

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.478.3

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13289

### Структурно-функциональные свойства трипсина в условиях иммобилизации на поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилате

Анастасия Николаевна Дубовицкая<sup>1</sup>, Марина Геннадьевна Холявка<sup>1,2</sup>✉,  
Мария Сергеевна Лавлинская<sup>1</sup>, Андрей Викторович Сорокин<sup>1</sup>,  
Максим Сергеевич Кондратьев<sup>1,3</sup>, Анатолий Николаевич Лукин<sup>1</sup>,  
Валерий Григорьевич Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж, Российская Федерация, holyavka@rambler.ru✉

<sup>2</sup>Севастопольский государственный университет, Севастополь, Российская Федерация

<sup>3</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Российская Федерация

**Аннотация.** Изучены структурно-функциональные свойства трипсина при его иммобилизации на поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилате (пДМАЭМА). Трипсин, относящийся к группе сериновых протеаз, играет ключевую роль во многих биологических процессах и применяется в различных отраслях, таких как биотехнология и медицина. Несмотря на свою распространенность, трипсин имеет ряд недостатков, среди которых – нестабильность и невозможность повторного использования, что снижает общую эффективность процессов и сокращает сроки хранения препаратов. Способом решения названных проблем является иммобилизация ферментов, которая позволяет повысить их стабильность, увеличить время полужизни и продлить срок службы. В данной работе объектом исследования стал трипсин, который был иммобилизован на пДМАЭМА — слабокатионном полиэлектролите, обладающем уникальными свойствами, такими как переход из гидрофильного состояния в гидрофобное под воздействием внешних стимулов, например, температуры и pH. Процесс синтеза пДМАЭМА включал использование *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата и *N,N*-диметилформамида, которые предварительно очищались вакуумной дистилляцией. Реакция проходила при 60 °С в течение пяти часов с добавлением инициатора азо-бис-изобутиронитрила. Полученный полимер выделялся лиофилизацией до постоянной массы образца. Иммобилизация трипсина происходила в два этапа: подготовка раствора трипсина в буферном растворе полимера с добавлением цистеина и инкубация полученного раствора с раствором резорцина при температуре 50 °С. Процесс завершался полным высушиванием препарата. Для изучения характеристик иммобилизованного трипсина использовались различные методы, включая измерение каталитической активности, ИК-спектроскопию и молекулярный докинг. Результаты показали, что иммобилизация трипсина на пДМАЭМА повышает его каталитическую активность в ~1.5 раза, что связано с формированием определенного микроокружения и улучшением условий для протекания реакций. Анализ ИК-спектров подтвердил наличие водородных связей и гидрофобных взаимодействий между трипсином и пДМАЭМА, что свидетельствует о важности данных типов физико-химических взаимодействий в процессе иммобилизации. Молекулярный докинг позволил выявить ключевые аминокислоты, участвующие в формировании комплекса, и подтвердить наличие солевых мостиков. Таким образом, данная работа демонстрирует потенциал использования пДМАЭМА в качестве носителя для иммобилизации трипсина, что открывает новые возможности для применения этого комплекса в биотехнологии и медицине.

**Ключевые слова:** ферменты, стимул-чувствительные полимеры, иммобилизация, поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилат, протеазы

**Благодарности:** работа выполнена в рамках госзадания «Фотобиофизический мониторинг окружающей среды на основе спектрально-флуоресцентных свойств структурно-организованных молекулярных (включая наночастицы) и супрамолекулярных биологически важных систем (FEFM-2023-0005).

Авторы признательны д.х.н., проф. В.Ф. Селеменеву за неоценимую помощь в интерпретации данных ИК-спектроскопии и конструктивные замечания, которые оказали существенное влияние на качество данной работы.

**Для цитирования:** Дубовицкая А.Н., Холявка М.Г., Лавлинская М.С., Сорокин А.В., Кондратьев М.С., Лукин А.Н., Артюхов В.Г. Структурно-функциональные свойства трипсина в условиях иммобилизации на поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилате // Сорбционные и хроматографические процессы. 2025. Т. 25, № 4. С. 613-624. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13289>

Original article

## Structural and functional properties of trypsin under conditions of immobilization on poly-*N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate

Anastasya N. Dubovitskaya<sup>1</sup>, Marina G. Holyavka<sup>1,2✉</sup>, Maria S. Lavlinskaya<sup>1</sup>, Andrey V. Sorokin<sup>1</sup>, Maxim S. Kondratiev<sup>1,3</sup>, Anatoliy N. Lukin<sup>1</sup>, Valeriy G. Artyukhov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, holyavka@rambler.ru ✉

<sup>2</sup>Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

<sup>3</sup>Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Moscow region, Pushchino, Russian Federation

**Abstract.** The structural and functional properties of trypsin have been studied upon its immobilization on poly-*N,N*-dimethylaminoethylmethacrylate (pDMAEMA). Trypsin, which belongs to the group of serine proteases, plays a key role in many biological processes and is used in various industries such as biotechnology and medicine. Despite its widespread use, trypsin has a number of disadvantages, including instability and inability to be reused, which reduces the overall efficiency of processes and shortens the shelf life of preparations. A way of solving the above mentioned problems is to immobilize enzymes to increase their stability, half-life and shelf life. In this work, the object of study was trypsin, which was immobilized on pDMAEMA, a weak cationic polyelectrolyte with unique properties, such as the transition from hydrophilic to hydrophobic state under the influence of external stimuli, such as temperature and pH. The process of synthesizing pDMAEMA involved the use of *N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate and *N,N*-dimethylformamide, which were pre-purified by vacuum distillation. The reaction was carried out at 60 °C for five hours with the addition of the initiator azo-bis-isobutyronitrile. The resulting polymer was isolated by lyophilization to constant sample weight. Trypsin immobilization was carried out in two steps: preparation of trypsin solution in polymer buffer solution with addition of cysteine and incubation of the obtained solution with resorcinol solution at 50 °C. The process was completed by full drying of the prepared drug. Various methods including catalytic activity measurement, IR spectroscopy and molecular docking were used to study the characteristics of immobilized trypsin. The results showed that immobilization of trypsin on PDMAEMA increased its catalytic activity by ~1.5-fold, which was attributed to the formation of a specific microenvironment and improved conditions for the reaction to proceed. Analysis of IR spectra confirmed the presence of hydrogen bonds and hydrophobic interactions between trypsin and pDMAEMA, indicating the importance of these types of physicochemical interactions in the immobilization process. Molecular docking enabled the identification of key amino acids involved in the formation of the complex and confirmed the presence of salt bridges. Thus, this work demonstrates the potential of using PDMAEMA as a carrier for trypsin immobilization, which opens new opportunities for the application of this complex in biotechnology and medicine.

**Keywords:** enzymes, stimulus-responsive polymers, immobilization, poly-*N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate, proteases.

**Acknowledgments:** the work was performed within the framework of the state task "Photobiophysical environmental monitoring based on the spectral and fluorescent properties of structurally organized molecular (including nanoparticles) and supramolecular biologically important systems (FEFM-2023-0005).

The authors are grateful to V.F. Selemenev, Doctor of Chemical Sciences, Professor, for his invaluable help in interpreting the IR spectroscopy data and constructive comments, which had a significant impact on the quality of this work.

**For citation:** Dubovitskaya A.N., Holyavka M.G., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Kondratiev M.S., Lukin A.N., Artyukhov V.G. Structural and functional properties of trypsin under conditions of immobilization on poly-*N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(4): 613-624. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13289>

### Введение

Протеолитические ферменты активно применяются в различных областях

науки и практики, позволяя быстро и эффективно проводить реакции гидролиза белков и пептидов. Трипсин (КФ 3.4.21.4) относится к группе сериновых протеаз

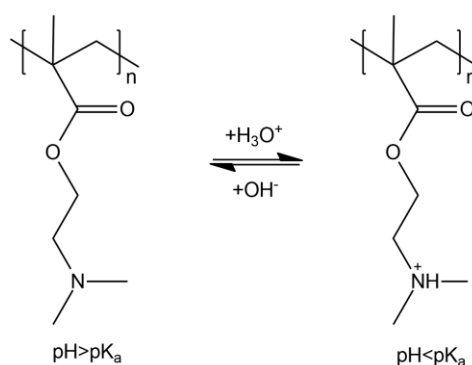


Рис. 1. Фрагменты структуры пДМАЭМА при разных значениях pH.

Fig. 1. Fragments of the PDMAEM structure at different pH values.

класса гидролаз и является одним из самых распространенных ферментов в различных отраслях человеческой деятельности. Он естественным образом продуцируется в форме неактивного предшественника – трипсиногена – экзокринными клетками поджелудочной железы млекопитающих. Трипсиноген превращается в трипсин под действием энтеропептидазы, самого трипсина и ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Данный процесс протекает в двенадцатиперстной кишке [1].

Оптимальной температурой функционирования трипсина является  $37^\circ\text{C}$ , однако она может быть повышена до  $47^\circ\text{C}$  при добавлении ионов кальция [2]. Молекула фермента состоит из 223 аминокислотных остатков и имеет массу 23.3 кДа. Изоэлектрическая точка трипсина находится между 10.1-10.5 единиц pH. Оптимальный диапазон pH составляет примерно 7.5-9.0 [3, 4]. Каталитическая триада трипсина включает в себя следующие аминокислоты: His 57, Ser 195 и вспомогательный Asp 102.

Данный фермент активно используется в биотехнологии, в частности, для расщепления белков в масс-спектрометрии [5], при очистке рекомбинантных белков от аффинных тэгов [6], а также при пептидном картировании [7]. Трипсин находит широкое применение в медицине благодаря своим терапевтическим свойствам. Он способствует проникновению химиотерапевтических препаратов и антибиотиков в целевой очаг поражения,

улучшает абсорбцию лекарств, уменьшает отек тканей, воспаление и окислительный стресс, что способствует их заживлению, в том числе после ожогов. Трипсин также активно используется для очищения ран и способствует регенерации грануляционной ткани [8-10].

Несмотря на широкие масштабы применения, свободные ферменты имеют ряд недостатков, связанных с их растворимостью, невозможностью повторного использования и недостаточной стабильностью, что негативно сказывается на общей эффективности процессов и сроках хранения препаратов [11].

Использование методов иммобилизации позволяет решить данные затруднения путем повышения стабильности ферментов, что способствует созданию препаратов с пролонгированным сроком хранения и высокой эффективностью в использовании. Иммобилизация представляет собой комплекс методов, заключающихся в прикреплении фермента к носителю или его включении в иммобилизационную матрицу [12-13].

Среди множества других потенциальных носителей в последнее время внимание специалистов в области биоинженерии привлекают «умные» полимеры, в частности – поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилат (пДМАЭМА) (рис. 1), характеризующего величиной  $pK_a \sim 7.4$  [14].

пДМАЭМА способен переходить из гидрофильного состояния в гидрофобное под влиянием внешних стимулов, таких

как температура и pH [15-16]. Нижняя критическая температура растворения (НКТР) полимера составляет  $\sim 40^{\circ}\text{C}$  и может регулироваться путем изменения величины его молекулярной массы, что может стать важным фактором для применения в биомедицинских исследованиях [17]. В частности, одной из важнейших потенциальных областей применения полимеров, чувствительных к pH, является создание препаратов, используемых для диагностики и лечения рака. Поскольку раковые клетки гораздо в большей степени зависят от аэробного гликолиза, чем здоровые, внеклеточная среда опухолевых клеток более кислая и составляет 6.2-6.8 единиц pH, что обуславливает использование полимеров метакрилата с третичными аминогруппами, чьи значения  $pK_a$  близки к данному диапазону [18]. В свете этого, целесообразным представляется использование буферных систем с указанным уровнем pH.

Общую структуру ДМАЭМА можно разделить на две части – гидрофильный боковой заместитель, содержащий карбонил и третичную аминогруппу, и гидрофобную алкильную цепь [19].

Поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилат обладает важными свойствами, такими как растворимость в воде и ряде органических растворителей, механическая прочность, антибактериальная активность, а также специфическими термическими и гидродинамическими параметрами, что делает его пригодным для различных современных практических применений в биологической и химической сферах [20-21].

На основе пДМАЭМА была синтезирована чувствительная к глюкозе система с регулируемым высвобождением инсулина на основе гидрогеля поли-2-гидроксиэтилметакрилат-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилат (ГЕМА-со-ДМАЭМА). Было замечено, что эти гидрогели были стабильны в воде без сшивающего агента. Чувствительность этой системы к значениям pH и концентрации глюкозы

была выше, чем у химически сшитых гидрогелей [22].

Было проведено исследование, в ходе которого пДМАЭМА использовался для иммобилизации двух ферментов – глюкозооксидазы и глутаматоксидазы. В результате были получены частицы с высокими значениями таких параметров, как точность контролируемого высвобождения, выход продукта, пропускная способность и уровень сохранения активности фермента [23].

пДМАЭМА используется в качестве эффективного бактерицидного средства против грамположительных и грамотрицательных бактериальных штаммов. Также, согласно исследованиям, пДМАЭМА может служить в качестве носителя для антимикробных препаратов, позволяя усилить их активность [17, 19].

В связи с вышеизложенным, целью работы стало изучение особенностей комплексов трипсин-пДМАЭМА для определения потенциала применения названного полимера в качестве носителя для иммобилизации сериновых протеаз.

### Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования был выбран протеолитический фермент трипсин (Sigma, США). Носителем для иммобилизации выступил синтетический термочувствительный полимер – поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилат (пДМАЭМА).

Синтез пДМАЭМА. *N,N*-Диметиламиноэтилметакрилат (ДМАЭМА; Sigma, США) с  $T_{\text{кин}}=58-65^{\circ}\text{C}/8$  мм. рт. ст.,  $n_{\text{D}}^{20}=1.44$ ) и *N,N*-Диметилформамид (ДМФА; Вектон, РФ) с  $T_{\text{кин}}=44^{\circ}\text{C}/15$  мм. рт. ст.,  $n_{\text{D}}^{20}=1.43$  непосредственно перед синтезом очищали вакуумной дистилляцией. Азо-*бис*-изобутиронитрил (АИБН; Вектон, РФ) перекристаллизовывали из этанола перед использованием. Толуол (Вектон, РФ) был абсолютизирован выдерживанием над прокаленным  $\text{CaCl}_2$  в течение суток с последующей фильтрацией.

Полимер был синтезирован по следующей методике: в колбе Шленка, установленной на магнитном перемешивающем устройстве и содержащей 32 см<sup>3</sup> ДМФА, растворяли 8 см<sup>3</sup> ( $4.8 \cdot 10^{-2}$  моль) ДМАЭМА. Полученный раствор дегазировали трехкратным повторением цикла замораживание-вакуумирование-оттаивание, после чего реактор заполняли аргоном, и против его тока вносили 0.079 г ( $4.8 \cdot 10^{-4}$  моль) АИБН. После полного растворения инициатора реактор был выдержан при 60°C в течение 5 часов. Затем реакционную массу охлаждали до комнатной температуры и осаждали в ацетон. Полученный осадок растворяли в дистиллированной воде, полученный раствор диализовали через мембрану из регенерированной целлюлозы с отсечением продукта молекулярной массы менее 3500 а.е.м. против дистиллированной водой до исчезновения каких-либо сигналов в промывных водах, тестируемых спектрофотометрически. Поли-2-диметиламиноэтилметакрилат из раствора выделяли лиофилизацией до постоянной массы образца. Выход продукта составил 64 %.

Иммобилизация трипсина. Раствор трипсина готовился в 7 масс.% буферном растворе (фосфатный буфер 0.05М со значением pH 6.5) полимера при предварительном добавлении 0.04М цистеина в иммобилизационную среду. Раствор фермент-носитель добавлялся к 1 масс.% раствору резорцина, разогретому до 50°C, в объемном отношении 1:1. Инкубация проводилась в течение 20 минут при температуре 37°C, а затем – при комнатной температуре до полного высыхания препарата [24-26].

Измерение каталитической активности ферментов и их комплексов. Измерение ферментативной активности проводилось по субстрату *N*- $\alpha$ -бензоил-*DL*-аргинин-*n*-нитроанилиду (BAPNA). Оптическая плотность образцов измерялась при длине волны 410 нм [27]. За единицу каталитической активности принимали количество

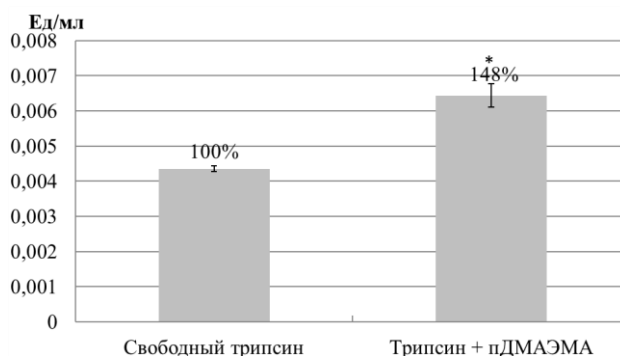
фермента, которое превращает 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин.

ИК-спектроскопия. Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов осуществляли в Центре коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета на ИК-Фурье спектрометре Bruker Vertex70 (Германия), оснащенным НПВО-приставкой Bruker Platinum 1000 с призмой из алмаза. Съемка образцов в виде тонкодисперсных порошков, просеянных через сито с размером отверстий 50 мкм, осуществлялась методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) в диапазоне волновых чисел 400-4000 см<sup>-1</sup>, производилось 4 цикла съемки по 32 сканирования каждый. Обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Omnic 9.0 и OPUS 6.5.

Молекулярный докинг. Подготовку структуры трипсина (1S5S) к докингу (молекулярной стыковке) проводили по стандартной схеме для AutodockVina следующим образом: из входного PDB-файла были удалены атомы и координаты атомов растворителя, буфера и лигандов. Центр молекулы и параметры бокса задавались вручную, гарантируя, что молекула протеазы полностью находится внутри домена вычислительного пространства.

Модель структуры полимера была создана в молекулярном конструкторе HyperChem и последовательно оптимизирована сначала в силовом поле AMBER, а затем квантово-химически в PM3 (параметрический метод 3). Лиганд при докинге обладал максимальной конформационной свободой: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановку зарядов на полимере и протонирование/депротонирование выполняли автоматически в пакете MGLTools1.5.6.

Визуализация. Визуализация результатов молекулярного докинга проводилась с помощью программного обеспечения



Примечание: \*отличия от контрольных значений (активности свободного трипсина) статистически достоверны при  $p < 0.05$

Рис 2. Активность трипсина, свободного (принята за 100%) и иммобилизованного на пДМАЭМА

Fig. 2. The activity of trypsin, free (assumed to be 100%) and immobilized on pDMAEMA

PyMOL.3.1.1, LigPlot и сервиса PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler).

Статистическая обработка результатов. Все экспериментальные исследования проводили не менее чем в восьмикратной повторности. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета программ Stadia 8.0 Professional. Статистическую значимость различий между контрольными и опытными значениями определяли по критерию Стьюдента (при  $p < 0.05$ ), так как все показатели характеризовались нормальным распределением.

### Обсуждение результатов

Измерение каталитической активности ферментов и их комплексов. В результате проведенных экспериментов и последующих расчетов была определена ферментативная активность свободного и иммобилизованного на поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилате трипсина (рис. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о факте повышения активности трипсина при его иммобилизации на пДМАЭМА на 48% по сравнению с таковой у нативного фермента. Существует несколько предполагаемых механизмов гиперактивации ферментов, включая снижение в результате иммобилизации степени автолиза [3, 28]. Кроме того, иммобилизация способствует созданию

определенного микроокружения вблизи фермента, что может влиять на его активность [29-32]. Конформационные изменения, претерпеваемые энзимом, также могут благоприятно воздействовать на его способность к катализу, в том числе, вероятно, благодаря более эффективному «раскрытию» активного центра и содействию пДМАЭМА в корректной ориентации субстрата по отношению к каталитической триаде [33-34].

ИК-спектроскопия. Представленные на рис. 3 ИК-спектр трипсина демонстрируют типичные для белков полосы поглощения: при 1632 и 1532  $\text{см}^{-1}$  – Амид I (валентные колебания  $\nu \text{C=O}$ ) и Амид II (составные частоты деформационных колебаний  $\delta \text{N-H}$  и колебаний  $\text{C-N}$ ), а также при 1238  $\text{см}^{-1}$ , соответствующие полосе Амид III [35-38].

Необходимо отметить, что полоса 1632  $\text{см}^{-1}$  может быть обусловлена деформационными колебаниями гидратной воды, что подтверждается максимумом при 3272  $\text{см}^{-1}$  ( $\nu_s \text{C=O} \cdots \text{H}_2\text{O}$  или обертоном  $\nu \text{C=O}$ ), а также полосой при 3078  $\text{см}^{-1}$  ( $\nu_s \text{C=O} \cdots \text{H}_2\text{O} \cdots \text{HN}$ ). Максимум при 1075  $\text{см}^{-1}$  вызван колебаниями в  $\text{C-O-C}$  группах. Полосы поглощения при 2933 и 2875  $\text{см}^{-1}$  свидетельствуют об асимметричных и симметричных валентных колебаниях  $\text{CH}_2$  и  $\text{CH}_3$ -групп соответственно. Данное

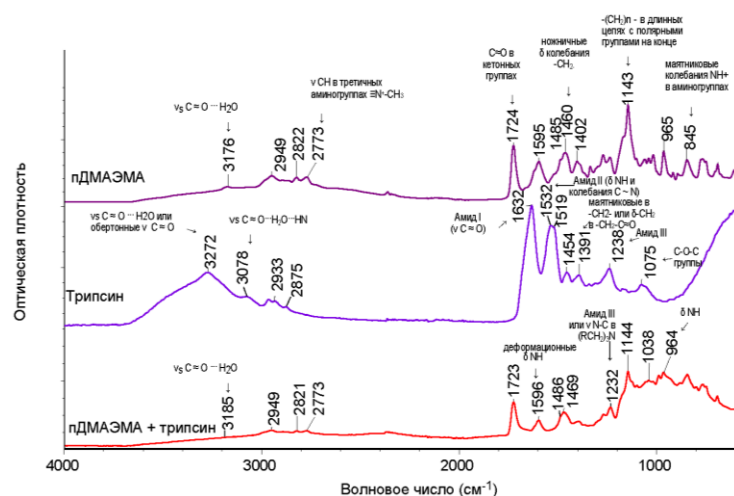


Рис. 3. Результаты ИК-спектроскопии препаратов трипсина, свободного и иммобилизованного на пДМАЭМА

Fig. 3. Results of IR spectroscopy of trypsin preparations free and immobilized on pDMAEMA

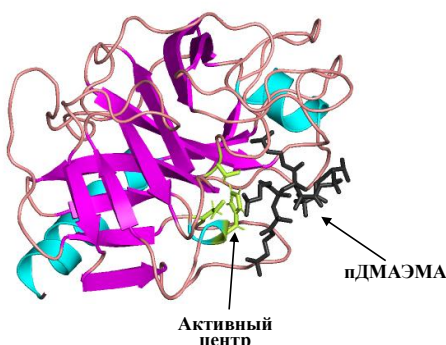


Рис. 4. Визуализация сайтов взаимодействия трипсин-пДМАЭМА с помощью средств визуализации PyMol

Fig. 4. Visualization of trypsin-PDMAEM interaction sites using PyMOL visualization tools

отнесение полос подтверждается наличием полос  $1454 \text{ cm}^{-1}$  (деформационные ножничные колебания  $\delta \text{CH}_2$ ) и  $1391 \text{ cm}^{-1}$  (маятниковые колебания  $\gamma\text{-CH}_2$ -групп или  $\delta\text{-CH}_2$  в  $-\text{CH}_2\text{-C=O}$  группах) [35-38].

В ИК-спектре пДМАЭМА наблюдаются полосы при  $1724 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu \text{C=O}$  сложных эфиров и кетонов);  $1595 \text{ cm}^{-1}$  ( $\delta \text{N-H}$ ). Присутствие  $\text{C=O}$  также подтверждается колебаниями при  $3176 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_s \text{C=O}\cdots\text{H}_2\text{O}$ ), а также полосой при  $1143 \text{ cm}^{-1}$ , которая описывает колебания  $-(\text{CH}_2)_n-$  в длинных цепях с полярными  $\text{C=O}$  или  $\text{NH}^+$  на конце цепочек. Наличие заряженных аминогрупп в полимере подтверждается полосами при  $965 \text{ cm}^{-1}$  и  $845 \text{ cm}^{-1}$  (колебания  $\text{NH}^+$  в аминогруппах), а

также при  $2773 \text{ cm}^{-1}$  (колебания  $\nu\text{CH}$  в третичных аминогруппах  $\equiv\text{N}^+-\text{CH}_3$ ). Полосы  $2949$  и  $2822 \text{ cm}^{-1}$  свидетельствуют об асимметричных  $\nu_{as}$  и симметричных  $\nu_s$  валентных колебаниях  $\text{CH}_2$  и  $\text{CH}$ -групп, а полоса  $1460 \text{ cm}^{-1}$  о ножничных  $\delta$  колебаниях этих же групп [35-38].

Сопоставление ИК-спектров индивидуальных компонентов и комплекса «пДМАЭМА+трипсин» свидетельствует о возможности фиксирования фермента за счёт ион-ионных  $-\text{COO}\cdots\text{NH}^+\equiv$  и ион-дипольных взаимодействий  $\text{C=O}\cdots\text{NH}^+\equiv$  (или  $\text{C-O-H}\cdots\text{N}\equiv$ ). На это указывает изменение формы и положения полосы Амид III (смещение в более длинноволновую область с  $1238$  до  $1232 \text{ cm}^{-1}$ ) [35-38].



Таблица 1. Результаты молекулярного докинга трипсина с пДМАЭМА, полученные с помощью LigPlot и сервиса PLIP

Table 1. Results of molecular docking of trypsin from pDMAEMA, obtained using LigPlot and PLIP service

Водородные связи, длина, Å	Гидрофобные взаимодействия*	Солевые мостики*	Другие типы физических взаимодействий**
His57, 2.95** - 3.83* Gln192, 2.93** - 3.17* Ser195, 3.46* Gly219, 3.63*	Trp215	His57 His57 Asp189	Phe41, Cys42, Phe94, Gly96, Asn97, Leu99, Tyr172, Ser190, Ser195, Gln175, Val213, Trp215, Gly216, Tyr217, Gly219, Lys224

Примечание: \* – данные получены с помощью сервиса PLIP; \*\* – данные получены с помощью ПО LigPlot.

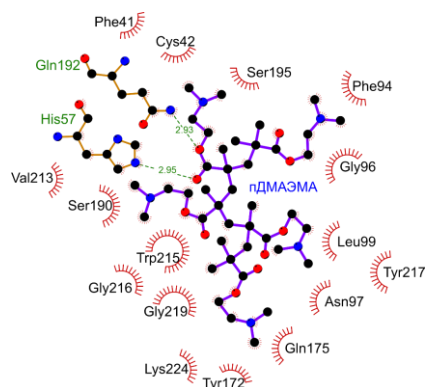


Рис. 5. Визуализация взаимодействий пДМАЭМА с трипсином посредством LigPlot

Fig. 5. Visualization of PDMAEM interactions with trypsin via LigPlot

**Молекулярный докинг и визуализация.** Для объяснения полученных результатов был проведен молекулярный докинг (рис. 4, табл. 1), позволяющий исследовать вероятные модели взаимодействия белок-лиганд и оценить энергетические характеристики связывания, а также идентифицировать аминокислотные остатки, принимающие участие в образовании комплекса.

Установлено, что трипсин склонен к формированию как водородных связей, так и физических взаимодействий с пДМАЭМА (табл. 1), что подтверждает данные, полученные из результатов анализа ИК спектров.

С помощью программного пакета LigPlot был проведен анализ результатов молекулярного докинга, благодаря чему было определено расположение и способ

формирования взаимодействия в полученном комплексе (рис. 5).

Анализ посредством ПО LigPlot показал вклад как водородных связей, так и физических взаимодействий в образование комплекса трипсина с пДМАЭМА. Для дальнейшей дифференциации физических взаимодействий был использован онлайн-ресурс PLIP (табл. 1, рис. 6).

Стоит отметить, что уточненные данные позволяют выделить большее количество аминокислот, вовлеченных в образование водородных связей с лигандом, а также выявить роль так называемых солевых мостиков – электростатических взаимодействий между разноименно заряженными функциональными группами пДМАЭМА и аминокислотами фермента, что свидетельствует о протекании супрамолекулярных процессов [39].



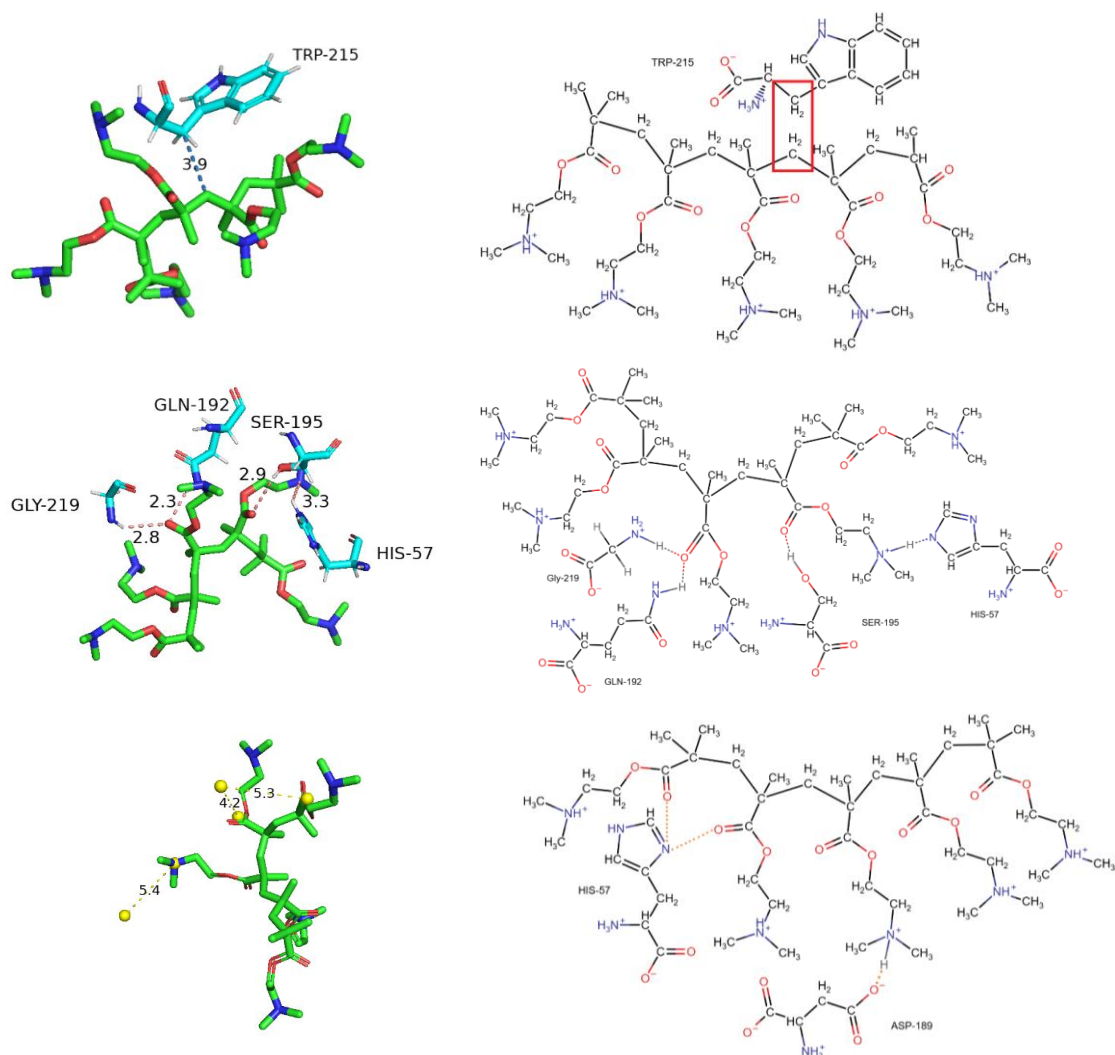


Рис.6. Визуализация взаимодействий пДМАЭМА с трипсином посредством сервиса PLIP (сверху вниз: гидрофобные взаимодействия, водородные связи, солевые мостики)  
Fig. 6. Visualization of PDMAEM interactions with trypsin through the PLIP service (from top to bottom: hydrophobic interactions, hydrogen bonds, salt bridges)

Кроме того, внимания заслуживает и факт вовлечения представителей каталитической триады во взаимодействие с пДМАЭМА, причем His 57 оказался способен как к вовлечению в ион-ионные взаимодействия (солевые мостики), так и к формированию водородных связей. Ser 195, в свою очередь, согласно анализу комплекса в ПО LigPlot, демонстрирует возможность участия в физических (ион-ионных) взаимодействиях. Полученные данные также свидетельствуют в пользу гипотезы о более эффективном конформационном состоянии каталитического кармана.

Стоит отметить, что для остатков Val, Leu, Gly, Ser, Cys, Tyr, Trp, Asn, Gln, Phe, участвующих в формировании комплекса с пДМАЭМА справедливо отношение:  $pK_1(\text{COOH}) < pI < pH \text{ раствора} < pK_2(\text{NH}_2)$ . Это значит, что часть аминокислотных остатков находится в состоянии  $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_3^+$ , а часть – в состоянии  $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_2$ , но эта доля меньше половины, так как  $pH \text{ раствора} < pK_2(\text{NH}_2)$ , поэтому большая часть молекул остается незаряженной, а меньшая их доля заряжена отрицательно. Исключением являются остатки Lys, His и Asp. У Lys  $pK_1(\text{COOH}) < pI \text{ раствора} < pK_2(\text{NH}_2)$  и он находится в условиях эксперимента ( $pH = 6.5$ ) в двух

состояниях: часть в  $\text{COOH}$ ,  $\text{NH}_3^+$ , а часть в  $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_3^+$ , т.е. основная часть имеет положительный заряд. Таким образом, можно заключить о возможности формирования всех типов взаимодействий между молекулами трипсина и пДМАЭМА: ориентационных между полярными участками полимеров, индукционных – между полярным и неполярным участками, дисперсионных – между неполярными участками. В образовании Н-связей и солевых мостиков с матрицей носителя активно участвует остаток His57 ( $\text{pI}=7.6$ ), который заряжен положительно в условиях эксперимента. Остаток Asp189 ( $\text{pI}=3.0$ ) имеет отрицательный заряд и также образует солевые мостики с пДМАЭМА.

Таким образом, молекулярный докинг подтвердил предполагаемые нами механизмы образования ассоциатов трипсин-пДМАЭМА, реализующиеся через ряд физических взаимодействий и образование водородных связей.

### Заключение

В результате проведенной работы был получен препарат трипсина, иммобилизованный на синтетическом термочув-

ствительном носителе поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилате, и изучены его характеристики. Эксперименты показали, что иммобилизация трипсина на пДМАЭМА приводит к гиперактивации фермента и, следовательно, к повышению эффективности катализа в  $\sim 1.6$  раза.

С помощью методов ИК-спектроскопии и молекулярного докинга было установлено, что доминирующими типами взаимодействий в образованных комплексах являются водородные связи и гидрофобные взаимодействия, кроме того, выявляется участие электростатических сил, выражающееся в появлении солевых мостиков.

Полученные комплексы трипсина с поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом с повышенной активностью могут увеличить перспективность применения названных композиций в биотехнологии и медицине.

### 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.

### Список литературы/References

1. Sukhanova S. M., Petruchuk E. M., Generalov A. A. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2018; 18(2): 106-113.
2. Nickerson J. L., Doucette A. A. *Biology*, 2022; 11(10): 1444.
3. Mansuri M. S., Bathla S., Lam T. T., Nairn A. C., Williams K. R. *Journal of Proteomics*, 2024; 297: 105109.
4. Kaur J., Singh P. K. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2022; 52(5): 949-967.
5. Vandermarliere E., Mueller M., Martens L. *Mass Spectrometry Reviews*, 2013; 32(6): 453-465.
6. Gahlawat S., Nanda V., Shreiber D. I. *PLOS ONE*, 2023; 18(5): e0285864.
7. Menneteau T., Saveliev S., Butré C. I., Rivera A. K. G., Urh M., Delobel A. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2024; 243: 116124.
8. Abhyankar S. V., Vartak A. M., Daftary G. V. *International Surgery Journal*, 2021; 8(7): 2254-2259.
9. Ma C., Li H., Lu S., Li X., Wang S., Wang W. *Journal of Inflammation Research*, 2023; 16: 927-939.
10. Famutimi O. G., Adebisi V. G., Akinmolu B. G., Dada O. V., Adewale I. O. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2024; 10(1): 126.
11. Choi H. J., Kim J. H., Le V. Q. A., Kim B. N., Cho B. K., Kim Y. H., Min J. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023; 264: 115446.
12. Mirsalami S. M., Mirsalami M., Ghodousian A. *Results in Chemistry*, 2024; 7: 101486.
13. Cavalcante F. T. T., Cavalcante A. L. G., De Sousa I. G., Neto F. S., dos Santos J. C. *Catalysts*, 2021; 11(10): 1222.



14. Brilmayer R., Kübelbeck S., Khalil A., Brodrecht M., Kunz U., Kleebe H. J., Buntkowsky G., Baier G., *Advanced Materials Interfaces*, 2020; 7(7): 1901914.
15. De Barros H.R., Theisen M., Durigon M.C., Leite D.C., Piovan L., Riegel-Vidotti I.C. *ChemCatChem*, 2024; 16(22): e202400699.
16. Mohammadi M., Salami-Kalajahi M., Roghani-Mamaqani H., Golshan M. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2017; 66(9): 455-461.
17. Manouras T., Platania V., Georgopoulou A., Chatzinikolaidou M., Vamvakaki M. *Polymers*, 2021; 13(18): 3051.
18. Gürsoy M. *Coatings*, 2024; 14(3): 347.
19. Kanth S., Puttaiahgowda Y. M., Nagaraja A., Bukva M. *European Polymer Journal*, 2022; 163: 110930.
20. Stawski D. *Royal Society Open Science*, 2023; 10(9): 230188.
21. Teper P., Celny A., Kowalczyk A., Mendrek B. *Polymers*, 2023; 15(5): 1260.
22. Adibfar A., Hosseini S., Eslaminejad M.B. *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 10: Stem Cells in Tissue Regeneration*, 2020: 133-148.
23. Pich A.Z., Adler H P. *Polymer international*, 2007; 56(3): 291-307.
24. Kirsch Y. E. *Poli-N-vinilpirrolidon i druge poli-N-vinilamidy*. M., Nauka, 1998, 252 p. (In Russ.)
25. Gomzyak V.I., Zubov V.P., Chikhacheva I.P., Rumsh L.D. *himicheskie tehnologii*, 2013; 8(1): 77.
26. Davidenko T.I., Kaed A.A. *Visnik Odes'kogo nacional'nogo universitetu. Himija*, 2003; 8(7-8): 93-101.
27. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1961; 95(2): 271-278.
28. Tacias-Pascacio V. G., Castañeda-Valbuena D., Tavano O., Abellanas P., de Andrades D., Santiz-Gómez J. A. Berenguer-Murcia Á., Fernandez-Lafuente R. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024; 273: 133089.
29. Chen J.-P., Chu D.-H., Sun Y.-M. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1997; 69(4): 421-428.
30. Ding Z., Chen G., Hoffman A.S. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998; 39(3): 498-505.
31. Raghava S., Mondal K., Gupta M. N., Pareek P., Kuckling D. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 2006; 34(3): 323-336.
32. Kutcherlapati S.N.R., Yeole N., Jana T. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016; 463: 164-172.
33. Chang X.-L., Zhang X.-R., Qiang Y., Cao Y.H., Shang X.Y., Wang W.F., Yang J.L. *Langmuir*, 2024; 40(43): 22794-22802.
34. Lai E., Wang Y., Wei Y., Li G., Ma G. *Journal of Applied Polymer Science*, 2016; 133(21): 43343.
35. Bekker Yu. *Spektroskopiya*. M., Tekhnosfera, 2009, 527 p. (In Russ.)
36. Kazitsina L.A., Kupletskaya N.B. *Primenenie UF-, IK- i YaMR- i mass-spektroskopii v organicheskoi khimii*. M., Izd-vo Moskovskogo un-ta, 1979, 240 p. (In Russ.)
37. Dekhant I., Dants R., Kimmer V., Shmol'ke R. *Infrakrasnaya spektroskopiya polimerov*. Moscow, Khimiya, 1976, 470 p. (In Russ.)
38. Karpov S.I., Selemenev V.F. *Infrakrasnaya spektroskopiya sorbentov: uchebnoe posobie*. Voronezh, Nauchnaya kniga, 2024, 376 p. (In Russ.)
39. Selemenev V F., Kostin D.V., Artjuhov V.G., Rudakov O.B. *Formy dvizheniya materii: razmyshleniya o nepoznannom: monografija / Voronezh: Nauchnaya kniga*, 2024, 194 p. (In Russ.)

### Информация об авторах / Information about the authors

**А.Н. Дубовицкая** – аспирант кафедры биофизики и биотехнологии, младший научный сотрудник, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**М.Г. Холявка** – д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, профессор кафедры «Физика» Севастопольского государственного университета, Севастополь, Россия

**A.N. Dubovitskaya** – postgraduate student of the Department of Biophysics and Biotechnology, junior researcher, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: [a.n.dubovitskaya@mail.ru](mailto:a.n.dubovitskaya@mail.ru)

**M.G. Holyavka** – PhD., DSci., Associate Professor, Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh; Full Professor of Physics Department, Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation, e-mail: [holyavka@rambler.ru](mailto:holyavka@rambler.ru)



**М.С. Лавлинская** – к.х.н., старший научный сотрудник медико-биологического факультета кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**А.В. Сорокин** – к.б.н., старший научный сотрудник медико-биологического факультета кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**М.С. Кондратьев** – к.ф.-м.н., заведующий лабораторией структуры и динамики биомолекулярных систем ИБК РАН, Пущино, старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, доцент, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**А.Н. Лукин** – к.ф.-м.н., инженер Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**В.Г. Артюхов** – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

**M.S. Lavlinskaya** – PhD, Senior Researcher of Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: [maria.lavlinskaya@gmail.com](mailto:maria.lavlinskaya@gmail.com)

**A.V. Sorokin** – PhD, Senior Researcher of Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: [andrew.v.sorokin@gmail.com](mailto:andrew.v.sorokin@gmail.com)

**M.S. Kondratiev** – PhD, Head of the Laboratory of Structure and Dynamics of Biomolecular Systems, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences; Senior Researcher, Associate Professor, Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: [ma-ko@bk.ru](mailto:ma-ko@bk.ru)

**A.N. Lukin** – Ph.D, engineer of Voronezh State University Research Core Center, Voronezh State University. Voronezh, Russian Federation, e-mail: [alukin@phys.vsu.ru](mailto:alukin@phys.vsu.ru)

**V.G. Artyukhov** – PhD., DSci., Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: [artyukhov@bio.vsu.ru](mailto:artyukhov@bio.vsu.ru)

*Статья поступила в редакцию 23.09.2025; одобрена после рецензирования 01.10.2025; принята к публикации 15.10.2025.*

*The article was submitted 23.09.2025; approved after reviewing 01.10.2025; accepted for publication 15.10.2025.*