

## Оценка влияния ионов хрома и цинка на процесс коллагенолиза в растворах методом динамического рассеяния света

© А.В. Петрова, А.В. Сидорова, И.А. Сергеева<sup>¶</sup>, Г.П. Петрова

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
119991 Москва, Россия

e-mail: av.sukneva@physics.msu.ru, <sup>¶</sup> sergeeva@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 20.12.2021 г.

В окончательной редакции 10.01.2022 г.

Принята к публикации 23.03.2022 г.

С помощью метода динамического рассеяния света получено, что скорость расщепления коллагена под воздействием бактериальной коллагеназы уменьшается почти в 4 раза при допировании молекул белка ионами  $\text{Cr}^{3+}$ , а при добавлении активатора фермента ионов  $\text{Zn}^{2+}$  увеличивается в 1.3 раза. На основании экспериментальных данных рассчитаны константы скорости реакции  $k_1$ . Обнаружено, что при дублировании молекул коллагена солью хрома он становится более устойчивым к деградации в растворах, содержащих ионы цинка, чем в растворах с добавлением ионов кальция, как было описано нами ранее в предыдущих работах.

**Ключевые слова:** коллаген I типа, бактериальная коллагеназа, хлорид хрома, хлорид цинка, метод динамического рассеяния света, коэффициент трансляционной диффузии, гидродинамический радиус, константа скорости реакции, *Clostridium histolyticum*.

DOI: 10.21883/OS.2022.06.52624.23-22

### Введение

Исследование процесса взаимодействия белка коллагена и фермента коллагеназы представляет большой интерес для современной науки, так как изучение механизма коллагенолиза лежит в основе разработки лекарственных препаратов и способов лечения различных заболеваний.

Нарушение в синтезе коллагена в организме может приводить к разрастанию коллагеновых волокон и являться причиной возникновения различных заболеваний (фиброз печени, легких, молочных желёз, контрактура Дюпюитрена и т.д.) [1–4]. Во многих случаях использование инъекционной формы коллагеназы или препаратов на ее основе может помочь в деградации обструктивного коллагена [5]. Наиболее часто используется бактериальная коллагеназа, полученная из *Clostridium histolyticum* (СНС) (возбудитель газовой гангрены) [6–8].

При некоторых заболеваниях, наоборот, бывает важным замедлить процесс деградации коллагена. Например, для лечения глаукомы часто используется коллагеновый имплант, регулирующий давление внутри глазного яблока. Для предотвращения его быстрого рассасывания используют хромовые нити, так как хром укрепляет молекулы белка и препятствует его расщеплению [9]. Также недостаточный синтез коллагена может приводить к дефициту белка в организме и способствовать возникновению таких заболеваний, как истончение и разрыв сосудов, артроз, остеохондроз и т.д. [10].

Таким образом, изучение взаимодействия коллагена и коллагеназы является важной задачей. При этом необходимо исследовать факторы, как ускоряющие этот

процесс, так и замедляющие его. Для этих целей используются различные активаторы и ингибиторы фермента, а также трехвалентные соли хрома, которые являются дубителями и стабилизаторами коллагеновых фибрилл в организме [11–14].

Хромовое дублирование молекул коллагена приводит к образованию поперечных связей („сшивок“) между молекулярными цепями белковой структуры и упрочению ее пространственной конфигурации. В результате устойчивость коллагена к воздействию ферментов повышается [15].

Методами атомно-силовой и электронной микроскопии были исследованы хромовое дублирование белка и процесс коллагенолиза [16–21]. Результаты экспериментов показали, что ионы  $\text{Cr}^{3+}$  повышают стабильность коллагенового матрикса и могут приводить к образованию молекулярных структур (белковых комплексов). Предварительные результаты исследований показали, что ионы  $\text{Cr}^{3+}$  могут вызывать агрегацию коллагеновых фибрилл и приводить к образованию его четвертичной структуры. Однако у данных методов есть существенные недостатки: для их применения используются высушенные фибриллы коллагена и необходима длительная подготовка образцов.

Эффективным спектрально-оптическим методом исследования взаимодействия молекул коллагена и коллагеназы в растворах является метод динамического рассеяния света. Он позволяет изучать броуновское движение макромолекул в растворах, определять при этом коэффициент трансляционной диффузии и гидродинамический радиус частиц или их комплексов. С помощью фотонно-

корреляционной спектроскопии может быть разработан метод мониторинга процесса расщепления белка коллагена в режиме реального времени в условиях, близких к физиологическим.

Данная методика позволит осуществлять контроль за протеканием коллагенолиза, возникающего при заболеваниях, связанных с избыточным/недостаточным содержанием коллагеновых волокон в живых организмах. Изменяя параметров среды (температура, pH и т.д.) и используя активаторы/ингибиторы или дубители, можно моделировать процессы, протекающие при различных патологиях, *in vitro*.

Ранее в наших работах [22,23] было получено, что воздействие ионов хрома на белок коллаген приводит к замедлению процесса коллагенолиза, а при добавлении к допированному коллагену активатора хлорида кальция скорость возрастает в 1.5 раза.

Поскольку бактериальная коллагеназа активируется ионами кальция и цинка, но механизм активации происходит по-разному ( $Zn^{2+}$  отвечает за активацию амидной группы фермента, а  $Ca^{2+}$  — за формирование третичной структуры молекулы [24]), то интересно получить экспериментальные данные о протекании коллагенолиза в растворах белка (при дублении солью хрома) с добавлением ионов  $Zn^{2+}$  и сравнить эти данные с полученными ранее результатами [22,23].

Основными целями данной работы являлись: исследование влияния активатора коллагеназы хлорида цинка на коллаген, заранее допированный солью трехвалентного хрома, в растворах, расчет константы скорости реакции и сравнение полученных данных.

## 1. Метод динамического рассеяния света

Метод динамического рассеяния позволяет определить коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  частиц в растворах, анализируя характерное время флуктуаций интенсивности рассеянного света [25]. Трансляционная подвижность молекул в растворах характеризуется коэффициентом  $D_t$ .

Трансляционный коэффициент диффузии частиц пропорционален скорости затухания флуктуаций интенсивности светорассеяния. Скорость затухания получается из зависящей от времени корреляционной функции интенсивности рассеянного света.

В случае полидисперсного раствора с разными размерами частиц спектр фототока представляет собой непрерывный набор (интеграл) кривых Лоренца с разной полушириной. Следовательно, чтобы найти распределение частиц по размерам (коэффициенты диффузии), необходимо решить обратную спектральную задачу в

виде интегрального уравнения с лоренцевым ядром:

$$g^{(2)}(t) = [g^{(1)}(t)]^2 + 1\xi(t), \quad (1)$$

$$g^{(1)}(t) = \int_0^\infty P(\Gamma)e^{-\Gamma t}d\Gamma, \quad (2)$$

где  $\xi(t)$  — ошибка, связанная со стохастической природой сигнала,  $P(\Gamma)$  — распределение скоростей затухания (обратные времена релаксации),  $\Gamma$  — полуширина спектра рассеянного света,  $g^{(1)}(t)$  — нормированная корреляционная функция первого порядка,  $g^{(2)}(t)$  — нормированная корреляционная функция второго порядка.

Величину  $\Gamma$  можно рассчитать следующим образом:

$$\Gamma = D_t q^2; \quad q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}; \quad D_t = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}, \quad (3)$$

где  $D_t$  — коэффициент трансляционной диффузии,  $q$  — вектор рассеяния,  $n$  — показатель преломления,  $\lambda$  — длина волны рассеянного света,  $\theta$  — угол рассеяния,  $k$  — постоянная Больцмана,  $\eta$  — динамическая вязкость растворителя,  $T$  — абсолютная температура раствора,  $R_H$  — гидродинамический радиус.

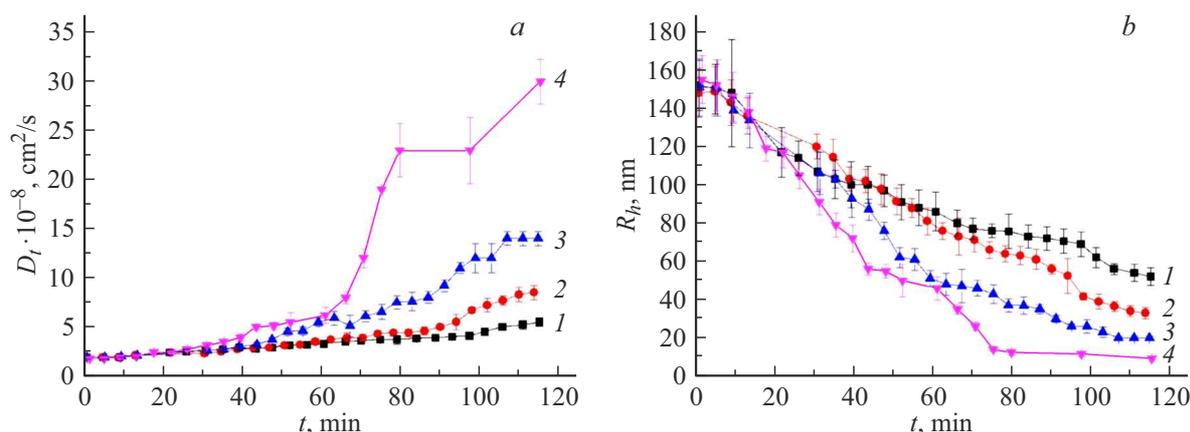
Уравнение (1), известное как уравнение Зигерта, позволяет вычислить нормированную корреляционную функцию первого порядка  $g^{(1)}(t)$  из нормированной корреляционной функции второго порядка  $g^{(2)}(t)$ , накопленной коррелятором в ходе эксперимента. Интегральное уравнение (2) составляет основу обработки данных в фотонной корреляционной спектроскопии [25].

## 2. Исследуемые образцы и их приготовление

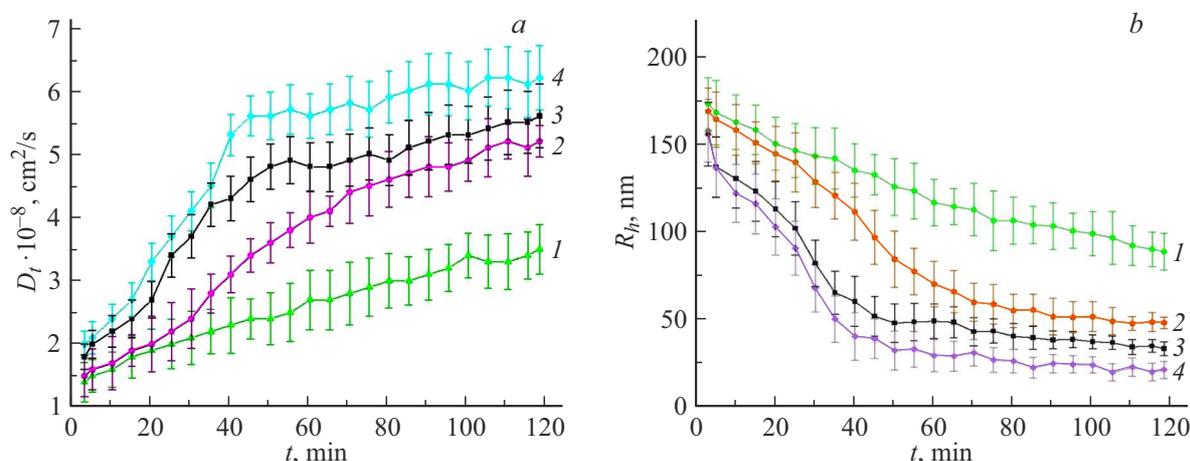
Коллаген — основной белковый элемент кожи, костей, сухожилий, хрящей, кровеносных сосудов и зубов [26]. В данной работе исследовался коллаген I типа из кожи телят, который представляет собой 0.1% (1 mg/ml) раствор коллагена в 0.1 М уксусной кислоте [27].

Разрушение коллагеновых волокон осуществляется активными формами кислорода и/или ферментативно (гидролитически). Нативный коллаген не гидролизует обычными пептидгидролазами. Основной фермент его катаболизма - коллагеназа, которая расщепляет пептидные связи в определённых участках спирализованных областей белка.

Бактериальная коллагеназа синтезируется некоторыми микроорганизмами, например, *Clostridium Histolyticum* (СНС) выделяет коллагеназу, расщепляющую пептидную цепь коллагена более чем в 200 участках. Этот фермент гидролизует следующую связь в молекулах: X-X-Гли-Про-U- между звеньями X и Гли-Про-пролин [28–30]. Образующиеся фрагменты коллагена растворимы в воде, при температуре тела они спонтанно



**Рис. 1.** Временные зависимости коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  (a) и гидродинамического радиуса  $R_h$  (b) молекул коллагена в растворах при добавлении различных концентраций коллагеназы (mg/ml): 1 — 0.1, 2 — 0.2, 3 — 0.3, 4 — 0.4 mg/ml.



**Рис. 2.** Временные зависимости изменения коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  (a) и гидродинамического радиуса  $R_h$  (b) в растворах коллагена и коллагеназы: 1 — коллаген, допированный ионами  $\text{Cr}^{3+}$ ; 2 — коллаген, допированный ионами  $\text{Cr}^{3+}$  при наличии  $\text{ZnCl}_2$ ; 3 — чистый раствор; 4 — при наличии  $\text{ZnCl}_2$ .

денатурируются и становятся доступными для действия других протеолитических ферментов.

В наших экспериментах использовался порошок коллагеназы, полученной из бактерии *Clostridium Histolyticum* типа IA [31].

В работе использовались следующие концентрации исследуемых веществ:

- концентрация коллагена 0.05 mg/ml;
- концентрация коллагеназы 0.3 mg/ml;
- хлорид цинка, хлорид хрома, хлорид натрия (ионная сила  $\mu = 10^{-3}$  mol/l).

Температура в кювете с исследуемым раствором поддерживалась на уровне  $30^\circ\text{C}$  при помощи встроенного в прибор термостата.

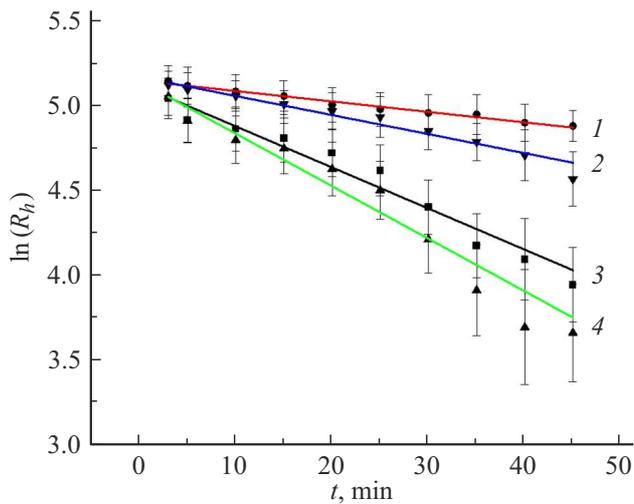
Усреднение значений, показанных на рис. 1–4, проводилось по 4–5 измерениям. Показанные разбросы значений имеют смысл стандартного отклонения от среднего.

### 3. Экспериментальные результаты

#### 3.1. Концентрационные зависимости растворов коллагена и коллагеназы

С целью подбора оптимального соотношения молекул белка и фермента для метода динамического рассеяния света были измерены концентрационные зависимости коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  (рис. 1, a) и гидродинамического радиуса  $R_h$  (рис. 1, b) в растворах коллагена при добавлении различного количества коллагеназы.

Известно, что с увеличением количества коллагеназы по отношению к коллагену скорость реакции коллагенолиза возрастает [32]. В нашей работе были подобраны следующие концентрации фермента: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/ml для отслеживания динамики процесса и последующего выбора оптимальной концентрации веществ для метода фотонно-корреляционной спектроскопии.



**Рис. 3.** Временные зависимости  $\ln R_h(t)$  в растворах коллагена и коллагеназы: 1 — коллаген, допированный ионами  $\text{Cr}^{3+}$ ; 2 — коллаген, допированный ионами  $\text{Cr}^{3+}$  при наличии  $\text{ZnCl}_2$ ; 3 — чистый раствор; 4 — при наличии  $\text{ZnCl}_2$ .

Из полученных результатов следует, что концентрация фермента в растворе влияет на скорость деградации белка (рис. 1), а именно, с увеличением количества коллагеназы в растворе растет скорость расщепления коллагена, что согласуется с полученными ранее результатами [32].

Концентрация коллагеназы 0.4 mg/ml приводит к разрушению молекул белка за 80 min (рис. 1, *b*, кривая 4), при концентрациях 0.1, 0.2 и 0.3 mg/ml в течение двух часов происходит расщепление коллагена до эффективных размеров 60, 40 и 20 nm соответственно (рис. 1, *b*, кривые 1–3).

Для проведения дальнейших экспериментов была выбрана концентрация фермента  $c = 0.3$  mg/ml, поскольку она является оптимальной для оценки кинетических зависимостей и времени протекания реакции деградации коллагена.

### 3.2. Временные зависимости $D_t$ и $R_h$ в растворах коллагена и коллагеназы при добавлении ионов $\text{Cr}^{3+}$ и $\text{Zn}^{2+}$

С помощью метода динамического рассеяния света были получены временные зависимости изменения коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  (рис. 2, *a*) и гидродинамического радиуса  $R_h$  (рис. 2, *b*) в растворах коллагена и коллагеназы при добавлении солей  $\text{CrCl}_3$  и  $\text{ZnCl}_2$ .

На основании экспериментальных данных (рис. 2) выявлено, что при добавлении активатора хлорида цинка (кривая 4) происходит ускорение реакции коллагенолиза, а при добавлении ионов трехвалентного хрома (кривая 1) — замедление реакции по сравнению с чистым раствором коллагена и коллагеназы (кривая 3).

Значения констант скорости  $k_1$  для исследуемых растворов

	Раствор	$k_1, \text{min}^{-1}$
1	$\text{Col}_{\text{Cr}}$ + коллагеназа	$0.006 \pm 0.001$
2	$\text{Col}_{\text{Cr}}$ + коллагеназа + $\text{ZnCl}_2$	$0.008 \pm 0.001$
3	Коллаген + коллагеназа	$0.023 \pm 0.002$
4	Коллаген + коллагеназа + $\text{ZnCl}_2$	$0.051 \pm 0.002$

При добавлении активатора хлорида цинка к коллагену (после дублирования ионами  $\text{Cr}^{3+}$ ) (кривая 2) процесс расщепления белка ускоряется по сравнению с раствором, не содержащим активатора (кривая 1), однако значения  $D_t$  и  $R_h$ , наблюдаемые в чистом растворе коллагена и коллагеназы, все равно не достигаются.

Для более наглядной оценки процесса были рассчитаны константы скорости реакций  $k_1$  для первых 45 min реакции на основании полученных данных [33].

Полученные значения  $k_1$  для исследуемых образцов приведены в таблице.

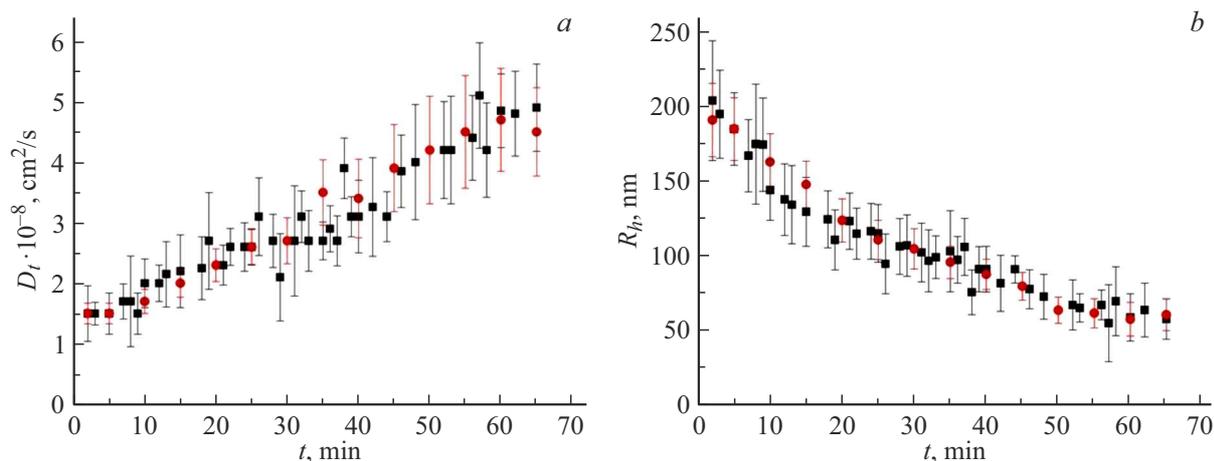
При добавлении ионов  $\text{Zn}^{2+}$  в раствор коллагена (после дублирования ионами  $\text{Cr}^{3+}$ ) и коллагеназы (рис. 3, кривая 2), скорость реакции увеличивается в 1.3 раза в сравнении с раствором без добавления активатора (рис. 3, кривая 1). Однако скорость реакции уменьшается в 2.9 раз в сравнении с чистым раствором коллагена и коллагеназы (рис. 3, кривая 3).

Аналогичные измерения были проведены в работе [23] при наличии активатора хлорида кальция. Из сравнения с предыдущими результатами следует, что при добавлении ионов кальция в раствор коллагена (после дублирования ионами хрома) реакции протекает несколько быстрее ( $k_1 = 0.009 \text{ min}^{-1}$ ), чем при добавлении ионов цинка ( $k_1 = 0.008 \text{ min}^{-1}$ ). Таким образом, коллаген, допированный солью  $\text{CrCl}_3$ , более устойчив к деградации в растворах, содержащих ионы цинка, чем в растворах с добавлением ионов кальция [23].

### 3.3. Влияние ионов $\text{Cl}^-$ на процесс коллагенолиза в растворах

Поскольку в наших исследованиях используются в основном хлориды различных металлов, то для оценки влияния ионов  $\text{Cl}^-$  на процесс расщепления коллагена были измерены временные зависимости  $D_t$  (рис. 4, *a*) и  $R_h$  (рис. 4, *b*) для растворов коллагена и коллагеназы с добавлением хлорида натрия.

Как видно из полученных графиков (рис. 4), зависимости для  $D_t$  и  $R_h$  в растворах, содержащих соль  $\text{NaCl}$ , идентичны зависимостям для чистых растворов коллагена и коллагеназы. Из этого следует, что ионы  $\text{Cl}^-$  не оказывают значительного влияния на исследуемый процесс, что позволяет использовать хлориды в экспериментах.



**Рис. 4.** Временные зависимости коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  (а) и гидродинамического радиуса  $R_h$  (б) для растворов коллагена и коллагеназы — чистого и с добавлением NaCl.

## Заключение

Проведенное исследование процесса коллагенолиза позволило определить концентрацию фермента, оптимальную для оценки кинетических зависимостей, равную 0.3 mg/ml.

Обнаружено, что при добавлении активатора хлорида цинка в растворы коллагена и коллагеназы процесс расщепления белка ускоряется в меньшей степени, чем при наличии хлорида кальция — как в чистых растворах, так и в растворах, содержащих ионы хрома. При добавлении активаторов хлорида цинка и хлорида кальция в растворы коллагена, допированного солью хрома, белок менее подвержен деградации по сравнению с коллагеном без дубления [23].

Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для разработки методики мониторинга процесса коллагенолиза в режиме реального времени с помощью фотонно-корреляционной спектроскопии.

## Благодарности

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета „Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина“.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] R. Bauer, J.J. Wilson, S.T.L. Philominathan, D. Davis. *J. Bacteriol.* **195** (2), 318–327 (2013).
- [2] P. Schlage, T. Kockmann, J.N. Kizhakkedathu. *Proteomics*, **15** (14), 2491–2502 (2015).
- [3] J. Nanchahal, K.S. Midwood, inventors; Isis Innovation Limited, assignee. Treatment for dupuytren’s disease. United States patent US 9138458 B2. 2015 Sep. 22.
- [4] T.C. Peak, G.C. Mitchell, F.A. Yafi, W.J. Hellstrom. *Biologics*, **9**, 107–116 (2015).
- [5] J.J. Wilson, O. Matsushita, A. Okabe, J. Sakon. *EMBO J.*, **22** (8), 1743–1752 (2003). DOI: 10.1093/emboj/cdg172
- [6] S. Müller-Herrmann, T. Scheibel. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **1** (4), 247–259 (2015).
- [7] N. Nezafat, M. Negahdaripour, A. Gholami, Y. Ghasemi. *Trends Pharm. Sci.*, **1** (4), 213–222 (2015).
- [8] H. Alipour, A. Raz. *Asian Pacific J. Tropical Biomedicine*, **6** (11), 975–981 2016.
- [9] M.T. Wevill, D. Meyer, E.V. Aswegen. *J. Eye*, **19**, 549–554 (2005).
- [10] S.N. Deshmukh, A.M. Dive, R. Moharil. *J. Oral. Maxillofac Pathol.*, **20** (2), 276–283 (2016).
- [11] A.S. Adhikari, E. Glassey, A.R. Dunn. *J. Am. Chem. Soc.*, **134** (32), 13143–13144 (2002).
- [12] Y. Zhang. *Biopolymers*, **111** (11), 2020.
- [13] Y. Zhang. *International J. Biological Macromolecules*, **126**, 123–129 (2019).
- [14] B. Wu, C. Mu, G. Zhang, W. Lin. *Langmuir*, **25**, (2009).
- [15] A.H. Agudaa, P. Panwara, X. Dub. *PNAS*, **111** (49), 17474–17479 (2014).
- [16] F.P. Matthew, A.C. Lin, M.C. Goh. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **50**, 1–10 (2002).
- [17] X. Zheng, H. Pan, Z. Wang, H. Chen. *J. Microsc.*, **241** (2), 162–170 (2011). Doi: 10.1111/j.1365-2818.2010.03412.x
- [18] Y. Zhang, M. Mehta, B.V. Mansel, Y. Liu *Biopolymers*, **111**, e23406 (2020).
- [19] Y. Zhang. *International J. Biological Macromolecules*, **126**, 123–129 (2019).
- [20] C. Ma, Y. Hou, S. Liu, G. Zhang. *Langmuir*, **25**, 9467–9472 (2009).
- [21] J.J. Wilson. *EMBO J.*, **22** (8), 1743–1752 (2003).
- [22] A.V. Petrova, I.A. Sergeeva, G.P. Petrova, A.V. Mitrofanova. *J. Biomedical Photonics & Engineering*, **7** (2), 020305-1-6 (2021).

- [23] A.V. Petrova, I.A. Sergeeva, G.P. Petrova, A.V. Mitrofanova. Moscow University Physics Bulletin, **75** (6), 610–615 (2021).
- [24] U. Eckhard, E. Schönauer, D. Nuss, H. Brandstetter. Nat. Struct. Mol. Biol., **18** (10), 1109–1115 (2011). DOI: 10.1038/nsmb.2127
- [25] G.Z. Kammins, E. R. Paik. Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy (Plenum, New York, 1974).
- [26] R. Ritchie, W. Yang, M. Meyers. Progress in Materials Sci. **103**, 425–483 (2019).
- [27] Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/C8919/>
- [28] N. Ohbayashi, N. Yamagata, M. Goto, K. Watanabe. Enhancement of the Structural Stability of Full-Length Clostridial Collagenase by Calcium Ions, 2012.
- [29] C. Chauvierre, M.C. Marden. Biomaterials, **25**, 3081 (2004).
- [30] N. Ohbayashi. Biophysical J., **104**, 1536–1545, (2013).
- [31] Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/C9891/>
- [32] I. Metzmacher, F. Radu, M. Bause, P. Knabner, W. Friess. European J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **67**, 340–360 (2007).
- [33] P. Atkins, J. Paula. *Physical Chemistry 8th ed.* (W.H. Freeman and Company, New York, 2006).