

УДК 577.15:591.466(043.5)

Л. Д. Орлова¹, консультант-терапевт,
О. В. Устянська², асп.,
Н. В. Мотрук², ст. лаб.,
С. С. Чернадчук², канд. біол. наук, доцент,
С. А. Петров², д-р біол. наук, професор

¹ Науково-дослідницький інститут здоров'я родини
Фонтанська дорога, 2, Одеса, 65074, Україна

² Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра біохімії,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

АКТИВНІСТЬ КАТЕПСИНОПОДІБНИХ ПРОТЕЇНАЗ У РІЗНИХ ВИДІВ ЗМІЙ

Вперше виявлено наявність катепсиноподібних ферментів в препаратах, виготовлених з різних видів змій. Встановлено, що всі досліджувані препарати характеризуються наявністю активності катепсин-D-подібних протеїназ. Найбільш активними є катепсиноподібні протеїнази в препаратах з *Vipera ursini Bonap* (Гадюка степова) і з *Natrix natrix* (Вуж звичайний).

Ключові слова: катепсиноподібні протеїнази, змії.

Використання природної сировини для одержування біологічно активних сполук є важливим напрямком наукових досліджень в біології та медицині. Для лікування хвороб, особливо невиліковних, у всьому світі ведеться постійний пошук лікарських засобів з рослин, тварин і мікроорганізмів [1, 2].

Слід відзначити, що в теперішній час великий інтерес викликають препарати, виготовлені із змій. В першій половині ХХ ст. вчені різних країн, зокрема А. С. Мелік-Карамян з співробітниками, одержали кобротоксин — поліпептид з багатим амінокислотним складом, який використовується для лікування різних захворювань, в тому числі онкологічних [3, 4]. В сучасній медицині застосовуються ліки на основі зміїних отрут, які знімають біль, зупиняють кровотечу, лікують нервову і кісткову системи, бронхіальну астму і епілепсію [5].

Новітні винаходи пов'язані з пошуком біологічно активних сполук в організмі змії, які можуть впливати на різноманітні процеси життєдіяльності організму, метаболічну активність клітин, мають інгібуючу або розщеплюючу дію. В організмі змії знайдені нові поліпептидні сполуки, нові білки [6], ферменти [7], на культурі клітин змії вивчаються механізми проліферації [8].

Одним з головних напрямків сучасних біохімічних досліджень є вивчення протеолізу як особливої форми біологічної регуляції і протеолітичних ферментів на різних рівнях біологічної організації. Протеолітичні ферменти приймають участь в обміні білків та деградації їх аномальних молекул, в поповненні клітин амінокислотами, а також мають велике значення для розшифровки регуляторних механізмів клітин [9].

Пошук протеолітичних ферментів проводиться у різних видів змій. Існує досить численна інформація про знайдені у змій протеолітичні ферменти. Зокрема, з організму змій виділені фібринолітична протеїназа неувідаза [10], плазміноген-активуюча протеїназа [11] тощо. Але слід зауважити, що ці винаходи стосуються тільки зміїних отрут. В літературі майже не існує досліджень активності протеїназ в тканинах і органах змій.

В зв'язку з вищезазначеним мета нашої роботи полягала в дослідженні активності протеолітичних ферментів, а саме — катепсиноподібних протеїназ в препаратах, виготовлених із змій [Патент РФ № 2034550 «Спосіб П. М. Орлова одержування засобу для лікування гнійних ран»].

В процесі виконання роботи вирішували наступні завдання:

1. Дослідити активність катепсиноподібних протеїназ В, L, D в препаратах, одержаних з різних видів змій.
2. Порівняти активність катепсиноподібних протеїназ В, L, D в досліджуваних препаратах.

Матеріали і методи дослідження

Щоб визначити активність ферментів протеолітичної системи в досліджуваних препаратах, зокрема, катепсин- В, -L, і D-подібних протеїназ, в експеримент були взяті чотири препарати, одержаних з різних видів змій. Препарати виготовлені із всього організму змії і являють собою рідину, яка легко розчиняється в воді. В ході експерименту використовувались дослідні проби препаратів, розведених дистильованою водою в різних співвідношеннях залежно від якості препаратів і методики постановки дослідів.

Для визначення активності катепсин-D-подібних протеїназ ми застосовували метод М. L. Anson в модифікації А. П. Левицького [12], заснований на визначенні кількості продуктів гідролізу 1 % гемоглобіну при рН 3,5, які не осаджуються 10 % розчином трихлороцтової кислоти.

Визначення катепсин-L-подібних протеїназ проводили методом В. І. Чорної в модифікації І. Л. Вовчук і С. С. Чернадчук [13]. Метод, заснований на визначенні кількості продуктів гідролізу білкового субстрату азоказеїна, які не осаджуються 10 % розчином трихлороцтової кислоти.

Визначення активності катепсин-B-подібних протеїназ проводили за методом В. F. Erlanger [14]. Метод, заснований на визначенні кількості продуктів гідролізу синтетичного субстрату БАПНА (N-бензоїларгінін-п-нітроанлід).

В ході експерименту проводили також визначення вмісту білка в досліджуваних зразках препаратів за методом О. Н. Lowry [15].

Статистичну значимість відмінностей між дослідними препаратами визначали за допомогою *t*-критерія Стьюдента [16].

Результати дослідження та їх обговорення

Для вивчення ферментативної активності препаратів, виготовлених з різних видів змій, ми визначали наявність в них катепсиноподібних лізосомних протеїназ В (КФ: 3.4.22.1), L (КФ: 3.4.22.15), D (КФ: 3.4.23.5).

Всі проби препаратів, виготовлених з чотирьох видів змій, показали наявність в них катепсиноподібних В-, L- і D-протеїназ. Результати визначення активності катепсиноподібних протеїназ в препаратах, отриманих з різних видів змій, наведені на рис. 1—3.

При порівняльному аналізі активності протеолітичних ферментів в препаратах реєстрували найбільшу активність катепсин-D-подібних протеїназ, значно меншу активність проявляли катепсин-L-подібні протеїнази і зовсім незначною активністю характеризувалися катепсин-B-подібні протеїнази.

Катепсин-D-подібні протеїнази найбільшу активність виявили в препаратах, одержаних з *Vipera ursini Bonap* і *Natrix natrix*. Меншою активністю катепсин-D-подібних протеїназ характеризувалися препарати, виготовлені з *Coluber jugularis* і *Vipera berus*. Значний розбіг активності цих препаратів,

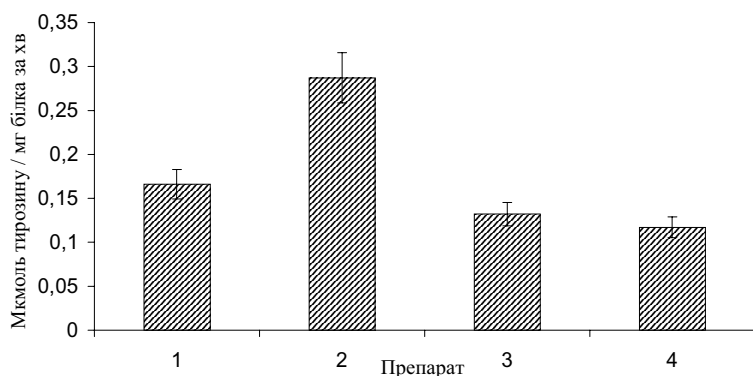


Рис. 1. Активність катепсин-D-подібної протеїнази в препаратах, отриманих з різних видів змій:

1 — *Natrix natrix* (Вуж звичайний); 2 — *Vipera ursini Bonap* (Гадюка степова); 3 — *Coluber jugularis* (Жовтобрюхий полоз); 4 — *Vipera berus* (Гадюка звичайна), $n = 5$

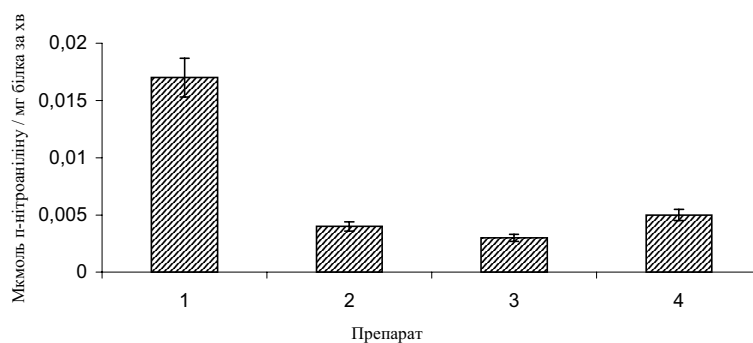


Рис. 2. Активність катепсин-B-подібної протеїнази в препаратах, отриманих з різних видів змій:

1 — *Natrix natrix*; 2 — *Vipera ursini Bonap*; 3 — *Coluber jugularis*; 4 — *Vipera berus*, $n = 7$

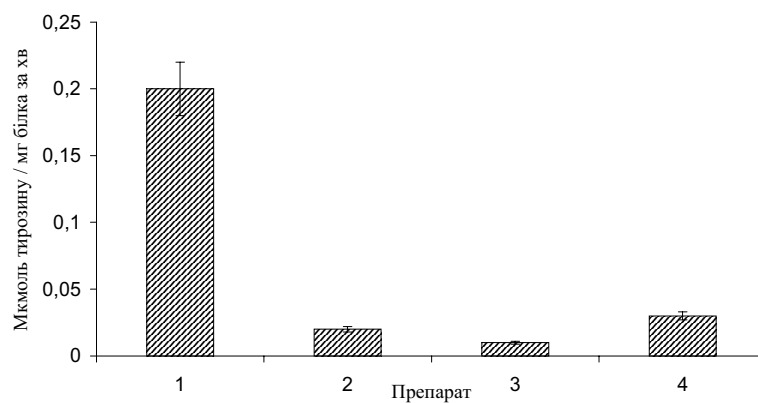


Рис. 3. Активність катепсин-L-подібної протеїнази в препаратах, отриманих з різних видів змій:

1 — *Natrix natrix*; 2 — *Vipera ursini Bonap*; 3 — *Coluber jugularis*; 4 — *Vipera berus*, $n = 8$

очевидно, можна пояснити не тільки видом змій, але і умовами їх життя і харчування.

Вивчення лізосомних протеолітичних ферментів, зокрема, катепсинів, знаходиться в центрі наукових досліджень останніх десятиліть, що пояснюється високою ефективністю цих ферментів, участю в процесах загального і обмеженого протеолізу, в рості та метастазуванні пухлин [17].

Таким чином, виявлена присутність в досліджених препаратах катепсиноподібних ферментів свідчить про їх протеолітичну дію, особливості якої потребують подальшого дослідження.

Висновки

1. Досліджувані препарати, виготовлені із змій, характеризуються максимальною активністю катепсин-*D*-подібних протеїназ.
2. Катепсиноподібні протеїнази *B* та *L* знаходяться в препаратах в слідових кількостях.
3. Рівень активності катепсин-*D*-подібних протеїназ в досліджуваних препаратах з різних видів змій залежить від джерела їх отримання.

Література

1. Пат. 2255747 Россия МКЦ А61К 35/56. Способ производства адаптогена / Одинец А. Г. — № 2003123738/15; заявл. 31.07.03; опубл. 10.07.05. Бюл. № 19.
2. *Toxines de venin: Des anees biologiques redoutabies au servise de la santé humaine* / F. Tiaho, F. Bera, N. Hussy // *Medical Science Monitor*. — 2001. — Vol. 17, № 8/9. — P. 947—951.
3. Мелик-Карамян А. С. Влияние ядов среднеазиатских змей на некоторые физиологические и патологические процессы в организме / А. С. Мелик-Карамян. — Ташкент: Изд-во АН УзССР, 1947. — 234 с.
4. Баркаган З. Ядовитые змеи и их яды / З. Баркаган, П. Перфильев. — Барнаул: Алтайское кн. изд-во, 1967. — 76 с.
5. Костюк Є. Є. Нескінченний пошук / Є. Є. Костюк. — К.: Знання, 1971. — 108 с.
6. MALDI-масс-спектрометрия для идентификации новых белков в яде змей / В. В. Кухтина, К. Вайзе, А. В. Рсипов [и др.] // *Биоорганическая химия*. — 2000. — Т. 26, № 11. — С. 803—807.
7. Isolation and characterization of pepsinogen from *Trimeresurus flavoviridis* / Y. Hiroo, N. Tsuyoshi, U. Tetsuya [et. al.] // *Journal of Biochemistry*. — 2000. — Vol. 127, № 5. — P. 755—760.
8. Голубков В. С. Перспективы получения культуры клеток, секретирующих токсичные ферменты, на примере культуры клеток эпителия околоушной железы гадюки обыкновенной — *Vipera berus* / В. С. Голубков, Э. И. Лежнев // *Биология клетки в культуре: Тез. докл. на Всероссийском симп.*, 20—22 окт. 1998 г., Санкт-Петербург // *Цитология*. — 1999. — Т. 41, № 3/4. — С. 256—257.
9. Локшина Л. А. Протеолитические ферменты в регуляции биологических процессов / Л. А. Локшина // *Биоорганическая химия*. — 1994. — Т. 206, № 2. — С. 142—143.
10. Purification, characterization and biological properties of phosphodiesterase from *Russell's viper (Vipera ruseili)* venom / Tin-Win, Aue-Kyaw, Sandia [et al.] // *Snake*. — 1998. — Vol. 28, № 1/2. — P. 83—89.
11. Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity form *Lachesis muta muta* (Bushmaster) snake venom / E. F. Sancher, C. L. Santos, A. Magalhaes [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 2000. — Vol. 378, № 1. — P. 131—147.
12. Чернадчук С. С. Активність катепсин *B*-подібних ферментів в онкопатологічних репродуктивних органах жінок / С. С. Чернадчук, І. Л. Вовчук // *Вчені записки Таврійського національного університету. Сер. «Біологія»*. — 2003. — Т. 16 (55), № 22. — С. 202—207.

13. Вовчук И. Л. Активность тканевых катепсин L-подобных протеиназ у женщин с онкопатологией тела матки / И. Л. Вовчук, С. С. Чернадчук // Украинский биохимический журнал. — 2004. — № 22. — С. 56—60.
14. Erlanger B. F., Kokovsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / B. Erlanger // Archives Biochemistry and Biophysics. — 1961. — Vol. 95, № 2. — P. 271—278.
15. Lowry O. H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // The Journal of biological chemistry. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265—275.
16. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. — Минск: Высшая школа, 1973. — 320 с.
17. Путьшев А. Б. Лизосомы человека: библиометрическая оценка актуальных направлений исследований / А. Б. Путьшев // Бюллетень СО РАМН. — 2006. — № 1 (199). — С. 106—115.

Л. Д. Орлова¹, О. В. Устьянская², Н. В. Мотрук²,
С. С. Чернадчук², С. А. Петров²

¹ Научно-исследовательский институт здоровья семьи
Фонтанская дорога, 2, Одесса, 65074, Украина

² Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
кафедра биохимии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНОПОДОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ У РАЗНЫХ ВИДОВ ЗМЕЙ

Резюме

Впервые обнаружено наличие катепсиноподобных ферментов в препаратах из различных видов змей. Установлено, что все исследованные препараты характеризуются максимальной активностью катепсин-D-подобных протеиназ. Наиболее активны катепсиноподобные протеиназы в препаратах *Vipera ursini Bonap* и *Natrix natrix*.

Ключевые слова: катепсиноподобные протеиназы, змеи.

L. D. Orlova¹, O. V. Ustjanska², N. V. Motruk²,
S. S. Chernadchuk², S. A. Petrov²

¹ Institute of Family Health research
Phontan Road, 2, Odesa, 65074, Ukraine

² Odesa National Mechnykov University, Department of Biochemistry,
Dvoryanska Str., 2, Odesa, 65026, Ukraine

ACTIVITY OF CATHEPSIN-LIKE PROTEINASES OF VARIOUS SNAKES KINDS

Summary

For the first time presence of cathepsin-like proteinases in preparations from various species of snakes is found out. It is established that all investigated preparations are characterized by the maximal activity cathepsin-D-like proteinases. Cathepsin-like proteinases are the most active in a preparation from *Vipera ursini Bonap* and *Natrix natrix*.

Key words: cathepsin-like proteinases, snakes.