

УДК 595.3.574

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ С ГИДРОБИОНТОВ АНТАРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА**Н. Г. Ракша, Д. В. Гладун, А. Н. Савчук, Л. И. Остапченко**

*Учебно-научный центр «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 64/13, Киев 01601, Украина,
e-mail: nkudina@ukr.net*

Реферат. Учитывая перспективность использования морских гидробионтов как сырьевого источника для получения ферментов с уникальными свойствами, данная работа посвящена изучению протеолитического потенциала гидробионтов с Антарктического региона. Применение методов гель-фильтрации и энзим-электрофореза позволило выявить присутствие в хроматографических пиках активных ферментов, которые в дальнейшем были идентифицированы как протеазы, обладающие коллагенолитической активностью.

Перспективи отримання колагенолітичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону.

Н. Г. Ракша, Д. В. Гладун, А. Н. Савчук, Л. І. Остапченко

Реферат. Враховуючи перспективність використання морських гідробіонтів як джерела сировини для одержання ферментів з унікальними властивостями, дана робота була присвячена вивченню протеолітичного потенціалу гідробіонтів із Антарктичного регіону. Застосування методів гель-фільтрації та ензим-електрофорезу дозволило виявити наявність у хроматографічних піках активних ферментів, які надалі були ідентифіковані як протеази, що володіють колагенолітичною активністю.

The prospects of extraction of collagenolytic enzymes from hydrobionts of Antarctic region

N. G. Raksha, D. V. Gladun, O. M. Savchuk, L. I. Ostapchenko

Abstract. Marine organisms have been recognized as rich sources of bioactive compounds with valuable biotechnology potential. Enzymes extracted from marine hydrobionts have gained much attention because of their unique quite specific properties that determined their profound applications in chemical, medical, food industries and molecular biology experiments. In this regard, our work focused on investigation of proteolytic potential of marine hydrobionts. At first, tissue extract was separated by gel filtration chromatography. Further zymography of obtained fractions revealed the presence of active enzymes which further were identified as collagenolytic.

Key words: marine hydrobionts, protein fractions, enzyme-electrophoresis, collagenolytic and trypsin-like activities.

1. Введение

Усиление тенденций использования продукции на основе ферментов во многих областях медицины, легкой и пищевой промышленности, в научных исследованиях обуславливает актуальность поиска новых, экономически оправданных природных источников сырья для наработки целевых ферментов. С этих позиций исключительно перспективным объектом для получения гидролитических ферментов представляются морские организмы. Перспективы их изучения и использования определяются обширной сырьевой базой за счет утилизации отходов рыбной промышленности, высоким

восстановительным потенциалом морских биоресурсов, а также неординарными физико-химическими и биологическими свойствами, обусловленными особенностями среды обитания данных организмов (соленость океанических вод, низкое освещение или полное его отсутствие, гидростатическое давление, колебания температур и т.д.) (Peck et al., 2004, Songklanakarin et al., 2008, Fuchise et al., 2014). Поиск и идентификация ферментов с нетипичными свойствами остается весьма актуальным заданием для биохимии, так как позволяет выявлять новые принципы и механизмы катализа. Одним из таких свойств ферментов из тканей гидробионтов оказалась их способность расщеплять тройную спираль молекулы коллагена во многих точках, что выгодно отличает коллагенолитические протеазы гидробионтов от коллагеназ микробного и животного происхождения, которые катализируют расщепление субстрата преимущественно в одной специфической точке и практически не способны гидролизировать образующиеся при этом растворимые крупные фрагменты (Rudenskaya et al., 2004).

Ферменты, обладающие коллагенолитической активностью, представляют определенный интерес и с позиций их практического применения, так как они эффективно лизируют некротизированные ткани, гнойные экссудаты, оказывают одновременно противовоспалительное, фибринолитическое и противоотечное действие, способствуя, таким образом, безболезненному очищению и относительно быстрому заживлению ран.

Следует подчеркнуть, что эффективных отечественных лекарственных препаратов на основе коллагеназ из гидробионтов Антарктического региона на сегодня нет, а лицензионные импортные препараты являются дорогостоящими, что значительно ограничивает их широкое применение в клинической практике и актуализирует проблему разработки и внедрения на отечественный рынок новых препаратов с заданными свойствами.

2. Материалы и методы исследования

В исследованиях была использована замороженная масса морского гидробионта Антарктического региона — Антарктической немертины *Parborlasia corrugatus*. Образцы были заготовлены в экспедиционных условиях и в замороженном виде доставлены в лабораторию. Для получения экстракта исходную замороженную массу взвешивали и гомогенизировали с последовательным добавлением жидкого азота и экстрагирующего буфера — 0,1 М Na фосфатного буфера, содержащего 0,15 М NaCl, 0,15 mM ЭДТА, 0,1% тритон X-100 и 2 mM фенолметилсульфонилфторид (ПМСФ). После центрифугирования проб при 10000 g, 40 мин, 4°C надосадочную жидкость отбирали и высушивали на лиофильной сушке для оптимизации условий хранения.

Фракционирование экстрактов проводили методом гель-фильтрации с использованием колонки HiLoad 26/60 Superdex 75 PG.

Энзим-электрофорез проводили в соответствии с методом (Ostapchenko et al., 2011), используя как субстрат заподимеризованный в разделяющий гель желатин (1 мг/мл). О наличии протеаз в анализируемых образцах судили по появлению на энзим-электрофореграмме неокрашенных зон гидролиза на фоне окрашенного красителем полиакриламидного геля.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по методу Брэдфорд (Bradford, 1976), используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Коллагенолитическую активность определяли с применением коллагена I типа (Moog et al., 1954). Скорость деградации субстрата оценивали спектрофотометрически по накоплению лейцина, определяемого с помощью нингидринового реагента.

Трипсиноподобную активность определяли по количеству п-нитроанилина, образующегося в процессе ферментативного гидролиза синтетического субстрата Na-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилида (БАПНА) (Xavier et al., 2005).

Статистическую обработку результатов измерений проводили общепринятыми методами со статистической достоверностью результатов $p < 0,05$ %.

3. Результаты и их обсуждение.

По данным литературы (Flood et al., 2000, Songklanakarin et al., 2008, Salamonea et al., 2012, Ghamari et al., 2014) в тканях морских беспозвоночных обнаружено ряд гидролитических ферментов, задействованных в реализации многих физиологических функций, начиная с расщепления белковых молекул и заканчивая более специфическими функциями, такими, как активация проферментов, участие в ремоделировании внеклеточного матрикса, в процессах эмбрионального развития, роста и дифференцировки клеток, реализации защитных механизмов. Принимая во внимание особенности

питания представителей типа Немертин, можно предположить, что исследуемый нами объект может быть богат на пищеварительные ферменты, обладающие коллагенолитической активностью.

В результате фракционирования экстракта Антарктической немертины методом гель-фильтрации было получено 8 пиков (рис. 1), которые соответствуют белковым фракциям в диапазоне молекулярных масс от 3 до 75 кДа. Предварительная калибровка колонки с использованием белков с известной массой позволяет нам говорить о присутствии в 1–3 пиках белковых молекул с молекулярной массой от 75 до 30 кДа, в то время как 4–7 пики включают низкомолекулярные вещества белковой природы и пептиды.

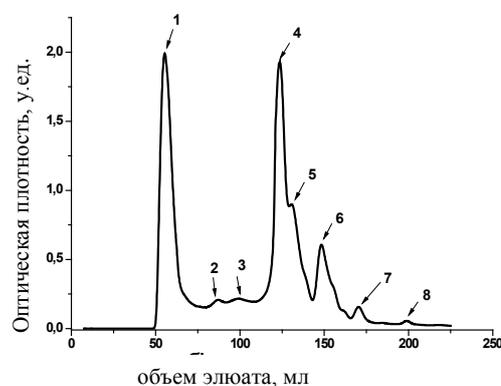


Рис. 1. Хроматограмма разделения экстракта Антарктической немертины на колонке с Superdex 75 PG: 1–8 — количество белковых фракций.

Такое разнообразие белков различной молекулярной массы позволяет предположить присутствие функционально активных молекул, обладающих ферментативными активностями. Поэтому целесообразным было протестировать полученные нами фракции на наличие активных ферментов. Поскольку одним из относительно простых, чувствительных и наглядных способов детекции в биологическом материале протеаз является метод энзим-электрофореза, для реализации поставленной цели мы использовали именно данный методический подход. Следует отметить, что сополимеризация полиакриламидного геля с желатином позволяет выявлять протеиназы, принадлежащие как к классу сериновых протеиназ, так и к металлопротеиназам (Wilkesman et al., 2009).

Результаты энзим-электрофоретического анализа белковых фракций экстракта тканей Антарктической немертины после гель-фильтрации представлены на рис. 2. В соответствии с полученными нами данными выраженные зоны гидролиза, свидетельствующие о наличии в экстракте тканей Антарктической немертины активных протеолитических ферментов, обладающих желатинолитической и/или коллагеназной активностями, были выявлены только в 2, 3 и 4 пиках.

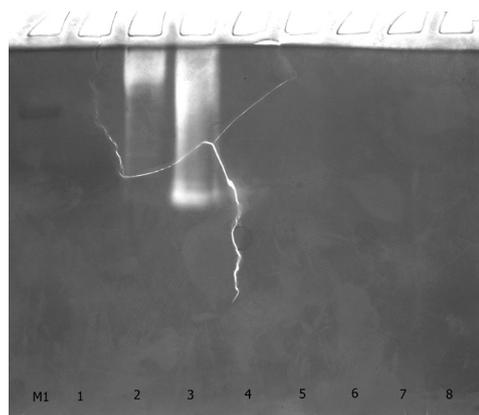


Рис. 2. Энзим-электрофореграмма белковых фракций экстракта Антарктической немертины: M1 — плазмин (85 кДа); 1–8 — номер пика.

Исходя из полученных нами данных обоснованными представляются дальнейшие исследования, направленные на идентификацию ферментов, присутствующих в экстракте. Поэтому на следующем этапе работы белковые фракции были проанализированы на наличие коллагенолитической активности.

В ходе проведенных исследований было установлено (табл. 1) присутствие данного типа активности в семи пиках, полученных после хроматографического разделения исследуемого образца Антарктической немертины. При этом максимальная коллагенолитическая активность была отмечена преимущественно в пике, который соотносился с третьей фракцией, что в целом полностью согласуется с данными энзим-электрофореза относительно присутствия наиболее ярко выраженной зоны гидролиза именно в третьем пике.

Таблица 1

Ферментативная активность в белковых фракциях экстракта Антарктической немертины

Тип ферментативной активности	Номер пика							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Коллагенолитическая активность, Ед/мг белка	29.2±0.55	26.4±0.45	32.7±0.63	17.3±0.35	20.1±0.5	25±0.56	17.8±0.28	—
Трипсиноподобная активность, мкмоль п-нитроанилина/мин x мг белка	2.4±0.04	—	—	—	—	—	—	—

Наличие активности в 1–3 пиках может указывать на присутствие в экстрактах Антарктической немертины коллагеназ, молекулярные массы которых в среднем находятся в диапазоне от 30 до 75 кДа, в то время как регистрируемая нами активность в 4–7 пиках может принадлежать низкомолекулярным сериновым коллагенолитическим протеиназам. Такие данные находят подтверждение в литературных источниках (Park et al., 2001, Ramundo et al., 2009) относительно молекулярной массы сериновых протеиназ с коллагенолитической активностью из морских беспозвоночных, которые, в отличие от высокомолекулярных микробных и тканевых коллагеназ, представлены в основном изоферментами с молекулярными массами до 36 кДа (Kim et al., 2002, Salamonea et al., 2012). С другой стороны, наличие ферментативной активности в пиках, соответствующих фракциям низкомолекулярных белков и пептидов может быть результатом активации процессов автолиза и накоплением каталитически активных субъединиц фермента.

Таким образом, обобщая полученные нами данные относительно распределения ферментативной активности по пикам и результаты энзим-электрофореза, можем сделать выводы о присутствии в экстракте тканей Антарктической немертины протеолитических ферментов, принадлежащих как к сериновым коллагенолитическим протеиназам, так и к металлзависимым ферментам, что, безусловно, требует более детальных исследований.

Учитывая, что пищеварительные ферменты большинства гидробионтов проявляют ярко выраженную трипсиноподобную активность (Fuchise et al., 2014), помимо коллагенолитической активности нами было проведено исследование амидазной активности с использованием в качестве субстрата БАПНА. Применение данного субстрата в сочетании с ингибитором цистеиновых протеиназ E-64 позволило нам говорить об активности именно сериновых протеиназ, в частности, трипсиноподобных ферментов. В соответствии с результатами, представленными в табл. 1, трипсиноподобная активность относительно используемого субстрата была слабо выражена и регистрировалась только в первом пике, в то время как в 2–8 пиках никакой значимой активности обнаружено не было. Такое низкое значение величины ферментативной активности позволяет предположить, что активность трипсиноподобных ферментов в экстрактах тканей Антарктической немертины может быть обусловлена присутствием ферментов с несколько иной субстратной специфичностью, например эстеразой, что в целом согласуется с данными литературы о большей эффективности гидролиза данными ферментами эфирных субстратов в сравнении с амидными. Установленные нами различия

значений коллагенолитической и трипсиноподобной активности могут быть обусловлены как физиологическими особенностями данного гидробионта, так и таксономической принадлежностью исследуемого объекта.

Следует подчеркнуть, что проведенное нами исследование активности протеиназ носит предварительный характер — предполагается дальнейшая идентификация ферментов с использованием субстратов различной структуры и специфических ингибиторов.

Подяка. Автори висловлюють подяку Державній установі Національний антарктичний науковий центр МОН України за надання зразків для досліджень і за підтримку.

Список литературы

1. **Bradford M. M.** A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding // *Analytical Biochemistry*. — 1976. — № 86. — С.193 — 200.
2. **Flood J.**, Mayne J., Robinson J.J. Identification and characterization of gelatin-cleavage activities in the apically located extracellular matrix of the sea urchin embryo // *Biochem. Cell. Biology*. — 2000. — № 78. — С. 455 — 562.
3. **Fuchise T.**, Sekizaki H., Kishimura H., Klomklo S., Nalinanon S., Benjakul S., Chun, B. Simple preparation of pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis // *Journal of Amino Acids*. — 2014. — № 8. — С.1 — 8.
4. **Ghamari M.**, Hosseinaveh V., Darvishzadeh A., Talebi K. Biochemical characterisation of the tissue degrading enzyme, collagenase, in the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae) // *Journal of Plant Protection Research*. — 2014. № 54. — С. 164—170.
5. **Kim S. K.**, Park P. J., Kim J. B., Shahidi F. Purification and characterization of a collagenolytic protease from the Filefish, *Novodon modestrus* // *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. — 2002. — № 35(2). — С.165 — 171.
6. **Moore S.**, Stein W. H. A modified ninhydrin reagent for the determination of amino acids and related compounds // *Journal of Biological Chemistry*. — 1954. — № 211. — С.907 — 913.
7. **Ostapchenko L.**, Savchuk O., Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active componenets of hemostasis system // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. — 201. № 2. — С.20—26.
8. **Peck L.S.**, Webb K.E., Bailey D.M. Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species // *Functional Ecology*. — 2004. № 18. — С.625—630.
9. **Ramundo J.**, Gray M. Collagenase for enzymatic debridement: a systematic review // *Journal of Wound Ostomy and Continece Nursing*. — 2009. — № 36(6). — С.4—11.
10. **Rudenskaya G. N.**, Kislitsin Yu. A., Rebrikov D. V. Collagenolytic serine protease PC and trypsin PC from king crab *Paralithodes camtschaticus*: cDNA cloning and primary structure of the enzymes // *BMC Structural Biology*. — 2004. № 4. — С.1 — 9.
11. **Salamonea M.**, Cuttittab A., Seiditac G., Mazzolad S., Bertuzzie, F., Ricordif, C., Ghersig, G. Characterization of collagenolytic/proteolytic marine enzymes // *Chemical Engineering Transactions*. — 2012. — № 27. — С.1 — 6.
12. **Songklanakarin S. K.** Digestive proteinases from marine organisms and their applications // *J. Sci. Technology*. — 2008. — № 30 (1). — С.37 — 46.
13. **Wilkesman J.**, Kurz L. Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents // *Recent Patents on Biotechnology*. — 2009. — № 3. — С.175 — 184.
14. **Xavier L. P.**, Almeida Oliveira M. G., Guedes R. N. C., Santos A. V., De Simone S. G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) // *European Journal of Entomology*. — 2005. — № 102. — С.147 — 153.