

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

ГЛАДУН ДМИТРО ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 595.3.574

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

03.00.04 – біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру “Інститут біології та медицини” Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Савчук Олексій Миколайович,**  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, завідувач кафедри біохімії ННЦ “Інститут біології та медицини”

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент  
**Калачнюк Лілія Григорівна,**  
Національний університет біоресурсів і природокористування України МОН України,  
професор кафедри біохімії;

доктор біологічних наук, професор  
**Кліщ Іван Миколайович,**  
Державний вищий навчальний заклад «Тернопільський державний медичний університет імені Г.Я. Горбачевського МОЗ України», проректор з наукової роботи, професор кафедри функціональної і лабораторної діагностики

Захист дисертації відбудеться “29” грудня 2017 року о годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ “Інститут біології та медицини”, ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ “Інститут біології та медицини”, спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою м. Київ, вул. Володимирська. 58, зала 12

Автореферат розісланий “25” листопада 2017 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Н.Г. Ракша

## АГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**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 визначати тонкі механізми дії біокаталізаторів 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 [Siddiqui K. et al., 2015; Santiago M. et al., 2016]. Окрім значного практичного потенціалу ферменти є важливим інструментом для проведення фундаментальних досліджень в галузі вивчення структурних та функціональних особливостей білків [Gudmundsdottir A. et al., 2005; Fuchise T., 2014]. 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 обґрунтованих джерел сировини та розробка нових підходів щодо швидкого скринінгу, 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 [Aneiros A. et al., 2004; Grienke U. et al., 2014]. 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, ширшою субстратною специфічністю та нижчою термостабільністю порівняно з аналогічними мезофільними ферментами [Feller G. et al., 2003; Margesin R. et al., 2010]. 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.). Здобувач був співвиконавцем цих тем

**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, оцінка гомогенності одержаних ферментів, ідентифікація активних ферментів, визначення ізоелектричних точок), спектрофотометричні (визначення активності ферментів), агрегатометричні (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 металопротейназ. Виявлено порушення здатності фібриногену до полімеризації та утворення фібринового згустку за дії фібриногенолітичного ферменту та показано значне пригнічення процесу АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Оптимізовано методіку 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 процес 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 «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.

**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, у 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 189 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.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи досліджень

У роботі було використано заморожену масу гідробіонту Антарктичного регіону *Adamussium colbecki*. Зразки для дослідження було люб'язно надано Державною установою «Національний антарктичний науковий центр МОН України». Загальний екстракт тканин одержували з використанням екстрагуючого буферу (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 подальшою ліофілізацією одержаних після центрифугування проб. Якісний білково-пептидний склад, чистоту одержаних ферментів, ізоелектричні точки та присутність активних форм ферментів оцінювали, відповідно, методами диск-електрофорезу у поліакріламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію [Laemli K., 1970], двовимірного електрофорезу [Amersham Biosciences, 2004] та ензим-електрофорезу з заполімеризованими у розділюючий гель субстратними білками (желатин, колаген чи фібриноген) [Ostapchenko L.I. et al., 2011]. Одержані електрофореграми аналізували у програмі TotalLab 2.01. Очистка трипсиноподібного ферменту включала два хроматографічні етапи - афінну хроматографію на колонці з SBTI-сефарозою 4В та хроматографію, що поділяє за розмірами на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG. Фракцію, що не зв'язалась з SBTI-сефарозою 4В було використано для одержання фібринолітичного ферменту, етапи очистки якого включали афінну хроматографію на колонці з Blue-sepharose 6 FF та хроматографію, що поділяє за розмірами на колонці з носієм HiLoad 16/60 Superdex 200 PG. На кожному етапі очистки одержані фракції перевіряли на наявність загальної протеолітичної активності та, відповідно, трипсиноподібної активності чи активності щодо фібриногену. Субстратну специфічність обох досліджуваних ферментів досліджували за гідролізом синтетичних хромогенних субстратів H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S<sub>2238</sub>), pyroGlu-Pro-Arg-pNA (S<sub>2366</sub>), Bz-Ile-Glu( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-pNA(S<sub>2222</sub>) та H-D-Val-Leu-Lys-pNA(S<sub>2251</sub>) та Ac-Phe-pNA у кінцевій концентрації 0,3 мМ. Загальну протеолітичну активність визначали відповідно до методу [Munilla-Moran R. et al., 1989], використовуючи казеїн (4%) як субстрат. Трипсиноподібну активність оцінювали використовуючи синтетичний хромогенний субстрат N- $\alpha$ -бензоїл-DL-аргінін-*p*-нітроанлід (BAPNA) [Xavier L. et al., 2005]. Вплив рН на активність ферментів визначали за гідролізом хромогенного субстрату pyroGlu-Pro-Arg-pNA використовуючи наступні буфери: 50 мМ лимонна кислота/цитрат натрію (рН 3,0-5,0); 50 мМ трис-HCl (рН 6,0-8,0) і 50 мМ гліцин-HCl (рН 9,0-13,0); визначення температурного оптимуму проводили у діапазоні температур від 8°C до 52°C та за встановленого рН оптимуму. Дію інгібіторів протеїназ EDTA (5 мМ), PMSF (2 мМ), SBTI (1 мг/мл) чи іонів двовалентних металів Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> (2, 5 і 10 мМ) оцінювали за ефективністю гідролізу субстрату pyroGlu-Pro-Arg-pNA за температурного та рН

оптимуму. Основні кінетичні константи ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  і  $k_{cat}/K_M$ ) гідролізу субстрату  $\text{puroGlu-Pro-Arg-pNA}$  для трипсиноподібного ферменту та субстрату  $\text{H-D-Phe-Pip-Arg-pNA}$  для фібриногенолітичного ферменту було розраховано після лінеаризації у координатах Лайнувера-Берка кривих залежності початкової швидкості реакції від концентрації субстрату. Специфічність фібриногенолітичного ферменту щодо ланцюгів фібриногену оцінювали методом диск-електрофорезу у 10% ДСН-ПААГ після інкубації фібриногену з досліджуваним ферментом при 37°C [Costa J. et al., 2007]. Співвідношення фібриногену до ферменту складало 100:1. Фібринолітичну активність визначали інкубуючи фібриногенолітичний фермент з фібриновим згустком. Через певні часові проміжки (1, 6 та 24 годин) зразки фібринового згустку та інкубаційного середовища аналізували методом диск-електрофорезу у 10% ДСН-ПААГ. Концентрацію фібриногену, не здатного до полімеризації вираховували як різницю між загальною концентрацією фібриногену (0,5 мг/мл) до інкубації з фібриногенолітичним ферментом та його концентрацією в оцтових лізатах фібринових згустків, що утворювалися після додавання до проб 10 NIH тромбіну. Визначення активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТТ), протромбінового (ПЧ) та тромбінового (ТЧ) часу зсідання плазми проводили відповідно до [Козлов А. и др., 2013]. Для дослідження впливу фібриногенолітичного ферменту на процес агрегації тромбоцитів використовували плазму, збагачену на тромбоцити. Як індуктор застосовували АДФ у кінцевій концентрації  $5 \cdot 10^{-6}$  М. 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 ( $m$ ).

### Результати досліджень та їх обговорення

Для оцінки доцільності використання гідробіонту антарктичного регіону *A.colbecki* як джерела для одержання ферментів, спочатку було проаналізовано якісний білковий склад у загальному екстракті тканин гідробіонту та оцінено присутність протеолітичних ферментів з різною будовою активного центру. Відповідно до результатів одно- та двохвимірного електрофорезу у поліакриламідному гелі за присутності ДСН, загальний екстракт тканин гідробіонту містив широкий спектр білків з молекулярними масами у діапазоні від 10 до 150 кДа, ізоелектричні точки яких знаходилися у межах двох інтервалів рН – 3,5–4,0 та 5,5–5,9. Застосування методу ензим-електрофорезу показало присутність низки протеїназ різної молекулярної маси, що виявляли активність щодо желатину, фібриногену та колагену. Подальший аналіз з використанням інгібіторів основних груп протеїназ, виявив, що 53% від загальної протеолітичної активності у загальному екстракті тканин гідробіонту обумовлено сериновими протеїназами, серед яких до 95% активності опосередковується трипсиноподібною активністю. Близько 20% ферментної активності належить металозалежним протеїназами, а решта 27% активності може бути пов'язана із присутністю цистеїнових та аспартильних протеїназ.



Для встановлення молекулярних мас ферментів, присутніх у тканинах гідробіонту, загальний екстракт було поділено на окремі фракції методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці з Superdex 75 PG, після чого кожна з фракцій було проаналізовано на загальну протеолітичну, трипсиноподібну та колагенолітичну активності. У результаті фракціонування екстракту було одержано 5 фракцій, що містили білки з молекулярними масами від 30 і до 75 кДа та вище. Відповідно до одержаних результатів, загальну протеолітичну активність, оцінену з використанням як субстрату казеїну, було виявлено у всіх досліджуваних фракціях. Застосування специфічного для трипсинів субстрату BApNA показало присутність ферментів, здатних гідролізувати цей субстрат, у фракціях, що містять білки з молекулярними масами від 30 до 65 кДа, причому найвищу активність було зареєстровано у фракції, білки якої мають молекулярну масу 30-40 кДа. Такі результати узгоджуються з даними літератури щодо молекулярної маси трипсинів та трипсиноподібних ферментів [Kishimura H. et al., 2008]. Присутність колагенолітичної активності лише у фракції білків з молекулярними масами близько 30 кДа опосередковано може вказувати на належність цих ферментів до серинових колагенолітичних ферментів, адже відомо, що у тканинах нижчих гідробіонтів поряд з металозалежними колагеназами з молекулярною масою 40-150 кДа є низькомолекулярні (нижче 30 кДа) колагенолітичні ферменти активний центр яких містить залишок Ser [Salamonea M. et al., 2012]. Узагальнюючи одержані результати, можна зробити висновок, що основна частина протеолітичної активності у тканинах досліджуваного гідробіонту зумовлена сериновими протеїназами, зокрема, ферментами з трипсиноподібною активністю. Тому, з огляду на одержані нами результати, та беручи до уваги, що робіт, присвячених вивченню властивостей трипсинів з організмів, зокрема, безхребетних, пристосованих до існування за понижених температур, у сучасній літературі не так багато, наступний етап роботи передбачав одержати та охарактеризувати трипсиноподібний фермент.

Нами було розроблено ефективну схему очистки трипсиноподібного ферменту, яка поєднувала два хроматографічні етапи (афінну хроматографію на колонці з SBTI-сефарозою 4В та хроматографію, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG) (рис.1) та дозволила одержати гомогенний фермент з виходом 50,3%, ступенем очистки 7,5 та питомою активністю 31,6 од·мг білка<sup>-1</sup> у порівнянні з 4,2 од·мг білка<sup>-1</sup> у загальному екстракті тканин.

Ензим-електрофоретичний аналіз з використанням як субстрату желатину підтвердив присутність активного ферменту з молекулярною масою 23 кДа, що повністю співпадало з результатами диск-електрофорезу у ДСН-ПААГ. Варто зазначити, що молекулярна маса одержаного нами ферменту знаходилася у діапазоні молекулярних мас, характерних для трипсинів.



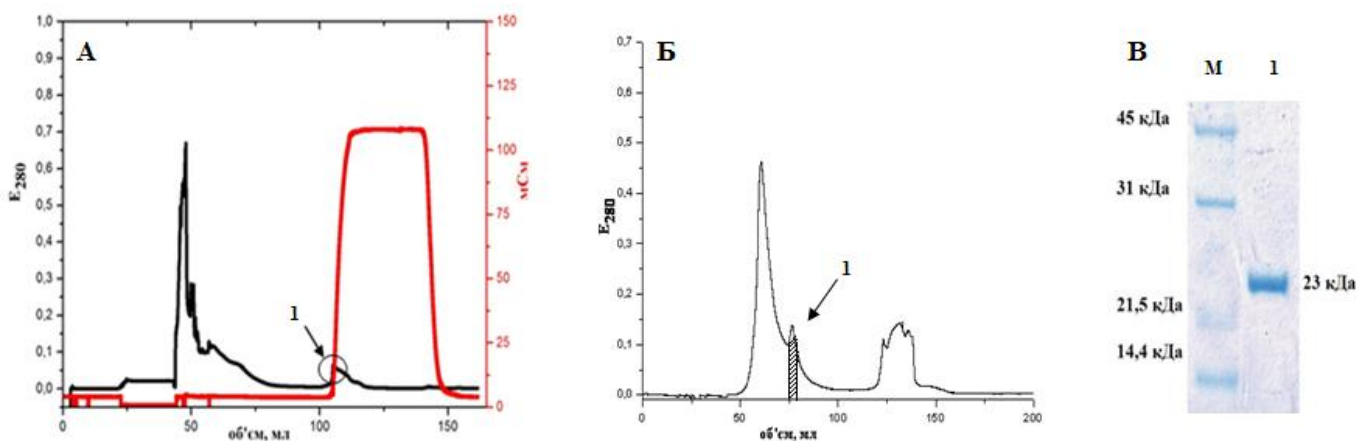


Рис. 1. Одержання трипсиноподібного ферменту:

А - афінна хроматографія на колонці з SBTI-sepharose 4B; Б - хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG; В - електрофореграма одержаного ферменту (1 – фракція, що містить трипсиноподібний фермент; М – маркери молекулярних мас)

Субстратну специфічність трипсиноподібного ферменту оцінювали з використанням низки хромогенних пептидів, що зазвичай використовуються для дослідження активності серинових протеїназ (табл.2).

Таблиця 2

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

Субстрат	Питома активність ферменту, $\mu\text{моль } p\text{NA} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$
pyroGlu-Pro-Arg-pNA ( $S_{2366}$ )	$9,82 \pm 0,06$
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA ( $S_{2238}$ )	$3,79 \pm 0,02$
H-D-Val-Leu-Lys-pNA ( $S_{2251}$ )	$2,25 \pm 0,04$
<i>N</i> - $\alpha$ -benzoyl-DL-Arg-pNA (BApNA)	$1,54 \pm 0,02$
Ac-Phe-pNA	-

Подібно до більшості трипсинів, одержаний нами 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. Відсутність ферментативної активності за умов використання субстрату для хімотрипсину Ac-Phe-pNA може слугувати додатковим підтвердженням того, що одержаний нами фермент належить до трипсинів. Для більш детальної характеристики трипсиноподібного ферменту було досліджено залежність активності даного ферменту від температури та значень рН.

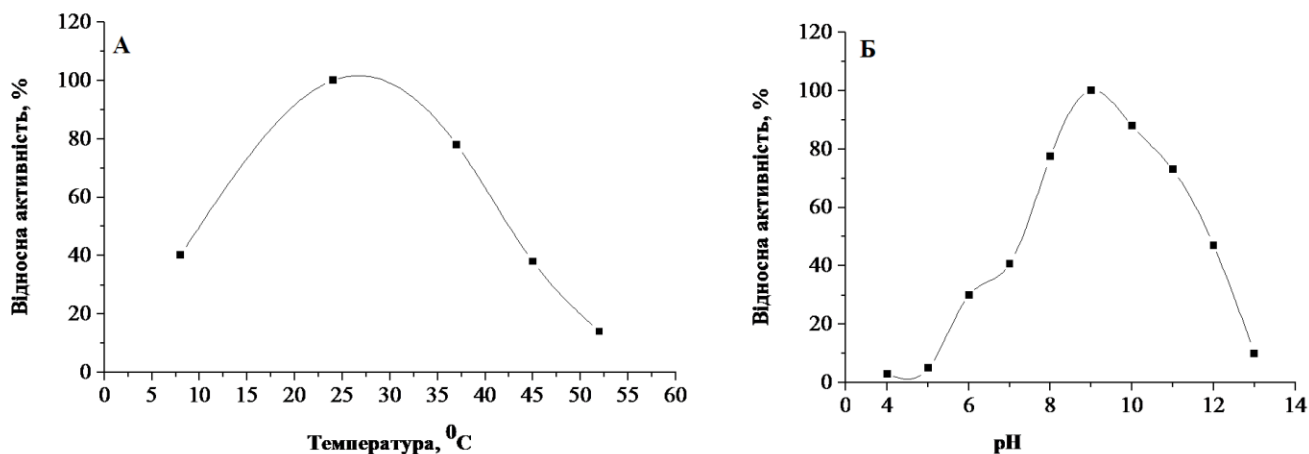


Рис. 2. Залежність активності трипсиноподібного ферменту від температури (А) та рН (Б)

Відповідно до одержаних результатів (рис. 2А) найвища активність трипсиноподібного ферменту спостерігалася при 24°C. При зниженні температури до 8°C активність ферменту зберігалася на рівні 40%, в той час як підвищення температури обумовлювало поступове зниження активності трипсиноподібного ферменту. Так, при 37°C та 45°C активність ферменту складала, відповідно, 31% та 14 % від максимальної. Встановлене значення температурного оптимуму виявилось нижчим за оптимальні температури, характерні для трипсинів з мезофільних організмів, але знаходилось у межах температур (20°C-40°C), визначених як оптимальні для функціонування ферментів з організмів, адаптованих до низьких температур середовища існування [Михайлова А.Г. и др., 2006; Bakermans C. et al., 2007]. рН оптимум трипсиноподібного ферменту знаходився в області лужних значень рН і складав 9,0 (рис. 2Б), що у цілому співпадає зі значеннями рН оптимуму більшості трипсинів як хребетних, так і безхребетних тварин [Muhlia-Almazán A. et al., 2008; Wu Z. et al., 2008].

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 трипсиноподібного ферменту. Оскільки іони  $\text{Ca}^{2+}$  є необхідними для забезпечення належної функціональної активності трипсинів з хребетних та деяких безхребетних тварин [Bode W. et al., 1975], першочергово було вивчено вплив саме даних іонів. Для визначення концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , оптимальної для прояву активності трипсиноподібного ферменту, дослідження було проведено у діапазоні концентрацій від 0,5 до 10 мМ. Згідно з одержаними результатами, використання іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у вищезазначених концентраціях не впливало на активність трипсиноподібного ферменту, яка залишалася на рівні базальної (рис. 3, дані наведено лише для концентрації 5 та 10 мМ.

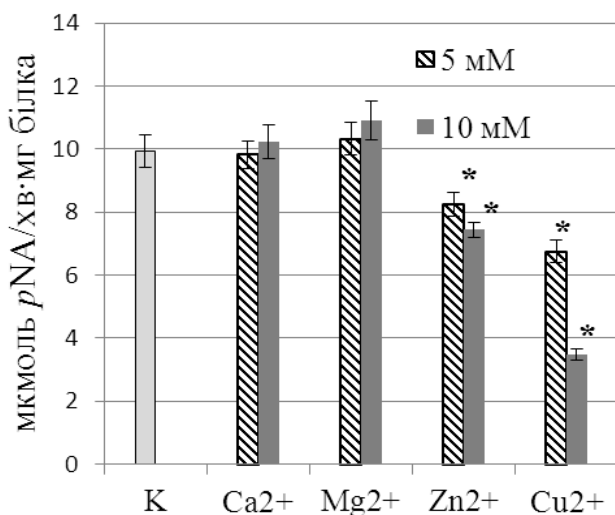


Рис. 3. Питома активність трипсиноподібного ферменту за дії іонів двохвалентних металів ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ); \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з активністю у контролі (К)

Такі дані у цілому не суперечать результатам низки робіт [Balti R. et al., 2009; Pereira E. et al., 2012], де автори також показали відсутність впливу іонів  $Ca^{2+}$  на активність трипсинів з нижчих хребетних та безхребетних. З огляду на одержані нами результати, подальші дослідження були проведені за концентрації іонів 5 та 10 мМ. Як видно з рис. 3, зростання активності трипсиноподібного ферменту на 10% спостерігалось лише при використанні іонів  $Mg^{2+}$  у концентрації 10 мМ, в той час як іони  $Zn^{2+}$  та  $Cu^{2+}$  обумовлювали пригнічення активності за обох досліджуваних концентрацій.

Додатковим підтвердженням належності одержаного нами ферменту до трипсинів слугують результати інгібіторного аналізу (табл. 3), відповідно до яких, преінкубація ферменту з інгібітором серинових протеїназ PMSF чи специфічним інгібітором трипсинів SBTI зумовлювала пригнічення активності ферменту відповідно на 50,3 і 94,7%, у той час як за використання інгібітору металозалежних ферментів EDTA, інгібуючого ефекту виявлено не було.

Вважається, що однією з характерних рис ферментів з організмів, адаптованих до існування за понижених температур навколишнього середовища, є вища, порівняно з аналогічними ферментами з мезофільних організмів, питома активність при низьких та помірних температурах [Leiros H. et al., 2000; DeMaayer P. et al., 2014].

Таблиця 3

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

	Питома активність ферменту, мкмоль $pNA \cdot h^{-1} \cdot mg$ білка <sup>-1</sup>	% інгібування
Контроль	9,8±0,7	-
+EDTA (5 мМ)	10,8±0,6	-
+PMSF (2 мМ)	4,9±0,5*	50,3
+SBTI (1 мг/мл)	0,52±0,1*	94,7

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

Тому на наступному етапі роботи було порівняно кінетичні параметри гідролізу субстрату руроGlu-Pro-Arg-pNA, визначені при 24°C та 8°C (рис. 4).

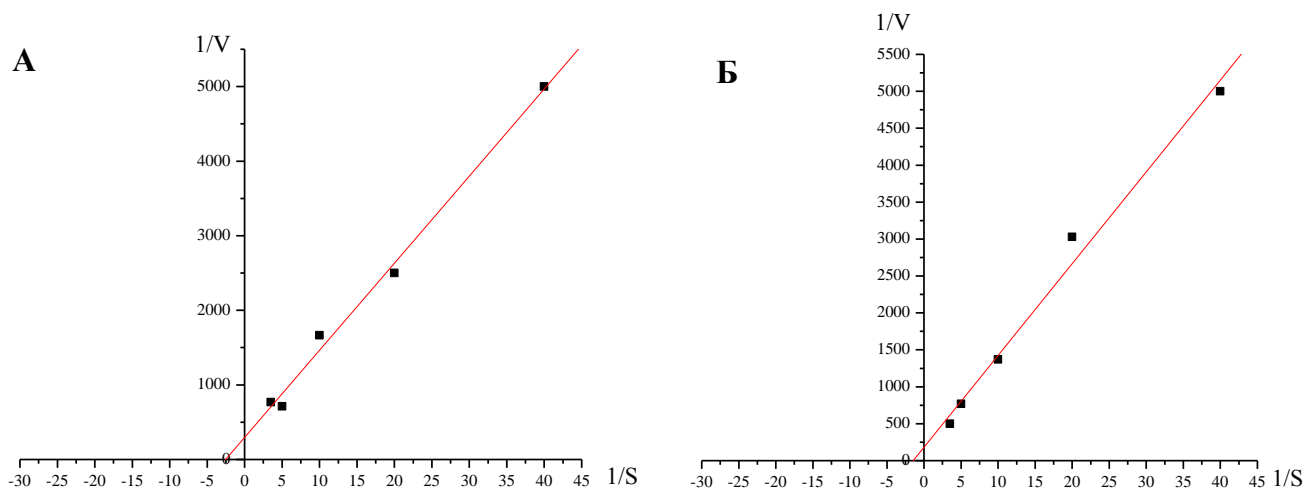


Рис. 4. Залежність швидкості реакції гідролізу субстрату руроGlu-Pro-Arg-pNA від його концентрації при 8°C (А) та 24°C (Б) у координатах Лайнувера-Берка

Як бачимо з даних, наведених у таблиці 4, при зниженні температури мало місце зниження значень  $K_M$  з  $0,68 \pm 0,07$  мМ при 24°C до  $0,39 \pm 0,09$  мМ при 8°C, що свідчить про зростання спорідненості ферменту до субстрату, але при цьому каталітична ефективність  $k_{cat}/K_M$  гідролізу субстрату майже не змінювалася при обох температурах і складала  $15,32 \pm 0,2$  мМ<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup> при 24°C та  $16,33 \pm 0,3$  мМ<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup> при 8°C.

Таблиця 4

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

Температура	$K_M$ , мМ	$k_{cat}/K_M$ , мМ <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>
24°C	$0,68 \pm 0,07$	$15,32 \pm 0,20$
8°C	$0,39 \pm 0,09$	$16,33 \pm 0,30$

З огляду на одержані результати можемо припустити, що одним з механізмів пристосування до функціонування при низьких температурах є підвищення спорідненості ферменту до субстрату, що у цілому узгоджується з даними, наведеними у роботах [Genicot S. et al., 1988; Kristjansson M. et al., 1997], де автори показали, що зростання каталітичної ефективності  $k_{cat}/K_M$  для трипсинів з організмів, адаптованих до низьких температур середовища, реалізується саме за рахунок підвищення спорідненості до субстрату.

Отже, за основними фізико-хімічними властивостями, зокрема, молекулярною масою, субстратною специфічністю, оптимумом рН при лужних значеннях та пригніченням активності за дії інгібітору серинових протеїназ, одержаний нами трипсиноподібний фермент подібний до трипсинів. Разом з тим, температурний оптимум при 24°C, збереження каталітичної ефективності гідролізу субстрату на

одному рівні як за оптимальної температури, так і при зниженні температури до 8°C, а також відсутність активуючого впливу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  є рисами, що відрізняють трипсиноподібний фермент з гідробіонту Антарктичного регіону *A. colbecki* від «традиційних» трипсинів.

Оскільки однією із виражених активностей, визначених на етапі оцінки протеолітичного потенціалу гідробіонту, була фібриногенолітична, наступний блок досліджень передбачав одержання та характеристику ферменту, що виявляв фібриногенолітичну активність. Незначна кількість робіт, присвячених скринінгу та дослідженню властивостей сполук, здатних впливати на систему гемостазу, серед гідробіонтів антарктичного регіону та існуюча на сьогодні нагальна потреба в ефективних та безпечних засобах, здатних швидко знижувати вміст фібриногену, слугували додатковим обґрунтуванням вибору саме фібриногенолітичного ферменту, як об'єкту для дослідження. Варто зазначити, що використання для одержання фібриногенолітичного ферменту фракції, що не зв'язалася з SBTI-сефарозою 4В на етапі одержання трипсиноподібного ферменту, дозволило відразу відділити ферменти, що виявляють трипсиноподібну активність. У результаті поєднання декількох хроматографічних стадій, 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 HiLoad 16/60 Superdex 200 PG, було одержано фібриногенолітичний фермент з молекулярною масою 40 кДа, що підтверджується результатами електрофорезу у ДСН-ПААГ та результатами ензим-електрофорезу з заполімеризованим у розділюючий гель фібриногеном (рис. 5 Б, В).

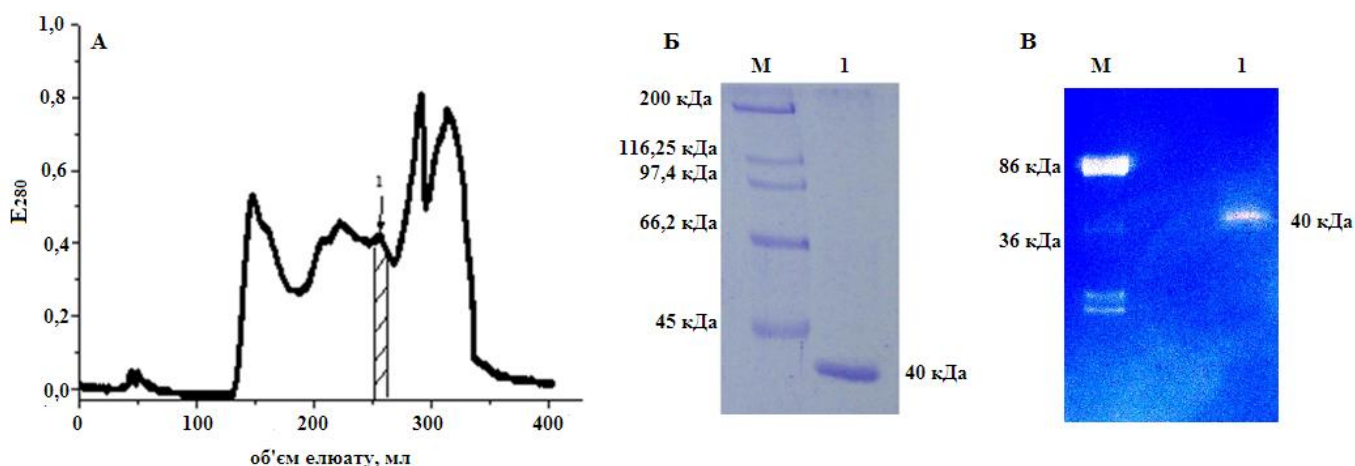


Рис. 5. Одержання фібриногенолітичного ферменту:

А - хроматографія, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200 PG; Б - електрофореграма одержаного ферменту; В - ензим-електрофореграма одержаного ферменту (1 – фракція, що містить фібриногенолітичний фермент; М – маркери молекулярних мас)

Для того, щоб в цілому оцінити вплив одержаного фібриногенолітичного ферменту на коагуляційну ланку системи гемостазу та визначити можливі

механізми реалізації даного впливу, було проведено аналіз процесів згортання плазми крові у хронометричних тестах (табл. 5).

Таблиця 5

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

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

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

Співставляючи результати хронометричних тестів, найбільш вірогідним видається припущення, що дія фібриногенолітичного ферменту реалізується на етапі перетворення фібриногену у фібрин, оскільки виявлене нами порушення показників часу зсідання плазми у всіх трьох тестах свідчить про гостру нестачу фібриногену. Для підтвердження цього було визначено концентрацію фібриногену, не здатного до полімеризації.

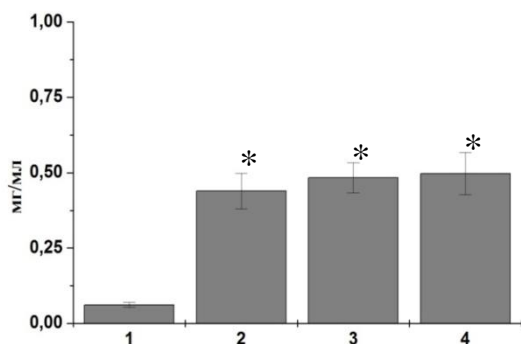


Рис. 6. Концентрація фібриногену, не здатного до полімеризації, після інкубації з фібриногенолітичним ферментом:

1 – контроль; 2, 3, 4 - інкубація впродовж відповідно 1, 3 та 6 год;

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

Відповідно до одержаних результатів (рис. 6), вже через 1 год інкубації концентрація функціонально неактивного фібриногену зростала у 7 разів і складала  $0,439 \pm 0,06$  мг/мл у порівнянні з  $0,062 \pm 0,008$  мг/мл у контролі. Виявлене нами підвищення концентрації функціонально неактивного фібриногену підтверджувалося візуальною оцінкою розмірів фібринового згустку, який значно зменшувався з подовженням часу інкубації фібриногену з ферментом і через 6 год інкубації внесення до проби тромбіну взагалі не викликало утворення згустку.

Важливою характеристикою фібриногенолітичних ферментів є специфічність щодо ланцюгів фібриногену, яка визначає належність ферментів до  $\alpha$ - чи  $\beta$ -фібриногеназ. З огляду на результати електрофоретичного аналізу (рис. 7), досліджуваний фермент першочергово гідролізував  $A\alpha$ -ланцюг молекули



фібриногену, що дозволяє віднести його саме  $\alpha$ -фібриногеназ. При подовженні часу інкубації до 4 год спостерігалася деградація також і  $B\beta$ -ланцюга фібриногену.

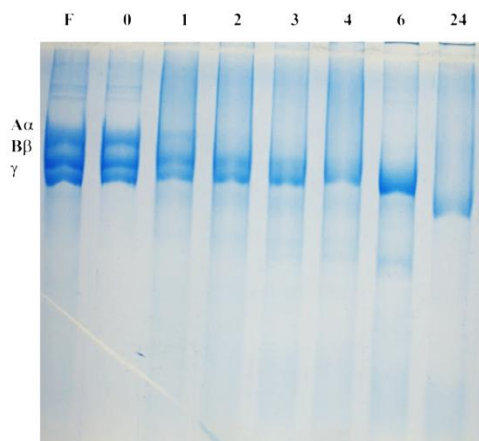


Рис. 7. Електрофореграма зразків фібриногену після інкубації з фібриногенолітичним ферментом: F – зразок фібриногену без інкубації з фібриногенолітичним ферментом; 0–24 – години інкубації

Варто підкреслити, що інкубація фібриногену з фібриногенолітичним ферментом не супроводжувалася утворенням фібринового згустку ні на початкових етапах дослідження, ні через 24 год інкубації.

Окрім здатності розщеплювати фібриноген, фібриногенолітичний фермент виявляв певну фібринолітичну активність. У цілому специфічність досліджуваного ферменту щодо ланцюгів нестабілізованого фібрину була подібна до такої, стосовно ланцюгів фібриногену – першим гідролізу зазнавав саме  $\alpha$ -ланцюг, про що свідчить поява у зразках інкубаційного середовища смуг, що відповідають  $\alpha$ -ланцюгам фібрину та зниження інтенсивності відповідних смуг у зразках фібринового згустку через 1 та 6 год інкубації з ферментом (рис. 8).

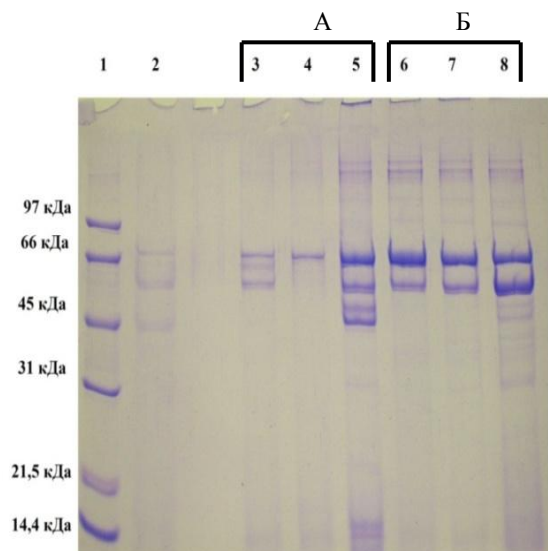


Рис. 8. Електрофореграма зразків інкубаційного середовища (А) та зразків фібринового згустку (Б) після інкубації з фібриногенолітичним ферментом: 1 – маркери молекулярних мас; 2 – фібрин; 3, 6 - інкубація впродовж 1 год; 4, 7 – інкубація впродовж 6 год; 5, 8 - інкубація впродовж 24 год

Враховуючи, що фібриноген є обов'язковим учасником процесу агрегації тромбоцитів, нами було досліджено вплив одержаного фібриногенолітичного ферменту на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів. Відповідно до результатів, наведених на рис. 9, внесення до плазми, збагаченої на тромбоцити, фібриногенолітичного ферменту у концентрації 12,5 мкг/мл та 6,25 мкг/мл



обумовлювало пригнічення процесу агрегації тромбоцитів, відповідно, на 80% та 31%.

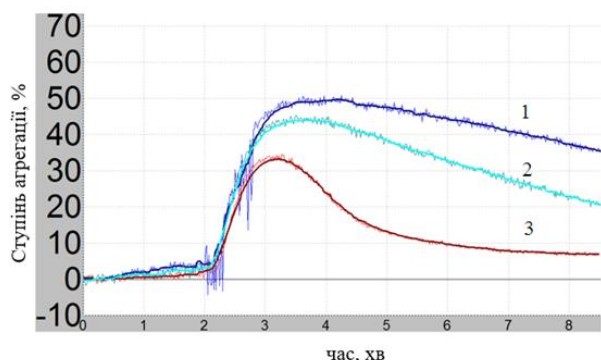


Рис. 9. Типова агрегатограма АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів за дії фібриногенолітичного ферменту: 1 – контроль; 2 – концентрація ферменту 6,25 мкг/мл; 3 – концентрація ферменту 12,5 мкг/мл

Виявлений інгібуючий вплив фібриногенолітичного ферменту, окрім розщеплення фібриногену, може бути пов'язаний з блокуванням тромбоцитарних рецепторів продуктами деградації фібриногену чи бути результатом безпосередньої взаємодії ферменту з даними рецепторами [Reiss S. et al., 2006; Kołodziejczyk J., 2013].

Значне пригнічення активності ферменту за інкубації з інгібітором металопротеїназ ЕДТА (на 72%) та збереження активності на рівні базальної за використання інгібітору серинових протеїназ PMSF свідчить про належність фібриногенолітичного ферменту до металопротеїназ (табл. 6). Одержані результати цілком узгоджуються з більш вираженою специфічністю даного ферменту щодо А $\alpha$ -ланцюгів фібриногену, адже відомо, що фібриногенази, що розщеплюють А $\alpha$ -ланцюг фібриногену, належать переважно до металопротеїназ, в той час як  $\beta$ -фібриногенази найчастіше є сериновими протеїназами [Markland F., 1998].

Таблиця 6

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

	Концентрація інгібітору, мМ	Питома активність ферменту, мкмоль $pNA \cdot хв^{-1} \cdot мг \text{ білка}^{-1}$	% інгібування
Контроль	-	$2,63 \pm 0,05$	-
EDTA	2	$1,20 \pm 0,04$ *	55
EDTA	5	$0,75 \pm 0,02$ *	72
PMSF	2	$2,58 \pm 0,03$	2
PMSF	5	$2,70 \pm 0,03$	-

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

Досліджуваний фермент ефективно гідролізував хромогенні субстрати, які містять у  $P_1$ -положенні залишок Arg чи Lys (табл. 7), що є не зовсім типовим для металопротеїназ і опосередковано може свідчити про відносно широку субстратну специфічність досліджуваного ферменту.

Незважаючи на важливість іонів  $Zn^{2+}$  для функціонування більшості металозалежних фібриногенолітичних ферментів [Markland F., 1998], активність досліджуваного нами ферменту, навпаки, знижувалася за інкубації з даними іонами;

іони  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 10) не впливали, а іони  $\text{Mg}^{2+}$  обумовлювали зростання активності ферменту на 17 та 34% за концентрації, відповідно, 2 і 5 мМ.

Таблиця 7

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

Субстрат	Питома активність ферменту, мкмоль $p\text{NA} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг білка}^{-1}$
pyroGlu-Pro-Arg- $p\text{NA}$ ( $S_{2366}$ )	$3,00 \pm 0,06$
H-D-Phe-Pip-Arg- $p\text{NA}$ ( $S_{2238}$ )	$2,63 \pm 0,02$
Bz-Ile-Glu( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg- $p\text{NA}$ ( $S_{2222}$ )	$0,94 \pm 0,04$
H-D-Val-Leu-Lys- $p\text{NA}$ ( $S_{2251}$ )	$0,88 \pm 0,03$
$N$ - $\alpha$ -benzoyl-DL-Arg- $p\text{NA}$ (BAPNA)	-

Зниження активності ферменту при додаванні цистеїну вказує на важливість вільних SH-груп для реалізації каталітичної активності.

Згідно з одержаними нами результатами, найвища активність фібринолітичного ферменту спостерігалася при рН 10,0, що у цілому узгоджується з даними літератури, адже рН оптимум більшості фібриногеназ знаходиться в області нейтральних та лужних значень [Deng Z. et al., 2010].

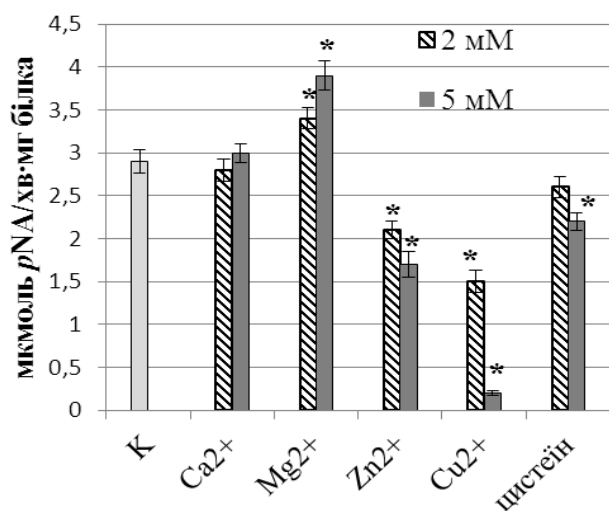


Рис. 10. Питома активність фібринолітичного ферменту за дії іонів двохвалентних металів та цистеїну ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ); \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем (К)

Таким чином, у результаті поєднання декількох стадій хроматографічної очистки з гідробіонту Антарктичного регіону було одержано декілька ферментів, які з огляду на основні фізико-хімічні властивості можна віднести до серинових протеїназ трипсинового типу та до металозалежних  $\alpha$ -фібриногеназ. Одержані у роботі результати обґрунтовують доцільність проведення подальших досліджень, спрямованих на більш детальне вивчення будови та фізіологічних ефектів даних ферментів.

## 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 протеїназами, серед яких до 95% активності опосередковується трипсиноподібною активністю. Близько 20% ферментативної активності належить металозалежним протеїназам, а решта 27% активності може бути пов'язана із присутністю цистеїнових та аспартильних протеїназ.

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

4. Виявлено, що трипсиноподібний та фібриногенолітичний ферменти, ефективно гідролізують синтетичні р-нітроанілідні 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°C.

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 зсідання плазми у хронометричних тестах та зростанням концентрації фібриногену, не здатного до полімеризації. Показано пригнічення процесу АДФ-залежної агрегації тромбоцитів за дії фібриногенолітичного ферменту.

#### СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ 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. *(Здобувачем особисто одержано та досліджено фракцію трипсиноподібних ферментів).*
2. **Ракша НГ**, **Гладун ДВ**, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Використання електрофоретичних методів для експрес-аналізу білків морських гідробіонтів Антарктичного регіону. Український Антарктичний Журнал. 2014;1(13):192–197.

(Здобувачем особисто використано електрофоретичні методи для експрес-аналізу білкових молекул).

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. (Здобувачем особисто отримано та проаналізовано цільові білкові фракції з морських гідробіонтів).

4. Савчук АН, **Гладун ДВ**, 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. (Здобувачем особисто отримано екстракти морських гідробіонтів)

5. Raksha N, **Gladun D**, Savchuk O, Ostapchenko L. Collagenolytic activity in tissue extract of *Parborlasia corrugatus* from Antarctic region. Biomedical Research and Therapy. 2015;9(2):354–358. (Здобувачем особисто отримано та проаналізовано білковий екстракт *Parborlasia corrugatus*)

6. Raksha N, **Gladun D**, 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. (Здобувачем особисто виділено білкові молекули, що володіють протеолітичною активністю).

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. (Здобувачем особисто виділено та охарактеризовано фракцію гідролітичних ферментів).

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. (Здобувачем особисто проаналізовано та оптимізовано умови хроматографічного отримання білкових фракцій з екстрактів).

9. Ракша НГ, **Гладун ДВ**, Савчук АН, Остапченко ЛІ. Перспективі получения колагенолитических ферментов с гидробионтов Антарктического региона. Український Антарктичний Журнал. 2015;1(14):175-179. (Здобувачем особисто отримано та протестовано ферменти з колагенолітичною активністю).

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. (Здобувачем особисто отримано фракцію трипсиноподібних ферментів).

11. Ракша НГ, **Гладун ДВ**. Детергент-стійкі протеїнази антарктичного гребінця *Adamussium colbecki*. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;20(1):62–65. (Здобувачем особисто отримано протеїнази)

12. **Gladun D**, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. New fibrinogenases isolated from marine hydrobiont *Adamussium colbecki*. Journal of Biochemistry International. 2016;3(1):9-18. (Здобувачем особисто виділено фібриногенази).

*Тези наукових доповідей*

1. **Гладун ДВ**, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Виділення та характеристика трипсиноподібного ферменту з Антарктичного морського гребінця *Adamussium colbecki*: VIII Міжнародна Антарктична Конференція; 2017 16-18 травня, Київ, Україна, С. 53-54.
2. **Гладун ДВ**, Кієнко ТВ Потенційні ефектори системи гемостазу з антарктичного морського гребінця: XII Міжнародна наукова конференція "Молодь та поступ біології"; 2016 19-21 квітня, Львів, Україна, С.26.
3. **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"; 2015 20-24 квітня, Львів, Україна, С.61.
4. **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 ХХ століття»; 2015 24 квітня, Київ, Україна, С.30
5. **Gladun D**, Raksha N, Savchuk O, Ostapchenko L. Hydrolytic enzymes marine organisms as an instrument for investigating protein-protein interaction: The FEBS Journal, 40th FEBS Congress; 2015 June 4-9, Berlin, Germany, P.146
6. **Гладун ДВ**, Ракша НГ. Порівняльний аналіз гідролітичних ферментів морського гребінця антарктичного за допомогою електрофоретичних методів: Матеріали X Міжнародної конференції молодих учених "Біологія: від молекули до біосфери"; 2015 2-4, Харків, Україна, с.10-11.
7. **Гладун ДВ**, Савчук ОМ. Електрофоретичний аналіз білкового складу антарктичних гідробіонтів, що становлять біотехнологічний інтерес: X Міжнародна наукова конференція "Молодь та поступ біології"; 2014 8-11 квітня, Львів, Україна, С.20-21

#### АНОТАЦІЯ

**Гладун Д.В. Фізико-хімічні та каталітичні властивості трипсиноподібного та фібриногенолітичного ферментів з антарктичного морського гребінця *Adamussium colbecki*. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04-біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

Дисертаційна робота присвячена вивченню структурно-функціональних властивостей та каталітичних констант трипсиноподібного та фібриногенолітичного ферментів отриманих з тканин Антарктичного морського гребінця *A. colbecki*.

Під час виконання дисертаційної роботи було виділено та охарактеризовано трипсиноподібний та фібриногенолітичний ферменти з екстракту тканин морського гребінця антарктичного (*A. colbecki*), оцінено їх молекулярні маси, визначено субстратну специфічність щодо деяких хромогенних та білкових субстратів, а також визначено основні кінетичні константи гідролізу хромогенних субстратів трипсиноподібним та фібриногенолітичним ферментами. Встановлено температурний та рН оптимум для трипсиноподібного і фібриногенолітичного ферментів, вивчено вплив інгібіторів протеїназ та іонів двохвалентних металів на

активність даних ферментів. Було показано, що отриманий фібриногенолітичний фермент обумовлював порушення здатності молекул фібриногену до полімеризації та утворення фібринового згустку.

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

### АННОТАЦИЯ

**Гладун Д.В. Физико-химические и каталитические свойства трипсиноподобного и фибринолитического ферментов из антарктического морского гребешка *Adamussium colbecki*. - Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04-биохимия. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, МОН Украины, Киев, 2017.

Диссертационная работа посвящена изучению структурно-функциональных свойств и каталитических констант трипсиноподобного и фибринолитического ферментов полученных из тканей антарктического морского гребешка *A. colbecki*.

Во время выполнения диссертационной работы было выделено и охарактеризовано трипсиноподобный и фибринолитический ферменты из экстракта тканей морского гребешка антарктического (*A. colbecki*), оценены их молекулярные массы, определено субстратную специфичность в отношении некоторых хромогенных и белковых субстратов, а также определены основные кинетические константы гидролиза хромогенных субстратов трипсиноподобным и фибринолитическим ферментами. Установлен температурный и рН оптимум для данных ферментов, изучено влияние ингибиторов протеаз и ионов двухвалентного металлов на активность полученных ферментов. Было показано, что полученный фибринолитический фермент обуславливал нарушения способности молекул фибриногена к полимеризации и образования фибринового згустка.

**Ключевые слова:** антарктический морской гребешок, трипсиноподобный и фибринолитический ферменты, физико-химические и каталитические свойства.

### ANNOTATION

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

The thesis for PhD degree in specialty 03.00.04 – biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

The thesis is devoted to the study of structural and functional properties and catalytic constants of trypsin-like and fibrinogenolytic enzymes derived from the tissues of the Antarctic sea scallop *A. colbecki*.

Electrophoretic separation of the total *A. colbecki* extract allowed to detect protein bands with molecular weights of 157, 144, 130, 121, 110, 79, 61, 47, 44, 35 kDa. The method of two-dimensional electrophoresis revealed the presence of a certain number of

protein stains in the plane of the 2D electrophoregram, the isoelectric points of which are located in two intervals of pH - from 3,5 to 4,0 and from 5,5 to 5,9. The range of molecular weights was from 30 to 235 kDa. Enzyme-electrophoretic analysis showed a clear area of hydrolysis observed in the 25kDa region. The use of protease inhibitors EDTA and PMSF showed a dominant presence in the total extract of *A. colbecki* serine proteases and metal-dependent proteases. The trypsin-like enzyme was isolated by two steps using affinity chromatography on a SBTI-sepharose and Superdex 75 PG columns. Electrophoretic analysis of the obtained fraction showed the presence of only one protein band in the region of 23 kDa. An enzyme-electrophoretic study of the obtained fraction revealed only one clearly defined zone of hydrolysis indicating the presence of an active enzyme with a molecular weight of about 23 kDa. The trypsin-like enzyme effectively hydrolyzed the ligands formed by the carboxyl groups of Arg or Lys, especially those containing the Arg residue in the P<sub>1</sub>-position. The activity of this enzyme on substrates S<sub>2366</sub> and S<sub>2238</sub> was respectively in 4.36 and 1.68 times higher than that of S<sub>2251</sub> substrate. Absence of activity on the substrate Ac-Phe-pNA is a confirmation of the trypsin-like nature of enzyme. The main kinetic constants of K<sub>M</sub> and V<sub>max</sub> were calculated from the Lineweaver–Burk graphs constructed for the respective substrates. The lowest value of K<sub>M</sub> and hence the highest affinity of the enzyme to the substrate was observed with the use of BA<sub>p</sub>NA - in this case, the value of K<sub>M</sub> by an order of magnitude exceeded the value defined for substrates S<sub>2366</sub> and S<sub>2238</sub>. The efficiency of the BA<sub>p</sub>NA hydrolysis was in 3.43 times lower than S<sub>2366</sub> but in 1.77 times higher than S<sub>2238</sub> substrate. The inhibitors PMSF and SBTI reduced the activity of the enzyme that confirm affiliation his serine protease nature. The use of EDTA did not affect the activity of the test enzyme. The activity of the trypsin-like enzyme increased by 10% with presence of 10 mM Mg<sup>2+</sup> ions. It was found that Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions act as strong inhibitors of enzyme activity in concentrations of 5 and 10 MM. The trypsin-like enzyme exhibited activity in the temperature range from 8°C to 45°C. The highest activity of the enzyme was observed at 24°C. Trypsin-like activity decreased at pH values below 5.0 and above 12.0. The fibrinogenolytic enzyme was isolated from the freeze-dried fraction that was not bound with SBTI-sepharose used a Blue-sepharose and Superdex 200 PG chromatographic columns. Electrophoretic and Enzyme-electrophoretic analysis of the obtained fraction with presence of fibrinogenolytic activity showed the protein band and the hydrolysis zone respectively in the 37-40 kDa regions. The introduction of a fibrinogenolytic enzyme into plasma caused a significant prolongation of the time of sowing in the APPT test. The isolated fibrinogenolytic enzyme, depending on the duration of the incubation, has the ability to cleave both the Aα- and Bβ-chains of fibrinogen. The incubation of the fibrinogenolytic enzyme with fibrin clot was accompanied by the appearance in the incubation medium of fragments corresponding to the molecular weight of the fibrin chains. The enzyme activity was significantly suppressed by incubation with Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions, and slightly increased with the presence of Mg<sup>2+</sup> ions. The consequence of the fibrinogen cleavage by the action of the fibrinogenolytic enzyme is the curvature of the process of ADP-dependent platelet aggregation.

**Keywords:** Antarctic scallop, trypsin-like and fibrinogenolytic enzymes, physico-chemical and catalytic properties.