

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ГЛАДУН ДМИТРО ВОЛОДИМИРОВИЧ**

УДК 595.3.574

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ТА КАТАЛІТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ  
ТРИПСИНОПОДІБНОГО ТА ФІБРИНОГЕНОЛІТИЧНОГО ФЕРМЕНТІВ З  
АНТАРКТИЧНОГО МОРСЬКОГО ГРЕБІНЦЯ *ADAMUSSIUM COLBECKI***

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Гладун Д.В.

Науковий керівник Савчук Олексій Миколайович доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник.

Київ – 2017

## АНОТАЦІЯ

Гладун Д.В. Фізико-хімічні та каталітичні властивості трипсиноподібного та фібриногенолітичного ферментів з Антарктичного морського гребінця *Adamussium colbecki*. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04-біохімія. – ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України; Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України, – Київ, 2017.

Ферменти з організмів, адаптованих до існування при низьких температурах середовища, з огляду на певні структурно-функціональні особливості, привертають значну увагу науковців як потенційно перспективні об'єкти не лише з практичної точки зору, а і як цінні інструменти для проведення фундаментальних досліджень, зокрема, спрямованих на вивчення молекулярних основ їх високої каталітичної ефективності та з'ясування механізмів холодової адаптації. Перспективним джерелом при держанні ферментів є морські гідробіонти, що обумовлено їх широкою розповсюдженістю, відносно високим відтворюваним потенціалом та присутністю ферментів, які, з огляду на особливості середовища існування даних організмів, можуть відрізнятися за певними фізико-хімічними характеристиками від наземних аналогів. Гідробіонт *Adamussium colbecki* як один з видів, що населяють антарктичний регіон та пристосовані до існування за понижених температур, може бути потенційно перспективним об'єктом для одержання ферментів з нетиповими характеристиками та вивчення їх властивостей.

Про доцільність використання гідробіонту, як джерела для одержання ферментів свідчать результати ензим-електрофоретичного аналізу,

відповідно до яких, загальний екстракт тканин гідробіонту містив ферменти, які мають гідролітичну активність щодо желатину, колагену та фібриногену. Подальший аналіз з використанням інгібіторів протеаз виявив, що близько 53% від загальної протеолітичної активності пов'язано з сериновими протеазами серед яких до 95% активності опосередковується трипсиноподібними ферментами. Близько 20% ферментативної активності належить металозалежним протеазам, а решта 27% протеолітичної активності може бути обумовлена присутністю цистеїнових та аспартильних протеаз.

Для встановлення приблизних молекулярних мас ферментів, присутніх у тканинах гідробіонту, загальний екстракт було поділено на окремі фракції методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці з носієм Superdex 75 PG, після чого кожен з фракцій було проаналізовано на присутність загальної протеолітичної, трипсиноподібної та колагенолітичної активностей. У результаті фракціонування екстракту було одержано 5 фракцій, що містили білки у діапазоні молекулярних мас від 30 і до 75 кДа та вище. Незважаючи на присутність загальної протеолітичної активності у всіх досліджуваних фракціях, трипсиноподібну активність було виявлено у трьох фракціях, причому найвища як трипсиноподібна, так і колагенолітична активності було зареєстровано у фракції, що містила білки з молекулярними масами близько 30-40 кДа.

Таким чином, одержані результати вказують на наявність у екстракті тканини *A. colbecki* активних форм як високо-, так і низькомолекулярних протеолітичних ферментів та можуть слугувати непрямим підтвердженням певного протеолітичного потенціалу досліджуваного гідробіонту.

В результаті поєднання декількох хроматографічних стадій, які включали афінну хроматографію та хроматографію, що поділяє за розмірами, із загального екстракту тканин було одержано трипсиноподібний та фібриногенолітичний ферменти, чистота яких була підтверджена методом

диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію. З огляду на ефективність одержання та очистки цільових ферментів, оптимізована нами методика може бути використана як основа для розробки технологій одержання протеолітичних ферментів аналогічного спектру дії з тканин морських гідробіонтів.

Належність одержаного ферменту до трипсинів була підтверджена результатами інгібіторного аналізу, відповідно до яких, інкубація з інгібітором серинових протеаз PMSF та специфічним інгібітором трипсинів SBTI обумовлювала зниження активності ферменту, в той час як за використання інгібітору металозалежних ферментів EDTA, пригнічення активності ферменту виявлено не було. Відсутність ферментативної активності у випадку використання субстрату для хімотрипсину Ac-Phe-pNA слугує додатковим підтвердженням належності одержаного ферменту до трипсинів. У цілому за своїми основними фізико-хімічними характеристиками трипсиноподібний фермент був подібним до більшості трипсинів ссавців та безхребетних. Так, фермент виявляв більш виражену активність при використанні ефірного субстрату *N*- $\alpha$ -p-tosyl-L-Arg-methylester у порівнянні з амідним субстратом *N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-Arg-pNA. Швидкість гідролізу *p*-нітроанлідних субстратів, що містили у P<sub>1</sub>-положенні залишок аргініну була суттєво вищою у порівнянні з субстратом, що містив у даному положенні залишок лізину; ефективність гідролізу залежала від довжини пептидного ланцюга субстрату і зростала з його подовженням. Оптимуму рН досліджуваного ферменту, подібно до інших трипсинів, знаходився в області лужних значень рН і складав 9,0. Порівняння кінетичних параметрів реакції гідролізу субстрату pGlu-Pro-Arg-pNA за температури, оптимальної для прояву ферментативної активності (24°C), та температури 8°C, яка є середньою температурою середовища існування істинних психрофілів, виявило зниження значень K<sub>M</sub> з 0,68±0,07 мМ при 24°C до 0,39±0,09 мМ при 8°C. При цьому каталітична ефективність гідролізу

субстрату залишалась незмінною при обох температурах і складала  $15,32 \pm 0,2$   $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  при  $24^\circ\text{C}$  та  $16,33 \pm 0,3$   $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  при  $8^\circ\text{C}$ . З огляду на одержані результати, можемо припустити, що один з механізмів адаптації трипсиноподібного ферменту, одержаного з гідробіонту антарктичного регіону, до функціонування при низьких температурах середовища пов'язаний з підвищенням спорідненості ферменту до субстрату.

Також із загального екстракту тканин гідробіонту було одержано новий фібриногенолітичний фермент. Встановлено, що даний фермент належить до  $\alpha$ -фібриногеназ, оскільки гідролізує переважно  $A\alpha$ -ланцюг молекули фібриногену, при тривалій інкубації ферменту з фібриногеном спостерігається розщеплення також і  $B\beta$ -ланцюга. За результатами інгібіторного аналізу зроблено висновок про належність фібриногенолітичного ферменту до металопротеаз. Одержаний фермент є лужною протеазою, оскільки його рН оптимум знаходиться при рН 10,0. Активність ферменту знижувалась при додаванні іонів  $\text{Zn}^{2+}$  та  $\text{Cu}^{2+}$ , незначно зростала при додаванні іонів  $\text{Mg}^{2+}$ , іони  $\text{Ca}^{2+}$  не впливали на прояв ферментативної активності. Значне пригнічення активності фібриногенолітичного ферменту при інкубації з цистеїном вказує на необхідність вільних SH-груп для реалізації ферментативної активності. Фермент ефективно гідролізував *p*-нітроанілідні субстрати, виявляючи вищу активність щодо субстратів, що містять залишок аргініну. Враховуючи належність одержаного нами ферменту до металопротеаз, така специфічність є не зовсім типовою та опосередковано може свідчити про широку субстратну специфічність досліджуваного ферменту.

Одержаний нами фібриногенолітичний фермент обумовлював порушення здатності молекул фібриногену до полімеризації та утворення фібринового згустку, що було підтверджено результатами базових хронометричних тестів оцінки стану плазменного гемостазу та зниженням концентрації фібриногену, здатного до полімеризації, після його інкубації з

досліджуваним фібриногенолітичним ферментом. Одним із наслідків дії фібриногенолітичного ферменту на фібриноген є пригнічення процесу АДФ-залежної агрегації тромбоцитів, оскільки відомим є факт, що необхідною умовою агрегації є присутність фібриногену – важливого кофактору даного процесу. Також фермент мав певну фібринолітичною активністю; при цьому специфічність щодо ланцюгів фібрину було подібна до такої, стосовно ланцюгів фібриногену – першим гідролізу зазнавав саме А $\alpha$ -ланцюг. Фібриногенолітичний фермент не виявляв активності стосовно колагену – важливого компоненту базальних мембран та позаклітинного матриксу, що може слугувати непрямым підтвердженням відсутності у даного ферменту вираженої геморагічної активності.

Проведені дослідження свідчать про перспективність використання гідробіонту *A. colbecki* як потенційного джерела зазначених ферментів та обґрунтовують доцільність проведення подальших досліджень, спрямованих на більш детальне вивчення будови та фізіологічних ефектів даних ферментів

**Ключові слова:** антарктичний морський гребінець, трипсиноподібний і фібриногенолітичний ферменти, фізико-хімічні та каталітичні властивості.

## SUMMARY

Gladun D.V. Physico-chemical and catalytic properties of trypsin-like and fibrinogenolytic enzymes from Antarctic sea scallop *Adamussium colbecki*. – Manuscript

Dissertation for a candidate of biological sciences degree in specialty 03.00.04-biochemistry. - ESC "Institute of Biology and Medicine", Kyiv National Taras Shevchenko University, Ministry of Education and Science of Ukraine; Kyiv National Taras Shevchenko University, Ministry of Education and Science of Ukraine, – Kyiv, 2017.

Enzymes from organisms adapted for low temperatures attract considerable attention of scientists as potentially promising objects for practical application and

fundamental research a molecular base of their high catalytic efficiency and mechanisms of cold adaptation. A promising source for psychrophilic enzymes is marine hydrobionts, due to their widespread, relatively high reproducible potential. *Adamussium colbecki* as one species inhabiting the Antarctic region and adapted for existence at lower temperatures, can be a potentially promising object for the production of enzymes with non-typical characteristics and study of their properties.

The expediency of use the hydrobiont as a source for the production of enzymes is shown by the results of the enzyme-electrophoretic analysis, according to which, the total hydrobiont tissue extract contained enzymes with hydrolytic activity. Regarding gelatin, collagen and fibrinogen. Further analysis using protease inhibitors revealed that 53% of the total proteolytic activity was associated with serine proteases, 95% of activity was mediated by trypsin-like enzymes. About 20% of enzymatic activity belongs to metal dependent proteases, and the remaining 27% of proteolytic activity may testify the presence of cysteine and aspartic proteases.

To determine the approximate molecular weight of enzymes presents in the hydrobionte tissues, the total extract was divided into separate fractions by size divide chromatography on a Superdex 75 PG column, each of the fractions was analyzed for the presence trypsin and collagenolytic activities. As a result of the extract fractionation, five obtained fractions contained proteins with molecular weights from 30 to 75 kDa.

Trypsin-like activity was detected in three fractions. The highest trypsin-like and collagenolytic activities was identified in a fraction contained proteins with molecular weights 30-40 kDa.

Thus results indicate the presence of active forms of high and low molecular weight proteolytic enzymes in the *A. colbecki* tissue extract. This data can serve as an indirect confirmation of a proteolytic potential of the hydrobiont.

Combination of several chromatographic steps, which included affinity chromatography and divide-size chromatography, trypsin and fibrinogenolytic enzymes were obtained from the total tissue extract, the purity of which was confirmed by disc-electrophoresis in a polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate. Taking into account the efficiency of obtaining and purifying target enzymes, the method optimized by us can be using in development of technologies for the production of proteolytic enzymes from marine organism tissues.

The trypsin nature of obtained enzyme was confirmed by the results of inhibitory analysis, according to which, incubation with a PMSF serine protease inhibitor and a specific SBTI trypsin inhibitor caused a decrease in the enzyme activity; the inhibition of the enzyme activity was not detected by the use of the metal-dependent enzyme EDTA inhibitor and absence of enzyme activity in case of use of substrate for chymotrypsin Ac-Phe-pNA. In general, the trypsin-like enzyme was similar to most trypsin mammals and invertebrates in terms of its basic physical and chemical characteristics. The enzyme was exhibited more pronounced activity on ethereal substrate N- $\alpha$ -p-tosyl-L-Arg-methylester in comparison with the amide substrate N- $\alpha$ -benzoyl-DL-Arg-pNA.

Trypsin-like enzyme was more active to p-nitroanilide substrates contained in P<sub>1</sub> – position the arginine compared to the substrate contained the lysine residue in similar position. The effectiveness of the hydrolysis was depended of the length of the peptide chain. Optimum pH of investigated enzyme, like other trypsins, was 9.0. Comparison of kinetic parameters was optimal at hydrolysis substrate pyroGlu-Pro-Arg-pNA at temperature 24 °C and 8 °C. Study was showed a decrease in values of K<sub>M</sub> from 0,68±0,07 mM at 24 °C to 0,39±0,09 In this case, the catalytic efficiency of the substrate hydrolysis remained unchanged at both temperatures and was 15,32±0,2 mM<sup>-1</sup>·c<sup>-1</sup> at 24 °C and 16,33±0,3 mM<sup>-1</sup>·c<sup>-1</sup> at 8 °C.

In view of the results, we can assume that one of adaptation mechanisms of the derived trypsin-like enzyme is functioning at low temperatures is increase affinity of enzyme to the substrate.

Also, a new fibrinogenolytic enzyme was obtained from the total hydrobiont tissue extract. It has been found that this enzyme belongs to  $\alpha$ -fibrinogenases, since the hydrolysis of the  $\alpha$ -chain of fibrinogen molecule is predominant, with the long incubation with fibrinogen - enzyme there is also a splitting of the  $\beta$ -chain. According to the results of the inhibitory analysis, the conclusion about the affinity of the fibrinogenolytic enzyme to the metalloprotease was made.

Obtained fibrinogenolytic enzyme is an alkaline protease with pH optimum - 10.0. The activity of the enzyme was reduced by the addition of ions  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  slightly increased with the addition of ions  $Mg^{2+}$ . Ions of  $Ca^{2+}$  have not affects on enzyme activity. Inhibition of fibrinogenolytic enzyme activity during incubation with cysteine indicates the need for free SH-groups for the implementation of enzymatic activity. The enzyme is effectively hydrolysed p-nitroanilide substrates, exhibiting higher activity for substrates contained of arginine.

The obtained fibrinogenolytic enzyme caused the impairment the ability of fibrinogen molecules to polymerize and forming fibrin bundle, which was confirmed by the results of basic cronometric tests. Reducing the concentration of fibrinogen capable of polymerization after incubation with the fibrinogenolytic enzyme was confirmed. One of the effects of the fibrinogenolytic enzyme is inhibition of ADP-dependent platelet aggregation. The necessary condition for aggregation is the presence of fibrinogen - important cofactor for this process. Also enzyme had a specificity for the fibrin chains. The  $A\alpha$ -chain hydrolyses first. The fibrinogenolytic enzyme did not exhibit activity to collagen - important component of the basal membranes and extracellular matrix, which can serve as confirmation of the absence of pronounced hemorrhagic activity of this enzyme.

The conducted studies indicate that the using of the hydrobiont *A. colbecki* as a potential source of these enzymes is promising and justifies the feasibility of

further research for more detailed study of the structure and physiological effects of these enzymes.

**Key words:** Antarctic scallop, trypsin-like and fibrinogenolytic enzymes, physic-chemical and catalytic properties.

#### Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. Гладун ДВ, Савчук АН, Остапченко ЛІ. Методологические подходы к получению фракции трипсиноподобных ферментов из морских гидробионтов (на примере Антарктического криля). Український Антарктичний Журнал. 2013;1(12):294–299.
2. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Використання електрофоретичних методів для експрес-аналізу білків морських гідробіонтів Антарктичного регіону. Український Антарктичний Журнал. 2014;1(13):192–197.
3. Гладун ДВ, Вовк ТБ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Отримання цільових білкових фракцій з морських гідробіонтів Антарктичного регіону. Український Антарктичний Журнал. 2014;1(13):133–139.
4. Гладун ДВ, Савчук АН, Гребиньк ДН, Короткий АГ, Остапченко ЛІ. Морские гидробиогты как альтернативный источник сырья для получения белковых молекул направленного действия. Российский Биофармацевтический Журнал. 2014;6(2):12–17.
5. Gladun D, Raksha N, , Savchuk O, Ostapchenko L. Collagenolytic activity in tissue extract of *Parborlasia corrugatus* from Antarctic region. Biomedical Research and Therapy. 2015;9(2):354–358.
6. Gladun D, Raksha N, Savchuk O, Ostapchenko L. Methodological approach to the isolation of functionally active proteins from the tissues of marine

- hydrobionts: an example of *Adamussium colbecki*. *Advances in Polar Science*. 2015;26(4):299–304.
7. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Антарктичні морські гідробіонти – нові перспективні джерела отримання гідролітичних ферментів. *Український біофармацевтичний журнал*. 2015;41(6):87-90.
  8. Гладун ДВ, Вовк ТБ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Підбір оптимальних умов для хроматографічного тестування екстрактів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону. *Український Антарктичний Журнал*. 2015;1(14):168–174.
  9. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук АН, Остапченко ЛІ. Перспективи получения колагенолитических ферментов с гидробионтов Антарктического региона. *Український Антарктичний Журнал*. 2015;1(14):175-179.
  10. Gladun D, Chornenka N, Raksha N, Ostapchuk S. Derivation of trypsin-like enzymes from antarctic marine organisms// *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*. Серія: Біологія. 2015;12(1):19–22.
  11. Гладун ДВ, Ракша НГ. Детергент-стійкі протеїнази антарктичного гребінця *ADAMUSSIUM COLBECKI*. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;20(1):62–65.
  12. Gladun D, Raksha N, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. New fibrinogenases isolated from marine hydrobiont *Adamussium colbecki*. *Journal of Biochemistry International*. 2016;3(1):9-18.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	14
РОЗДІЛ 1. ТРИПСИНИ БЕЗХРЕБЕТНИХ ТВАРИН .....	20
РОЗДІЛ 2. ФІБРИНОГЕНОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ .....	27
РОЗДІЛ 3. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ З ПСИХРОФІЛЬНИХ ОРГАНІЗМІВ .....	32

РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	42
4.1. Реактиви та обладнання .....	42
4.2. Одержання загального екстракту тканин.....	43
4.3. Електрофоретичні методи.....	44
4.3.1. Приготування проб для електрофорезу.....	44
4.3.2. Одновимірний диск-електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію .....	45
4.3.3. Ензим-електрофорез (зимографія) у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію .....	46
4.3.4. Двовимірний електрофорез білків.....	46
4.4. Хроматографічні методи.....	47
4.4.1. Синтез афінного сорбенту.....	47
4.4.2. Хроматографія, що поділяє за розмірами .....	48
4.4.3. Афінна хроматографія.....	48
4.5. Одержання фібриногену .....	49
4.6. Визначення фібриногенолітичної та фібринолітичної активності.....	49
4.7. Оцінка здатності фібриногену до полімеризації.....	50
4.8. Хронометричні тести .....	51
4.8.1. Визначення тромбінового часу зсідання плазми.....	51
4.8.2. Визначення протромбінового часу зсідання плазми.....	51
4.8.3. Визначення активованого часткового тромбoplastинового часу зсідання плазми .....	51
4.9. Одержання сироватки крові.....	52
4.10. Одержання плазми, збагаченої тромбоцитами.....	52
4.11. Дослідження процесу агрегації тромбоцитів .....	52
4.12. Визначення загальної протеолітичної активності.....	53
4.13. Визначення трипсиноподібної активності .....	54
4.14. Визначення активності щодо синтетичних хромогенних субстратів..	54
4.15. Визначення дії інгібіторів та іонів двовалентних металів .....	55
4.16. Визначення рН та температурного оптимуму.....	56

4.17. Визначення кінетичних параметрів реакції гідролізу хромогенних субстратів .....	56
4.18. Визначення концентрації білка .....	57
4.19. Статистична обробка отриманих результатів .....	57
РОЗДІЛ 5. ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАГАЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ ТКАНИН ГІДРОБІОНТУ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ А. <i>COLBECKI</i> .....	58
РОЗДІЛ 6. ОДЕРЖАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ТРИПСИНОПОДІБНОГО ФЕРМЕНТУ З ГІДРОБІОНТУ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ А. <i>COLBECKI</i> .....	81
6.1. Одержання трипсиноподібного ферменту .....	82
6.2. Характеристика трипсиноподібного ферменту.....	90
РОЗДІЛ 7. ОДЕРЖАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ФІБРИНОГЕНОЛІТИЧНОГО ФЕРМЕНТУ З ГІДРОБІОНТУ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ А. <i>COLBECKI</i> .....	109
7.1. Одержання фібриногенолітичного ферменту .....	109
ЗАКЛЮЧЕННЯ .....	149
ВИСНОВКИ .....	158
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	160

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АЧТЧ	– активований частковий тромбопластиновий час
ДСН	– додецилсульфат натрію
ПААГ	– поліакриламідний гель
ПЧ	– протромбіновий час
TAME	–N- $\alpha$ -p-tosyl-L-Arg-methylester
ТПФ	– трипсиноподібний фермент
ТХО	– трихлороцтова кислота
ТЧ	– тромбіновий час
EDTA	– етилендіамінтетраоцтова кислота
PMSF	– фенілметилсульфонілфлуорид
SBTI	– соєвий інгібітор трипсину
BApNA	– N- $\alpha$ -бензоїл-DL-аргінін-p-нітроанлід
S <sub>2366</sub>	– pyroGlu-Pro-Arg-pNA
S <sub>2238</sub>	– H-D-Phe-Pip-Arg-pNA
S <sub>2222</sub>	– Bz-Ile-Glu( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-pNA
S <sub>2251</sub>	– H-D-Val-Leu-Lys-pNA

**Актуальність теми.** Вивчення будови та з'ясування теоретичних основ взаємозв'язку між структурою і механізмом дії ферментів, а також розробка рекомендацій щодо їх практичного застосування безумовно належать до пріоритетних напрямків сучасних наукових досліджень, зокрема, у галузі біохімії та біотехнології. Незважаючи на інтенсивні дослідження, ця проблема не втрачає своєї актуальності, оскільки розвиток сучасних технологій у поєднанні із застосуванням наукових підходів і методів, дозволяє не лише визначити тонкі механізми дії біокатализаторів та знаходити шляхи регулювання процесів *in vitro*, та *in vivo*, а й значно спростити багатостадійну процедуру одержання ферментних препаратів. На сьогодні гідролітичні ферменти широко застосовуються у різних галузях промисловості, сільському господарстві, медицині, фармакології [1, 2]. Окрім значного практичного потенціалу ферменти є важливим інструментом для проведення фундаментальних досліджень в галузі вивчення структурних та функціональних особливостей білків [3]. Детальне дослідження будови та властивостей ферментів із організмів різних таксономічних рангів має першочергове значення для кращого розуміння механізмів таких складних біологічних явищ як диференціювання та морфогенез, поділ та трансформація, адаптаційні перебудови обміну речовин, є важливим для розшифрування молекулярних основ еволюції. Тому пошук нових економічно обгрунтованих джерел сировини та розробка нових підходів щодо швидкого скринінгу [4], одержання та очистки цільових молекул набуває особливого значення як для академічної науки в цілому, так і для практичної біотехнології та фармакології. В цьому контексті увагу привертає Світовий океан, біологічне розмаїття якого складає фактично необмежений ресурс в галузі одержання різноманітних за будовою та спектром біологічних активностей речовин [5]. Перспективність використання морських гідробіонтів, як джерела для одержання гідролітичних ферментів, зумовлена не лише їх значною сировинною базою, а й присутністю ферментів, які за

своїми структурно-функціональними характеристиками можуть відрізнятися від ферментів з наземних організмів. Так, зокрема, ферменти, одержані з організмів, адаптованих до низьких температур навколишнього середовища, характеризуються вищою каталітичною ефективністю при температурах близьких до нуля, широкою субстратною специфічністю та нижчою термостабільністю у порівнянні з аналогічними мезофільними ферментами з [6, 7]. Гідробіонт *Adamussium colbecki*, як один з видів, що населяють антарктичний регіон та пристосовані до існування за понижених температур, може бути потенційно перспективним об'єктом для одержання ферментів з нетиповими характеристиками та дослідження їх властивостей.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідних тем: «Механізми реалізації адаптаційно компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011–2015 рр.) та «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016–2018 рр.).

**Мета і задачі дослідження.** Метою роботи було одержати трипсиноподібний та фібриногенолітичний ферменти з Антарктичного морського гребінця *Adamussium colbecki* та вивчити їх основні фізико-хімічні і каталітичні властивості.

Для досягнення мети було поставлено наступні задачі:

1. Проаналізувати якісний білково-пептидний склад та спектр ферментів з різною будовою активного центру у загальному екстракті тканин гідробіонту *A. colbecki*.
2. Одержати трипсиноподібний і фібриногенолітичний ферменти, визначити їх молекулярні маси, субстратну специфічність щодо певних синтетичних і

білкових субстратів та дослідити основні кінетичні параметри реакції гідролізу хромогенних субстратів.

3. Визначити температурний та рН оптимум для трипсиноподібного і фібриногенолітичного ферментів і вивчити вплив інгібіторів протеїназ та іонів двохвалентних металів на активність даних ферментів.
4. Дослідити вплив фібриногенолітичного ферменту на окремі параметри системи гемостазу.

*Об'єкт дослідження:* трипсиноподібний та фібриногенолітичний ферменти з гідробіонту *A.colbecki*.

*Предмет дослідження:* біохімічні, фізико-хімічні, каталітичні властивості ферментів

*Методи дослідження:* хроматографічні (одержання та очищення трипсиноподібного та фібриногенолітичного ферментів), електрофоретичні (аналіз якісного білково-пептидного складу тканин, оцінка гомогенності одержаних ферментів, ідентифікація активних ферментів, визначення ізоелектричних точок), спектрофотометричні (визначення активності ферментів), агрегометричні (дослідження процесу агрегації тромбоцитів), коагулометричні (проведення хронометричних тестів) та методи математичної статистики.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше одержано трипсиноподібний і фібриногенолітичний ферменти з гідробіонту антарктичного регіону *A. colbecki* та охарактеризовано їх основні фізико-хімічні властивості, зокрема, визначено молекулярну масу, температурний та рН оптимум, досліджено вплив іонів двовалентних металів та інгібіторів протеаз на активність одержаних ферментів. Виявлено вищу активність обох досліджуваних ферментів при використанні синтетичних субстратів, що містять у Р<sub>1</sub>-положенні залишок аргініну, у порівнянні з субстратом, що має у даному положенні залишок лізину. Вперше визначено кінетичні параметри ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$ ) реакції гідролізу трипсиноподібним і фібриногенолітичним

ферментами синтетичних субстратів та досліджено залежність значень кінетичних констант гідролізу трипсиноподібним ферментом синтетичного субстрату від температури. Результати роботи доповнюють існуючі на сьогодні уявлення щодо фізико-хімічних та каталітичних властивостей ферментів з організмів, пристосованих до низьких температур середовища існування, та вносять певний вклад у розуміння ролі протеолітичних ферментів у механізмах біохімічної адаптації організму. Одержані у дисертації дані є певним доробком у галузі еволюційної біохімії, оскільки сприяють кращому розумінню молекулярних основ еволюції ферментів. Визначено специфічність фібриногенолітичного ферменту щодо ланцюгів фібриногену та встановлено його належність до металопротеїназ. Виявлено порушення здатності фібриногену до полімеризації та утворення фібринового згустку, а також пригнічення процесу АДФ-залежної агрегації тромбоцитів за дії фібриногенолітичного ферменту.

**Практичне значення одержаних результатів.** Оптимізовано методику одержання та очищення трипсиноподібного і фібриногенолітичного ферментів з гідробіонту антарктичного регіону, яка в подальшому може бути використана як основа для розробки технологій одержання протеолітичних ферментів аналогічного спектру дії з тканин морських гідробіонтів. Одержаний фібриногенолітичний фермент з огляду на його вплив на процеси полімеризації фібриногену, здатність гідролізувати фібриновий згусток та пригнічувати процес АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів, може бути потенційно перспективним для розробки терапевтичних засобів, спрямованих на зниження гемостатичного потенціалу крові. Окрім того, даний фібриногенолітичний фермент може бути використаний як додатковий інструмент для більш детального вивчення закономірностей процесу полімеризації фібриногену та дослідження структурних взаємодій з іншими білками. Отримані у дисертаційній роботі дані впроваджено у навчальний

процес курсів лекцій «Біохімічні основи гемостазу та діагностика», «Методи практичної біохімії».

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом особисто проаналізовано наукову літературу за темою дослідження, інтерпретовано отримані експериментальні результати, здійснено їх статистичну обробку, оформлено рисунки та таблиці. Експериментальна частина дисертаційної роботи була виконана здобувачем особисто або за його безпосередньої участі. Планування експерименту та розробка методичних підходів, формування ідеї роботи, узагальнення результатів досліджень та редагування дисертаційної роботи здійснено спільно з науковим керівником.

Автор висловлює глибоку вдячність к.б.н. Ракші Н.Г. за допомогу в плануванні та проведенні досліджень, співучасть якої у виконанні роботи представлена в спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертації доповідались на вітчизняних та міжнародних конференціях, зокрема, IX Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія ХХ століття» (Київ 2015), VI Міжнародній конференції «Антарктичні дослідження: нові горизонти та пріоритети» (Київ 2015), X Міжнародній конференції «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків 2015), VIII Міжнародній конференції присвяченій 25-річчю приєднання України до Договору про Антарктику (Київ 2017).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 20 наукових праць, в тому числі 8 статей у фахових виданнях, рекомендованих ДАК України, 4 статті в іноземних виданнях, 8 публікацій у матеріалах з'їздів та конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена українською мовою на 196 сторінках друкованого тексту і складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів роботи та їх обговорення, висновку та списку використаних літературних джерел, що містить 292 найменування. Робота ілюстрована 12 таблицями та 34 рисунками.

## РОЗДІЛ 1

### ТРИПСИНИ БЕЗХРЕБЕТНИХ ТВАРИН

Трипсин є ферментом, що є сериноюю ендопептидазою і належить до класу гідролаз [11]. Даний фермент знайдений у більшості хребетних та безхребетних тварин. Загалом, трипсин синтезується у вигляді профермента – трипсиногена, що згодом активується [12]. Трипсин розщеплює зв'язки між амінокислотами, головним чином, на С-кінцевій стороні амінокислот лізину або аргініну. Трипсини багатьох тварин мають приблизно схожу структуру та подібні механізми каталізу. Наприклад, трипсин бика має молекулярну масу приблизно 24 кДа і складається з 223 амінокислотних залишків, що утворюють один поліпептидний ланцюг і містять 6 дисульфідних зв'язків. Ізоелектрична точка трипсину знаходиться при рН 10,8, а оптимум каталітичної активності — при рН 7,8—8,0. [13].

Як у хребетних, так і у безхребетних, трипсин може бути присутній у кількох ізоформах. Гідроліз пептидних зв'язків, загалом, каталізують п'ять сімейств протеаз, серед них і серинові ендопротеази, що розділені на два надсімейства – трипсинове і субтилізинове, каталітичні механізми яких еволюціонували незалежно один від одного. Трипсинова надродина включає в себе, власне трипсин і хімотрипсин, які широко поширені в тварин, в той час, як надродина субтилізину представлена в більшості бактерій і грибів [14].

Спільною рисою трипсинів та інших серинових протеаз, є наявність каталітичної тріади. Відмінністю від інших серинових протеаз є наявність специфічного пептидного зв'язку утвореного карбоксильною стороною аргінінового або лізинового залишків та здатність активувати інші панкреатичні зимогени [15]. Амінокислотний залишок бичачого хімотрипсину - Ser 195 діє, як нуклеофіл і утворює проміжний ацил-ензим-субстратний комплекс, залишки Asp102 і His57 стабілізують коректний

таутомер і забезпечують компенсацію утворення позитивного заряду під час каталітичної реакції. Субстрат утворює зустрічно паралельну  $\beta$ -складку з протеїн-зв'язуючим сайтом, що забезпечує негативні заряди для приєднання позитивно заряджених Lys та Arg амінокислотних залишків у субстраті [16].

Гідроліз білкових молекул є важливим етапом в процесі травлення, тому трипсини є найпоширенішими протеазами та еволюційно одним з найперших ферментів у безхребетних. Rurpiewski та ін. [16] показали, що здатність перетравлювати білкові молекули, з'явилась ще на початку еволюції. Примітивні організми вибірково мають, здатність використовувати чужорідний білок як джерело одержання амінокислот шляхом ферментивного гідролізу, за допомогою протеаз, які здатні розпізнавати і гідролізувати пептидні зв'язки в специфічній області поліпептидного ланцюга.

Трьохвимірна структура ензимів сімейства S1 є високо консервативною. На сьогоднішній день структура трипсинів вивчена тільки в двох ракоподібних, прісноводного раку *A. leptodactylus* [17] та морського краба *C. pagurus* [18]. Молекула трипсину представлена одиночними поліпептидними ланцюгами, каталітичні амінокислотні залишки лежать між двома  $\beta$ -складчастими доменами, що упаковані один навпроти одного. У роботі Fodor та ін. [17] відмічаються певні відмінності між структурою трипсинів ракоподібних та хребетних. Відмінності було знайдено на рівні петель 37, 60, 145, 202. Також в структурі трипсину ракоподібних показано розширений гідрофобний регіон в положенні 37, що можливо, беруть участь у взаємодії з інгібітором. Більшість трипсинів безхребетних мають N-кінцевий сигнальний пептид і синтезуються, як попередники, тому, виступають як проферменти, що потребують протеолітичної модифікації з утворенням активної форми [19, 20]. Деякі дослідження трипсинів хребетних і безхребетних, дозволили припустити, що між цими ферментами існує певний еволюційний зв'язок. Виявляється, що мутації, які впливали на структуру ферментів були

великими, але каталітична активність і специфічність були ледь порушені [21, 22].

Трипсини мають першочергове значення, як ефектори в мережі ферментних функцій. Їх активація є першим кроком в серії послідовних реакцій, де функція декількох протеаз різних класів є частиною скоординованого фізіологічного процесу і перетравлення харчового білка є яскравим прикладом [23, 24]. Синтез і зберігання активних протеаз обумовлює ризик пошкодження тканин шляхом гідролізу аутологічних білків, тому організми повинні володіти механізмами контролю активації, доки це не стане необхідним для виконання конкретної функції. Це досягається за допомогою складної системи, яка включає в себе контроль на рівні синтезу, транскрипції і трансляції, зберігання, секреції і активації зимогенів. Відомо, що безхребетні, наприклад, комарі та ракоподібні, мають відразу декілька механізмів регуляції протеолітичних ферментів, [25, 26, 27, 28] на транскрипційному, посттранскрипційному рівнях, що реалізуються окремо, або в поєднанні [29].

На сьогоднішній день існують дані, що активація і стабільність трипсинів деяких безхребетних може бути як залежною, так і незалежною від концентрації йонів. Відомо, що кальцій-зв'язуючий мотив присутній у молекулі трипсинів багатьох ссавців може бути відсутнім у більшості комах. [30, 31, 32]. Наприклад структура трипсину раку *Astacus leptodactylus* має високу афінність до зв'язування йонів за рахунок сайту, що формується петлею Glu70–Glu80 [17]. Деякі автори вказують на активуючі та стабілізуючі ефекти йонів на серинові протеази у краба *Cancer pagurus* [33] та австралійського рака *Cherax quadricarinatus* [34].

Транскрипція генів, що кодують трипсин у хребетних та безхребетних належить до ключових регуляторних механізмів. Навіть, незважаючи на кілька нуклеотидних послідовностей, що кодують трипсиногени у безхребетних, повідомлялося, що гени трипсину широко представлені у

багатьох сімейств безхребетних [35, 36]. У москітів *A. gambiae* гени трипсину розташовані як щільне кластерне сімейство генів, що складається з семи споріднених послідовностей. У *Lucilia surcina* трипсин кодує чотирьохсегментне сімейство генів [37, 38]. Це дозволяє припустити, що предки двокрилих і лускокрилих мали тільки один ген трипсиногену, а додаткові копії були отримані в результаті дуплікації генів, що, імовірно, забезпечує більш ефективні механізми деградації білків, що є адаптивною перевагою для комах, чиє харчування пов'язано з рослинами, що містять інгібітори трипсину [39, 40]. У випадку безхребетних, було запропоновано ряд механізмів регуляції трипсину, особливо під час транскрипції генів в ядрі клітини та процесів трансляції.

Деякі безхребетні тварини мають декілька форм трипсину. Присутність і кількість кожного ізофермента залежить від механізму контролю, кількості мРНК кожної з ізоформ [41]. З *S. calcitrans* ХУ дрозофіли було виділено чотири гени, що належать до кластерного сімейства та кодують трипсинові ферменти [42]. Ці чотири гени транскрибуються по черзі, тому послідовність, що кодує активаційний пептид не схожа на більшість трипсинів, що вказує на модифікований механізм активації. У дрозофіл фактори транскрипції розпізнають висококонсервативний промотор ДНК послідовностей з інших споріднених видів [43]. У *S. calcitrans* ХУ, велика кількість мРНК трипсину зберігається навіть в голодних особин. Це слугує підтвердженням того, що гени трипсину можуть конститутивно транскрибуватися. Таким чином, контроль над синтезом травного трипсину можна регулювати під час наступної транскрипції [26]. Дослідження трипсинів в морських безхребетних, особливо ракоподібних, виявили різні гени трипсину, зосереджені в різних мультигенних сімействах, таких як *Panaeus Vannamei*, де кількість інтронів в трьох генах трипсину змінюється від нуля до трьох, показуючи консервативні позиції і, як правило, більш короткі послідовності, ніж у видів хребетних тварин [44]. Порівняння послідовностей ДНК і кДНК

виявили три екзони і два інтрони, в той час як хребетні зазвичай мають п'ять екзонів, що розділені чотирма інтронами [45]. В *P. Vannamei*, три ізотрипсина, А, В, і С, були знайдені в травній залозі, очищені і охарактеризовані [46], підтверджуючи факт, що трипсин є поліморфним ферментом. При вивченні кДНК, *P. Vannamei*, з'ясовано, що ізотрипсини кодуються в двох локусах: локус- $\beta$ , який є кодує ізофермент С і локус- $\alpha$ , який кодує ізоферменти А і В [47]. Також існує припущення, що у деяких безхребетних, фібрилярні клітини залоз каналців кишки мають тільки сайти для секреції травних ферментів, які повинні синтезуватись, як зимогени у гранулах і зберігатися в над'ядерних вакуолях, за аналогією з утворенням зимогенів в панкреатичних екзокринних клітинах хребетних [48, 49]. Існують дані, що травні ферменти у вакуолі вивільняються періодично в кишку, в залежності від виду та умов харчування, що є характерним для більшості видів ракоподібних [50, 51].

Припускається, що тварини, які мають ізоформи трипсинів, володіють адаптивними перевагами, наприклад, атлантична сьомга з ізотрипсином TRP-2\*92 більша у розмірах, ніж лосось без даного ізоферменту, автори вважають, що ефект є наслідком кращої конверсії корму і ефективності засвоєння білка, по меншій мірі, в умовах експерименту [52]. Деякі ізоферменти можуть бути пригніченими, що не є рідкістю, згідно даних Pils & Shulz (2004) [53]. Прийнято вважати, що протеїнолітичні ферменти транскрипційно регулюються в організмі ссавців, з кількістю і якістю харчового білка, що є одним з основних індукторів [54]. Існують дані про вплив їжі на активність трипсину, у личинок червоного пальмового довгоносіка *Rhynchoporus ferrugineus* (Alarcón та ін., 2002) [55] і в комарів *A. Aegypti* [31, 46] вказує, що один з генів трипсину в основному регулюється на рівні транскрипції, в залежності, від якості і кількості їжі. Подібні механізми були описані для деяких ракоподібних. Le Moullac та ін. (1994) припустив, що у личинок креветок *P. Vannamei* синтез ферментів травлення (трипсину,

хімотрипсину і амілази) індукується якістю білкової їжі [57]. Після голодування протягом 24 год, у данних тварин, кількість мРНК трипсину значно збільшується, після чого різко знижується [58]. Таким чином, зниження активності трипсину як і мРНК голодної особини, передбачає стратегію зниження синтезу ферментів, для економії енергії, необхідної для синтезу білка, а також для запобігання потенційного автолізу. У хребетних трипсин синтезується у вигляді неактивного попереднику – трипсиногену, який зазвичай зберігається у внутрішньоклітинних органелах, поки він не буде активований та секретується в просвіт кишечника для перетравлення білків. Активна форма трипсину досягається за рахунок гідролітичного посттрансляційного видалення короткого, зарядженого N-термінального пептиду з зимогена [59]. Перехід з неактивного в активний стан досягається за рахунок переорієнтації так званого домена активації. Новий N-кінцевий домен формує кишеньку утворює сольовий місток з Asp 194, що призводить до впорядкованих, конформаційних змін в домені активації, який створює сайт зв'язування субстрату [60, 61]

Одним з найбільш важливих механізмів, що регулюють протеоліз аутологічних білків є синтез ендогенних інгібіторів, які запобігають спонтанній активації ферментів. Інгібітори грають важливу роль в регуляції активності ферментів у рослин, тварин і мікроорганізмів. Уникнення небажаного автогідролізу є настільки істотним завданням для організму, що на синтез інгібіторів протеаз витрачається значна енергія. Деякі дані показують важливість інгібіторів в широкому діапазоні процесів. Інгібітори перешкоджають протеазній активності шляхом формування інгібітор-ферментних комплексів. Отриманий інгібітор-протеазний комплекс неактивний, оскільки каталітичний сайт з ензиму заблокований. Згідно з Krowarsch та співавт. (2003), інгібітори мають три еволюційних механізми дії, щоб блокувати доступ субстрата до фермента [62]. Перший, канонічний механізм, це зв'язування інгібітора з ензимом через експоновану, так звану

опуклу петлю, що є комплементарною до активного центру ферменту. Механізми гальмування в цій групі завжди дуже схожі і нагадують “ідеальний субстрат”. Другий механізм – це так звані неканонічні інгібітори, що взаємодіють з ензимом через свій N-кінцевий сегмент. Відбуваються великі вторинні взаємодії за межами активного сайту, що впливають на силу, швидкість та специфічність розпізнавання. Третій механізм демонструють серпіни, що діють подібно до канонічних інгібіторів, взаємодіючи з їх цільовою протеазою по субстратоподібному типу. Однак, розщеплення одного пептидного зв'язку в петлі зв'язування призводить до масштабних структурних змін. З огляду на важливість інгібіторів протеаз в модуляції біологічних процесів, інгібітори трипсину деяких безхребетних призначені для практичних медичних завдань. Прикладом є триптази п'явки або інгібітори трипсину кліща *Boophilus*.

Інгібітори протеаз також активно використовуються в харчовій технології. Оскільки, деякі інгібітори трипсину безхребетних є короткими поліпептидами, вони вивчаються як потенційні ефекторні молекули, щодо шкідливих або корисних протеаз [63]. Деякі види комах часто харчуються на рослинах, синтезуючи і зберігаючи інгібітори протеаз для травних ферментів шкідників і хижаків; Таким чином, інгібітори грають роль в регуляції протеолізису [35, 64, 65].

Організму потрібно кілька різних протеаз, щоб збільшити його біологічну придатність. Формальна причина в тому, що організми, які мають кілька типів протеаз, таких як трипсин і хімотрипсин, можуть здійснювати гідроліз великої кількості харчових білків, вивільнюючи різні незамінні амінокислоти, що підвищує ефективність засвоювання. Однак було виявлено, що в креветок *caridean* [66], каліфорнійських лангустів *Panulirus* [67] та омара європейського [68] всупереч очікуванню, активність трипсину досягається при кислому рН, що не є рН оптимумом для серинових протеаз.

## РОЗДІЛ 2

### ФІБРИНОГЕНОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ

Згідно з даними Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я (ВООЗ), щороку від серцево-судинних захворювань (ССЗ) вмирає 17 мільйонів людей. Однією з основних причин різних ССЗ є внутрішньосудинний тромбоз, тобто утворення згустку крові у просвіті кровоносної судини.

Основним білковим компонентом згустка крові є фібрин, який утворюється з фібриногену за допомогою протеолізу тромбіном. У той же час, згустки фібрину можуть бути гідролізовані плазміном, щоб уникнути тромбозів у кровоносних судинах. В силу тих чи інших порушень системи гемостазу, фібринові згустки не гідролізуються і, таким чином, відбувається тромбоз. В останні роки широко досліджувались різні тромболітичні терапії з застосуванням різних тромболітичних агентів як ін'єкційно так і перорально.

Класичні тромболітичні агенти поділяються на два типи: активатори плазміногену та плазмін-подібні білки. Прикладом активатора плазміногену є активатор плазміногену тканинного типу (ТАП) [69] та урокінази, [70] які перетворюють плазміноген в активний плазмін, що згодом деградує фібринові згустки. Плазмін-подібні білки безпосередньо лізують фібринові згустки в крові, тим самим швидко і повністю розчиняючи тромби. Прикладом є люмброкіназа з дощового черв'яка і фібролаза зі зміїної отрути [71]. Незважаючи на те, що сьогодні ТАП та урокінази все ще широко використовуються в тромболітичній терапії, їхні дорогі ціни і небажані побічні ефекти, такі, як ризик внутрішнього крововиливу в шлунково-кишковому тракті при пероральному застосуванні, змушують дослідників шукати більш дешеві та безпечні ресурси для отримання нових фібринолітичних ензимів, наприклад Стафілокіназа (САК), що являє собою фібрин-специфічний агент, що розчиняє згусток при інфаркті міокарда,

позаклітинний білок, що виділяється штамом стафілококів після лізогенного перетворення бактеріофагами. Отримана стафілокіназа складається з одного поліпептидного ланцюга зі 136 амінокислот без дисульфідних містків. Його молекулярна маса приблизно 16 кДа [71]. Механізм активації має подібності, до стрептокінази поряд з деякими відмінностями. Стафілокіназа, як і стрептокіназа, утворює стехіометричний комплекс з плазміногеном, але на відміну від стрептокінази комплекс стафілокіназа-плазмін є неактивним [72].

Зміїні отрути є сумішами високо-реакційних ферментів які можуть впливати на компоненти гемостазу: фактори згортання крові, білки ендотеліальних клітин і тромбоцитів. Дані агенти можуть впливати на систему як невибірково, (через неспецифічний гідроліз), так і специфічно, наприклад, через активацію або інгібування ферментів коагуляції, фібринолізу і активації тромбоцитів. Такі ферменти, часто, стійкі до дії фізіологічних інгібіторів [73, 74]. В зміїних отрутах також існує група фібриногеназ. Ці ендопептидази спрямованої дії, не відщеплюють від фібриногена фібринопептид і, отже, не викликають полімеризацію [75, 76], за своєю природою є або серин- або металопротеїназами.

Вони класифікуються відповідно до їх дії на  $\alpha$ - або  $\beta$ -ланцюг фібриногену. Фібриногенази уповільнюють згортання крові (особливо  $\alpha$ -фібриногенази), оскільки модифікований фібриноген не формує сильного фібринового згустку, на відміну від нативного [77]. Як правило,  $\alpha$ -фібриногенази мають молекулярні маси в середньому 20-26 кДа. В їх структурах часто зустрічаються дисульфідні зв'язки. Більшість з них інгібуються білками сироватки крові і мають спорідненість до фібриногену і стабілізованого фібрину [75, 76]. З іншого боку,  $\beta$ -фібриногенази є сериновими протеазами і також можуть помірно розщеплювати і  $\alpha$ -ланцюг [78, 79]. Крім того для  $\beta$ -фібриногеназ характерна загальна активність серинових фібриногеназ, тому вони здатні брати участь у деградації фібрину. Середні молекулярні маси  $\beta$ -фібриногеназ варіюються між 23-32 кДа.

Серинові фібриногенази, на відміну від металопротеаз є більш терmostійкими і менш залежними від змін рН. Більшість з них є глікопротеїнами [76, 78, 80].

Існує суттєва гомологія між фібрино(гено)літичними сериновими протеазами, активаторами плазміногену та тромбіно-подібними сериновими протеазами з отрути змій. Тим не менш, фібриногенази не мають тромбіноподібної активності [76, 80]. Серинові протеази, в тому числі фібриногенолітичні ферменти дуже поширені в отрутах *Viperidae*, в яких вони можуть становити 20% від загального вмісту білка в отруті [81].

Механізми патогенезу гіпофібриногенемії в природних умовах, індуковані зміїною отрутою, можуть бути розділені на дві групи. Зміїні отрути, що містять тромбіноподібні ферменти можуть зменшити рівень фібриногену, шляхом перетворення фібриногену у фібрин, як речовина, яка не утворює твердий згусток, що швидко руйнується *in vivo* фібринолітичною системою (синдром дефібринації) [82, 83]. Інший механізм полягає у зниженні кількості фібриногену плазми, у першу чергу, шляхом руйнування безпосередньо фібриногену [84, 85] або опосередковано через активацію плазміногену [86].

Вивчення трансформації фібриноген-фібрин і фібринолітичної системи може сприяти не тільки розумінню механізмів згортання крові, але й також розробці нових терапевтичних засобів для лікування тромбозу. Тромбіно-подібні ферменти зміїних отрут, особливо Арвін з *Agkistrodon rhodostorna*, були ретельно вивчені, і на сьогоднішній день дуже цінні в якості антитромботичних агентів для людини [87, 88]. Існують дані про виділення та очищення двох ферментів з отрути *Trimeresurus mucrosquamatus*, що володіють фібриногенолітичною активністю [89].

Фібриногенази  $\alpha$  та  $\beta$  мають подібний амінокислотний склад та вміст аспарагінової кислоти. Проте, вміст гліцину, проліну і триптофану у  $\beta$ -

фібриногеназах значно вищий. Також є помітні відмінності в термостійкості оптимальних значеннях рН та ізоелектричній точці.

Існують літературні дані про створення рекомбінантної форми  $\alpha$ -фібриногенази з отрути *Deinakistrodon acutus*, враховуючи можливість корисного застосування фібриногеназ у вивченні білок-білкових взаємодій в системі гемостазу [90]. Даний ензим є одноланцюговим білком з молекулярною масою 27 кДа та ізоелектричною точкою при рН 7.1, початково був виділений та очищений з отрути змії *Deinakistrodon acutus*. Розщеплює  $\alpha$ -ланцюги фібриногену, існує можливість розщеплення і  $\beta$ -ланцюгів при продовженні часу інкубації. Протеолітична активність фермента інгібується ЕДТА, L-цистеїном, та ДТТ, що вказує на металлопротеїназне походження, що вимагає наявності дисульфідних зв'язків для своєї діяльності. Моделювання ензиму показало, наявність двох висококонсервативних дисульфідних зв'язків (Cys159-Cys164 та Cys117-Cys197) що, підтримують його структуру і три залишки гістидину в каталітичному сайті, що залучаються до зв'язування йона цинку [90].

Lee та співавт. (1999) повідомляли про виділення та очищення “бревінази”-  $\beta$ -фібриногенази з отрути змії *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. Фермент складається з двох поліпептидних ланцюгів молекулярними масами 16,5 та 17 кДа і є сериною протеазою. Активність даного ферменту поступово знижують цистеїн, апротинін, бензамідин, ЕДТА, ЕГТА і 1,10-фенантролін. Фібринолітичну активність повністю інгібують типові інгібітори серинових протеаз - PMSF, DFP, Refabloc і ДТТ. Фібринолітична активність повністю інактивується при наявності йонів [91]. Jiao та співавт. (2005) повідомили про отримання “шедаоенази”, фібриногенази з отрути змії *Agkistrodon shedaoentesis*. Фермент за своєю природою є сериною протеазою, складається з 238 амінокислотних залишків та має молекулярну масу 36 кДа. Первинна структура даної фібриногенази є типовою для серинових протеаз зміїної отрути. Фермент має каталітичну тріаду His43,

Asp88 і Ser194. “Шедаоеназа” містить шість дисульфідних містків: Cys7-Cys141, Cys28-Cys44, Cys76-Cys236, Cys119-Cys190, Cys151-Cys168 і Cys180-Cys206 [92]. Не та співавт. (2007) звітували про ідентифікацію нової серинові протеази з фібриногенолітичною активністю – “харобіну” з отрути морської змії *Lapemis hardwickii*. Було показано, що даний фермент лізує спочатку  $\beta$ -ланцюг, а згодом і  $\alpha$ -ланцюг фібриногену. Через 18 годин інкубації ензим лізує і  $\gamma$  – ланцюг, залишаючи лише фрагмент фібриногену молекулярною масою 42 кДа [93].

Виділення фібриногенолітичних ферментів можливе не тільки з отрути змій, так Swadesh та ін. (1990) опублікували дані про отримання ферменту “хементину” зі слинних залоз п’явки *Haementeria ghilianii*. Фібриногенолітична активність слини даної п’явки виникає внаслідок активності даної одиночної протеази з молекулярною масою 82 кДа [94]. Toshiaki та колеги (1993) звітували про виділення фібриногенази з гриба *Candida albicans* NH-1. Фермент складається з 117 амінокислот, має приблизну молекулярну масу 13 кДа та розщеплює спочатку  $\alpha$ -ланцюг, потім  $\beta$ -ланцюг фібриногену. Показано, що активні сайти даного ензиму відрізняються від активних сайтів тромбіну [95]. Існують дані про наявність фібриногенолітичної активності в екстракті гусениці *Lonotia obliqua caterpillars*, що зумовлена наявністю  $\alpha$ -фібриногенази – “ланофібрази”, що представляє собою протеїн молекулярною масою 35 кДа. Даний ензим здатний ефективно розщеплювати  $\alpha$ - та  $\beta$ -ланцюги фібриногену і навіть здійснювати літичний вплив на фібрин [96].

### РОЗДІЛ 3

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ З ПСИХРОФІЛЬНИХ ОРГАНІЗМІВ

Живі організми, особливо мікроби, здатні пристосовуватись до широкого діапазону різних теплових середовищ і мають здатність до термічної адаптації, особливо в екстремальних умовах. Всі живі істоти мають певні температурні межі, які вони здатні витримувати, це ілюструється представником Археїв, що живе у гарячих середовищах, який був виділений з гідротермального джерла і здатний існувати при температурах між  $85^{\circ}\text{C}$  і  $121^{\circ}\text{C}$  [97]. Психрофільні організми (адаптовані до холоду) здатні підтримувати свій метаболізм при низьких температурах  $-20^{\circ}\text{C}$ . Було описано численні психрофільні організми, що здатні розмножуватися при  $\leq 0^{\circ}\text{C}$  та існувати при температурі до  $< 30^{\circ}\text{C}$  [98,99, 100, 101]. Очевидно, це зумовлено механізмами еволюції, які забезпечують можливість організму адаптуватися до температурного середовища. Найбільша питома вага біомаси на Землі генерується при низьких температурах ( $\leq 5^{\circ}\text{C}$ ). Це відбувається головним чином за рахунок вкладу величезного числа мікроорганізмів холодної біосфери, що поширюється на постійно холодні високогірні та полярні регіони, верхні шари атмосфери та Світовий океан [98, 99, 101-103]. Серед представників таких організмів є бактерії, дріжджі, археї, водорості, гриби, лишайники, мохи, рослини, безхребетні і риби [98, 101]. Всі ці організми знаходяться в тепловій рівновазі з навколишнім середовищем, тому всі компоненти їх клітин повинні бути адаптовані до холоду [101]. Їх філогенетична різноманітність підкреслює розмаїття механізмів, в тому числі на клітинному рівні, що еволюційно розвинулися, щоб дозволити організму адаптуватися до холодних температур. Наприклад, так звані “незамерзаючі білки” є характерною рисою для риб Антарктики. Тому особливий інтерес

викликають ферменти психрофільних організмів, що ефективно функціонують при низьких температурах [99-101, 104-106].

Для вивчення конформаційних особливостей білкових структур та їх застосовується ряд методологічних підходів: спектрофотометрія (флуоресценція, круговий дихроїзм, калориметрія, диференціальна скануюча калориметрія), різні види гель-електрофорезу [97-99]. Даними методиками досліджували більшість холодоадаптованих білків, наприклад хітобіазу [110], дигідрофолат-редуктазу [111], орнітин-карбамоїлтрансферазу [112], фосфогліцераткіназу [113], ксиланазу [114, 115], ДНК-лігазу [116],  $\beta$ -галактозидазу [117], EF-2 [118] і АНА [119, 107, 108, 120-122] і т.д.

Теплоіндуковане розгортання великих мультидоменних білків (в тому числі холод-адаптованих білків) носить незворотній характер. Білок-АНА, в даний час, є єдиним прикладом з “незамерзаючих” ферментів, який може повністю відновлювати структуру [107]. Для ферментів з малою молекулярною масою ( $\sim 50$  кДа), що мають щільно упаковану серцевину, є характерним кооперативний ефект розгортання. Наймовірніше, даний ефект спостерігається через обмеження число взаємодій між структурними елементами, порушення яких, імовірно призводить до втрати нативної структури [123]. Холодоадаптовані ферменти характеризуються високою гнучкістю, термолабільністю і питомою активністю при низьких температурах [99, 105, 106].

У фосфогліцераткінази активний сайт утворений гнучким, термолабільним каталітичним доменом, що тримається зі стабільним субстрат-зв'язуючим доменом, за допомогою шарнірної області [113]. Аналогічний приклад організації каталітичного і субстрат-зв'язуючого доменів присутній у холод-адаптованої хітобіази [110]. Ці приклади показують, що за стабільність і активність можуть відповідати різні регіони фермента [124, 108].

Термостабільність холодоадаптованих ферментів може відображати здатність до високої гнучкості в активному сайті регіону, а не відсутність вибіркового впливу на стабільність [125]. Таким чином підвищується термостабільність без втрати функціональних властивостей та зниження активності [126, 127], існує припущення про те, що холодоадаптовані ферменти еволюціонували від більш термостабільного предка [128].

Як правило, специфічна активність таких “холодних” ферментів вище, ніж у їх мезофільних аналогів, при температурах приблизно 0-30<sup>0</sup>С. При більш високих температурах, відбувається денатурація холодоадаптованих ферментів. Загалом, термостабільні ферменти, які характеризуються високою термостійкістю є поганими каталізаторами при кімнатній температурі. Термостабільність зумовлена вираженою жорсткістю молекулярної будови, що погіршує взаємодію між субстратом і ферментом. На противагу цьому, гнучкість або пластичність молекулярної структури дозволить більшу взаємодоповнюваність, що зменшує витрату енергії при активації і тому підвищує активність ферменту. В роботі [129] автори оцінили відносну гнучкість двох гомологічних ферментів (3-ізопропіл малатдегідрогеназа), з мезофільних та термофільних бактерій. Було з’ясовано, що хоч ці ферменти мають подібну гнучкість при відповідній температурі їх навколишнього середовища, термофільний фермент є значно більш жорстким, ніж його мезофільний аналог при кімнатній температурі; конформаційні зміни пов’язані з каталізом, були істотно ослаблені при кімнатній температурі.

Shoichet та ін. також показали за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу, що амінокислотні залишки, які беруть участь в каталізі і зв’язуванні субстрату не оптимізовані для зберігання стабільності [130].

Існує, однак, все більше доказів, що конформаційний баланс між стабільністю, специфічною активністю та структурною гнучкістю є набагато більш складним, ніж очікувалося. Деякі елементи структури білка, контролюють стабільність, інші регіони грають важливу роль у додаванні

гнучкості, даючи початок оптимальній каталітичній ефективності при температурі навколишнього середовища.

Тому ймовірно, що не тільки висока специфічність, але і значна стабільність є характерною для ферментів, що функціонують у холодних умовах, що підтверджується сайт-спрямованими експериментами з застосуванням мутагенних чинників (амінокислотні заміни в певних місцях), які були проведені на субтилізині [131] і помірно стабільному термолізиноподібному ензимі [132].

Велика увага приділяється значним структурним змінам в активному сайті психрофільних ферментів. У багатьох випадках спостерігається збільшення каталітичного карману, що досягається різними способами, в тому числі заміною громіздких бічних ланцюгів на невеликі групи, різні конформаційні петлі, або делеції в них, поряд з активним сайтом, що ілюструється холодо-активною цитрат-синтазою [133]. У випадку протеаз з психрофільних видів *Pseudomonas*, бонди формують вхід до активного сайту, що помітно підвищує його доступність в порівнянні з мезофільними гомологами [134]. Відмінності в електростатичних потенціалах всередині і навколо активного сайту психрофільних ферментів, мабуть, є важливим параметром для активності при низьких температурах. Електростатичні поверхневі потенціали, що генеруються зарядженими і полярними групами є одним з найважливіших компонентів каталітичного механізму на різних етапах. Цікаво відзначити, що холодоактивна цитрат-синтаза [133], малат-дегідрогеназа [135], урацил-ДНК-глікозилаза [136] і трипсин [137-139] характеризуються значними відмінностями в електростатичних потенціалах поблизу активної області сайту, в порівнянні з мезофільними або термофільними аналогами, тому мають вищу ефективність взаємодії з лігандом.

Низькі температури не сприяють швидкості хімічної реакції, що каталізується ферментами [140]. Організми, що живуть в холодних умовах

вимагають різних фундаментальних пристосувань, в тому числі експресії ферментативної активності на відповідних рівнях, які повинні працювати при підвищеній в'язкості середовища, викликаній низькими температурами.

Організми, що живуть при температурі близько 0<sup>0</sup>С, охоплюють відразу декілька таксонів: бактерії, дріжджі, водорості, рослини, комахи, морські риби і деякі наземні безхребетні [99]. Не дивлячись на те, що найбільша частка біомаси на Землі утворюється при низьких температурах, існує недостатня кількість інформації про психрофільні ферменти. З відомих таких ферментів можна виділити лізоцим з тютюнового черв'яка молі *M. sexta* [141], ДНКазу II з Ісландського гребінця *Chlamys islandica* [142], цитратсинтази з ізопод *Idotea baltica* та *Idotea emarginata* [143], лужні фосфатази з креветок арктичних *Pandalus borealis* [144] і глутатіон S-трансфераза з ісландського гребінця *Chlamys islandica* [145].

Цілком очевидно, що механізми адаптації ферментів до холоду не можуть бути зрозумілі без вивчення їх трьохвимірної структури. На сьогоднішній день охарактеризовані структури деяких ферментів психрофільних організмів:  $\alpha$ -амілази – широко вивчений фермент, що секретується антарктичною бактерією *Alteromonas haloplanctis* [146, 147]. Популяція бактерій добре росте при температурі 4<sup>0</sup>С, в той час як секреція ферментів вже змінюється, коли температура зростає до 18<sup>0</sup>С. Різниця між оптимальними температурними діапазонами роботи у даного фермента та аналога - панкреатичної  $\alpha$ -амілази вище ніж на 20<sup>0</sup>С. Амінокислотна послідовність психрофільної  $\alpha$ -амілази на 66% подібна до гомологів бактеріального або грибового походження. Ферменту необхідний один йон і один йон, які пов'язані з підтриманням афінності. Тривимірна структура передбачає велику подібність до свинячих та інших  $\alpha$ -амілаз. Фермент має класичну тридоменну архітектуру: бочкоподібний домен А (складається з  $\alpha$ -спіралей та  $\beta$ -складчастих структур), домен В ( $\beta$ -складчасті структури) та глобулярний домен С [147, 148]. Холод-адаптований фермент показує різке

зниження кількості сольових містків та ароматичних гідрофобних взаємодій між проліном і аргініном та стабілізацію диполів спіралей. Всі ці фактори вказують на збільшення стабільності структури? але зі збереженням певної гнучкості для більш високої специфічної активності. Дисульфідні зв'язки збережені, в той час як 12 з 21 пролінових залишків у фермента свиней або видалені внаслідок делецій, або замінені. Ці зміни в основному відбуваються в петлях, що зумовлює гнучкість з'єднань поліпептидних ланцюгів сусідніх вторинних структур.

Субтилізин. Два вида субтилізинів, були виділені з двох антарктичних штамів *Bacillus* (ТА39 і ТА41). Послідовності цих ферментів подібні на 92%. Головною їхньою відмінністю є вміст залишків тирозину (20 для одного і 11 для другого). Ці дві ізоформи кодується двома незалежними генами поруч один з одним в обох штамів, мають поліпептидний ланцюг (309 амінокислот) більше ніж у мезофільних гомологів. Вставки можуть виникати в деяких петлях, що з'єднують вторинні структури. Збільшення довжини петлі, можливо, забезпечують більшу амплітуду відносних переміщень між елементами вторинної структури, що зумовлює більш гнучка структура. Обидва білка містять дисульфідний місток (С51-С65), але класичний субтилізин, зазвичай, не містить будь-яких залишків цистеїну. Ще однією цікавою особливістю є різниця ізоелектричних точок у мезофільного субтилізіна (і.т.=9) та холод-адаптованого субтилізіна (і.т.=5,5) це пояснюється більш високим вмістом аспаргінових залишків (21 замість 9). Холодоадаптовані форми субтилізіну зазвичай відображають специфічну активність в кілька разів вище, ніж у мезофільних аналогів, особливо до великих субстратів. Порівняння структури холод-активних ферментів і мезофільних аналогів показало зменшення кількості сольових містків, зменшення числа ароматичних взаємодій; значне збільшення взаємодії з розчинником [149]. Амінокислоти, які формують каталітичну порожнину ті самі, що й у гомологів, але існує дві зміни в активному сайті зв'язування. По-

перше, заміна у P210F петлі підключення. Це призводить до збільшення гнучкості і, можливо, також відносної рухливості спіралс H6, яка несе в собі активний серин. Друга відмінність полягає у заміні [150] залишку Tyr або Val в положенні 104. В порівнянні з мезофільним субтилізином, у холодоадаптованої форми існує заміна аспаргіну на треонін в положенні 85. Бічний ланцюг треоніна є поганим лігандом для іонів [151]. Холодоадаптовані ліпази були отримані і досліджені з холодоадаптованих бактерій Антарктичного регіону [152-156]. Було визначено їх послідовності, та виконано експерименти по сайт-спрямованому мутагенезу [153]. Жодна з цих ліпаз, однак, не очищена повністю через сильні взаємодії з ліпополісахаридами, що секретується бактеріальними штамами. Холодні ліпази каталізують ліполіз при температурах близько 3<sup>0</sup>C. Механізмом адаптації до холоду, можливо, є наявність залишків гліцину, що імовірно, дає більше свободи для активного сайту [153, 154, 156]. Leiros і ін. [157] повідомили про збільшення спорідненості до субстрату у трипсинів психрофільних організмів, що, імовірно, досягається за рахунок оптимізації електростатичної комплементарності між сайтом зв'язування і підкладкою. В цілому електростатичний потенціал поверхні всіх “холодних” трипсинів зменшується, особливо, в С-кінцевому домені. Також імовірно фактором, підвищення ефективності таких ферментів є орієнтація підкладки перед зв'язуванням [158]. Окрім того, серинові протеази, що були виділені з brachyurins (десятиногі ракоподібні) показали хімотрипсинподібні, трипсиноподібні та еластазородібні подібні активності по відношенню до синтетичних субстратів [159] та всі характеристики холодоадаптивних ферментів. [160]. Ці ферменти є членами клану SA сімейства S1 серинових ендопептидаз і включають в себе еуфалізін з криля [161]. Особливостями еуфалізинів є їх здатність розщеплювати колаген, і чутливість до автолізу [162]. Беручи до уваги, недавнє виявлення цього ферменту і його комерційний інтерес, не дивно, що наразі з'являються все нові звіти про

виділення і характеристику трипсинів з безхребетних, що мешкають в холодних умовах були [163].

В даний час відомо, що безхребетні, що живуть при екстремальних температурах, мають низький вміст кисню, токсичного сірководню і важких металів. Однак, наскільки відомо, лише кілька досліджень були присвячені вивченню біохімічних характеристик ферментів безхребетних, що живуть в таких віддалених і екстремальних біотопах.

Більшість ферментів з психрофільних організмів є холод-активними і термолабільними. Психрофільні ферменти можуть бути в десять разів більш активні при низьких і середніх температурах у порівнянні з їх мезофільних гомологами. Крім того, психрофільні ферменти, часто інактивуються при температурах, які не є шкідливими для їх мезофільних аналогів. Ці специфічні риси дають таким ферментам ряд переваг в біотехнології:

- потрібно менша концентрація ферментного каталізатора, щоб досягти найбільшої активності;

- через адаптованість таких ферментів до холоду вони залишаються ефективними у воді або при температурі навколишнього середовища, завдяки чому вдається уникнути нагріву під час технологічного процесу;

- враховуючи термолабільність таких ферментів, вони можуть бути ефективно і селективно інактивовані, шляхом помірною підведення тепла;

Не слід забувати про те, що ферменти з організмів холодних умов можуть бути цінним джерелом нових каталізаторів, що володіють корисними ферментативними характеристиками.

Прикладів використання психрофільних ензимів у біотехнологічній практиці досить багато, тому можна виділити основні напрямки: молекулярна біологія, індустрія ферментів, харчова промисловість, створення каталізу за холодних умов. Kobori та колеги [164] очистили й охарактеризували термолабільну лужну фосфатазу з антарктичної бактерії. Лужні фосфатази в основному використовуються в молекулярній біології для

дефосфорилювання ДНК-векторів перед клонуванням, для запобігання рециркуляції дефосфорилювання 5'-кінців нуклеїнової кислоти до маркування 5'-кінця за допомогою полінуклеотид-кінази або для видалення динуклеозидтрифосфату та пірофосфату з ПЛР-реакцій. Проте, фосфатази повинні бути ретельно видалені після того, як відбулося дефосфорилювання, щоб не чинити перешкод на наступних етапах методу. Крім того, *E.coli* і лужна фосфатаза теляти (яка є кращим ферментом для цього методу) є термічно стабільними і вимагають додавання миючого засобу для дезактивації. Це свідчить про те, що термолабільні лужні фосфатази є відмінною альтернативою, вони інактивуються поступово, з термообробкою, що дозволяє виконувати наступні кроки в тій же пробірці і зводять до мінімуму втрати нуклеїнових кислот. Група Bouriotis виділила лужну фосфатазу з іншої антарктичної бактерії і клонували її ген в *E.coli* [165], описали кристалічну структуру [166], а також показали, що властивості даного фермента можуть бути додатково поліпшені шляхом спрямованої еволюції з точки зору високої активності і термічної лабільності [167]. Ця термолабільна лужна фосфатаза продається, як Антарктична фосфатаза і в даний час пропонується на біотехнологічному ринку. На промисловому рівні найбільш відомим представником полярних мікроорганізмів, безумовно, є дріжджі *Candida antarctica*. Дані дріжджі виробляють два ліпази А і В, причому остання продається, наприклад, як “NOVOZYM 435” від Novozymes (Багсверд, Данія). Незважаючи на те, що даний фермент має помірну термостійкість у водних розчинах, його стабілізовано в іммобілізованій формі. В результаті своєї субстратної стереоспецифічності, ліпаза В бере участь в дуже великій кількості органосинтетичних процесів, пов'язаних з харчуванням / переробкою корму, лікарськими або косметичними засобами [168]. Однак, показано, що одним з найпопулярніших ферментів з антарктичних організмів є ліпаза С [169].

Ринок ферментів, що використовуються в миючих засобах, складає 30%-40% всіх ферментів, що виробляються в світі. Серед цих ферментативних чистячих засобів субтилізин (лужна серинова протеаза, переважно виробництва видів *Bacillus*) в значній мірі домінує. Відповідно, холодноактивні субтилізини необхідні для досягнення оптимальних результатів прання при температурі водопровідної води. Таким чином, в даний час генно-інженерний субтилізин є компонентом “холодних” миючих засобів і поєднує в собі стабільність при зберіганні, лужну стабільність і активність. Ксиланази з антарктичної бактерії *Pseudoalteromonas* є хорошим прикладом успішного біотехнологічного трансферу в харчову промисловість. Ксиланази є глікозид гідролазами, розщеплюють полісахарид  $\beta$ -1,4-ксилан, тим самим руйнуючи геміцелюлозу, один з основних компонентів клітинних стінок рослин. Ксиланази також є ключовим компонентом у промислових тестах якості хліба. Було встановлено, що антарктичний фермент належав до нового класу ксиланаз а його амінокислотна послідовність і будова відрізнялися від раніше охарактеризованих ксиланаз. У зв'язку з цим психрофільний фермент інтенсивно досліджували, щоб з'ясувати його структурні особливості та передумови, що дають високу активність в холодних умовах, а також на розуміння його ферментативної дії [170-174]. Крім того, хлібопекарські випробування показали, що психрофільні ксиланази були дуже ефективні для поліпшення властивостей тіста та якості кінцевого хліба [175]. Слід підкреслити, що 75% населення земної кулі страждає від непереносимості лактози, що виникає через недостатній синтез кишкової лактази у дорослих і в результаті виникають травні розлади. У цьому контексті, холод-активні лактази з антарктичної бактерії гідролізують лактозу під час зберігання молока при низьких температурах [176]. Варто відзначити, що комерційно доступні лактази вимагають підігріву молока, щоб стати активними. Ця стадія нагрівання, однак, має згубні наслідки для якості молока, так як це змінює смак і структуру.

## РОЗДІЛ 4

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### 4.1. Реактиви та обладнання

В роботі було використано наступні реактиви: акриламід, N,N'-метиленбіс-акриламід, персульфат амонію, N,N,N',N'-тетраметилен-1,2-діамін («GE Healthcare AB», Швеція), β-меркаптоетанол, хромогенні субстрати, реагенти для проведення хронометричних тестів та плазми-калібратори («Ренам», Росія), маркери молекулярних мас білків для електрофорезу («Bio Rad», США), N-α-бензоїл-DL-аргінін-р-нітроанлід, N-α-р-тосил-L-аргінін-метилестер, трис(гідроксиметил)амінометан, етилендіамінтетраацетат, фенілметилсульфонілфлуорид, бичачий сироватковий альбумін, тритон X-100, L-цистеїн виробництва фірми «Sigma-Aldrich», США. Хроматографічні носії: Superdex 200 PG, Superdex 75 PG, Sephadex G 25 виробництва фірми «Bio Rad», США. Інші реактиви та органічні розчинники були вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч. або ч.д.а.

В роботі використовували: апарат для препаративного диск-електорофорезу («BioRad», США), препаративний хроматограф низького тиску (BioLogic LP, «BioRad», США), спектрофотометр (SmartSpec Plus, «BioRad», США), аналізатор агрегації тромбоцитів AT-02 («Медицина-Техніка», Білорусь), мікропланшетний спектрофотометр (BioTek Instruments, «BioTek», USA), коагулологічний аналізатор («Rayto Life and Analytical Sciences», China).

Лабораторне пластикове обладнання (мікропланшети, еппендорфи, пробірки, і т.ін.) одержане від Costar і ColeParmer, США. Скляне лабораторне обладнання, включаючи обладнання для об'ємних вимірів (колби, стакани,

пробірки, циліндри і т.ін.) та фільтрувальні системи, одержане від «Simax» і «Wheaton», США.

#### 4.2. Одержання загального екстракту тканин

У роботі було використано заморожену масу морського гідробіонту Антарктичного регіону – Антарктичного морського гребінця *Adamussium colbecki*. Об'єкт для дослідження було люб'язно надано Національним антарктичним науковим центром. Зразки були зібрані біля острова Галіндез (географічні координати – 65°15' південної широти, 64°15' західної довготи) архіпелагу Аргентинські островів. Солоність води біля острова складала 28,4-32,2 ‰, температура 1,1-0,8<sup>0</sup>С. Матеріал було зібрано в рамках XVII, XVIII Українських антарктичних експедицій у березні 2012 – квітні 2013 року та березні 2013 – квітні 2014, відповідно.

Для забезпечення максимальної екстракції білків з тканин досліджуваного гідробіонту було протестовано декілька екстрагуючих буферів. Ефективність процедури екстракції оцінювали за накопиченням білка, який визначали, вимірюючи оптичну щільність за довжини хвилі 280 нм, у пробах одержаних при використанні різних буферів. Як видно з рис. 4.1, найвище значення оптичної щільності спостерігалось при використанні 100 мМ Na-фосфатного буферу, рН 7,5, що містив 150 мМ NaCl, 0,15 мМ EDTA, 0,1% тритон X-100 та 2 мМ PMSF, тому саме даний буфер було використано для одержання загального екстракту тканин гідробіонту. Для цього після відділення твердого панциру заморожену масу м'яких тканин гідробіонту зважували та гомогенізували, додаючи рідкий нітроген та екстрагуючий буфер – 100 мМ Na-фосфатний буфер, рН 7,5, що містив 150 мМ NaCl, 0,15 мМ EDTA, 0,1% тритон X-100 та 2 мМ PMSF з розрахунку 5 мл буферу на кожні 10 грам матеріалу. Зразки гомогенізували за допомогою блендера («Braun», Німеччина) впродовж 10 хв та центрифугували при 10000 g, 4<sup>0</sup>С впродовж 40 хв. Одержану надосадову рідину відбирали та

ліофілізували. Отриманий ліофілізат використовували для подальших досліджень чи зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

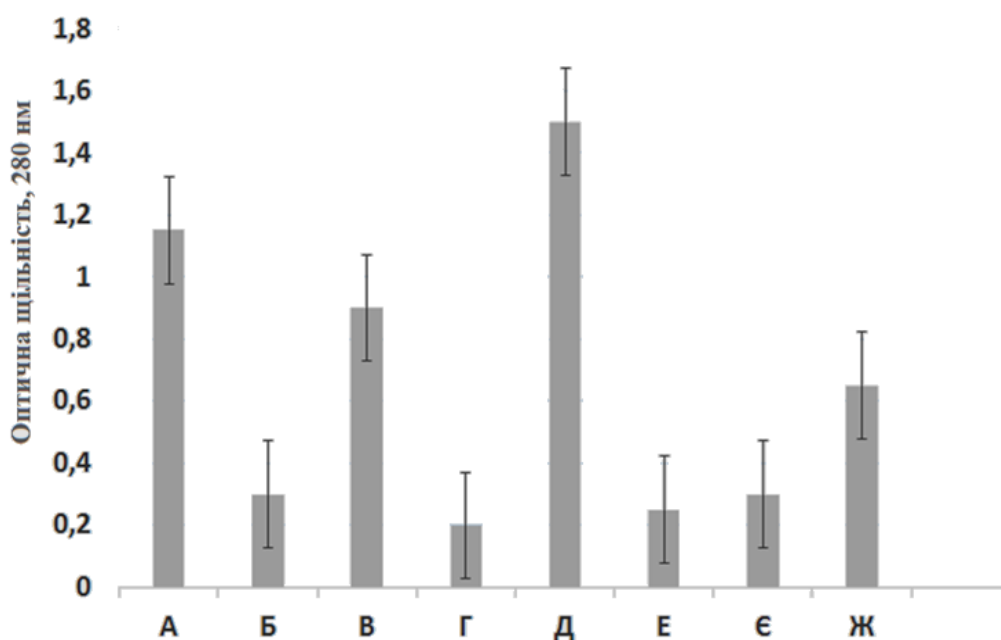


Рис. 4.1. Значення екстинкції екстрактів при використанні різних буферів: А – 100 мМ  $\text{Na}^+$ -фосфатний буфер, рН 6,8; Б – 60 мМ  $\text{Na}^+$ -фосфатний буфер, рН 6,6, що містив 1 мМ 2-меркаптоетанол; В – 100 мМ трис-гліциновий буфер, рН 6,0, що містив 0,15% ЕДТА, 0,2 % диетилдитіокарбамат натрію, 0,2 % аскорбінову кислоту та 10 М пепстатин А; Г – 60 мМ  $\text{Na}^+$ -фосфатний буфер, рН 6,6; Д – 100 мМ  $\text{Na}$ -фосфатний буфер, рН 7,4, що містив 150 мМ  $\text{NaCl}$ , 0,15 мМ ЕДТА, 0,1% тритон Х-100 та 2 мМ PMSF; Е – 100 мМ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  фосфатний буфер, рН 6,6; Є – 100 мМ трис- $\text{HCl}$  буфер, 7,5 рН; Ж – 100 мМ трис-гліциновий буфер, рН 7,5

### 4.3. Електрофоретичні методи

#### 4.3.1. Приготування проб для електрофорезу

Зразки для електрофорезу готували, додаючи до ліофілізованого екстракту тканин гідробіонту 10 мМ трис- $\text{HCl}$  буфер, рН 6,8, що містив 2% додецилсульфат натрію, 10% сахарозу та 0,01% бромфеноловий синій. Проби

для диск-електрофорезу зразки кип'ятили впродовж 2 хв, в той час як проби для ензим-електрофорезу нагріванню не піддавали. У випадку низької концентрація білка проби концентрували за допомогою трихлороцтової кислоти (ТХО). Для цього зразки змішували з рівним об'ємом 25% ТХО та залишали на 10 хв при 4<sup>0</sup>С, після чого центрифугували при 10 000 g. Надосадову рідину зливали, а до осаду додавали 0,5 мл ацетону та знову центрифугували. Процедуру відмивки ацетоном повторювали 3 рази, після чого проби залишали на 15-20 хв для випаровування залишків ацетону. Після повного випаровування ацетону проби розчиняли у відповідному об'ємі буферу для приготування проб для електрофорезу.

#### **4.3.2. Одновимірний диск-електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію**

Електрофоретичний аналіз білків проводили, використовуючи метод диск-електрофорезу у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію у системі Лемлі за денатуруючих умов [177]. Для відновлення дисульфідних зв'язків застосовували 5% β-меркаптоетанол. Електрофорез проводили у пластинках 10% акриламіду для розділяючого та 4% для концентруючого гелів. Для одержання рівної горизонтальної поверхні на гель нашаровували дистильовану воду. Електрофорез проводили в камерах для вертикального препаративного диск-електрофорезу («BioRad», США) у пластинах товщиною 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого та 36 мА для розділяючого гелів. Після закінчення електрофоретичного поділу досліджуваних зразків гелі фіксували у розчині 7,5% оцтової кислоти та 37,5% ізопропілового спирту впродовж 10 хв. Проявлення ділянок, які містять білки, здійснювали шляхом забарвлення гелів у розчині, що містив 2,5% кумасі діамантовий синій G-250, 10% етанол, 10% оцтову кислоту та 15% ізопропанол. Гелі фарбували впродовж 15 хв на

автоматичному шейкері. Для видалення залишків барвника гелі відмивали кип'ятінням у 2-8% розчині оцтової кислоти.

Для встановлення молекулярних мас білків, присутніх у зразках, використовували суміш маркерних білків: «SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range» та «SDS-PAGE Molecular Weight Standards, High Range» («BioRad», США).

#### **4.3.3. Ензим-електрофорез (зимографія) у поліакриламідому гелі за присутності додецилсульфату натрію**

Ензим-електрофоретичний аналіз проводили відповідно до методу [178]. Розділяючий гель полімеризували за присутності субстратних білків (желатин, колаген, фібриноген) з розрахунку 1 мг/мл. Концентрація розділяючого гелю складала 15%, що унеможливило міграцію заполімеризованих у розділяючий гель субстратних білків.

Електрофорез проводили в камерах для вертикального препаративного диск-електрофорезу («BioRad», США) у пластинах товщиною 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого та 36 мА для розділяючого гелів. Після закінчення електрофоретичного розділення гелі відмивали у 2,5% розчині тритону X-100 впродовж години для видалення залишків додецилсульфату натрію. Далі гелі заливали 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,4, що містив 130 мМ NaCl та інкубували впродовж 12 годин.

Фіксацію та фарбування гелів здійснювали відповідно до стандартного протоколу проведення одновимірного диск-електрофорезу.

#### **4.3.4. Двовимірний електрофорез білків**

Двовимірний електрофорез проводили відповідно до методу [179]. Ізоелектрофокусування (перший напрямок двовимірного електрофорезу) здійснювали на 7 см стрипах ПААГ Immobi DryStrip Gels з нанесеним

градієнтом рН 3,0-10,0. Стрип регідрували в DeSteak Rehydration Solution з IPG Buffer, рН 3-10, протягом 12 годин, наносили зразок і піддавали напрузі 10000 В протягом 6-8 годин. Для електрофорезу у другому напрямку стрип переносили на пластину ПААГ відповідної щільності (4-20%) і піддавали напрузі 400 В при силі струму 100-200 мА на трек. Всі операції відбувалися при температурі 4-6<sup>0</sup>С. Візуалізацію плям білків і пептидів здійснювали відповідно до стандартного протоколу проведення одновимірного диск-електрофорезу.

#### **4.4. Хроматографічні методи**

##### **4.4.1. Синтез афінного сорбенту**

Синтез афінного сорбенту проводили за стандартною методикою [180]. BrCN-активовану сефарозу розчиняли у 1 мМ НСl, залишали на 20 хв, після чого двічі промивали 1 мМ НСl на скляному фільтрі під вакуумом. Білок (ліганд), який необхідно було кон'югувати з сорбентом, розчиняли за концентрації 10 мг/мл у 100 мМ NaHCO<sub>3</sub> буфері, рН 8,3, що містив 100 мМ NaCl. Розчин ліганду змішували із суспензією носія та інкубували впродовж 3-4 годин при 25<sup>0</sup>С на шейкері. Ліганд, що не зв'язався з носієм, видаляли, промиваючи сорбент на скляному фільтрі під вакуумом, спочатку 100 мМ NaHCO<sub>3</sub> буфером, рН 4,0, що містив 100 мМ NaCl, а потім 100 мМ NaHCO<sub>3</sub>, рН 8,3, що містив 100 мМ NaCl. Блокування активних груп сорбенту, що залишились вільними після інкубування з лігандом, проводили розчином 1000 мМ гліцину, рН 8,3 впродовж 1 години за 25<sup>0</sup>С за постійного перемішування. Усі незв'язані молекули гліцину видаляли, промиваючи сорбент на скляному фільтрі спочатку 100 мМ NaHCO<sub>3</sub>буфером, рН 4,0, що містив 100 мМ NaCl, а потім 100 мМ NaHCO<sub>3</sub>, рН 8,3, що містив 100 мМ

NaCl. Після відмивання від надлишку гліцину отриманий сорбент можна було використовувати для подальшої роботи.

#### **4.4.2. Хроматографія, що поділяє за розмірами**

Для позбавлення зразків від небілкових домішок та зміни буферів під час проведення різних етапів хроматографії використовували хроматографію, що поділяє за розмірами, на колонці з носієм Sephadex G 25 (2,5 x 80 см) («BioRad», США). Швидкість всіх етапів хроматографічного процесу складала 4,5 мл/хв.

Для розділення проб на фракції, відповідно до молекулярних мас, використовували хроматографію, що поділяє за розмірами, на носієві HiLoad 16/60 Superdex 200 PG («Bio Rad», США) чи носієві HiLoad 16/60 Superdex 75 PG («Bio Rad», США). Швидкість всіх етапів хроматографічного процесу складала 0,5 мл/хв для хроматографії на носієві HiLoad 16/60 Superdex 200 PG та 0,75 мл/хв для хроматографії на носієві HiLoad 16/60 Superdex 75 PG.

#### **4.4.3. Афінна хроматографія**

Ліофілізат проб, одержаних після етапу їх очистки методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці з Sephadex G 25, розчиняли у 10 мМ трис-НСІ буфері (рН 8,0), що містив 5 мМ CaCl<sub>2</sub> з розрахунку 0,5 мг ліофілізату на 5 мл буферу та залишали на 30 хв при 4<sup>0</sup>С, після чого центрифугували при 10 000 g впродовж 5 хв. Одержану надосодову наносили на колонку з SBTI-sepharose 4В (2,5 x 80 см), попередньо врівноважену цим же буфером. Швидкість нанесення складала 3 мл/хв. Після відмивання сорбенту від не зв'язаного матеріалу, білки, що зв'язалися з носієм, елюювали використовуючи 50 мМ гліцин-НСІ буфер (рН 3,0), що містив 10 мМ CaCl<sub>2</sub> та 1000 мМ NaCl за аналогічної швидкості.

Одержану фракцію збирали і відразу ж нейтралізували до рН 8,0 використовуючи 500 мМ NaOH.

Ліюфілізат проб, одержаних після етапу афінної хроматографії на колонці SBTI-sepharose 4B, розчиняли у 10 мМ трис-HCl буфері, рН 8,0, що містив 130 мМ NaCl з розрахунку 0,5 мг ліюфілізату на 5 мл буферу та залишали на 30 хв при 4<sup>0</sup>С, після чого центрифугували при 10 000 g впродовж 5 хв. Одержану надосодову наносили на колонку з Blue-sepharose 6 FF (2,5 x 80 см) врівноважену цим же буфером. Після відмивання сорбенту від не зв'язаного матеріалу, білки, що зв'язалися з носієм, елюювали використовуючи 10 мМ трис-HCl буфером, рН 8,0, що містив 1000 мМ NaCl. Швидкість нанесення та елюції матеріалу складала 1 мл/хв.

#### **4.5. Одержання фібриногену**

Фібриноген виділяли з плазми крові бика шляхом висолювання 16% розчином сульфату натрію з наступним відділенням кріофібриногену за методом [181]. Фібриноген очищали від домішок плазміногену методом афінної хроматографії на лізін-сефарозі. Швидкість нанесення та елюції складала 2 мл/хв. Очистка фібриногену на лізін-сефарозі дозволяє отримати фібриногену в якому кількість плазміногену складає менше ніж 0,05%.

Чистоту отриманого препарату контролювали методом диск-електрофорезу у 10% поліакриламідному гелі. Отримані препарати зберігали при температурі -20<sup>0</sup>С.

#### **4.6. Визначення фібриногенолітичної та фібринолітичної активності**

Фібриногенолітичну активність визначали відносно до методу [182], інкубуючи фібриногенолітичний фермент з фібриногеном (1мг/мл) у 50 мМ

трис-НС1 буфері (рН 7,4), що містить 130 мМ NaCl при 37<sup>0</sup>С. Співвідношення фібриноген : фермент складало 100:1. Аліквоти для аналізу відбирали через 0, 1, 2, 3, 4, 6, 24 та години інкубації, змішували з 5% β-меркаптоетанолом, кип'ятили впродовж 3-5 хв, після чого додавали рівний об'єм буферу для приготування проб для електрофорезу. Одержані таким чином зразки аналізували методом диск-електрофорезу у 10% ДСН-ПААГ.

Фібринолітичну активність визначали, інкубуючи фібринолітичний фермент з фібриновим згустком, одержаним при додаванні до фібриногену (1мг/мл) 10 NIH тромбіну. Для цього на фібриновий згусток нашаровували досліджуваний фібринолітичний фермент та залишали при 37<sup>0</sup>С. Через певні часові проміжки (1, 6 та 24 годин) до фібринового згустку та зразків середовища інкубації додавали 5% β-меркаптоетанол, кип'ятили впродовж 3-5 хв, після чого змішували з рівним об'ємом буферу для приготування проб для електрофорезу. Одержані таким чином зразки аналізували методом диск-електрофорезу у 10% ДСН-ПААГ.

#### **4.7. Оцінка здатності фібриногену до полімеризації**

Фібринолітичний фермент (25 мкг) інкубували з фібриногеном (0,5 мг/мл) впродовж 1, 6 та 24 годин при 37<sup>0</sup>С, після чого до проб додавали 10 NIH тромбіну, що є значним надлишком відносно кількості фібриногену у пробі. Згусток фібрину, що утворився, відділяли шляхом викручування на склянну паличку та віджимали рідину, натискуючи на стінки пробірки. Одержаний згусток декілька разів промивали розчином 130 мМ NaCl, рідину видаляли з поверхні легким дотиком до фільтрувального паперу. Згусток розчиняли у 0,125% оцтовій кислоті.

Оптичну щільність зразків вимірювали спектрофотометрично за довжин хвиль 280 та 320 нм. Концентрацію фібриногену розраховували відповідно до формули:

$$\Phi \text{ (мг/мл)} = (E_{280} - E_{320}) / 1,56$$

## **4.8. Хронометричні тести**

### **4.8.1. Визначення тромбінового часу зсідання плазми**

У пластикову кювету коагулометра вносили плазму крові та фібриногенолітичний фермент. Інкубували при 37<sup>0</sup>С впродовж 2 хв, після чого вносили розчин тромбіну з активністю 36 МО/мл. Фіксували час зсідання у секундах на коагулологічному аналізаторі [183].

### **4.8.2. Визначення протромбінового часу зсідання плазми**

У пластикову кювету коагулометра вносили плазму крові та фібриногенолітичний фермент. Інкубували при 37<sup>0</sup>С впродовж 2 хв, після чого вносили суміш тромбопластин-Са<sup>2+</sup>. Фіксували час зсідання у секундах на коагулологічному аналізаторі [182].

### **4.8.3. Визначення активованого часткового тромбопластинового часу зсідання плазми**

У пластикову кювету коагулометра вносили плазму крові, фібриногенолітичний фермент та АЧТЧ-реагент. Інкубували при 37<sup>0</sup>С впродовж 3 хв, після чого додавали розчин 25 мМ СаСl<sub>2</sub>. Фіксували час зсідання у секундах на коагулологічному аналізаторі [182].

#### **4.9. Одержання сироватки крові**

Для отримання сироватки крові використовували цільну кров, яку відбирали у скляну пробірку та залишали при 37<sup>0</sup>С на 1 годину для вилучення фібриногену і супутніх білків. Утворений згусток видаляли скляною паличкою, після чого кров центрифугували при 2000 g впродовж 40 хв [184].

#### **4.10. Одержання плазми, збагаченої тромбоцитами**

Плазму крові отримували згідно з методом [184]. Кров для дослідження відбирали з вушної артерії здорового кроля у поліетиленову пробірку, що містила 3,8% розчин лимоннокислого натрію у кінцевому співвідношенні 9:1 та обережно перемішували (не струшуючи). Плазму, збагачену тромбоцитами, одержували після центрифугування стабілізованої крові при 300 g впродовж 10 хв при 20<sup>0</sup>С. Плазму, «бідну» на тромбоцити, отримували шляхом подальшого центрифугування плазми, збагаченої тромбоцитами за 1500 g впродовж 30 хв при 20<sup>0</sup>С.

#### **4.11. Дослідження процесу агрегації тромбоцитів**

Агрегацію тромбоцитів досліджували на фотооптичному агрегометрі АТ-02 («Медтех», РФ). У роботі на агрегометрі дотримувались ключових рекомендацій фірми виробника. Для досліджень використовували плазму, збагачену тромбоцитами. Перед проведенням досліджень визначали кількість тромбоцитів і при необхідності розводили її за допомогою плазми, бідною на тромбоцити, до концентрації 220-260 тис. кл/мкл. У кювету агрегометра вносили плазму, збагачену тромбоцитами, додавали фібриногенолітичний фермент та слідкували за процесом агрегації,

оцінюючи ступінь агрегації (максимальний рівень світлопропускання плазми після внесення зразка), який порівнювали зі ступенем агрегації у відповідь на внесення до плазми індуктора АДФ у кінцевій концентрації  $5 \cdot 10^{-9}$  мМ. Дослідження впливу фібриногенолітичного ферменту на процес АДФ-залежної агрегації тромбоцитів проводили у трьох пробах плазми, збагаченої тромбоцитами, різних кролів, при цьому дослід для кожної плазми повторювали тричі.

#### **4.12. Визначення загальної протеолітичної активності**

Загальну протеолітичну активність визначали відповідно до методу [185], використовуючи казеїн як субстрат. Розчин 4% казеїну готували розчиняючи 4 г казеїну у 80 мл 50 мМ трис-НСІ-буферу, рН 7,4, що містив 130 мМ NaCl, після чого додавали 1,6 мл 1000 мМ NaOH та залишали при кімнатній температурі на 40 хв для набухання казеїну. Далі розчин кип'ятили 15 хв на водяній бані, періодично помішуючи. Після охолодження казеїну до кімнатної температури, підводили рН розчину до 7,4 використовуючи 1000 мМ NaOH та доводили до кінцевого об'єму 100 мл 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,4, що містив 130 мМ NaCl. До проби (75 мкг білка) у 100 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4), що містив 130 мМ NaCl, додавали розчин 4% казеїну, ретельно перемішували та інкубували на водяній бані при 37<sup>0</sup>С впродовж 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 15% ТХО, після чого проби центрифугували при 10 000 g впродовж 30 хв. Ферментативну активність визначали у надосадовій рідині за накопиченням розчинних тирозинвмісних пептидів. Оптичну щільність проб вимірювали при 280 нм проти контрольного зразка, який замість досліджуваної проби містив відповідний об'єм дистильованої води.

Загальну протеолітичну активність розраховували відповідно до формули:

$$A (\text{од}\cdot\text{мг білка}^{-1}) = (E_{280} \times K) / C$$

Коефіцієнт  $K$  у даній формулі є похідним перерахунку часу інкубації на 1 год, кінцевого об'єму суміші (мл) і показника оптичних властивостей тирозину:

$$K = 2 \cdot 5 \cdot 147 \cdot 1/450 = 3,27 \text{ де,}$$

2 – перерахунок часу інкубації на 1 год;

5 – кінцевий об'єм суміші, мл;

147·1/450 – показник оптичних властивостей тирозину

$C$  - концентрація білка у пробі, мг

#### 4.13. Визначення трипсиноподібної активності

Трипсиноподібну активність визначали відповідно до методу [186], використовуючи синтетичний хромогенний субстрат *N*- $\alpha$ -бензоїл-DL-аргінін-*p*-нітроанлід (BAPNA). У лунку мікропланшету для імуноферментного аналізу вносили 50 мМ трис-НСl буфер, рН 9,0, пробу (20 мкг білка) та 0,3 мМ BAPNA, яку попередньо розчиняли у мінімальному об'ємі диметилсульфоксиду та доводили до кінцевого об'єму дистильованою водою. Кількість вивільненого під дією ферменту *p*-нітроаніліну (*p*NA) визначали спектрофотометрично на рідері  $\mu$ Quant Microplate Spectrophotometer («Bio-Tek», США), вимірюючи оптичну щільність проб при 405 та 492 нм. Для розрахунку концентрації *p*NA використовували коефіцієнт молярної екстинкції  $\epsilon = 10,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

#### 4.14. Визначення активності щодо синтетичних хромогенних субстратів

Для визначення активності використовували хромогенні субстрати H-D-Phe-Pip-Arg-*p*NA (S<sub>2238</sub>), *p*uroGlu-Pro-Arg-*p*NA (S<sub>2366</sub>), Bz-Ile-Glu( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-*p*NA(S<sub>2222</sub>) та H-D-Val-Leu-Lys-*p*NA(S<sub>2251</sub>). У лунку мікропланшету для імуноферментного аналізу вносили 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 9,0 (для визначення активності трипсиноподібного ферменту) чи рН 10,0 (для визначення активності фібриногенолітичного ферменту), пробу (20 мкг білка) та відповідний субстрат у концентрації 0,3 мМ. Кількість вивільненого під дією ферменту *p*-нітроаніліну (*p*NA) визначали спектрофотометрично на рідері  $\mu$ Quant Microplate Spectrophotometer («Біо-Тек», США), вимірюючи оптичну щільність проб при 405 та 492 нм. Для розрахунку концентрації *p*NA використовували коефіцієнт молярної екстинкції  $\epsilon=10,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### **4.15. Визначення дії інгібіторів та іонів двовалентних металів**

Визначення проводили відповідно до методу [187]. Для дослідження впливу на активність ферментів інгібіторів протеаз EDTA (5 мМ), PMSF (2 мМ), SBTI (1 мг/мл) чи іонів двовалентних металів  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  (2, 5 і 10 мМ) у лунку мікропланшету для імуноферментного аналізу вносили 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 9,0 (для визначення активності трипсиноподібного ферменту) чи рН 10,0 (для визначення активності фібриногенолітичного ферменту), фермент (20 мкг білка) та відповідний інгібітор чи іон металу. Після інкубації впродовж 30 хв до проб додавали субстрат *p*uroGlu-Pro-Arg-*p*NA у кінцевій концентрації 0,3 мМ. Кількість вивільненого під дією ферменту *p*-нітроаніліну (*p*NA) визначали спектрофотометрично на рідері  $\mu$ Quant Microplate Spectrophotometer («Біо-Тек», США), вимірюючи оптичну щільність проб при 405 та 492 нм. Для розрахунку концентрації *p*NA використовували коефіцієнт молярної екстинкції  $\epsilon=10,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### 4.16. Визначення рН та температурного оптимуму

Визначення проводили відповідно до методу [188]. Вплив рН на активність ферментів визначали, використовуючи наступні буфери: 50 мМ лимонна кислота/цитрат натрію (рН 3,0-5,0); 50 мМ трис-НСl (рН 6,0-8,0) і 50 мМ гліцин (рН 9,0-13,0); визначення температурного оптимуму проводили у діапазоні температур від 8°C до 52°C при встановленому рН оптимумі. У лунку мікропланшету для імуноферментного аналізу вносили відповідний буфер, фермент (20 мкг білка) та субстрат *pyroGlu-Pro-Arg-pNA* у кінцевій концентрації 0,3 мМ. Кількість вивільненого під дією ферменту *p*-нітроаніліну (*pNA*) визначали спектрофотометрично на рідері *μQuant Microplate Spectrophotometer* («Біо-Тек», США), вимірюючи оптичну щільність проб при 405 та 492 нм. Для розрахунку концентрації *pNA* використовували коефіцієнт молярної екстинкції  $\varepsilon = 10,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### 4.17. Визначення кінетичних параметрів реакції гідролізу хромогенних субстратів

Кінетичні параметри гідролізу субстратів визначали відповідно використовуючи субстрат *pyroGlu-Pro-Arg-pNA* для трипсиноподібного ферменту та *H-D-Phe-Pip-Arg-pNA* для фібриногенолітичного ферменту у діапазоні концентрацій від 0,01 до 3 мМ. Виміри проводили за оптимальних значень рН та при температурі 8°C і 24°C для трипсиноподібного ферменту і 37°C для фібриногенолітичного ферменту. Швидкість реакції визначали зп накопиченням продуктів реакції, вимірюючи оптичну щільність проб при 405 та 492 нм через кожні 5 хв впродовж 60 хв. Знаходили початкову швидкість реакції  $V_0$  для кожної концентрації субстрату, будували криві залежності  $V_0$  від  $S_0$ . Кінетичні константи  $K_M$  та  $V_{max}$  визначали методом лінеаризації отриманих даних у зворотніх координатах Лайнуївера-Берка.  $k_{cat}$

розраховували як відношення  $V_{\max}$  до  $[E]$ , де  $[E]$  – молярна концентрація ферменту, розрахована з урахуванням молекулярної маси ферментів.

#### **4.18. Визначення концентрації білка**

Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд [189], який базується на здатності білків зв'язуватися з кумасі діамантовим синім G-250. Для визначення концентрації білка до проби додавали 30% розчин NaOH, дистильовану воду та робочий розчин реактиву Бредфорд. Для приготування робочого розчину змішували стоковий розчин реактив, 95% етанол та 88% ортофосфорну кислоту за співвідношення 2:1:2 та доводили водою до об'єму 100 мл. Стоковий розчин містив 10 мл 95% етанолу, 20 мл 88% ортофосфорної кислоти та 35 мг кумасі діамантового синього. Інтенсивність забарвлення, яке утворювалось через 2-5 хв, вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 595 нм проти контролю, який замість проби містив дистильовану воду. Концентрацію білка у досліджуваному зразку визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/мл.

#### **4.19. Статистична обробка отриманих результатів**

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Excel (Microsoft corporation, США). Обраховували показники середньої арифметичної ( $M$ ), середньої квадратичної помилки середньої арифметичної ( $m$ ). Побудова графіків проводилася за допомогою пакету Origin 9.0 (OriginLab Corporation, США).

## РОЗДІЛ 5

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАГАЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ ТКАНИН ГІДРОБІОНТУ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ А. COLBECKI

На сьогодні спостерігається стрімке зростання попиту на засоби на основі речовин природного походження, які характеризуються більшою безпечністю, відсутністю негативних впливів на здоров'я людини та стан довкілля. Перспективним в цьому контексті є використання ферментів, які з огляду на ряд характеристик можуть активно застосовуватися не лише у харчовій та легкій промисловості, а й бути використані як активна діюча речовина у фармакологічних та косметичних засобах. Так, препарати на основі ферментів все активніше використовуються у хірургії, офтальмології, гінекології, отоларингології, а також у дерматології та косметології. Завдяки здатності гідролізувати білкові субстрати, протеолітичні ферменти ефективно лізують некротизовані тканини, гнійні екsudати, виявляють одночасно протизапальну, фібринолітичну і протинабрякову дію. Незважаючи на нагальну потребу ринок ферментів та ферментних засобів далекий від насичення, що обумовлено поєднанням низки чинників, зокрема, їх відносною нестійкістю, складністю відділення кінцевих продуктів, труднощами, пов'язаними з необхідністю внесення чи заміни кофакторів для оптимізації перебігу ферментативної реакції. Враховуючи значний практичний потенціал використання засобів на основі ферментів у різних галузях промисловості пошук нових економічно обґрунтованих джерел сировини та розробка нових підходів щодо швидкого скринінгу, виділення та очистки цільових молекул для створення оригінальних фармакологічних субстанцій набуває особливого значення як для академічної науки в цілому, так і для практичної біотехнології та фармакології.

У даному контексті увагу науковців привертає Світовий океан, біологічне різноманіття якого складає фактично необмежений ресурс в області виділення нових речовин. Визначальними факторами, що обґрунтовують доцільність пошуку біологічно активних речовин саме серед метаболітів морських гідробіонтів є економічна рентабельність, обумовлена широкою розповсюдженістю та відносно високим відтворюваним потенціалом даних організмів, що на фоні невпинно зростаючого дефіциту сировини і, відповідно, постійно зростаючої ціни на фармакологічні препарати основу яких складають досить коштовні речовини, виділені з сировини рослинного та тваринного генезу, набуває особливого значення та актуальності.

За даними літератури, у тканинах морських безхребетних виявлено ряд ферментів, що задіяні у реалізації низки фізіологічних процесів, починаючи з розщеплення білкових молекул і закінчуючи більш специфічними функціями, такими, як активація проферментів, участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу, у процесах ембріонального розвитку, росту та диференціювання клітин, реалізації захисних механізмів. Тому дані організми можна розглядати як потенційний сировинний ресурс для одержання ферментів.

Додатковим аргументом на користь використання морських гідробіонтів як сировинного ресурсу є відсутність, на відміну від сировини тваринного походження, так званих споживчих ризиків, пов'язаних з потенційно існуючою загрозою зараження коров'ячим сказом, ящуром чи пташиним грипом та існування генетичних модифікацій. Окрім того, сировина тваринного генезу може бути контамінована пріонами, інфекційними агентами, проонкогенами, нуклеїновими кислотами та іншими потенційно-небезпечними для здоров'я речовинами, що потребує включення додаткових стадій очистки та контролю чистоти продукції на всіх етапах виробничого процесу та впливає на собівартість кінцевої продукції.

Проте, незважаючи на ряд безумовних переваг, використання ферментів, виділених з морських організмів є досить обмеженим. Серед причин їх обмеженого використання – недостатність інформації щодо фізико-хімічних характеристик даних ферментів, періодичні (часто, сезонні) коливання кількості матеріалу, а також стереотипне ставлення широкої громадськості до субпродуктів та відходів морського промислу, як до сировинного ресурсу.

Разом з тим, такі джерела можуть забезпечити промисловість ферментами з унікальними властивостями, особливо це стосується ферментів, виділених з організмів адаптованих до низьких температур або психрофільних організмів. Ферменти з психрофільних організмів є цікавими об'єктами не лише з точки зору проведення фундаментальних досліджень та вивчення адаптаційних можливостей організму, а й становлять певний практичний інтерес. Їх практична привабливість полягає у відносно високій каталітичній ефективності ферментів при низьких та середніх температурах, високій термолабільності та здатності функціонувати в органічних розчинниках. Ферменти з адаптованих до холоду організмів можуть бути більш комерційно вигідними, за рахунок, більшої продуктивності, ніж мезофільні або термофільні аналоги при низьких температурах, забезпечуючи тим самим значну економію енергії при їх використанні у ферментативних процесах. Дані ферменти можна використати як активні компоненти у миючих засобах, продуктах харчування, застосувати під час обробки шкіри, деградації ксенобіотиків, молекулярній біології. Психрофільні ферменти зазвичай виявляють максимальну каталітичну активність при температурах нижче 40°C та є досить термолабільними. Наразі зростає тенденція до промислової обробки продуктів за м'яких, порівняно з традиційними, умов, зокрема, за понижених температур, для того, щоб уникнути небажаних змін властивостей продукції та пониження харчової цінності. Ферменти, що каталізують реакції за нижчих температур, можуть бути особливо корисними у промислових процесах, що потребують

ферментативної обробки впродовж короткого часу з наступною швидкою зупинкою реакції для того, щоб запобігти надлишковим чи шкідливим змінам. Прикладами може слугувати використання психрофільних протеаз для гідролізу білків, при обробці ікри, під час виділення каротенопротеїдів для використання їх як барвників чи ароматизаторів. З огляду на високу термолабільність, холодоадаптовані ферменти можуть інактивуватися навіть за незначного підвищення температури, яке не змінить властивостей кінцевого продукту. Окрім того використання таких ензимів може звести до мінімуму небажані хімічні реакції, які можуть відбуватися при більш високих температурах. Такі функціональні особливості сприяють використанню психрофільних ферментів для трансформації субстратів в умовах, що вимагають низьких температур.

Зважаючи на певні особливості фізико-хімічних характеристик речовин з морських організмів, оптимізацію існуючих та розробку нових методів їх одержання, а також детальне вивчення властивостей, можна віднести до одного з пріоритетних напрямків розвитку науково-технологічного прогресу.

Отримання вихідного екстракту з потенційного джерела є важливим етапом процесу одержання цільових молекул, оскільки перш за все необхідно підібрати оптимальні умови та методологічні підходи для виділення речовин з максимальним збереженням їх функціональних характеристик.

В наших дослідженнях як вихідний матеріал було використано заморожену масу гідробіонту Антарктичного регіону *Adamussium colbecki*. Для одержання екстракту використовували м'які тканини гідробіонту, які гомогенізували з послідовними додаванням рідкого нітрогену та 100 мМ Na-фосфатного буферу, рН 7,4, що містив 150 мМ NaCl. З метою збереження стабільності та функціональної активності білкових молекул та для того, щоб забезпечити належну екстракцію білків з тканин гідробіонту до буферу додавали 0,15 мМ EDTA, 2 мМ PMSF та 0,1% тритон X-100. Проби залишали на 30 хв при 4 °C, після чого центрифугували при 10000 g, 40 хв. Надосадову

рідину ліофілізували і використовували як загальний екстракт тканин після розчинення у відповідному буфері згідно з задачами конкретного етапу дослідження [190].

Для того, щоб одержати вихідну інформацію щодо білково-пептидного складу тканин *A. colbecki* та оцінити доцільність використання саме даного виду гідробіонту для проведення подальших досліджень, спрямованих на одержання та характеристику окремих ферментів, спочатку було проаналізовано якісний склад білків у загальному екстракті тканин гідробіонту. Для цього було використано метод одновимірного диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію, який дозволяє ефективно розділити білкові молекули відповідно до їх молекулярних мас. Використання концентруючого гелю дозволило ефективно розділити білки у діапазоні молекулярних мас від 10 до 150 кДа, що цілком відповідало вимогам експерименту, а можливість в рамках даного підходу варіювати щільність розділяючого гелю дала змогу підібрати умови для досягнення максимально ефективного поділу білкових молекул.

На рис. 5.1 наведено типову електрофореграму розділення загального екстракту тканин *A. colbecki*. Як видно з одержаних нами даних, досліджуваний екстракт характеризується досить широким спектром білкових молекул, що різняться за молекулярними масами.

Для встановлення точних молекулярних мас білків, присутніх у досліджуваному зразку, одержані електрофореграми були обраховані з використанням програми TotalLab 2.04, що дозволило виявити білкові фракції з молекулярними масами у діапазоні від 35 до 200 кДа. Так, було ідентифіковано 10 чітко виражених смуг з молекулярними масами 157, 144, 130, 121, 110, 79, 61, 47, 44, 35 кДа. Варто зазначити, що близько 50% від загальної кількості білків, мали молекулярну масу, вищу за 100 кДа.

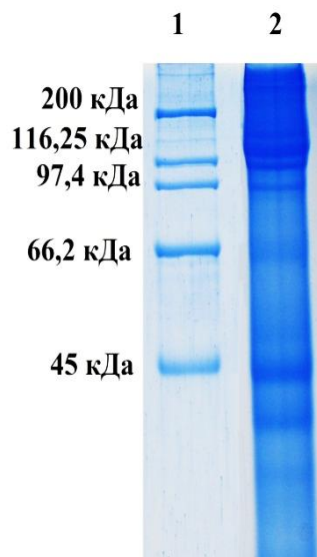


Рис. 5.1. Типова електрофореграма розділення білків загального екстракту тканин гідробіонту *A. colbecki*:

- 1 – маркери молекулярних мас;
- 2 – досліджуваний екстракт

Для більш детальної характеристики білкових молекул у загальному екстракті тканин *A. colbecki* було застосовано метод двовимірного електрофорезу, який дозволяє розділяти білкові молекули не лише за молекулярними масами, а й відповідно до їх ізоелектричних точок (pI). Даний метод передбачає спочатку ізоелектрофокусування білків у градієнті рН від 3,0 до 10,0 з подальшим їх розділенням у поліакриламідному гелі.

Застосування двовимірного гель-електрофорезу за умов нашого експерименту є особливо доцільним з огляду на те, що зразки тканин гідробіонтів - це складна суміш різноманітних за молекулярними масами білкових молекул та пептидів. Тому при використанні лише одновимірного електрофорезу деякі білкові зони можуть перекриватись. Електрофоретичне розділення у другому напрямку забезпечує більш ефективне розділення білків і дозволяє отримати більш повну картину розділення білкових молекул. На рис. 5.2 наведено типову 2D-електрофореграму розділення білків загального екстракту тканин *A. colbecki*.

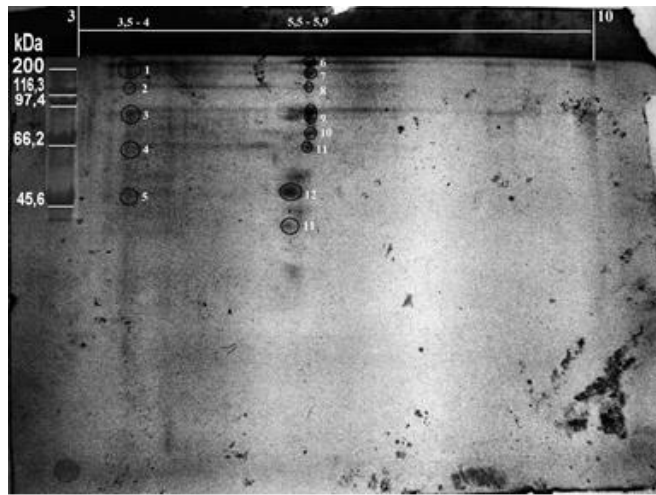


Рис. 5.2. Типова 2D-електрофореграма розділення білків загального екстракту тканин гідробіонту *A. colbecki*

Аналіз білків загального екстракту тканин з застосуванням даного методу виявив присутність у площині 2D-електрофореграми певної кількості білкових плям, ізоелектричні точки яких розташовані у двох інтервалах рН - від рН 3,5 до рН 4,0 та від рН 5,5 до рН 5,9 та діапазоні молекулярних мас від 30 до 235 кДа. Результати обрахунку 2D -електрофореграми представлено у табл.5.1, відповідно до яких було виявлено близько 14 білкових плям, п'ять з них мали рІ у діапазоні рН 3,5-4,0. Ізоелектричні точки решти дев'яти білків знаходились у межах рН 5,5 – 5,9. Присутність у загальному екстракті білків з ізоелектричними точками в області кислих значень рН опосередковано вказує на той факт, що домінуюча частина білків досліджуваного гідробіонту представлена аніонними ізоформами білками. Це може бути обумовлено як нижчим вмістом у молекулі залишків позитивно заряджених амінокислот, так і/або наявністю значної кількості залишків негативно заряджених амінокислот, зокрема, глутамінової та аспарагінової кислоти. Значна частка саме аніонних ізоформ білків в цілому узгоджується з даними, наведеними у літературі, відповідно до яких багато ферментів у тканинах гідробіонтів представлені саме аніонними лізоформами. Так, наприклад, ізоелектричні точки найбільш розповсюджених гідролітичних ферментів гідробіонтів –

трипсиноподібних ферментів – знаходиться в області кислих значень рН [191, 192]. У земноводних та птахів трипсини представлені як аніонними, так і катіонними лізоформами, але у кількісному відношенні переважають аніонні трипсини [193]. Трипсини і хімотрипсини ссавців зазвичай мають ізоелектричні точки при рН 9,0-11,0 [194].

Таблиця 5.1

**Ізоелектричні точки білків загального екстракту тканин гідробіонту  
*A.colbecki***

<b>рН 3,5- 4,0</b>	<b>рН 5,5-5,9</b>
211 кДа	235 кДа
121 кДа	180 кДа
92 кДа	121 кДа
60 кДа	93 кДа
46 кДа	83 кДа
	68 кДа
	49 кДа
	40 кДа
	30 кДа

Виявлений нами відносно широкий спектр білків з різною молекулярною масою, представлених у загальному екстракті тканин, дозволяє припустити присутність серед загальної маси білків функціонально активних молекул ферментів. Особливо це стосується білків, молекулярна маса яких є нижчою за 100 кДа, адже відомо, що більшість ферментів гідробіонтів мають молекулярну масу до 100 кДа, а відповідно до наших результатів близько 64% від загальної кількості білків *A. colbecki* мають масу меншу за 100 кДа.

Оскільки одним з відносно простих, чутливих і наочних способів детекції у біологічному матеріалі активних протеаз, є метод ензим-електрофорезу, на наступному етапі роботи було використано саме даний методичний підхід. Особливість методу ензим-електрофорезу полягає у тому, що полімеризація розділяючого гелю відбувається за присутності відповідних субстратних білків. Слід зазначити, що концентрація розділяючого гелю має бути не нижчою 12%, що унеможливило міграцію заполімеризованих у гель субстратних білків. Після закінчення електрофоретичного розділення гелі відмивають у 2,5% розчині тритону Х-100 для видалення залишків додецилсульфату натрію та залишають у оптимальному для прояву ферментативної активності буфері на 10-12 годин для виявлення присутності в аналізованих зразках ферментів відповідної субстратної специфічності. При наявності у досліджуваних зразках активних гідролітичних ферментів, заполімеризовані у поліакриламідний гель субстратні білки будуть зазнавати розщеплення, при цьому зони, що відповідають локалізації активних ферментів, не будуть забарвлюватись після профарбовування відповідно до стандартної методики диск-електрофорезу.

Для того, щоб приблизно оцінити протеолітичний потенціал досліджуваного гідробіонту як субстрати було використано желатин, фібриноген та колаген. Проведений ензим-електрофоретичний аналіз загального екстракту тканин дозволив отримати наступні результати, які наведено на рисунку 5.3. Для визначення молекулярних мас ідентифікованих активних ферментів, одержані ензим-електрофореграми було обраховано з використанням програми TotalLab 2.04.

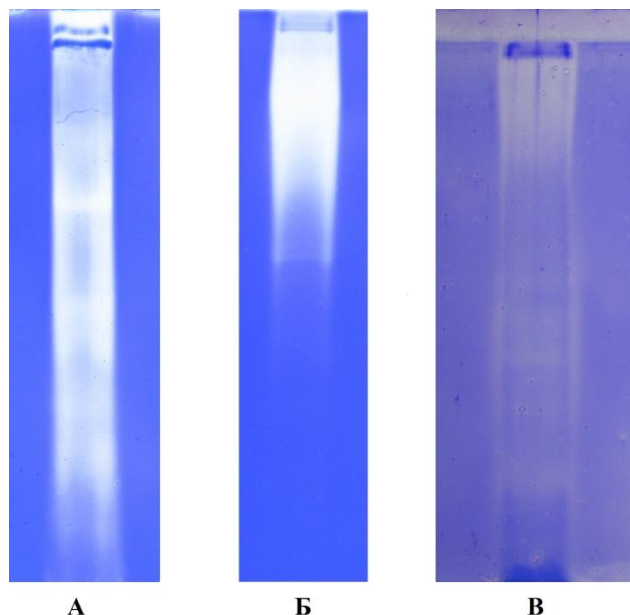


Рис. 5.3. Типові ензим-електрофореграми розділення білків загального екстракту тканин гідробіонту з використанням як субстрату желатину (А), фібриногену (Б), колагену (В)

Візуальне порівняння одержаних ензим-електрофореграм дозволяє зробити висновок про значно вищу активність ферментів з *A. colbecki* у випадку використання як субстрату желатину. При цьому зона гідролізу була розтягнута по всій довжині треку. Одержані результати є цілком очікуваними, адже у даному методичному підході желатин, зазвичай, використовують для попередньої оцінки присутності активних форм ферментів, оскільки його розглядають як загальний субстрат, що дає можливість оцінити загальну протеолітичну активність.

Колаген та фібриноген є більш специфічними субстратами, так як не всі ферменти здатні до їх гідролізу. Так, використання заполімеризованого у поліакриламідний гель фібриногену дозволяє говорити про присутність чи, відповідно, відсутність фібриногенолітичних ферментів. У випадку використання як субстрату фібриногену (рис. 5.3 Б ) активна зона гідролізу була ідентифікована переважно в області, що відповідає білкам з молекулярною масою вище 50 кДа. Зазвичай істинні фібриногенолітичні

ферменти мають молекулярну масу від 20 до 60 кДа, проте відомі ферменти як з нижчою, так і з вищою масою. Присутність у загальному екстракті високомолекулярних ферментів зі специфічністю щодо фібриногену можна пояснити включенням даних ферментів у комплекси.

З огляду на існуючу на сьогодні нагальну потребу у високоефективних терапевтичних засобах, здатних діяти на ланку зсідання системи гемостазу та позбавлених при цьому побічних ефектів, характерних для типових антикоагулянтів, одержані нами результати щодо присутності у екстракті тканин *A. colbecki* ферментів з фібриногенолітичною активністю є цікавими та вказують на доцільність проведення подальших досліджень, спрямованих на одержання та характеристику даних ферментів. Фібриногенолітичні ферменти можуть знайти застосування у білковій хімії, при дослідженнях структурних взаємодій з іншими білками. Препарати, створені на основі фібриногенолітичних ферментів, можуть бути використані у клінічній практиці для дефібринування плазми крові при деяких патологічних станах, асоційованих з надмірним тромбоутворенням.

Результати ензим-електрофоретичного аналізу загального екстракту тканин з використанням заполімеризованого у розділяючий гель колагену наведено на рис 5.3 В. Як бачимо з наведених даних, досліджуваний екстракт також містив гідролітичні ферменти, здатні розщеплювати колаген, проте чітко окреслених зон гідролізу виявлено не було - гідролітична активність різного ступеню вираженості відмічалася по всій довжині треку. Варто відмітити той факт, що деякі зони гідролізу на ензим-електрофореграмах з желатином та колагеном співпадали. Це опосередковано може свідчити про наявність ферментів, що одночасно володіють як желатиназною, так і колагеназною активністю. Показана нами присутність у загальному екстракті тканини гідробіонту ферментів з колагенолітичною активністю в цілому узгоджується з даними літератури. Так, однією з нетипових характеристик ферментів з морських гідробіонтів, зокрема, Антарктичного регіону, є їх

здатність розщеплювати потрійну спіраль колагену у багатьох точках, що відрізняє колагенолітичні протеази гідробіонтів від колагеназ мікробного і тваринного походження, які каталізують розщеплення субстрату переважно в одній специфічній точці і практично не здатні гідролізувати великі фрагменти колагену, що при цьому утворюються. Ферменти, що володіють колагенолітичною активністю, представляють певний інтерес з позицій їх практичного застосування у медицині, біотехнології, харчовій промисловості. На основі колагенолітичних ферментів вже створено низку препаратів для лікування ран, опіків та інших пошкоджень шкіри, оскільки вони здатні ефективно лізувати некротизовані тканини, гнійні екsudати, виявляють певну протизапальну і протинабрякову дію, що сприяє безболісному очищенню і відносно швидкому загоєнню ран. Слід підкреслити, що ефективних вітчизняних лікарських препаратів на основі колагеназ з гідробіонтів Антарктичного регіону на сьогодні не існує, а ліцензійні імпорتنі засоби є дорогими за вартістю та не завжди доступними, що значно обмежує їх широке застосування в клінічній практиці і актуалізує проблему розробки і впровадження на вітчизняний фармакологічний ринок нових препаратів із заданими властивостями.

Таким чином, загальний екстракт тканин гідробіонту *A. colbecki* містить ряд активних гідролітичних ферментів з різною субстратною специфічністю.

Враховуючи одержані результати, наступним нашим завданням було оцінити присутність серед протеолітичних ферментів гідробіонту, ферментів з різною будовою активного центру. Для цього було використано інгібітори EDTA та PMSF, що дозволило з'ясувати внесок, відповідно, металозалежних ферментів та серинових протеаз. Застосування соєвого інгібітору трипсинів SBTI дозволило одержати додаткову інформацію щодо присутності серед трипсиноподібних ферментів. Вплив інгібіторів оцінювали, порівнюючи результати визначення казеїнолітичної активності, яку можна розглядати як загальну протеолітичну активність, за інкубації загального екстракту, як

джерела ферментів, з відповідними інгібіторами з результатами без додавання інгібітору.

Одержані нами дані вказують на присутність у загальному екстракті тканин протеаз з різною будовою активного центру. Як видно з результатів, представлених у таблиці 5.2, застосування EDTA обумовлювало пригнічення казенолітичної активності у 1,25 раза в той час як при додаванні до проб PMSF мало місце більш виражене пригнічення ферментативної активності. Так, спостерігалось зниження ферментативної активності у 2,1 раза.

Таблиця 5.2

**Загальна протеолітична активність за дії інгібіторів протеаз**

	Питома активність ферменту, од·мг білка <sup>-1</sup>	% Інгібування
Базальна активність	7,3±0,64	-
+EDTA (5 мМ)	5,8±0,38*	20,6
+PMSF (2 мМ)	3,4±0,47*	53,5
+SBTI (1 мг/мл)	3,7±0,52*	49,4

\* -  $p < 0,05$  у порівнянні з базальною активністю

PMSF, як загальний інгібітор серинових протеаз, вступаючи у взаємодію з залишками серину в активному центрі ферменту, унеможливає перебіг ферментативних реакцій. Його дія викликає пригнічення активності таких серинових протеаз як трипсин, хімотрипсин, еластаза. Згідно з нашими результатами, застосування PMSF обумовлювало більш виражене пригнічення казеїнолітичної активності у досліджуваному екстракті тканин гідробіонту.

З огляду на результати проведеного інгібіторного аналізу можемо говорити про наступний розподіл протеаз з різною будовою активного центру у тканинах досліджуваного гідробіонту (рис. 5.4). Так, серинові протеази є домінуючими і обумовлюють близько 53% від загальної протеолітичної активності, в той час як металозалежні протеази займають близько 20% у загальній структурі. Решта 27% може бути обумовлена присутністю цистеїнових та аспартильних протеаз.

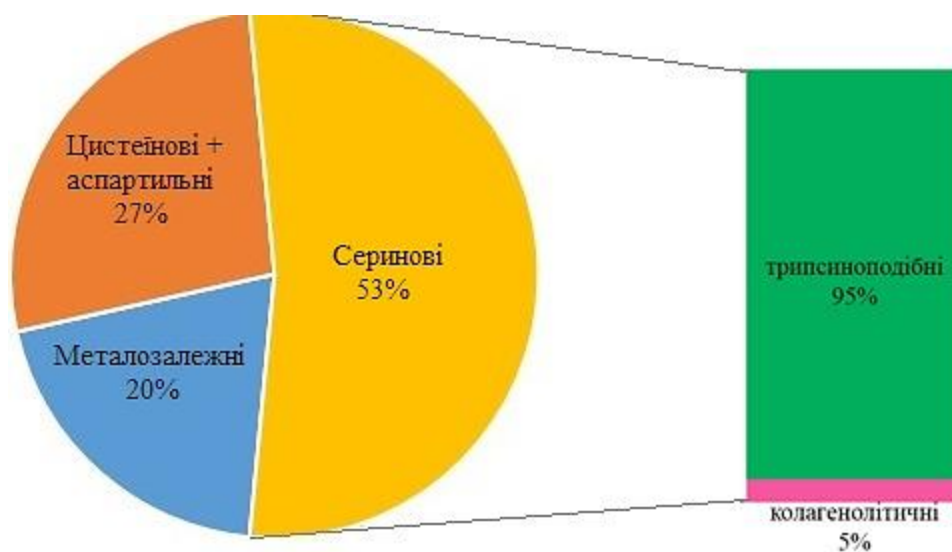


Рис. 5.4. Протеолітична активність у загальному екстракті тканини гідробіонту *A. colbecki*

Типовими представниками серинових протеаз є трипсини, які задіяні у реалізації більшості фізіологічних процесів та біохімічних реакцій, починаючи з розщеплення білкових молекул і закінчуючи більш специфічними функціями, такими, як активація проферментів, участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу, у процесах ембріонального розвитку, росту та диференціювання клітин, реалізації захисних механізмів. Тому доцільним видавалося оцінити присутність серед серинових протеаз

саме трипсиноподібних ферментів. Для досягнення поставленої мети було використано соєвий інгібітор трипсинів SBTI, який належить до специфічних інгібіторів трипсинів. Одержані нами результати показали, що за інкубації з SBTI мало місце пригнічення казеїнолітичної активності у 1,9 рази, що однозначно вказує на значну присутність трипсиноподібних ферментів.

Проаналізувавши одержані результати, можемо зробити висновок, що серед серинових протеаз досліджуваного гідробіонту близько 95% активності опосередковується саме трипсиноподібними ферментами, решта 5% може бути пов'язана з присутністю серинових колагенолітичних ферментів. Відомо, що колагенолітичні ферменти безхребетних належать переважно не до металопротеаз, як це має місце у випадку більшості колагеназ хребетних, а є представниками серинових протеаз, які відрізняються від «істинних» колагеназ передусім будовою активного центру, в якому міститься залишок серину. Так, серинові колагенази було виділено з комахи *H. lineatum*, краба *U. pugilator*, *P. corrugatus* деяких земноводних і ссавців [193 - 194]. Серинові протеази з колагенолітичною активністю мають значно нижчу молекулярну масу, але за основними структурно-функціональними характеристиками та механізмом дії подібні до трипсиноподібних ферментів.

Враховуючи одержані нами результати щодо присутності у тканинах досліджуваного гідробіонту різних протеаз, доцільним видавалося виділити окремі білкові фракції та охарактеризувати їх за проявом ферментативної активності та спектром молекулярних мас, що і було завданням наступного етапу нашої роботи.

Беручи до уваги, що молекулярні маси більшості білків у загальному екстракті тканин знаходяться у діапазоні молекулярних мас від 30 до 150 кДа для поділу досліджуваного екстракту на окремі фракції було використано метод хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці з носієм, розмір пор якого був оптимальним для реалізації поставленої нами задачі. Оскільки

ефективність поділу безпосередньо залежить від низки факторів, зокрема, сорбції матеріалу на носіїві, швидкості потоку нанесення та елюції матеріалу, складу робочого буферу для хроматографування, концентрації зразку при нанесенні, першочерговим нашим завданням було оптимізувати умови, які б забезпечили належний хроматографічний поділ екстракту. Даний етап є виключно важливим з огляду на існування певних структурних особливостей сполук, одержаних з гідробіонтів Антарктичного регіону, у порівнянні з аналогічними речовинами з мезофільних організмів. Відмінності структури та специфічності ферментів гідробіонтів обумовлюють необхідність розробки чи оптимізації методів їх одержання, очистки та стабілізації, оскільки загальноприйняті методичні підходи у більшості випадків є малоефективними. Це відноситься як до методів роботи з тканинними екстрактами, так і з чистими ферментами чи фракціями біологічно активних речовин. Тому спочатку були проведенні дослідження по підборі оптимального сорбенту для забезпечення належного фракціонування саме даного матеріалу. Було протестовано декілька сорбентів, зокрема, Superdex 75 PG та Superdex 200 PG, що характеризуються високою фізико-хімічною стабільністю і практично не проявляють неспецифічних взаємодій з компонентами аналізованого зразку. В результаті порівняння ефективності поділу за використання різних носіїв ми зупинили свій вибір на носіїві Superdex 75 PG, який і було використано для проведення даного блоку досліджень.

Також була підібрана оптимальна для роботи швидкість нанесення та елюції матеріалу [195]. Як бачимо з результатів, наведених на рис. 5.5, найбільш ефективно розділення екстракту на окремі білкові фракції мало місце при швидкості потоку 0,5 мл/хв, адже саме за таких умов спостерігалось найбільш виражене розходження піків.

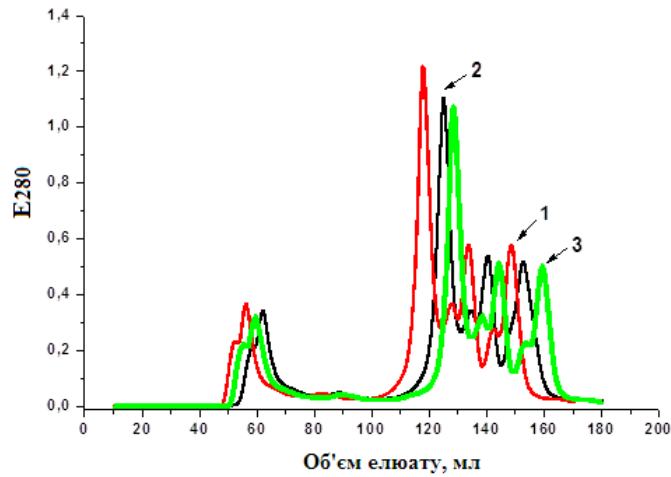


Рис. 5.5. Хроматограма розділення білків загального екстракту тканин гідробіонту на колонці з HiLoad 16/60 Superdex 75 PG за швидкості потоку 1,0 мл/хв (1), 0,75 мл/хв (2), 0,5 мл/хв (3)

Враховуючи результати проведених нами досліджень, рекомендованим є застосування як робочого буферу для хроматографування 50 мМ трис-НСІ, рН 7,4 з обов'язковим додаванням 150 мМ NaCl (рис. 5.6), оскільки це дозволило збільшити вихід білків у піках у порівнянні з використанням буферу, що не містив NaCl. Варто зазначити, що застосування саме даного буферного розчину або буферів з еквівалентною іонною силою дозволяє уникнути неспецифічних взаємодій білкових компонентів зразка із носієм та перешкоджає взаємодії між білками і утворенню білкових конгломератів, що в кінцевому результаті знижує кількість елюйованого матеріалу та може призвести до втрати потенційно цінних білків ще на етапі фракціонування матеріалу.

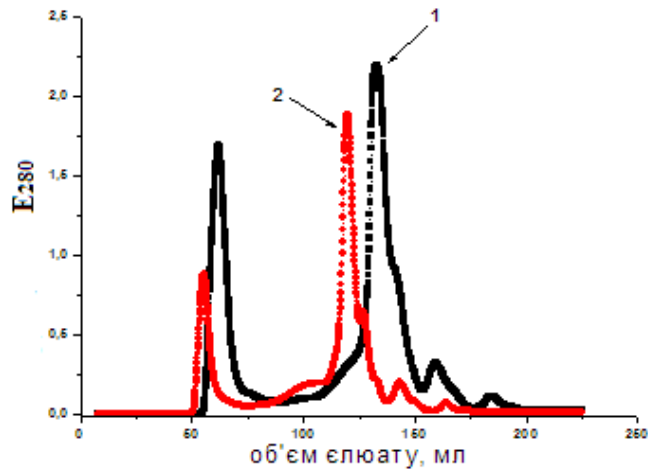


Рис. 5.6. Хроматограма розділення білків загального екстракту тканин гідробіонту на колонці з HiLoad 16/60 Superdex 75 PG за використання як робочого буферу 50 мМ трис-НСl, рН 7,4, що містив 150 мМ NaCl (1), 50 мМ трис-НСl, рН 7,4 без додавання NaCl (2)

Важливою умовою для ефективного та стандартизованого поділу білків, присутніх у аналізованих зразках є загальна концентрація білка у пробах, що наносяться на колонку. Даний фактор набуває особливої значимості при використанні хроматографії, що поділяє за розмірами. На рисунку 5.7 наведено результати хроматографічного розділення за нанесення на колонку зразків у різній концентрації. Згідно з одержаними результатами оптимальною для нанесення на колонку виявилась концентрація білка, що складала 50 мг/мл.

Також нами було показано, що розчинення зразків у буферах різної іонної сили жодним чином не впливало на характер розділення білкових фракцій (рис. 5.8).

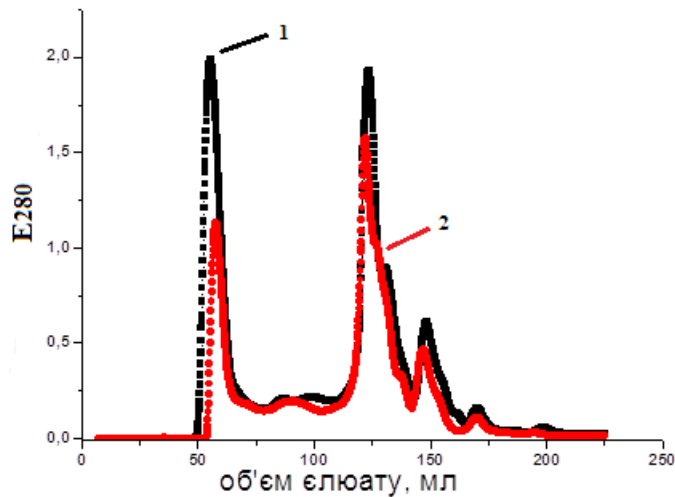


Рис. 5.7. Хроматограма розділення білків загального екстракту тканин гідробіонту на колонці з HiLoad 16/60 Superdex 75 PG за нанесення зразка у концентрації 50 мг/мл (1), 75 мг/мл (2)

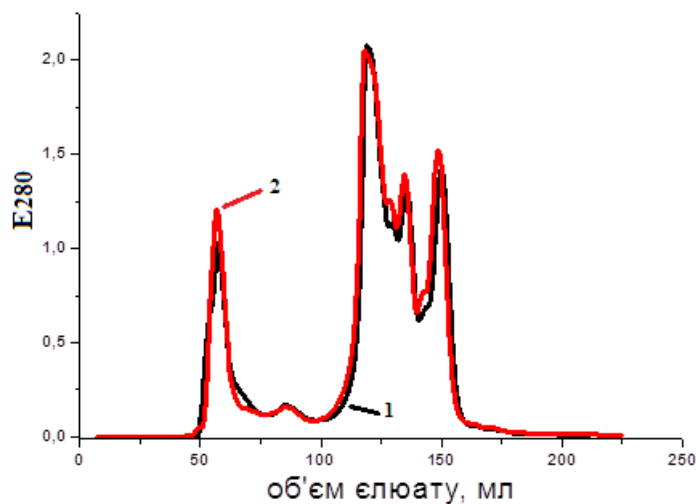


Рис. 5.8. Хроматограма розділення білків загального екстракту тканин гідробіонту на колонці з HiLoad 16/60 Superdex 75 PG за розчинення зразка у 50 мМ трис-НСІ, рН 7,4 з 500 мМ NaCl (1), 50 мМ трис-НСІ, рН 7,4 (2)

Таким чином, узагальнюючи результати проведеного етапу щодо підбору оптимальних умов для забезпечення належного фракціонування білків загального екстракту тканин досліджуваного гідробіонту методом хроматографії, що поділяє за розмірами, можемо рекомендувати наступні

параметри хроматографічного процесу: швидкість потоку – 0,5 мл/хв, робочий буфер для хроматографування - 50 мМ трис-НСІ (рН 7.4), що містить 150 мМ NaCl, загальна концентрація білка у зразку для нанесення - не вище 50 мг/мл.

Фракціонування загального екстракту тканин гідробіонту з дотриманням всіх вищезазначених параметрів (рис. 5.9) дозволило одержати 5 фракцій, які вподальшому було проаналізовано на наявність певних видів ферментативної активності.

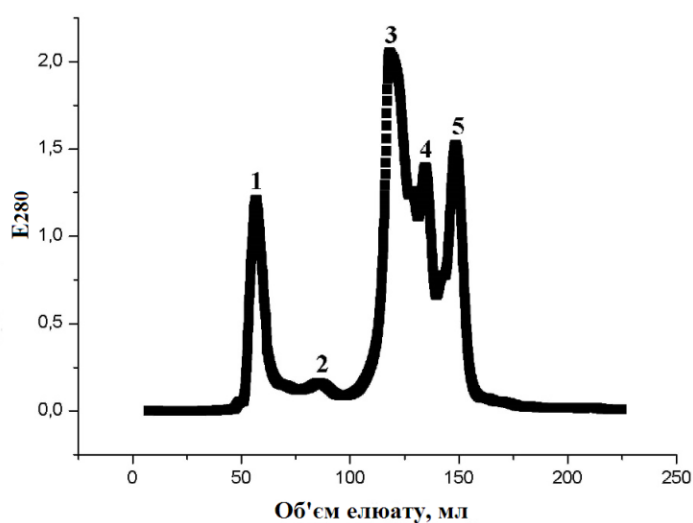


Рис. 5.9. Хроматограма розділення білків загального екстракту тканин гідробіонту на колонці з носієм HiLoad 16/60 Superdex 75 PG:

1-5 – білкові фракції

Як субстрати для проведення подальших досліджень було використано колаген I типу та синтетичний амід N- $\alpha$ -бензоїл-L-аргінін-*p*-нітроанлід (BAPNA), що дозволило ідентифікувати, відповідно, колагенолітичну та трипсиноподібну активності. Проте спочатку було визначено загальну протеолітичну активність, використовуючи казеїн як субстрат. У даному випадку визначення казеїнолітичної активності було необхідне не лише для того, щоб оцінити загальну протеолітичну активність у кожній окремій

фракції, а й для підтвердження доцільності використання даного методичного підходу для виділення ферментів зі збереженням їх функціональних активностей. Попереднє калібрування колонки з використанням білків відомої молекулярної маси дало можливість приблизно визначити молекулярні маси білків, що присутні в одержаних нами фракціях. Порівнюючи результати калібрування з результатами, одержаними в експерименті, можемо стверджувати, що 1-2 фракції містять білки з молекулярними масами 65 кДа і вище, в той час як у фракціях 3-5 присутні білки у діапазоні молекулярних мас від 30 до 65 кДа. Як бачимо з результатів, представлених у таблиці 5.3, казеїнолітична активність була зареєстрована у всіх п'яти фракціях, причому найбільша активність спостерігалася у 3 фракції, що містить білки з молекулярними масами близько 45-65 кДа, а найменша активність відмічалася у 1 та 5 фракціях.

Таблиця 5.3

**Протеолітична активність у фракціях, одержаних після розділення загального екстракту тканин гідробіонту, методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG**

	Номер фракції				
	1	2	3	4	5
	< 75 кДа	75-65 кДа	65-45 кДа	45-40 кДа	40-30 кДа
Казеїнолітична активність, од·мг білка <sup>-1</sup>	1,65±0,04	4,9±0,06	7,84±0,32	4,18±0,27	1,96±0,04
Трипсиноподібна активність, мкмоль рНА·хв <sup>-1</sup> ·мг білка <sup>-1</sup>	-	-	5,25±0,35	5,92±0,32	6,43±0,35

Колагенолітична активність, од·мг білка <sup>-1</sup>	-	-	-	-	38,5±0,58
---	---	---	---	---	-----------

Такі дані в цілому узгоджуються з результатами проведеного раніше ензим-електрофоретичного аналізу загального екстракту тканин гідробіонту та вказують на присутність як високо-, так і низькомолекулярних протеолітичних ферментів.

З огляду на одержані нами попередні результати щодо домінуючої частки серед серинових протеаз саме трипсиноподібних ферментів, далі ми визначали присутність у одержаних фракціях даного типу активності, що дозволило б зробити висновок про приблизну молекулярну масу трипсиноподібних ферментів досліджуваного гідробіонту. Проведений нами аналіз показав присутність трипсиноподібної активності у 3, 4 та 5 фракціях, причому максимальна активність була виявлена у 4 фракції, що містить білки з молекулярними масами 40-45 кДа. У фракціях, що відповідали білкам з молекулярною масою понад 65 кДа трипсиноподібної активності ідентифіковано не було. Такі результати повністю узгоджуються з даними літератури, відповідно до яких, молекулярні маси трипсинів, виділених з різних джерел, знаходяться у межах 15-50 кДа [190].

Певні відмінності у профілях ферментативної активності при використанні казеїну та VArNA можуть вказувати на присутність в одержаних фракціях інших ферментів, ймовірно, колагеназ. Адже відомо, що окрім здатності гідролізувати колаген та желатин, колагенази володіють активністю щодо казеїну. Тому далі фракції було проаналізовано на наявність колагенолітичних ферментів. У відповідності з результатами, наведеними у таблиці 5.3, колагенолітичну активність було виявлено лише у 5 фракції. А отже, молекулярна маса колагенолітичних ферментів з *A. colbecki* складає близько 30-40 кДа. Як вже зазначалося, серед

колагенолітичних ферментів безхребетних можна виділити як «істинні» колагенази, що належать до нейтральних металопротеаз, так і ті, що відносяться до серинових протеаз. Відмінності між обома типами пов'язані з особливостями будови активного центру, зокрема, включенням залишку серину у випадку серинових колагеназ та різним діапазоном молекулярних мас. Так, металозалежні колагенази більшості вищих тварин та мікроорганізмів мають молекулярну масу від 40 до 150 кДа, в той час як колагенолітичні серинові протеази морських безхребетних є комплексом із ферментів з молекулярною масою до 36 кДа.

Таким чином, узагальнюючи результати, одержані на даному етапі роботи, можемо говорити про доцільність використання гідробіонту Антарктичного регіону *A. colbecki* як джерела для одержання гідролітичних ферментів, зокрема, трипсиноподібних та перспективність проведення подальших досліджень спрямованих на одержання, очистку та визначення їх основних структурно-функціональних характеристик.

## РОЗДІЛ 6

### ОДЕРЖАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ТРИПСИНОПОДІБНОГО ФЕРМЕНТУ З ГДРОБІОНТУ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ

*A.COLBECKI*

Протеолітичні ферменти відіграють виключно важливу роль в обмінних процесах усіх живих організмів, починаючи від бактерій та мікроміцетів і закінчуючи вищими тваринами і людиною. Трипсини є типовими представниками серинових протеаз. На сьогодні дані ферменти виявлені в організмів, що належать до різних таксономічних груп. Незважаючи на залучення трипсинів до реалізації багатьох процесів, основна їх функція полягає в безпосередній участі у процесах травлення та активації інших протеолітичних ферментів, важливих для даного процесу. Окрім того, доведеною є участь трипсинів у розвитку ряду патологічних станів – раку, хвороби Альцгеймера, панкреатиту, астми, дерматитів, екзем тощо. На відміну від вищих тварин, у безхребетних фізіологічні та біохімічні процеси, в яких задіяні трипсини, досліджені значно гірше. Так, показана участь трипсинів у процесах травлення, клітинного диференціювання, реакціях імунної відповіді. Детальне дослідження будови та функцій ферментів із організмів, що належать до різних таксономічних груп, має важливе значення для кращого розуміння механізмів молекулярної еволюції, специфічності дії та особливостей каталізу, а також може бути корисним при створенні біокаталізаторів із заданими властивостями. Відомо, що ферменти, одержані з риб та безхребетних, адаптованих до низьких температур середовища, мають певні особливості у фізико-хімічних та каталітичних властивостях, що дозволяє їм проявляти належну ферментативну активність незважаючи на сповільнення метаболічних реакцій. Тому для кращого розуміння молекулярних механізмів, що обумовлюють каталітичну ефективність

ферментів з психрофільних чи холодоадаптованих організмів, необхідне проведення комплексних досліджень структури та фізико-хімічних властивостей даних ферментів.

Все вище викладене, а також результати, викладені у попередньому розділі роботи, відповідно до яких протеолітична активність у загальному екстракті тканини гідробіонту обумовлена сериновими протеазами, визначила мету наступного етапу дослідження – одержати трипсиноподібний фермент та охарактеризувати його основні фізико-хімічні і каталітичні властивості.

### **6.1. Одержання трипсиноподібного ферменту**

Одержання гомогенних білків у кількостях, достатніх для проведення біохімічних та структурних досліджень та зі збереженням їх функціональних характеристик, є першочерговою та важливою умовою будь якого експерименту, пов'язаного з виділенням ферментів. Для досягнення поставленої мети нами була розроблена ефективна схема очистки, яка включала дві хроматографічні стадії – афінну хроматографію та хроматографію, що поділяє за розмірами. Для одержання та очистки трипсинів методом афінної хроматографії застосовують сорбенти з різноманітними лігандами. Це, зокрема, циклічні антибіотики (бацитрацин, бета-лактамі антибіотики), тріозинові барвники, сорбенти, які, як ліганди, містять низькомолекулярні інгібітори протеаз (бензамідин та його похідні), а також сорбенти з «пришитими» білками чи аналогами субстратів (бичачий панкреатичний трипсиновий інгібітор, соєвий інгібітор трипсинів, морфоліди трипептидів та ін.).

Порівнявши ефективність хроматографічного процесу при застосуванні як ліганду бензамідину та соєвого інгібітору трипсинів (SBTI), ми зупинили свій вибір на останньому, оскільки його використання дозволило одержати

більшу кількість матеріалу. Окрім того, даний інгібітор є відносно дешевим, доступним та стабільним, що обґрунтовує його багаторазове використання. Зв'язування SBTI з трипсином відбувається через взаємодію петельних структур інгібітору з S1-зв'язуючою ділянкою у молекулі ферменту. Той факт, що петельні структури інгібітору можуть бути пошкоджені іншими протеазами, що присутні у аналізованих зразках, жодним чином не обмежує його використання, оскільки дані структури можуть бути швидко ресинтезовані. Застосування у даному методичному підході SBTI дозволило відразу відділити ферменти, що володіють трипсиноподібною активністю.

Варто підкреслити, що як вихідний матеріал для одержання трипсинів було використано ліофілізат загального екстракту тканини *A. colbecki* після його очистки на колонці з носієм Sephadex G 25, що дозволило позбавитись від домішок та інгібіторів, присутніх у загальному екстракті, які б могли вплинути на взаємодію між лігандом та активним центром ферменту. 0,5 г ліофілізату розчиняли у 5 мл 10 мМ трис-НСІ буферу (рН 8,0), що містив 5 мМ СаСІ<sub>2</sub>, та наносили на колонку з SBTI-сефарозою 4В, врівноважену цим же буфером за швидкості нанесення 3 мл/хв. Після етапу відмивання сорбенту, матеріал, що зв'язався з носієм, елюювали, використовуючи 50 мМ гліцин-НСІ буфер (рН 3,0), що містив 5 мМ СаСІ<sub>2</sub> та 1М NaCl за аналогічної швидкості.

Наявність у фракції, одержаній після етапу афінної хроматографії, трипсиноподібною активності (рис. 6.1) було підтверджено з використанням стандартного для трипсинів хромогенного субстрату ВАРНА. Для того, щоб оцінити чистоту одержаної нами фракції та отримати інформацію щодо якісного складу білків було застосовано метод диск-електрофорезу у 10% поліакриламідному гелі за присутності натрію додецилсульфату.

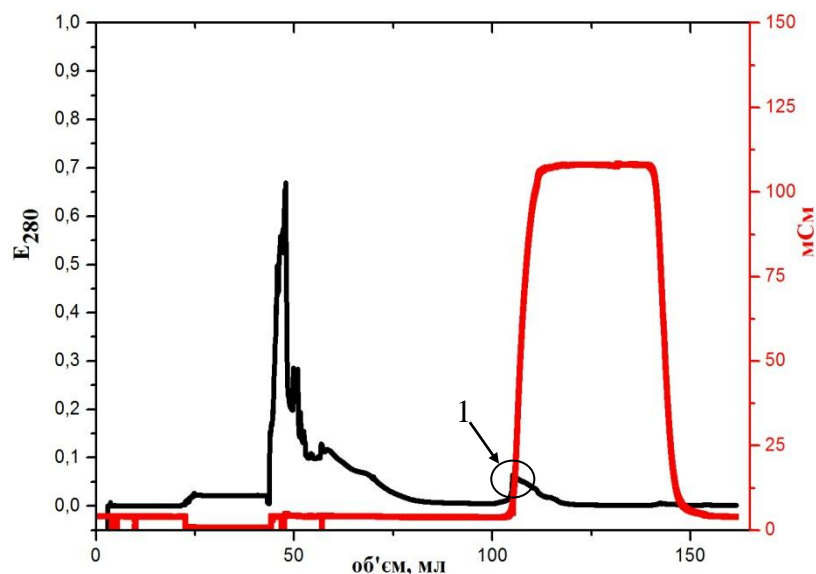


Рис. 6.1. Хроматограма розділення білків загального екстракту тканин гідробіонту методом афінної хроматографії на колонці з SBTI-сефарозою 4В: 1 – фракція, у якій було ідентифіковано трипсиноподібну активність

Як бачимо з рис. 6.2, отримана фракція не була гомогенною і містила низку білків різної молекулярної маси.

З використанням програми TotalLab було ідентифіковано близько 15 білкових смуг з молекулярними масами у діапазоні від 14 до 250 кДа. Незважаючи на ряд публікацій, де було охарактеризовано трипсиноподібні ферменти з безхребетних, що мають молекулярну масу вище 30 кДа [196, 197], для більшості трипсинів характерною є маса до 25 кДа. Присутність у одержаній нами фракції певної кількості високомолекулярних білків є цілком допустимою, враховуючи, що SBTI - це оборотний інгібітор не лише для трипсинів та трипсиноподібних ферментів, а й для деяких інших серинових протеаз (плазміноген, калікреїн, прекалікреїн, колагенази).

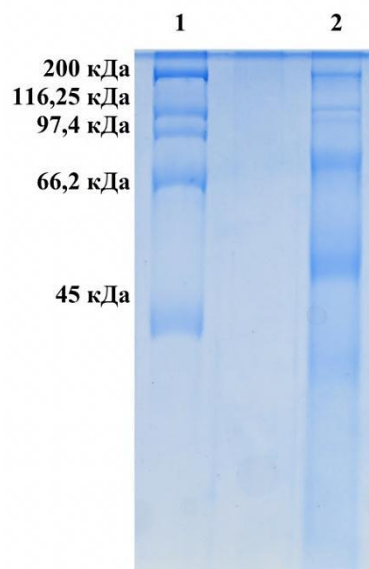


Рис. 6.2. Типова електрофореграма розділення білків фракції, одержаної після етапу афінної хроматографії, на колонці з SBTI-сефарозою 4В:

- 1 – маркери молекулярних мас;
- 2 – досліджувана фракція

Окрім того, оскільки застосування даного методичного підходу дозволяє відділяти не лише ферменти, а й проферменти, можемо припустити, що поява на електрофореграмі високомолекулярних білкових фракцій частково може бути обумовлена присутністю проферментів, в той час як білкові смуги з молекулярною масою нижче 20 кДа можуть бути фрагментами трипсиноподібних ферментів, що зазнали автолізу. Оскільки фракція, одержана після етапу афінної хроматографії, містила домішки, було проведено наступну стадію очистки методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці з HiLoad 16/60 Superdex 75 PG. Даний метод дозволяє розділяти білки відповідно до їх молекулярних мас та добре зарекомендував себе у попередніх наших дослідженнях, пов'язаних з розділенням білків загального екстракту тканин.

В результаті хроматографічного розділення було одержано лише дві фракції – 1 та 2, що значно відрізнялися за розмірами піків на хроматограмі (рис.6.3).

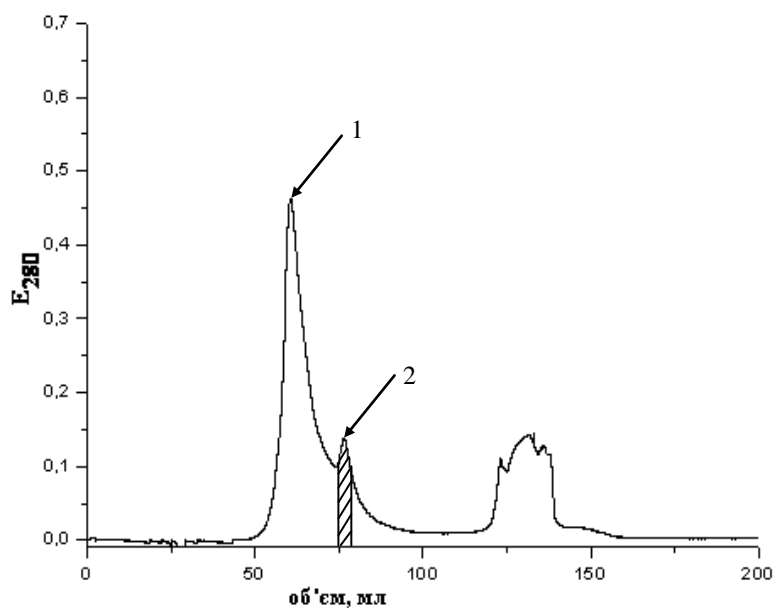


Рис. 6.3. Хроматограма розділення білків фракції, одержаної після етапу афінної хроматографії, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG:

1, 2 – номер одержаної фракції;

заштрихованим виділено фракцію, що містила трипсиноподібний фермент

Обидві одержані фракції було проаналізовано за вище описаним алгоритмом, тобто протестовано на наявність ферментативної активності стосовно субстрату для трипсинів  $ВАрNA$  та перевірено на гомогенність методом диск-електрофорезу у ДСН-ПААГ. Відповідно до результатів електрофоретичного поділу перша фракція (рис. 6.4) містила декілька білкових смуг, молекулярна маса яких була вищою за 50 кДа, в той час білковий склад другої фракції (рис.6.5) був представлений лише однією смугою, локалізованою в області 23 кДа.

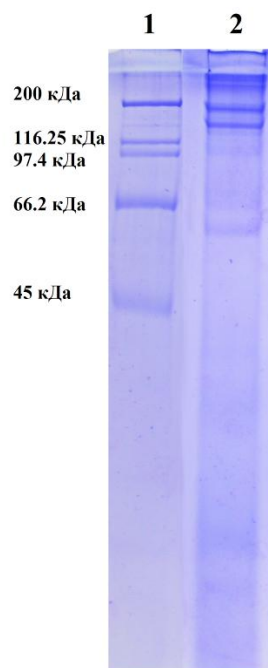


Рис. 6.4. Електрофореграма білків фракції 1, після розділення на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG:

- 1 – маркери молекулярних мас;
- 2 – досліджувана фракція

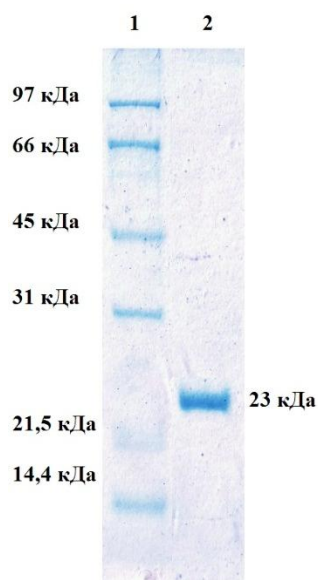


Рис. 6.5. Електрофореграма білків фракції 2, після розділення на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG:

- 1 – маркери молекулярних мас;
- 2 – трипсиноподібний фермент

Проведений аналіз з використанням трипсинового субстрату VApNA виявив присутність значної ферментативної активності у другій фракції; в той час як у першій фракції було відмічено лише слідові значення активності щодо даного субстрату.

Для додаткової оцінки присутності в аналізованих фракціях активних протеолітичних ферментів обидві одержані фракції було проаналізовано методом ензим-електрофорезу з використанням як субстрату желатину, результати якого в цілому узгоджуються з результатами спектрофотометричного визначення активності з використанням VApNA. Незважаючи на певну кількість білкових смуг, представлених у першій фракції, більшість з них не володіли ферментативною активністю, оскільки на ензим-електрофореграмі даної фракції було виявлено лише одну слабо виражену зону гідролізу, локалізовану в області високомолекулярних білків (дані не наведено).

Ензим-електрофоретичний аналіз другої фракції (рис.6.6), одержаної після етапу хроматографії, що поділяє за розмірами, виявив чітко виражену зону гідролізу, що вказує на присутність активного ферменту з молекулярною масою близько 23 кДа. Таким чином, молекулярна маса активного ферменту, оцінена методом ензим-електрофорезу, повністю співпадає з результатами диск-електрофорезу в ДСН-ПААГ.

Варто зазначити, що молекулярна маса одержаного ферменту знаходиться у діапазоні мас, характерних для трипсинів (13-50 кДа). Так, трипсини хребетних зазвичай мають молекулярну масу в діапазоні 23-27 кДа, зокрема, молекулярна маса трипсину бика становить 24 кДа [190], молекулярна маса трипсину морської зірки *A. pectinifera* складає 28 кДа [198], трипсину асцидії *B. schlosseri* – 23 кДа [199]. Дещо вищі значення молекулярних мас мають трипсини краба *C. sapidus* – 33,5 кДа [200], криля *E. superba* – 30 кДа, [201], омару *T. orientalis* – 35 кДа. Вищі значення молекулярних мас трипсинів з безхребетних можуть бути пов'язані з

глікозилюванням молекули ферменту; відповідно до літератури [202], дана модифікація характерна переважно для безхребетних та нижчих хребетних і, як вважають, знижує вірогідність автолітичного розщеплення молекули.

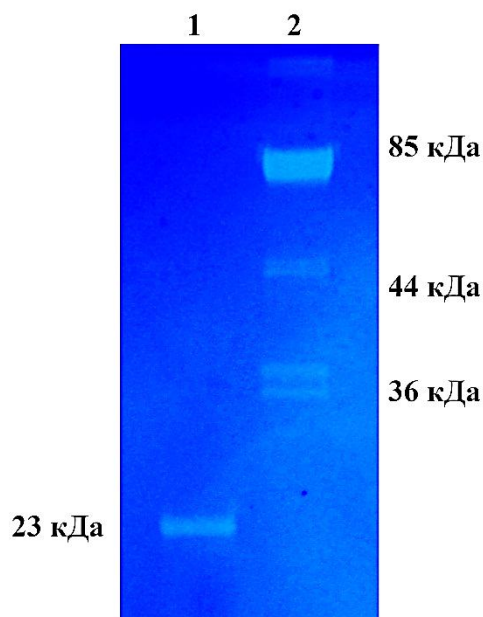


Рис. 6.6. Ензим-електрофореграма фракції 2, після розділення на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG:

- 1 – трипсиноподібний фермент;
- 2 – маркери молекулярних мас

Отже, у результаті поєднання методів афінної хроматографії та хроматографії, що поділяє за розмірами, з загального екстракту тканин гідробіонту було одержано чистий фермент з виходом 50,3% та ступенем очистки 7,5 (табл. 6.1). Питома активність після заключного етапу очистки складала  $31,6 \text{ од} \cdot \text{мг білка}^{-1}$  у порівнянні з  $4,2 \text{ од} \cdot \text{мг білка}^{-1}$  у загальному екстракті, отже питома активність зросла у 7,5 раза.

## Етапи одержання трипсиноподібного ферменту

Етапи	Загальна кількість білка Мг	Питома активність, од·мг білка <sup>-1</sup>	Загальна активність, од	Ступінь очистки	Вихід, %
Загальний екстракт тканин	10,5	4,2	44,1	1,0	100
Афінна хроматографія на колонці з SBTI-сефарозою 4В	1,2	18,9	22,7	4,5	51,4
Хроматографія, що поділяє за розмірами на колонці з HiLoad 16/60 Superdex 75 PG	0,7	31,6	22,1	7,5	50,3

## 6.2. Характеристика трипсиноподібного ферменту

Спочатку було визначено активність одержаного нами ферменту щодо низки синтетичних амідних субстратів. На сьогодні субстратна специфічність трипсинів щодо синтетичних низькомолекулярних субстратів досліджена досить повно. Проте більшість робіт у даному напрямку проводилися на трипсинах ссавців. Досліджень властивостей трипсинів, одержаних з організмів і, зокрема, безхребетних, що мешкають за відносно не типових умов середовища, у сучасній літературі не так багато.

Зазначимо, що короткі синтетичні поліпептиди не належать до оптимальних субстратів для трипсинів, проте є зручними інструментами для визначення первинної субстратної специфічності даних ферментів. Відповідно до загальноприйнятої номенклатури амінокислотний залишок субстрату, карбонільна група якого входить до пептидного зв'язку, що атакується ферментом, позначається як  $P_1$ , наступні, відповідно,  $P_2$ ,  $P_3$  і так далі у напрямку до N-кінця субстрату. Відповідні зони зв'язування субстрату у ферменті позначають як  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  і так далі. Під первинною специфічністю ферменту, зазвичай, розуміють специфічність  $S_1$ - $P_1$  взаємодії. Трипсини розщеплюють переважно пептидний зв'язок субстрату, у  $P_1$ -положенні якого знаходиться залишок Arg чи залишок Lys, що пов'язано з розташуванням у  $S_1$ -положенні молекули ферменту негативно зарядженого залишку Asp 108 [203]. Окрім первинної специфічності, для належного орієнтування молекули субстрату відносно амінокислотних залишків активного центру ферменту важливими є взаємодії між групами ферменту та субстрату, що просторово значно віддалені від  $S_1$ - $P_1$  ділянки, іншими словами на зв'язування субстрату значно впливають  $S_1$ - $P_1$ ,  $S_2$ - $P_2$  і так далі взаємодії.

Як бачимо з результатів, наведених у таблиці 6.2, досліджуваний нами фермент виявляв активність щодо хромогенних субстратів -  $p$ -Glu-Pro-Arg- $p$ NA, H-D-Phe-Pip-Arg- $p$ NA, *N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-Arg- $p$ NA, H-D-Val-Leu-Lys- $p$ NA, що зазвичай використовуються для оцінки активності серинових протеаз. Відповідно до літератури, більшість серинових протеаз, виділених з безхребетних, не володіють широкою субстратною специфічністю по відношенню до амінокислотних залишків субстрату, що знаходяться у  $P_1$ -положенні. Виключенням є ферменти з деяких видів ракоподібних [5, 204].

Подібно до більшості трипсинів [205, 206], одержаний фермент гідролізував зв'язки, в утворенні яких задіяна карбоксильна група Arg чи Lys, причому наявність Arg у  $P_1$ -положенні субстрату є важливою умовою ефективного гідролізу, оскільки при заміні Arg на Lys спостерігалось

зниження активності ферменту. Так, активність ферменту при використанні субстратів  $\text{puroGlu-Pro-Arg-pNA}$  та  $\text{H-D-Phe-Pip-Arg-pNA}$  була відповідно у 4,36 та 1,68 рази вищою ніж при використанні субстрату  $\text{H-D-Val-Leu-Lys-pNA}$ . Варто відмітити, що вища активність щодо субстратів, що містять у  $P_1$ -положенні саме залишок Arg є характерною для більшості трипсинів незалежно від джерела їх одержання.

Варто підкреслити, що найнижча активність ферменту спостерігалася при використанні стандартного трипсинового субстрату  $\text{BApNA}$ , незважаючи на присутність у  $P_1$ -положенні аргінінового залишку. Так, активність ферменту була у 6,4 рази нижчою у порівнянні з активністю щодо субстрату  $\text{puroGlu-Pro-Arg-pNA}$ .

Таблиця 6.2

**Активність трипсиноподібного ферменту щодо синтетичних хромогенних субстратів ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Субстрат	Питома активність ферменту, мкмоль $pNA \cdot xv^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$
$\text{puroGlu-Pro-Arg-pNA}$ ( $S_{2366}$ )	$9,82 \pm 0,063$
$\text{H-D-Phe-Pip-Arg-pNA}$ ( $S_{2238}$ )	$3,79 \pm 0,015$
$\text{H-D-Val-Leu-Lys-pNA}$ ( $S_{2251}$ )	$2,25 \pm 0,035$
$N\text{-}\alpha\text{-benzoyl-DL-Arg-pNA}$ ( $\text{BApNA}$ )	$1,54 \pm 0,024$
$\text{Ac-Phe-pNA}$	-

Одержані нами результати в цілому узгоджуються з даними робіт [185, 207, 208], де автори відмічали зростання активності трипсину зі зростанням довжини пептидного ланцюга субстрату та можуть свідчити про важливість залучення більш віддалених амінокислотних залишків субстрату для забезпечення його належної просторової орієнтації відносно активного центру ферменту.

Відомо, що поряд із здатністю розщеплювати амідні амінокислот та деяких карбонових кислот, трипсини більшості ссавців та безхребетних здатні ефективно гідролізувати складні ефіри, тобто поряд з амідною характеризуються ще й естеразою активністю. Тому для одержання більш детальної інформації щодо субстратної специфічності одержаного нами ферменту ми порівняли його активність при використанні амідного *N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-Arg-*p*NA та ефірного *N*- $\alpha$ -*p*-tosyl-L-Arg-methylester субстратів. У відповідності з одержаними нами результатами ефективність гідролізу *N*- $\alpha$ -*p*-tosyl-L-Arg-methylester була майже втричі вищою у порівнянні з гідролізом субстрату *N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-Arg-*p*NA. Так, при використанні *N*- $\alpha$ -*p*-tosyl-L-Arg-methylester активність трипсиноподібного ферменту складала  $15,42 \pm 1,23$  од·мг білка<sup>-1</sup>, в той час як активність щодо *N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-Arg-*p*NA становила  $5,3 \pm 0,52$  од·мг білка<sup>-1</sup>. Загалом такі результати цілком узгоджуються з даними літератури, відповідно до яких, гідроліз трипсинами як безхребетних, так і хребетних тварин, ефірних субстратів протікає значно ефективніше ніж амідних субстратів [209], що може бути пов'язано з особливостями механізму каталізу серинових протеаз, зокрема, процесами ацилювання/деацелювання субстрату.

Для додаткового підтвердження саме трипсиноподібної природи одержаного нами ферменту було визначено його активність щодо субстрату Ac-Phe-*p*NA, специфічного для хімотрипсинів, адже відомо, що за молекулярною масою хімотрипсин подібний до трипсину і, подібно до трипсинів, його активність інгібується при додаванні SBTI. Відсутність будь якої активності за умов використання субстрату Ac-Phe-*p*NA свідчить про належність одержаного нами ферменту саме до трипсинів.

Для отримання більш детальної інформації щодо властивостей одержаного нами ферменту було досліджено залежність активності ферменту від температури та значень рН. Оскільки найвища активність ферменту спостерігалася у випадку використання хромогенного субстрату ругоGlu-Pro-

Arg-pNA, саме даний субстрат було використано для проведення подальших досліджень властивостей ферменту з гідробіонту.

Графік залежності активності досліджуваного ферменту від температури представлено на рис. 6.7.

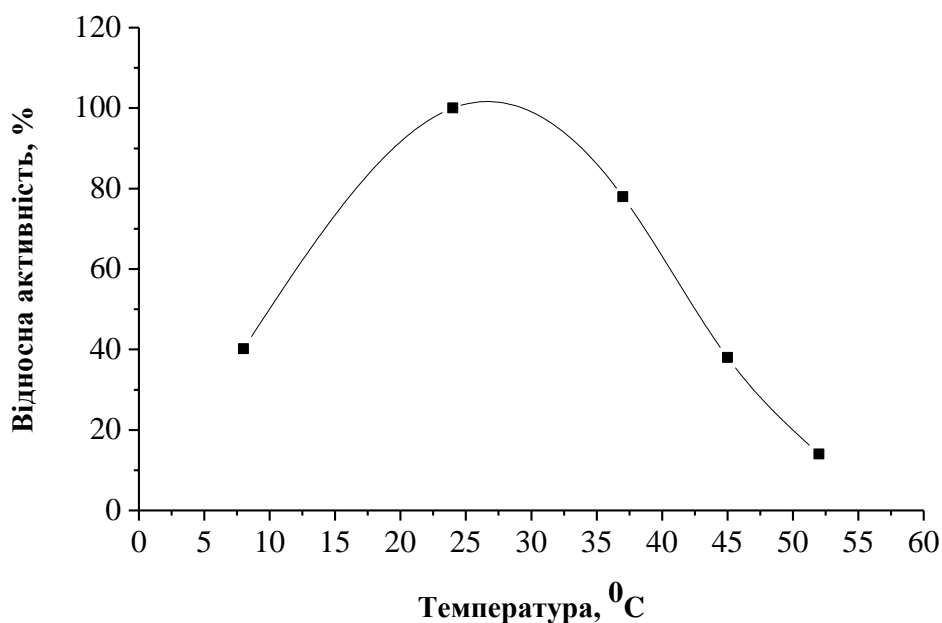


Рис. 6.7 Залежність активності трипсиноподібного ферменту від температури

Як бачимо, трипсиноподібний фермент виявляв активність у діапазоні температур від 8°C до 45°C. Оскільки найвища активність ферменту була ідентифікована при 24°C, саме дана температура була визначена як оптимальна для прояву ферментативної активності. Встановлене нами значення температурного оптимуму для досліджуваного ферменту було значно нижчим, якщо порівнювати з даним показником для трипсинів ссавців (40°C-45°C), проте знаходились у межах температур (20°C-40°C), визначених як оптимальні для функціонування ферментів з організмів, адаптованих до низьких температур середовища існування. Так, наприклад, температурний оптимум ферментів деяких психрофільних мікроорганізмів

було визначено при 25°C (протеаза з *S. proteomacular*) [210], 35°C (*P. cryohalolentis*) [211]. Хоча, наприклад, для трипсину з гепатопанкреаса камчатського краба *Paralithodes camtschatica* температурний оптимум було визначено при 55°C [5], подібне значення оптимальної температури показано також для трипсину з антарктичного криля *E. superba* [212]. Відповідно до одержаних нами результатів фермент зберігав активність на рівні 86 % від максимальної при температурі 37°C, проте при підвищенні температури до 45°C та 52°C спостерігалось різке зниження активності ферменту. Так, за даних температур активність ферменту складала, відповідно, 31 % та 14 %. Варто відмітити, що при 8°C ферментативна активність залишалась на рівні 40%.

Для психрофільних організмів характерна низька стабільність білкових молекул, що необхідно для підтримання належної каталітичної ефективності ферментів. Стратегія холодової адаптації включає підвищення значень  $k_{cat}$ , що пов'язано з менш щільною упаковкою білкової глобули. Відповідно до концепції локальної гнучкості молекул ферментів з організмів, адаптованих до низьких температур середовища, ділянка ферменту, що безпосередньо задіяна у каталізі, характеризується максимальною гнучкістю, в той час як ділянки не залучені до каталізу зберігають жорстку конформацію. Така рухливість ділянок у молекулі ферменту забезпечує необхідну комплементарність до субстрату і, відповідно, вищу питому активність. Дана концепція була експериментально підтверджена для низки ферментів з психрофільних організмів. Взагалі, створення загальної концепції, в рамках якої було б узагальнено існуючу на сьогодні інформацію щодо структурних особливостей, характерних лише для білків психрофільних організмів, є досить проблематичним з огляду на недостатній масив експериментальних даних. Проте, все ж таки встановлено деякі загальні закономірності для білків з холодоадаптованих організмів, які в цілому пов'язані зі зниженням кількості і/або сили всіх факторів, залучених у

стабілізації білкової молекули. Так, на рівні первинної організації молекули має місце зниження гідрофобності внаслідок заміни неполярних амінокислотних залишків на полярні, зокрема, проліну на гліцин, знижується відношення аргінін/лізін; для вторинної та третинної структури адаптованих до функціонування за низьких температур білків характерним є підвищення молекулярної гнучкості внаслідок послаблення внутрішньоклітинних та міжсубодиничних взаємодій, зокрема, за рахунок зменшення кількості сольових містків та водневих зв'язків [213, 214]. Підвищення конформаційної рухливості і перебудови амінокислотного складу для протидії холодовій денатурації обумовлюють високу теплову лабільність молекули.

Таким чином, для ферментів з організмів, адаптованих до функціонування за понижених температур середовища, характерним є збереження належної ферментативної активності при температурах 20°C і нижче та інактивація ферменту при температурах вище 40-45°C.

Далі було вивчено вплив рН на активність одержаного нами трипсиноподібного ферменту. Дослідження проводили використовуючи хромогенний субстрат  $\text{pH-Glu-Pro-Arg-pNA}$  та за визначеного температурний оптимуму у ацетатному (рН 3,0-5,0), трисовому (рН 6,0-8,0) і гліциновому (рН 9,0-13,0) буферах. Як видно з рис. 6.8, рН-залежність гідролізу субстрату має стандартну для серинових протеаз і, зокрема, для трипсинів у вигляді параболи. Ферментативна активність вище 30 % від максимальної було виявлена у діапазоні рН від 6,0 до 12,0, при цьому найвища активність була відмічена при рН 9,0. За даних умов активність була майже у 3,3 раза нищою, ніж при рН 6,0 та вдвічі вищою, ніж при рН 12,0.

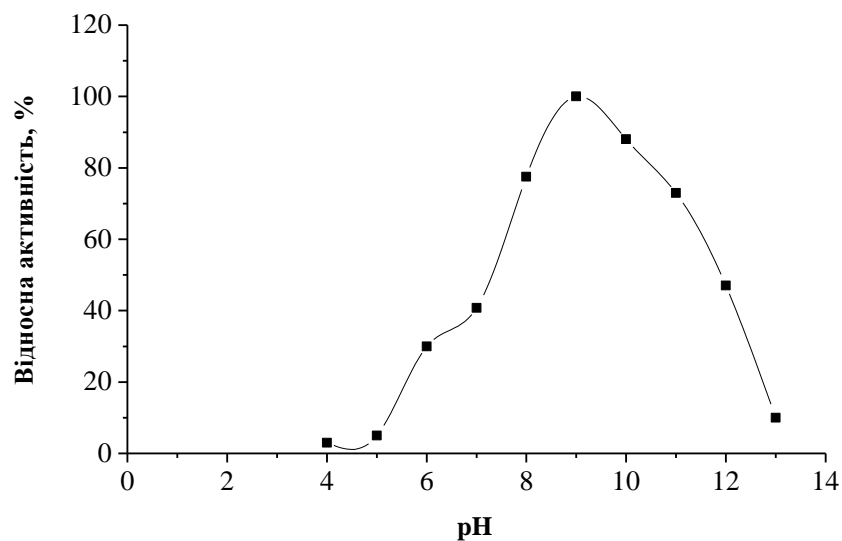


Рис. 6.8. Залежність активності трипсиноподібного ферменту від рН

У цілому, встановлений нами рН оптимум для трипсиноподібного ферменту, знаходиться у діапазоні значень рН, характерних для більшості трипсинів, адже відомо, що дані ферменти належать до лужних протеаз. Так, рН оптимум для трипсинів бика (*B. taurus*) складає 8,0, саранчі (*L. migratorid*) – 9,0, метелика (*C. fumiferana*) – 9,5. Дещо нижчі значення характерні для трипсинів тріски (*G. ogac*) – 7,5, краба (*P. camtschaticus*) – 7,5, криля (*E. superba*) – 8,0.

Відповідно до одержаних нами результатів, активність ферменту різко знижувалася при рН нижче 5,0 та вище 12,0. Так, за Н 13,0 спостерігалася лише 10% від максимальної активності ферменту. За значень рН нижче 4,0 спостерігалася лише слідова трипсиноподібна активність, що може бути пов'язано з конформаційними перебудовами, обумовленими змінами в іонізації амінокислотних залишків у каталітичному сайті і/чи сайтах зв'язування субстрату.

Як уже зазначалося, більшість ферментів, одержаних з організмів, адаптованих до низьких температур середовища існування, характеризуються певними структурними особливостями, спрямованими на

підвищення гнучкості та лабільності молекули. Наслідком таких змін є відносна конформаційна нестійкість даних ферментів. Враховуючи вище викладене, ми досліджували чи зберігає одержаний нами трипсиноподібний фермент активність після його інкубації впродовж 180 хв у діапазоні рН від 3,0 до 13,0. Залишкову активність ферменту визначали за встановленого на попередньому етапі оптимального значення рН, виміри проводили при 24°С. Згідно з одержаними нами даними (рис. 6.9), досліджуваний фермент зберігав активність після його трьохгодинної інкубації при рН від 8,0 до 10,0.

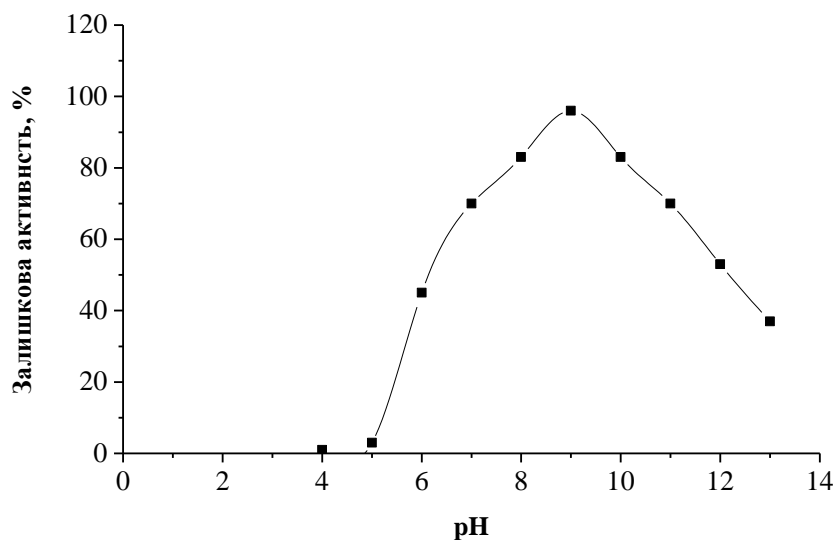


Рис. 6.9. Активність трипсиноподібного ферменту після його інкубації впродовж 180 хв при різних значеннях рН

При цьому було виявлено близько 78%, 100% та 80% активності ферменту, відповідно, при рН 8,0, 9,0 і 10,0. Активність ферменту різко знижувалася за умов його тривалої інкубації при рН нижче 5,0 та вище 12,0 – при цьому зберігалось менше 5 % активності. Як вже зазначалося, одним з наслідків підвищення гнучкості молекули є зниження її стабільності. З цих позицій одержані нами результати є цілком закономірними та знаходяться у руслі вище описаного явища.

Загалом одержані нами результати збігаються з даними, представленими у літературі, адже в цілому профіль рН-стабільності досліджуваного нами ферменту співпадає з таким, що був встановлений для ферментів з організмів, адаптованих до низьких температур середовища існування. Так, наприклад, трипсини, одержані з деяких видів антарктичних риб, зберігають стабільність у діапазоні рН 7,0-8,5 [215], трипсини з камчатського краба та антарктичного криля, відповідно, при рН 5,8-9,0 та 7,0-9,0 [216]. Варто зазначити, що трипсини ссавців, наприклад, бика, виявляють більшу стійкість при кислих значеннях рН – відповідно до літератури фермент зберігає активність після його інкубації в інтервалі рН від 3,0 до 9,5.

Відносно низька стабільність більшості відомих на сьогодні ферментів з психрофільних організмів є досить привабливою характеристикою з огляду на перспективність та потенційність їх використання у виробничих процесах, що потребують швидкої та «м'якої» температурної інактивації ферменту. Теплова деактивація ферментів має особливе значення для харчової промисловості, де важливим є запобігти псуванню термочутливих складових кінцевого продукту [217, 218]. У молекулярній біології термолабільні ферменти необхідні для забезпечення незворотної інактивації ферменту шляхом м'якої термічної обробки без втручання в подальшу реакцію [219, 220]. Завдяки своїм унікальним властивостям, ферменти з психрофільних організмів є цінною моделлю для проведення фундаментальних досліджень в області молекулярних механізмів ферментативного каталізу.

Незважаючи на те, що за деякими загальними фізико-хімічними характеристиками, зокрема, молекулярною масою, проявом ферментативної активності за лужних значень рН та вираженою специфічністю щодо пептидних зв'язків, в утворенні яких задіяні карбоксильні групи аргініну чи лізину, одержаний нами фермент подібний до трипсинів, для додаткового підтвердження його належності саме до серинових протеаз було досліджено активність даного ферменту за дії інгібіторів.

Як загальний інгібітор серинових протеаз було використано PMSF, який взаємодіючи з залишком Ser в активному центрі ферменту викликає необоротне пригнічення ферментативної активності. Показане нами (табл. 6.3) пригнічення активності трипсиноподібного ферменту за дії даного інгібітору може свідчити про належність одержаного нами ферменту до серинових протеаз.

Таблиця 6.3

**Активність трипсиноподібного ферменту за дії інгібіторів протеаз ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

	Питома активність ферменту, мкмоль $pNA \cdot xh^{-1} \cdot мг \text{ білка}^{-1}$	% інгібування
Базальна активність	$9,8 \pm 0,73$	-
+EDTA (5 мМ)	$10,8 \pm 0,67$	-
+PMSF (2 мМ)	$4,9 \pm 0,55^*$	50
+SBTI (1 мг/мл)	$0,52 \pm 0,12^*$	94,7

\* -  $p < 0,05$  у порівнянні з базальною активністю

У випадку використання SBTI - специфічного інгібітору саме трипсинів, активність ферменту знижувалася від  $9,8 \pm 0,73$  мкмоль  $pNA \cdot xh^{-1} \cdot мг \text{ білка}^{-1}$  до  $0,52 \pm 0,12$  мкмоль  $pNA \cdot xh^{-1} \cdot мг \text{ білка}^{-1}$ , тобто мало місце інгібування активності ферменту майже на 95%. Такі результати є цілком прогнозованими, враховуючи, що один з етапів одержання ферменту включав афінну хроматографію з використанням як ліганду SBTI. Також було оцінено вплив на активність досліджуваного ферменту інгібітору металозалежних ферментів. Як видно з результатів, наведених у таблиці 6.3, інкубація з EDTA жодним чином не впливала на прояв активності трипсиноподібного ферменту, яка залишалась у межах значень базальної активності.

Таким чином, з огляду на результати інгібіторного аналізу одержаний нами трипсиноподібний фермент можна віднести до серинових протеаз трипсинового ряду.

Враховуючи важливість іонів деяких металів для підтримання належної конформації білкової молекули, а також їх безпосередню залученість у процес каталізу, на наступному етапі роботи було досліджено вплив іонів двохвалентних металів, зокрема,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  на активність одержаного трипсиноподібного ферменту.

З літератури відомою є важлива роль іонів для збереження належної функціональної активності трипсинів, зокрема, їх стабілізуючий вплив. Так, стабілізація ферменту та підвищення його активності при додаванні іонів  $\text{Ca}^{2+}$  була показана для трипсинів з багатьох видів риб та ссавців [221, 222].

Тому першочергово нами було вивчено вплив саме даних іонів на активність одержаного трипсиноподібного ферменту. Відповідно до інформації, наведеної у літературі [223, 224], активуючий вплив іонів  $\text{Ca}^{2+}$  спостерігався за їх використання у досить широкому діапазоні концентрацій, тому для встановлення концентрації іонів, оптимальної для прояву ферментативної активності трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki*, дослідження було проведено у діапазоні концентрацій 0,5-10 мМ. Згідно з одержаними результатами, використання іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у вищезазначених концентраціях не впливало на активність трипсиноподібного ферменту, яка залишалася у межах значень базальної активності (рис.6.10, дані наведено лише для концентрації 5 та 10 мМ).

Такі результати в цілому не суперечать роботам, де автори показали відсутність зростання активності трипсинів з каракатиці *S. officinalis* [224], рака *P. clarki* [225] чи незначне підвищення активності трипсину з морського ляща *L. mormyrus* [226] при додаванні іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у концентрації 5 мМ. З огляду на одержані нами результати, для дослідження впливу решти іонів на активність трипсиноподібного ферменту було обрано концентрації 5 та 10

мМ. В результаті проведених досліджень незначний активуючий ефект було виявлено лише для іонів  $Mg^{2+}$  і тільки при їх використанні у концентрації 10 мМ, при цьому активність трипсиноподібного ферменту зростала лише на 10%.

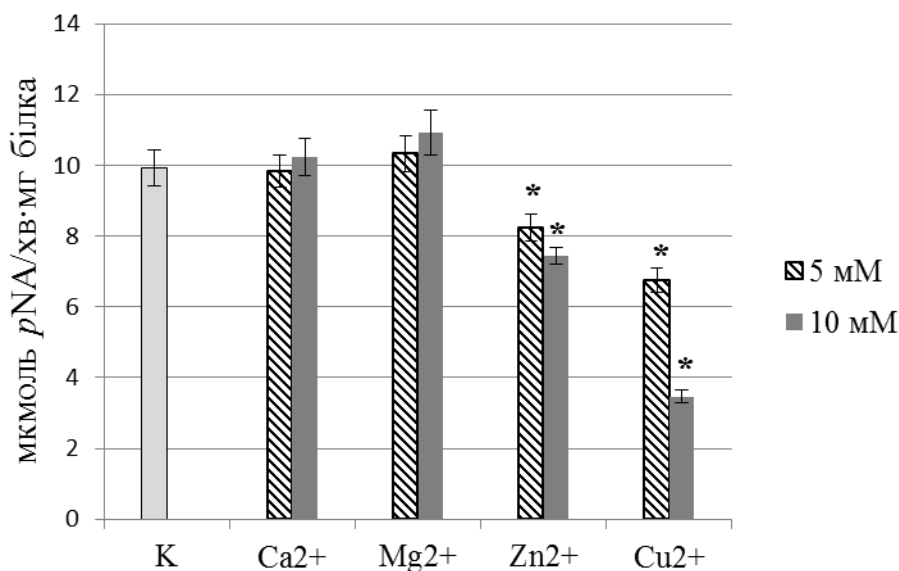


Рис. 6.10. Питома активність трипсиноподібного ферменту за дії іонів двохвалентних металів ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

\* -  $p < 0,05$  у порівнянні з активністю у контролі (К)

Було виявлено, що іони  $Zn^{2+}$  і  $Cu^{2+}$  діють як сильні інгібітори активності ферменту за обох досліджуваних концентрацій. Максимальний інгібувальний ефект було встановлено при використанні іонів  $Cu^{2+}$  - активність ферменту знижувалася у 1,47 рази за концентрації 5 мМ та у 2,85 рази при внесенні іонів  $Cu^{2+}$  у концентрації 10 мМ.

Оскільки об'єкт нашого дослідження – гідробіонт Антарктичного регіону, гідролітичні ферменти даного організму мають забезпечувати підтримання належного рівня метаболізму навіть за понижених температур середовища. Як уже зазначалося, ферменти з організмів, що адаптовані до низьких температур середовища, мають певні структурно-метаболічні

особливості, які дозволяють їм підтримувати належну швидкість обмінних процесів. Адаптація до існування за умов низьких температур відбувається на різних рівнях організації. Особливе місце займає адаптація на молекулярному рівні, так званий феномен температурної компенсації ферментативних систем. Вважається, що у тварин, адаптованих до низьких температур середовища існування, каталітична активність гомологічних ферментів вища, ніж у тварин, не адаптованих до холоду, і не залежить від положення у філогенетичній системі. Зниження ефективності роботи ферментів при низьких температурах може бути компенсовано різними способами, один з яких полягає у підвищенні концентрації ферменту. Проте, це досить енергозатратний шлях, який характерний лише для незначної кількості організмів, пристосованих до умов низьких температур [227]. Так, у деяких видів холодоадапованих риб спостерігається підвищення рівня експресії серцевої лактатдегідрогенази. Вплив зниження температури середовища на швидкість ферментативної реакції має двоякий характер. З одного боку, відбувається зниження каталітичної константи  $k_{cat}$  внаслідок експоненціальної залежності константи швидкості ферментативної реакції від температури. З іншого боку, зниження температури впливає на спорідненість ферменту до субстрату, оскільки зв'язування субстрату визначається не лише геометрією активного центру, а й сукупністю слабких взаємодій між відповідними ділянками субстрату та ферменту. Таким чином, адаптація ферментів з організмів холодних ареалів може відбуватися декількома способами – за рахунок підвищення  $k_{cat}$  (зниження  $\Delta H^*$  активації) і зниження  $K_M$  (підвищення спорідненості субстрату до ферменту) [228, 229], а також за рахунок змін амінокислотного складу, що забезпечує збереження нативної трьохмірної структури ферменту за умов низьких температур.

Зростання значень  $k_{cat}$  може бути досягнуто за декількома механізмами, зокрема, через зниження енергії активації  $\Delta H^*$  чи підвищення  $\Delta S^*$  [230]. Проте основна адаптивна стратегія ферментів з психрофільних організмів

полягає у зниженні енергії активації внаслідок підвищення гнучкості молекули ферменту або його окремих частин за рахунок зниження сили або кількості взаємодій, задіяних у конформаційних перебудовах під час зв'язування ферменту з субстратом. Незважаючи на ряд адаптивних пристосувань значення  $k_{cat}$  ферментів з психрофільних організмів при низьких температурах все одно будуть нижчими, ніж значення  $k_{cat}$  мезофільних аналогів при 37°C. Молекули ферментів з організмів, адаптованих до низьких температур, в цілому характеризуються більшою рухливістю і, відповідно, дані ферменти здатні легше змінювати конформацію при зниженні температури. Це дозволяє швидко утворювати фермент-субстратний комплекс. У результаті підвищеної пластичності ділянка активації ферменту стає менш стійкою, що обумовлює зниження спорідненості ферменту до субстрату. Саме тому ферменти психрофільних організмів потребують менше енергії для утримання субстрату, що, в свою чергу, веде до зменшення нижньої межі енергії активації, необхідної для утворення фермент-субстратного комплексу, та підвищує швидкість реакції.

Таким чином, питома активність ферментів з психрофілів при низьких температурах є у декілька разів вищою, ніж у аналогічних ферментів з мезофільних організмів. Через їх високу каталітичну ефективність і більшу чутливість до інактивації за підвищення температури та зниження рН ферменти з адаптованих до низьких температур організмів є привабливим інструментом для використання у біотехнологічних процесах [2].

Враховуючи все вище викладене, на наступному етапі роботи ми порівнювали кінетичні параметри гідролізу субстрату, визначені за температури, оптимальної для прояву ферментативної активності (24°C), та визначені за температури 8°C.

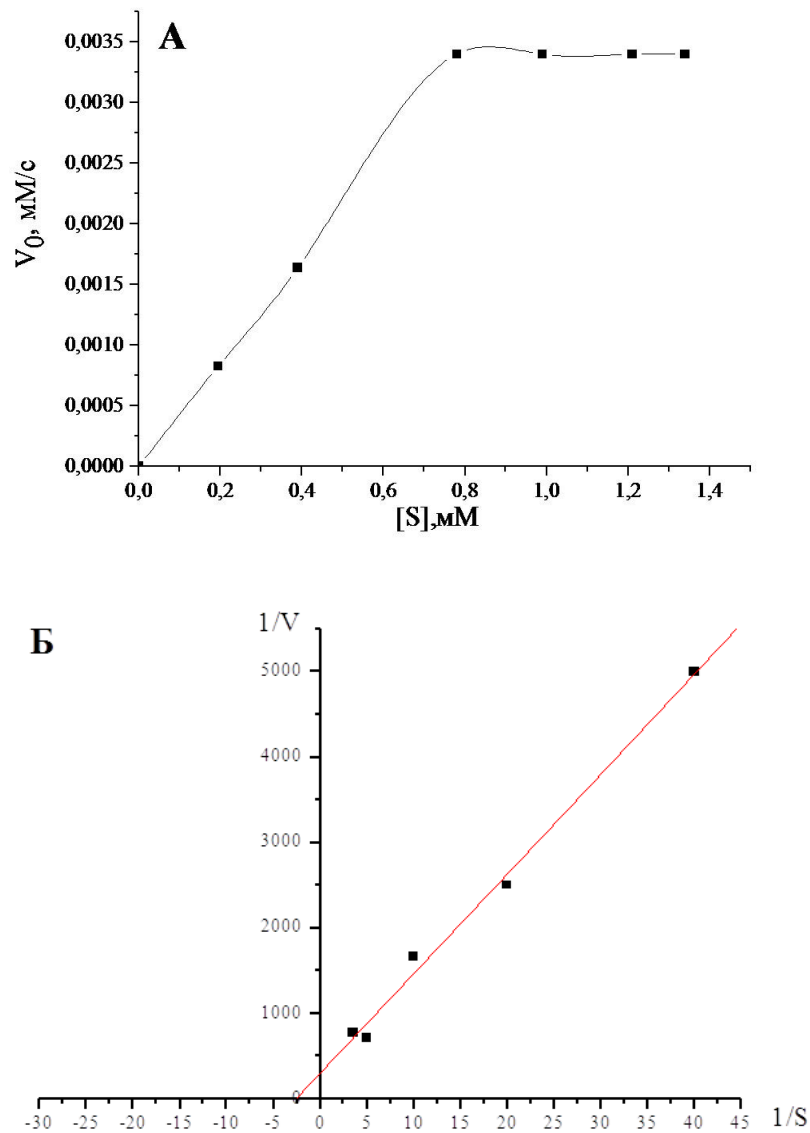


Рис. 6.11. Залежність початкової швидкості реакції гідролізу субстрату пууроGlu-Pro-Arg-pNA від його концентрації (А) при 8°С та лінеаризація у координатах Лайнувера-Берка (Б)

Основні кінетичні константи  $K_M$  і  $V_{max}$  були розраховані з графіку Лайнувера-Берка (рис. 6.11, 6.12) використовуючи субстрат пууроGlu-Pro-Arg-pNA, стосовно якого досліджуваний фермент виявляв найвищу активність та за оптимальних значень рН.

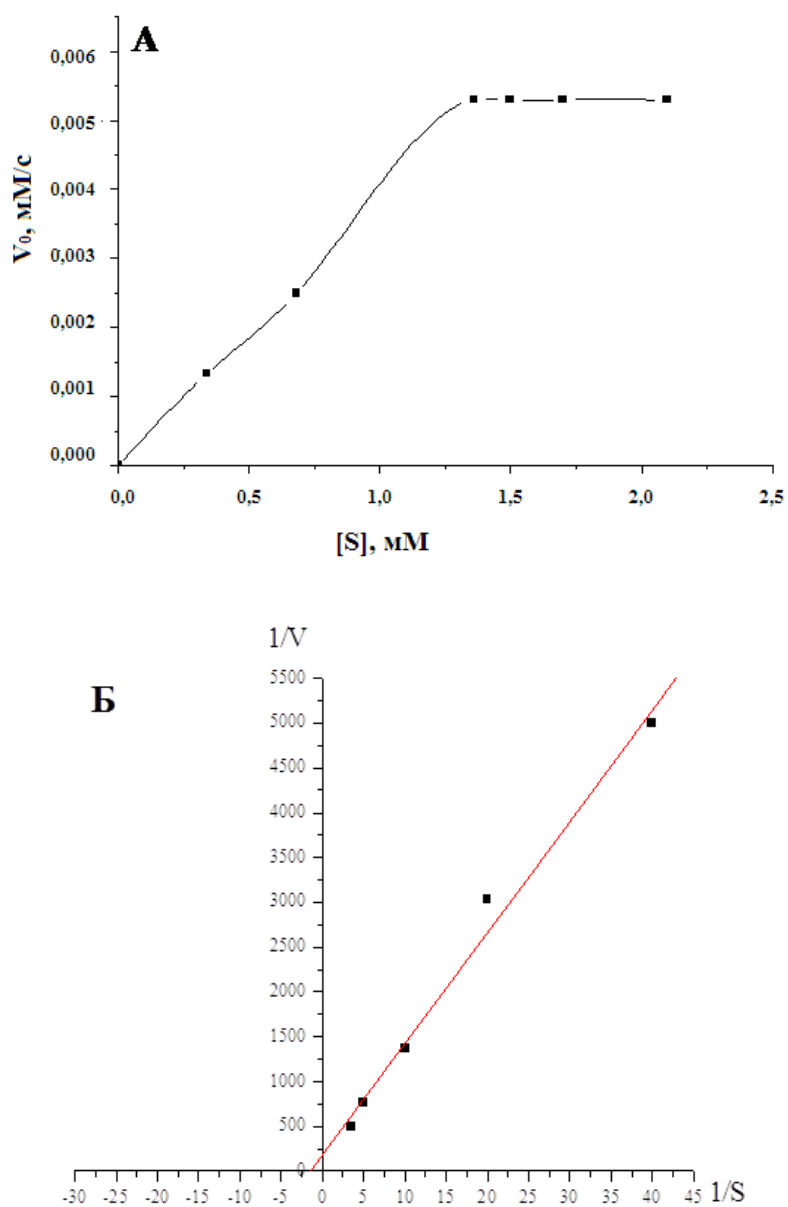


Рис. 6.12. Залежність початкової швидкості реакції гідролізу субстрату ругоGlu-Pro-Arg-pNA від його концентрації (А) при 24 °С та лінеаризація у координатах Лайнувера-Берка (Б)

Як бачимо з даних, наведених у таблиці 6.4, при зниженні температури мало місце зниження значень  $K_M$ , що свідчить про зростання спорідненості ферменту до субстрату.

Таблиця 6.4

**Кінетичні параметри реакції гідролізу субстрату *pyroGlu-Pro-Arg-pNA* трипсиноподібним ферментом ( $M \pm m, n=6$ )**

Температура	$K_M$ , мМ	$k_{cat}$ , $c^{-1}$	$k_{cat}/K_M$ , $mM^{-1} \cdot c^{-1}$
24 °C	0,68±0,07	10,41±0,3	15,32±0,2
8 °C	0,39±0,09	6,34±0,1	16,33±0,3

Так, значення  $K_M$  за температури 8 °C було майже вдвічі нижчим у порівнянні зі значенням  $K_M$ , визначеним при 37 °C. Одержані нами результати узгоджуються з даними, наведеними у роботах [215, 231], де автори показали, що зростання каталітичної ефективності  $k_{cat}/K_M$  для трипсинів з організмів, адаптованих до низьких температур середовища, відбувається за рахунок підвищення спорідненості до субстрату, тобто зниження значень  $K_M$ . Варто відмітити, що для більшості ферментів з холодоадаптованих організмів підвищення каталітичної ефективності гідролізу субстратів відбувається переважно за рахунок зростання значень  $k_{cat}$  [232, 233]. Проте згідно з нашими експериментальними дослідженнями, при зниженні температури до 8 °C спостерігалось зниження не лише значень  $K_M$ , а й  $k_{cat}$ . За даних умов величина  $k_{cat}$  була у 1,64 рази нижчою ніж при 24 °C. Відмічене нами зниження значень  $k_{cat}$  при зниженні температури є цілком логічним враховуючи експоненційну залежність швидкості ферментативної реакції від температури. Подібна тенденція до зниження значень обох кінетичних параметрів при зниженні температури з 21 °C до 5 °C була продемонстрована для трипсину з камчатського краба [234].

Як уже зазначалося однією з стратегій, спрямованих на підвищення ефективності процесу каталізу є підвищення спорідненості ферменту до субстрату, тобто зниження значень  $K_M$ . З огляду на одержані нами результати щодо значень  $K_M$  і  $k_{cat}$  за досліджуваних температур можемо припустити, що для досліджуваного нами трипсиноподібного ферменту може мати місце реалізація адаптивної стратегії, пов'язаної зі зростанням спорідненості ферменту до субстрату. Незважаючи на відмінність значень  $K_M$  та  $k_{cat}$  при різних температурних умовах визначення кінетичних параметрів, каталітична ефективність  $k_{cat}/K_M$  гідролізу субстрату трипсиноподібним ферментом за обох температур була майже ідентичною -  $15,3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  і  $16,3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  відповідно при  $24^\circ\text{C}$  та  $8^\circ\text{C}$ .

Таким чином, узагальнюючи одержані нами результати, можемо зробити висновок, що за основними фізико-хімічними властивостями, зокрема, молекулярною масою, субстратною специфічністю, максимальним проявом ферментативної активності при лужних значеннях рН та пригніченням активності за дії інгібітору серинових протеаз, одержаний нами трипсиноподібний фермент належить до типових трипсинів. Разом з тим, температурний оптимум при  $24^\circ\text{C}$ , збереження каталітичної ефективності гідролізу субстрату на одному рівні як за оптимальної температури, так і при зниженні температури до  $8^\circ\text{C}$ , а також відсутність активуючого впливу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  є рисами, що відрізняють трипсиноподібний фермент досліджуваного гідробіонту від трипсинів ссавців.

**РОЗДІЛ 7**  
**ОДЕРЖАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА**  
**ФІБРИНОГЕНОЛІТИЧНОГО ФЕРМЕНТУ З ГДРОБІОНТУ**  
**АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ А. COLBECKI**

**7.1. Одержання фібриногенолітичного ферменту**

Відповідно до даних Всесвітньої організації охорони здоров'я, серцево-судинні захворювання є однією з ключових причин, що спричиняють смертність та обумовлюють зниження працездатності серед населення більшості країн світу. У клінічній практиці для профілактики та лікування патологій, пов'язаних з надмірними тромбоутворенням, застосовують ряд антикоагулянтів - гепарин, гірудин, стрептокіназа, тканинний активатор плазміногену та ін. Незважаючи на безумовну клінічну цінність, застосування більшості з них пов'язано з певними побічними ефектами, зокрема, обмеженою ефективністю дії, коротким період напіввиведення, значними терапевтичними дозами, необхідними для прояву належного клінічного ефекту та розвитком алергічних реакцій. Тому розробка нових ефективних лікарських засобів, здатних впливати на систему гемостазу, залишається безумовно перспективним та актуальним напрямком сучасної науки та фармакології.

Фібриноген є одним з ключових білків системи зсідання крові, який окрім залучення в утворення власне фібринового згустку та зупинку кровотеч, виконує ряд важливих функцій у фізіологічних і патологічних процесах, зокрема, у репаративних, запальних, під час метастазування. Його концентрація експоненціально корелює з в'язкістю крові, визначає процес агрегації тромбоцитів, еритроцитів і впливає на адгезію лейкоцитів. Фібриноген прискорює активацію фактору XIII системи згортання крові і

взаємодіє з рядом білків: фібронектином, тромбоспондином, колагеном (тип IV), фактором фон Віллебранда, альфа<sub>2</sub>-антиплазміном. Фібриноген відіграє важливу роль не лише в каскаді реакцій зсідання крові, він стимулює проліферацію гладких м'язових клітин, агрегацію тромбоцитів, збільшує в'язкість крові [235], є джерелом для утворення фібринопептидів, що володіють протизапальною активністю. Разом з іншими білками (церулоплазмін,  $\alpha_1$ -антитрипсин, гаптоглобін, сироватковий амілоїд А та ін.) фібриноген підвищує резистентність до бактеріальних інфекцій, обмежує пошкодження тканин, прискорює заживлення ран. У плазмі крові людини вміст фібриногену становить 2,0-3,0 г/л. Однак за патологічних станів він може досягати 1,0-10 г/л. Високий рівень фібриногену в плазмі є суттєвим фактором ризику розвитку інсульту, інфаркту міокарду, атеросклерозу, ішемічної хвороби серця та ряду периферичних артеріальних захворювань.

На сьогодні серед сполук, що здатні впливати на рівень фібриногену, особливу увагу науковців та клініцистів привертають фібриногенолітичні ферменти або фібриногенази, оскільки дані ферменти діють безпосередньо на молекулу фібриногену, не потребують для прояву активності ніяких інших допоміжних факторів і тому можуть бути потенційно перспективними як профілактичні засоби розвитку ускладнень, обумовлених активацією прокоагулянтної ланки, а також при терапії захворювань, що супроводжуються надмірним тромбоутворенням. Їх можна застосовувати, наприклад, для розчинення фібринових згустків при венозних тромбозах, інфаркті міокарда, інсультах, легеневій емболії. Окрім того, фібриногенолітичні ферменти можуть бути використані як додатковий інструмент для більш детального вивчення закономірностей процесу полімеризації фібрину та при дослідженні структурних взаємодій з іншими білками.

Виключно перспективним об'єктами для пошуку нових сполук з унікальними властивостями видаються морські організми. Серед продуктів їх

життєдіяльності було виявлено ряд речовин, що мають антибактеріальну, протигрибкову, антивірусну, протизапальну, імуностимулюючу, протипухлинну, антиапоптотичну дію. Проте, незважаючи на таке структурне та функціональне різноманіття метаболітів, у сучасній науковій літературі представлено лише поодинокі роботи, присвячені дослідженню впливу сполук з морських гідробіонтів на різні ланки системи гемостазу. Так, наприклад, пептиди з вираженою антикоагулянтною активністю були виділені з *L. aspera* [236], *U. uncinatus* [237], *M. edulis* [238] та *S. broughtonii* [239].

Проведений нами на попередніх етапах роботи аналіз загального екстракту тканин морського гідробіонту *A. colbecki* з використанням методу ензим-електрофорезу із заполімеризованим у розділюючий гель фібриногеном показав присутність ферментів, здатних розщеплювати фібриноген. Враховуючи одержані результати, а також незначну кількість робіт, присвячених скринінгу та дослідженню властивостей сполук, здатних впливати на систему гемостазу, серед гідробіонтів Антарктичного регіону, наступний етап передбачав одержати з гідробіонту *A. colbecki* фермент, що володіє фібриногенолітичною активністю та охарактеризувати його основні фізико-хімічні властивості. Для досягнення поставленої мети нами було використано комплексний підхід, який поєднував декілька хроматографічних стадій, а також включав аналіз фракцій, одержаних на кожному з етапів на наявність як загальної протеолітичної, оціненої з використанням як субстрату казеїну, так і власне фібриногенолітичної активності.

Беручи до уваги незначну кількість білка, присутню у вихідному екстракті, при підборі умов виділення фібриногенолітичного ферменту однією з задач було максимально скоротити стадії очистки, оскільки на кожному з етапів очищення відбувається часткова втрата цільового ферменту. Перший етап виділення включав метод афінної хроматографії з використанням сорбенту Blue Sepharose 6 FF, у якому лігандом слугує

ковалентно пришитий барвник Cibacron™ Blue F3G-A. Даний сорбент було обрано з огляду на результати робіт [240, 241], де автори продемонстрували його високу ефективність при виділенні ряду білків з отрути змій. Відносно широка специфічність сорбенту Blue Sepharose 6 FF до різних груп білків обумовлює його застосування на етапі очищення різних ферментів [242]. Окрім того, барвник Cibacron™ Blue F3G-A є відносно дешевим, синтез сорбентів на його основі методично відносно простий, а ємність такого сорбенту на порядок вища, порівнюючи з іншими афінними сорбентами [243, 244].

Як вихідний матеріал для виділення ферменту було використано фракцію, що незв'язалася з SBTI-сефарозою на етапі одержання трипсиноподібного ферменту. Варто підкреслити, що використання для подальшої роботи саме даної фракції дозволило відразу відділити ферменти, що володіють трипсиноподібною активністю. Перевірка фракції, що не зв'язалася з SBTI-сефарозою, з використанням казеїну показала присутність певної ферментативної активності, а подальший аналіз методом ензим-електрофорезу з використанням як субстрату фібриногену виявив декілька чітко виражених зон гідролізу, що переконливо свідчить про наявність ферменту чи ферментів, здатних розщеплювати фібриноген. Для одержання фібриногенолітичного ферменту, ліофілізовану фракцію, що не зв'язалася з SBTI-сефарозою розчиняли у 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,0 та наносили на колонку з Blue Sepharose, врівноважену цим же буфером. Швидкість нанесення становила 1 мл/хв. Після відмивання сорбенту від не зв'язаного матеріалу, білки, що зв'язалися з носієм елюювали використовуючи 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, що містив 1 М NaCl за швидкості елюції 1 мл/хв. Варто підкреслити, що у білковому матеріалі, що не зв'язався з носієм на даному етапі очистки, а це близько 75-80% від вихідного, було виявлено лише слідові залишки фібриногенолітичної активності.

Фракцію, одержану після етапу хроматографічного розділення на Blue Sepharose 6 FF, перевіряли на наявність цільової активності методом ензим-електрофорезу з використанням як субстрату фібриногену, заполімеризованого у розділяючий гель. Проведений аналіз підтвердив присутність у виділеній фракції активних ферментів, про що свідчить поява у площині гелю декількох зон з фібриногенолітичною активністю (рис.7.1).

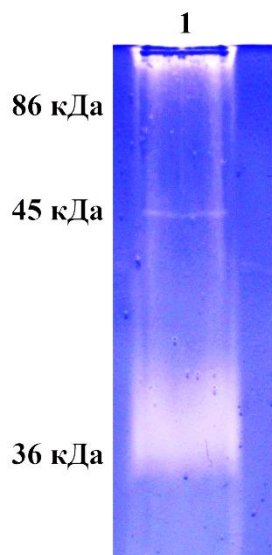


Рис. 7.1. Електрофореграма розділення білків фракції, одержаної після етапу афінної хроматографії на колонці з Blue Sepharose 6 FF:

1 – досліджувана фракція

Найбільш виражена зона гідролізу реєструвалася у області, що відповідає білкам з молекулярною масою близько 35-40 кДа. Слід відмітити, що незначна зона гідролізу, виявлена в області, що відповідає високомолекулярним білкам, може бути обумовлена утворенням комплексів, що включають фібриногенолітичний фермент.

Для більш наочного підтвердження здатності ферментів чи ферменту з фракції, отриманої на етапі афінної хроматографії на сорбенті Blue Sepharose 6 FF, гідролізувати фібриноген, а також з метою одержання загальної інформації до яких саме продуктів розщеплюється фібриногену було

проведено електрофоретичний аналіз зразків, одержаних після інкубації фібриногену та даної фракції впродовж певних часових інтервалів, зокрема, 0, 1, 2, 3, 5 та 24 години. Результати проведених досліджень наведено на рис. 7.2.

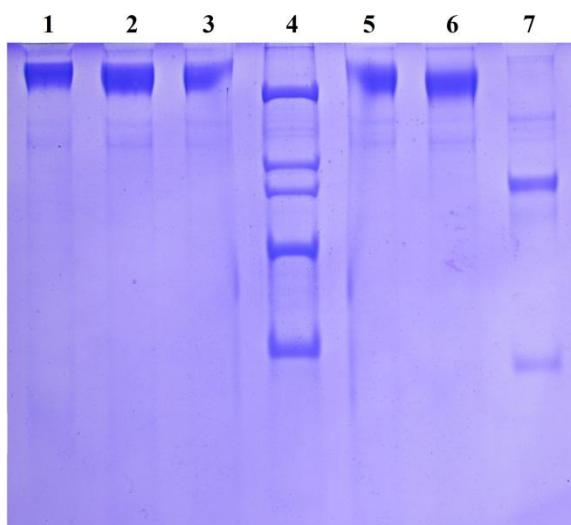


Рис. 7.2. Електрофореграма зразків фібриногену після їх інкубації з фракцією, одержаною після етапу афінної хроматографії на колонці з Blue Sepharose 6 FF:

- 1 – без інкубації;
- 2 – інкубація впродовж 1 год;
- 3 – інкубація впродовж 2 год;
- 4 – маркери молекулярних мас (200, 116,25, 97,4, 66,2, 45 кДа);
- 5 – інкубація впродовж 3 год;
- 6 – інкубація впродовж 5 год;
- 7 – інкубація впродовж 24 год

Білкові смуги, що локалізуються у верхній частині електрофореграми, належать фібриногену, молекулярна маса якого становить 340 кДа. Як бачимо, чітко виражений гідроліз фібриногену мав місце лише через 24 години інкубації з фракцією і супроводжувався накопиченням фрагментів з молекулярною масою близько 97, 85 та 44 кДа. Одержані нами результати цілком узгоджуються з даними ензим-електрофорезу і підтверджують

присутність у виділеній фракції ферменту чи ферментів, що володіють фібриногенолітичною активністю.

Незважаючи на ряд безумовних переваг, сорбент Blue Sepharose 6 FF не належить до високоспецифічних, тому необхідно було перевірити якісний склад одержаної нами фракції. Аналіз даної фракції методом диск-електрофорезу у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію виявив присутність ряду білкових смуг у діапазоні молекулярних мас від 20 до 200 кДа, що є цілком очікуваним результатом, враховуючи той факт, що використаний нами ліганд здатен ефективно зв'язувати ряд ферментів, включаючи кінази, дегідрогенази, а також більшість ензимів, що потребують наявності аденозинвмісних кофакторів. Для того, щоб виділити з загальної маси, присутніх у зразку білків, чистий фібриногенолітичний фермент, одержана нами фракція була піддана наступній стадії хроматографічної очистки, яка включала хроматографію, що поділяє за розмірами. Даний метод фракціонування розділяє білкові компоненти вихідного зразка у відповідності до їх молекулярних мас та дозволяє зберегти активність всіх присутніх ферментів. На відміну від іонообмінної чи афінної хроматографії, при використанні хроматографії, що поділяє за розмірами, склад буферу і його характеристики (кондуктивність, рН) загалом не впливають на процес хроматографічного розділення. Лімітуючим фактором при цьому є об'єм зразка, який можна нанести на колонку, концентрація в ньому білків, швидкість току рідини і тиск. Після проведення ряду хроматографічних досліджень з використанням різних носіїв ми зупинили свій вибір на носіїві HiLoad 16/60 Superdex 200 PG, який відповідно до своїх технічних характеристик дозволяє ефективно розділяти білки у широкому діапазоні молекулярних мас. Обраний нами носій цілком відповідав вимогам експерименту з огляду на профіль молекулярних мас білків, що присутні у досліджуваній фракції (20-200 кДа) та добре відомий факт, що більшість фібриногенолітичних ферментів, виділених з отрути змій, зазвичай мають

молекулярну масу у межах 20-30 кДа, проте є ряд ферментів, молекулярна маса яких сягає 70 кДа і вище.

Для проведення даної стадії хроматографічної очистки ліофілізовану фракцію з попереднього етапу розчиняли у 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,0, що містив 130 мМ NaCl і, після відділення центрифугування часток, що не розчинилися, наносили на колонку з носієм за швидкості потоку 0,5 мл/хв. Швидкість елюції також становила 0,5 мл/хв (рис. 7.3).

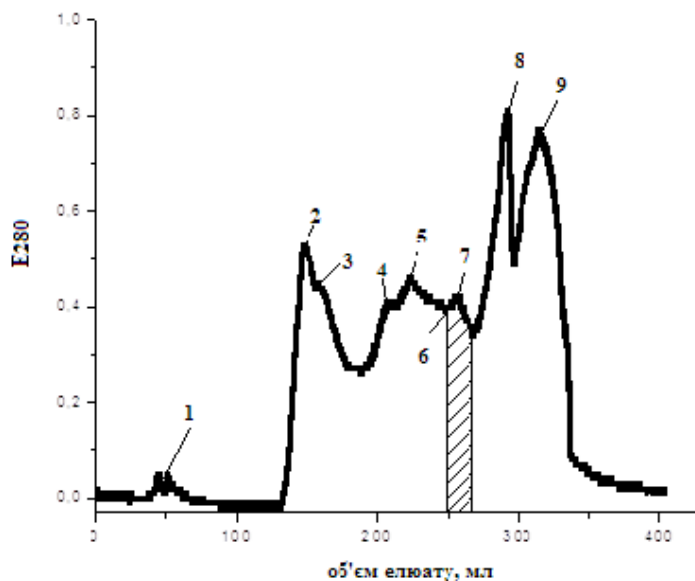


Рис. 7.3. Хроматограма розділення білків фракції, одержаної після етапу афінної хроматографії, на колонці з носієм HiLoad 16/60 Superdex 200 PG:

1-9 – номери одержаних фракцій;

заштрихованим виділено фракцію, що містила фібриногенолітичний фермент

Варто підкреслити, що саме за даної швидкості спостерігалася найбільш оптимальне розділення вихідного зразка на окремі фракції. В результаті хроматографічного розділення було одержано 9 фракцій, які перевіряли на присутність ферментативної активності щодо фібриногену методом ензим-електрофорезу. Відповідно до одержаних нами результатів, найбільш виражена активність щодо фібриногену реєструвалася у фракції 7, про що

свідчить поява у площині гелю зони гідролізу, локалізованої в області 37-40 кДа (рис.7.4).

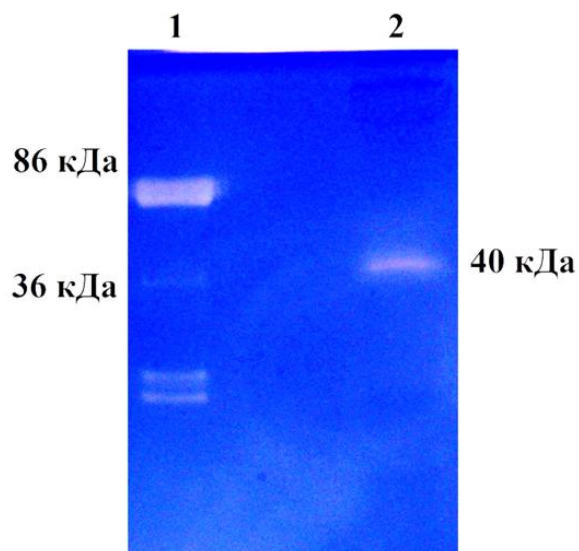


Рис. 7.4. Ензим-електрофореграма фракції 7, після розділення на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200 PG:

- 1 – маркери молекулярних мас;
- 2 – фібриногенолітичний фермент

Для перевірки чистоти одержаного ферменту та підтвердження його молекулярної маси було проведено електрофоретичний аналіз фракції 7, результати якого наведено на рис. 7.5.

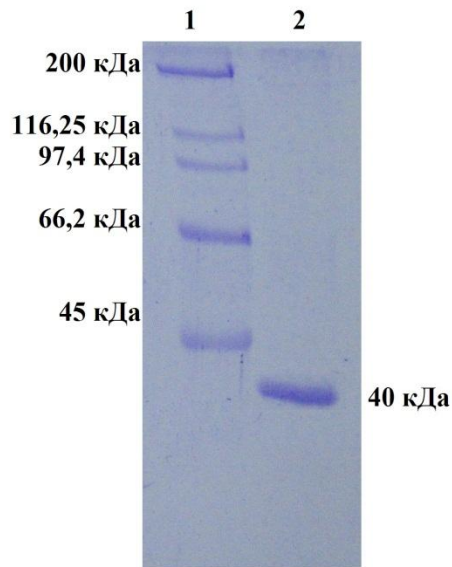


Рис. 7.5. Електрофореграма фібриногенолітичного ферменту, одержаного з гідробіонту *A. colbecki*:

- 1 – маркери молекулярних мас;
- 2 – фібриногенолітичний фермент

Як бачимо, досліджувана фракція містить лише одну білкову смугу, що відповідає молекулярній масі 40 кДа. Таке значення молекулярної маси в цілому узгоджується з молекулярною масою фібриногенолітичних ферментів, виділених з різних джерел. Більшість фібриногеназ є одноланцюговими глікопротеїнами з молекулярною масою від 20 до 40 кДа, проте з отрут деяких змій були виділені ферменти, молекулярна маса яких знаходиться у діапазоні від 60 до 100 кДа. Це, зокрема, металопротеази. Серинові фібриногенолітичні ферменти зазвичай мають масу до 45 кДа.

Етапи очистки фібриногенолітичного ферменту наведено у таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

#### Етапи одержання фібриногенолітичного ферменту

Стадії очистки	Загальний вміст білка, мг	Питома активність, од·мг <sup>-1</sup>	Загальна активність, од	Ступінь очистки	Вихід, %

Загальний екстракт тканин гідробіонту	22,2	3,6	79,9	1,0	100,0
Афінна хроматографія на колонці з SBTI-sepharose 4B	20,0	4,9	99,4	1,4	90,0
Афінна хроматографія на колонці з Blue sepharose 6 FF	4,4	24,7	108,8	6,8	19,8
Хроматографія, на колонці з HiLoad 16/60 Superdex 200 PG	1,1	35,5	28,0	9,8	4,9

Таким чином, в результаті поєднання декількох стадій хроматографічної очистки, що включали афінну хроматографію на колонці з сорбентом Blue Sepharose 6 FF та подальше розділення одержаної фракції з використанням хроматографії, що поділяє за розмірами на колонці з носієм HiLoad 16/60 Superdex 200 PG, було одержано фібриногенолітичний фермент з молекулярною масою близько 40 кДа, що підтверджується результатами ензим-електрофорезу та електрофорезу у ДСН-ПААГ.

## 7.2. Характеристика фібриногенолітичного ферменту

Відомо, що фібриногенолітичні ферменти, виділені зі отрут зміїних отрут здатні розщеплювати білки коагуляційної ланки гемостазу, обумовлюючи, таким чином, розвиток переважно кровотеч. Коагуляційний або плазменний гемостаз поєднує каскад ферментативних реакцій, кінцевим етапом яких є перетворення за дії тромбіну розчинного фібриногену у нерозчинний фібрин. Таким чином, весь каскад системи згортання крові

спрямований на активацію протромбіну у тромбін та подальше утворення фібринового згустку. Важливим етапом при цьому є формування протромбіназного комплексу, який забезпечує перетворення неактивного протромбіну у тромбін. В залежності від механізму утворення протромбінази розрізняють внутрішній та зовнішній шляхи, що різняться джерелом клітинних мембран на поверхні яких протікають ферментативні реакції. Такий поділ є досить умовним, оскільки обидва шляхи взаємодіють між собою та доповнюють один одного.

Внутрішній шлях реалізується за участі ряду коагуляційних факторів (XII, XI, IX, VIII, X), калікреїн-кінінової системи та тромбоцитів, які слугують джерелом негативно заряджених мембран. Зовнішній шлях ініціюється при надходженні у кровоток тканинного активатора тромбопластину, за дії якого, а також за присутності іонів кальцію, відбувається активація фактора X зсідання крові. Активний фактор  $X_a$  діє на протромбін перетворюючи його у активний тромбін [245].

Для того, щоб оцінити чи впливає одержаний нами фібринолітичний фермент на коагуляційну ланку, зокрема, на внутрішній та зовнішній шляхи утворення протромбінази, було проведено ряд хронометричних тестів, які широко використовуються у клінічній практиці для характеристики стану плазменного гемостазу.

Внутрішній шлях зсідання крові відтворювали за допомогою тесту “Активованій частково тромбопластиновий час” (АЧТЧ). Відповідно до результатів, наведених у таблиці 7.2, внесення до плазми фібринолітичного ферменту обумовлювало значне подовження часу зсідання у тесті АЧТЧ.

*Таблиця 7.2*

**Час зсідання плазми у хронометричних тестах за дії  
фібринолітичного ферменту ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

	АЧТЧ, с	ПЧ, с	ТЧ, с
Контроль	18,0 ± 0,5	7,2 ± 0,3	28,7±0,7
Фібриногенолітичний фермент (40 мкг/мл)	Перевищення інтервалу вимірів	16,4 ± 0,7*	Перевищення інтервалу вимірів
Фібриногенолітичний фермент (20 мкг/мл)	68,8 ± 0,8*	9,2 ± 0,3*	Перевищення інтервалу вимірів
Фібриногенолітичний фермент (10 мкг/мл)	18,8 ± 0,4	7,0 ± 0,4	Перевищення інтервалу вимірів

\* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем

Так, при додаванні до плазми ферменту у концентрації 20 мкг/мл час зсідання плазми зростав до  $68,8 \pm 0,8$  с у порівнянні з  $18,0 \pm 0,5$  с у контрольному зразку без внесення ферменту. При зменшенні концентрації ферменту до 10 мкг/мл показник залишався на рівні контрольних значень, а при внесенні до інкубаційного середовища ферменту у концентрації 40 мкг/мл зсідання плазми взагалі не відбувалося. Як бачимо, вплив фібриногенолітичного ферменту на час зсідання плазми мав чітко виражений дозозалежний характер. Зазвичай, подовження часу зсідання у тесті АЧТЧ свідчить про розвиток гіпокоагуляційного стану, що може бути пов'язано з дефіцитом чи аномаліями будь якого з факторів внутрішнього шляху зсідання, а також факторів загального шляху активації протромбінази.

Для одержання більш детальної інформації щодо здатності фібриногенолітичного ферменту впливати на коагуляційну ланку системи гемостазу було визначено протромбіновий час (ПЧ), який моделює зовнішній шлях зсідання крові. Відповідно до одержаних результатів фібриногенолітичний фермент також впливав на показники часу зсідання у даному тесті. Найбільш виражене подовження часу зсідання плазми спостерігалось при внесенні до інкубаційного середовища ферменту у концентрації 40 мкг/мл. При цьому мало місце подовження часу зсідання з

7,2 ± 0,3 с у контролі до 16,4 ± 0,7 с. Зниження концентрації ферменту до 20 мкг/мл обумовлювало менш виражене подовження часу зсідання, а при використанні ферменту у концентрації 10 мкг/мл даний показник наближався до контрольних величин.

Співставляючи результати обох хронометричних тестів, найбільш логічним видається припущення, що дія фібриногенолітичного ферменту реалізується на етапі загального шляху, зокрема, перетворення фібриногену у фібрин. Тому далі було визначено тромбіновий час (ТЧ), який дозволяє оцінити кінцевий етап процесу коагуляції, а саме утворення фібрину. Показники тромбінового часу не залежать від зовнішньої і внутрішньої системи активації протромбінази, проте безпосередньо залежать від концентрації фібриногену, його властивостей, наявності аномальних форм, процесів полімеризації та стабілізації фібрину, тому застосування даного тесту дозволяє стверджувати перш за все про функціональну цілісність молекули фібриногену.

Проведені нами дослідження виявили значне подовження тромбінового часу за дії фібриногенолітичного ферменту у всіх досліджуваних концентраціях (10, 20, 40 мкг/мл). При цьому для всіх концентрацій спостерігалось перевищення інтервалу вимірів.

Таким чином, порушення показників всіх трьох базисних тестів оцінки коагуляційної ланки системи гемостазу, переконливо свідчить про значний дефіцит фібриногену та розвиток стану глибокої гіпофібриногенемії за дії досліджуваного фібриногенолітичного ферменту. Беручи до уваги встановлену нами здатність фібриногенолітичного ферменту розщеплювати фібриноген, одержані результати є цілком закономірними і можуть бути пояснені за рахунок зниження концентрації функціонально-активного фібриногену.

До важливих характеристик фібриногенолітичних ферментів належить їх специфічність щодо ланцюгів фібриногену. Фібриноген – мультидоменний

глікопротеїн з молекулярною масою близько 340 кДа. Молекула фібриногену складається з трьох поліпептидних ланцюгів -  $A\alpha$ ,  $B\beta$ , та  $\gamma$ , молекулярна маса яких відповідно складає 67,6, 54,7 та 46,4 кДа. Ланцюги об'єднані у дві ідентичні субодиниці, що симетрично з'єднані трьома дисульфідними зв'язками. В молекулі фібриногену умовно розрізняють центральну ділянку E, дві периферичні ділянки D та два  $\alpha$ C-домени. Пізніше було встановлено, що кожна з D-ділянок складається з двох структурованих «субдоменів», які є C-кінцевими ділянками  $B\beta$ - і  $\gamma$ -ланцюгів і утворюють компактні структури, названі, відповідно,  $\beta$ C- і  $\gamma$ C-доменами [246-248].

Відповідно до сучасної класифікації всі фібриногенолітичні ферменти в залежності від специфічності дії на ланцюги фібриногену поділяють на  $\alpha$ - чи  $\beta$ -фібриногенази, тобто ферментів, що розщеплюють переважно  $A\alpha$ - чи  $B\beta$ -ланцюги фібриногену [89]. Проте слід підкреслити, що даний поділ є до певної міри умовним, оскільки за тривалої інкубації деякі  $\alpha$ -фібриногенази здатні розщеплювати  $B\beta$ -ланцюг і, навпаки,  $\beta$ -фібриногенази здатні до гідролізу  $A\alpha$ -ланцюга. Зауважимо, що  $\gamma$ -ланцюг фібриногену не є специфічною мішенню для фібриногеназ і, за деякими виключеннями, залишається інтактним. На сьогодні фібриногенолітичних ферментів, здатних першочергово розщеплювати саме  $\gamma$ -ланцюг, не виявлено, хоча його гідроліз може відбуватися за довготривалої інкубації фібриногену з фібриногенолітичним ферментом.

З метою ідентифікації належності виділеного нами фібриногенолітичного ферменту до  $\alpha$ - чи  $\beta$ -фібриногеназ необхідно було з'ясувати, який саме з ланцюгів фібриногену є першочерговою мішенню даного ферменту. Специфічність дії на фібриноген оцінювали за результатами електрофоретичного поділу зразків, одержаних після інкубації фібриногенолітичного ферменту з фібриногеном. Співвідношення ферменту до фібриногену було підібрано експериментально і складало 1:100, оскільки саме за таких умов спостерігався максимально ефективний гідроліз

фібриногену. Аліквоти для аналізу відбирали до початку інкубації, а також через 1, 2, 3, 4, 6 та 24 години інкубації. Як контроль було використано фібриноген, що не підлягав інкубації з ферментом. Як видно з результатів, представлених на рис. 7.6, одержаний нами фібриногенолітичний фермент в залежності від тривалості інкубації розщеплював як  $A\alpha$ -, так і  $B\beta$ -ланцюги фібриногену.

Проте, варто підкреслити, що у першу чергу розщеплення зазнавав саме  $A\alpha$ -ланцюг фібриногену. Інтенсивність смуги, що відповідає  $A\alpha$ -ланцюгу, помітно знижувалася вже через 1 годину інкубації з ферментом. Аналіз електрофореграми не виявив присутності  $A\alpha$ -ланцюга на 2 годину інкубації з досліджуваним ферментом. Одержані нами результати узгоджуються з результатами робіт [249, 250], де автори також відмічали повну деградацію  $A\alpha$ -ланцюга через дві години інкубації з фібриногенолітичним ферментом одержаним із отрути *A. blomhoffi*.

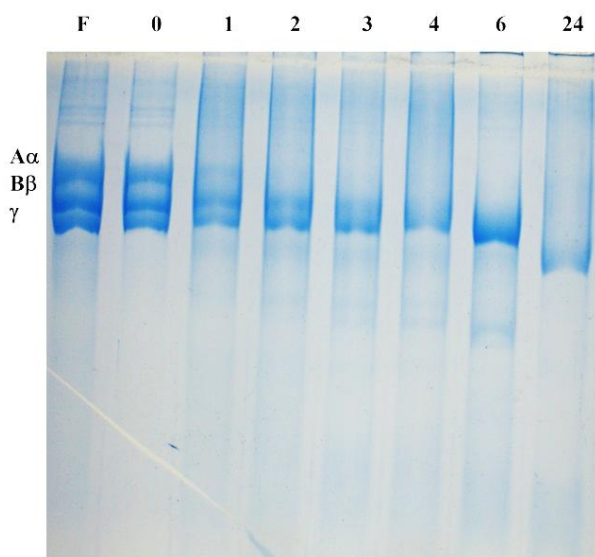


Рис. 7.6. Електрофореграма зразків фібриногену після інкубації з фібриногенолітичним ферментом:

F – зразок фібриногену без інкубації з фібриногенолітичним ферментом;

0–24 – години інкубації

Проте, проаналізувавши літературу, в цілому можемо констатувати, що швидкість гідролізу ланцюга-мішені фібриногенолітичним ферментом з *A. colbecki* є дещо нижчою у порівнянні з ефектами фібриногеназ, що були виділені зі зміїних отрут. Так, при інкубації фібриногену з фібриногенолітичними ферментами з *B. colombiensis*, *V. ammodytes*, *B. alternatus* деградація  $\text{A}\alpha$ -ланцюга відбувалася впродовж відповідно 15, 30 та 45 хв [251, 252].

Оскільки  $\text{A}\alpha$ -ланцюг фібриногену майже вдвічі довший у порівнянні з  $\text{B}\beta$ - та  $\gamma$ -ланцюгами, а його С-кінцева ділянка або  $\alpha\text{C}$ -домен дещо виступає з молекули фібриногену, саме він є найбільш чутливим до протеолізу.  $\alpha\text{C}$ -домен фібриногену відіграє виключно важливу роль у латеральній агрегації та поперечному зшиванні протофібрил під час утворення фібринового згустку. Більш того,  $\alpha\text{C}$ -домени опосередковують взаємодії з деякими білками плазми, зокрема, даний домен містить сайти зв'язування для фібрoneктину, FXIII, плазміногену та тканинного активатора плазміногену. Зв'язуючись з  $\alpha\text{C}$ -доменом фібриногену, білки плазми включаються у фібриновий згусток.

Відповідно до одержаних нами результатів, при більш тривалій інкубації відбувається деградація  $\text{B}\beta$ -ланцюга. Так, незначне розщеплення  $\text{B}\beta$ -ланцюга фібриногену спостерігалось вже через 2 години інкубації. Зі збільшенням часу інкубації інтенсивність смуги, що відповідає  $\text{B}\beta$ -ланцюгу, поступово знижувалася і, дана смуга повністю зникла через 4 години інкубації з ферментом. Такі наші результати не суперечать даним літератури, оскільки, як вже зазначалося, незважаючи на виражену специфічність щодо одного з ланцюгів фібриногену, за умов тривалої інкубації фібриногенолітичні ферменти також здатні гідролізувати й другий ланцюг фібриногену. Слід відмітити, що  $\gamma$ -ланцюг фібриногену залишається повністю інтактним впродовж перших 6 години експерименту. Проте через 24 години інкубації мало місце повне розщеплення даного ланцюга. Оскільки ми не відбирали

проб для аналізу в інтервалі між 6 та 24 годинами інкубації, точний час, коли саме відбувалося його гідролітичне розщеплення, нами встановлено не було. Деградація  $\gamma$ -ланцюга за участі фібриногенолітичних ферментів є досить рідкісним явищем. На сьогодні у літературі представлено не так багато робіт стосовно фібриногеназ здатних гідролізувати  $\gamma$ -ланцюг. Так, здатністю розщеплювати  $\gamma$ -ланцюг фібриногену володіють ферменти виділені з отрути змій *A. acutus*, *B. moojeni*, *B. colombiensis* [251, 253, 254], причому повна його деградація спостерігалася як на відносно ранніх термінах інкубації (до 8 год), так і через 18 годин.

В умовах нашого експерименту розщеплення фібриногену супроводжується накопиченням продуктів його деградації з молекулярною масою нижче 45 кДа, кількість яких зростала пропорційно до часу інкубації. Слід відмітити, що інкубація фібриногену з фібриногеназами із отрути деяких видів змій також супроводжувалася утворенням фрагментів, молекулярна маса яких в залежності від виду змій варіювала від 45 до 10 кДа.

Таким чином, відповідно до результатів електрофоретичного аналізу у початковий період інкубації спостерігалось розщеплення  $A\alpha$ -ланцюга фібриногену, подальша інкубація супроводжувалася деградацією  $B\beta$ -ланцюга, в той час як  $\gamma$ -ланцюг залишається інтактним впродовж всього досліджуваного періоду [255].

Важливо підкреслити той факт, що інкубація фібриногену з фібриногенолітичним ферментом не супроводжувалася утворенням фібринового згустку ні на початкових етапах дослідження, ні через 24 години інкубації, що дозволяє констатувати, що дія досліджуваного ферменту не пов'язана з вивільненням з молекули фібриногену фібринопептидів А і/чи В, які, як відомо [256], необхідні для ініціації процесу полімеризації фібрину та утворення згустку. Саме відщеплення фібринопептиду А є пусковим механізмом процесу полімеризації фібрину, оскільки при цьому у домені Е молекули фібриногену відбувається експонування двох активних центрів

полімеризації, що взаємодіють з комплементарними центрами у домені D. В результаті фібриноген, представлений як  $(A\alpha, B\beta, \gamma)_2$ , перетворюється на фібрин –  $(\alpha, \beta, \gamma)_2$ . Молекули фібрину агрегують у протофібрили, що ростуть у різних напрямках, створюючи фібриновий гель. Відщеплення фібринопептиду B необхідне не стільки для ініціації, як переважно для стабілізації D-блоків та посилення латеральних контактів між протофібрилами, що обумовлює укріплення структури протофібрил та сприяє зростанню ступеню галуження волокон та підвищує еластичність фібринового гелю. Показана нами здатність фібриногенолітичного ферменту, одержаного з *A. colbecki*, розщеплювати фібриноген без ініціації процесу полімеризації опосередковано може свідчити про його належність до фібриногеназ. Оскільки більшість фібриногенолітичних ферментів, зокрема тих, що є металопротеазами, поряд із здатністю розщеплювати фібриноген мають ще й фібринолітичну активність, на наступному етапі роботи ми перевіряли одержаний фібриногенолітичний фермент на наявність активності щодо фібрину. Для цього на фібриновий згусток, отриманий при додаванні до фібриногену (1мг/мл) тромбіну нашаровували досліджуваний фібриногенолітичний фермент, проби для аналізу відбирали через певні часові проміжки (1, 6 та 24 год). Для аналізу було використано як власне фібриновий згусток, так і зразки середовища, що залишилися після відділення фібринового згустку.

Відповідно до результатів проведених досліджень (рис. 7.7) фібриногенолітичний фермент виявляв певну фібринолітичну активність. В цілому специфічність досліджуваного ферменту щодо ланцюгів фібрину була подібна до його специфічності щодо ланцюгів фібриногену. Інкубація фібриногенолітичного ферменту з фібриновим згустком супроводжувалася появою у середовищі після інкубації фрагментів, що за молекулярною масою відповідають ланцюгам фібрину.

Так, через 1 та 6 год інкубації на електрофореграмах зразків інкубаційного середовища було ідентифіковано білкові смуги з молекулярною масою 67 кДа. Через 24 год інкубації окрім смуг, що відповідають  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -ланцюгам фібрину, було виявлено низку смуг з молекулярною масою нижче 45 кДа.

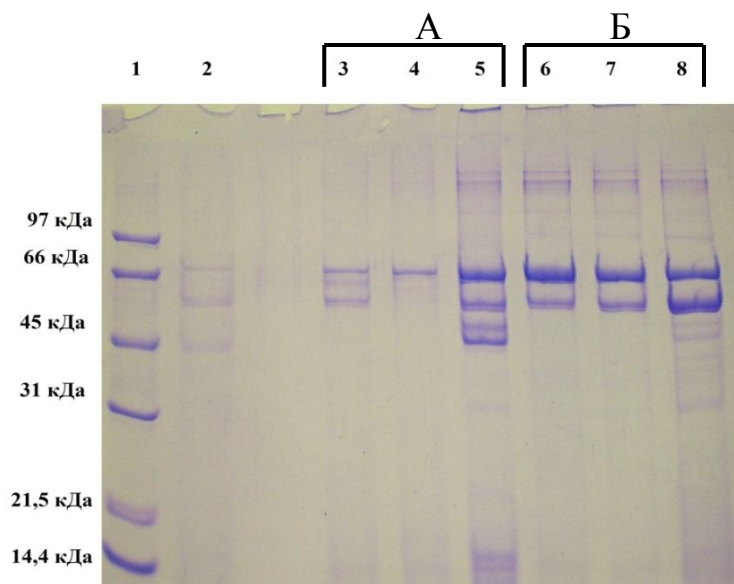


Рис. 7.7. Електрофореграма інкубаційного середовища (А) та зразків фібринового згустку (Б) після інкубації з фібриногенолітичним ферментом:

- 1 – маркери молекулярних мас;
- 2 – фібрин;
- 3, 6 - інкубація впродовж 1 год;
- 4, 7 – інкубація впродовж 6 год;
- 5, 8 - інкубація впродовж 24 год

Електрофоретичний аналіз зразків фібринового згустку після інкубації з досліджуваним ферментом показав присутність чітко виражених білкових смуг з молекулярними масами 67 та 55 кДа в усі досліджувані часові проміжки. З огляду на молекулярну масу та відповідність ланцюгам фібрину у контрольному зразку можемо говорити, що дані смуги є  $\alpha$ - та  $\beta$ -ланцюгам

фібрину. Відсутність в одержаних зразках смуги, що відповідає  $\gamma$ -ланцюгу, частково можна пояснити за рахунок прошивки  $\gamma$ -ланцюгів фібрину та утворення  $\gamma$ -полімерів.

Незважаючи на те, що для ініціації утворення фібринового згустку ми не використовували фактор XIIIa, який необхідний для ковалентної прошивки фібрину, певна його кількість завжди присутня у препаратах фібриногену у вигляді домішок і може викликати прошивку ланцюгів. Порівняння електрофоретичного профілю зразків, одержаних після інкубації фібринового згустку з фібриногенолітичним ферментом впродовж різних часових інтервалів дозволяє говорити про незначну гідролітичну активність даного ферменту щодо  $\alpha$ -полімерів фібрину. Як видно з наведеної електрофореграми, інтенсивність смуги, що відповідає  $\alpha$ -полімерам, дещо знижувалася з подовженням часу інкубації до 6 годин, проте повного розщеплення не спостерігалось навіть через 24 години інкубації. Певним підтвердженням фібринолітичної активності досліджуваного ферменту слугує накопичення низки продуктів деградації фібрину, що візуалізуються в області 45-31 кДа. Незважаючи на показану нами на попередньому етапі дослідження здатність фібриногенолітичного ферменту за умов тривалій інкубації з фібриногеном розщеплювати його  $\gamma$ -ланцюг, даний фермент не гідролізував  $\gamma$ -полімери фібрину, про що свідчить присутність на електрофореграмі смуг з молекулярною масою близько 90 кДа у зразках, відібраних на всіх часових проміжках. Подібні результати були отримані у роботах [257- 259], де автори показали, що металопротеази, виділені із змій видів *A. contortrix contortrix*, *C. atrox*, *M. lebetina*, *M. mauritanica* ефективно розщеплювали як  $A\alpha$ -, так і  $B\beta$ -ланцюги фібриногену, проте не виявляли активності щодо  $\gamma$ -ланцюгів фібриногену та  $\gamma$ -полімерів фібрину. Відповідно до даних, представлених у літературі, фібринолітична активність характерна переважно для металопротеаз, в той час як серинові тромбіноподібні ферменти з отрути змій, зазвичай, подібною активністю не володіють.

Таким чином, узагальнюючи одержані нами результати, можемо стверджувати, що одержаний фібриногенолітичний фермент має певний антикоагулянтний потенціал, оскільки виявляє фібриногенолітичну та менш виражену фібринолітичну активність тому може розглядатися як потенційно перспективний при лікуванні судинних патологій, зокрема, судинно-оклюзійних та тромбоемболічних порушень.

Розщеплення фібриногену за дії фібриногенолітичних ферментів обумовлює порушення здатності молекул фібриногену до полімеризації, вираженість якої безпосередньо залежить від ступеню гідролізу фібриногену та природи фібриногенолітика. Так, наприклад, дія металопротеаз обумовлює більш виражене порушення здатності фібриногену до полімеризації, ніж у випадку його розщеплення за участі серинових фібриногенолітичних ферментів, що пов'язано зі специфічністю даних ферментів стосовно ланцюгів фібриногену.

Враховуючи встановлену нами на попередньому етапі роботи здатність фібриногенолітичного ферменту, одержаного з *A. colbecki*, розщеплювати фібриноген, на наступному етапі роботи ми визначали відсоток фібриногену, що зберігає функціональну активність та здатен утворювати фібрин-мономери після його інкубації з фібриногенолітичним ферментом. До зразків фібриногену (0,5 мг/мл) після його інкубації з фібриногенолітичним ферментом додавали надлишок тромбіну, що приводило до утворення фібринового згустку, який видаляли одночасним викручуванням і віджиманням скляною паличкою та залишали у 0,125% оцтовій кислоті до повного розчинення. Концентрацію фібриногену, що не володіє здатністю до полімеризації вираховували як різницю між загальною концентрацією фібриногену та його концентрацією в оцтових лізатах фібринових згустків. Для з'ясування вираженості впливу фібриногенолітичного ферменту порівнювали зразки, відібрані через 1, 3 та 6 годин інкубації фібриногену з досліджуваним ферментом.

Відповідно до одержаних нами результатів, наведених на рис. 7.8, інкубація фібриногену з фібриногенолітичним ферментом приводила до зростання концентрації фібриногену, не здатного до полімеризації.

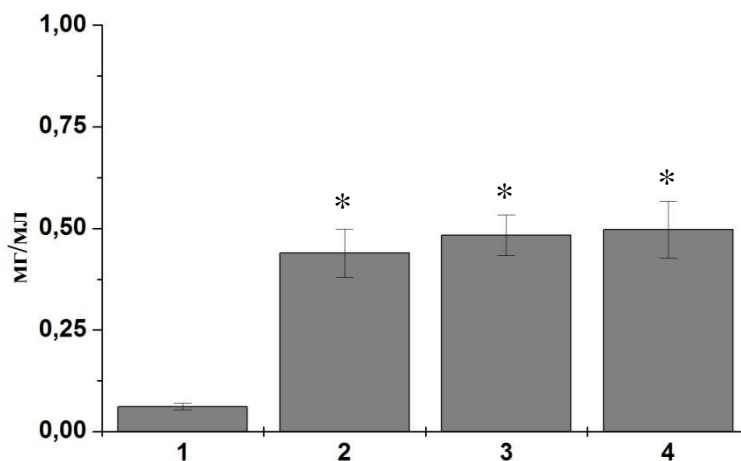


Рис. 7.8. Концентрація фібриногену, не здатного до полімеризації, після інкубації з фібриногенолітичним ферментом:

1 – контроль;

2 - інкубація впродовж 1 год;

3 - інкубація впродовж 3 год;

4 - інкубація впродовж 6 год

\* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем

Так, якщо у контрольном зразку концентрація функціонально неактивного фібриногену складала  $0,062 \pm 0,008$  мг/мл, що відповідає 12% від загального вмісту, то через 1 год інкубації даний показник зростав у 7 разів і становив  $0,439 \pm 0,06$  мг/мл. Подовження часу інкубації до 3 годин призводило до подальшого зростання концентрації фібриногену, що не вступав у реакцію полімеризації. Слід підкреслити, що виявлені нами зміни концентрації фібриногену підтверджувалися візуальною оцінкою розмірів фібринового згустку, що утворювався після додавання до фібриногену

тромбіну – так, розмір згустку зменшувався з часом інкубації, а при додаванні до проби з фібриногеном після його шестигодинної інкубації з досліджуваним ферментом тромбіну утворення фібринового згустку взагалі не відбувалося. Такі результати можуть слугувати підтвердженням відсутності функціонально активного фібриногену, здатного вступати в реакцію полімеризації.

Таким чином, фібриногенолітичний фермент обумовлював зниження концентрації функціонально активного фібриногену, що є цілком закономірним з огляду на виявлену нами на попередньому етапі роботи здатність фібриногенолітичного ферменту розщеплювати ланцюги фібриногену. Відомим є факт, що перетворення фібриногену у мономерний фібрин відбувається внаслідок обмеженого протеолізу тромбіном, який відщеплюючи від N-кінця молекули фібриногену фібринопептиди A, обумовлює експонування центрів полімеризації та власне ініціацію процесу самозбирання фібрину. Подальше ускладнення будови та утворення волокнистої сітки фібрину потребує залучення C-кінцевих ділянок молекули фібриногену, зокрема його  $\alpha$ C-доменів, що беруть участь у латеральній асоціації протофібрил. Тому відщеплення фрагментів від C-кінців A $\alpha$ -ланцюгів фібриногену значно впливає на етап латеральної асоціації протофібрил у фібрили, а отже в залежності від активності ферменту, ступеню пошкодження фібриногену та кількості функціонально ушкодженого фібриногену, сповільнює чи взагалі унеможлиблює формування трьохмірної сітки фібринового згустку.

З огляду на вищевикладене, одержані нами результати щодо зниження концентрації фібриногену, здатного залучатися у процес утворення фібринового згустку, можна пояснити саме за рахунок дії досліджуваного нами ферменту на A $\alpha$ -ланцюги фібриногену.

Відомо, що дія багатьох фібриногеназ, зокрема тих, що належать до металопротеаз, супроводжується розвитком геморагічного синдрому, який

розвивається у відповідь на підвищення проникності кровоносних судин та пов'язаний з порушенням взаємодії між базальною мембраною та ендотеліальними клітинами, внаслідок протеолізу низки мембранних білків ендотеліальних клітин (інтегрину, кадхеліну) та компонентів базальних мембран, зокрема, фібронектину, ламініну, нідогену та колагенів [260]. Подібна дія ферментів може бути пов'язана не стільки з присутністю у молекулі ферменту каталітичного або металопротеазного домену, як з наявністю дезінтегринового (для металопротеаз РІІ класу) чи цистеїн-збагаченого (для металопротеаз РІІ та РІІІ класів) доменів. Дані домени містять SECD-послідовність необхідну для зв'язування з колагеном та іншими білками екстрацелюлярного матриксу [261, 262]. Оскільки одержаний нами фібриногенолітичний фермент за його специфічністю щодо  $\text{A}\alpha$ -ланцюгів фібриногену є металопротеазною та з огляду на його молекулярну масу (близько 40 кДа) може містити дезінтегриновий домен, на наступному етапі роботи ми перевіряли, чи здатен даний фермент розщеплювати колаген, який є важливою складовою базальних мембран та позаклітинного матриксу. Відповідно до результатів електрофоретичного аналізу проб, відібраних через 1, 3 та 24 год інкубації (рис. 7.9), досліджуваний фібриногенолітичний фермент не володів здатністю розщеплювати колагенову спіраль.

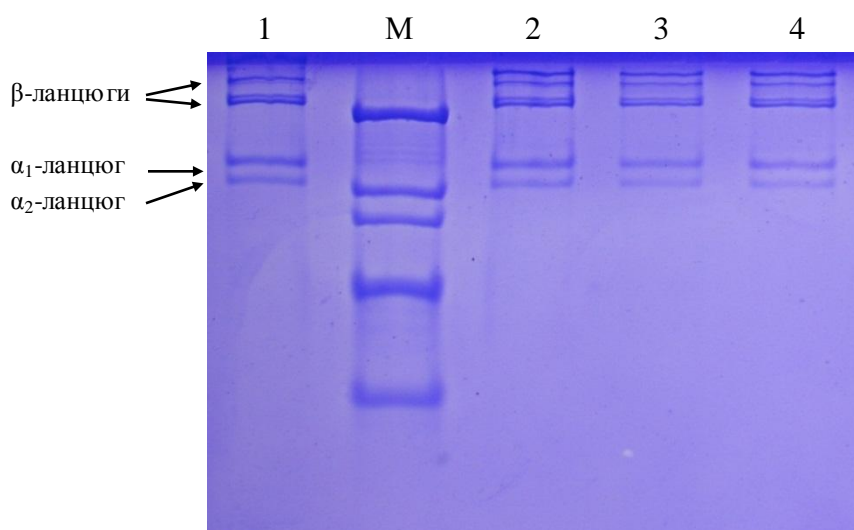


Рис. 7.9. Електрофореграма зразків колагену після інкубації з фібриногенолітичним ферментом:

1 – колаген;

М – маркери молекулярних мас (200, 116, 97, 66, 45 кДа);

2 – інкубація впродовж 1 год;

3 – інкубація впродовж 3 год;

4 – інкубація впродовж 24 год

Доведеним є факт, що для нормального перебігу процесу агрегації тромбоцитів, важливою є присутність фібриногену, який розглядається як обов'язковий кофактор даного процесу. Тому на наступному етапі роботи вивчали вплив одержаного фібриногенолітичного ферменту на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів. Дослідження проводили у плазмі, збагаченій на тромбоцити, що дозволило нам опосередковано оцінити чи пов'язана дія ферменту з його здатністю розщеплювати фібриноген. Швидкість агрегації реєстрували за допомогою агрегометра АТ-02 за зміною світлорозсіювання інкубаційної суміші до і після введення індуктора агрегації АДФ у концентрації  $5 \times 10^{-9}$  мМ.

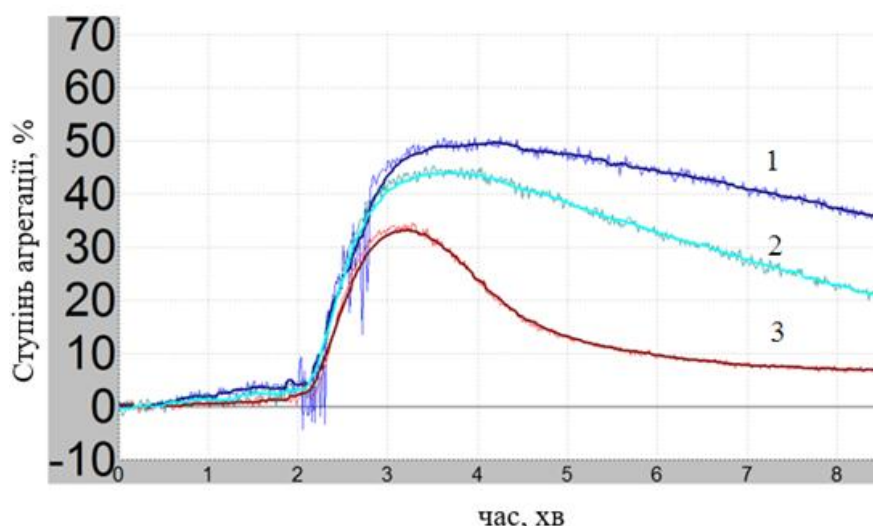


Рис. 7.10. Типова агрегатограма АДФ-залежної агрегації тромбоцитів за дії фібриногенолітичного ферменту

- 1 – контроль
- 2 – концентрація ферменту 6,25 мкг/мл
- 3 - концентрація ферменту 12,5 мкг/мл

Результати проведених досліджень свідчать про пригнічення АДФ-залежної агрегації тромбоцитів за дії досліджуваного ферменту. При додаванні до плазми, збагаченої на тромбоцити, ферменту у концентрації 12,5 мкг/мл та 6,25 мкг/мл спостерігалось 8% та 28% агрегації у порівнянні з 41%, що були зареєструвані без внесення до реакційного середовища ферменту. Такі показники відповідають інгібуванню процесу агрегації, відповідно, на 80,5% та 31,8%.

Одержані нами результати цілком узгоджуються з даними, представленими у літературі, відповідно до яких здатність пригнічувати агрегацію тромбоцитів характерна переважно для  $\alpha$ -фібриногеназ, в той час як для  $\beta$ -фібриногеназ подібний ефект не є типовим [89, 263, 264]. При цьому інгібуючий вплив безпосередньо залежить від концентрації ферменту та часу інкубації з тромбоцитами, що опосередковано може свідчити що їх дія пов'язана саме з проявом ферментативної активності. Класична модель агрегації тромбоцитів полягає в тому, що введення агоніста у суспензію тромбоцитів обумовлює внутрішньоклітинний сигналінг, що ініціює активацію інтегринового рецептору GPIIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ), внаслідок чого він набуває високої спорідненості до лігандів. Тромбоцитарний інтегрин GPIIb/IIIa сприяє взаємодії тромбоцитів один з одним використовуючи розчинні полівалентні молекули ліганда, в тому числі і фібриноген, як містки. Фібриноген зв'язується з тромбоцитами, що приводить до утворення містків між сусідніми активованими тромбоцитами та сприяє стабілізації тромбоцитарного агрегату. Враховуючи вищевикладене можемо припустити, що пригнічення процесу АДФ-залежної агрегації тромбоцитів при додаванні фібринолітичного ферменту може бути пов'язано з нестачею

функціонально активного фібриногену внаслідок розщеплення його А $\alpha$ -ланцюгів. Важливість А $\alpha$ - та  $\gamma$ -ланцюгів фібриногену для забезпечення належної взаємодії між фібриногеном та тромбоцитами було продемонстровано у роботах [265-267]. У той час як С-кінець  $\gamma$ -ланцюга необхідний для початкового зв'язування фібриногену з інтегриновими рецепторами, А $\alpha$ -ланцюг забезпечує міцність зв'язування. Взаємодія інтегринів групи  $\beta_3$  з лігандами відбувається через трипептидний фрагмент Arg-Gly-Asp або сигнальну RGD-послідовність, яка знаходиться на С-кінці ліганду. Відомо, що молекула фібриногену містить шість основних сайтів зв'язування з тромбоцитарними інтегринами, це, зокрема, додекапептид на С-кінцях обох  $\gamma$ -ланцюгів ( $\gamma$ 400-411) і дві RGD-послідовності, що локалізовані у А $\alpha$ -ланцюгу фібриногену -  $\alpha$ 95-98 (RGDF) та  $\alpha$ 572-575 (RGDS). Тому відщеплення від молекули фібриногену фрагментів, що містять RGD-послідовність послаблює або взагалі унеможливує утворення ліганд-рецепторного комплексу. Фрагменти, що відщеплюються від молекули фібриногену також можуть містити RGD-послідовності і тому можуть виступати ефективними інгібіторами процесу агрегації тромбоцитів [268-270]. Показано, що продукти розпаду фібриногену/фібрину низької молекулярної маси інгібують агрегацію тромбоцитів, а високої молекулярної маси, навпаки, посилюють її [271]. Їх інгібуючий вплив може бути обумовлений конкуруванням з молекулами нативного фібриногену за сайти зв'язування з інтегриновими рецепторами, проте їх зв'язування, на відміну від інтактного фібриногену, не приводить до подальшої агрегації тромбоцитів та утворення тромбоцитарної пробки.

З огляду на той факт, що молекулярна маса фібриногенолітичного ферменту з *A. colbecki* складає близько 40 кДа, можемо припустити, що виділений нами фермент належить до металопротеаз РІІ-групи, які мають молекулярні маси у діапазоні 30-60 кДа та характеризуються присутністю окрім, власне, металопротеазного або каталітичного домену ще й

дезінтегринового домену. Було показано, що D-петля дезінтегринового домену містить RGD-послідовність, тому даний домен слугує сильним інтегриновим лігандом [272-274]. З'ясування ролі інтегринових рецепторів GPIIb/IIIa як ключових посередників агрегації тромбоцитів дозволяє розглядати їх певний інструмент для маніпулювання процесом агрегації. В даному контексті певну увагу науковців та клініцистів привертають RGD-вмісні пептиди або дезінтегрини. Отрута деяких змій містить поліпептидні молекули довжиною від 49 до 84 амінокислотних залишків з активною RGD-послідовністю, які є специфічними інгібіторами інтегринів груп  $\beta_1$  і  $\beta_3$  до яких належить і тромбоцитарний рецептор фібриногену. На користь цього твердження свідчить той факт, що отримані з отрути змій білки – аплагін, ехистатін і триграмін, які блокують зв'язування фібриногену з його рецепторами на поверхні тромбоцитів, також блокують і агрегацію тромбоцитів [275, 276]. Незважаючи на високу ефективність інгібування RGD-залежних процесів, дезінтегрини не можуть бути використані як терапевтично обґрунтовані ефектори агрегації тромбоцитів оскільки є досить потужними антигенами. Проте дезінтегрини можуть слугувати структурними прототипами для створення антитромботичних агентів, які можуть бути використані для збільшення реперфузії у пацієнтів, які проходять курс антитромботичної терапії. [277-279].

Отже, показана нами інгібуюча дія фібринолітичного ферменту на агрегацію тромбоцитів частково може бути пов'язана ще й зі здатністю даного ферменту через дезінтегриновий домен безпосередньо зв'язуватися з тромбоцитарними рецепторами, унеможливаючи, таким чином, їх подальшу взаємодію з фібриногеном. Узагальнюючи, інгібуючий вплив фібринолітичного ферменту на процес агрегації тромбоцитів з одного боку обумовлений розщепленням фібриногену – важливого кофактору даного процесу, з іншого боку може бути пов'язаний з блокуванням тромбоцитарного рецептору як за рахунок накопичення продуктів деградації

фібриногену, так і внаслідок безпосередньої взаємодії ферменту з рецепторами.

Для більш детальної характеристики властивостей одержаного нами фібриногенолітичного ферменту було проведено субстратний аналіз з використанням хромогенних субстратів, які широко використовуються для вивчення властивостей ферментів системи гемостазу. Відповідно до одержаних нами результатів, представлених у табл. 7.3, фібриногенолітичний фермент виявляв активність стосовно всіх досліджуваних субстратів, проте ефективність гідролізу субстратів, що містили у P<sub>1</sub>-положенні залишок Arg, була суттєво вищою у порівнянні з активністю щодо субстрату, що у даному положенні мав залишок Lys. Так, активність ферменту при використанні субстрату *pyroGlu-Pro-Arg-pNA* була у 3,44 рази вищою, ніж при використанні субстрату *H-D-Val-Leu-Lys-pNA*. Слід відмітити, що одержаний нами фібриногенолітичний фермент не виявляв активності щодо *BApNA*. Відсутність ферментативної активності при використанні класичного субстрату, що широко застосовується для визначення активності трипсинів, може слугувати опосередкованим підтвердженням того, що даний фермент не належить до трипсинів.

Таблиця 7.3

**Активність фібриногенолітичного ферменту щодо синтетичних хромогенних субстратів (M±m, n=6)**

Субстрат	Питома активність ферменту, мкмоль <i>pNA</i> ·хв <sup>-1</sup> ·мг білка <sup>-1</sup>
<i>pyroGlu-Pro-Arg-pNA</i> (S <sub>2366</sub> )	3,0 ± 0,063
<i>H-D-Phe-Pip-Arg-pNA</i> (S <sub>2238</sub> )	2,63 ± 0,025
<i>H-D-Val-Leu-Lys-pNA</i> (S <sub>2251</sub> )	0,88 ± 0,035
<i>Bz-Ile-Glu(γ-OR)-Gly-Arg-pNA</i> (S <sub>2222</sub> )	0,94 ± 0,047
<i>N-α-benzoyl-DL-Arg-pNA</i> (BApNA)	-

Відомо, що фібриногенолітичні ферменти, зокрема ті, що належать до металопротеаз, мають вищу спорідненість до пептидних зв'язків, в утворенні яких беруть участь карбоксильні групи гідрофобних амінокислот, що розташовані у P<sub>1</sub>-положенні субстрату [280]. Дослідження проведені з використанням низки синтетичних пептидів, в яких проводили заміну амінокислот, задіяних в утворенні пептидного зв'язку, показали, що найвищу активність металопротеази виявляли стосовно зв'язків, утворених залишками лейцину або амінокислот з громіздким бічним ланцюгом, наприклад метіоніну [76, 281]. Ефективність взаємодії ферменту з субстратом визначається не лише природою амінокислотного залишку у P<sub>1</sub>-положенні, а й залишками, що її оточують. Істотний вклад у даний процес можуть вносити амінокислотні залишки значно віддалені від зв'язку, що розщеплюється. Саме вони визначають вторинну специфічність ферменту, яка пов'язана з строгою просторовою орієнтацією субстрату стосовно активного центру ферменту. Тому виявлені нами значні відмінності активності фібриногенолітичного ферменту при використанні різних аргінін-вмісних субстратів можуть бути обумовлені саме природою амінокислотних залишків, що знаходяться у P<sub>2</sub>- та P<sub>3</sub>-положенні субстрату. Порівнявши будову використаних нами аргінін-вмісних субстратів та прояв ферментативної активності, можемо говорити про важливість розташування у P<sub>2</sub>-положенні субстрату залишку неполярної амінокислоти. Так, найвища ферментативна активність спостерігалася стосовно субстрату  $\gamma$ -Glu-Pro-Arg-pNA, у P<sub>2</sub>-положенні якого знаходиться залишок проліну. Заміна даного амінокислотного залишку на полярну амінокислоту обумовлювала значне зниження ферментативної активності. Так, активність фібриногенолітичного ферменту щодо субстрату Vz-Pe-Glu( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-pNA була у 3,2 рази нижчою у порівнянні з активністю щодо субстрату  $\gamma$ -Glu-Pro-Arg-pNA. Чітко вираженої кореляції між полярністю амінокислотного залишку у P<sub>3</sub>-положенні субстрату та проявом

ферментативної активності виявлено не було, оскільки, незважаючи на той факт, що обидва використані субстрати (pyroGlu-Pro-Arg-pNA та Vz-Ile-Glu( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-pNA) містили у P<sub>3</sub>-положенні залишок глютамінової кислоти, вони значно розрізнялися за ступенем гідролізу фібриногенолітичним ферментом. Такі результати опосередковано можуть свідчити про відносно широку субстратну специфічність досліджуваного ферменту та в цілому узгоджуються з інформацією, наведеною у літературі. Адже добре відомим є факт, що для металопротеаз, виділених з отрути змій, характерна широка субстратна специфічність пов'язана зі значною структурною гнучкістю субстрат-зв'язуючого карману у каталітичному центрі ферменту [282].

Відповідно до сучасної класифікації фібриногенази, що виявляють специфічність до A $\alpha$ -ланцюгів фібриногену, належать переважно до металопротеаз, в той час як  $\beta$ -фібриногенази є сериновими протеазами [89]. Незважаючи на той факт, що одержаний нами фібриногенолітичний фермент першочергово розщеплював A $\alpha$ -ланцюги фібриногену ми не можемо однозначно класифікувати даний фермент як металопротеазу. Тому для встановлення належності фібриногенолітичного ферменту до метало- чи серинових протеаз було проведено інгібіторний аналіз з використанням EDTA та PMSF – інгібіторів, відповідно, метало- та серинових протеаз. Активність фібриногенолітичного ферменту визначали, використовуючи хромогенний субстрат pyroGlu-Pro-Arg-pNA, стосовно якого фермент виявляв найвищу активність. Згідно з одержаними результатами (табл. 7.4) преінкубація фібриногенолітичного ферменту з EDTA обумовлювала дозозалежне пригнічення ферментативної активності. Так, при використанні 2 мМ EDTA мало місце інгібування ферменту на 55%, а при підвищенні концентрації інгібітору до 5 мМ спостерігалось пригнічення активності на 75%. При внесенні до інкубаційного середовища загального інгібітору серинових протеаз PMSF інгібуючого ефекту виявлено не було.

Таким чином, з огляду на одержані нами результати, можемо зробити висновок про належність фібриногенолітичного ферменту до металопротеаз, що цілком узгоджується з його вираженою специфічністю щодо А $\alpha$ -ланцюгів фібриногену.

Таблиця 7.4

**Активність фібриногенолітичного ферменту за дії інгібіторів протеаз  
( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

	Концентрація інгібітору, мМ	Питома активність ферменту, мкмоль pNA·хв <sup>-1</sup> ·мг білка <sup>-1</sup>	% інгібування
Базальна активність	-	2,63 $\pm$ 0,05	-
EDTA	2	1,2 $\pm$ 0,04 *	55
	5	0,75 $\pm$ 0,02 *	72
PMSF	2	2,58 $\pm$ 0,03	2
	5	2,7 $\pm$ 0,03	-

\* -  $p < 0,05$  у порівнянні з базальною активністю

Використання фібриногенолітичних ферментів, як потенційно терапевтичних агентів безпосередньо залежить від їх чутливості до дії ендогенних інгібіторів, присутніх у кровотоці. З метою з'ясування чутливості одержаного нами фібриногенолітичного ферменту до дії природних інгібіторів ми інкубували досліджуваний фермент з плазмою крові, яка є джерелом ендогенних інгібіторів. Преінкубація фібриногенолітичного

ферменту впродовж 30 хв з плазмою приводила до значного інгібування ферментативної активності, оціненої з використанням хромогенного субстрату  $\text{puroGlu-Pro-Arg-pNA}$ . Так, за концентрації ферменту 10 мкг/мл мало місце пригнічення активності у 8 разів порівняно із активністю без додавання до інкубаційного середовища плазми. Підвищення концентрації ферменту до 80 мкг/мл супроводжувалося дещо менш вираженим інгібуванням ферментативної активності – за цих умов мало місце пригнічення активності ферменту у 4,6 рази. Подібні результати цілком узгоджуються з даним літератури щодо активності  $\alpha$ -фібриногеназ за умов їх інкубації з плазмою [283]. Оскільки одержаний нами фермент є металопротеазною, малоймовірно, що інгібування його активності в умовах нашого експерименту може бути пов'язано з дією інгібіторів серинових протеаз (серпінів), які контролюють активність більшості ферментів системи гемостазу та присутні у плазмі у достатніх кількостях. Виключенням може бути  $\alpha_2$ -макроглобулін, який є універсальним інгібітором незалежно від їх належності до серинових чи металопротеаз. В літературі є ряд робіт, де показано, що інкубація металопротеаз з  $\alpha_2$ -макроглобуліном супроводжується значним пригніченням їх активності, внаслідок утворення ковалентного комплексу між інгібітором та ферментом [284, 285].

Прояв каталітичної активності багатьох ферментів безпосередньо залежить та регулюється іонами металів. Для деяких ферментів, іони металів виконують функції протетичних груп. Також вони сприяють приєднанню субстрату до активного центру ферменту та утворенню фермент-субстратних комплексів. Окрім того, відомим є факт безпосередньої участі металів, наприклад іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , під час формування та стабілізації активного центру та всієї третинної структури молекули ферменту. Варто також відмітити значення іонів металів як алостеричних модуляторів – взаємодіючи з алостеричним центром, вони сприяють утворенню найбільш оптимальної просторової конфігурації ферменту та фермент-субстратного комплексу.

Особливо важливою є роль металів у випадку металозалежних ферментів. Для металопротеаз іони металів, утворюючи хелатні комплекси, забезпечують стійкість структури ферменту.

Враховуючи, що одержаний нами фібриногенолітичний фермент належить до металопротеаз, прояв ферментативної активності яких безпосередньо залежить та регулюється іонами металів, на наступному етапі роботи ми досліджували вплив іонів деяких металів на прояв ферментативної активності.

Іони  $Zn^{2+}$ , як відомо [286], необхідні для прояву активності багатьох металопротеаз. Окрім того, більшість металопротеаз, одержаних із зміїних отрут, належать до родини цинк-вмісних ферментів [287, 288], для яких присутність цинку є необхідною умовою для забезпечення ефективного каталізу. Враховуючи важливість даного іону, доцільним видавалось дослідити, чи впливають іони  $Zn^{2+}$  на активність одержаного нами ферменту. Як бачимо (рис. 7.11), в умовах нашого експерименту стимулюючого ефекту іонів  $Zn^{2+}$  виявлено не було.

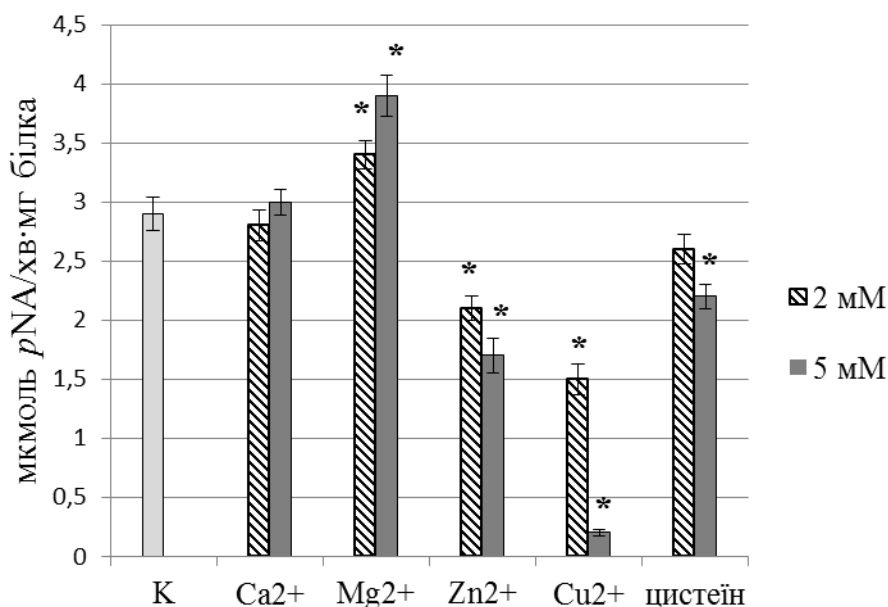


Рис. 7.11. Питома активність фібриногенолітичного ферменту за дії іонів двоцвалентних металів та цистеїну ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

\* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем (К)

Більш того, було показано чітко виражений інгібуючий вплив даного іону на ферментативну активність фібриногенолітичного ферменту. Так, згідно з одержаними результатами, активність досліджуваного ферменту становила 72% та 61% від базальної активності при внесенні до інкубаційного середовища іонів  $Zn^{2+}$  у концентрації, відповідно, 2 мМ та 5 мМ. Незважаючи на [252], де автори відзначають чітко виражений активуючий вплив  $Zn^{2+}$  на активність фібриногенолітичних металопротеаз, в літературі представлено ряд робіт, де, навпаки, показано пригнічення активності  $\alpha$ -фібриногеназ за їх інкубації з іонами  $Zn^{2+}$ . Це стосується, зокрема, фібриногеназ, виділених з отрути змій видів *P. patagoniensis*, *D. acutus*, *C. viridis oreganus* [91, 289, 290]. Практично повне інгібування активності фібриногенолітичного ферменту спостерігалось після його інкубації з іонами  $Cu^{2+}$  - активність ферменту при цьому становила 52% від базальної за концентрації  $Cu^{2+}$  2 мМ та лише 6,8% при підвищенні концентрації  $Cu^{2+}$  до 5 мМ. Виявлений нами інгібуючий ефект за дії іонів  $Zn^{2+}$  та  $Cu^{2+}$  може бути обумовлений конформаційними перебудовами молекули ферменту внаслідок зв'язування з катіонами вищезазначених металів або бути результатом їх взаємодії з функціональними групами в активному центрі ферменту, що в обох випадках унеможливорює перебіг каталітичного процесу. З літератури відомою є важлива роль іонів  $Ca^{2+}$  для підтримання належної структурної цілісності та стабільності ферментів, особливо за відсутності оптимальних умов каталізу, а також їх стимулюючий вплив на ферментативну активність. Тому ми досліджували чи впливають іони  $Ca^{2+}$  на активність ферменту. Відповідно до одержаних нами результатів (табл. 7.6) преінкубація фібриногенолітичного ферменту з іонами  $Ca^{2+}$  у концентрації 2 та 5 мМ не впливала на ферментативну активність, яка залишалась у межах базальних значень. Відсутність активуючого впливу іонів  $Ca^{2+}$  також була продемонстрована для фібриногенолітичних ферментів,

одержаних, зокрема, з отрути змій видів *A. blomhoffii brevicaudus*, *V. lebetina*, *B. leucurus* [91, 255] та ін. Серед всіх досліджених нами металів лише іони  $Mg^{2+}$  виявляли певний активуючий вплив на активність ферменту. Так, за присутності в інкубаційному середовищі іонів  $Mg^{2+}$  у концентрації 2 мМ активність фібриногенолітичного ферменту зростала на 17%, підвищення концентрації іонів до 5 мМ приводило до зростання активності ферменту на 34%. Внесення до інкубаційного середовища цистеїну викликало пригнічення активності досліджуваного нами ферменту на 10% та 25% за концентрації цистеїну, відповідно, 2 мМ та 5 мМ. Такі результати дозволяють зробити припущення про важливість вільних SH-груп для прояву належної ферментативної активності. В цілому, одержані нами дані щодо інгібуючого впливу цистеїну узгоджуються з результатами, представленим у літературі [289], де автори також виявили значне пригнічення активності фібриноенолітичних металопротеаз при їх інкубації з цистеїном.

Таким чином, підвищення активності фібриногенолітичного ферменту мало місце лише при додаванні до інкубаційного середовища іонів  $Mg^{2+}$ , в той час як іони  $Ca^{2+}$  не впливали, а іони  $Zn^{2+}$  та  $Cu^{2+}$ , навпаки, знижували активність досліджуваного ферменту.

Також було визначено оптимальне для прояву ферментативної активності значення рН. Як видно з рис. 7.12 залежність активності фібриногенолітичного ферменту від значень рН описується кривою, що має типову дзвоноподібну форму. З огляду на результати визначення активності за різних рН середовища фібриногенолітичний фермент можна віднести до лужних протеаз, оскільки ферментативна активність була незначно виражена в області кислих значень рН та зростала в діапазоні лужних значень. Так, активність ферменту при рН 4,0 та 5,0 складала лише близько 9,5% від максимально зареєстрованої, в той час як при зміщенні рН у бік лужних значень мало місце виражене зростання активності ферменту до 22,6% за рН 6,0 та до 46,4% за рН 9,0. рН оптимум для досліджуваного

фібриногенолітичного ферменту було визначено при рН 10,0. Подальше підвищення значень рН до 11,0 та 12,0 приводило до пригнічення ферментативної активності. За даних умов активність ферменту складала відповідно близько 96% та 70%. Проте вже при рН 13,0 активність ферменту становила половину від максимальної.

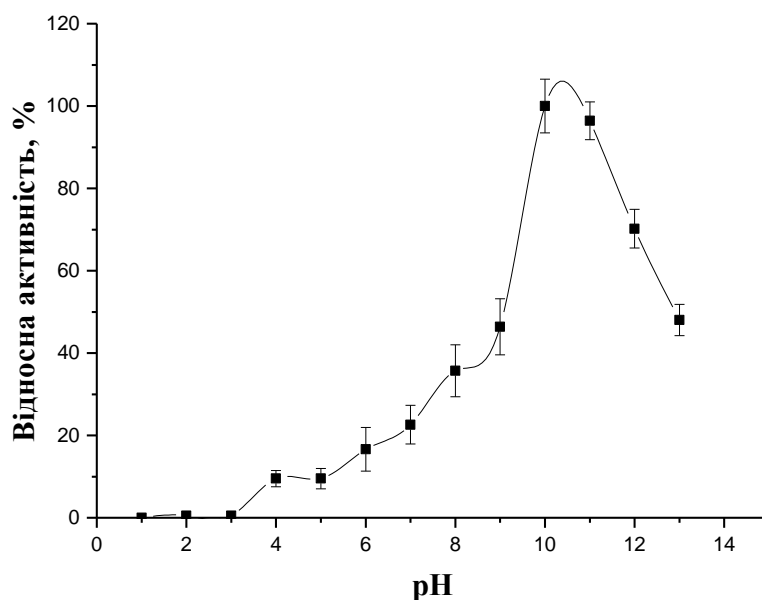


Рис. 7.12. Залежність активності фібриногенолітичного ферменту від рН

Одержані результати щодо рН оптимуму фібриногенолітичного ферменту в цілому узгоджуються з результатами, представленими у літературі, адже більшість фібриногенолітичних ферментів мають оптимум рН при нейтральних та лужних значеннях [91, 255, 287].

Також було визначено основні кінетичні параметри, зокрема, максимальну швидкість ферментативної реакції  $V_{\max}$ , константу Міхаеліса ( $K_M$ ), каталітичну константу ( $k_{\text{cat}}$ ) та розраховано відношення ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ), яке дозволяє оцінити ефективність каталізу конкретного субстрату. Визначення проводили за оптимального значення рН використовуючи хромогенний субстрат Н-D-Phe-Pip-Arg-pNA, що дозволило порівняти одержані нами результати з даними, розрахованими для інших фібриногенолітичних

ферментів. стосовно якого виділений нами фібриногенолітичний фермент виявляв одну з найвищих активностей. Для дослідження було використано субстрат у діапазоні кінцевих концентрацій від 0,01 до 0,3 мМ. Для розрахунку кінетичних констант  $K_M$  та  $V_{max}$  використовували графік, побудований у обернених координатах Лайнувера-Берка (рис. 7.13). Відповідно до проведених розрахунків,  $V_{max}$  та  $K_M$  склали, відповідно,  $0,00099 \text{ мМ}\cdot\text{с}^{-1}$  та  $0,023 \text{ мМ}$ .

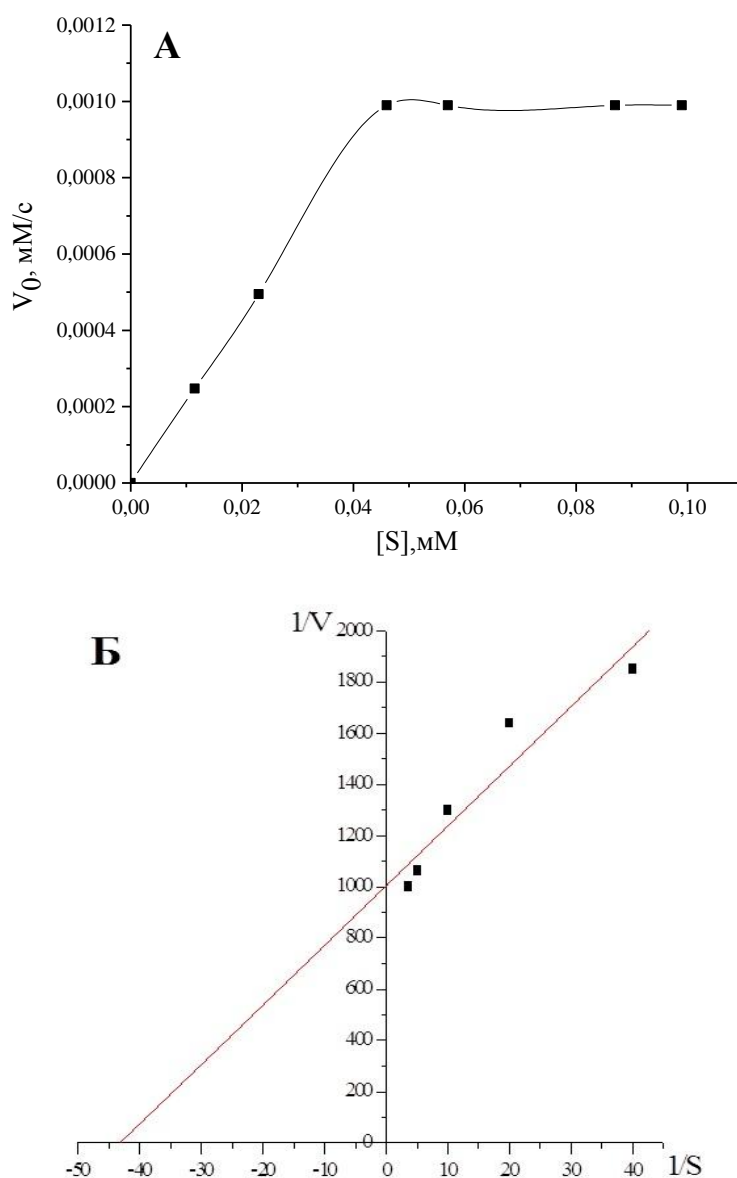


Рис. 7.13. Залежність початкової швидкості реакції гідролізу субстрату Н-D-Phe-Pip-Arg-pNA від його концентрації (А) та лінеаризація у координатах Лайнувера-Берка (Б)

Порівнявши значення  $K_M$  для досліджуваного нами ферменту та  $K_M$  для фібриногенолітичних ферментів, одержаних зі зміїної отрути, можемо відзначити, що фібриногенолітичний фермент з *A. colbecki* виявляв вищу спорідненість до субстрату H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, яка була у 2 та 20 разів вищою, якщо порівнювати з  $K_M$ , обчисленим для ферментів, одержаних, відповідно, з отрути змії видів *T. jerdonii* [291] та *T. stejnegeri* [292]. Враховуючи, що субстрат H-D-Phe-Pip-Arg-pNA широко використовується під час дослідження функціональної активності тромбіну та тромбіноподібних ферментів, цікавим видавалося порівняти значення  $K_M$  для ферменту з *A. colbecki* зі значенням для тромбіну. Варто зазначити, що ми не розраховували значення  $K_M$  для тромбіну, а скористалися даними, наведеними у каталозі продукції фірми Chromogenix. Величина  $K_M$  для досліджуваного фібриногенолітичного ферменту була у 2,3 рази вищою, а отже його спорідненість щодо тромбінового субстрату S<sub>2238</sub> у стільки ж разів нижчою, якщо порівнювати з відповідним показником для тромбіну бика.

Таблиця 7.5

**Кінетичні параметри реакції гідролізу субстрату H-D-Phe-Pip-Arg-pNA  
фібриногенолітичним ферментом**

$V_{max}$ , $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$	$K_M$ , $\text{mM}$	$k_{cat}$ , $\text{s}^{-1}$	$k_{cat}/K_M$ , $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
0,00099	0,023	0,25	10,8

До параметрів, що описують ефективність каталізу належить константа швидкості другого порядку  $k_{cat}/K_M$  або каталітична ефективність. Як бачимо з одержаних результатів ефективність гідролізу субстрату складала  $10,8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ .

## ЗАКЛЮЧЕННЯ

Ферменти з організмів, адаптованих до низьких температур, через певні структурно-функціональні особливості привертають значну увагу науковців як потенційно перспективні не лише з практичної точки зору, а і як цінні інструменти для проведення фундаментальних досліджень. Організми, здатні виживати та успішно розвиватися за понижених температур навколишнього середовища, називаються психрофільними. Істинними психрофілами є ті, для яких оптимальною для функціонування є температура нижче 15°C. Незважаючи на широке розповсюдження та різноманіття, будова та властивості ферментів з психрофілів залишаються недостатньо вивченими, що обумовлює актуальність проведення комплексних досліджень в даному напрямку. Адаптація до низьких температур середовища забезпечується низкою генетично детермінованих механізмів, що реалізуються на різних рівнях організації. Так, на рівні цілого організму формуються спеціальні поведінкові реакції (міграції), метаболічні пристосування (оціпеніння, сплячка). На молекулярному рівні адаптація включає синтез антифризних білків; певними особливостями характеризується енергетична система, механізми синтезу та деструкції білків, система транспорту. Особливе місце відводиться адаптації на молекулярному рівні - так званому феномену температурної компенсації ферментних систем психрофілів. В першу чергу на флуктуації параметрів зовнішнього середовища реагують ферменти, що дозволяє проявляти ферментативну активність та підтримувати належну швидкість обмінних процесів, незважаючи на сповільнення метаболічних реакцій за низьких температур. Ферменти з психрофільних організмів здатні компенсувати зниження швидкості реакцій за рахунок підвищення каталітичної ефективності. Порівняння кінетичних параметрів гідролізу субстратів гомологічними ферментами з психрофільних, мезофільних і термофільних об'єктів виявили, що їх питомі активності за умов

температурного оптимуму, як правило, є подібними. Тобто, ефективність ферментів з психрофільних організмів є досить високою. На сьогодні точні молекулярні механізми даного явища залишаються остаточно не з'ясованими, але вважається, що висока каталітична ефективність ферментів з психрофілів пов'язана, насамперед, з більшою лабільністю ділянок молекули ферменту, що безпосередньо залучені до каталізу.

Вивчення структурно-функціональних особливостей ферментів, адаптованих до функціонування за низьких температур, становить значний інтерес не лише для фундаментальної науки, а є досить привабливим з позицій їх потенційного практичного застосування. На сучасному етапі економічного розвитку сфера використання ферментів надзвичайно широка і включає різні галузі промисловості, сільське господарство, біотехнологічне виробництво. Важливою областю застосування препаратів на основі ферментів є медицина, де їх призначають як основний засіб, а також як допоміжний компонент під час терапії гастро-ентерологічних захворювань, гнійно-некротичних процесів, використовують у стоматології, офтальмології, отоларингології, гінекології.

Окрім значного практичного потенціалу, ферменти, адаптовані до функціонування за низьких температур, є важливими об'єктами для проведення фундаментальних досліджень, пов'язаних з вивченням структурних основ високої каталітичної ефективності даних ферментів. Дослідження у даному напрямку дозволять доповнити існуючі на сьогодні уявлення щодо адаптаційних стратегій, зокрема, молекулярних механізмів холодової адаптації. Вивчення особливостей ферментів з психрофілів має суттєве значення для білкової інженерії, оскільки чітке розуміння механізмів взаємозв'язку між структурою та функцією дозволить створювати молекули з заданими характеристиками. Окрім того, порівняльний аналіз амінокислотного складу, структури та кінетичних параметрів ферментів з

організмів різних таксономічних рангів сприятиме розширенню уявлень про еволюцію ферментів.

До ферментів, що виявлені у більшості організмів, незалежно від їх таксономічного положення, належать трипсини. Незважаючи на те, що будова, властивості та залучення даних ферментів у реалізацію базових фізіологічних функцій та розвиток патологічних процесів є добре дослідженими, робіт, присвячених вивченню властивостей трипсинів з психрофільних безхребетних в сучасній літературі не так багато.

*A. colbecki* як гідробіонт Антарктичного регіону, де середня температури води складає 0°C, може розглядатися як потенційно перспективний об'єкт для одержання та вивчення властивостей ферментів з нетиповими властивостями.

Висновок щодо доцільності використання гідробіонту *A. colbecki*, як джерела для одержання ферментів, було зроблено на основі результатів аналізу якісного білково-пептидного складу тканин даного гідробіонту та з огляду на присутність протеолітичних ферментів з різною будовою активного центру. Так, відповідно до результатів проведених електрофоретичних досліджень, загальний екстракт тканин гідробіонту містив широкий спектр білків з молекулярними масами у діапазоні від 10 до 150 кДа; при цьому домінуюча частина білків була представлена аніонними ізоформами, ізoeлектричні точки яких знаходилися у межах двох інтервалів рН – 3,5–4,0 та 5,5–5,9. Застосування методу ензим-електрофорезу показало присутність активних протеаз, що виявляли активність щодо желатину, фібриногену та колагену. Проведений аналіз, з використанням інгібіторів протеаз, виявив, що близько 53% від загальної протеолітичної активності обумовлено сериновими протеазами, серед яких до 95% активності опосередковується трипсиноподібною активністю. Близько 20% ферментативної активності належить металозалежним протеазам, а решта

27% активності може бути пов'язана із присутністю цистеїнових та аспартильних протеаз.

В результаті фракціонування загального екстракту тканин гідробіонту на окремі фракції методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці з носієм Superdex 75 PG було одержано 5 фракцій, що містили білки з молекулярними масами від 30 і до 75 кДа та вище: 1 фракція містила білки з масою вище 75 кДа, 2 фракція – 75-65 кДа, 3 фракція – 65-45 кДа, 4 фракція – 45-40 кДа, 5 фракція – 40-30 кДа. Оскільки, відповідно до результатів інгібіторного аналізу, протеази у екстракті тканини гідробіонту представлені переважно сериновими, зокрема, трипсиноподібними та металозалежними ферментами, кожна фракція була протестована на наявність трипсиноподібної та колагенолітичної активності. Також було визначено казеїнолітичну активність, яка дозволяє зробити висновок про загальну протеолітичну активність. Даний тип активності було виявлено у всіх досліджуваних фракціях, що вказує на наявність у екстракті тканини *A. colbecki* активних форм як високо-, так і низькомолекулярних протеолітичних ферментів та слугує непрямым підтвердженням певного протеолітичного потенціалу досліджуваного гідробіонту. Застосування специфічного для трипсинів субстрату VApNA виявило присутність ферментів, здатних гідролізувати даний субстрат, у фракціях, що містять білки з молекулярними масами від 30 до 65 кДа, найвищу активність було зареєстровано у фракції, білки якої мають молекулярну масу 30-40 кДа. Такі результати в цілому узгоджуються з даними літератури щодо молекулярної маси трипсинів та трипсиноподібних ферментів. Присутність колагенолітичної активності лише у фракції білків з молекулярними масами близько 30 кДа опосередковано може вказувати на належність даних ферментів до серинових колагенолітичних ферментів, адже відомо, що у тканинах нижчих гідробіонтів поряд з високомолекулярними (40-150 кДа) металозалежними

колагеназами є низькомолекулярні (нижче 30 кДа) колагенолітичні ферменти активний центр яких містить залишок Ser.

Узагальнюючи результати даного етапу роботи, можемо зробити висновок, що основна частина протеолітичної активності у тканинах досліджуваного гідробіонту обумовлена сериновими протеазами, зокрема тими, що мають трипсиноподібну активність.

Тому, з огляду на одержані нами результати, наступний етап роботи передбачав одержати та охарактеризувати трипсиноподібний фермент. Варто зазначити, що певні структурні відмінності білків з психрофільних організмів обумовлюють необхідність розробки нових чи оптимізації існуючих методів їх виділення, очистки та стабілізації, оскільки загальноприйняті методичні підходи у більшості випадків виявляються малоефективними. Це відноситься як до методів роботи з тканинними екстрактами, так і з чистими ферментами чи іншими фракціями біологічно активних речовин. Нами було розроблено ефективну схему очистки ферменту, яка поєднувала два хроматографічні підходи (афінну хроматографію та хроматографію, що поділяє за розмірами) та дозволила одержати гомогенний фермент з виходом 50,3% та ступенем очистки 7,5. Належність одержаного ферменту до трипсинів була підтверджена результатами інгібіторного аналізу, відповідно до яких, інкубація з інгібітором серинових протеаз PMSF та специфічним інгібітором трипсинів SBTI обумовлювала пригнічення активності ферменту, в той час як за використання інгібітору металозалежних ферментів EDTA, інгібуючого впливу виявлено не було. Додатковим підтвердженням трипсинової природи одержаного ферменту може слугувати прояв ферментативної активності щодо класичного субстрату для дослідження властивостей трипсинів *N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-Arg-pNA та відсутність ферментативної активності у випадку використання субстрату для хімотрипсину Ac-Phe-pNA.

В цілому за своїми основними фізико-хімічними характеристиками трипсиноподібний фермент, одержаний з *A. colbecki*, виявився подібним до

більшості трипсинів ссавців та безхребетних. Так, фермент виявляв більш виражену активність при використанні ефірного субстрату *N*- $\alpha$ -*p*-tosyl-L-Arg-methylester у порівнянні з амідним субстратом *N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-Arg-*p*NA. Швидкість гідролізу *p*-нітроанлідних субстратів, що містили у P<sub>1</sub>-положенні залишок Arg була суттєво вищою у порівнянні з субстратом, що містив у даному положенні залишок Lys; ефективність гідролізу залежала від довжини пептидного ланцюга субстрату і зростала з його подовженням. Оптимуму рН, подібно до інших трипсинів, знаходився в області лужних значень рН і складав 9,0. Однією з основних відмінностей трипсиноподібного ферменту, одержаного з гідробіонту *A. colbecki*, від «класичних» трипсинів є значення температурного оптимуму, яке було встановлено при температурі 24°С. Даний показник виявився значно нижчим за оптимальні температури, характерні для трипсинів мезофільних організмів, але знаходився в інтервалі температурного оптимуму, характерного для трипсиноподібних ферментів, одержаних з організмів, адаптованих до низьких температур середовища. Порівняння кінетичних параметрів реакції гідролізу субстрату *p*Arg-Glu-Pro-Arg-*p*NA за температури, оптимальної для прояву ферментативної активності (24°С) та температури 8°С, яка є середньою температурою середовища існування істинних психрофітів, виявило суттєве зниження значень  $K_M$  з 0,68±0,07 мМ при 24°С до 0,39±0,09 мМ при 8°С. При цьому каталітична константа  $k_{cat}$  також знижувалась. Незважаючи на зниження обох кінетичних констант, каталітична ефективність гідролізу субстрату  $k_{cat}/K_M$  залишалась незмінною при обох температурах і складала 15,32±0,2 мМ<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup> при 24°С та 16,33±0,3 мМ<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup> при 8°С. На основі одержаних нами результатів можемо припустити, що один з механізмів адаптації трипсиноподібного ферменту до функціонування при низьких температурах середовища пов'язаний з підвищенням спорідненості субстрату до ферменту. Слід відмітити, що для більшості досліджених на сьогодні ферментів з психрофільних організмів,

підвищення каталітичної ефективності відбувається за рахунок підвищення ефективності зв'язування субстрату з ферментом. Виявлена нами стратегія адаптації за рахунок зниження значень  $K_M$  характерна для деяких видів риб – *G. morhua*, *P. magellanica*, *S. gairdneri*, що живуть за низьких температур середовища.

Оскільки однією із виражених активностей, визначених на етапі оцінки протеолітичного потенціалу гідробіонту, була фібриногенолітична активність, наступний блок досліджень включав одержання та характеристику фібриногенолітичного ферменту. Додатковим обґрунтуванням вибору саме фібриногенолітичного ферменту, як об'єкту для дослідження, стала існуюча на сьогодні нагальна потреба у ефективних та безпечних засобах, здатних швидко знижувати вміст фібриногену у кровотоці, адже відомо, що серцево-судинні захворювання, патогенез яких ускладнений тромботичними порушеннями, є однією з ключових причин летальних випадків та інвалідизації серед працездатного населення.

Варто зазначити, що використання для одержання фібриногенолітичного ферменту ліофілізату фракції, що не зв'язалася з SBTI-сефарозою 4В на етапі одержання з трипсиноподібного ферменту, дозволило відразу відділити ферменти, що володіють трипсиноподібною активністю. В результаті поєднання декількох хроматографічних стадій, зокрема, афінної хроматографії на колонці з Blue-сефарозою 6 FF та хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200 PG, було одержано електрофоретично гомогенний фермент з молекулярною масою близько 40 кДа. Виражена специфічність даного ферменту щодо А $\alpha$ -ланцюгів фібриногену та значне пригнічення його активності при додаванні EDTA, а також відсутність інгібуючого впливу за інкубації з PMSF дозволило віднести одержаний нами фермент до металопротеаз. Фібриногенолітичний фермент належить до лужних протеаз – його рН оптимум знаходиться при рН 10,0. Активність ферменту значно пригнічувалась за інкубації з іонами  $Zn^{2+}$

та  $\text{Cu}^{2+}$  та незначно зростала при додаванні іонів  $\text{Mg}^{2+}$ . Пригнічення активності ферменту при додаванні цистеїну дозволяє зробити висновок про важливість вільних SH-груп для прояву каталітичної активності. Одержаний нами фібриногенолітичний фермент обумовлював порушення здатності молекул фібриногену до полімеризації та утворення фібринового згустку, що було підтверджено результатами трьох базових хронометричних тестів оцінки стану плазменного гемостазу та безпосереднім зниженням концентрації фібриногену, здатного до полімеризації, після інкубації з досліджуваним фібриногенолітичним ферментом. Окрім здатності розщеплювати фібриноген, фермент володів певною фібринолітичною активністю; при цьому специфічність щодо ланцюгів фібрину було подібна до такої, стосовно ланцюгів фібриногену – першим гідролізу зазнавав саме А $\alpha$ -ланцюг. Ще одним наслідком розщеплення фібриногену за дії фібриногенолітичного ферменту може бути виявлене нами пригнічення процесу АДФ-залежної агрегації тромбоцитів, оскільки відомим є факт, що необхідною умовою агрегації є присутність фібриногену – важливого кофактору даного процесу. Відповідно до результатів субстратного аналізу, фібриногенолітичний фермент виявляв значно вищу активність щодо субстратів, що містять у  $\text{P}_1$ -положенні залишок Arg, у порівнянні з тими, що містять у даному положенні залишок Lys. Враховуючи належність одержаного нами ферменту до металопротеаз, виявлена специфічність щодо *p*-нітроанлідних субстратів є не зовсім типовою та опосередковано може свідчити про широку субстратну специфічність досліджуваного ферменту. Незважаючи на таку відносно широку субстратну специфічність та той факт, що більшість металопротеаз здатні ефективно розщеплювати не лише ряд білків системи гемостазу, а й білки мембран ендотеліальних клітин та базальних мембран, обумовлюючи розвиток кровотеч, одержаний нами фібриногенолітичний фермент не виявляв активності стосовно колагену – важливого компоненту базальних мембран та позаклітинного матриксу, що

може слугувати непрямим підтвердженням відсутності у даного ферменту вираженої геморагічної активності.

Узагальнюючи, нами було одержано в гомогенному вигляді трипсиноподібний (23 кДа) та фібриногенолітичний (40 кДа) ферменти, пригнічення активності яких за дії, відповідно, PMSF і EDTA дозволяє віднести досліджувані ферменти до серинових протеаз та металопротеаз. Такі результати в цілому узгоджуються з даними щодо представництва ферментів з різною будовою активного центру у загальному екстракті тканини гідробіонту *A. colbecki*, згідно з якими основна частина ферментів даного організму представлена сериновими протеазами, зокрема, трипсиноподібними, а також металозалежними ферментами. Проведені дослідження свідчать про перспективність використання гідробіонту *A. colbecki* як потенційного джерела зазначених ферментів та обґрунтовують доцільність проведення подальших досліджень, спрямованих на більш детальне вивчення будови та фізіологічних ефектів даних ферментів з перспективою створення на їх основі препаратів для лікування патологічних проявів, асоційованих з надмірними тромбоутворенням чи активізацією гнійно-некротичних процесів.

## ВИСНОВКИ

Отримані у дисертації результати доповнюють та поглиблюють існуючі на сьогодні уявлення щодо фізико-хімічних та каталітичних властивостей протеолітичних ферментів з морських гідробіонтів Антарктичного регіону.

1. Показано присутність у загальному екстракті тканин гідробіонту білків з молекулярними масами від 35 до 200 кДа та ізоелектричними точками в інтервалах рН 3,5-4,0 і рН 5,5-5,9 і виявлено присутність ферментів, що виявляють желатиназну, колагеназну і фібриногенолітичну активності.

2. Встановлено, що близько 53% протеолітичної активності у загальному екстракті тканин гідробіонту обумовлено сериновими протеазами, серед яких до 95% активності опосередковується трипсиноподібною активністю. Близько 20% ферментативної активності належить металозалежним протеазам, а решта 27% активності може бути пов'язана із присутністю цистеїнових та аспартильних протеаз.

3. Одержано трипсиноподібний та фібриногенолітичний ферменти молекулярною масою 23 та 40 кДа, які є, відповідно, сериновою протеазою та металозалежною протеазою.

4. Виявлено, що трипсиноподібний та фібриногенолітичний ферменти, ефективно гідролізують синтетичні *p*-нітроанлідні субстрати, виявляючи вищу активність щодо субстратів, що містять у Р<sub>1</sub>-положенні залишок аргініну. Активність обох ферментів знижувалась при додаванні іонів Zn<sup>2+</sup> та Cu<sup>2+</sup>, незначно зростала при додаванні іонів Mg<sup>2+</sup>, іони Ca<sup>2+</sup> не впливали на активності обох досліджуваних ферментів.

5. Визначено основні кінетичні параметри ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$ ) реакції гідролізу синтетичних субстратів трипсиноподібним та фібриногенолітичним ферментом та показано, що каталітична ефективність гідролізу трипсиноподібним ферментом не змінювалася зі зниженням температури.

6. Встановлено, що рН оптимум трипсиноподібного та фібриногенолітичного ферментів знаходиться, відповідно, при рН 9,0 та 10,0, а температурний оптимум трипсиноподібного ферменту становить 24°С.

7. Встановлено, що фібриногенолітичний фермент мав виражену специфічність щодо А $\alpha$ -ланцюгів фібриногену, виявляв певну фібринолітичну активність, впливав на полімеризаційну здатність фібриногену, що супроводжувалося подовженням часу з'єднання плазми у хронометричних тестах та зростанням концентрації фібриногену, не здатного до полімеризації. Показано пригнічення процесу АДФ-залежної агрегації тромбоцитів за дії фібриногенолітичного ферменту.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Siddiqui, K. Somelike it hot, somelike it cold: temperature dependent biotechnological applications and improvements in extremophilic enzymes. *Biotechnology Advances*. 2015;33(8):1912–1922
2. Santiago M, Ramirez-Sarmiento C, Zamora R, Parra L. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(1):1408–1423
3. Fuchise T, Sekizaki H, Kishimura H, Klomklao S, Nalinanon S, Benjakul S, Chun B. Simple preparation of pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis. *Journal of Amino Acids*. 2014;8(1):1-8
4. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Використання електрофоретичних методів для експрес-аналізу білків морських гідробіонтів Антарктичного регіону. *Український Антарктичний Журнал*. 2014;1(13):192–197.
5. Гладун ДВ, Савчук АН, Гребиньк ДН, Короткий АГ, Остапченко ЛІ. Морские гидробиогты как альтернативный источник сырья для получения белковых молекул направленного действия. *Российский Биофармацевтический Журнал*. 2014;6(2):12–17.
6. Руденская ГН, Исаев ВА, Калебина ТС, Степанов ВМ, Мальцев КВ, Швец СВ, Лукьянова НА, Кислицын ЮА, Мирошников АИ. Выделение трипсина РС камчатского краба *Paralithodes camtschatica* и его свойства. *Биоорганическая химия*. 1998;24(2):112-118
7. Wu G, Zhang S, Zhang H, Zhang S, Liu Z. A novel esterase from a psychrotrophic bacterium *Psychrobacter celer* 3Pb1 showed cold-adaptation and salt-tolerance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013;98(1): 119-126
8. Georlette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Hoyoux A, Marx J, Sonan G, Feller G, Gerday C, Somelike it cold: biocatalysis at low temperatures *FEMS Microbiology Reviews*. 2004;28(1):25–42

9. Gianese G, Argos P, Pascarella S. Structural adaptation of enzymes to low temperatures *Protein Engineering*. 2001;14(3):141-148.
10. Schiaparellia S, Linseb K. A reassessment of the distribution of the common Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Deep-Sea Research*. 2006;53(8-10):912–920.
11. Rawlings N, Barrett A. Families of serine peptidases. *Methods in Enzymology*. 1994; 244: 19–61.
12. Mayer J, Rau B, Schoenberg M, Beger H,. Mechanism and role of trypsinogen activation in acute pancreatitis *Hepatogastroenterology*. 1999; 46(29):2757-2763.
13. Stroud R, Kay L, Dickerson R. The structure of bovine trypsin: Electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and at 2.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 1974;83(2):185-192.
14. Hu G, Leger R. A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteinases in fungi. *Journal of Evolutionary Biology* 2004; 17(6):1204–1214.
15. de Albuquerque C, Muhlia-Almazán A, Hernández-Cortés P, García-Carreño F. Proteinases from marine organisms. *Recent advances in marine biotechnology*. Science Publishers, Plymouth, 2001;209–238
16. Rypniewsky W, Perrakis A, Vorgias C, Wilson K. Evolutionary divergence and conservation of trypsin. *Protein Engineering*. 1994; 7(1):57–64.
17. Fodor K, Harmat V, Hetenyi C, Kardos J, Antal J, Perczel A, Patthy A, Katona G, Graf L. Extended intermolecular interactions in a serine proteinase–canonical inhibitor complex account for strong and highly specific inhibition. *Journal of Molecular Biology*. 2005; 350(1):156–169
18. Hehemann J, Redecke L, Perbandt M, Saborowski R, Betzel C. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a psychrophilic subtilisin-like protease *Apal* from Antarctic *Pseudoalteromonas* sp. strain AS-11. *Acta*

Crystallographica Section F: Structural Biology Crystallography Community. 2005;61(3):242–245.

19. Amino R, Tanaka A, Schenkman S. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2001;31(4-5):465–472
20. Sainz J, García-Carreño F, Sierra-Beltrán A, Hernández-Cortés P. Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*. 2004;24(2):266–273.
21. Pfeiderer G, Linke R, Reinhardt G. On the evolution of endopeptidases—VIII. cross-reactions of trypsins and chymotrypsins of different species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1970;33(4):955–967
22. Arnon R, Neurath H. An immunological approach to the study of evolution of trypsins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 1969;64(4):1623–1628
23. Neurath H. Evolution of proteolytic enzymes. *Science*. 1984;224(4647):350–357.
24. Ehrmann M, Clausen T. Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annual Review of Genetics* 2004;38:709–724
25. Carreira S, Fueri C, Chaix J, Puigserver A. Dietary modulation of the mRNA stability of trypsin isozymes and the two forms of secretory trypsin inhibitor in the rat pancreas. *European Journal of Biochemistry*. 1996;239(1):117–123
26. Lehane S, Assinder S, Lehane M. Cloning, sequencing temporal expression and tissue-specificity of two serine proteinases from the midgut of the blood-feeding XY *Stomoxys calcitrans*. *European Journal of Biochemistry* 1998;254(2):290–296
27. Sahin-Tóth M. Human cationic trypsinogen. Role of Asn-21 in zymogen activation and implications in hereditary pancreatitis. *Journal Biological Chemistry* 2000;275(30):22750–22755

28. Sahin-Toth M, Toth M. Gain of function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;278(2):286–289
29. Xiong B, Jacobs-Lorena M. The black fly *Simulium vittatum* trypsin gene: characterization of the 5'-upstream region and induction by the blood meal. *Experimental Parasitology*. 1995;81(3):363–370.
30. Гладун ДВ, Ракша НГ. Детергент-стійкі протеїнази антарктичного гребінця ADAMUSSIUM COLBECKI. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;20(1):62–65.
31. Kishimura H, Hayashi K. N-terminal amino acid sequence of trypsin from the pyloric ceca of starfish *Asterias amurensis*. *Fisheries Science*. 2003; 69(4):867–869
32. Lopes A, Juliano M, Marana S, Juliano L, Terra W. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2006; 36(2):130–140
33. Saborowski R, Sahling G, Navarrete del Toro M, Garcia-Carreño F. Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2004; 30(3):109–118.
34. Figueiredo M, Krickler J, Anderson A. Digestive enzyme activities in the alimentary tract of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology* 2001; 21(2):334–344
35. Zwilling R, Neurath H. Invertebrate proteinases. *Methods in Enzymology*. 1981; 80:633–664.
36. Diaz-Mendoza M, Ortego F, García de Lacoba M, Magaña C, de laPoza M, Farinós G, Castañera P, Hernández-Crespo P. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae),

- revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2005;35(9):1005–1020.
37. Casu R, Jarney J, Elvin C, Eisemann C. Isolation of a trypsin-like serine protease gene family from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Insect Molecular Biology*. 1994; 3(3):159–170.
  38. Wang K, Gan L, Lee I, Hood L. Isolation and characterization of the chicken trypsinogen gene family. *Biochemical Journal*. 1995; 307(2):471–479
  39. Zhu Y, Baker J. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) (Coleoptera: Bostrichidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1999; 29(12):1053–1063
  40. Bown D, Wilkinson H, Gatehouse J. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families.. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1997; 27(7):625–638.
  41. Noriega F, Barillas-Mury C, Wells M. Dietary control of trypsin gene transcription in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1994 24(6):627–631.
  42. Davis C, Riddell D, Higgins M, Holden J, White B. A gene family in *Drosophila melanogaster* coding for trypsin-like enzymes. *Nucleic Acids Research*. 1985; 13(18):6605–6619
  43. Shen Z, Jacobs-Lorena M. Nuclear factor recognition sites in the gut-specific enhancer region of an *Anopheles gambiae* trypsin gene. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28(12):1007–1012.
  44. Klein B, Sellos D, Van Wormhoudt A. Genomic organization and polymorphism of a Crustacean trypsin multi-gene family. *Gene*. 1998;216(1):123–129.
  45. Craik C, Choo Q, Swift G, Quinto C, MacDonald R, Rutter W. Structure of two related rat pancreatic trypsin genes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984;259(22):14255–14264

46. Sainz J, García-Carreño F, Hernández-Cortés P. *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2004;138(2):155–162.
47. Sainz J, García-Carreño F, Cordova-Murueta J, Cruz-Hernandez P. Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) isotrypsins: Their genotype and modulation *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2005;326(1):105–113.
48. Al-Mohanna S, Nott A, Lane D. Mitotic E- and Secretory F-Cells in the Hepatopancreas of the Shrimp *Penaeus Semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1985;65(4):901–910.
49. Lehnert S, Johnson S. Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 2002;133(2):63–171.
50. Al-Mohanna S, Nott J. Functional cytology of the hepato-pancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the molt cycle. *Marine Biology*. 1989;101(4):535–544
51. Icely J, Nott J (1992) Digestion and absorption: digestive system and associated organs. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. 1992;10:147–202.
52. Rungruangsak-Torrisen K, Carter C, Sundby A, Berg A, Houlihan D. Maintenance ration, protein synthesis capacity, plasma insulin and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isoenzymes. *Fish Physiology and Biochemistry* 1999;21(3):223–233.
53. Pils B, Shultz J. Inactive enzyme homologues find new function in regulatory processes. *Journal of Molecular Biology* 2004; 340(3):399-404.
54. Lhoste E, Fiszlewicz M, Gueugneau A, Tranchant T, Corring T. Early adaptation of pancreas to protein-enriched feed: role of cholecystokinin and gastrin-releasing peptide. *Pancreas* 1994;9(5):624-632.

55. Alarcón F, Martínez T, Barranco P, Cabello T, Díaz M, Moyano F. Digestive proteinases during development of larvae of redpalm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2002; 32(3):265-274.
56. Noriega F, Pennington J, Barrillas-Mury C, Wang X, Wells M. *Aedes aegypti* midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding. *Insect Molecular Biology*. 1996;5(1):25–29.
57. Le Moullac G, van Wormhoudt A. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquatic Nature*. 1994;7(3):203–210.
58. Sánchez-Paz A, García-Carreño F, Muhlia-Almazán A, Hernández-Saavedra N, Yepiz-Plascencia G. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2003;292(1):1–17.
59. Male R, Lorens J, Smalas A, Torrissen K. Molecular cloning and characterization of anionic and cationic variants of trypsin from Atlantic salmon. *European Journal of Biochemistry*. 1995;232(2):677–685.
60. Pasternak A, Ringe D, Hedstrom L. Comparison of anionic and cationic trypsinogens: the anionic activation domain is more flexible in solution and differs in its mode of BPTI binding in the crystal structure. *Protein Science*. 1999 8(1):253–258.
61. Ehrmann M, Clausen T. Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annual Review of Genetics*. 2004;38:709–724.
62. Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, Otlewski J. Canonical protein inhibitors of serine proteinases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003;60(11):2427-2444.
63. Boigegrain R, Matras H, Brehelin M, Coletti-Previero M. Invertebrate proteinase inhibitors. *Pure Applied Chemistry*. 1994;66(1):1–7.

64. Cherqui A, Cruz N, Simoes N. Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimna unipuncta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2001 31(8):761–769.
65. De Leo F, Bonadé-Bottino M, Ceci L, Gallerani R, Jouanin L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2001;31(6-7):593-602.
66. Teschke M, Saborowski R. Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of *Crangon crangon* and *Crangon allmani* (Decapoda: Caridea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2005;316:213–229.
67. Celis-Guerrero L, García-Carreño F, Navarrete del Toro M. Characterization of proteases in the digestive system of spiny lobster (*Panulirus interruptus*). *Marine Biotechnology*. 2004;6(3):262–269.
68. Navarrete del Toro M, García-Carreño F, Díaz L, Celis-Guerrero L, Saborowski R. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A*. 2006;305(8):645–654.
69. Collen D, Lijnen H. Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2004;2(4):541–546
70. Duffy M. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clinical Chemistry*. 2002;48(8):1194–1197.
71. Chen H, Guan A, Markland F. Immunological properties of the fibrinolytic enzyme (fibrolase) from southern copperhead (*Agkistrodon contortrix contortrix*) venom and its purification by immunoaffinity chromatography. *Toxicon*. 1991;29(6):683–694.
72. Collen D, Lijnen H. Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential? *Blood*. 1994;84(3):680–686.

73. Braud, S., Bon, C. Wisner, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 2000;82(9-10):851-859.
74. Segers, W, Ouyang, C. Snake venoms and blood coagulation. *Handbook of Experimental Pathology*. 1991;52:703-711.
75. Pirkle, H. and Markland, F.S., Jr., Ed., Haemostasis and Animal Venoms. *Journal of Applied Toxicology*. 1988;9(1):69-71.
76. Swenson, S, Markland, F. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon*. 2005;45(8):1021-1039.
77. Kini, R. Anticoagulant proteins from snake venoms: Structure, function and mechanism. *Biochemical Journal*. 2006;397(3):377-387.
78. Jiao H, Yang, L, Lu B. Shedaoenase, a novel fibrinogenase from the venom of *Agkistrodon shedaoentesis* Zhao. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005;37(12):835-842.
79. Samel M, Subban J, Siigur J, Siigur E. Biochemical characterization of fibrinogenolytic serine proteinases from *Vipera lebetina* snake venom. *Toxic on*, 2002;40(1):51-54.
80. Matsui T, Sakurai Y, Fujimura Y. Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. *European Journal of Biochemistry*, 1998;252(3):569-575.
81. Wisner A, Braud S, Bon C. Snake venom proteinases as tools in hemostasis studies: structure-function relationship of a plasminogen activator purified from *Trimeresurus stejnegeri* venom. *Haemostasis*, 2001;31(3-6):133-140.
82. Ashford A, Ross JW, Southgate P. Pharmacology and toxicology of a defibrinating substance from Malayan pit viper venom. *Lancet*. 1968 9;1(7541):486-489.
83. Ouyang C, Teng C. The Effects of the Purified Thrombin-Like and Anticoagulant Principles of *Agkistrodon Acutus* Venom on Blood Coagulation in Vivo. *Toxicon*. 1976;14(1):49-54.

84. Ouyang, C. The effects of Formosan snake venoms on blood coagulation in vitro. *Journal of the Formosan Medical Association*. 1957;56:435—448
85. Phillips L, Weiss H, Christy N. Effects of Puff Adder Venom on the Coagulation Mechanism. II. In Vitro. *Thrombosis Et Diathesis Haemorrhagica*. 1973;30(3): 499—508.
86. Forbes C, Turpie A, McNicol G, Douglas A. Studies on East African Snakes. *Scottish Medical Journal*. 1966;11(5):168—175.
87. Bell W, Pitney W, Goodwin J. Therapeutic defibrination in the treatment of thrombotic disease. *The Lancet*. 1968;291(7541):490—493
88. Sharp A, Warren B, Paxton A, Allington M. Anticoagulant therapy with a purified fraction of Malayan pit viper venom. *The Lancet*. 1968;1(7541):493—499.
89. Ouyang C, Teng C, Ching Y. - Physicochemical properties of  $\alpha$ - and  $\beta$ -fibrinogenases of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom - *Biochimica et Biophysica Acta*. 1977;481(2):622-630.
90. Xu L, Jiang W, Ma T. - Expression, purification and molecular modeling of recombinant fibrinogenase [IV], a metalloproteinase from *Deinakistrodon acutus* venom – *Toxicon*. 2006; 47(2):241–248.
91. Lee J, Seu J, Rhee I, Jin I, Kawamura Y, Park W. - Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffii* brevicaudus - *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999;260(3):665-670.
92. Jiao H, Yang L, Lu B. Shedaoenase, a novel fibrinogenase from the venom of *Agkistrodon shedaoensis* Zhao. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005;37(12):835-842.
93. He J, Chen S, Gu J.- Identification and characterization of Harobin, a novel fibrino(geno)lytic serine protease from a sea snake (*Lapemis hardwickii*). *FEBS Letters*. 2007;581(16):2965–2973.

94. Swadesh J, Huang I, Budzynski A. - Purification and characterization of hementin, a fibrinogenolytic protease from the leech *Haementeria ghilianii* - Journal of Chromatography A. 1990;502(2):359-369.
95. Toshiaki N, Yoshiyuki O, Youichi H. - Isolation and characterization of fibrinogenase from candida albicans NH-1 - International Journal of Biochemistry. 1993;25(12):1815-1822.
96. Pinto A, Dobrovolski R, Veiga A, Guimarães J. - Lonofibrase, a novel a-fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars - Thrombosis Research. 2004; 113(2):147 – 154.
97. Kashefi K, Lovley D. Extending the upper temperature limit for life. Science. 2003;301(5635):934.
98. Margesin R, Schinner F. Cold-Adapted Organisms—Ecology, Physiology, Enzymology and Molecular Biology. Berlin: Springer-Verlag. 416.
99. Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. Nature Reviews Microbiology. 2003;1(3):200–208.
100. Somero G. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic “strategies”. Comparative Biochemistry and Physiology. 2004;139:321–333.
101. Pandey C. In Enzyme Technology. 1st ed. New York, NY. Springer Science; 2004;615–638.
102. Sheridan P, Panasik N, Coombs J, Brenchley J. Approaches for deciphering the structural basis of low temperature enzyme activity Biochimica et Biophysica Acta. 2000;1543(2):417–33.
103. Wainwright M, Wickramasinghe N, Narlikar J, Rajaratnam P. Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km. FEMS Microbiology Letters. 2003;218(1):161–165.
104. Smalas A, Leiros H, Willassen Os V., Cold adapted enzymes. Biotechnology Annual Review. 2000;6:1–57.

105. D'Amico S, Claverie P, Collins T, Georlette D, Gratia E. Molecular basis of cold adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2002;357(1423): 917–925.
106. Georlette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, et al. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiological Reviews*. 2004;28(1):25-42.
107. Feller G, d'Amico D, Gerday C. Thermodynamic stability of a cold-active alpha-amylase from the Antarctic bacterium *Alteromonas haloplanctis*. *Biochemistry*. 1999;38(14):4613–4619.
108. D'Amico S, Marx J, Gerday C, Feller G. Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(10):7891-7896
109. Rainey F, Oren A. 2006. In *Extremophiles-Methods in Microbiology*. London. Elsevier-Acad. 2006;395–436.
110. Lonhienne T, Zoidakis J, Vorgias C, Feller G, Gerday C, Bouriotis V. Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *Journal of Molecular Biology*. 2001;310:291–297.
111. Xu Y, Feller G, Gerday C, Glansdorff N. Moritella Cold-Active Dihydrofolate Reductase: Are There Natural Limits to Optimization of Catalytic Efficiency at Low Temperature? *Journal of Bacteriology*. 2003;185(18):5519–5526.
112. Xu Y, Feller G, Gerday C, Glansdorff N. Metabolic enzymes from psychrophilic bacteria: challenge of adaptation to low temperatures in ornithine carbamoyltransferase from *Moritella abyssi*. *Journal of Bacteriology*. 185(7):2161-8.
113. Bentahir M, Feller G, Aittaleb M, Lamotte-Brasseur J, Himri T, et al. Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the antarctic *Pseudomonas* sp. TACII18. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(15):11147–53.

114. Collins T, Meuwis M, Stals I, Claeysens M, Feller G, et al. A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(38):35133–35139.
115. Collins T, Meuwis M, Gerday C, Feller G. Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. *Journal of Molecular Biology*. 2003;328(2):419–28.
116. Georlette D, Damien B, Blaise V, Depiereux E, Uversky V, et al. Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(39):37015–23.
117. Hoyoux A, Jennes I, Dubois P, Genicot S, Dubail F, et al. Cold-adapted beta-galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. 2001. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(4):1529–35.
118. Thomas T, Kumar N, Cavicchioli R. Effects of ribosomes and intracellular solutes on activities and stabilities of elongation factor 2 proteins from psychrotolerant and thermophilic methanogens. *Journal of Bacteriology*. 2001;183(6):1974–82
119. D'Amico S, Gerday C, Feller G. Structural determinants of cold adaptation and stability in a large protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:25791–25796.
120. Feller G, Payan F, Theys F, Qian M, Haser R, Gerday C. Stability and structural analysis of alpha-amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *European Journal of Biochemistry*. 1994;222(2):441–47.
121. Siddiqui K, Feller G, D'Amico S, Gerday C, Giaquinto L, Cavicchioli R. The active site is the least stable structure in the unfolding pathway of a multidomain cold-adapted  $\alpha$ -amylase. *Journal of Bacteriology*. 2005;187(17):6197 - 6205.

122. Siddiqui K, Poljak A, Guilhaus M, Feller G, D'Amico S, et al. Role of disulfide bridges in the activity and stability of a cold-active  $\alpha$ -amylase. *Journal of Bacteriology*. 2005;187(17):6206–6212.
123. Privalov P. In *Protein Folding*, ed. TE Creighton. New York: Freeman. 1992;83–126.
124. Fields P, Somero G. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A4 orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 1998;95(19):11476–11481.
125. Feller G. Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003;60(4):648–662.
126. Zecchinon L, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Delille D, et al. Did psychrophilic enzymes really win the challenge? *Extremophiles*. 2001;5(5):313–321
127. Miyazaki K, Wintrode P, Grayling R, Rubingh D, Arnold F. Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. 2000. *Journal of Molecular Biology*. 2000;297(4):1015–1026.
128. Marshall C. Cold-adapted enzymes. *Trends in Biotechnology*. 1997;15(9):359–364.
129. Lonhienne T, Gerday C, Feller G. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000;1543(1):1–10
130. Crawford DL, Powers DA. Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation. *Molecular Biology and Evolution*. 1992;9(5):806–813.
131. Goodchild A, Raftery M, Saunders N, Guilhaus M, Cavicchioli R. Biology of the cold adapted archaeon, *Methanococcus burtonii* determined by proteomics using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*. 2004;3(6):1164–1176.

132. Somero G. Proteins and temperature. *Annual Review of Physiology*. 1995; 57:43–68
133. Russell R, Gerike U, Danson M, Hough D, Taylor G. Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. *Structure*. 1998;6(3):351–361.
134. Aghajari N, van Petegem F, Villeret V, Chessa J, Gerday C, Haser R, Van Beeumen J. Crystal structures of a psychrophilic metalloprotease reveal new insights into catalysis by cold-adapted proteases. *Proteins*. 2003;50(4):636–647.
135. Kim S, Hwang K, Kim S, Sung H, Han Y, Cho Y. Structural basis for cold adaptation. Sequence, biochemical properties, and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(17):11761–11767.
136. Leiros I, Moe E, Lanes O, Smalas A, Willassen N. The structure of uracil-DNA glycosylase from Atlantic cod (*Gadus morhua*) reveals cold-adaptation features. *Acta Crystallographica. D Biological Crystallography*. 2003;59(8), 1357–1365.
137. Smalas, A.O.; Leiros, H.K.; Os, V.; Willassen, N.P. Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2000, 6, 1–57.
138. Gorfe A, Brandsdal B, Leiros H, Helland R, Smalas A. Electrostatics of mesophilic and psychrophilic trypsin isoenzymes: Qualitative evaluation of electrostatic differences at the substrate binding site. *Proteins*. 2000;40(2):207–217.
139. Brandsdal B, Smalas A, Aqvist J. Electrostatic effects play a central role in cold adaptation of trypsin. *FEBS Letters*. 2001;499(1-2):171–175.
140. D'Amico S, Claverie P, Collins T, Georlette D, Gratia E, Hoyoux A, Meuwis M, Feller G, Gerday C. Molecular basis of cold adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 2002;357(1423):917–925.

141. Sotelo-Mundo R, López-Zavala A, Garcia-Orozco K, Arvizu-Flores A, Velázquez-Contreras E, Valenzuela-Soto E, Rojo-Dominguez A, Kanost M. The lysozyme from insect (*Manduca sexta*) is a cold-adapted enzyme. *Protein & Peptide Letters* 2007;14(8):774–778.
142. Øverbø K, Myrnes B. Deoxyribonuclease II from the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): isolation and partial characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2006;143(3):315–318.
143. Salomon M, Buchholz F. Effects of temperature on the respiration rates and the kinetics of citrate synthase in two species of *Idotea* (Isopoda, Crustacea). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2000;125(1):71–81.
144. De Backer M, McSweeney S, Rasmussen H, Riise B, Lindley P, Hough E. The 1.9 Å crystal structure of heat-labile shrimp alkaline phosphatase. *Journal of Molecular Biology*. 2002;318(5):1265–1274.
145. Myrnes B, Nilsen I. Glutathione S-transferase from the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): Isolation and partial characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2007;144(4):403–407.
146. Feller G, Lonhienne T, Deroanne C, Libioulle C, Van Beeumen J, Gerday Ch. Purification, characterization, and nucleotide sequence of the thermolabile alpha-amylase from the antarctic psychrotroph *Alteromonas haloplanctis* A23. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(8):5217-5221.
147. Feller G, Payan F, Theys F, Qian M, Haser R, Gerday Ch. Stability and structural analysis of  $\alpha$ -amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *European Journal of Biochemistry*. 1994;222(2):441-447.
148. Qian M, Haser R, Payan F. Structure and molecular model refinement of pig pancreatic  $\alpha$ -amylase at 2.1 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 1993;231(3):785-791.
149. Davail S, Feller G, Narinx E, Gerday Ch. Cold adaptation of proteins. Purification, characterization and sequence of the heat-labile subtilisin from the

- antarctic psychrophile *Bacillus* TA41. *Journal Biological Chemistry*. 1994; 269(26):17448-17453.
150. Gron H, Meldal M, Breddam K. Extensive comparison of the substrate preferences of two subtilisins as determined with peptide substrates which are based on the principle of intramolecular quenching. *Journal of Biochemistry*. 1992;31(26):6011-6018.
151. Narinx, E. Adaptations moléculaires des enzymes aux basses températures: application aux subtilisines de bactéries antarctiques. Ph.D. Thesis. 1994.
152. Feller G, Thiry M, Arpigny J, Gerday Ch. (1991) Cloning and expression in *E. coli* of three lipase-encoding genes from the psychrophilic antarctic strain *Moraxella* TAI44. *Gene*. Feller G, Thiry M, Arpigny JL, Gerday C. 1991. Cloning and expression in *Escherichia coli* of three lipase-encoding genes from the psychrotrophic Antarctic strain *Moraxella* TA144. *Gene*. 1991;102, 111-115.
153. Feller G, Thiry M, Gerday Ch. Nucleotide sequence of the lipase gene *lip2* from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TAI44 and site specific mutagenesis of the conserved serine and histidine residues. *DNA Cell Biol*. 1991;10(5):381-388.
154. Arpigny J, Feller G, Gerday Ch. Cloning sequence and structural features of a lipase from the antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993;1171(3):331-333.
155. Arpigny J, Feller G, Gerday Ch. Corrigendum to Cloning, sequence and structural features of a lipase from the Antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995;1263(1):103.
156. Arpigny J, Feller G, Davail S, Genicot, S, Narinx, E, Zekhnini Z, Gerday Ch. Molecular adaptations of enzymes from thermophilic and psychrophilic organisms. In: *Comparative Environmental Physiology*. Ed. Gilles R. Berlin. Springer-Verlag. 1994;20:269-295.

157. Leiros H, Willassen N, Smalås A. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. Elucidating the molecular basis of cold-adaptation. *European Journal of Biochemistry*. 2000;267(4):1039–1049.
158. Smalås A, Heimstad E, Hordvik A, Willassen N, Male R. Cold adaptation of enzymes: structural comparison between salmon and bovine trypsins. *Proteins*. 1994;20(2):149–166.
159. Kristjánsdóttir S, Gudmundsdóttir A. Propeptide dependent activation of the Antarctic krill euphausease precursor produced in yeast. *European Journal of Biochemistry*. 2000;267(9):2632–2639.
160. Kristjánsdóttir K. Isolation and characterization of a broad specificity collagenolytic protease from Antarctic krill. M.Sc thesis, Department of Chemistry. University of Iceland. Reykjavik. 1999.
161. Turkiewicz M, Galas E, Kalinowska H. Collagenolytic serine protease from *Euphausia superba* Dana (Antarctic krill). *Comparative Biochemistry and Physiology* 1991; 99B(2):359–371.
162. Gudmundsdóttir A. Cold-adapted and mesophilic brachyurins. *Biological Chemistry*. 2002;383(7-8):1125–1131.
163. Гладун ДВ, Савчук АН, Остапченко ЛІ. Методологічні підходи к получению фракции трипсиноподобных ферментов из морских гидробионтов (на примере Антарктического криля). *Український Антарктичний Журнал*. 2013;1(12):294–299.
164. Kobori H, Sullivan C, Shizuya H. Heat-labile alkaline phosphatase from Antarctic bacteria: Rapid 5' end labelling of nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 1984, 81(21), 6691–6695
165. Rina M, Pozidis C, Mavromatis K, Tzanodaskalaki M, Kokkinidis M, Bouriotis V. Alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5. Properties and psychrophilic adaptations. *European Journal of Biochemistry*. 2000;267(4):1230–1238.

166. Wang E, Koutsioulis D, Leiros H, Andersen O, Bouriotis V, Hough E, Heikinheimo P. Crystal structure of alkaline phosphatase from the Antarctic bacterium TAB5. *Journal of Molecular Biology*. 2007;366(4):1318–1331.
167. Koutsioulis D, Wang E, Tzanodaskalaki M, Nikiforaki D, Deli A, Feller G, Heikinheimo P, Bouriotis V. Directed evolution on the cold adapted properties of TAB5 alkaline phosphatase. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2008;21(5):319–327.
168. Babu J, Ramteke P, Thomas G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*. 2008;26(5):457–470.
169. Lohan D, Johnston S. UNU-IAS Report:Bioprospecting in Antarctica. 2005.
170. Collins T, Meuwis M, Gerday C, Feller G. Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. *Journal of Molecular Biology*. 2003;328(2):419–428.
171. Collins T, Meuwis M, Stals I, Claeysens M, Feller G, Gerday C. A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(38):35133–35139.
172. Van Petegem, F.; Collins, T.; Meuwis, M.A.; Gerday, C.; Feller, G.; Van Beeumen, J. The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 Å resolution. Structural adaptations to cold and investigation of the active site. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(9):7531–7539.
173. Collins T, de Vos D, Hoyoux A, Savvides S, Gerday C, Van Beeumen J, Feller G. Study of the active site residues of a glycoside hydrolase family 8 xylanase. *Journal of Molecular Biology*. 2005;354(2):425–435.
174. De Vos, D, Collins T, Nerinckx W, Savvides S, Claeysens M, Gerday C, Feller G, Van Beeumen J. Oligosaccharide binding in family 8 glycosidases: Crystal structures of active-site mutants of the beta-1,4-xylanase pXyl from *Pseudoaltermonas haloplanktis* TAH3a in complex with substrate and product. *Journal of Biochemistry*. 2006;45:4797–4807.

175. Collins T, Hoyoux A, Dutron A, Georis J, Genot B, Dauvrin T, Arnaut F, Gerday C, Feller G. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. *Journal of Cereal Science*. 2006;43(1):79–84.
176. Hoyoux, A.; Jennes, I.; Dubois, P.; Genicot, S.; Dubail, F.; Francois, J.M.; Baise, E.; Feller, G.; Gerday, C. Cold-adapted beta-galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 1529–1535.
177. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(1):680-685.
178. Ostapchenko L, Savchuk O, Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of hemostasis system // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 2, № 1. – P. 20-26.
179. 2-D Electrophoresis Principles and Methods Amersham Biosciences UK Limited Amersham Place Little Chalfont. 2004;168
180. Affinity Chromatography. Principles and Methods. Amersham Pharmacia Biotech AB. 2011;156.
181. Варецька ТВ. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген. *Український біохімічний журнал*. 1960;32(2):13 – 24.
182. Costa J, Petric C, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo M, Oliveira C, Soares A, Oliveira F. Purification and functional characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2007;13(3):640-654.
183. Козлов АА, Берковский АЛ, Качалова НД. Пособие для врачей-лаборантов. Работа с отечественными коагулометрами и реагентами НПО «Ренам». 2013;44.
184. Токар А.В. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньовенного мікрозсідання крові (методичні рекомендації) / А.В. Токар, Э.М. Макогоненко, Т.М. Платонова – К.: Макком, 1994. – 22 с.

185. Munilla-Moran R, Stark J. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus(L.)*. Aquaculture.1989; 8:315–327.
186. Xavier L, Almeida Oliveira M, Guedes R, Santos A, De Simone S. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera:Noctuidae)*. European Journal of Entomology. 2005;102:147–153.
187. Garcia-Carreno F. Proteinase inhibitors. Trends in Food Science & Technology. 1996;7:197–203.
188. Castillo-Yáñez F, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño F, Navarrete-Del Toro Mde L. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 2005;140:91–98
189. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / Bradford M. M. // Analytical Biochemistry. – 1976. – V. 86. – P. 193–200.
190. Gladun D, Raksha N, Savchuk O, Ostapchenko L. Methodological approach to the isolation of functionally active proteins from the tissues of marine hydrobionts: an example of *Adamussium colbecki*. Advances in Polar Science. 2015;26(4):299–304.
191. Torrissen K. Characterization of proteases in the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry . 1984;77(B):669 - 674.
192. Asgeirsson B, Fox J, Bjarnason J. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. European Journal of Biochemistry. 1989;180(1):85-94.
193. Климова ОА, Чеботарев ВЮ. Препараты коллагенолитических протеаз беспозвоночных: биохимические аспекты медицинского и

- косметологического применения. Бюллетень эксперим. биологии и медицины. 2000;130(7):70–75.
194. Gladun D, Raksha N, , Savchuk O, Ostapchenko L. Collagenolytic activity in tissue extract of *Parborlasia corrugatus* from Antarctic region. *Biomedical Research and Therapy*. 2015;9(2):354–358.
195. Гладун ДВ, Вовк ТБ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Підбір оптимальних умов для хроматографічного тестування екстрактів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону. Український Антарктичний Журнал. 2015;1(14):168–174.
196. Wu Z, Jiang G. Purification and characterization of trypsin-like enzymes from *Neomysis japonica* using BApNA as substrate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2007;14(2):75–80.
197. Asgeirsson B, Fox J, Bjarnason J. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *European Journal of Biochemistry*. 1989; 180:85-94.
198. Kishimura H, Hayashi K. Isolation and characteristics of trypsin from pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2002;132(B):485-490.
199. Pancer Z, Leuck J, Rinkevich B, Steffen R, Muller I, Muiier W. E. G, Molecular cloning and sequence analysis of two cDNA coding for putative anionictrypsinogen from the colonial urochordate *Botryllus schlosseri* (Asciacea). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1996;5(4): 326-333.
200. Bello C, Hermogenes A, Magalhaes A, Veiga S, Gremski L, Richardson M, Sanchez E. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie*. 2006;88:189–200.

201. Kimoto K, Kusama S, Murakami K, Purification and characterization of serine proteinases from *Euphausia superba*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1983;47:529-534.
202. Sainz J, García-Carreño F, Hernández-Cortés P. *Penaeus vannamei* isotrypsins: Purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 2004;138:155–162.
203. Di Cera F. Serine Proteases. *IUBMB Life*. 2009; 61:510–515.
204. Eisen A, Henderson K, Jeffrey J, Bradshaw R, A collagenolytic protease from the hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator*. Purification and properties. *Biochemistry*. 1973;12:1814-1822.
205. Diaz-Mendoza M, Ortego F, Garcia de Lacoba M, Magana C, de la Poza M, Farinos G, Castañera P, Hernández-Crespo P. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2005;35:1005–1020.
206. Perera E, Rodriguez-Casariago J, Rodriguez-Viera L, Calero J, Perdomo-Morales R, Mancera J. Lobster (*Panulirus argus*) hepatopancreatic trypsin isoforms and their digestion efficiency. *The Biological Bulletin*. 2012; 222:158–70.
207. Silvestre M, Morais H, Silva V. Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2013;38(3):278-290.
208. Asgeirsson B, Cekan P, Microscopic rate-constants for substrate binding and acylation in cold-adaptation of trypsin I from Atlantic cod. *FEBS Letters*. 2006;580:4639–4644.
209. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*. 2002; 102(12):4501-24.

210. Михайлова АГ, Лихарева ВВ, Хайруллин РФ, Лубенец НЛ, Румш ЛД, Демидюк ИВ, Костров СВ. Новая психрофильная трипсиноподобная протеиназа из *Serratia proteamaculans*. Биохимия. 2006;71:563-570.
211. Bakermans C, Tollaksen S, Giometti C, Wilkerson C, Tiedje J, Thomashow M. Proteomic analysis of *Psychrobacter cryohalolentis* K5T during growth at subzero temperatures // *Extremophiles*. 2007;11:343-354.
212. Kimoio K, Kusama S, Murakami K. Purification and Characterization of Serine Proteinases from *Euphausia superba*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1983;47(3):529-534.
213. DeMaayer P, Anderson D, Cary C, Cowan D. Somelike it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports*. 2014;15(5):508-17
214. Leiros H, Willassen N, Smalas A. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. Elucidating the molecular basis of cold-adaptation European. *Journal of Biochemistry*. 2000;267:1039-1049.
215. Genicot S, Feller G, Gerday C. Trypsin from antarctic fish (*Papanotothenia magellanica* forster) as compared with trout (*Salmo gairdneri* ) trypsin. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1988;90:601-609.
216. Osnes K, Mohr V. On the purification and characterization of three anionic, serine-type peptide hydrolases from Antarctic krill, *Euphausia superba*, *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1985;82(B):607–619.
217. Гулевский А. К., Рязанцев В. В., Грищенкова Е. А., Релина Л. И. Изменения в спектре белков личинок большого мучного хрущака (*Tenebrio molitor*) в период холодной акклимации // проблемі криобиологии. – 1995. - №4. – С. 29-32
218. Ciardiello M.A., Camardella L., Carratore V. et al. L-glutamate dehydrogenase from the antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. Primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation. *Biochym Biophys Acta* 2000; 1543(1): 11-23.

219. Chakravarty S., Varadarajan R., Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: a structural genomics based study. 2002; 42(25): 8152-8161
220. Coquelle N., Fioravanti E., Weik M. et al. Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments. J Mol Biol 2007; 374(2): 547-562.
221. Green N, Neurath H. The effects of divalent cations on trypsin. Journal of Biological Chemistry. 1953;204(1):379-90.
222. Bode W, Schwager P. The refined crystal structure of bovine betatrypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. Journal of Molecular Biology. 1975;98:693–717.
223. Xavier L, Almeida Oliveira M, Guedes R, Santos A, De Simone S.. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). European Journal of Entomology. 2005;102:147–153.
224. Balti R, Barkia A, Bougatef A, Ktari N, Nasri M. A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterization. Food Chemistry. 2009;113:146–154.
225. Guizani N, Marshall M, Wei C. Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the hepatopancreas of crayfish (*Procambarus clarkii*) Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. 1992;103(4):809-815.
226. El Hadj Ali N, Hmidet N, Bougatef A, Nasri R, Nasri M. A Laundry Detergent-Stable Alkaline Trypsin from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: Purification and Characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009;57:10943–10950.

227. Crawford D, Powers D. Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation. *Molecular Biology and Evolution*. 1992;9:806–813.
228. Hochachka P, Somero G. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, New Jersey. 1984;355-449
229. Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1997;53:830–841.
230. Lonhienne T, Gerday C, Feller, G. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochimica et Biophysica Acta* 200;1543:1–10.
231. Kristjansson M, Sgeirsson A, Bjarnason J. Serine proteinases from cold-adapted organisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1997; 415:27-46.
232. Bentahir M, Feller G, Aittaleb M, Lamotte-Brasseur J, Himri T, Chessa J, Gerday C. Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the Antarctic *Pseudomonas* sp. TACII18 *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275:11147–11153.
233. Lonhienne T, Zoidakis J, Vorgias C, Feller G, Gerday C, Bouriotis V. (2001) Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *Journal of Molecular Biology* 2001;310:291–297.
234. Паписова АИ, Кислицын ЮА, Семенова СА, Руденская ГН. Кинетические параметры гидролиза пептидных и белковых субстратов протеиназами камчатского краба при различных температурах. VI Международный симпозиум “Химия протеолитических ферментов”, сборник тезисов. 2007;102.
235. Peng Y, Huang Q, Zhang R, Zhang Z, Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened

- from Douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 2003;134:45–52.
236. Rajapakse N, Jung W, Mendis E. et al. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIIa and platelet aggregation. *Life Science*. 2005;76(22):2607-2619.
237. Jo H, Jung W, Kim S. Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, *Urechis unicinctus*. *Process Biochemistry* 2008;43:179–184.
238. Juang W, Kim S. Isolation and characterisation of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Food chemistry*. 2009;117(4):687-692.
239. Jung W, Je J, Kim H, Kim S. A novel anticoagulant protein from *Scapharca broughtonii*. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2002;35(2):199-205.
240. Konovalova V, Guzikevich K, Burban A. et al. Enhanced starch hydrolysis using  $\alpha$ -amylase immobilized on cellulose ultrafiltration affinity membrane. *Carbohydrate Polymers*. 2016;152:710-742.
241. Su C, Teng T, Wong Y, Et al. Catalytic thermolysis in treating Cibacron Blue in aqueous solution: Kinetics and degradation pathway. *Chemosphere*. 2016;146:503-510.
242. Skopes R. Dye-ligands and multifunctional adsorbents; An empirical approach to affinity chromatography. Review. *Analytical Biochemistry*. 1987;165(2):235-246.
243. Atkinson T, Hammond P, Hartwell R, et al. Triazine-dye affinity chromatography. *Biochemical Society Transactions*. 1981;9:290-293.
244. Соловьев ДА, Угарова ТП. Выделение и характеристика  $\alpha$ -специфичных тромбиноподобных ферментов из ядов Щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*) и Щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys blomhoffii*). *Биохимия*. 1993;58(8):33-39.

245. Баркаган З.С. Введение в клиническую гемостазиологию. Барнаул. 1998; 43.
246. Fuss C, Palmar J, Sprague E. Fibrinogen: structure, function, and surface interaction. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2001;12(6): 677-682.
247. Blomback B. Fibrinogen and fibrin - proteins with complex roles in haemostasis and thrombosis. *Thrombosis Research*. 1996;83(1):1-75.
248. Doolittle R. Fibrinogen and fibrin. *Annual Review of Biochemistry*. 1984; 53:195-229.
249. Karbovs'kyi VL, Savchuk OM, Volkov HL. Characterization of platelets aggregation inhibitor from *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* snake venom. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2006;78(3):130-135.
250. Karbovs'kyi VL, Savchuk OM, Volkov HL. Effect of proteins from the *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* snake venom on platelets in the hemostasis system. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2007;79(4):82-89.
251. Girón M, Rodríguez-Acosta A, Salazar A, Sánchez E, Galán J, Ibarra C, Guerrero B. Isolation and characterization of two new non-hemorrhagic metalloproteinases with fibrinogenolytic activity from the mapanare (*Bothrops colombiensis*) venom. *Archives of Toxicology*. 2013;87:197.
252. Costa J, Petri C, Hamaguchi A. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases Dis*. 2007;13(3):640-654.
253. Liang X, Zhou Y, Chen J, Qiu P, Chen H, Sun H, Wu Y, Yan G. Enzymological characterization of FII(a), a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005;26:1474–1478.
254. Serrano S, Sampaio C, Mandelbaum F. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom-II. Isolation of the metalloproteinase MPB.

- Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP 1 and MSP 2. *Toxicon* 1993;31:483–492.
255. Gladun D, Raksha N, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. New fibrinogenases isolated from marine hydrobiont *Adamussium colbecki*. *Journal of Biochemistry International*. 2016;3(1):9-18.
256. Riedel T, Suttner J, Brynda E. et al. Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. *Blood*. 2011;117(5):1700-1706.
257. Tu A, Baker B, Wongvibulsin S, Willis T. Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme. *Toxicon* 1996;34:1295-1300.
258. Randolph A, Chamberlain S, Chu H, Retzios A, Markland F. Jr, Masiarz F. Amino acid sequence of fibrolase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *Protein Science*. 1992;1:590-600.
259. Aaspõllu A, Siigur J, Siigur E. cDNA cloning of a novel P-I lebetase isoform Le-4. *Toxicon*. 2005;46:591-594.
260. Baramova E, Shannon J, Bjarnason J, Fox J. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1989;275:63–71.
261. Fox J, Serrano S, Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS Journal*. 2008;275:3016–3030.
262. Clissa P, Lopes-Ferreira M, Della-Casa M, Farsky S, Moura-da-Silva A. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. *Toxicon*. 2006;47:591–596.
263. Retzios A, Markland F, Jr. A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*: effects on various components of the human blood coagulation and fibrinolysis systems. *Thrombosis Research*. 1988;52(6):541-552.

264. Ouyang C, Hwang L, Huang T.  $\alpha$ -Fibrinogenase from *Agkistrodon rhodostoma* (Malayan pit viper) snake venom Toxicon. 1983;21(1):25-33.
265. Bennett J. Platelet-fibrinogen interactions. Annals of the New York Academy of Sciences. 2001;936:340-354.
266. Ikeda Y, Handa M, Kawano K et al. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. The Journal of Clinical Investigation. 1991;87(4):1234–1240.
267. Marguerie G, Thomas-Maison N, Ginsberg M. The platelet-fibrinogen interaction evidence for proximity of the Aa chain of fibrinogen to platelet membrane glycoproteins IIb/III. European Journal of Biochemistry. 1984;39:5 – 11.
268. Sánchez-Cortés J, Mrksich M. The Platelet Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Binds to the RGD and AGD Motifs in Fibrinogen. Chemical Biology. 2009;16(9):990–1000.
269. Jois S, Tambunan U, Chakrabarti S. Solution structure of a cyclic RGD peptide that inhibits platelet aggregation. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. 1996;(1):1-11.
270. Reiss S, Sieber M, Oberle V. Inhibition of platelet aggregation by grafting RGD and KGD sequences on the structural scaffold of small disulfide-rich proteins. Platelets. 2006;17(3):153-7.
271. Kołodziejczyk J. The role of fibrinogen, fibrin and fibrin(ogen) degradation products (FDPs) in tumor progression. Contemporary Oncology. 2013;17(2):113–119.
272. Cominetti M, Terruggi C, Ramos, O. et al. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. Journal of Biological Chemistry. 2004;279:18247–18255.
273. Huang T, Holt J, Lukasiewicz H, Niewiarowski S. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors

- expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex, *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262: 16157–16163.
274. Calvete J, Marcinkiewicz C, Monleon D, Esteve V, Celda B, Juarez P, Sanz L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function, *Toxicon*. 2005; 45:1063–1074.
275. Huang T, Holt J, Lukasiewicz H, et al. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex / *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262:16157–16163.
276. Savage B, Marzec U, Chao B, et al. Binding of the snake venom-derived proteins applaggin and echistatin to the arginine-glycine-aspartic acid recognition site(s) on platelet glycoprotein IIb. IIIa complex inhibits receptor function. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265:11766–11772.
277. Albers G, Amarenco P, Easton J, et al. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke. *Chest*. 2001;119:300 – 320.
278. Camacho E, Sanz L, Escalante T, et al. Novel Catalytically-Inactive PII Metalloproteinases from a Viperid Snake Venom with Substitutions in the Canonical Zinc-Binding Motif. *Toxins (Basel)*. 2016;8(10):292.
279. Camacho E, Villalobosa E, Sanz L, et al. Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: Characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of. *Biochimie*. 2014;101:145–155.
280. Paes Leme A, Escalante T, Pereira J, Oliveira A, Sanchez E, Gutierrez J, Serrano S, Fox J. High resolution analysis of snake venom metalloproteinase (SVMP) peptide bond cleavage specificity using proteome based peptide libraries and mass spectrometry. *Journal of Proteomics*. 2011;74(4):401-10.
281. Iwanaga S, Takeya H, Structure and function of snake venom metalloproteinase family, in: *Methods in Protein Sequence Analysis*, Plenum Press, New York, 1993;107–115.

282. Lingott T, Schleberger C, Gutierrez J, Merfort I. High-resolution crystal structure of the snake venom metalloproteinase BaP1 complexed with a peptidomimetic: insight into inhibitor binding, *Biochemistry*. 2009;48:6166–6174.
283. Rau J, Beaulieu L, Huntington J, Church F. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007;1:102-115.
284. Baramova E, Shannon J, Bjarnason J, Gonias S, Fox J. Interaction of hemorrhagic metalloproteinases with human alpha 2-macroglobulin. *Biochemistry* 1990;29:1069-1074.
285. Arakawa H, Nishigai M, Ikai A. Alpha 2-macroglobulin traps a proteinase in the midregion of its arms. An immunoelectron microscopic study. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264:2350-2356.
286. Chinnasamy S, Mani N, Muthusamy K. Zn<sup>2+</sup> ion of the snake venom metalloproteinase (SVMP) plays a critical role in ligand binding: A molecular dynamics simulation study. *Royal Society of Chemistry Advances*. 2016;5(86):70566-70576.
287. Sun M, Liu S, Frederick T. Greenaway. Characterization of a fibrinolytic enzyme (ussurenase) from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom: Insights into the effects of Ca<sup>2+</sup> on function and structure. *Biochimica and Biophysica Acta*. 2006;64(8):1340-8.
288. Swenson S, Markland F, Jr. Fibrolase. *Toxin Reviews*. 2006;25:347–374.
289. Peichoto M, Teibler P, Mackessy S. Purification and characterization of patagonfibrase, a metalloproteinase showing alpha-fibrinogenolytic and hemorrhagic activities, from *Philodryas patagoniensis* snake venom. *Biochimica Biophysica Acta*. 2007;70(5):810-819
290. Zhu Z, Gongc W, Zhu X, Teng M, Niu L. Purification, characterization and conformational analysis of a haemorrhagin from the venom of *Agkistrodon acutus*. *Toxicon*. 1997;35:283–292.

291. Jin Y, Lu Q, Wang W. et al, Actions of two serine proteases from *Trimeresurus jerdonii* venom on chromogenic substrates and fibrinogen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 2002;132:529–534.
292. Gao R, Zhang Y, Meng Q. et al. Characterization of three fibrinogenolytic enzymes from Chinese green tree viper (*Trimeresurus stejnegeri*) venom. *Toxicon*. 1998;36(3):457-467.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

За темою дисертації опубліковано 20 наукових праць, в тому числі 8 статей у фахових виданнях, рекомендованих ДАК України, 4 статті в іноземних виданнях, 8 публікацій у матеріалах з'їздів та конференцій.

1. Гладун ДВ, Савчук АН, Остапченко ЛІ. Методологические подходы к получению фракции трипсиноподобных ферментов из морских гидробионтов (на примере Антарктического криля). Український Антарктичний Журнал. 2013;1(12):294–299.
2. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Використання електрофоретичних методів для експрес-аналізу білків морських гідробіонтів Антарктичного регіону. Український Антарктичний Журнал. 2014;1(13):192–197.
3. Гладун ДВ, Вовк ТБ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Отримання цільових білкових фракцій з морських гідробіонтів Антарктичного регіону. Український Антарктичний Журнал. 2014;1(13):133–139.
4. Гладун ДВ, Савчук АН, Гребиньк ДН, Короткий АГ, Остапченко ЛІ. Морские гидробиогты как альтернативный источник сырья для получения белковых молекул направленного действия. Российский Биофармацевтический Журнал. 2014;6(2):12–17.
5. Gladun D, Raksha N, , Savchuk O, Ostapchenko L. Collagenolytic activity in tissue extract of *Parborlasia corrugatus* from Antarctic region. Biomedical Research and Therapy. 2015;9(2):354–358.

6. Gladun D, Raksha N, Savchuk O, Ostapchenko L. Methodological approach to the isolation of functionally active proteins from the tissues of marine hydrobionts: an example of *Adamussium colbecki*. *Advances in Polar Science*. 2015;26(4):299–304.
7. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Антарктичні морські гідробіонти – нові перспективні джерела отримання гідролітичних ферментів. *Український біофармацевтичний журнал*. 2015;41(6):87-90.
8. Гладун ДВ, Вовк ТБ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Підбір оптимальних умов для хроматографічного тестування екстрактів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону. *Український Антарктичний Журнал*. 2015;1(14):168–174.
9. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук АН, Остапченко ЛІ. Перспективи получения колагенолитических ферментов с гидробионтов Антарктического региона. *Український Антарктичний Журнал*. 2015;1(14):175-179.
10. Gladun D, Chornenka N, Raksha N, Ostapchuk S. Derivation of trypsin-like enzymes from antarctic marine organisms// *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія*. 2015;12(1):19–22.
11. Гладун ДВ, Ракша НГ. Детергент-стійкі протеїнази антарктичного гребінця *ADAMUSSIUM COLBECKI*. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2016;20(1):62–65.
12. Gladun D, Raksha N, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. New fibrinogenases isolated from marine hydrobiont *Adamussium colbecki*. *Journal of Biochemistry International*. 2016;3(1):9-18.
13. Гладун ДВ, Савчук ОМ. Електрофоретичний аналіз білкового складу антарктичних гідробіонтів, що становлять біотехнологічний інтерес. X Міжнародна наукова конференція "Молодь та поступ біології", 8-11 квітня 2014 р, м.Львів, с. 20-21

14. Gladun D, Raksha N, Savchuk O, Ostapchenko L. Hydrolytic enzymes marine organisms as an instrument for investigating protein-protein interaction. The FEBS Journal, 40<sup>th</sup> FEBS Congress, June 4-9, 2015, Berlin, Germany, P. 146
15. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук ОМ. Диференційна екстракція білків та пептидів з морського гребінця антарктичного (*Adamussium colbecki*). XI Міжнародна наукова конференція "Молодь та поступ біології", 20-24 квітня 2015 р, м.Львів, с. 61
16. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Гідролітичні ферменти гребінця антарктичного (*Adamussium colbecki*) як нові потенційні біотехнологічні продукти направленої дії. VI Міжнародна Антарктична Конференція “ Антарктичні дослідження: нові горизонти та пріоритети ”, 12 –14травня 2015 року, м. Київ, с. 49.
17. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Отримання білкових молекул з різними функціональними властивостями з тканин морських гідробіонтів Антарктичного регіону. IX Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття», 24 квітня 2015 р., м. Київ. с. 30.
18. Гладун ДВ, Ракша Н.Г. Порівняльний аналіз гідролітичних ферментів морського гребінця антарктичного за допомогою електрофоретичних методів. Матеріали X Міжнародної конференції молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери”, 2-4 грудня 2015 р., м.Харків, с.10
19. Гладун ДВ, Кієнко ТІ. Потенційні ефектори системи гемостазу з антарктичного морського гребінця. XII Міжнародна наукова конференція "Молодь та поступ біології", 19-21 квітня 2016 р., м.Львів, С.262
20. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Виділення та характеристика трипсиноподібного ферменту з Антарктичного морського гребінця *Adamussium colbecki*. VIII Міжнародна Антарктична Конференція присвячена 25-річчю приєднання України до Договору про Антарктику м. Київ, 16-18 червня, 2017, с. 53

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертації доповідались на вітчизняних та міжнародних конференціях, зокрема, IX Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія ХХ століття» (Київ 2015), VI Міжнародній конференції «Антарктичні дослідження: нові горизонти та пріоритети» (Київ 2015), X Міжнародній конференції «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків 2015), VIII Міжнародній конференції присвяченій 25-річчю приєднання України до Договору про Антарктику (Київ 2017).