ISSN 0206-5657. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2011. Випуск 55. С. 34–38
Visnyk of the Lviv University. Series BIology. 2011. Issue 55. P. 34–38

УДК 577.15:591.466(043.5)

АКТИВНІСТЬ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ МАТРИКСУ (ММР-2) І КАТЕПСИНОПОДІБНОЇ ПРОТЕЇНАЗИ D У РІЗНИХ ВИДІВ ЗМІЙ

Л. Орлова, С. Петров

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
пер. Шампанський, 2, Одеса 65058, Україна
e-mail: peterodessa@gmail.com

Уперше виявлено матриксну металопротеїназу-2 і катепсиноподібну протеїназу D в препаратах, виготовлених зі змій. Встановлено, що досліджувані препарати характеризуються різною протеолітичною активністю цих ферментів. Металопротеїназа-2 має вищу активність порівняно з катепсин-D-подібною протеїназою і робить більший вклад у загальну протеолітичну активність препаратів. Найбільша активність металопротеїнази-2 виявлена у препаратах, одержаних із гадюки звичайної (*Vipera berus*) і гадюки степової (*Vipera ursini*).

Ключові слова: протеоліз, металопротеїназа-2, катепсиноподібна протеїназа D, змії.

В історії світової науки збереглися численні відомості про використання змій для виготовлення ліків проти багатьох хвороб. Відомо, що Пліній-старший, вчений античної епохи, «зміїні» ліки виготовляв з отрути і частин тіла плазунів. У сучасній фармакології ліки, створені на основі зміїних отрут, знімають біль, зупиняють кровотечу, лікують нервову та кісткову системи, бронхіальну астму й епілепсію [4].

Новітні наукові винаходи пов'язані з пошуком біологічно активних сполук в організмі змії, які здатні впливати на різноманітні процеси життєдіяльності організму, мають метаболічну активність, інгібуючу та розщеплювальну дії.

Одним із основних напрямів сучасних наукових досліджень є вивчення системи протеолізу як особливої форми біологічної регуляції. Протеоліз постійно відбувається в живих організмах і в оточуючому середовищі під впливом мікроорганізмів, у результаті чого виникають різноманітні біологічно активні речовини – ферменти, гормони, пептиди, амінокислоти тощо [13].

Протеолітичні ферменти, які мають високу біологічну активність, беруть участь у функціонуванні різних органів і систем організму та в регуляції біологічних процесів. Вони не тільки здійснюють неспецифічний розпад білкових молекул, а й контролюють функції та системи організму, що реалізується в реакціях загального й обмеженого протеолізу. За сучасними уявленнями, саме ферменти протеолізу підтримують рівновагу між загибеллю та деградацією клітин і їхнім відновленням [1, 5].

Протеолітичні процеси необхідні для нормального функціонування організму. Порушення механізмів біологічної регуляції може викликати тяжкі захворювання: артрити, розсіяний склероз, ракові пухлини та ін. Протеолітичні ферменти відіграють важливу роль у метастазуванні при проходженні злоякісних клітин крізь мембрани, їхній міграції та інвазії у позаклітинний матрикс. У цих процесах беруть участь 4 класи протеолітичних ферментів – матриксні металопротеїнази, цистеїнові та серинові протеїнази, а також аспартатпротеїназа катепсин D [14].

Лізосомальні протеїнази – катепсини, до яких належить катепсиноподібна протеїназа D, становлять найбільш вивчену групу протеолітичних ферментів і перебувають у цен-

© Орлова Л., Петров С., 2011

трі уваги сучасних наукових досліджень. Новітні винаходи аспартатпротеїнази D пов'язані з вивченням її ролі у пухлинному процесі різних органів і систем організму, в поєднанні дії катепсину D з іншими засобами [6].

В останнє десятиріччя проведені наукові дослідження матриксних металопротеїназ у морфогенезі, загоєнні ран, імплантації ембріонів і вивченні їхньої ролі в злоякісному пухлинному процесі. Дослідження матриксних протеїназ і регуляція їхньої активності мають важливе значення для розуміння молекулярних механізмів різноманітних біологічних процесів [21].

Слід відзначити, що вчені різних країн при вивченні матриксних металопротеїназ велику увагу приділяють дослідженню змій.

Так, з отрути змії *Bothrops neuwiedi* виділена фібринолітична протеїназа неувідаза, яка має високий ступінь гомології з іншими металопротеїназами з отрут змій. Неувідаза розщеплює фібрин і деякі компоненти міжклітинного матриксу [18].

З отрути змії *Bothrops leucurus* виділена металопротеїназа лейкурозин-а, яка розчиняє в дослідах *in vitro* згустки фібрину з крові та фібриногену [12].

Металопротеїнази отрути змій берітрактиваза і ярарагін активізують ендотеліальні клітини та виявляють антиагрегаційну і прокоагулянтну дію [20].

Досліджена металопротеїназа отрути щитомордника *Agkistrodon halys* Palas з антимікробною активністю до бактерій, патогенних для людини і стійких до різних лікарських засобів [19].

З отрути змій також виділений рекомбінантний домен агролізин А, який гальмує агрегацію тромбоцитів, а також інгібує адгезію клітин остеосаркоми [15].

В інформаційних джерелах описані засоби одержання інгібіторів металопротеїназ, у тому числі з отрути змії, які можуть бути використані для лікування патологій, пов'язанних з надлишком ендогених металопротеїназ [16].

Таким чином, вивчення металопротеїназ у змій є науково актуальним, але ці винаходи стосуються, в основному, тільки зміїних отрут. У світовій літературі майже відсутні дослідження активності металопротеїназ у тканинах і органах змій.

Мета нашого дослідження полягала у вивченні активності протеолітичних ферментів, а саме: матриксної металопротеїнази-2 і катепсиноподібної протеїнази D у препаратах, виготовлених із різних видів змій за оригінальною технологією [Патент РФ №2034550 «Спосіб П.М. Орлова одержування засобу для лікування гнійних ран»].

Щоб визначити активність ферментів протеолітичної системи в досліджуваних препаратах, зокрема, металопротеїнази-2 матриксу і катепсиноподібної протеїнази D, в експеримент були взяті 4 зразки препаратів, одержаних із різних видів змій:

1. Вуж звичайний (*Natrix natrix*)
2. Гадюка степова (*Virepa ursini*)
3. Жовтобрюхий полоз (*Coluber jugularis*)
4. Гадюка звичайна (*Vipera berus*)

У ході експерименту використовувалися дослідні проби препаратів, розведені дистильованою водою.

Для визначення активності металопротеїнази-2 ми застосували метод Bradshaw R. S., заснований на визначенні кількості продуктів гідролізу 10% желатину при pH 7 [10].

Активність катепсин-D-подібних протеїназ ми визначали за методом Anson M. L. [11], заснованим на знаходженні кількості продуктів гідролізу 1% гемоглобіну при pH 3,5, які не осаджуються 10% розчином трихлороцтової кислоти.

У ході експерименту проводили також визначення вмісту білка в досліджуваних зразках препаратів за методом Lowry [17].

Статистичну значимість відмінностей між дослідними препаратами визначали за допомогою t-критерію Стьюдента [7].

Для вивчення протеолітичної активності препаратів, виготовлених із різних видів змій, ми визначали наявність у них металопротеїнази-2 і катепсиноподібної протеїнази D. Вибір серед родини катепсинів катепсиноподібної протеїнази D обумовлений тим, що серед усіх протеїназ катепсинового ряду ця протеїназа є найбільш активною.

Як видно з таблиці, досліджувані препарати характеризуються різною протеолітичною активністю.

Активність матриксної металопротеїнази-2 визначали в мкмолях гліцину/мг білка, катепсиноподібної протеїнази D – в мкмолях тирозину/мг білка.

Активність металопротеїнази-2 і катепсин-D-подібної протеїнази у препаратах, виготовлених зі змій (мкмоль гліцину/мг білка; мкмоль тирозину/мг білка; M±м; n=8)

Види змій	Активність ферментів	
	Металопротеїназа-2 (мкмоль гліцину/мг білка)	Катепсин D (мкмоль тирозину/мг білка)
Вуж звичайний (*Natrix natrix*)	117,450±20,027	0,166±0,044
Гадюка степова (*Vipera ursini*)	273,357±46,744	0,287±0,066
Полоз жовтобрюхий (*Coluber jugularis*)	244,804±30,883	0,132±0,041
Гадюка звичайна (*Vipera berus*)	517,184±82,438	0,117±0,041

При порівняльному аналізі активності ферментів у препаратах, виготовлених з 4-х видів змій, ми реєстрували переважну активність протеїнази ММР-2. Найбільшою активністю ММР-2 характеризуються препарати, виготовлені з гадюки звичайної (*Vipera berus*), а також із гадюки степової (*Vipera ursini*). Активність металопротеїнази була найменшою у препаратах із вужа звичайного (*Natrix natrix*). Активність матриксної металопротеїнази-2 можна пов'язати з наявністю отрути у зміях, з яких виготовлено препарати. Більшу активність виявляють препарати, виготовлені з отруйних змій.

Катепсин-D-подібна протеїназа характеризується найбільшою активністю у препаратах, одержаних із гадюки степової (*Vipera ursini*) та вужа звичайного (*Natrix natrix*). Меншою активністю катепсин-D-подібних протеїназ характеризуються препарати, виготовлені з жовтобрюхого полоза (*Coluber jugularis*) і гадюки звичайної (*Vipera berus*). Значні розбіжності в активності цих препаратів, очевидно, можна пояснити не тільки видом змій, а й умовами їхнього життя і харчування.

Протеїназа ММР-2 (КФ 3.4.24.24) належить до родини металопротеїназ позаклітинного матриксу, які мають в активному центрі іони двовалентних металів Zn і Ca. Як і катепсиноподібна протеїназа D, металопротеїназа-2 бере участь в обмеженому протеолізі, що є характерним для протеїназ широкого спектра дії. Матриксна металопротеїназа-2 – єдиний фермент, здатний до позаклітинного розщеплення колагену. Вивчення металопротеїназ має особливе значення при злоякісному рості клітин, оскільки інвазія пухлин потребує розпаду колагену [3].

Катепсиноподібна протеїназа D (КФ 3.4.23.5) характеризується високою катептичною активністю і здатністю руйнувати білки міжклітинного середовища. Вважається, що цей фермент бере участь у внутріклітинному гідролізі білків м'язів. При патологічних станах, у тому числі і при злоякісному рості, рівень активності катепсиноподібної протеїнази D підвищується в декілька разів [9].

Досліджувані препарати, виготовлені зі змій, свідчать, що металопротеїназа-2 матриксу характеризується вищою ферментативною активністю порівняно з катепсин-D-подібною протеїназою. На основі одержаних нами експериментальних даних можна зробити висновок про скоординовану дію специфічних білків-ферментів металопротеїнази-2 і катепсин-D-подібної протеїнази у протеолітичному процесі та про їхній індивідуальний вклад у загальний протеоліз. За своєю ферментативною активністю матриксна металопротеїназа-2 вносить більший вклад у загальну протеолітичну активність препаратів.

1. *Андрійчук Т. Р., Ракша Н. Г., Цудзевич Б. О., Остапченко Л. І.* Участь протеолітичних ензимів у радіаційноіндукованому апоптозі лімфоцитів тимуса щурів // Укр. біохім. журн. 2009. Т. 81. № 3. С. 102–107.
2. *Веремеенко К. Н.* Протеолитические ферменты и их ингибиторы в медицине // Биохимия животных и человека: Республ. межвед. сб. Вып. 5. К.: Наук. думка, 1981. С. 28–40.
3. *Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И.* Протеолиз в норме и при патологии. К.: Здоров'я, 1988. 200 с.
4. *Костюк Є. Є.* Нескінченний пошук. К.: Знання, 1971. 108 с.
5. *Локшина Л. А.* Протеолитические ферменты в регуляции биологических процессов // Биоорганич. химия. 1994. Т. 206. № 2. С. 142–143.
6. *Пупышев А. Б.* Лизосомы человека: библиометрическая оценка актуальных направлений исследований // Бюллетень СО РАМН. 2006. № 1(199). С. 106–115.
7. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. Минск: Высш. шк., 1973. 320 с.
8. *Сологуб Л. І., Пашковська І. С., Антоняк Г. Л.* Протеази клітин та їх функції. К.: Наук. думка, 1992. 195 с.
9. *Ханикова Т. А.* Катепсины B, L и D и цистатин C при гемобластозах человека и экспериментальных опухолях мышей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2004. 30 с.
10. *Чернадчук С. С., Вовчук І. Л.* Активність металопротеїнази матриксу (ММР-2) у тканинах новоутворень ендометрія та міометрія // Вісн. Одес. ун-ту. 2005. Т. 10. № 5. С. 58–63.
11. *Anson M. L., Mirsky A. E.* The estimation of pepsin with hemoglobin // L. Gen. Physiol. 1932. Vol. 16. N 1. P. 59–67.
12. *Beilo C. A., Nermogenes A. L. N., Magalhaes A*. et al. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from Bothrops leucuris (white-tailed jararaca) snake venom // Biochimie. 2006. Vol. 88. N 2. P. 189–200.
13. *Cari B., Curr P.* Remarkabie roles of proteolysis on and bejond the ceil surface // Opinion Cell. Biol. 2000. Vol. 12. N 5. C. 606–612.
14. *Jedinak A., Maliar T.* Inhibitors of proteases as anticancer drugs // Neoplasma. 2005. Vol. 52. N 3. P. 185–192.
15. *Jia Li-Guo, Wang Xiao-Ming, Shannon John D.* et al. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemor rhagic shake venom metalloproteinase atrolysin A // Arch. Biochem. and Biophys. 2000. Vol. 373. N 1. P. 281–286.
16. Пат. 6057297 США, МКИ С07К 5/06. Inhibitor compounds of zinc-dependent metalloproteinases associated with pathological conditions and therapeutic use thereof / Politi Vincenzo, D`Alessio Silvana, Di Stazio Glovanni, et all. №09 |040446; Заявл. 18.03.98; Опубл. 02.05.00; НКИ 514/19.
17. *Lowry O.H., Rosebrough N. I., Farr A. Z., Randal R. J.* Proteinneasurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
18. *Rodriques Veridiana M., Soares Andreimar M., Guerra-Sa Renata* et al. Structural and functional characterization of neuwiedase and nonhemorrhagic fifrin(ogen) olytie metalloprotease from Bothrops neuwiedi snake venom // Biochem. and Biophys. 2000. Vol. 381. N 2. P. 213–224.

19. *Samy Ramar Perumai, Gopalaksrishnakone Panampalam, Chow Vincent T.K.* et al. Viper metalloproteinase (Agkistrodon halys Pallas) with antimicrobial activity against multi-drug resistant human pathogens // J. Cell. Physiol. 2008. Vol. 216. N 1. P. 54–68.
20. *Schattner Mirta, Fritzen Marcio, de Soura Ventura Janaina* et al. The snake venom metalloproteases berythractivase and jaraihagin activate endotheilai cells // Biol. Chem. 2005. Vol. 386. N 4. P. 369–374.
21. *Vu Thiennu H., Werb Zena.* Matrix metalloproteinases: Effectors of development and normal-physiology // Genes and Dev. 2000. Vol. 14. N 17. P. 2123–2133.

Стаття: надійшла до редакції 24.09.10

доопрацьована 16.11.10

прийнята до друку 23.11.10

MATRIX METALLOPROTEINASE (MMP-2) AND CATHEPSINE LIKE PROTEINASE D ACTIVITY OF DIFFERENT SPECIES OF SNAKES

L. Orlova, S. Petrov

Mechnikov National University of Odessa
2, Shampansky Lane, Odessa 65058, Ukraine
e-mail: peterodessa@gmail.com

The presence of matrix metalloproteinase-2 and cathepsine like proteinase D 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 ensymes. Metalloproteinase-2 prossesses higher activity compared to cathepsine-D-like proteinase and contributes more to the general proteolytic activity of preparations. The most activity of metalloproteinase-2 is detected by pireparations, obtained from common viper (*Vipera berus*) and orsini's viper (*Vipera ursini*).

Key words: proteolysis, metalloproteinase-2, cathepsine-like proteinase D, snakes.

АКТИВНОСТЬ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ МАТРИКСА (ММР-2) И КАТЕПСИНОПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ D У РАЗНЫХ ВИДОВ ЗМЕЙ

Л. Орлова, С. Петров

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова
пер. Шампанский, 2, Одесса 65058, Украина
e-mail: peterodessa@gmail.com

Впервые выявлено наличие матриксной металлопротеиназы-2 и катепсиноподобной протеиназы D в препаратах, изготовленных из змей. Установлено, что исследуемые препараты характеризуются различной протеолитической активностью этих ферментов. Металлопротеиназа-2 обладает более высокой активностью сравнительно с катепсин-D-подобной протеиназой и вносит больший вклад в общую протеолитическую активность препаратов. Наибольшая активность металлопротеиназы-2 выявлена в препаратах, полученных из гадюки обыкновенной (*Vipera berus*) и гадюки степной (*Vipera ursini*).

Ключевые слова: протеолиз, металлопротеиназа-2, катепсиноподобная протеиназа D, змеи.