



УДК 532.77.11; 537.635

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ДИНАМИКИ МОЛЕКУЛ В РАСТВОРАХ КОЛЛАГЕНА И КОЛЛАГЕНАЗЫ МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА



И. А. Сергеева, К. А. Хитрина, А. Р. Крот, А. В. Сукнева, Г. П. Петрова

Сергеева Ирина Александровна, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, sergeeva@physics.msu.ru

Хитрина Ксения Александровна, аспирант кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, ksensanna@gmail.com

Крот Алексей Романович, бакалавр кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, ar.krot@physics.msu.ru

Сукнева Анна Валерьевна, магистр кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, av.sukneva@physics.msu.ru

Петрова Галина Петровна, доктор физико-математических наук, профессор кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, petrova@phys.msu.ru

Бактериальная коллагеназа *Clostridium histolyticum* используется в современной медицине для лечения различных заболеваний. Важным ее свойством является способность к биодegradации основного белка межклеточного матрикса – коллагена. Спектрально-оптические методы, такие как фотонно-корреляционная спектроскопия, позволяют исследовать растворы молекул коллагена и коллагеназы в условиях, максимально приближенных к физиологическим. Моделировать различные процессы, протекающие в организме человека, можно путем изменения различных параметров среды: температуры, pH раствора, тип растворителя и добавок активаторов/ингибиторов фермента. На основе зависимости коэффициента трансляционной диффузии от pH среды, полученной методом динамического рассеяния света, определена изоэлектрическая точка бактериальной коллагеназы СНС (*Clostridium histolyticum*) типа IA (pI 6.0). Показано, что добавление в водный раствор бактериальной коллагеназы СНС хлорида кальция приводит к увеличению подвижности молекул фермента. Изучены временные зависимости коэффициента трансляционной диффузии и гидродинамического радиуса в растворах на основе смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl буфере без добавок и с добавлением активатора – хлорида кальция. Из полученных данных следует, что добавление ионов кальция к растворам приводит к увеличению скорости биодegradации коллагена почти в 2 раза.

Ключевые слова: коллаген I типа, бактериальная коллагеназа, хлорид кальция, активатор, биодegradация, динамическое рассеяние света.

DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-171-178

Введение

Препараты на основе ферментов используются в разных областях современной медицины: в хирургии, гинекологии, отоларингологии, офтальмологии, а также в дерматологии и косметологии. Одним из таких ферментов является бактериальная коллагеназа, вырабатываемая некоторыми микроорганизмами, например, *Clostridium histolyticum* СНС (возбудитель газовой гангрены).

Бактериальная коллагеназа СНС используется в клинической практике: для удаления некротических тканей из ран на микроскопическом уровне, лечения заболеваний глаз в офтальмологии, ускорения рассасывания швов из кетгута и расщепления переродившейся рубцовой ткани сухожилий при болезни Дюпюитрена [1, 2].

Важным свойством коллагеназы является ее способность к биодegradации основного белка межклеточного матрикса – коллагена. Бактериальная коллагеназа может расщеплять почти все типы коллагенов и способна разрушать не только пептидную цепь белка, но и многочисленные связи внутри тройных спиралей молекулы [3].

Структурные изменения коллагеновых фибрилл под воздействием коллагеназы с течением времени хорошо исследованы с помощью микроскопии, а также определена скорость дegradации белка [4]. Полученные результаты наглядно демонстрируют процесс расщепления коллагеновых волокон и позволяют количественно оценить скорость изменения диаметра коллагеновых фибрилл, однако плохо согласуются с результатами, полученными в условиях, приближенных к физиологическим [4].

Поскольку расщепление коллагена под действием фермента коллагеназы в растворах происходит в среднем за 60 мин, метод фотонно-корреляционной спектроскопии позволяет отслеживать динамику данного процесса в режиме реального времени. Моделировать различные процессы, протекающие в организме человека, можно путем изменения параметров среды: температуры, pH раствора, типа растворителя и добавок активаторов/ингибиторов фермента.



В данной работе с помощью метода динамического рассеяния света исследовались растворы коллагена I типа и бактериальной коллагеназы СНС типа IA с добавлением активатора хлорида кальция. Метод фотонно-корреляционной спектроскопии позволяет определять автокорреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света, а при дальнейшей обработке получить распределения размеров частиц R_h или распределения коэффициентов трансляционной диффузии D_t .

1. Метод фотонно-корреляционной спектроскопии

Молекулярные движения макромолекул белков под воздействием тепловой энергии определяют динамику флуктуаций интенсивности рассеянного света в исследуемых системах. Эти движения представляют собой комбинацию трансляционной и вращательной диффузий, характер которых зависит от эффективных размеров и формы рассеивающих макромолекул, а также от их межмолекулярного электростатического взаимодействия, обусловленного величиной и характером пространственного распределения зарядовых центров на поверхности молекулы [5, 6].

Метод фотонно-корреляционной спектроскопии, известный также как метод динамического рассеяния света, позволяет определять автокорреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света. При дальнейшей обработке становится возможным получение распределения размеров частиц или распределения коэффициентов трансляционной диффузии.

Флуктуации интенсивности рассеянного света возникают из-за неоднородности диэлектрической проницаемости среды. В жидкости они напрямую связаны с флуктуациями локальной концентрации частиц, обусловленными броуновским движением макромолекул.

В простейшем случае раствора, содержащего не взаимодействующие сферические частицы одного размера, спектр мощности фототока представляет собой кривую Лоренца [6] с полушириной Γ , а корреляционная функция интенсивности – экспоненту с временем релаксации $\tau_{\text{рел}} = 1/\Gamma$:

$$g^{(2)}(t) = pe^{-2\Gamma t} + 1. \quad (1)$$

Коэффициент Γ связан с физическими параметрами среды и условиями эксперимента следующим образом:

$$\Gamma = q^2 D_t, \quad (2)$$

$$q = k_i - k_s = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (3)$$

$$D_t = \frac{KT}{6\pi\eta R_h}, \quad (4)$$

где D_t – коэффициент трансляционной диффузии частиц, k_i – волновой вектор падающего излучения, k_s – волновой вектор рассеянного излучения, n – показатель преломления среды, λ – длина волны рассеянного излучения, θ – угол рассеяния, T – абсолютная температура среды, K – постоянная Больцмана, η – вязкость раствора, R_h – гидродинамический радиус частицы.

В случае полидисперсных растворов, когда размеры частиц различаются, спектр фототока представляет собой непрерывное множество (интеграл) кривых Лоренца с разными полуширинами. Следовательно, для нахождения распределения частиц по размерам (коэффициентам диффузии) необходимо решать обратную спектральную задачу в виде интегрального уравнения с лоренцевым ядром.

$$g^{(2)}(t) = [g^{(1)}(t)]^2 + 1 + \zeta(t), \quad (5)$$

$$g^{(1)}(t) = \int_0^{\infty} P(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma, \quad (6)$$

где $g^{(1)}(t)$ – нормированная автокорреляционная функция сигнала, а $g^{(2)}(t)$ – нормированная автокорреляционная функция интенсивности, $\zeta(t)$ – ошибка, связанная со стохастической природой самого сигнала [6].

Если пренебречь влиянием постоянного экспериментального шума $\zeta(t)$ уравнение (5), известное как соотношение Зигерта, позволит вычислить $g^{(1)}(t)$ через $g^{(2)}(t)$, накапливаемую коррелятором во время эксперимента.

Интегральное уравнение (6) формирует основной принцип обработки данных в фотонно-корреляционной спектроскопии. В проводимых экспериментах обработка результатов производилась с помощью программного обеспечения DYNALS (Израиль, SoftScientific), в котором поиск приближенного решения уравнения (6) осуществляется с помощью метода регуляризации А. Н. Тихонова для интегральных уравнений.

2. Исследуемые вещества

2.1. Коллаген

Коллаген играет важную роль в эволюции сложных организмов, формируя прочный нерастворимый каркас [7]. Это основной структурный



белок межклеточного матрикса. Он составляет от 25 до 33% общего количества белка в организме, т.е. около 6% массы тела. Название «коллаген» объединяет семейство близкородственных фибриллярных белков, которые являются основным белковым элементом кожи, костей, сухожилий, хряща, кровеносных сосудов, зубов. В разных тканях преобладают разные типы коллагена, а это, в свою очередь, определяется той ролью, которую он играет в конкретном органе или ткани [8].

В настоящее время известно 19 типов коллагена, которые отличаются друг от друга по первичной структуре пептидных цепей, функциям и локализации в организме. Наиболее распространен коллаген I типа. Его структура представляет собой три левозакрученных альфа-полипептида, свернутые в тройную правозакрученную спираль, стабилизированную водородными связями (между цепочками и внутри цепочек) [9].

В данной работе использовался коллаген I типа из кожи телят производства компании Sigma-Aldrich (США). Молекулярная масса белка около 300 кДа, длина молекулы составляет 300 нм.

Как и любой белок, коллаген функционирует в организме определенное время. Его относят к медленно обменивающимся белкам ($T_{1/2}$ составляет недели или месяцы). Разрушение коллагеновых волокон осуществляется активными формами кислорода или ферментативно (гидролитически) [8].

Нативный коллаген не гидролизуется обычными пептидгидролазами. Основной фермент его катаболизма – коллагеназа, которая расщепляет пептидные связи в определенных участках молекулы.

2.2. Коллагеназа

Известны два типа коллагеназы: тканевая и бактериальная. Тканевая коллагеназа присутствует у человека в различных органах и тканях. Она обладает высокой специфичностью, перерезает тройную спираль коллагена в определенном месте, примерно на 1/4 расстояния от С-конца, между остатками глицина и лейцина или изолейцина [8].

Образующиеся фрагменты коллагена растворимы в воде. При температуре тела они спонтанно денатурируют и становятся доступными для действия других протеолитических ферментов.

Бактериальные коллагеназы менее избирательны и расщепляют от 150 до 200 связей в каждой полипептидной цепи коллагена. Они

гидролизуют неполярные участки молекулы белка, разрывая связь X-Гли в последовательности -R-Про-X-Гли (X – нейтральная аминокислота) (рис. 1).

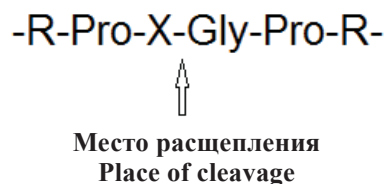


Рис. 1. Принцип действия бактериальной коллагеназы на коллаген

Fig. 1. The action of bacterial collagenase on collagen

Бактериальная коллагеназа не демонстрирует выраженного снижения ферментной активности и является наиболее подходящей для длительных экспериментов [10].

В настоящее время известно 7 форм коллагеназы, синтезируемой возбудителем газовой гангрены *Clostridium Hystolyticum*. Молярные массы коллагеназ СНС варьируются от 68 до 130 кДа. Изоэлектрическая точка находится в интервале pH 5.4–6.5 [11]. Активаторами коллагеназы являются ионы кальция и цинка [12, 13]. Zn^{2+} отвечает за активацию амидной группы фермента, а Ca^{2+} – за формирование третичной структуры молекулы [14].

В данной работе использовалась бактериальная коллагеназа типа IA производства компании Sigma-Aldrich, синтезируемая возбудителем газовой гангрены *Clostridium histolyticum* (молекулярная масса 79 кДа).

3. Приготовление образцов

Для измерения pH-зависимостей использовался водный раствор коллагеназы с концентрацией 0.2 мг/мл. Необходимое значение pH раствора достигалось путем добавления кислоты HCl или щелочи KOH.

Для исследования растворов на основе смеси коллагена и коллагеназы использовался буфер Tris-HCl (10^{-2} М, pH 7.0). Концентрация коллагена в растворе составляла 0,1 мг/мл, концентрация коллагеназы – 0.2 мг/мл. Ионная сила раствора при добавлении хлорида кальция – 0.03 моль/л.

Все образцы перед измерениями обрабатывались в ультразвуковой ванне с частотой 30 кГц в течение 1 мин.

Эксперименты проводились на оптической установке «Photocor-Complex» с диодным лазе-



ром 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 [15].

4. Экспериментальные результаты

С помощью метода динамического рассеяния света были получены зависимости коэффициента трансляционной диффузии рассеивающих частиц D_t от pH в водных растворах коллагеназы (рис. 2).

Известно, что коэффициент трансляционной диффузии D_t линейно зависит от коэффициента межмолекулярного взаимодействия B [16]:

$$D_t = D_0\{1 + (2BM - [\eta])c\}. \quad (7)$$

Коэффициент взаимодействия меняется с ростом суммарного заряда на белке по параболическому закону (эффект Доннана) с минимумом в изоэлектрической точке [17]. Таким образом, из полученных данных следует, что изоэлектрическая точка для коллагеназы типа IA, синтезируемой *Clostridium histolyticum*, приходится на pH 6.0.

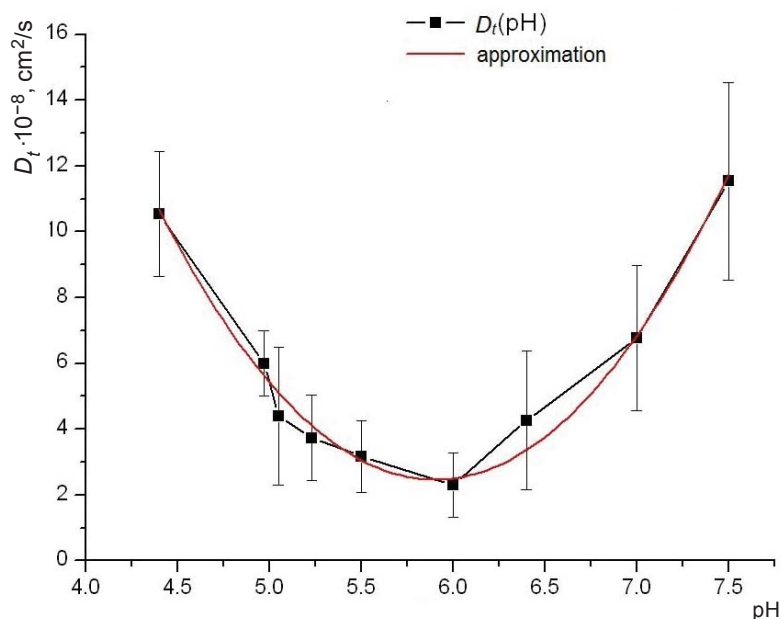


Рис. 2. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии рассеивающих частиц D_t от pH в водных растворах коллагеназы (аппроксимирующая функция вида $y=B_1 \cdot x+B_2 \cdot x^2$)

Fig. 2. Dependence of translational diffusion coefficient of scattering particles D_t on pH in water solutions of collagenase (approximating function of the form $y=B_1 \cdot x+B_2 \cdot x^2$)

С помощью метода динамического рассеяния света были проведены эксперименты по измерению коэффициента трансляционной диффузии молекул коллагеназы в водных растворах при добавлении активатора CaCl_2 (рис. 3).

Из рис. 3 видно, что с увеличением концентрации хлорида кальция в водном растворе коэффициент трансляционной диффузии рассеивающих частиц возрастает (подвижность молекул растёт).

Также были получены временные зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t рассеивающих частиц в растворах на основе смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl буфере

без добавок (рис. 4, 1) и с добавлением активатора хлорида кальция (рис. 4, 2).

Значение коэффициента трансляционной диффузии в чистом Tris-HCl растворе коллагена и коллагеназы увеличилось за 60 мин с $(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$ до $(4.6 \pm 0.5) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ и далее практически не менялось. При добавлении в раствор хлорида кальция значение D_t в течение первых 30 мин изменилось с $(1.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$ до $(14.0 \pm 2.1) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$, после чего его рост замедлился.

С помощью программы DYNALS были рассчитаны зависимости гидродинамического радиуса R_h рассеивающих частиц от времени

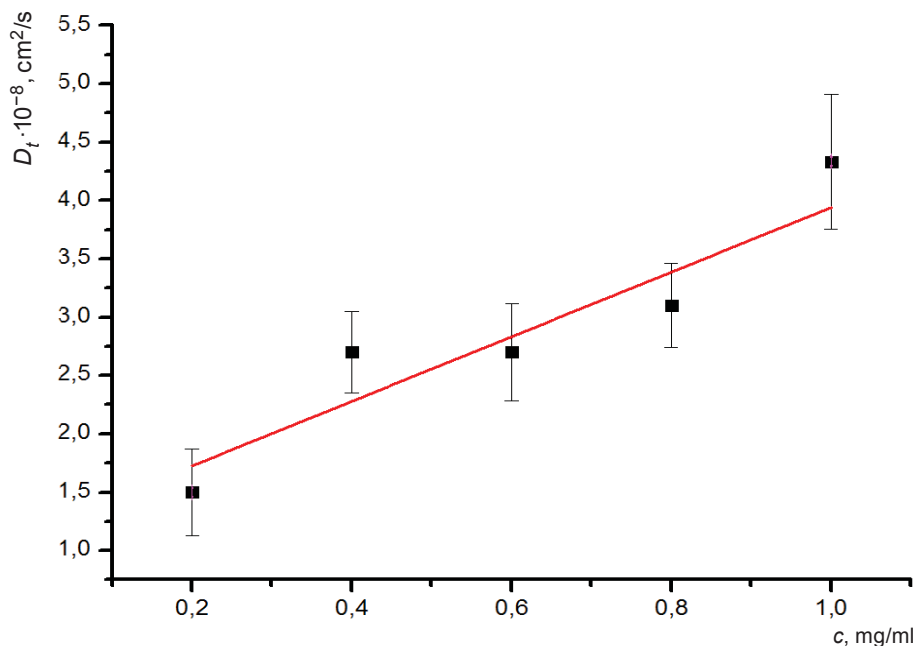


Рис. 3. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии D_t от концентрации активатора CaCl_2 в водных растворах коллагеназы

Fig. 3. Dependence of translational diffusion coefficient D_t on CaCl_2 activator concentration in water solutions of collagenase

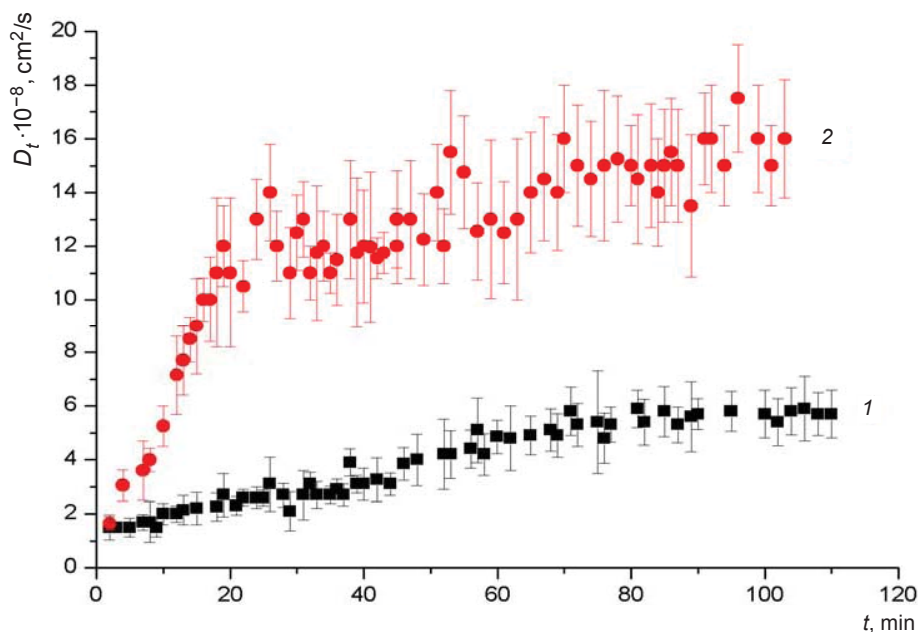


Рис. 4. Временная зависимость коэффициента трансляционной диффузии D_t для растворов на основе смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl буфере без добавок (1) и с добавлением хлорида кальция (2)

Fig. 4. Translation diffusion coefficient (D_t) on time dependencies of scattering particles in “collagen+collagenase” Tris-HCl buffer solutions (1) and with added CaCl_2 (2)

для растворов смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl без добавок (рис. 5, 1) и с добавлением хлорида кальция (рис. 5, 2).

Из рис. 5 видно, что размер рассеивающих частиц уменьшается со временем в обоих случаях. Значение гидродинамического радиуса

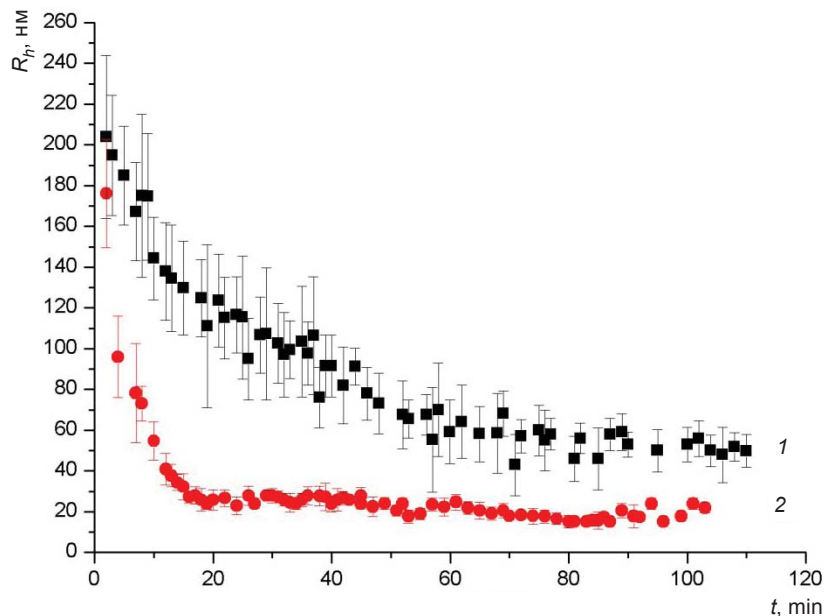


Рис. 5. Временная зависимость гидродинамического радиуса R_h для растворов на основе смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl буфере без добавок (1) и с добавлением хлорида кальция (2)

Fig. 5. Hydrodynamic radius (R_h) on time dependencies of scattering particles in “collagen+collagenase” Tris-HCl buffer solutions (1) and with added CaCl_2 (2)

для растворов на основе смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl буфере без добавок изменилось за 30 мин от 200 ± 25 до 110 ± 15 нм, а с добавлением активатора хлорида кальция – от 180 ± 20 до 27 ± 3 нм.

Наиболее интенсивное расщепление молекул коллагена происходит в течение первых 30 мин при добавлении в растворы ионов кальция (рис. 4, 2 и рис. 5, 2). В данном случае ионы Ca^{2+} включаются в активный центр фермента и обеспечивают конформацию, необходимую для связывания с пептидной цепью белка, что приводит к увеличению скорости расщепления коллагена [12].

Результаты и выводы

Полученные результаты дают возможность сделать вывод о том, что для бактериальной коллагеназы СНС типа IA зависимость коэффициента трансляционной диффузии от pH среды имеет нелинейный вид (близкий к параболическому) и достигает минимального значения в изоэлектрической точке (pH 6.0).

Активация бактериальной коллагеназы СНС в водном растворе хлоридом кальция приводит к увеличению подвижности молекул фермента.

Показана возможность применения метода динамического рассеяния света для определения

скорости биodeградации коллагена под воздействием коллагеназы в режиме реального времени в растворах. При добавлении хлорида кальция основное расщепление коллагеновых волокон происходит в течение первых 30 мин, в то время как в чистом растворе (без активатора) - в течение первых 60 мин (скорость увеличивается в 2 раза).

Список литературы

1. Hay D. C., Louie D. L., Earp B. E., Kaplan F. T., Akelman E., Blazar P. E. Surgical findings in the treatment of Dupuytren's disease after initial treatment with clostridial collagenase (Xiaflex) // *Hand Surg. Eur.* 2014. Vol. 39, № 5. P. 463–465.
2. Syed F., Thomas A. N., Singh S., Kolluru V., Emeigh Hart S. H., Bayat A. *In vitro* study of novel collagenase (Xiaflex) on Dupuytren's Disease fibroblasts displays unique drug related properties // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7, № 2. e31430. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00774.x
3. Ohbayashi N., Yamagata N., Goto M., Watanabe K., Yamagata Y., Murayama K. Enhancement of the structural stability of full-length Clostridial Collagenase by calcium ions // *Applied and Environmental Microbiology.* 2012. Vol. 78, № 16. P.5839-5844. DOI: 10.1128/AEM.00808-12.
4. Matthew F. P., Lin A. C., Goh M. C. Real-time enzymatic biodegradation of collagen fibrils monitored by atomic force microscopy // *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2002. Vol. 50. P. 1–10.



5. Петрова Г. П., Петрусевич Ю. М. Сильные электростатические взаимодействия заряженных биополимеров в водных растворах // Биомедицинская радиоэлектроника. 2000. № 3. С. 41–47.
6. Камминс Г., Пайк Э. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. М. : Книжный дом «Университет», 2002. 584 с.
7. Hulmes D. J. S. The collagen superfamily – diverse structures and assemblies // Essays in Biochemistry. 1992. Vol. 27. P. 49–67.
8. Северин Е. С. Биохимия : учебник для вузов. М. : Гэотар-Медиа, 2003. 779 с.
9. Kun Wu, Wentao Liu, Guoying Li. The aggregation behavior of native collagen in dilute solution studied by intrinsic fluorescence and external probing // Spectrochimica Acta. Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2013. Vol. 102. P. 186–193.
10. Radu F. A., Bause M., Knabner P., Friess W., Metz-macher I. Numerical simulation of drug release from collagen matrices by Enzymatic degradation // Computing and Visualization in Science. 2009. Vol. 12, № 8. P. 409–420. DOI: 10.1007/s00791-008-0118-9.
11. Mandl L., MacLennan J. D., Howes E. L., DeBellis R. H., Sohler A. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from Clostridium histolyticum // J. Clin. Invest. 1953. Vol. 32. P. 1323–1329.
12. Wilson J. J., Matsushita O., Okabe A., Sakon J. A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation // The EMBO J. 2003. Vol. 22, № 8. P. 1743–1752. DOI 10.1093/emboj/cdg172.
13. Angleton E. L., Van Wart H. E. Preparation and Reconstitution with Divalent Metal Ions of Class I and Class II Clostridium histolyticum Apocollagenases // Biochemistry. 1988. Vol. 27. P. 7406–7412.
14. Eckhard U., Schönauer E., Nüss D., Brandstetter H. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis // Nat. Struct. Mol. Biol. 2011. Vol. 18, № 10. P. 1109–1115. DOI: 10.1038/nsmb.2127
15. Компания Photocor Complex : сайт. URL: <http://www.photocor.ru> (дата обращения: 10.03.2017).
16. Масленникова А. Д., Сергеева И. А., Петрова Г. П. Влияние ионов тяжелых металлов на молекулярно-динамические характеристики молекул коллагена в водных растворах // Вестн. Моск. ун-та. Физика. Астрономия. 2013. № 2. С. 73–78.
17. Петрова Г. П. Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов : в 2 ч. Ч. 1. М. : Физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 2008. 71 с.

Образец для цитирования:

Сергеева И. А., Хитрина К. А., Крот А. Р., Сукнева А. В., Петрова Г. П. Исследование взаимодействия и динамики молекул в растворах коллагена и коллагеназы методом динамического рассеяния света // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 171–178. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-171-178.

Investigation of the Interaction and Dynamics of Collagen and Collagenase Molecules in Solutions by Dynamic Light Scattering

I. A. Sergeeva, K. A. Khitrina,
A. R. Krot, A. V. Sukneva, G. P. Petrova

Irina A. Sergeeva, ORCID 0000-0002-3492-133X, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, sergeeva@physics.msu.ru

Ksenia A. Khitrina, ORCID 0000-0003-0021-9822, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, ksensanna@gmail.com

Aleksey R. Krot, ORCID 0000-0001-6360-7203, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, ar.krot@physics.msu.ru

Anna V. Sukneva, ORCID 0000-0003-2846-5718, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, av.sukneva@physics.msu.ru

Galina P. Petrova, ORCID 0000-0002-1823-5081, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, petrova@phys.msu.ru

Background and Objectives: Bacterial collagenase from Clostridium histolyticum is widely used as a clinical tool in the nonsurgical treatment of Dupuytren's disease in eye's disorders treatment, for enzymatic debridement, for accelerated resorption of catgut sutures. Collagenase main feature is its ability to digest key protein of the animal extracellular matrix – collagen. Dynamic Light Scattering (DLS) technique allows for investigation of collagen and collagenase solutions in conditions close to physiological. Varying the solution parameters (pH, temperature, solvent type) and adding activators or inhibitors of collagenase one can simulate the processes in living organisms. **Materials and Methods:** DLS method enables one to assess the translation diffusion coefficient of particles in solutions by analyzing the characteristic time of scattered light intensity fluctuations. Experiments were carried out using the photon-correlation spectrometer Photocor-Complex with diode laser (wavelength 647 nm, power 25 mW). Collagen type I from calf skin and Bacterial collagenase from Clostridium histolyticum type IA produced by Sigma-Aldrich were used. **Results:** Using the DLS method we have experimentally obtained: dependence of the translation diffusion coefficient dependence on pH in collagenase water solutions (pI 6.0), translation diffusion coefficient on time dependencies of scattering particles in "collagen+collagenase" Tris-HCl buffer solution without additives and with addition of CaCl₂. **Conclusion:** DLS enables us to monitor the dynamics of collagen biodegradation in real time. Different physiological states can be simulated for in-vitro investigation by varying temperature, solution formula and collagen-collagenase ratio.



Key words: collagen type I, bacterial collagenase, calcium chloride, activator, biodegradation, fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering.

References

1. Hay D. C., Louie D. L., Earp B. E., Kaplan F. T., Akelman E., Blazar P. E. Surgical findings in the treatment of Dupuytren's disease after initial treatment with clostridial collagenase (Xiaflex). *Hand Surg. Eur.*, 2014, vol. 39, no. 5, pp. 463–465.
2. Syed F., Thomas A. N., Singh S., Kolluru V., Emeigh Hart S. H., Bayat A. In vitro study of novel collagenase (Xiaflex) on Dupuytren's Disease fibroblasts displays unique drug related properties. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 2, p. e31430. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00774.x
3. Ohbayashi N., Yamagata N., Goto M., Watanabe K., Yamagata Y., Murayama K. Enhancement of the structural stability of full-length Clostridial Collagenase by calcium ions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, vol. 78, no. 16, pp. 5839–5844. DOI: 10.1128/AEM.00808-12.
4. Matthew F. P., Lin A. C., Goh M. C. Real-time enzymatic biodegradation of collagen fibrils monitored by atomic force microscopy. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2002, vol. 50, pp. 1–10.
5. Petrova G. P., Petrusovich Yu. M. Sil'nye elektrostatische vzaimodeistviia zariazhennykh biopolimerov v vodnykh rastvorakh. *Biomeditsinskaya radioelektronika*. [Biomedical electronics], 2000, no. 3, pp. 41–47 (in Russian).
6. Kammins G., Paik E. *Spektroskopiia opticheskogo smesheniia i korreliatsiia fotonov* [Spectroscopy of optical mixing and correlation of photons]. Moscow, Knizhnyi dom "Universitet", 2002. 584 p. (in Russian).
7. Hulmes D. J. S. The collagen superfamily – diverse structures and assemblies. *Essays in Biochemistry*, 1992, vol. 27, pp. 49–67.
8. Severin E. S. *Biokhimiia: Uchebnik dlia vuzov* [Biochemistry: Textbook for universities]. Moscow, Geotar-Media, 2003. 779 p. (in Russian).
9. Kun Wu, Wentao Liu, Guoying Li. The aggregation behavior of native collagen in dilute solution studied by intrinsic fluorescence and external probing. *Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, vol. 102, pp. 186–193.
10. Radu F. A., Bause M., Knabner P., Friess W., Metzmacher I. Numerical simulation of drug release from collagen matrices by enzymatic degradation. *Computing and Visualization in Science*, 2009, vol. 12, no. 8, pp. 409–420. DOI: 10.1007/s00791-008-0118-9.
11. Mandl L., MacLennan J. D., Howes E. L., DeBellis R. H., Sohler A. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Clostridium histolyticum*. *J. Clin. Invest.*, 1953, vol. 32, pp. 1323–1329.
12. Wilson J. J., Matsushita O., Okabe A., Sakon J. A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation. *The EMBO J.*, 2003, vol. 22, no. 8, pp. 1743–1752. DOI 10.1093/emboj/cdg172.
13. Angleton E. L., Van Wart H. E. Preparation and Reconstitution with Divalent Metal Ions of Class I and Class II *Clostridium histolyticum* Apocollagenases. *Biochemistry*, 1988, vol. 27, pp. 7406–7412.
14. Eckhard U., Schönauer E., Nüss D., Brandstetter H. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011, vol. 18, no. 10, pp. 1109–1115. DOI: 10.1038/nsmb.2127
15. *The Photocor Company webpage*. Available at: <http://www.photocor.ru> (accessed 10 March 2017).
16. Maslennikova A. D., Sergeeva I. A., Petrova G. P. Effect of heavy-metal ions on dynamic characteristics of collagen molecules in solutions. *Moscow University Phys. Bull.*, 2013, vol. 68, no. 2, pp. 154–158. DOI: 10.3103/S0027134913020094.
17. Petrova G. P. *Opticheskie spektral'nye metody issledovaniia zhidkostei i rastvorov: v 2 chastyah. Chast' 1* [Optical spectroscopic methods for study of liquids and solutions: in 2 parts. Part 1]. Moscow, Fizicheskii fakul'tet MGU [Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University], 2008. 71 p. (in Russian).

Cite this article as:

Sergeeva I. A., Khitrina K. A., Krot A. R., Sukneva A. V., Petrova G. P. Investigation of the Interaction and Dynamics of Collagen and Collagenase Molecules in Solutions by Dynamic Light Scattering. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 171–178 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-171-178.