



## Оригинальные статьи

Научная статья

УДК 577.325:602.1

<https://doi.org/10.17308/kcmf.2022.24/10556>

## Исследование протеолитической активности ассоциатов фицина с наночастицами хитозана

С. С. Ольшанникова<sup>1</sup>, Ю. А. Редько<sup>1</sup>, М. С. Лавлинская<sup>1,2</sup>, А. В. Сорокин<sup>1,2</sup>, М. Г. Холявка<sup>1,2</sup>✉, Н. Е. Юдин<sup>1</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет,  
Университетская пл., 1, Воронеж 394018, Российская Федерация

<sup>2</sup>Севастопольский государственный университет,  
ул. Университетская, 33, Севастополь 299053, Российская Федерация

### Аннотация

Работа направлена на разработку и исследование биокатализаторов на основе ассоциатов фицина с наночастицами хитозана. Получены наночастицы среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов без и с добавлением аскорбиновой кислоты.

Дзета-потенциал всех типов наночастиц составил 0 мВ. Ассоциаты фицина и наночастиц хитозана, сформированные с добавлением аскорбиновой кислоты, показали более высокие значения протеолитической активности. При определении стабильности ассоциатов наночастиц хитозана и фицина выявлялось снижение протеолитической активности образцов в течение семи суток. Установлено, что наночастицы средне- и высокомолекулярного хитозанов, полученные в присутствии аскорбиновой кислоты, существенно отличаются по размерам от наночастиц, созданных без аскорбиновой кислоты.

Предлагаемые нами биокатализаторы обладают высокими перспективами для использования в области косметологии, биомедицина и фармации.

**Ключевые слова:** наночастицы, фицин, хитозан, ассоциирование

**Источник финансирования:** работа выполнена при поддержке программы Приоритет-2030 Севастопольского государственного университета, стратегический проект № 3 (получение наночастиц хитозана), и Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020–2022 годы, проект № FZGU-2020-0044 (комплексобразование наночастиц с ферментом)

**Для цитирования:** Ольшанникова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Холявка М. Г., Юдин Н. Е., Артюхов В. Г. Исследование протеолитической активности ассоциатов фицина с наночастицами хитозана. *Конденсированные среды и межфазные границы*. 2022;24(4): 523–528. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2022.24/10556>

**For citation:** Olshannikova S. S., Redko Yu. A., Lavlinskaya M. S., Sorokin A. V., Holyavka M. G., Yudin N. E., Artyukhov V. G. Study of the proteolytic activity of ficin associates with chitosan nanoparticles. *Condensed Matter and Interphases*. 2022;24(4): 523–528. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2022.24/10556>

✉ Холявка Марина Геннадьевна, e-mail: [holyavka@rambler.ru](mailto:holyavka@rambler.ru)

© Ольшанникова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Холявка М. Г., Юдин Н. Е., Артюхов В. Г., 2022



## 1. Введение

В последнее время наночастицы, представляющие собой высокодисперсные материалы с размерами менее 100 нм, приобрели огромное значение в современной медицине. Их применение варьирует от контрастных веществ для визуализации до носителей для доставки генов и биологически активных веществ в целевые клетки. Эти уникальные наноматериалы обладают рядом свойств, обусловленных их размерами и отличающих их от макроматериалов аналогичного состава. Среди этих свойств можно выделить высокую реакционную способность, поглощение энергии электромагнитного излучения, а также повышенную биологическую подвижность [1–3].

Наночастицы также называют «нульмерными» наноматериалами. Это определение возникло из-за того, что сумма измерений их размеров находится в наномасштабе, что отличает их от одномерных и двумерных наноматериалов (нанопроволоки, нанотрубки, самособирающиеся монослойные пленки и др.), которые имеют одно или два измерения, выходящих за пределы понятия нано- [4].

Преимущества наночастиц для современной медицины многочисленны. Среди них особое место занимают структурная стабильность и обеспечение защиты биологически активного вещества от деструкции в среде организма, дезактивации и клиренса, тем самым создается возможность для поддержания требуемых терапевтических концентраций веществ [5–7]. Кроме того, в процессе получения наночастиц можно добиться их желаемого распределения по размерам и поверхностному заряду. Кинетика высвобождения биологически активных веществ из комплексов с наночастицами является контролируемой и происходит путем диффузии, набухания или деструкции полимера, или комбинации этих процессов в зависимости от типа полимера, используемого для получения матриц-носителей [8]. Таким образом, наночастицы – перспективные материалы для современной медицины, а одним из многообещающих полисахаридов для их получения, сочетающим в себе различные механизмы высвобождения лекарственных препаратов, является хитозан – модифицированный природный полиамино-β-гликозид. Помимо способности к биодеструкции и отсутствию иммунного ответа на его присутствие, хитозан характеризуется антибактериальной активностью, обусловленной наличием свободных первичных аминогрупп [9–10], и высокой мукоадгезивностью [11].

Протеазы являются одними из первых ферментов, используемых человеком в биотехнологической обработке пищевых продуктов. В настоящее время протеазы применяются во многих областях производства, например, кожевенной, пищевой и фармацевтической промышленности, а также в медицине. Среди наиболее часто используемых протеаз растительного происхождения стоит отметить фицин.

Фицин (КФ 3.4.22.3) – протеолитический энзим, выделяемый из млечного сока представителей рода *Ficus*. Имеет мономерную структуру, состоящую из одной полипептидной цепи массой 25–26 кДа. Является представителем цистеиновых папаиноподобных протеаз, характеризуется широкой субстратной специфичностью, максимум каталитической активности достигается в диапазоне pH от 6.5 до 9.5 [12–16]. Фицин обладает антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Кроме того, известны его противовоспалительные, антигельминтные, антитромботические и фибринолитические, отбеливающие свойства, обладает противораковой активностью и иммуномодулирующими эффектами [17–19].

Однако использование растворов нативных протеаз ограничено их низкой стабильностью и автолизом, приводящим к потере практически ценных свойств энзимов. Одним из способов их сохранения является получение гибридных ферментных препаратов с использованием носителей-наночастиц [20].

В связи с вышесказанным, цель настоящей работы – исследование каталитической (протеолитической) активности ассоциатов фицина с наночастицами хитозана.

## 2. Экспериментальная часть

Объектом исследования в работе являлся фицин, субстратом для гидролиза был выбран азоказеин (оба – производства Sigma, США). Наночастицы получали из среднемoleкулярного (СМ, 200 кДа) и высокомолекулярного (ВМ, 350 кДа) хитозанов (ЗАО «Биопрогресс», Россия).

Хитозановые наночастицы с добавлением и без добавления аскорбиновой кислоты и их ассоциаты с фицином получали согласно методике, описанной в [20–22].

Протеазную активность полученных препаратов измеряли по известной методике, представленной в [24]. Реакцию осуществляли с раствором азоказеина в концентрации 0.5 % в 50 мМ трис-НСl буфере, pH 7.5 в течение 2 часов при 37 °С. За единицу каталитической активно-

сти принимали количество фицина (в мг белка), которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

Для определения размеров и поверхностных зарядов наночастиц и их ассоциатов с фицином использовали установку Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments, США), оснащенную He/Ne-лазером мощностью 4 мВт с  $\lambda = 632.8$  нм, угол рассеяния составлял  $173^\circ$ .

### 3. Результаты и их обсуждение

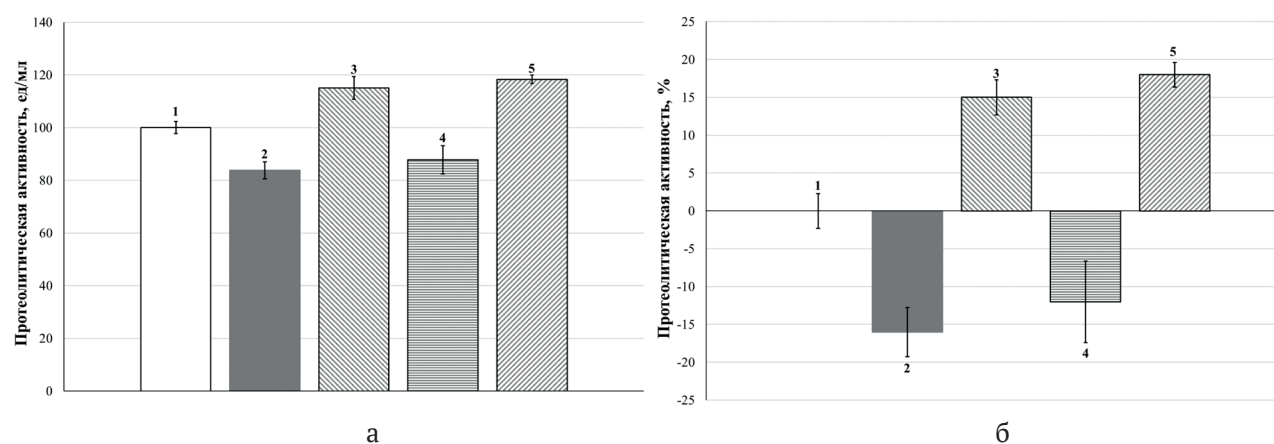
В первой серии экспериментов мы определили размеры и дзета-потенциал наночастиц хитозана. Параметры наночастиц представлены в табл. 1. Отчетливо видно, что наночастицы средне- и высокомолекулярного хитозанов, полученных в присутствии аскорбиновой кислоты, существенно отличаются по размерам от наночастиц, сформированных без аскорбиновой кислоты. Медианное значение дзета-потенциала всех типов наночастиц составило 0 мВ.

При ассоциировании фицина с наночастицами средне- и высокомолекулярного хитозанов, полученными без добавления аскорбиновой кислоты, активность ассоциированных препаратов составляла 84 и 88 % соответственно от тех же значений для нативного фермента. При образовании ассоциатов фицина с наночастицами, сформированными в присутствии аскорбиновой кислоты, его каталитическая способность увеличилась на 15 % для среднемолекулярного хитозана и 18 % для высокомолекулярного хитозана (рис. 1). Более высокому проценту сохранения активности фермента в комплексе с наночастицами хитозана, полученными в присутствии аскорбиновой кислоты, вероятно, способствуют протекторные, в том числе антиоксидантные, функции этой кислоты по отношению к биокатализатору [25, 26].

В ходе выполнения экспериментов по определению остаточной активности фицина при  $37^\circ\text{C}$  в 0.05 М трис-НСI буфере с pH 7.5 свободно-го и ассоциированного с наночастицами средне-

**Таблица 1.** Параметры наночастиц средне- и высокомолекулярного хитозанов

Наночастицы хитозана	Средний размер, нм	Диапазон размеров, нм	Медианное значение дзета-потенциала, мВ	Диапазон дзета-потенциалов, мВ
среднемолекулярного	12	7–21	0	0
среднемолекулярного с аскорбиновой кислотой	21	14–59	0	0
высокомолекулярного	33	18–79	0	0
высокомолекулярного с аскорбиновой кислотой	38	28–79	0	0



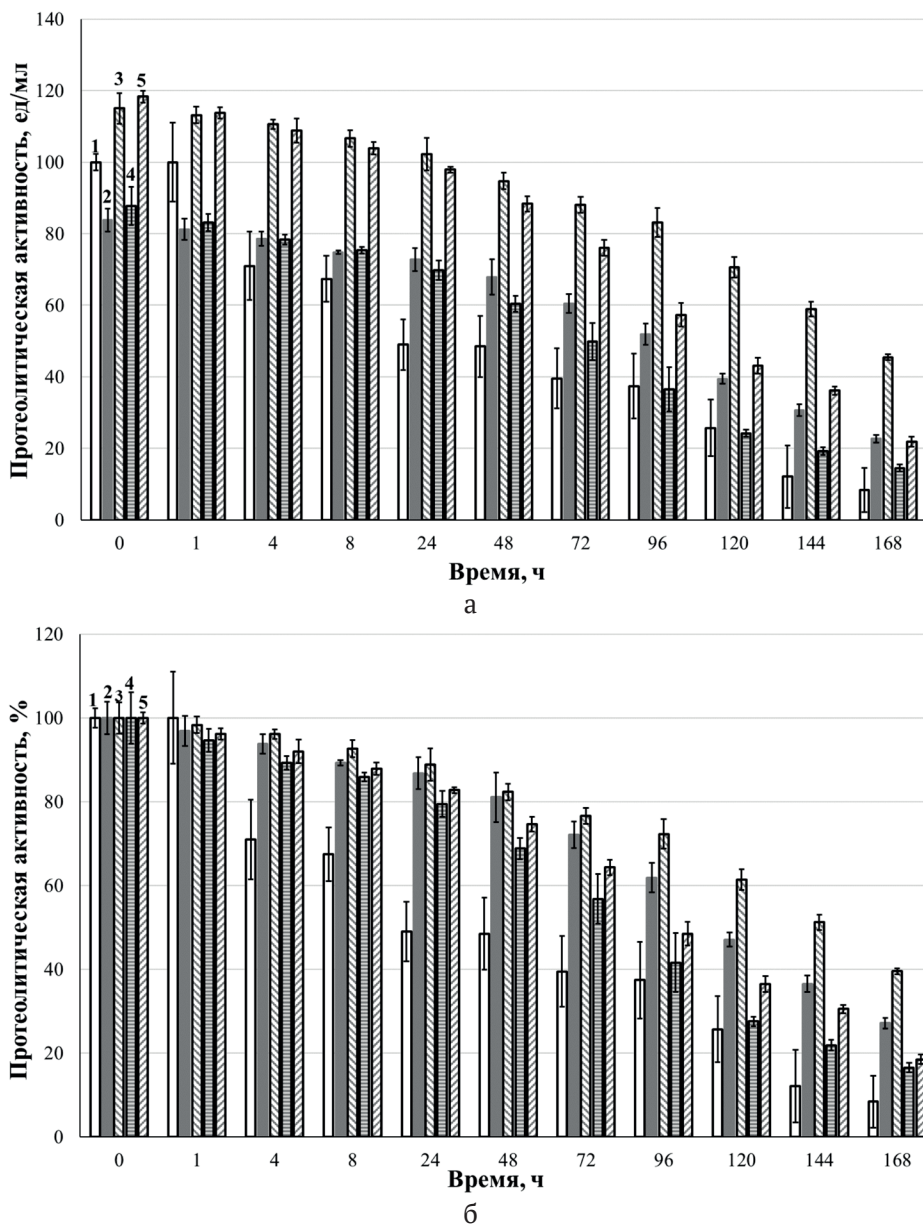
**Рис. 1.** Каталитическая активность фицина, ед/мл (а) и ее изменение, % (б): растворимый фицин (1); фицин, ассоциированный с наночастицами среднемолекулярного хитозана (2); фицин с наночастицами среднемолекулярного хитозана, полученными с добавлением аскорбиновой кислоты (3); фицин, ассоциированный с наночастицами высокомолекулярного хитозана (4); фицин с наночастицами высокомолекулярного хитозана, полученными с добавлением аскорбиновой кислоты (5). За 100 % принята активность свободного фицина при оптимальных условиях гидролиза

и высокомолекулярного хитозанов, полученными без и с добавлением аскорбиновой кислоты, в течение 7 дней происходило снижение активности всех испытуемых образцов.

Раствор нативного фицина после инкубации продолжительностью 168 часов сохранял 8 % от своей начальной каталитической активности, его ассоциаты с наночастицами средне- и высокомолекулярного хитозанов, полученными без

добавления аскорбиновой кислоты, проявляли соответственно 27 и 16 % своей способности гидролизовать азоказеин, в то время как ассоциаты с наночастицами средне- и высокомолекулярного хитозанов, созданными с добавлением аскорбиновой кислоты, сохраняли соответственно 39 и 18 % их протеолитической активности (рис. 2).

Ассоциаты фицина и наночастиц обоих типов хитозана, созданных как без, так и с добавлени-



**Рис. 2.** Остаточная каталитическая активность фицина после инкубации образцов при 37 °С (а – в ед/мл раствора или суспензии, б – в % от первоначального уровня): 1 – свободный фицин; 2 – фицин, ассоциированный с наночастицами среднемолекулярного хитозана; 3 – фицин, ассоциированный с наночастицами среднемолекулярного хитозана, полученными с добавлением аскорбиновой кислоты; 4 – фицин, ассоциированный с наночастицами высокомолекулярного хитозана; 5 – фицин, ассоциированный с наночастицами высокомолекулярного хитозана, полученными с добавлением аскорбиновой кислоты. За 100 % принята ферментативная активность непосредственно полученных образцов в оптимальных условиях

ем аскорбиновой кислоты, были более стабильны, чем свободный фермент, начиная с 4 часов инкубации при 37 °С в 0.05 М трис-НСl буфере с рН 7.5.

#### 4. Заключение

Таким образом, в ходе проделанной работы нам удалось получить наночастицы среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозана без и с добавлением аскорбиновой кислоты. Ассоциаты фицина и наночастиц хитозана, сформированных с добавлением аскорбиновой кислоты, показали более высокие значения протеолитической активности. При определении стабильности ассоциатов наночастиц хитозана и фицина выявлялось снижение протеолитической активности образцов в течение семи суток.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

#### Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации

#### Список литературы

- Murthy S. K. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *International Journal of Nanomedicine*. 2007;2(2): 129–141. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2673971/>
- Parak W. J., Gerion D., Pellegrino T., Zanchet D., Micheel C., Williams C. S., Boudreau R., Le Gros M. A., Larabell C. A., Alivisatos A. P. Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*. 2003;14: R15–R27. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/14/7/201>
- Pankhurst Q. A., Connolly J., Jones S. K., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics Series D: Applied Physics*. 2003;36: R167–R181. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/36/13/201>
- Whitesides G. M. The ‘right’ size in Nanobiotechnology. *Nature Biotechnology*. 2003;21: 1161–1165. <https://doi.org/10.1038/nbt872>
- Xiong M.-H., Bao Y., Yang X.-Zh., Zhu Ya.-H., Wang J. Delivery of antibiotics with polymeric particles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014;78: 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.02.002>
- Danhier F., Ansorenav E., Silva J. M., Coco R., Le Breton A., Préat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2): 505–522. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>
- Egebro Birk S., Boisen A., Hagner Nielsen L. Polymeric nano- and microparticulate drug delivery systems for treatment of biofilms. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;174: 30–52. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.005>
- Misra R., Acharya S., Dilnawaz F., Sahoo S. K. Sustained antibacterial activity of doxycycline-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(ε-caprolactone) nanoparticles. *Nanomedicine*. 2009;4(5): 519–530. <https://doi.org/10.2217/nnm.09.28>
- Cheung R., Ng T., Wong J., Chan W. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Marine Drugs*. 2015;13: 5156–5186. <https://doi.org/10.3390/md13085156>
- Osman R., Kan P. L., Awad G., Mortada N., El-Shamy A. E., Alpar O. Spray dried inhalable ciprofloxacin powder with improved aerosolisation and antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;449: 44–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.009>
- Lehr C. M., Bouwstra J. A., Schacht E. H., Junginger H. E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1992;78: 43–48. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90353-4](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90353-4)
- Siar E.-H., Arana-Peña S., Barbosa O., Zidoune M. N., Fernandez-Lafuente R. Immobilization/stabilization of ficin extract on glutaraldehyde-activated agarose beads. Variables that control the final stability and activity in protein hydrolyses. *Catalysts*. 2018;8: 149. <https://doi.org/10.3390/catal8040149>
- Olshannikova S., Koroleva V., Holyavka M., Pashkov A., Artyukhov V. Covalent immobilization of thiol proteinases on chitosan. *Chemistry Proceedings*. 2020;2(1):7. <https://doi.org/10.3390/ECCS2020-07527>
- Silva-López R. E., Gonçalves R. N. Therapeutic proteases from plants: biopharmaceuticals with multiple applications. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*. 2019;6(2): 101–109. <https://doi.org/10.15406/jabb.2019.06.00180>
- Hu R., Chen G., Li Y. Production and characterization of antioxidative hydrolysates and peptides from corn gluten meal using papain, ficin, and bromelain. *Molecules*. 2020;25(18): 4091. <https://doi.org/10.3390/molecules25184091>
- Holyavka M., Pankova S., Koroleva V., Vyshkvorkina Yu., Lukin A., Kondratyev M., Artyukhov V. Influence of UV radiation on molecular structure and catalytic activity of free and immobilized bromelain, ficin and papain. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019;201: 111681. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111681>
- Ribeiro J. S., Barboza A. d. S., Cuevas-Suárez C. E., Silva A. F., Piva E., Lund R. G. Novel in-office peroxide-free tooth-whitening gels: bleaching effectiveness,

enamel surface alterations, and cell viability. *Scientific Reports*. 2020;10: 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66733-z>

18. Aider M. Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates. *JDS Communications*. 2021;2(5): 233–237. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2020-0073>

19. Morellon-Sterling R., El-Siara H., Tavano O. L., Berenguer-Murcia A., Fernández-Lafuente R. Ficin: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;162: 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.144>

20. Szeto Y. S., Hu Z. *Method for preparing chitosan nano-particles*. Patent No US2008/0234471 A1. Publication Date: 25.09.2008.

21. Ol'shannikova S. S., Red'ko Y. A., Lavlinskaya, M. S. Sorokin A. V., Holyvka M. G., Artyukhov V. G. Preparation of papain complexes with chitosan microparticles and evaluation of their stability using the enzyme activity level. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;55: 1240–1244. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02564-8>

22. Королева В. А., Холявка М. Г., Олшанникова С. С., Артюхов В. Г. Разработка методики получения комплексов фицина с наночастицами хитозана с высоким уровнем протеолитической активности. *Биофармацевтический журнал*. 2018;10(4): 36–40. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=36834674>

23. García-Carreño F. L. The digestive proteases of langostilla (pleuroncodes planipes, decapoda): their partial characterization, and the effect of feed on their composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 1992;103: 575–578. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(92\)90373-Y](https://doi.org/10.1016/0305-0491(92)90373-Y)

24. Sabirova A. R., Rudakova N. L., Balaban N. P., Ilyinskaya O. N., Demidyuk I. V., Kostrov S. V., Rudenskaya G. N., Sharipova M. R. A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius*. *FEBS Lett*. 2010;584 (21): 4419–4425. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.049>

25. Burri B., Jacob R. Human metabolism and the requirement for vitamin C. In: *Vitamin C in health and disease*. Packer L., Fuchs J. (eds.). New York: Marcel Dekker Inc., 1997; 25–58.

26. Arrigoni O., De Tullio M. C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002;1569: 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(01\)00235-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(01)00235-5)

### Сведения об авторах

Олшанникова Светлана Сергеевна, аспирант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета (Воронеж, Российская Федерация).

<https://orcid.org/0000-0003-3381-2008>  
olshannikovas@gmail.com

Редько Юлия Александровна, бакалавр кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета (Воронеж, Российская Федерация).

redkoju@yandex.ru

Лавлинская Мария Сергеевна, к. х. н., с. н. с. кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета (Воронеж, Российская Федерация); с. н. с. НИЛ «Биоресурсный потенциал приморской территории» Севастопольского государственного университета (Севастополь, Российская Федерация).

<https://orcid.org/0000-0001-9058-027X>  
maria.lavlinskaya@gmail.com

Сорокин Андрей Викторович, аспирант кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, м. н. с. кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета (Воронеж, Российская Федерация); м. н. с. НИЛ «Биоресурсный потенциал приморской территории» Севастопольского государственного университета (Севастополь, Российская Федерация).

<https://orcid.org/0000-0001-5268-9557>  
andrew.v.sorokin@gmail.com

Холявка Марина Геннадьевна, д. б. н., доцент, профессор кафедры биофизики и биотехнологии, с. н. с. кафедры биохимии и физиологии клетки Воронежского государственного университета (Воронеж, Российская Федерация); профессор кафедры «Физика»; вед. н. с. центра коллективного пользования «Молекулярная структура вещества» Севастопольского государственного университета (Севастополь, Российская Федерация).

<https://orcid.org/0000-0002-1390-4119>  
holyvka@rambler.ru

Юдин Николай Евгеньевич, магистрант 1 года обучения кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии Воронежского государственного университета (Воронеж, Российская Федерация).

<https://orcid.org/0000-0001-5667-0319>  
koli4ka99@mail.ru

Артюхов Валерий Григорьевич, д. б. н., профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии, с. н. с. кафедры биохимии и физиологии клетки Воронежского государственного университета (Воронеж, Российская Федерация).

artyukhov@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 06.05.2022; одобрена после рецензирования 30.06.2022; принята к публикации 15.09.2022; опубликована онлайн 25.12.2022.