

УДК 577.15:591.466(043.5)

## АКТИВНІСТЬ ТРИПСИНОПОДІБНИХ ПРОТЕЇНАЗ У ЗМІЙ

*Орлова Л.Д., Федорко Н.Л., Петров С.А.*

*Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, Одеса, Україна  
E-mail: peterodessa@gmail.com*

Вперше виявлено наявність трипсиноподібних протеїназ, виготовлених з організму змій. Встановлено, що досліджувані препарати характеризуються різною протеолітичною активністю цих ферментів. Найбільшою активністю трипсиноподібних протеїназ характеризуються препарати, одержані з гадюки степової (*Vipera ursini*).

**Ключові слова:** протеоліз, трипсиноподібні протеїнази, змії.

### ВСТУП

Одним з головних напрямків сучасних наукових досліджень є вивчення системи протеолізу як особливої форми біологічної регуляції. Протеоліз постійно відбувається в живих організмах та в оточуючому середовищі під впливом мікроорганізмів, в результаті чого виникають різноманітні біологічно активні речовини – ферменти, гормони, пептиди, амінокислоти тощо.

Протеолітичні ферменти, які мають високу біологічну активність, приймають участь в функціонуванні різних органів і систем організму і в регуляції біологічних процесів. Вони не тільки здійснюють неспецифічний розпад білкових молекул, але і контролюють функції і системи організму, що реалізується в реакціях загального та обмеженого протеолізу. За сучасними уявленнями, саме ферменти протеолізу підтримують рівновагу між загибеллю і деградацією клітин та їх відновленням [1, 2].

Дослідження протеолізу і механізмів його регуляції є актуальним, оскільки зв'язано з вивченням на молекулярному рівні життєво важливих основ біологічних процесів, з лікуванням і діагностикою сучасних хвороб [3, 4].

Протеолітичні ферменти та їх інгібітори широко використовуються в медицині. Так, для поліпшення травлення застосовується травний фермент пепсин, для виведення відмерших тканин і прискорення їх заживлення використовуються серинові протеїнази трипсин і хіотрипсин. При лікуванні тромбозів та інфаркта міокарда – плазмін і активатори плазміногена урокіназа і стрептокіназа. Тромболітин застосовується при лікуванні хворих на рак гортані [5].

Протеолітичні ферменти та їх інгібітори, одержані із сировини тваринного походження, займають особливе місце в лікуванні хвороб. Головним джерелом промислового одержання трипсиноподібних протеїназ є підшлункова залоза великої рогатої худоби і свиней [6].

Аналіз літературних джерел свідчить, що для одержання лікарських засобів використовуються також протеїнази, які виділені з риб. Так, серинові протеїнази,

одержані з риб, застосовуються для лікування або попередження захворювань і можуть також бути ефективним косметичним засобом [7].

Трипсиноподібні протеїнази і їх інгібітори одержані також з мікроорганізмів [8].

Ферменти, в тому числі і трипсиноподібні протеїнази, виділені із змій. Зокрема, з отрути змії *Agkistrodon contortrix contortrix* одержаний новий тромбіноподібний фермент контортриксобін, який розщеплює фібриноген і компоненти зсідання крові [9].

З отрут змій виділені різноманітні ферменти, але з тканин організму змії ферменти досліджені недостатньо.

Мета нашого дослідження полягає у вивченні протеолітичної активності трипсиноподібних протеїназ в препаратах, одержаних з організму різних видів змій за оригінальною технологією [Патент РФ №2034550 «Спосіб П.М. Орлова одержування засобу для лікування гнійних ран»].

Трипсиноподібні протеїнази відносяться до пептидгідролаз, сімейства серинових протеїназ. Це найбільш вивчена група ферментів, головними представниками якої є трипсин (КФ 3.4.4.4), хімотрипсин (КФ 3.4.4.5), протеїназа трипсиноподібного типу калікреїн (КФ 3.4.4.6) та карбоксипептидаза А (КФ 3.4.17.1) і карбоксипептидаза В (КФ 3.4.17.1).

Важливою особливістю цих ферментів є селективний характер їх дії на пептидні зв'язки в білковій молекулі. Трипсин прискорює гідроліз пептидних зв'язків, утворених аргініном і лізином, хімотрипсин – ароматичними амінокислотами.

Трипсин і хімотрипсин утворюються клітинами підшлункової залози у вигляді неактивних проферментів (зімогенів). Тому для трипсиноподібних протеїназ особливе значення мають реакції обмеженого протеолізу пептидних зв'язків в зімогенах, які призводять до виникнення активних форм ферментів, гормонів, пептидів тощо [10].

Завдяки своїй специфічності і різноманітним механізмам дії, трипсиноподібні протеїнази мають виключне значення в життєво важливих для організму процесах – обміні речовин і системах регуляції метаболізму, захисних реакціях, процесах росту і ділення клітин, оплодотворінні, патогеності вірусів, а також в розвитку злоякісних захворювань [11-14].

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Щоб визначити активність ферментів протеолітичної системи, зокрема, трипсиноподібних протеїназ в досліджуваних препаратах, в експеримент були взяті 4 зразки препаратів, одержаних з різних видів змій:

- 1) вужа звичайного (*Natrix natrix*);
- 2) гадюки степової (*Vipera ursini*);
- 3) жовтобрюхого полоза (*Coluber jugularis*);
- 4) гадюки звичайної (*Vipera berus*).

В ході експерименту використовувались дослідні проби препаратів, розведені дистильованою водою.

Для визначення активності трипсиноподібних протеїназ в препаратах ми застосували метод Kunitz в модифікації Веремеєнко. В ролі субстрата

використовували 2 % розчин казеїну по Гаммерстену в 0,1 М фосфатному буфері при рН 7,4 [15].

В ході експерименту проводили також визначення вмісту білка в досліджуваних зразках препарату за методом Lowry [16].

Статистичну значимість відмінностей між дослідними препаратами визначали за допомогою t-критерія Стьюдента [17].

Ферментативна активність препаратів, виготовлених з різних видів змій, нами визначалась по активності трипсиноподібних протеїназ в мкмоль тирозину на мг білка.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Всі проби препаратів, виготовлені з 4-х видів змій, показали наявність в них активних форм трипсиноподібних протеїназ і характеризувалися різною протеолітичною активністю.

Результати дослідів представлені на діаграмі.

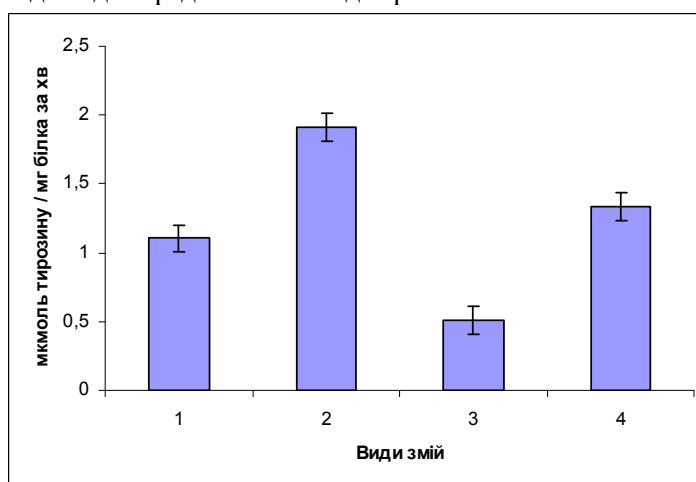


Рис. Активність трипсиноподібних протеїназ в препаратах, виготовлених із змій: 1 – вуж звичайний (*Natrix natrix*); 2 – гадюка степова (*Vipera ursini*); 3 – жовтобрюхий полоз (*Coluber jugularis*); 4 – гадюка звичайна (*Vipera berus*).

При порівняльному аналізі активності трипсиноподібних протеїназ в препаратах, одержаних з організму змій, ми реєстрували переважну активність ферментів в препаратах з отруйних змій. Максимальна активність трипсиноподібних протеїназ спостерігалась в препараті з гадюки степової (*Vipera ursini*). Найменша – з жовтобрюхого полоза (*Coluber jugularis*). Препарат, виготовлений з вужа звичайного (*Natrix natrix*), показав середній рівень активності трипсиноподібних протеїназ порівняльно з іншими препаратами.

В попередніх дослідях ми також вивчали ферментативну активність інших пептидгідролаз в препаратах, виготовлених з різних видів змій, зокрема, аспартильної катепсиноподібної протеїнази D і матричної металопротеїнази (ММР-2) [18].

На основі проведених нами дослідів можна зробити попередній висновок про наявність пептидазної активності в препаратах не тільки трипсиноподібних протеїназ, але і інших видів протеолітичних ферментів – матриксних металопротеїназ (ММР-2) і катепсин-D-подібних протеїназ. Наявність цих ферментів в препаратах свідчить про зкоординовану дію специфічних білків-ферментів в протеолітичному процесі і про їх індивідуальний вклад в загальний протеоліз. В цьому процесі трипсиноподібні протеїнази відіграють досить активну роль, значно менший вклад в протеоліз вносять катепсин-D-подібні протеїнази. Матриксні металопротеїнази (ММР-2) є найбільш активними і вносять найбільший вклад в протеолітичну активність препаратів, виготовлених із змій.

Продовження досліджень ферментативної активності препаратів із змій допоможе розкрити інші сторони їх протеолітичної дії.

### ВИСНОВКИ

Таким чином, в препаратах, виготовлених з різних видів змій, виявлена наявність трипсиноподібних протеїназ, активність яких залежить від виду змій. Найбільша активність цих ферментів спостерігалась в препараті з гадюки степової (*Vipera ursini*).

### Список літератури

1. Участь протеолітичних ензимів у радіаційно-індукованому апоптозі лімфоцитів тимуса щурів / Т.Р. Андрійчук, Н.Г. Ракша, Б.О. Цудзевич [и др.] // Укр. біохім. журнал. – 2009. – Т. 81, № 3. – С. 102–107.
2. Локшина Л.А. Протеолитические ферменты в регуляции биологических процессов / Л.А. Локшина // Биоорганич. химия. – 1994. – Т. 206, № 2. – С. 142–143.
3. Веремеенко К.Н. Протеолиз в норме и при патологии / Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. – К.: Здоров'я, 1988. – 200 с.
4. Cari V. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface / V. Cari, P. Curr // Opinion Cell Biol. – 2000. – 12, № 15. – P. 606–612.
5. Реннеберг Р. Эликсиры жизни. Новейшие результаты в области исследования ферментов / Реннеберг Р. – М.: Мир, 1987. – 151 с.
6. Веремеенко К.Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы в медицине / К.Н. Веремеенко // Биохимия животных и человека: Республиканский межвед. сб. – Вып. 5. – Киев: Наукова думка. – 1981. – С. 28–40.
7. Пат. 2264824 России, МКИ7 А 61 К 38/48. Сериновые протеиназы рыб, их фармацевтическое и косметическое применение / Бьярнасон Йон Браги. № 2002101125/15; Заявл. 15.06.00; Опубл. 27.11.05. Бюл. № 33.
8. Бурцева Т.И. Трипсиноподобная протеиназа и ее эндогенный ингибитор из *Versinia pseudotuberculosis* / Т.И. Бурцева., Ю.Н. Лоенко // 2. Съезд Биохим. о-ва РАН. Москва, 19-23 мая, 1997: Тез. стенод. сообщений. – Ч. 1. – Пушкино, 1997. – С. 12.
9. A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: Evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket differem from thrombin / G. Amiconi, A. Amoresano, G. Boumis [et al.] // Biochemistry. – 2000. – 39, № 33. – P. 10294–10308.
10. Сологуб Л.І. Протеази клітин та їх функції / Сологуб Л.І., Пашковська І.С., Антоняк Г.Л. – К.: Наук. думка, 1992. – 195 с.
11. Акбашева О.Е. Показатели протеолиза плазмы крови и фенотипы α1-протеиназного ингибитора при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у детей / О.Е. Акбашева // Биомед. химия. – 2007. – 53, № 3. – С. 338–344.

12. Сериновые протеиназы – трипсин и химо трипсин играют важную роль в накоплении холестерина в сосудистой стенке и в развитии ранних стадий атеросклероза / О.М. Панасенко, Д.В. Аксенов, А.А. Мельниченко [и др.] // Бюл. экспер. биол. и мед. – 2005. – 140, № 11. – С. 530–534.
13. Soreide K. Molecular biological mechanisms of proliferation, invasion and metastasis / K. Soreide, E.A. Janssen, H. Baak Komer // J. Pathol. – 2006. – 209, № 2. – P. 147–156.
14. Soreide Kjetil. Proteinase-activated receptor 2 (PAR-2) in gastrointestinal and pancreatic pathophysiology / Kjetil Soreide // Scand. J. Gastroenterol. – 2008. – 43, № 8. – P. 902–908.
15. Kunitz M.I. The determination of kaseine in the blood and urine / M.I. Kunitz // Biol. Chem. – 1946. – V. 164. – P. 563–571.
16. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.I. Rosebrough, A.Z. Farr [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265–275.
17. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика / Рокицкий П.Ф. – Минск: Высш. школа, 1973. – 320 с.
18. Орлова Л.Д. Активність металопротеїнази матриксу (ММР-2) і катепсиноподібної протеїнази D у різних видів змій / Л.Д. Орлова, С.А. Петров // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2010. – № 55. – С. 38–42.

**Орлова Л.Д. Активность трипсиноподобных протеиназ у змей / Л.Д. Орлова, Н.Л. Федорко, С.А. Петров // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 1. – С.144-148.**

Впервые выявлено наличие трипсиноподобных протеиназ в препаратах, изготовленных из организма змей. Установлено, что исследуемые препараты характеризуются различной протеолитической активностью этих ферментов. Наибольшей активностью трипсиноподобных протеиназ характеризуются препараты, полученные из гадюки степной (*Vipera ursini*).

**Ключевые слова:** протеолиз, трипсиноподобные протеиназы, змеи.

**Orlova L.D. Activity trypsyne-like proteinases of snakes / L.D. Orlova, N.L. Fedorko, S.A. Petrov // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No. 1. – P. 144-148.**

The presence of trypsyne-like proteinase was first detected in preparations made from serpent's organism. It is ascertained that the examined preparations are characterized with the various proteolytic activity of those enzymes. The most activity of trypsyne-like proteinase is detected by preparation from *Vipera ursini*.

**Keywords:** proteolysis, trypsyne-like proteinases, snakes.

Поступила в редакцию 20.01.2011 г.