

Особенности взаимодействия молекул коллагена и коллагеназы при наличии ионов хрома и кальция в растворах методом динамического рассеяния света

А. В. Петрова,^а И. А. Сергеева,^б Г. П. Петрова, А. В. Митрофанова

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.

Поступила в редакцию 10.07.2020, после доработки 22.08.2020, принята к публикации 06.10.2020.

В данной работе методом динамического рассеяния света были получены рН-зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t и гидродинамического радиуса R_h в буферных растворах коллагена и коллагеназы при наличии ионов кальция, цинка и хрома. Выявлено незначительное влияние ионов металлов на исследуемые молекулы. Измерены временные зависимости D_t и R_h в растворах коллагена и коллагеназы при наличии активатора (Ca^{2+}) и дубителя (Cr^{3+}), а также рассчитаны константы скорости расщепления белка. Получено, что добавление ионов хрома замедляет процесс коллагенолиза на 70% (или в 3.3 раза) ($k_1 = 0.006 \text{ мин}^{-1}$) по сравнению с чистым раствором коллагена и коллагеназы ($k_1 = 0.02 \text{ мин}^{-1}$). В свою очередь, наличие ионов кальция ускоряет реакцию на 250% (или в 3.5 раза) ($k_1 = 0.07 \text{ мин}^{-1}$). Однако заранее хромированный коллаген менее подвержен биодеградации под воздействием активированной коллагеназы ($k_1 = 0.009 \text{ мин}^{-1}$).

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

УДК: 535.36, 539.2. PACS: 42.55, 39.90.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается экспоненциальный рост интереса к процессу расщепления белка коллагена под воздействием фермента коллагеназы *Clostridium histolyticum* (коллагенолиз). Глубокое понимание этого процесса необходимо для лечения заболеваний в различных областях медицины: онкологии, офтальмологии, хирургии, дерматологии, косметологии, а также терапии гнойных и ожоговых ран, отморожений [1].

В настоящее время коллагеназа используется в препаратах для лечения заболеваний, которые возникают в результате чрезмерного отложения белка коллагена в некоторых органах, приводящем к нарушению их нормального функционирования [2, 3]. Наиболее часто используется бактериальная коллагеназа, полученная из *Clostridium histolyticum* СНС (возбудитель газовой гангрены) [4–6]. Поскольку коллаген составляет одну треть всех белков в организме человека, то нарушение его синтеза может привести к таким заболеваниям, как синдром Дюпюитрена, болезнь Пейрони и др. [7, 8]. В таких случаях использование инъекционной формы коллагеназы или препаратов на ее основе может помочь в деградации обструктивного коллагена [9].

Однако существуют и такие заболевания, при которых коллагеновые волокна начинают произвольно разрушаться: остеохондроз, артроз, ухудшение зрения, состояния сосудов и кожи [10]. Процесс разрушения белка можно замедлить, используя ингибиторы фермента или дубители белка. Хромирование (или дубление) коллагена давно используется не только в кожевенном производстве, но и для стабилизации и упрочнения структуры молекул белка.

Расщепление коллагеновых волокон под воздействием коллагеназы хорошо изучено с помощью метода атомно-силовой микроскопии [11]. В данной работе были изучены структурные изменения молекул коллагена под действием фермента, а также вычислены скорости разрушения белка.

В работе [12] с помощью метода динамического рассеяния света были исследованы временные зависимости коэффициента трансляционной диффузии и гидродинамического радиуса в растворах на основе смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl буфере с добавлением активатора — хлорида кальция. Показано, что добавление ионов кальция в растворы приводит к увеличению скорости биодеградации коллагена почти в 2 раза [12].

При использовании солей трехвалентного хрома процесс деградации коллагена происходит менее интенсивно, поскольку дубление молекул белка приводит к образованию поперечных связей («сшивок») между молекулярными цепями белковой структуры и упрочнению ее пространственной конфигурации. Хромовое дубление придает коллагену устойчивость к воздействию ферментов [13].

Актуальность данной работы заключается в исследовании процесса коллагенолиза методом динамического рассеяния света при добавлении в растворы дубителя белка коллагена (хлорида хрома) и активатора коллагеназы (хлорида кальция). Данный метод позволяет в режиме реального времени отслеживать изменения физико-химических свойств молекул в условиях, близких к физиологическим.

1. ИССЛЕДУЕМЫЕ ВЕЩЕСТВА

1.1. Коллаген

Коллаген (с греческого *cola genno* — клееродный) — это наиболее распространенный белок в организме млекопитающих. Он составляет одну треть

^а E-mail: av.sukneva@physics.msu.ru

^б E-mail: sergeeva@physics.msu.ru

части массы всех белков. Около 40% коллагена находится в коже — самом большом органе человека [14]. В данной работе использовался 0.1% (1 мг/мл) монодисперсный раствор коллагена I типа из кожи телят производства компании Sigma-Aldrich [15]. Молекулярная масса коллагена около 300 кДа, длина 300 нм, изоэлектрическая точка рI 6.0.

Коллаген может подвергаться необратимой денатурации: под воздействием температуры (различной для разных типов коллагенов), микроорганизмов, а также под влиянием солей тяжелых металлов, сильных кислот и щелочей, альдегидов или облучения и др. Кроме того, коллаген может биодеградировать под воздействием фермента коллагеназы [16].

1.2. Коллагеназа

Коллагеназа — уникальный фермент, который способен избирательно гидролизовать белок коллаген [17]. Клостридиальная коллагеназа способна полностью расщеплять тройную спираль белка [18].

Бактериальная коллагеназа синтезируется некоторыми микроорганизмами, например: СНС выделяет коллагеназу, расщепляющую пептидную цепь коллагена более чем в 200 местах. Таким образом, разрушаются соединительнотканые барьеры в организме человека, что обеспечивает проникновение (или инвазию) этого микроорганизма и способствует возникновению и развитию газовой гангрены. Сам возбудитель не содержит коллагена и поэтому не подвержен действию коллагеназы [19].

Именно бактериальная коллагеназа характеризуется высокой специфичностью действия на коллагеновые волокна. Ее активаторами являются ионы кальция и цинка [20, 21]. Zn^{2+} отвечает за активацию амидной группы фермента, а Ca^{2+} — за формирование третичной структуры молекулы [22]. Кроме того, активация СНС коллагеназы в водном растворе хлоридом кальция приводит к увеличению подвижности молекул фермента [23].

В работе использовалась коллагеназа СНС производства компании Sigma-Aldrich (США). Молекулярная масса — 79.8 кДа. Цвет коричневый, изоэлектрическая точка рI 6.0 [24].

2. МЕТОД ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

Для измерения размеров молекул исследуемых веществ используется метод динамического рассеяния света. Данный метод позволяет определить коэффициент диффузии D_t дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света. Далее из коэффициента диффузии рассчитывается радиус наночастиц R_h [25].

Хаотическое броуновское движение дисперсных частиц приводит к микроскопическим флуктуациям их локальной концентрации и соответствующим локальным неоднородностям показателя преломления среды. При прохождении лазерного луча через такую среду часть света будет рассеяна на этих неоднородностях. Флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флуктуациям

локальной концентрации дисперсных частиц. Информация о коэффициенте диффузии частиц содержится в зависящей от времени корреляционной функции флуктуаций интенсивности [26]. Временная автокорреляционная функция, согласно определению, имеет следующий вид:

$$G(\tau) = \langle I(0)I(t - \tau) \rangle = \lim_{t_m \rightarrow \infty} \frac{1}{t_m} \int_0^{t_m} I(t)I(t - \tau) dt, \quad (1)$$

где интенсивность I имеет различные значения во время t и $(t - \tau)$. t_m — это время интегрирования (время накопления корреляционной функции). Очевидно, что при $\tau = 0$ автокорреляционная функция равна среднеквадратичной интенсивности $\langle I^2 \rangle$.

Из корреляционной функции можно получить информацию о коэффициенте трансляционной диффузии D_t , из которого вычисляется гидродинамический радиус частиц R_h .

В простом случае для монодисперсных растворов, нормированная корреляционная функция флуктуации интенсивности имеет вид

$$G(\tau) = a \exp\left(\frac{-2\tau}{t_c}\right) + b, \quad (2)$$

где, в соответствии с решением уравнения диффузии, обратное время корреляции равно

$$\frac{1}{t_c} = D_t q^2. \quad (3)$$

Волновой вектор флуктуаций концентрации описывается выражением:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right). \quad (4)$$

В выражениях (2)–(4): a и b — экспериментальные константы; n — показатель преломления жидкости, в которой взвешены дисперсные частицы; λ — длина волны лазерного света и θ — угол рассеяния.

Из коэффициента диффузии для монодисперсного раствора, содержащего сферические частицы, по формуле Стокса—Эйнштейна находим гидродинамический радиус R_h :

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (5)$$

где k_B — константа Больцмана, T — абсолютная температура и η — сдвиговая вязкость среды, в которой взвешены частицы радиуса R .

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для приготовления образцов использовался калий-фосфатный буфер (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , 1М). Концентрация коллагена в растворе составляла 0.03 мг/мл, концентрация коллагеназы — 0.3 мг/мл. Ионная сила раствора при добавлении солей ($CaCl_2$, $CrCl_3$) — $\mu = 0.03$ моль/л. Образцы готовились в лабораторных условиях непосредственно перед проведением эксперимента, обрабатывались в ультразвуковой ванне с частотой 30 кГц в течение 2 мин.

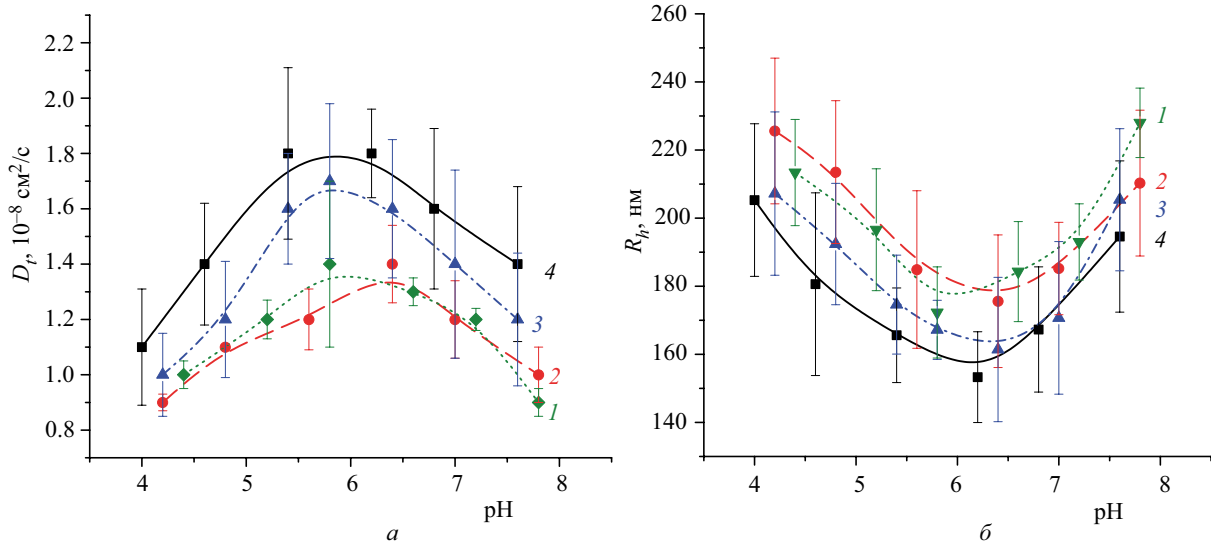


Рис. 1. pH-зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t (а) и гидродинамического радиуса R_h (б) в буферных растворах: 1 – коллаген + CrCl_3 , 2 – коллаген + CaCl_2 , 3 – коллаген + ZnCl_2 , 4 – коллаген

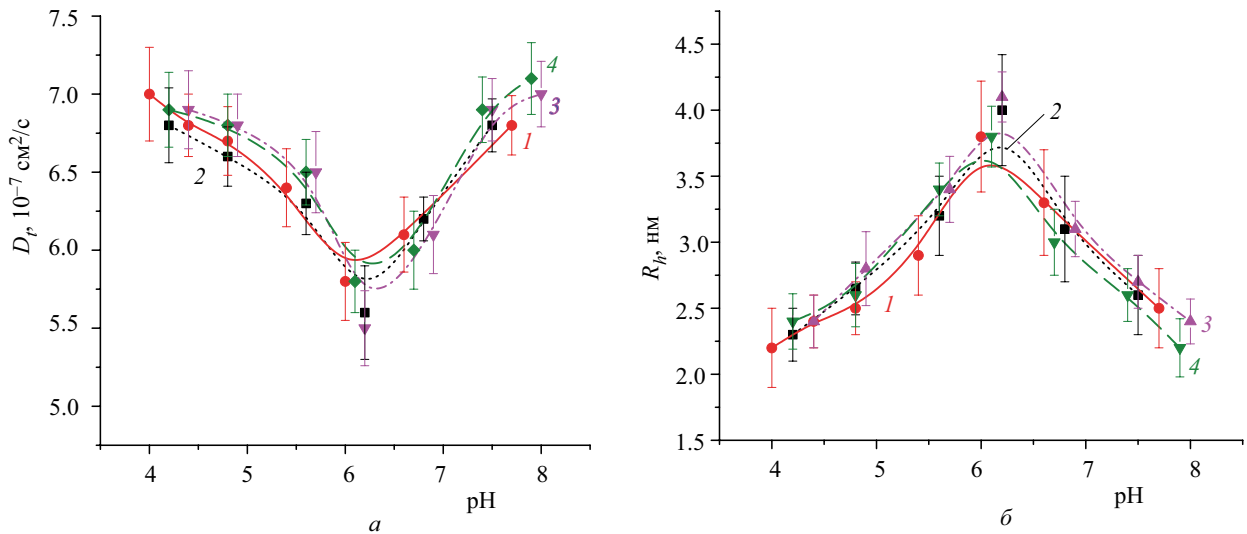


Рис. 2. pH-зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t (а) и гидродинамического радиуса R_h (б) в буферных растворах: 1 – коллагеназа + CaCl_2 , 2 – коллагеназа, 3 – коллагеназа + ZnCl_2 , 4 – коллагеназа + CrCl_3

Усреднение всех полученных данных проводилось по 3–5 измерениям (рис. 1–4). Показанные разбросы значений имеют смысл стандартного отклонения от среднего.

Хромированный коллаген был получен в результате добавления хлорида хрома в буферный раствор коллагена, далее использовался в экспериментах по истечении 40 мин.

Эксперименты проводились на оптической установке «Photosog-Complex» с диодным лазером с длиной волны 647 нм и мощностью 25 мВт. Температура в кювете с исследуемым раствором поддерживалась на уровне 30°C при помощи встроенного в прибор термостата [27].

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. С помощью метода динамического рассеяния света были получены pH-зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t (рис. 1, а) и гидродинамического радиуса R_h (рис. 1, б) молекул коллагена в буферных растворах.

Полученные зависимости имеют нелинейный вид, близкий к параболическому, с максимумом (рис. 1, а) и минимумом (рис. 1, б) в области изоэлектрической точки белка (рН 6.0).

Согласно теории Скэтчарда коэффициент межмолекулярного взаимодействия меняется с ростом суммарного заряда на макромолекуле по параболическому закону $\sim Z^2$ (эффект Доннана) с минимумом в изоэлектрической точке белков ($Z = 0$) [28]. В соответствии с формулой $D_t = D_0\{1 + (2BM - [\eta])c\}$ коэффициент D_t зависит от коэффициента межмолекулярного взаимодействия B , молекулярной массы M , характеристической вязкости η и концентрации c [23].

Вблизи изоэлектрической точки коллагена коэффициент D_t имеет максимальное значение, поскольку коэффициент B минимален, а характеристическая вязкость белка имеет достаточно большое значение ($[\eta] = 1150 \text{ см}^3/\text{г}$). При увеличении суммарного заряда на поверхности молекул модуль $|2BM - [\eta]|$ в формуле $D_t = D_0\{1 + (2BM - [\eta])c\}$ уменьшается,

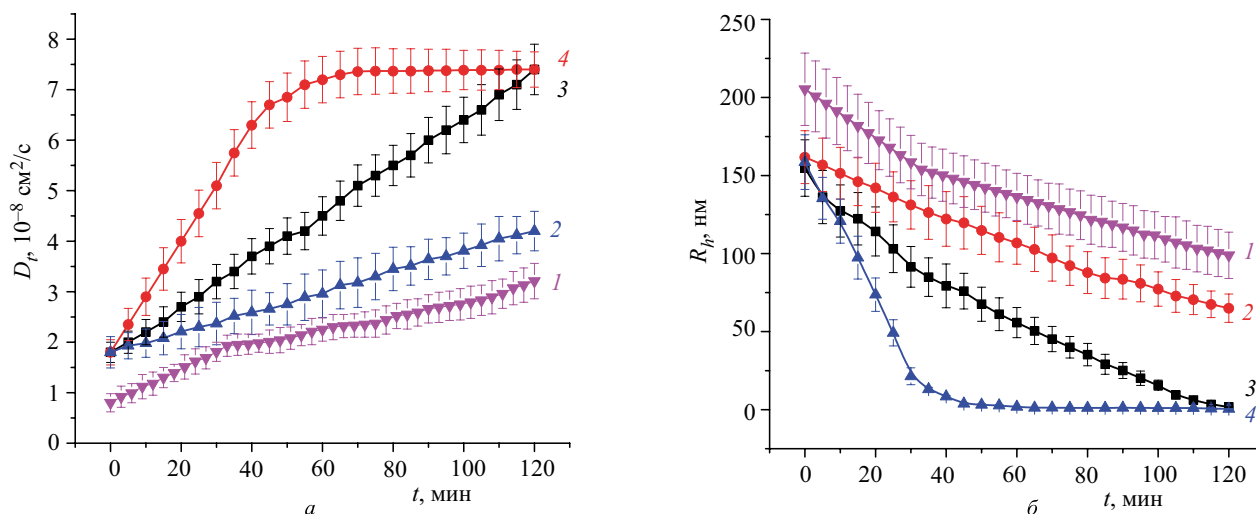


Рис. 3. Временные зависимости D_t (а) и R_h (б) молекул коллагена в буферных растворах для смесей: 1 — хромированный коллаген + коллагеназа + CaCl_2 , 2 — коллаген + коллагеназа + CrCl_3 , 3 — коллаген + коллагеназа, 4 — коллаген + коллагеназа + CaCl_2

соответственно D_t коэффициент тоже уменьшается [28].

При добавлении солей в буферный раствор коллагена (CaCl_2 , ZnCl_2 , CrCl_3) параболический вид зависимостей с максимумом в области изоэлектрической точки белка сохраняется, что свидетельствует о незначительном влиянии ионов металлов на молекулы белка.

2. Далее в работе были получены рН-зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t (рис. 2, а) и гидродинамического радиуса R_h (рис. 2, б) молекул коллагеназы в буферных растворах.

Как видно из рисунков, зависимости имеют нелинейный вид, близкий к параболическому, с минимумом (рис. 2, а) и максимумом (рис. 2, б) в области изоэлектрической точки фермента (рН 6.0).

При сравнении рисунков 1, а и 2, а видно, что в растворах коллагеназы коэффициент трансляционной диффузии имеет минимум в области изоэлектрической точки, а не максимум, как в случае с коллагеном, поскольку, согласно формуле $D_t = D_0\{1 + (2BM - [\eta])c\}$ [23], основной вклад в значение D_t вносит не характеристическая вязкость (значение для коллагеназы $[\eta] = 0.6 \text{ см}^3/\text{г}$), а другие члены формулы. В связи с этим при увеличении суммарного заряда на поверхности молекул модуль $|2BM - [\eta]|$ увеличивается, соответственно коэффициент D_t тоже увеличивается.

При добавлении солей в буферный раствор коллагеназы (CaCl_2 , ZnCl_2 , CrCl_3) параболический вид зависимостей с минимумом в области изоэлектрической точки фермента сохраняется, что свидетельствует о незначительном влиянии ионов металлов на молекулы коллагеназы.

3. Также были получены временные зависимости изменения коэффициента трансляционной диффузии D_t (рис. 3, а) и гидродинамического радиуса R_h (рис. 2, б) в буферных растворах для смесей:

- 1) коллагена и коллагеназы;
- 2) коллагена и коллагеназы с добавлением хлорида кальция;
- 3) коллагена и коллагеназы с добавлением хлорида хрома;
- 4) хромированного коллагена и активированной коллагеназы ионами Ca^{2+} .

3) коллагена и коллагеназы с добавлением хлорида хрома;

4) хромированного коллагена и активированной коллагеназы ионами Ca^{2+} .

Из рис. 3, б видно, что при наличии хлорида кальция в течение первых 30 мин происходит более резкое уменьшение радиуса рассеивающих частиц, что указывает на усиление процесса биодеградации белка коллагена (кривая 4). В растворах, содержащих хлорид хрома, уменьшение R_h менее заметно (кривая 2). Далее для более точной оценки процесса были рассчитаны константы скорости данных реакций.

4. На основании полученных значений гидродинамического радиуса R_h молекул коллагена были построены временные зависимости $\ln R_h(t)$ для исследуемых смесей 1–4 для первых 40 мин (рис. 4). Поскольку процесс коллагенолиза является реакцией 1 порядка, логарифмическая зависимость $\ln R_h(t)$ будет иметь линейный вид [29].

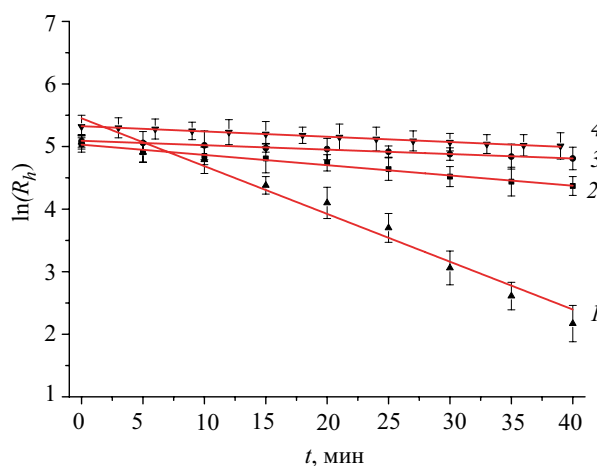


Рис. 4. Временные зависимости $\ln R_h(t)$ в буферных растворах для смесей: 1 — коллаген + коллагеназа + CaCl_2 , 2 — коллаген + коллагеназа, 3 — коллаген + коллагеназа + CrCl_3 , 4 — хромированный коллаген + коллагеназа + CaCl_2

Кинетическое уравнение для реакции первого порядка:

$$\ln C = \ln C_0 - k_1 t, \quad (6)$$

где C_0 — начальная концентрация вещества, а k_1 — коэффициент скорости реакции

$$k_1 = -\operatorname{tg} \alpha. \quad (7)$$

Полученные значения k_1 для исследуемых систем приведены в таблице.

Таблица. Значения констант скорости k_1 (мин⁻¹) для исследуемых растворов

Раствор	k_1
Коллаген + коллагеназа	0.02
Коллаген + коллагеназа + CaCl ₂	0.07
Коллаген + коллагеназа + CrCl ₃	0.006
Хромированный коллаген + коллагеназа + CaCl ₂	0.009

При добавлении соли CrCl₃ в буферный раствор коллагена и коллагеназы, константа скорости реакции уменьшается: $k_1 = 0.006$ мин⁻¹ (рис. 4, кривая 3) по сравнению с чистым раствором коллагена и коллагеназы, где $k_1 = 0.02$ мин⁻¹ (рис. 4, кривая 2). Скорость расщепления молекул коллагена снижается на 70% (или в 3.3 раза), что подтверждает влияние ионов хрома на упрочнение структуры белка. Это связано с образованием поперечных водородных связей между положительно заряженными (катионными) комплексами и отрицательно заряженным белком, которые упрочняют структуру коллагена, в результате чего повышается его устойчивость к действию фермента.

В свою очередь бактериальная коллагеназа изначально содержит ионы кальция, которые отвечают за формирование третичной структуры молекулы. При добавлении соли CaCl₂ в раствор, содержащий коллагеназу, ионы Ca²⁺ занимают все свои оставшиеся позиции и формируют наибольшее количество центров активности. В результате скорость реакции увеличивается на 250% (или в 3.5 раза) $k_1 = 0.07$ мин⁻¹ (рис. 4, кривая 1) в сравнении с чистым раствором коллагена и коллагеназы.

При взаимодействии заранее хромированного коллагена с активированной коллагеназой (ионами Ca²⁺) скорость реакции уменьшается на 87% (или в 8 раз) ($k_1 = 0.009$ мин⁻¹) (рис. 4, кривая 4) по сравнению с раствором коллагена и коллагеназы при наличии CaCl₂ ($k_1 = 0.07$ мин⁻¹) (рис. 4, кривая 1). Однако в сравнении с раствором коллагена и коллагеназы, содержащем соль CrCl₃, скорость реакции увеличивается на 50% (или в 1.5 раза) ($k_1 = 0.006$ мин⁻¹, рис. 4, кривая 2). В результате можно сделать вывод, что хромированный коллаген менее подвержен биодegradации под воздействием фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате подготовительной работы было выявлено, что ионы кальция, цинка и хрома не оказывают значительного влияния на молекулы коллагена

и коллагеназы в буферных растворах по отдельности. Полученные рН-зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t и гидродинамического радиуса R_h для исследуемых молекул имеют нелинейный вид (близкий к параболическому) с минимумами и максимумами в изоэлектрической точке соответственно (рI 6.0).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что ионы хрома действительно упрочняют структуру коллагена и скорость расщепления молекул белка снижается на 70%. Увеличить скорость реакции на 50% можно путем добавления в растворы ионов кальция. Однако, та скорость биодegradации коллагеновых волокон, которая наблюдается в чистом растворе все равно не достигается. Максимальная скорость расщепления молекул белка получается путем активации коллагеназы ионами Ca²⁺.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазуров В. И. Биохимия коллагеновых белков. М.: Медицина, 1974.
2. Bauer R., Wilson J. J., Philominathan S. T. L., Davis D. // J. Bacteriol. 2013. **195**, № 2. P. 318.
3. Schlage P., Kockmann T., Kizhakkedathu J. N. // Proteomics. 2015. **15**, N 14. P. 2491.
4. Müller-Herrmann S., Scheibel T. // ACS Biomater Sci Eng. 2015. **1**, № 4. P. 247.
5. Nezafat N., Negahdaripour M., Gholami A., Ghasebi Y. // Trends Pharm Sci. 2015. **1**, N 4. P. 213.
6. Alipour H., Raz A. // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2016. **6**, N 11. P. 975.
7. Nanchahal J., Midwood K. S., inventors; Isis Innovation Limited, assignee. Treatment for Dupuytren's disease. United States patent US 9138458 B2. 2015. Sep 22.
8. Peak T. C., Mitchell G. C., Yafi F. A., Hellstrom W. J. // Biologics. 2015. **9**. P. 107.
9. Wilson J. J., Matsushita O., Okabe A., Sakon J. // The EMBO J. 2003. **22**, N 8. P. 1743.
10. Deshmukh Sh. N., Dive Al. M., Moharil R. // J Oral Maxillofac Pathol. 2016. May. **20**, № 2. P. 276.
11. Matthew F. P., Lin A. C., Goh M. C. // International Biodeterioration & Biodegradation. 2002. **50**. P. 1.
12. Сергеева И. А., Хитрина К. А., Крот А. Р. и др. // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2017. **17**, № 3. С. 171.
13. Adeleke H. Aguda, Preeti Panwara, Xin Du Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K. University of California, 2014.
14. Ritchie R., Ritchie R. O., Wen Yang, Meyers M. Structural Architectures with Toughening Mechanisms in Nature: A Review of the Materials Science of Type-I Collagenous Materials. Progress in Materials Science, 2019.
15. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/C8919/>
16. Adhikari Ar. S., Glassey E., Dunn A. R. Conformational Dynamics. Conformational dynamics accompanying the proteolytic degradation of trimeric collagen I by collagenases. 2012.
17. Справочник химика. **21**. Химия и химическая технология. [С. 244].

18. Ohbayashi N., Yamagata N., Goto M., Watanabe K. Enhancement of the Structural Stability of Full-Length Clostridial Collagenase by Calcium Ions. 2012.
19. Nanchahal J., Midwood K.S., inventors; Isis Innovation Limited, assignee. Treatment for Dupuytren's disease. United States patent US 9138458 B2. 2015 Sep 22.
20. Wilson J.J., Matsushita O., Okabe A., Sakon J. // *The EMBO J.* 2003. **22**, N 8. P. 1743.
21. Angleton E.L., Van Wart H.E. // *Biochemistry.* 1988. **27**. P. 7406.
22. Eckhard U., Schönauer E., Nüss D., Brandstetter H. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. **18**, N 10. P. 1109.
23. Масленникова А.Д., Сергеева И.А., Петрова Г.П. // *Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон.* 2013. № 2. С. 73. (Maslennikova A.D., Sergeeva I.A., Petrova G.P. // *Moscow Univ. Phys. Bull.* 2013. **68**, N 2. P. 154.)
24. Mandl L., MacLennan J.D., Howes E.L., DeBellis R.H. // *J. Clin. Invest.* 1953. **32**. P. 1323.
25. Kammins G.Z., Paik E.R. Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy. Plenum, New York, 1974.
26. Pike E.R., Ab J.B. Light Scattering and Photon Correlation Spectroscopy. Kluwer Academic Publishers, 1997.
27. Компания Photocor Complex : сайт. URL: <http://www.photocor.ru>
28. Петрова Г.П. Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов. Ч. 1. М.: Физ. фак-т МГУ им. М. В. Ломоносова, 2008.
29. Леванов А.В., Антипенко Э.Е. Введение в химическую кинетику. 2006.

The Features of Interaction of Collagen and Collagenase Molecules in the Presence of Chromium and Calcium Ions in Solutions by Dynamic Light Scattering

A. V. Petrova^a, I. A. Sergeeva^b, G. P. Petrova, A. V. Mitrofanova

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Department of molecular processes and extreme states of matter. Moscow 119991, Russia.

E-mail: ^aav.sukneva@physics.msu.ru, ^bsergeeva@physics.msu.ru.

The pH dependences of the translational diffusion coefficient D_t and hydrodynamic radius R_h in buffer solutions of collagen and collagenase in the presence of calcium, zinc, and chromium ions have been studied using the method of dynamic light scattering. An insignificant influence of metal ions on the studied molecules has been revealed. The time dependences of D_t and R_h in solutions of collagen and collagenase in the presence of an activator (Ca^{2+}) and tanning agent (Cr^{3+}) are measured, and the rate constants of protein cleavage are calculated. It has been found that the addition of chromium ions slows the collagenolysis process by 70% (or 3.3 times) ($k_1 = 0.006 \text{ (min}^{-1}\text{)}$), compared to pure solution collagen and collagenase ($k_1 = 0.02 \text{ (min}^{-1}\text{)}$). In turn, the presence of calcium ions accelerates the reaction by 250% (or 3.5 times) ($k_1 = 0.07 \text{ (min}^{-1}\text{)}$). However, prechromated collagen is less susceptible to biodegradation by activated collagenase ($k_1 = 0.009 \text{ (min}^{-1}\text{)}$).

Keywords: type I collagen, bacterial collagenase, calcium chloride, chromium chloride, dynamic light scattering method, translational diffusion coefficient, hydrodynamic radius, collagenolysis, *Clostridium histolyticum*.

PACS: 42.55, 39.90.

Received 10 July 2020.

English version: *Moscow University Physics Bulletin.* 2020. **75**, No. 6. Pp. 611–617.

Сведения об авторах

1. Петрова Анна Валерьевна — аспирант; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: av.sukneva@physics.msu.ru.
2. Сергеева Ирина Александровна — канд. физ.-мат. наук, доцент; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: sergeeva@physics.msu.ru.
3. Петрова Галина Петровна — доктор физ.-мат. наук, профессор; e-mail: petrova.phys@gmail.com.
4. Митрофанова Анна Владимировна — магистр; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: mitrofanova.av15@physics.msu.ru.