. Полисахарид эффективно предотвращал фотодegradацию их макроциклов [38]. Тонкие пленки и пористые структуры, полученные из хитозана, используются при трансплантации клеток и регенерации тканей. В фармации и медицине полимер применяется в составе средств для лечения заболеваний костей и хирургических швов [39–41]. УФ-облучение может оказывать модифицирующий эффект на свойства хитозана несмотря на то, что сам хитозан не имеет полос поглощения в области 220–500 нм [42].

Таким образом, целью нашей работы было изучить особенности воздействия УФ-излучения

на процессы фотомодуляции папаина, свободного и иммобилизованного на матрицах хитозана и сукцината хитозана.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования был выбран папаин фирмы “Sigma-Aldrich”, субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы “Sigma-Aldrich”, носителями для иммобилизации – хитозаны, синтезированные ЗАО “Биопрогресс”: хитозан пищевой кислоторастворимый среднемолекулярный ( $M_r = 200$  кДа), хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный ( $M_r = 350$  кДа), хитозан пищевой ( $M_r < 100$  кДа) и сукцинат хитозана.

Иммобилизацию папаина на матрице хитозанов осуществляли адсорбционным методом. К 1 г хитозана добавляли 20 мл раствора фермента в концентрации 1 мг/мл в 0.05 моль/л глициновом буфере ( $pH 9.0$ ), инкубировали в течение 4 ч с периодическим перемешиванием для среднемолекулярного хитозана, а при использовании высокомолекулярного хитозана время сорбции составляло 5 ч. Суспензию центрифугировали при 1500 г в течение 10 мин. Образовавшийся осадок промывали 0.05 моль/л трис-НСI буфером ( $pH 7.5$ ) до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при  $\lambda = 280$  нм).

Иммобилизацию папаина за счет включения в гель проводили следующим образом: к 1 г хитозана добавляли 20 мл раствора фермента в концентрации 1 мг/мл в 0.05 моль/л глициновом буфере ( $pH 10.0$ ), инкубировали в течение 2 ч. После окончания инкубации образовавшийся осадок (в виде геля) промывали 0.05 моль/л трис-НСI буфером ( $pH 7.5$ ) до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при  $\lambda = 280$  нм). Определение количества белка в препаратах и активности фермента проводили модифицированным методом Лоури [43].

Перед облучением к образцам фермента добавляли 0.05 моль/л фосфатный буфер с  $pH 6.8$  в соотношении 1 мг/мл для свободного и 50 мг/мл (что эквивалентно 1 мг/мл по белковой составляющей) для иммобилизованного на хитозане папаина. Процесс УФ-облучения происходил при непрерывном перемешивании соответственно раствора суспензии геля в объеме 4 мл (толщина слоя в середине кюветы 7 мм) магнитной мешалкой в круглодонной термостатируемой кювете ( $20 \pm 1^\circ C$ ) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм в течение 1, 3, 5, 10,

20, 30, 40 мин. Доза облучения составила соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup>.

Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов осуществляли в Центре коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета с помощью ИК-Фурье спектрометра Bruker Vertex-70 (Германия). Спектры снимали с неориентированных порошковых образцов, которые получали после УФ-облучения иммобилизованного папаина путем высушивания препаратов при комнатной температуре и измельчения до состояния пудры.

Подготовку структуры папаина для докинга выполняли по стандартной для Autodock Vina схеме, описанной авторами пакета на сайте: из входного файла PDB были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя, буфера и лигандов. Перед проведением численных расчетов была выполнена расстановка зарядов на поверхности белков с помощью MGLTools. Центр молекулы и параметры бокса (“ячейки”) мы задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула протеазы полностью была внутри расчетной области пространства.

Модели структур хитозана и сукцината хитозана были нарисованы в молекулярном конструкторе NuregChem, последовательно оптимизированы сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически в PM3. Лиганд в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановка зарядов на молекуле лиганда и ее протонирование/депротонирование осуществлялись автоматически в пакете MGLTools 1.5.6.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5% с использованием *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После воздействия дозы УФ-света 453 Дж/м<sup>2</sup> на раствор папаина выявлено снижение каталитической способности энзима на 32% по сравнению с контрольным (необлученным) образцом. При повышении дозы облучения от 755 до 6040 Дж/м<sup>2</sup> фермент сохранял свою активность на относительно постоянном уровне 65–75% от первоначального значения.

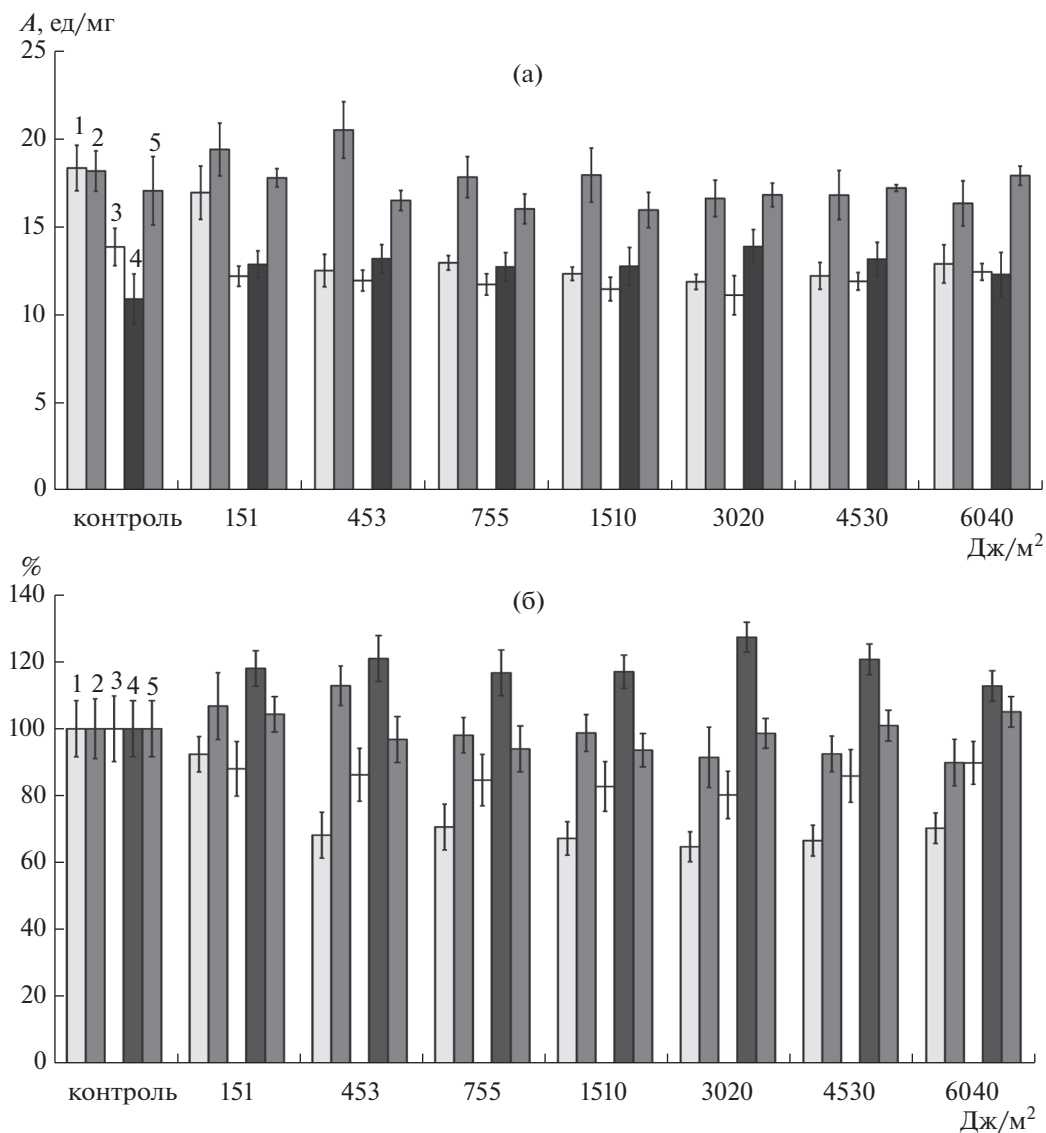
После иммобилизации папаина на матрице среднемолекулярного (200 кДа) и высокомолекулярного (350 кДа) хитозанов и после включения в гель пищевого хитозана (<100 кДа) и сукцината хитозана при воздействии доз от 151 до 6040 Дж/м<sup>2</sup> каталитическая способность фермента изменялась в меньшей степени, чем у его растворимой

формы. В частности, после адсорбции на среднемолекулярном хитозане при воздействии УФ-света во всем изучаемом нами диапазоне доз активность папаина колебалась в пределах ~5%, а при облучении УФ-светом энзима, сорбированного на высокомолекулярном хитозане, активность биокатализатора даже увеличивалась на 13–27% от первоначального уровня, вероятно, за счет “удачного” изменения конформации глобулы и повышения доступности активных центров молекул папаина для субстрата БСА. При включении папаина в гель пищевого хитозана его активность сначала увеличивалась на 7–13% при облучении дозами 151–453 Дж/м<sup>2</sup>, а при повышении дозы облучения немного снижалась, достигая ~90% при дозе 6040 Дж/м<sup>2</sup>. После включения фермента в гель сукцината хитозана его каталитическая способность оставалась на уровне 80–90% во всем диапазоне используемых нами доз (рис. 1).

Известно, что за функционально активное поглощение УФ-света белковыми молекулами ответственны хромофорные группы, представляющие собой остатки ароматических аминокислот: прежде всего триптофана, в значительно меньшей степени тирозина и фенилаланина, а также цистина [44]. Механизм действия УФ-излучения на молекулы папаина достаточно сложный. По данным К. Дозе (1972), не очевидна простая корреляция между потерей активности фермента и разрушением любого аминокислотного остатка-хромофора для трех длин волн – 254, 280 и 313 нм. Установлено, что относительно низкая реакционная способность трех остатков цистина обусловлена сильным стабилизирующим действием нековалентных связей, а не маскированием остатков цистина другими группами [45].

Активный центр папаина расположен на границе L и R-доменов в V-образной расщелине и образован цистеином (Cys25), гистидином (His159), аспарагином (Asn175) и остатком глутамина (Gln19), которые консервативны для всех папаин-подобных протеаз [46, 47]. Trp177, который наряду с Cys25 является хромофором для УФ-света, хотя и не входит в состав активного центра папаина, но участвует в генерации нуклеофильного характера ионной пары Cys25/His159 [48]. J.F. Baugher (1975) показал существенный вклад фотоионизации остатка Trp 177 в процессы инактивации папаина [49].

Более высокую устойчивость к действию УФ-излучения иммобилизованного на хитозане папаина можно объяснить следующим образом: в процессе его связывания с матрицей носителя принимают участие три аминокислотных остатка – хромофора для УФ-света: Tyr61, Cys63 и Tyr67. При включении папаина в гель сукцината хитозана связи и взаимодействия формируются со сле-

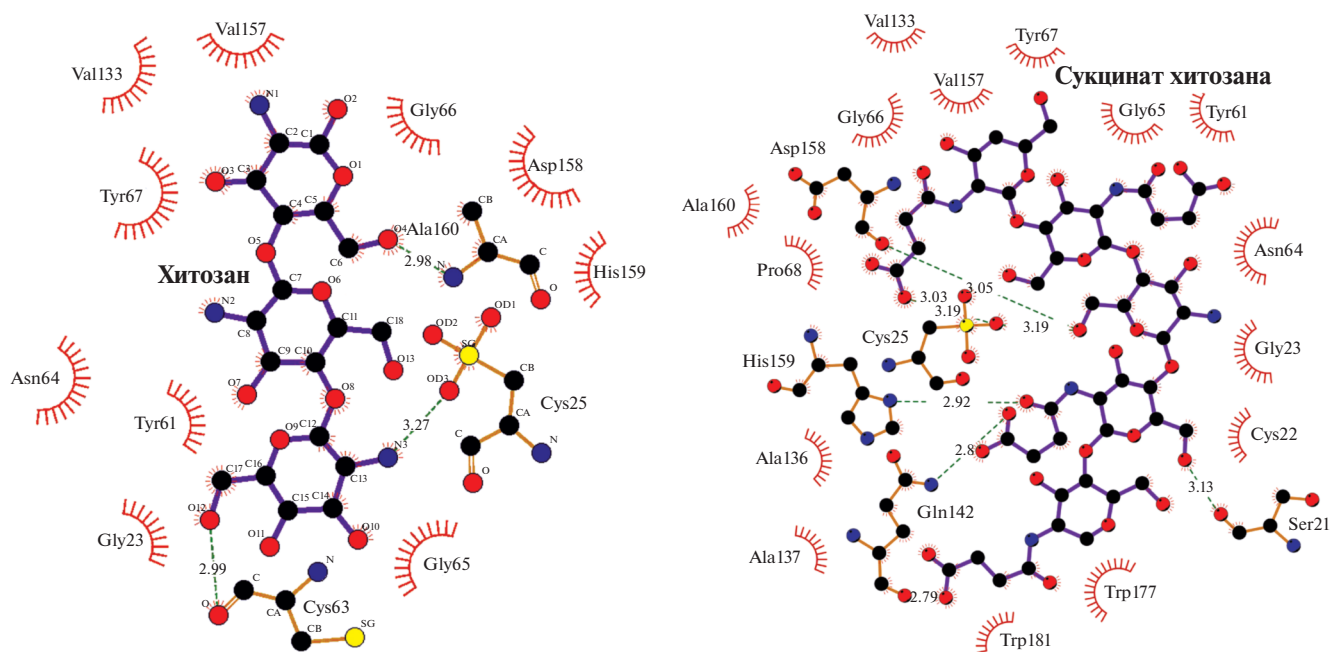


**Рис. 1.** Влияние УФ-излучения на удельную каталитическую активность (ед/мг) папаина (а) и ее изменение в процентах (б): 1 – свободный фермент, 2 – иммобилизованный путем включения в гель пищевого хитозана, 3 – иммобилизованный путем включения в гель сукцината хитозана, 4 – иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане, 5 – иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане. За 100% принята активность свободного и иммобилизованного папаина, измеренная у образцов, не подвергнутых воздействию УФ-излучения.

**Fig. 1.** Effect of UV radiation on the specific catalytic activity (U/mg) of papain (a) and its change in percentage (b): 1 – free enzyme, 2 – immobilized by including in the gel of food chitosan, 3 – immobilized by including in the gel of chitosan succinate, 4 – immobilized on medium molecular weight chitosan, 5 – immobilized on high molecular weight chitosan. The activity of free and immobilized papain was taken as 100%, measured on samples not exposed to UV radiation.

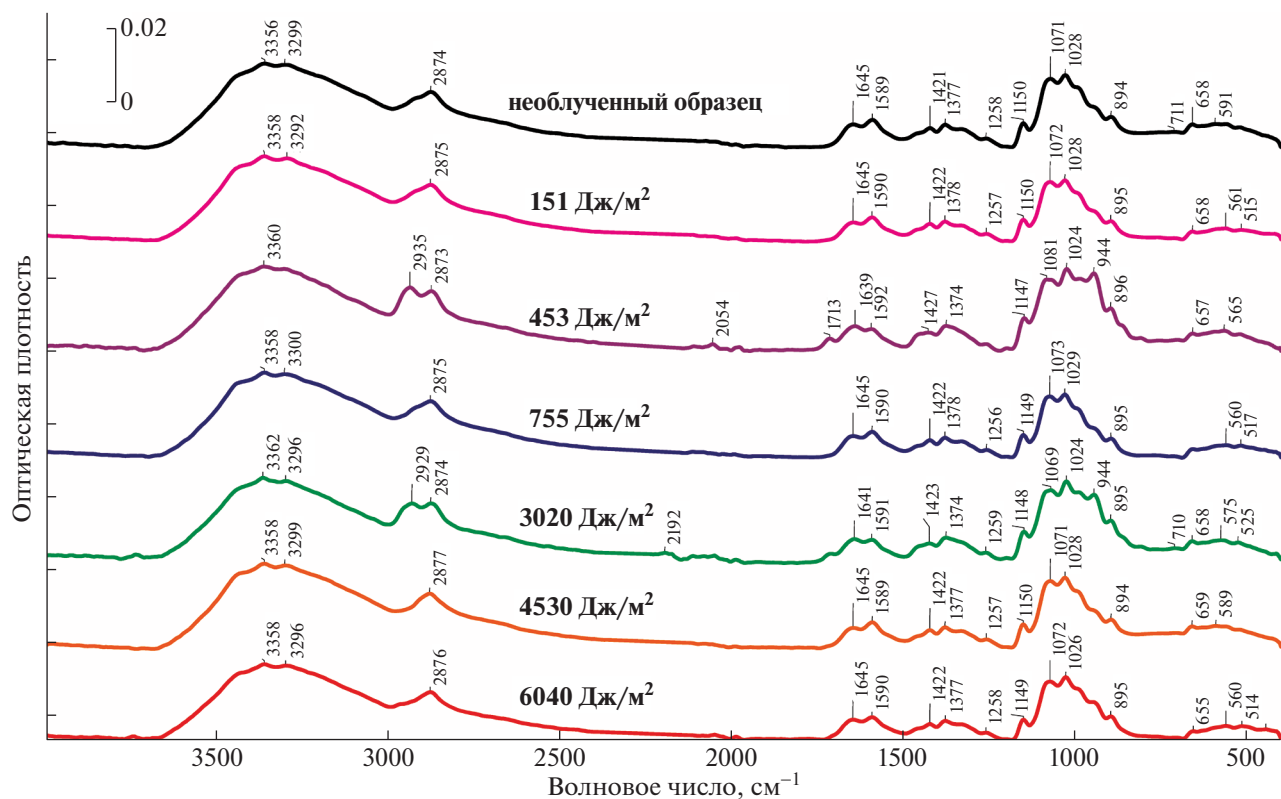
дующими хромофорами: Cys22, Tyr61, Tyr67, Trp177, Trp181. Кроме того, два остатка из активного центра папаина Cys25 и His159 также задействованы в процессах иммобилизации энзима на хитозане и сукцината хитозана, что объясняет снижение каталитической активности фермента после иммобилизации и повышение его устойчивости к действию УФ-излучения (рис. 2).

Для более полного обсуждения наблюдаемых эффектов мы зарегистрировали ИК-спектры папаина, свободного и иммобилизованного на матрице среднемoleкулярного (200 кДа), высокомолекулярного (350 кДа), пищевого (<100 кДа) хитозанов и сукцината хитозана, до и после облучения образцов УФ-светом в дозах 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup> (рис. 3–6).



**Рис. 2.** Связи (обозначены пунктирными линиями с указанием длины в Å) и взаимодействия между молекулой папаина и матрицами хитозана и сукцината хитозана, возникающие в ходе иммобилизации фермента.

**Fig. 2.** Bonds (indicated by dotted lines with lengths in Å) and interactions between the papain molecule and matrices of chitosan and chitosan succinate forming during the enzyme immobilization.



**Рис. 3.** ИК-спектры папаина, иммобилизованного на матрице среднемoleкулярного (200 кДа) хитозана, до и после УФ-облучения в диапазоне доз 151–6040 Дж/м<sup>2</sup>.

**Fig. 3.** IR spectra of papain immobilized on a matrix of the medium molecular weight (200 kDa) chitosan before and after UV irradiation in the dose range of 151–6040 J/m<sup>2</sup>.

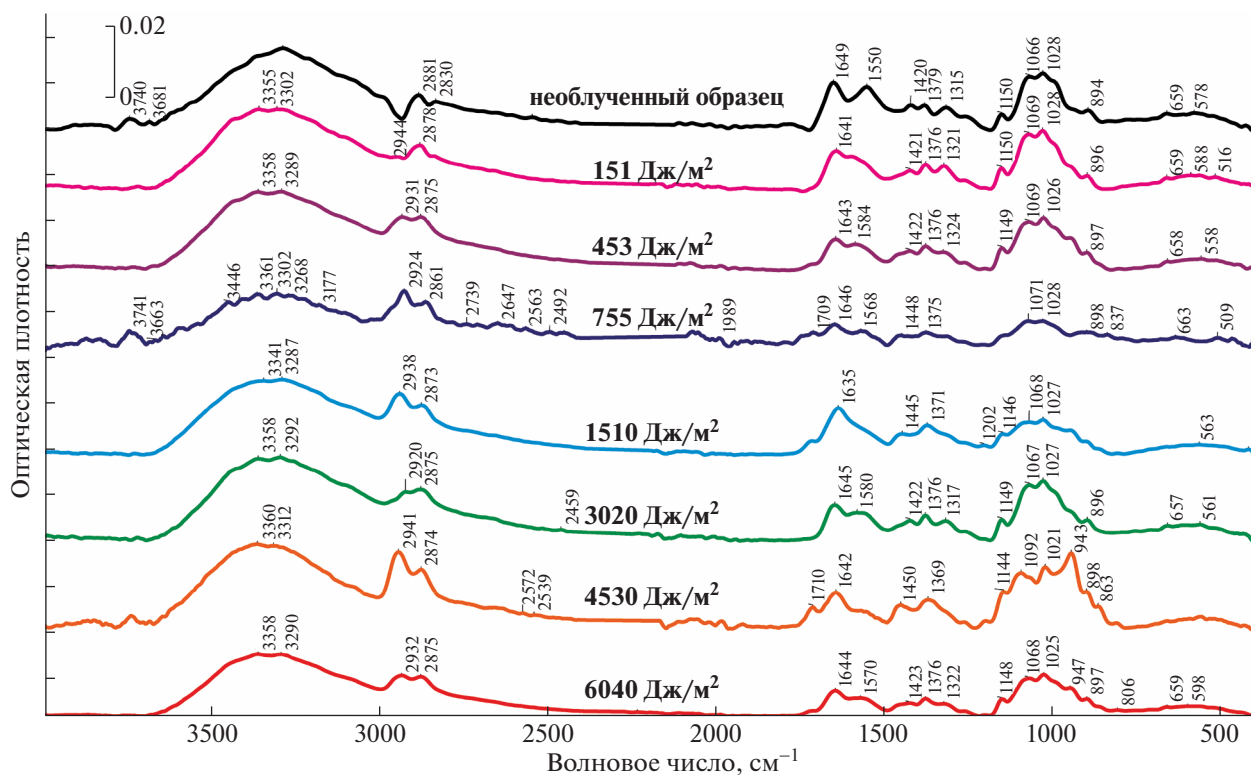


Рис. 4. ИК-спектры папаина, иммобилизованного на матрице высокомолекулярного (350 кДа) хитозана, до и после УФ-облучения в диапазоне доз 151–6040 Дж/м<sup>2</sup>.

Fig. 4. IR spectra of papain immobilized on a matrix of the high molecular weight (350 kDa) chitosan before and after UV irradiation in the dose range of 151–6040 J/m<sup>2</sup>.

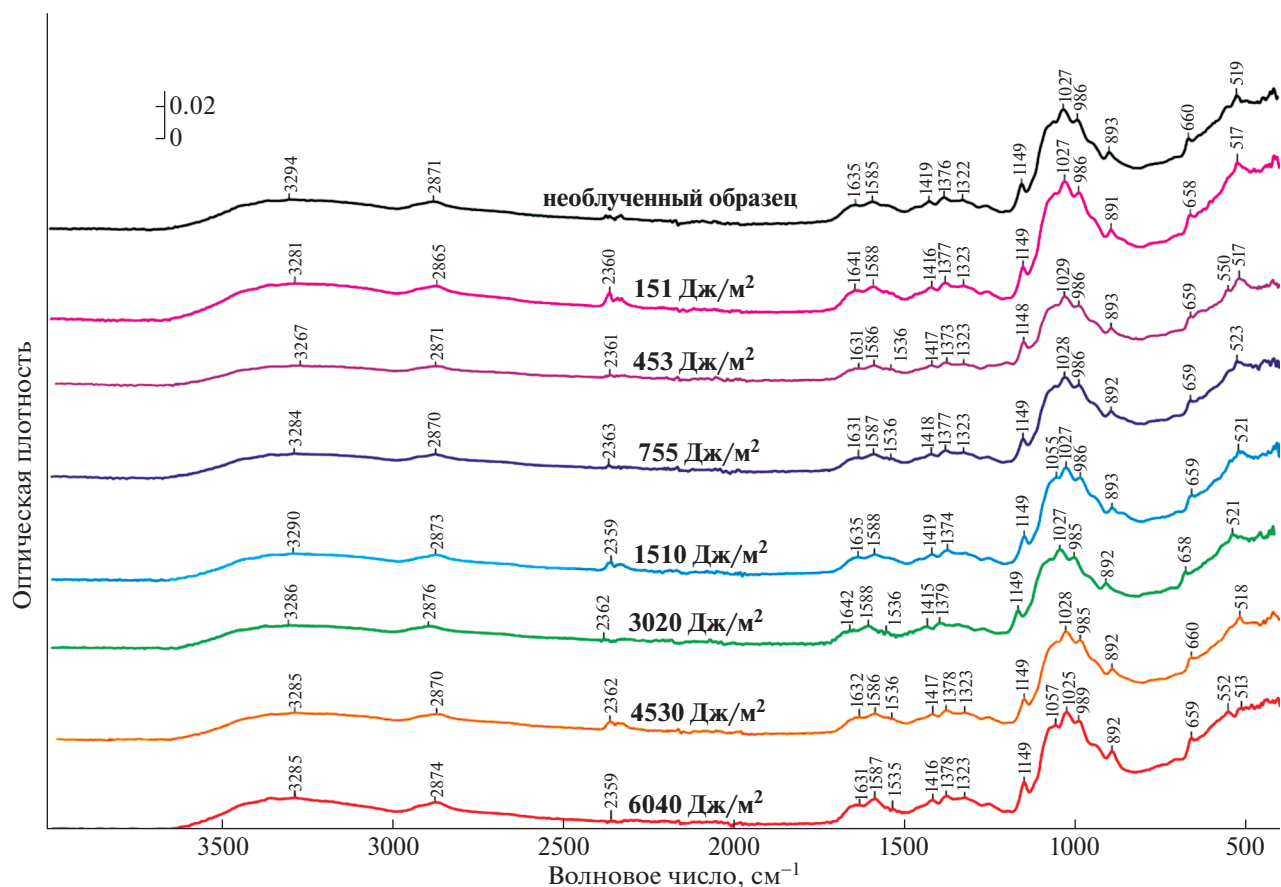
Характеристика полос ИК-спектров папаина и хитозана представлена в табл. 1 [50–53].

После иммобилизации папаина на матрице среднемолекулярного хитозана существенных

Таблица 1. Характерные полосы поглощения на ИК-спектрах папаина и хитозана

Table 1. Characteristic absorption bands in the IR spectra of papain and chitosan

Полосы поглощения в спектре свободного папаина, см <sup>-1</sup>	Характеристика	Полосы поглощения в спектре хитозана, см <sup>-1</sup>	Характеристика
3450–3225	Обусловлена растяжением связи N–H вторичного N-замещенного амида	3600–3100	Обусловлена колебаниями N–H, O–H связей
2981	Обусловлена растяжением связи C–H	3100–2800	Вызвана растяжением C–H связей
1650	Вызвана C=O-растяжением карбоксильной группы	1635–1630	Вызвана колебаниями C–N, N–H связей
1600–1500	Обусловлена наличием C–C-связей	1558–1550	Обусловлена колебаниями C–N, N–H связей
1429 и 1321	Вызваны деформацией C–H в алкильных радикалах аминокислотных остатков	1409–1406 и 1379–1316	Вызваны деформационными колебаниями O–H и C–H в пиранозном кольце
868 и 850	Связаны с процессами деформации ароматического кольца остатков триптофана и тирозина	1200–1000	Обусловлена растяжением C–O–C связей
1150–1050 и 705–570	Обусловлены наличием C–S связей		



**Рис. 5.** ИК-спектры папаина, иммобилизованного путем включения в гель пищевого (<100 кДа) хитозана, до и после УФ-облучения в диапазоне доз 151–6040 Дж/м<sup>2</sup>.

**Fig. 5.** IR spectra of papain immobilized by incorporating into gel of food (<100 kDa) chitosan before and after UV irradiation in the dose range of 151–6040 J/m<sup>2</sup>.

изменений максимумов и интенсивности полос амид I (1690–1630 см<sup>-1</sup>), амид II (1560–1520 см<sup>-1</sup>), амид III (1250–1200 см<sup>-1</sup>) при УФ-облучении образцов во всем диапазоне используемых нами доз не происходит (рис. 3).

После УФ-облучения в ИК-спектрах папаина, иммобилизованного на высокомолекулярном хитозане, наблюдаются следующие модификации: смещение максимума от 1649 см<sup>-1</sup> (необлученный образец) в сторону уменьшения значений волновых чисел до 1644 см<sup>-1</sup> (после воздействия дозы 6040 Дж/м<sup>2</sup>) и небольшое снижение интенсивности полосы амид I (рис. 4).

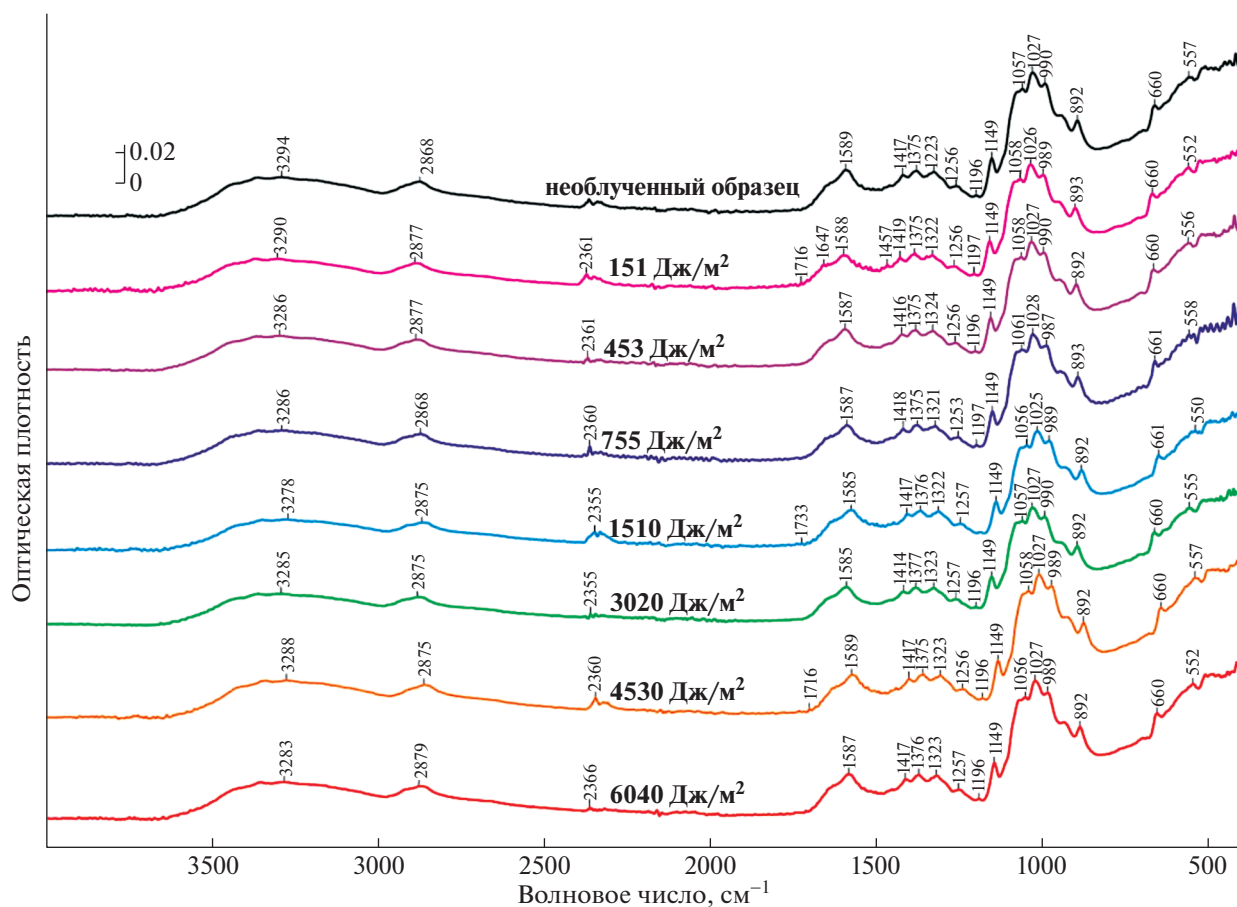
После включения папаина в гель пищевого хитозана зарегистрировано смещение полосы 3294–3285 см<sup>-1</sup>, ответственной за NH<sub>2</sub>-валентные колебания, в сторону уменьшения значений волнового числа при облучении дозами 151–6040 Дж/м<sup>2</sup>. Выявлено смещение максимума при дозах 151 Дж/м<sup>2</sup> и 3020 Дж/м<sup>2</sup> от 1635 см<sup>-1</sup> (необлучен-

ный образец) до 1641 см<sup>-1</sup> и 1642 см<sup>-1</sup> соответственно (рис. 5).

После УФ-облучения в ИК-спектрах папаина, включенного в гель сукцината хитозана, выявлено смещение полосы 2868–2879 см<sup>-1</sup> (C<sub>sp3</sub>-H валентные колебания) в сторону увеличения значений волнового числа после облучения дозами 151–6040 Дж/м<sup>2</sup>. При дозах 151, 1510, 4530 Дж/м<sup>2</sup> появляются максимумы 1716, 1733, 1716 см<sup>-1</sup> соответственно (рис. 6).

Как видно из рис. 3–6, изменения в ИК-спектрах папаина, иммобилизованного путем адсорбции или включения в гель, практически не затрагивают полосы, обусловленные белковым компонентом системы: амид I, амид II, амид III. Поэтому можно констатировать, что матрицы хитозана и сукцината хитозана выступают в качестве фотопротектора для иммобилизованного на ней фермента.





**Рис. 6.** ИК-спектры папаина, иммобилизованного путем включения в гель сукцината хитозана, до и после УФ-облучения в диапазоне доз 151–6040 Дж/м<sup>2</sup>.

**Fig. 6.** IR spectra of papain immobilized by incorporating into the gel chitosan succinate before and after UV irradiation in the dose range of 151–6040 J/m<sup>2</sup>.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Действие УФ-излучения в дозе 453 Дж/м<sup>2</sup> способствует снижению каталитической активности свободного папаина. Иммобилизация на матрице средномолекулярного (200 кДа), высокомолекулярного (350 кДа), пищевого (<100 кДа) хитозанов и сукцината хитозана приводит к повышению стабильности структуры молекул биокатализатора по отношению к УФ-облучению по сравнению со свободным папаином. Матрицы хитозана и сукцината хитозана, вероятно, играют роль фотопротектора для иммобилизованного на ней фермента.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-74-20053.

Результаты исследований получены на оборудовании ЦКПНО ВГУ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кисткин А.И.* Эффективность озонотерапии и АУФОК в комплексном лечении больных с посттравматическими гнойно-воспалительными осложнениями: Дис. ... канд. мед. наук. Саранск, 2009. 111 с. [*Kistkin A.I.* Effektivnost' ozonoterapii i AUFOK v kompleksnom lechenii bol'nyh s posttravmaticheskimi gnojno-vospalitel'nymi oslozhneniyami. [dissertation]. Saransk, 2009. 111 p. (In Russ.)]
2. *Алипов Н.В.* О клинической эффективности дальней длинноволновой УФ-терапии // Саратовский науч.-мед. журн. 2015. Т. 11. № 3. С. 431–434. [*Alipov N.V.* O klinicheskoy effektivnosti dal'nej dlinnovolnovoy UF-terapii // Saratovskij nauchno-medicinskij zhurnal. 2015. V. 11. № 3. P. 431–434. (In Russ.)]
3. *Bintsis T., Litopoulou-Tzanetaki E., Robinson R.K.* Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review // *J. Sci. Food Agric.* 2000. V. 80. № 6. P. 637–645. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000501\)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1)



4. *Mohr H., Gravemann U., Bayer A., Müller T.H.* Sterilization of platelet concentrates at production scale by irradiation with short-wave ultraviolet light // *Transfusion*. 2009. V. 49. P. 1956–1963.  
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02228.x>
5. *Vij T., Prashar Y.* A review on medicinal properties of *Carica papaya* Linn // *Asian Pacific J. Tropic. Dis.* 2015. V. 5. № 1. P. 1–6.  
[https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60617-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60617-4)
6. *Aravind G., Debjit B., Duraivel S. Harish G.* Traditional and Medicinal Uses of *Carica papaya* // *J. Med. Plant. Stud.* 2013. V. 1. № 1. P. 7–15.
7. *Manosroi A., Chankhampan C., Pattamapun K. et al.* Antioxidant and gelatinolytic activities of papain from papaya latex and bromelain from pineapple fruits // *Chiang Mai J. Sci.* 2014. V. 41. № 3. P. 635–648.
8. *Ajlia S.A., Majid F.A., Suvik A. et al.* Efficacy of papain-based wound cleanser in promoting wound regeneration // *Pak. J. Biol. Sci.* 2010. V. 13. № 12. P. 596–603.  
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2010.596.603>
9. *Pratap K.M., Nandakumar K., Sambashivarao P., Sandhya P.S.* Chemo Mechanical Caries Removal – A New Horizon // *Ind. J. Dental Advancem.* 2011. V. 3. № 4. P. 668–672.  
<https://doi.org/10.5866/3.4.668>
10. *Klasen H.J.* A review on the nonoperative removal of necrotic tissue from burn wounds // *Burns*. 2000. V. 26. № 3. P. 207–222.  
[https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(99\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00117-5)
11. *Thallinger B., Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M.* Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms // *Biotechnol.* 2013. V. 8. № 1. P. 97–109.  
<https://doi.org/10.1002/biot.201200313>
12. *Mogosanu G.D., Grumezescu A.M.* Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing // *Int. J. Pharmaceut.* 2014. V. 463. № 2. P. 127–136.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.015>
13. *Benucci I., Lombardelli C., Liburdi K. et al.* Immobilised native plant cysteine proteases:packed-bed reactor for white wine protein stabilization // *J. Food Sci. Technol.* 2015. V. 53. № 2. P. 1130–1139.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-015-2125-4>
14. *Sim Y.C., Lee S.G., Lee D.C. et al.* Stabilization of Papain and Lysozyme for Application to Cosmetic Products // *Biotechnol. Lett.* 2000. V. 22. № 2. P. 137–140.  
<https://doi.org/10.1023/A:1005670323912>
15. *Li M., Su E., You P. et al.* Purification and In Situ Immobilization of Papain with Aqueous Two-Phase System // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 12. P. e15168.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015168>
16. *Pinto C.A.S.O., Lopes P.S., Sarruf F.D. et al.* Comparative study of the stability of free and modified papain incorporated in topical formulations // *Brazil. J. Pharm. Sci.* 2011. V. 47. № 4. P. 751–760.  
<https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000400012>
17. *Sangeetha K., Abraham T.E.* Chemical modification of papain for use in alkaline medium // *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*. 2006. V. 38. P. 171–177.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.01.003>
18. *Li F.Y., Xing Y., Ding X.* Immobilization of papain on cotton fabric by sol–gel method // *Enzyme Microbial. Technol.* 2007. V. 40. № 7. P. 1692–1697.  
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.09.007>
19. *Xue Y., Nie H., Zhu L. et al.* Immobilization of Modified Papain with Anhydride Groups on Activated Cotton Fabric // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. V. 160. P. 109–121.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-009-8588-x>
20. *Homaei A.A., Sajedi R.H., Sariri R. et al.* Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain // *Amino Acids*. 2010. V. 38. P. 937–942.  
<https://doi.org/10.1007/s00726-009-0302-3>
21. *Moreno-Cortez I.E., Romero-Garda J., Gonzalez-Gonzalez V. et al.* Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA cross-linked with glutaraldehyde vapor // *Mat. Sci. Engineering C*. 2015. V. 52. P. 306–314.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.049>
22. *Xin B., Si S.F., Xing G.W.* Protease immobilization on  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for the synthesis of oligopeptides in organic solvents // *Chemistry – An Asian J.* 2010. V. 5. № 6. P. 1389–1394.  
<https://doi.org/10.1002/asia.200900696>
23. *Muller C., Perera G., Konig V., Bernkop-Schnurch A.* Development and in vivo evaluation of papain-functionalized nanoparticles // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014. V. 87. № 1. P. 125–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.12.012>
24. *Manosroi A., Chankhampan C., Manosroi W., Manosroi J.* Transdermal absorption enhancement of papain loaded in elastic niosomes incorporated in gel for scar treatment // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013. V. 48. № 3. P. 474–483.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.010>
25. *Manosroi A., Chankhampan C., Manosroi W., Manosroi J.* Toxicity Reduction and MMP-2 Stimulation of Papain and Bromelain Loaded in Elastic Niosomes // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2012. V. 8. № 5. P. 720–729.  
<https://doi.org/10.1166/jbn.2012.1458>
26. *Chen Y.Y., Lu Y.H., Ma C.H. et al.* A novel elastic liposome for skin delivery of papain and its application on hypertrophic scar // *Biomed. & Pharmacother.* 2017. V. 87. P. 82–87.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.076>
27. *Wang M., Jia C., Qi W. et al.* Porous-CLEAs of papain: Application to enzymatic hydrolysis of macromolecules // *Biores. Technol.* 2011. V. 102. P. 3541–3545.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.120>
28. *Zhou L., Wang C., Jiang Y., Gao J.* Immobilization of papain in biosilica matrix and its catalytic property // *Chin. J. Chem. Engineer.* 2013. V. 21. № 6. P. 670–675.  
[https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(13\)0013](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(13)0013)
29. *Sahoo B., Sahu S.K., Bhattacharya D. et al.* A novel approach for efficient immobilization and stabilization of papain on magnetic gold nanocomposites // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013. V. 101. P. 280–289.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.003>
30. *Романовская И.И., Декина С.С., Чаланова Р.И., Сотникова Е.П.* Технология получения и изучение

- острой токсичности глазных лекарственных пленок с папаином и мочевиной // Хим.-фарм. журн. 2012. Т. 46. № 3. С. 37–39. [*Romanovskaya I.I., Dekina S.S., Chalanova R.I., Sotnikova E.P.* Production technology and acute toxicity of ocular medicinal films containing papain and urea // *Pharm. Chem. J.* 2012. V. 46. № 3. P. 180–182. (In Russ.)]  
<https://doi.org/10.1007/s11094-012-0755-7>
31. *Khalil A., Saurabha C.K., Adnan A.S. et al.* A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: properties and their applications // *Carbohydr. Polym.* 2016. V. 150. P. 216–226.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.028>
  32. *Logith Kumar R., Keshav Narayan A., Dhivya S. et al.* A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering // *Carbohydr. Polym.* 2016. V. 15. P. 172–188.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.049>
  33. *Sionkowska A.* Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review // *Progress in Polymer Sci.* 2011. V. 36. № 9. P. 1254–1276.  
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003>
  34. *Ji J., Hao S., Wu D. et al.* Preparation, Characterization and in Vitro Release of Chitosan Nanoparticles Loaded with Gentamicin and Salicylic Acid // *Carbohydr. Polym.* 2011. V. 85. P. 803–808.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.051>
  35. *Dincer A., Becerik S., Aydemir T.* Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads // *Int. J. Biol. Macromol.* 2012. V. 50. № 3. P. 815–820.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.11.020>
  36. *Zargar V., Asghari M., Dashti M.* A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications // *Chem. Bio. Eng.* 2015. V. № 3. P. 204–226.  
<https://doi.org/10.1002/cben.201400025>
  37. *Sionkowska A., Planecka A., Lewandowska K., Michalska M.* The influence of UV-irradiation on thermal and mechanical properties of chitosan and silk fibroin mixtures // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 2014. V. 140. P. 301–305.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.08.017>
  38. *Chelminiak-Dudkiewicz D., Ziegler-Borowska M., Stolarska M. et al.* The chitosan - Porphyrine hybrid materials and their photochemical properties // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 2018. V. 181. P. 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.02.021>
  39. *Nettles D.L., Elder S.H., Gilbert J.A.* Potential Use of Chitosan as a Cell Scaffold Material for Cartilage Tissue Engineering // *Tissue Eng.* 2002. V. 8. № 6. P. 1009–1016.  
<https://doi.org/10.1089/107632702320934100>
  40. *Struszczyk M.H.* Applications of chitosan // *Polymer.* 2002. V. 47. P. 396–403.
  41. *Marsano E., Bianchi E., Vicini S. et al.* Stimuli responsive gels based on interpenetrating network of chitosan and poly(vinylpyrrolidone) // *Polymer.* 2005. V. 46. № 5. P. 1595–1600.  
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.12.017>
  42. *Sionkowska A., Skopinska-Wisniewska J., Planecka A., Kozłowska J.* The influence of UV irradiation on the properties of chitosan films containing keratin // *Polymer Degradation and Stability.* 2010. V. 95. № 12. P. 2486–2491.  
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.002>
  43. *Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazykina S.M., Nakvasina M.A.* Properties of Trypsin-Based Heterogeneous Biocatalysts Immobilized on Ion-Exchange Fiber Matrices // *Pharm. Chem. J.* 2017. V. 51. № 8. P. 702–706.  
<https://doi.org/10.1007/s11094-017-1678-0>
  44. *Артюхов В.Г., Ковалева Т.А., Наквасина М.А. и др.* Биофизика. М.: Академ. Проект, 2020. 294 с. [*Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Nakvasina M.A. et al.* *Biofizika.* Moskva: Akademicheskij Proekt, 2020. 294 p. (In Russ.)]
  45. *Dose K., Risi S.* The action of U.V. light of various wavelengths on papain // *Photochem. Photobiol.* 1972. V. 15. № 1. P. 43–50.  
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1972.tb06221.x>
  46. *Novinec M., Lenardc B.* Papain-like peptidases: structure, function, and evolution // *Biomol. Concepts.* 2013. V. 4. № 3. P. 287–308.  
<https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0054>
  47. *Vernet T., Tessier D.C., Chatellier J. et al.* Structural and Functional Roles of Asparagine 175 in the Cysteine Protease Papain // *J. Biol. Chem.* 1995. 270. № 28. P. 16645–16652.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.16645>
  48. *Fernandez-Lucas J., Castaneda D., Hormigo D.* New trends for a classical enzyme: papain, a biotechnological success story in the food industry // *Trends in Food Sci. & Technol.* 2017. V. 68. P. 91–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.017>
  49. *Baughner J.F., Grossweiner L.I.* Ultraviolet inactivation of papain // *Photochem. Photobiol.* 1975. V. 22. № 5. P. 163–167.  
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1975.tb06731.x>
  50. *Sharma M., Sharma V., Panda A.K. et al.* Enteric microsphere formulations of papain for oral delivery // *Pharm. Soc. Jap.* 2011. V. 131. № 5. P. 697–709.  
<https://doi.org/10.1248/YAKUSHI.131.697>
  51. *Sharma M., Sharma V., Panda A.K., Majumdar D.K.* Development of enteric submicron particle formulation of papain for oral delivery // *Int. J. Nanomed.* 2011. V. 6. P. 2097–2111.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S23985>
  52. *Sionkowska A., Kaczmarek B., Gnatowska M., Kowalonek J.* The influence of UV-irradiation on chitosan modified by the tannic acid addition // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 2015. V. 148. P. 333–339.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.028>
  53. *Praxedes A.P.P., Silva A.J.C., Silva R.C. et al.* Effects of UV irradiation on the wettability of chitosan films containing dansyl derivatives // *J. Colloid and Interface Sci.* 2012. V. 376. № 1. P. 255–261.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.02.056>

## Chitosan and Chitosan Succinate as Photoprotectors for Papain Immobilized on Their Matrix

M. G. Holyavka<sup>a,b,#</sup>, S. M. Pankova<sup>a,c</sup>, Yu. M. Vyshkvorkina<sup>d</sup>, A. N. Lukin<sup>a</sup>, M. S. Kondratyev<sup>e</sup>, and V. G. Artyukhov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Voronezh State University, Voronezh, Russia

<sup>b</sup> Sevastopol State University, Sevastopol, Russia

<sup>c</sup> N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia

<sup>d</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

<sup>e</sup> Institute of Cell Biophysics, Russian Academie of Sciences, Pushchino, Russia

#E-mail: holyavka@rambler.ru

It has been established that UV radiation in doses of 453–6040 J/m<sup>2</sup> has an effect on the decrease in the specific activity of free papain. Adsorption immobilization on a matrix of medium-molecular weight (200 kDa), high-molecular weight (350 kDa), food (<100 kDa) chitosans and chitosan succinate promotes an increase in the stability of papain molecules with respect to UV irradiation in the dose range from 151 to 6040 J/m<sup>2</sup> compared to free enzyme. Modifications in the IR spectra of immobilized papain practically do not affect the bands caused by the protein component of the system: amide I, amide II, amide III, so it can be postulated that the chitosan and chitosan succinate matrix act as a photoprotector for immobilized papain. The results obtained can be useful for pharmacology and medicine in the development of drugs that promote accelerated healing of the skin, as well as in the selection of conditions for UV sterilization of drugs containing papain.

**Keywords:** UV-irradiation, adsorption immobilization, gel incorporation, papain, chitosan, chitosan succinate