

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України  
Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки  
Національної академії наук України» Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**РАКША НАТАЛІЯ ГРИГОРІВНА**

УДК 577.112.7: 612.115

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПІДХОДІВ СТВОРЕННЯ  
БІЛКОВИХ ІННОВАЦІЙНИХ ПРОДУКТІВ З ГІДРОБІОНТІВ  
АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ**

03.00.20 «Біотехнологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

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



Н.Г. Ракша

Київ-2024

## АНОТАЦІЯ

*Ракиша Н.Г.* Розробка біотехнологічних підходів створення білкових інноваційних продуктів з гідробіонтів Антарктичного регіону. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія». – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України; Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» НАН України, Київ, 2024.

Дисертаційна робота присвячена розробці підходів створення технологій отримання інноваційних продуктів на основі білкових молекул (протеолітичні ферменти, колаген та його низькомолекулярні фрагменти) і пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону на основі застосування сучасних біотехнологічних методологій.

Перший розділ експериментальної частини роботи присвячено оцінці перспективності використання гідробіонтів Антарктичного регіону (морський гребінець *Adamussium colbecki*, морський їжак *Sterechinus neumayeri*, морська зірка *Odontaster validus*, криль *Euphausia superba*, немертина *Parborlasia corrugatus*, медуза *Diplulmaris antarctica*) як джерела молекул білкової природи для біотехнологічних цілей та виявленню видів, найбільш придатних для одержання окремих білкових молекул та пептидів. Було досліджено білковий профіль тканин гідробіонтів Антарктичного регіону та виявлено присутність білків у діапазоні молекулярних мас від 13 до 180 кДа, що підвищує ймовірність виділити з-поміж загального спектру білкових молекул ті, що можуть виявляти потенційно привабливі структурні чи функціональні характеристики. За результатами ензим-електрофоретичного аналізу з використанням різних субстратних білків всі досліджувані гідробіонти містили високо активні протеолітичні ферменти різної молекулярної маси, що

були здатні розщеплювати желатин, фібриноген та колаген, причому окремі гідробіонти виявляли вищу специфічність до того чи іншого субстратного білка. Найвищу активність щодо фібриногену було виявлено у тканинах *A. colbecki* та *S. neumayeri*, щодо колагену – у тканинах *S. neumayeri*, *O. validus* та *P. corrugatus*. Слід підкреслити, що фібриноген належить до досить специфічних субстратів і не всі ферменти здатні до його розщеплення, тому отримані результати є досить перспективними, так як у випадку підтвердження належності цих ферментів саме до фібрино(гено)літичних, відкривають перспективи використання гідробіонтів Антарктичного регіону як можливого джерела фібриногенолітиків. Згідно отриманих результатів, домінуюча частина протеолітичної активності у тканинах медузи, *A. colbecki* та *O. validus* представлена сериновими протеїназами, у той час тканини *P. corrugatus* містять переважно металозалежні ферменти. Отримані результати обґрунтовують можливість використання обраних видів гідробіонтів для одержання цільових білкових молекул, зокрема, серинових протеїназ, які є одними з найбільш поширених ферментів у промисловості і медицині, а також ферментів, здатних розщеплювати фібриноген. Крім того, достатній вміст білка дозволяє використовувати гідробіонти Антарктичного регіону для отримання фракції пептидів.

Другий розділ експериментальної частини роботи було присвячено розробці технологій очищення біотехнологічно перспективних ферментів, зокрема, фібрино(гено)літичних і серинових протеїназ, а також дослідженню їх основних фізико-хімічних характеристик і біологічної активності. У результаті порівняння ефективності декількох хроматографічних підходів для одержання фракції серинових протеїназ рекомендованим є 1) застосування афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі та елюція матеріалу, який зв'язався з хроматографічним носієм, буфером, що поєднує низьке значення рН і високий вміст солі для одноетапного одержання фракції серинових протеїназ; 2) застосування хроматографії на КМ-сефарозі чи ДЕАЕ-сефарозі

при рН 10,0 та елюція матеріалу, який зв'язався з хроматографічним носієм, буфером з 25 % NaCl для одержання фракції протеолітичних ферментів з різною будовою активного центру. Температурний оптимум серинових протеїназ з медузи при +55 °С та збереження активності в широкому діапазоні значень рН з максимальним проявом активності при рН 12,0 відкриває перспективи їх можливого використання у виробництвах, що потребують вищих температур та характеризуються нестійкістю або зміною значень рН впродовж технологічного процесу. Такий температурний оптимум, прояв максимальної активності при рН 12,0 і той факт, що тривала інкубація ферментів у сильнокислих чи сильнолужних буферах не приводила до зниження активності серинових протеїназ відкриває перспективи їх використання у виробництвах, що потребують вищих температур та характеризуються нестійкістю або зміною рН впродовж технологічного процесу.

Підхід, що поєднував два хроматографічні етапи – афінну хроматографію на СІТ-сефарозі та хроматографію, що поділяє за розмірами (носій супердекс 75), виявився ефективним для очищення трипсиноподібного ферменту. Із застосування запропонованого підходу з гідробіонту антарктичний морський гребінець *A. colbecki* було одержано трипсиноподібний фермент, який за молекулярною масою, здатністю розщеплювати зв'язки в утворенні яких задіяні залишки аргініну чи лізину, а також значенням рН оптимуму при рН 8,0 був подібний до канонічних трипсинів. Виявлена нами властивість трипсиноподібного ферменту зберігати активність при +8 °С, температурний оптимум при +24 °С та нестійкість молекули ферменту може бути досить перспективними характеристиками ферменту з позиції його можливого впровадження у біотехнологічні виробництва, що потребують нижчих температур перебігу процесу та можливостей швидкої інактивації каталізатору.

У результаті поєднання методів афінної хроматографії на блакитній сефарозі та хроматографії, що поділяє за розмірами (носій супердекс 200), з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону було одержано фібрино(гено)літичні ферменти, які за результатами інгібіторного аналізу належать до металопротеїназ (ферменти з *S. neumayeri*, *A. colbecki*) та серинових протеїназ (фермент з *O. validus*). Очищені фібрино(гено)літичні ферменти виявляли виражені антикоагуляційні властивості, зокрема, пригнічували АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів та специфічно розщеплювали молекулу фібриногену з утворенням фібриногену зі зниженою здатністю до полімеризації при додаванні тромбіну.

Третій розділ експериментальної частини роботи було присвячено отриманню пептидів та дослідженню їх деяких біологічних активностей та ефектів на моделях *in vitro* та *in vivo*. Було оптимізовано метод одержання пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону, який включав етап екстракції колагену та подальший його гідроліз з використанням фракції серинових протеїназ з медузи, одержаної в ході реалізації попереднього етапу роботи. Вперше проведено комплексне дослідження біологічних ефектів пептидів колагену з молекулярною масою нижче 5 кДа на моделі ожиріння у щурів та встановлено, що споживання фрагментів колагену т обумовлювало покращення загального метаболічного статусу, що виявлялося у зниженні динаміки зростання маси тіла; зниженні потягу тварин до споживання висококалорійного корму; нормалізації показників, що асоційовані з розвитком переддіабетичного стану (концентрація глюкози, рівень глікозильованого гемоглобіну, відносний вміст інсуліну). Споживання пептидів колагену також сприяло покращенню структурно-функціонального стану жирової тканини та зниженню відносного вмісту прозапальних цитокінів та тлі підвищення вмісту деяких протизапальних цитокінів.

Шляхом ферментативного гідролізу біомаси гідробіонту було отримано фракцію пептидів, що виявляли антиоксидантні властивості, підтвержені у

тесті визначення загальної антиоксидантної активності. Споживання тваринами з моделлю ожиріння фракції гідролізних пептидів сприяло нормалізації прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, що виявлялося у зниженні сироваткового рівня первинних, проміжних та кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів, продуктів окиснювальної модифікації білків на тлі підвищення супероксиддисмутази активності та зростання вмісту загальних сульфгідрильних груп. Профілактичний ефект щодо розвитку ожиріння реалізувався через вплив на функціонування периферійної серотонінергічної системи, свідченням чого є зниження концентрації сироваткового серотоніну. Одержані результати є досить перспективними з позицій можливого застосування пептидів з *A. colbecki* як основи для створення функціональних продуктів харчування або, у випадку очищення та виділення з-поміж суміші пептидів конкретних молекул, що виявляють вплив на функціонування периферійної серотонінергічної системи, і про створення препаратів для корекції порушень за ожиріння.

Було оптимізовано метод одержання ендогенних пептидів, який поєднував етапи поступового осадження високомолекулярних білків спочатку хлорною кислотою, а потім етиловим спиртом та подальше доочищення методом ультрафільтрації на мембранах з відсікаючою здатністю 10 кДа. Такий підхід дозволив отримати фракцію ендогенних пептидів з молекулярною масою до 5 кДа. Виявлено антиоксидантну та мембрано протекторну активність ендогенних пептидів з антарктичного криля *E. superba*. Встановлено модулюючий вплив ендогенних пептидів з криля *E. superba* та медузи на здатність тромбіну перетворювати фібриноген у фібрин, а також показано їх здатність пришвидшувати процес полімеризації плазми крові в експериментах *in vitro*. Виявлено здатність пептидів з криля *E. superba* викликати агрегацію тромбоцитів та впливати на секреторну функцію ендотеліоцитів. Результати щодо впливу пептидів з криля *E. superba* на секреторну активність ендотеліоцитів відкривають певні перспективи

їхнього використання як можливих засобів направленої регуляції гемостатичного балансу.

За результатами виконання дисертаційної роботи сформульовано положення наукової концепції по створенню технологій щодо використання біологічних ресурсів Антарктичного регіону на прикладі малоцінних видів гідробіонтів та потенційно інвазійних видів як альтернативного джерела молекул білкової природи для отримання на їх основі інноваційних біотехнологічних продуктів з метою використання у медицині та інших секторах промисловості. Оптимізовані у ході виконання роботи методи вилучення та очищення цих молекул інтегровано у загальний методологічний підхід створення технологій інноваційних продуктів на основі білкових молекул, який може бути рекомендовано для впровадження в пілотне біотехнологічне виробництво одержання цільових білкових молекул з гідробіонтів інших кліматичних зон.

**Ключові слова:** інноваційні білкові продукти, гідробіонти, Антарктичний регіон, фібрино(гено)літичні ферменти, серинові протеїнази, колаген, біологічно-активні пептиди

### **Наукові праці,**

#### **в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Kalmukova O, **Raksha N**, Vovk N, Halenova T, DzerzhynskyM, Mitrecic D, Savchuk O, Ostapchenko L. Low Molecular Mass Fragments of Collagen Improve Parameters Related to Mass and Inflammation of the Adipose Tissue in the Obese Rat. Food Technology and Biotechnology. 2023;61(1):51-63. DOI:10.17113/ftb.61.01.23.7926 (Scopus, **Q2**), *(здобувачем отримано низькомолекулярні фрагменти колагену з луски риб Антарктичного регіону та оцінено вплив їх вплив на індекс маси тіла тварин)*

2. **Raksha N**, Halenova T, Vovk T, Kostyuk O, Synelnyk T, Andriichuk T, Maievska T, Savchuk O, Ostapchenko L. Anti-obesity effect of collagen peptides obtained from *Diplulmaris antarctica*, a jellyfish of the Antarctic region. Croatian Medical Journal. 2023;64(1):21-28. DOI:10.3325/cmj.2023.64.21 (Scopus, **Q3**) (*здобувачем отримано колагенові пептиди з медузи, оцінено їх вплив на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та на показники, що характерні для стану інсулінорезистентності, інтерпретовано результати та підготовлено публікацію до друку*)
3. **Raksha N**, Halenova T, Vovk T, Beregova T, Maievska T, Tomchuk V, Savchuk O, Ostapchenko L. Isolation and partial characterization of serine proteases from jellyfish of the Antarctic region. Journal of Applied Biology and Biotechnology. 2023;11(2):144-150. DOI:10.7324/JABB.2023.110214 (Scopus, **Q3**) (*здобувачем розроблено методологію отримання фракції серинових протеїназ, досліджено їх температурний та рН оптимум, оцінено активність щодо різних білкових субстратів*)
4. **Raksha N**, Kalmukova O, Vovk T, Halenova T, Dzerzhynsky M, Savchuk O, Ostapchenko L. Effects of peptides derived from the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* on obese rats' adipose tissue histophysiology. Carpathian Journal of Food Science and Technology. 2021;13(4):24-34. DOI:10.34302/crpjfst/2021.13.4.3 (Scopus) (*здобувачем отримано фракцію гідролізних пептидів, оцінено вплив пептидів на показники, що асоційовані з розвитком ожиріння*)
5. **Raksha N**, Halenova T, Vovk T, Savchuk O, Tomchuk V, Maievska T, Ostapchenko L. Biologically active peptides derived from the Antarctic hydrobionts. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2021;11(08):126-133. DOI:10.7324/JAPS.2021.110817 (Scopus, **Q2**) (*здобувачем отримано фракцію ендогенних пептидів з гідробіонтів *Nacella concinna*, *Euphausia superba*, *Diplulmaris antarctica*, оцінено їх антиоксидантний потенціал, досліджено вплив на функціональну активність тромбіну та здатність фібриногену до полімеризації, інтерпретовано результати, підготовлено публікацію до друку*)



6. **Ракша Н**, Маєвська Т, Савчук О. Одержання пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. 2021;1(84):38-43. *(здобувачем оптимізовано метод отримання ендогенних пептидів з молекулярною масою нижче 5 кДа, підготовлено публікацію до друку)*
7. **Raksha N**, Halenova T, Kravchenko O, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. Purification and biochemical characterization of Trypsin-like enzyme from Antarctic Hydrobiont *Adamussium colbecki*. Research Journal of Biotechnology. 2020;15(1):1-7. (Scopus) *(здобувачем оптимізовано метод очищення трипсиноподібних ферментів з екстракту тканин гідробіонту *Adamussium colbecki*, проведено електрофоретичний аналіз одержаних ферментів, визначено температурний та рН оптимум, визначено кінетичні константи та підготовлено публікацію до друку)*
8. **Raksha N**, Udovychenko I, Halenova T, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. Purification and biochemical characterization of fibrino(geno)lytic enzymes from tissues of Antarctic hydrobionts. Ukrainian Antarctic Journal. 2020;1:69-81. DOI:10.33275/1727-7485.1.2020.380 *(здобувачем очищено фібрино(гено)літичні ферменти з екстракту тканин гідробіонтів *Parborlasia corrugatus*, *Sterechinus neumayeri* та *Odontaster validus*, визначено їх специфічність щодо ланцюгів фібриногену, оцінено амідазну активність, досліджено вплив ферментів на тромбоцити та коагуляційну ланку системи гемостазу, узагальнено результати, підготовлено публікацію до друку)*
9. Абрамова М, **Ракша Н**. Оптимізація методологічних підходів щодо одержання цільових білків із гідробіонтів Антарктичного регіону. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2019;2(78):7-13. *(здобувачем оптимізовано хроматографічний підхід щодо отримання цільових білкових фракцій з екстракту тканин гідробіонтів, проведено електрофоретичний аналіз отриманих фракцій, підготовлено публікацію до друку)*

10. **Raksha N**, Potalitsyn P, Yurchenko A, Halenova T, Savchuk O, Ostapchenko L. Prevention of diet-induced obesity in rats by oral application of collagen fragments. Archives of Biological Sciences. 2018;70(1):77-86. doi.org/10.2298/ABS170401027R (Scopus, **Q3**) *(здобувачем оптимізовано методику отримання колагену з луски риб Антарктичного регіону, отримано низькомолекулярні фрагменти колагену, оцінено показники, що характеризують антиоксидантно-прооксидантний баланс, досліджено цитокіновий профіль плазми крові та підготовлено публікацію до друку)*
11. **Raksha N**, Halenova T, Vovk T, Ishchuk T, Savchuk O, Ostapchenko L. Novel fibrinolytic metalloprotease from the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*). Advances in Marine Biology. Nova Science Publishers, Inc. 2018;3(1):1-28. (Scopus) *(здобувачем розроблено трьохстадійну схему очищення фібрино(гено)літичних ферментів на прикладі гідробіонту Adamussium colbecki, досліджено специфічність ферментів щодо ланцюгів фібриногену, визначено каталітичні константи, інтерпретовано результати та підготовлено публікацію до друку)*
12. Gladun D, **Raksha N**. Detergent-stable proteases from the antarctic scallop *Adamussium colbecki*. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;20(1):62-65. *(здобувачем проведено визначення протеолітичної активності у екстрактах тканин гідробіонту Adamussium colbecki за присутності детергентів)*
13. Нагірняк ОЮ, **Ракша НГ**, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Вплив низькомолекулярних фрагментів колагену, одержаних з луски риб Антарктичного регіону, на розвиток ожиріння. Український антарктичний журнал. 2016;15:128-136. *(здобувачем сформульовано концепцію дослідження, оптимізовано методику отримання колагену з луски риб Антарктичного регіону, отримано низькомолекулярні фрагменти колагену, інтерпретовано*

результати щодо впливу фрагментів колагену на динаміку розвитку ожиріння та підготовлено публікацію до друку)

14. Gladun D, **Raksha N**, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. New fibrinogenases isolated from marine hydrobiont *Adamussium colbecki*. Journal of Biochemistry International. 2016;3(1):9-18. (здобувачем оптимізовано метод отримання фібрино(гено)літичних ферментів, визначено активність одержаних ферментів методом ензим-електрофорезу та за використання хромогенних субстратів, оцінено належність ферментів до серинових чи металозалежних протеїназ, підготовлено публікацію до друку)

15. **Raksha N**, Gladun D, Savchuk O, Ostapchenko L. Protease composition in tissue extracts of hydrobionts from Antarctic region. Journal of Biology and Nature. 2016;1:39-46. (здобувачем оцінено присутність у тканинах гідробіонтів *Odontaster validus* і *Glyptonotus antarcticus* ферментів з різною будовою активного центру, інтерпретовано результати та підготовлено публікацію до друку)

16. Gladun D, **Raksha N**, Savchuk O, Ostapchenko L. Collagenolytic activity in tissue extract of *Parborlasia corrugatus* from Antarctic region. Biomedical Research and Therapy. 2015;9(2):354-358. DOI 10.7603/s40730-015-0021-1 (Web of Science) (здобувачем розроблено концепцію дослідження та оптимізовано умови отримання фракцій, збагачених на колагенолітичні ферменти)

17. Gladun D, **Raksha N**, Savchuk O, Ostapchenko L. Methodological approach to the isolation of functionally active proteins from the tissues of marine hydrobionts: an example of *Adamussium colbecki*. Advances in Polar Science. 2015;26(4):299-304. (здобувачем сформульовано підхід щодо комплексного аналізу протеолітичного профілю тканин гідробіонту *Adamussium colbecki* та проведено оцінку ферментативної активності у загальному екстракті тканин)

18. 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 здійснено формування концепції дослідження, проаналізовано білковий спектр тканин гідробіонтів криль, морська зірка, гігантська ізопода, антарктичний морський їжак, антарктичний морський гребінець та актинія)*

19. 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 оптимізовано умови хроматографічного розділення екстракту тканин гідробіонту *Adamussium colbecki* на окремі фракції та оцінено присутність у фракціях протеолітичних ферментів методом ензим-електрофорезу)*

20. Гладун ДВ, **Ракша НГ**, Савчук АН, Остапченко ЛІ. Перспективи получения колагенолитических ферментов с гидробионтов Антарктического региона. Український Антарктичний Журнал. 2015;1(14):175-179. *(здобувачем здійснено поділ екстракту тканин гідробіонту *Parborlasia corrugatus* на окремі білкові фракції методом хроматографії, що поділяє за розмірами, та проаналізовано протеолітичний профіль отриманих фракцій)*

21. 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;1(69):19-22. *(здобувачем підібрано умови отримання трипсиноподібних ферментів з екстракту тканин гідробіонтів методом афінної хроматографії та здійснено електрофоретичний аналіз отриманих фракцій)*

22. Гладун ДВ, **Ракша НГ**, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Використання електрофоретичних методів для експрес-аналізу білків морських гідробіонтів Антарктичного регіону. Український Антарктичний Журнал. 2014;1(13):192-197. *(здобувачем розроблено концепцію експериментальної частини публікації)*

23. 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 підібрано оптимальні умови розділення екстрактів тканин гідробіонтів криль, морська зірка, немертина методом хроматографії, що поділяє за розмірами)*

#### Окремі розділи в книгах:

24. **Raksha N**, Halenova T, Vovk T, Yurchenko A, Nikolaiava I, Savchuk O, Ostapchenko L. Prevention of diet-induced obesity in rats by administration of peptides derived from marine hydrobiont. In Advances in health and disease Vol. 11, 2019, Nova Science Publishers, Inc. New York, 165-199. *(здобувачем отримано фракцію гідролізних пептидів, досліджено стан антиоксидантно-прооксидантної системи та периферійної серотонінергічної системи, узагальнено результати, підготовлено публікацію до друку)*

25. **Raksha N**, Gladun D, Vovk T, Galenova T, Savchuk O, Ostapchenko L. New Fibrinogenases Isolated from Marine Hydrobiont *Adamussium colbecki*. In New Insights on Chemical Research Vol. 1 (E ISBN No: 978-93-89246-83-4). 2019, Book Publisher International, Chapter 13, 148-159. *(здобувачем розроблено методологію очищення фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонту *Adamussium colbecki*, здійснено біохімічну характеристику одержаних ферментів, узагальнено результати та підготовлено публікацію)*

#### Патенти України на корисну модель:

26. Савчук ОМ, Остапченко ЛІ, **Ракша НГ**, Галенова ТІ, Вовк ТБ, Джулай АО. Спосіб отримання трипсиноподібного ферменту з екстракту тканин медузи *Diplulmaris antarctica*. 2023, u202106489.

27. Савчук ОМ, Остапченко ЛІ, **Ракша НГ**, Галенова ТІ, Вовк ТБ, Маланчук ВМ. Спосіб отримання фібрино(гено)літичного ферменту з естракту тканин морського гребінця. 2023, u202106490.

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

28. **N.G. Raksha**, S.A. Shchypanskyi, T.M. Maievska, O.M. Savchuk. Effect of collagen peptides from the hydrobiont *diplulmaris antarctica* on obesity development. XI International Antarctic Conference Dedicated to the 160th Anniversary of the birth of Volodymyr Vernadsky – the first President of the Ukrainian Academy of Sciences, Founder of the Study of Noosphere. May 10–12 2023, Kyiv, Ukraine, Book of Abstracts, p. 45-47.

29. **Nataliia Raksha**, Tetiana Halenova, Tetiana Vovk, Olexiy Savchuk, Ludmila Ostapchenko. Antioxidant peptides derived from the antarctic hydrobionts. International Antarctic Conference Dedicated to the 25th Anniversary of Raising of the National Flag of Ukraine at the Ukrainian Antarctic Akademik Vernadsky Station. Kyiv, May 11-13, 2021, Kyiv, Ukraine, Book of Abstracts, p. 42-43.

30. **N. Raksha**, O. Savchuk, L. Ostapchenko. The Effect of the Fibrino(geno)lytic Enzymes from Tissues of Antarctic Hydrobionts on Hemostasis. ISTH 2020 Congress, July 12-14 2020. Virtual Congress, Abstract number: PB0765.

31. Л.О. Семенюк, **Н.Г. Ракша**, Т.М. Маєвська, О.М. Савчук. Розробка методологічних підходів до отримання пептидів з відходів рибної промисловості, що виявляють цільові активності. Міжнародна науково-практична конференція, присвяченої 90-річчю Київського національного університету технологій та дизайну та кафедри біотехнології, шкіри та хутра. 14-15 травня 2020, м. Київ, збірник тез, С. 46.

32. **N.G. Raksha**, A.Y. Yurchenko. Peptides derived from the tissues of hydrobiont of the Antarctic region as the substances for treatment of obesity induced metabolic

disorders. IX Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 60-річчю підписання Договору про Антарктику 959 р. 14-16 травня 2019, м. Київ, збірник тез, С.93.

33. D.V. Gladun, **N.G. Raksha**, A.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko. Obtaining and characterization of trypsin-like enzyme from antarctic scallop (*Adamussium colbecki*). VIII Міжнародна Антарктична конференція, присвячена 25-річчю приєднання України до договору про Антарктику. 16-18 травня 2017, м. Київ, збірник тез, С.53.

34. D.V. Gladun, **N.G. Raksha**, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko. Hydrolytic enzymes marine organisms as an instrument for investigating protein–protein interaction. FEBS Journal, 282 (Suppl. 1), 2015, Abstract number: P14-061, P. 146.

35. А. Сорокін, Д.В. Гладун, **Н.Г. Ракша**. Тестування екстрактів морських гідробіонтів Антарктичного регіону для виявлення цільових активностей. XIII International Scientific Conference of Young Scientists Shevchenkivska Vesna: Life Sciences, April 1-3 2015, Kyiv, Ukraine, Book of Abstracts, P. 87.

## ABSTRACT

*Raksha N.G.* Development of biotechnological approaches to creating innovative protein products from hydrobionts of the Antarctic region. – Qualification scientific work with the manuscript copyright. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine; Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

The dissertation is devoted to the development of approaches to the creation of technologies for obtaining innovative products based on protein molecules (proteolytic enzymes, collagen and its low-molecular-weight fragments) and peptides from hydrobionts of the Antarctic region based on the application of modern biotechnological methodologies.

The first part was devoted to the evaluation of the prospects of using hydrobionts of the Antarctic region (*Adamussium colbecki*, *Sterechinus neumayeri*, *Odontaster validus*, *Euphausia superba*, *Parborlasia corrugatus*, *Diplulmaris antarctica*) as a source of protein molecules for biotechnological purposes and to identify the species most suitable for obtaining individual protein molecules and peptides. The protein profile of the tissues of hydrobionts of the Antarctic region was investigated and the presence of proteins in the range of molecular masses from 13 to 180 kDa was revealed, which increases the probability of distinguishing from the total spectrum of protein molecules those that may exhibit potentially attractive structural or functional characteristics. According to the results of enzyme-electrophoretic analysis using different substrate proteins, all studied hydrobionts contained highly active proteolytic enzymes of different molecular weights that were able to split gelatin, fibrinogen, and collagen, and individual hydrobionts showed higher specificity for one or another substrate protein. The highest activity for fibrinogen was found in *Adamussium colbecki* and *Sterechinus neumayeri* tissues, and for collagen – in sea urchin, starfish, and sea urchin tissues. It should be emphasized that fibrinogen belongs to rather specific substrates and not all enzymes are capable of its cleavage, therefore, the obtained results are quite promising, since in the case of confirmation that these enzymes belong to fibrino(geno)lytic ones, they open the prospects of using the hydrobionts of the Antarctic region as a possible source of fibrinogenolytics. According to the obtained results, the dominant part of the proteolytic activity in the tissues of the *Diplulmaris antarctica*, *Adamussium colbecki* and *Odontaster validus* is represented by serine proteinases, while the tissues of nemertina contain mainly metal-dependent enzymes. The obtained results substantiate the possibility of using selected species of hydrobionts to obtain target protein molecules, in particular, serine proteinases, which are one of the most common enzymes in industry and medicine, as well as enzymes capable of splitting fibrinogen. In addition, the sufficient protein content allows the use of hydrobionts of the Antarctic region to obtain the peptide fraction.



The second part of the experimental part of the work was devoted to the development of purification technologies for biotechnologically promising enzymes, in particular, fibrino(geno)lytic and serine proteinases, as well as to the study of their main physicochemical characteristics and biological activity. As a result of the comparison of the efficiency of several chromatographic approaches for obtaining the fraction of serine proteinases, it is recommended 1) the use of affinity chromatography on benzamidine-sepharose and the elution of the material that has bound to the chromatographic carrier, a buffer combining a low pH value and a high salt content for one-step preparation of the fraction serine proteinases; 2) application of chromatography on KM-Sepharose or DEAE-Sepharose at pH 10.0 and elution of the material that has bound to the chromatographic carrier with a buffer with 25% NaCl to obtain a fraction of proteolytic enzymes with a different structure of the active center. The temperature optimum of serine proteinases from *Diplulmaris antarctica* at +55 °C and the preservation of activity in a wide range of pH values with the maximum manifestation of activity at pH 12.0 opens the prospects for their possible use in industries that require higher temperatures and are characterized by instability or changes in pH values during the technological process. Such a temperature optimum, the manifestation of maximum activity at pH 12.0, and the fact that long-term incubation of enzymes in strongly acidic or strongly alkaline buffers did not lead to a decrease in the activity of serine proteinases open up prospects for their use in industries that require higher temperatures and are characterized by instability or changes in pH over time technological process.

An approach that combined two chromatographic steps - affinity chromatography on SIT-sepharose and size separation chromatography (on superdex 75) – proved to be effective for the purification of the trypsin-like enzyme. Using the proposed approach, a trypsin-like enzyme was obtained from the hydrobiont of the Antarctic *Adamussium colbecki*, which was similar to canonical trypsins in terms of molecular weight, the ability to cleave bonds in the formation of which arginine or lysine residues are involved, as well as the pH value of the optimum at pH 8.0.

We discovered the property of the trypsin-like enzyme to maintain activity at +8 °C, the temperature optimum at +24 °C and the instability of the enzyme molecule can be quite promising characteristics of the enzyme from the point of view of its possible introduction into biotechnological productions, which require lower process temperatures and the possibility of rapid inactivation of the catalyst.

As a result of the combination of the methods of affinity chromatography on dove-sepharose and size-separating chromatography (on superdex 200), fibrin (gen)olytic enzymes were obtained from the tissues of hydrobionts of the Antarctic region, which, according to the results of the inhibitory analysis, belong to metalloproteinases (enzymes from *Stereochinus neumayeri*, *Adamussium colbecki*) and serine proteinases (an enzyme from *Odontaster validus*). Purified fibrino(gen)olytic enzymes showed pronounced anticoagulant properties, in particular, inhibited ADP-induced aggregation of platelets and specifically cleaved the fibrinogen molecule with the formation of fibrinogen with a reduced ability to polymerize upon addition of thrombin.

The third section of the experimental part of the work was devoted to the preparation of peptides and the study of some of their biological activities and effects on in vitro and in vivo models. The method of obtaining collagen peptides from fish scales of the Antarctic region was optimized, which included the stage of collagen extraction and its subsequent hydrolysis using the fraction of serine proteinases from *Diplulmaris antarctica* obtained during the implementation of the previous stage of work. For the first time, a comprehensive study of the biological effects of collagen peptides with a molecular weight below 5 kDa was conducted on a model of obesity in rats, and it was established that the consumption of collagen fragments led to an improvement in the general metabolic status, which was manifested in a decrease in the dynamics of body weight growth; reduction of animals' desire to consume high-calorie feed; normalization of indicators associated with the development of a prediabetic condition (glucose concentration, glycosylated hemoglobin level, relative insulin content). The consumption of collagen peptides also contributed to

the improvement of the structural and functional state of adipose tissue and a decrease in the relative content of pro-inflammatory cytokines and the background of an increase in the content of some anti-inflammatory cytokines.

By means of enzymatic hydrolysis of the hydrobiont biomass, a fraction of peptides was obtained that showed antioxidant properties, which were confirmed in the test for the determination of total antioxidant activity. Consumption of hydrolyzable peptide fractions by animals with an obesity model contributed to the normalization of pro-oxidant-antioxidant homeostasis, which was manifested in a decrease in the serum level of primary, intermediate and final products of lipid peroxidation, products of oxidative modification of proteins against the background of increased superoxide dismutase activity and an increase in the content of total sulfhydryl groups. The preventive effect on the development of obesity was realized due to the effect on the functioning of the peripheral serotonergic system, which is evidenced by a decrease in the concentration of serum serotonin. The obtained results are quite promising from the point of view of the possible use of peptides from sea scallop as a basis for the creation of functional food products or, in the case of purification and isolation from the mixture of peptides of specific molecules that have an effect on the functioning of the peripheral serotonergic system, and the creation of drugs for correction violations due to obesity.

The method of obtaining endogenous peptides was optimized, which combined the stages of gradual precipitation of high molecular weight proteins first with perchloric acid and then with ethyl alcohol and further purification by ultrafiltration on membranes with a cut-off capacity of 10 kDa. This approach made it possible to obtain a fraction of endogenous peptides with a molecular weight of up to 5 kDa. The antioxidant and membrane protective activity of endogenous peptides from *Euphausia superba* was revealed. The modulating effect of endogenous peptides from *Euphausia superba* and *Diplulmaris antarctica* on the ability of thrombin to convert fibrinogen into fibrin was established, and their ability to accelerate the polymerization of blood plasma in in vitro experiments was also shown. The ability

of *Euphausia superba* peptides to cause platelet aggregation and influence the secretory function of endotheliocytes was revealed. The results regarding the effect of peptides from *Euphausia superba* on the secretory activity of endotheliocytes open up certain prospects for their use as possible means of directed regulation of hemostatic balance.

According to the results of the dissertation work, the position of the scientific concept for the creation of technologies for the use of biological resources of the Antarctic region was formulated using the example of low-value species of hydrobionts and potentially invasive species as an alternative source of protein molecules for obtaining innovative biotechnological products based on them for use in medicine and other sectors of industry. The methods of extraction and purification of these molecules optimized during the work are integrated into the general methodological approach of creating technologies of innovative products based on protein molecules, which can be recommended for implementation in the pilot biotechnological production of obtaining target protein molecules from hydrobionts of other climatic zones.

**Keywords:** innovative protein products, hydrobionts, Antarctic region, fibrino(geno)lytic enzymes, serine proteinases, collagen, biologically active peptides

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....</b>	<b>26</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>27</b>
<b>РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНО-АКТИВНІ СПОЛУКИ З ГІДРОБІОНТІВ ЯК ОСНОВА ДЛЯ СТВОРЕННЯ СУЧАСНИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОДУКТІВ.....</b>	<b>37</b>
1.1. Сучасний ринок біотехнологічних продуктів на основі білкових молекул з гідробіонтів .....	37
1.2. Методологічні підходи до створення біотехнологічних продуктів на основі молекул з гідробіонтів .....	44
1.3. Перспектива подальшої розробки та впровадження цільових біотехнологічних продуктів на основі молекул з гідробіонтів..	51
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>	<b>61</b>
2.1. Реактиви та обладнання.....	61
2.2. Одержання екстрактів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону.....	62
2.3. Одержання фракції серинових протеїназ з медузи <i>Diplulmaris antarctica</i> Антарктичного регіону.....	62
2.3.1. Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ- та КМ-сефарозі.....	62
2.3.2. Афінна хроматографія на бензамідин-сефарозі.....	63
2.4. Одержання трипсиноподібного ферменту з гідробіонту антарктичний морський гребінець <i>Adamussium colbecki</i> .....	63
2.4.1. Афінна хроматографія на СІТ-сефарозі.....	64
2.4.2. 2.4.2. Хроматографія, що поділяє за розмірами на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG.....	64
2.5. Очищення фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів антарктичний морський гребінець <i>Adamussium colbecki</i> , морський їжак <i>Sterechinus neumayeri</i> , морська зірка <i>Odontaster</i>	64

	<i>validus</i> , криль <i>Euphausia superba</i> та немертина <i>Parborlasia corrugatus</i> .....	
2.5.1.	Афінна хроматографія на блакитній сефарозі.....	65
2.5.2.	2.5.2. Хроматографія, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200.....	65
2.6.	Одержання колагену та його низькомолекулярних фрагментів.	65
2.6.1.	Одержання колагену з луски риб Антарктичного регіону.....	65
2.6.2.	Одержання колагену з медузи <i>Diplulmaris antarctica</i> Антарктичного регіону.....	66
2.6.3.	Одержання низькомолекулярних фрагментів колагену.....	67
2.7.	Одержання фракції пептидів.....	67
2.7.1.	Одержання фракції ендогенних пептидів з антарктичного криля <i>Euphausia superba</i> та медузи <i>Diplulmaris antarctica</i> Антарктичного регіону.....	67
2.7.2.	Одержання фракції гідролізних пептидів з гідробіонту антарктичний морський гребінець <i>Adamussium colbecki</i> .....	68
2.8.	Електрофоретичні методи аналізу.....	68
2.8.1.	Приготування проб для електрофорезу.....	68
2.8.2.	Одновимірний диск-електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію.....	69
2.8.3.	Ензим-електрофорез (зимографія) у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію.....	70
2.8.4.	Двовимірний електрофорез.....	70
2.9.	Визначення загальної протеолітичної активності.....	71
2.10.	Визначення активності ферментів з використанням хромогенних субстратів.....	71
2.11.	Визначення активності фібрино(гено)літичних ферментів та оцінка їх впливу на здатність фібриногену до полімеризації....	72
2.12.	Визначення рН та температурного оптимуму ферментів.....	72

2.13.	Визначення кінетичних параметрів реакції гідролізу хромогенного субстрату puoGlu-Pro-Arg-pNA трипсиноподібним ферментом.....	73
2.14.	Агрегатометрія.....	73
2.15.	Проточна цитометрія.....	74
2.16.	Хронометричні тести.....	74
2.17.	Дослідження антиоксидантного потенціалу пептидів та їх мембрано протекторної активності.....	75
2.18.	Дослідження впливу пептидів на процес полімеризації фібриногену та на індуковане тромбіном згортання плазми крові.....	76
2.19.	Дослідження на моделях <i>in vivo</i> .....	76
2.19.1.	Відтворення моделі ожиріння, індукованого споживанням висококалорійного корму.....	77
2.19.2.	Відтворення моделі повношарових вирізаних площинних ран у щурів.....	78
2.20.	Отримання зразків біологічного матеріалу.....	79
2.21.	Гістологічні дослідження.....	79
2.22.	Оцінка планіметричних показників.....	80
2.23.	Визначення показників, що асоційовані з розвитком інсулінорезистентності.....	80
2.23.1.	Визначення концентрації глюкози у сироватці крові.....	80
2.23.2.	Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну.....	80
2.23.3.	Визначення відносного вмісту інсуліну.....	81
2.24.	Оцінка оксидативного балансу.....	81
2.24.1.	Визначення активності антиоксидантних ферментів.....	81
2.24.2.	Визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів...	82

2.24.3.	Визначення вмісту продуктів окиснювальної модифікації білків.....	82
2.24.4.	Визначення вмісту загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних груп.....	82
2.25.	Оцінка стану периферійної серотонінергічної системи.....	83
2.25.1.	Визначення концентрації серотоніну та триптофану.....	83
2.25.2.	Визначення моноаміноксигеназної активності.....	83
2.26.	Статистична обробка отриманих результатів.....	84
<b>РОЗДІЛ 3. ОЦІНКА ПЕРСПЕКТИВ ВИКОРИСТАННЯ ГІДРОБІОНТІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ ЯК ДЖЕРЕЛА МОЛЕКУЛ БІЛКОВОЇ ПРИРОДИ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ЦІЛЕЙ.....</b>		
		85
<b>РОЗДІЛ 4. РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ОДЕРЖАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНО ПЕРСПЕКТИВНИХ ФЕРМЕНТІВ З ГІДРОБІОНТІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ.....</b>		
		96
4.1.	Оптимізація методу одержання серинових протеїназ на прикладі медузи <i>Diplulmaris antarctica</i> Антарктичного регіону та загальна біохімічна характеристика одержаних ферментів...	96
4.2.	Одержання трипсиноподібного ферменту з морського гребінця <i>Adamussium colbecki</i> та дослідження його деяких фізико-хімічних і каталітичних властивостей.....	121
4.3.	Методологічні основи отримання фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону.....	139
4.3.1.	Оцінка антикоагуляційного потенціалу фібрино(гено)літичних ферментів, одержаних з гідробіонтів Антарктичного регіону...	156
<b>РОЗДІЛ 5. ПЕПТИДНІ МОЛЕКУЛ З ГІДРОБІОНТІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ, ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ ЗАСІБ КОРЕКЦІЇ МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ.....</b>		
		181



5.1.	Пептиди колагену з луски риб Антарктичного регіону як основа для створення функціональних харчових добавок.....	181
5.2.	Композиції на основі колагену з гідробіонтів Антарктичного регіону як потенційні ранозагоювальні засоби.....	209
5.3.	Одержання фракції ендогенних пептидів з гідробіонтів антарктичний криль <i>Euphausia superba</i> та медуза <i>Diplulmaris antarctica</i> та дослідження їх біологічних активностей .....	216
5.4.	Одержання фракції гідролізних пептидів з морського гребінця <i>Adamussium colbecki</i> та дослідження їх ефектів на моделі ожиріння у щурів.....	248
	<b>УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ .....</b>	<b>278</b>
	<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>290</b>
	<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>293</b>
	<b>ДОДАТОК А.</b> Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації.....	<b>338</b>
	<b>ДОДАТОК Б.</b> Витяг з протоколу засідання комісії з питань біоетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.....	<b>346</b>
	<b>ДОДАТОК В.</b> Довідка про впровадження результатів дисертаційного дослідження.....	<b>349</b>

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АДФ – аденозиндифосфат

АЧТЧ – активований частковий тромбопластиновий час

ДЕАЕ – диетиламіноетил

ДФПГ – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил

ДСН – додецилсульфат натрію

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

КМ – карбоксиметил

ІФА – імуноферментний аналіз

ПААГ – поліакриламідний гель

ПАІ-1 – інгібітор 1 активатору плазміногену

пНА – паранітроанілін

ПЧ – протромбіновий час

СІТ – соєвий інгібітор трипсинів

ТАП – тканинний активатор плазміногену

ТЧ – тромбіновий час

ФМСФ – фенілметилсульфоніл фторид

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Останніми роками на ринку біотехнологічних продуктів спостерігається тенденція до зростання частки продукції на основі молекул білкового походження (ферменти, структурні білки, білкові гідролізати, пептиди), що значною мірою пов'язано із зростанням споживчих запитів на використання засобів на основі природних молекул. Білки та пептиди є активною складовою багатьох фармацевтичних, косметичних препаратів, харчових добавок, входять до складу побутових засобів та функціональних дієтичних продуктів, білкові гідролізати знаходять застосування в агропромисловому секторі як кормові добавки та біостимулятори [1, 2]. Один з біотехнологічних напрямів передбачає активне використання ферментів, впровадження яких дозволяє оптимізувати існуючі виробничі алгоритми з урахуванням особливостей сировини та споживчих запитів, сприяє покращенню параметрів технологічних процесів та зниженню навантаження на довкілля через заміну хімічних підходів на більш екологічні ферментативні, дозволяє розвивати нові наукоємні напрямки. Обсяг світового ринку ферментів оцінюється в 60 млрд. доларів США в 2023 році, і очікується, що сукупний річний темп зростання складе 4,9 % з 2024 по 2030 рік. Стрімкі темпи розвитку спостерігаються і у сегменті препаратів на основі пептидних молекул, які з огляду на широкий спектр біологічних активностей, розглядаються як перспективні засоби не лише для профілактики розвитку захворювань, асоційованих з порушенням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги чи попередження розвитку ускладнень, супутніх патогенезу основного захворювання, а й для лікування таких хвороб як ожиріння, цукровий діабет 2-го типу, метаболічний синдром.

Отже, зростаюча потреба у білкових та пептидних молекулах з цільовими активностями актуалізує пошук доступних та економічно виправданих джерел сировини. Адже незважаючи на значні досягнення в області білкової інженерії

та розкриття основних молекулярних механізмів, що визначають структурно-функціональні взаємозв'язки в білкових молекулах, економічно доцільнішим є пошук та використання природних молекул, властивості яких відповідають запитам дослідників.

У цьому контексті, біологічні ресурси Світового океану можуть бути перспективним джерелом сировини. Не зважаючи на те, що біотехнологічний потенціал гідробіонтів досліджується досить інтенсивно [3-5], не так багато робіт, що присвячені одержанню та вивченню ефектів біологічно активних речовин з гідробіонтів Антарктичного регіону. Хоча, з огляду на особливості існування цих організмів, зокрема, понижені температури, та низку публікацій [6-8], які свідчать про наявність певних структурних і функціональних особливостей у сполук, одержаних з організмів, середовище існування яких характеризується екстремальністю умов, гідробіонти Антарктичного регіону можуть слугувати джерелом молекул з біотехнологічно привабливими властивостями. З-поміж гідробіонтів, достатньо перспективним може бути використання як сировини непромислових видів гідробіонтів, а також відходів рибної промисловості та переробки гідробіонтів, що є економічно і екологічно обґрунтованим, так як дозволяє одночасно вирішувати дві важливі задачі – забезпечує комплексне використання біоресурсів та частково сприяє вирішенню проблеми утилізації відходів. Раціоналізація підходів щодо використання біологічних ресурсів Світового океану продиктована не лише сучасними економічними реаліями, а й зростанням екологічної освіченості суспільства. В перспективі широке впровадження мають знайти підходи, які ґрунтуються на засадах глибинної переробки сировини, що дозволить значно збільшити обсяг і асортимент кінцевої продукції, а також знизить кількість відходів, утилізація яких потребує певних затрат і які є суттєвими факторами забруднення навколишнього середовища.

Тому оптимізація методів очищення білкових молекул з урахуванням особливостей вихідної сировини, їх інтеграція у загальний підхід створення

інноваційних біотехнологічних продуктів та дослідження ефектів отриманих молекул на модельних системах *in vitro* та *in vivo* є актуальним і визначає стабільно високий інтерес науковців до даної проблематики.

**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.); «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.) та науково-дослідних робіт за державною цільовою науково-технічною програмою проведення досліджень в Антарктиці на 2011-2023 роки: «Отримання та характеристика цільових біотехнологічних продуктів з тканин антарктичної медузи» (№ д/р 0121U112501, 2021 р.); «Отримання та характеристика пептидних молекул, що виявляють цільові активності, з гідробіонтів Антарктичного регіону» (№ д/р 0120U104207, 2020 р.); «Отримання та молекулярно-біохімічна характеристика фібрино(гено)літичних ферментів з морських гідробіонтів Антарктичного регіону» (№ д/р 0119U002995, 2019 р.); «Пептиди, отримані з антарктичного морського гребінця *Adamussium colbecki*, як потенційний засіб корекції метаболічних порушень організму, спричиненої розвитком ожиріння» (№ д/р 0117U004992, 2017 р.); «Пептиди колагену, отримані з луски антарктичних риб, як основа для створення засобів профілактично лікувальної дії на розвиток ожиріння та вивчення механізмів їх дії» (№ д/р 0116U007769, 2016 р.); «Скринінг потенційних об'єктів отримання препаратів білків та пептидів для фармакологічного застосування» (№ Н/1-2014, 2014 р.); «Розробка методологічних підходів та створення колекції препаратів білків та пептидів з антарктичних організмів» (№ д/р 0113U005690, 2013 р.); «Розробка

технологій отримання препаратів білків та пептидів з антарктичних організмів» (№ д/р 0112U008038, 2012 р.).

**Мета і завдання дослідження. Мета і завдання дослідження.** Метою дисертаційної роботи було розробити підходи для створення технологій отримання інноваційних продуктів на основі білкових молекул (протеолітичні ферменти, колаген та його низькомолекулярні фрагменти) і пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону та дослідити потенційні ефекти отриманих молекул на модельних системах *in vitro* та *in vivo*.

Відповідно до мети було сформульовано наступні **завдання**:

1. Оцінити можливість використання гідробіонтів Антарктичного регіону на прикладі видів морський гребінець *Adamussium colbecki*, морський їжак *Sterechinus neumayeri*, морська зірка *Odontaster validus*, криль *Euphausia superba*, немертина *Parborlasia corrugatus* та медуза *Diplulmaris antarctica*, як сировини для одержання молекул білкової природи для біотехнологічних цілей та ідентифікувати види, найбільш придатні для одержання окремих білкових молекул і пептидів.

2. Розробити технологію очищення фібрино(гено)літичних ферментів і серинових протеїназ з гідробіонтів Антарктичного регіону та дослідити основні фізико-хімічні характеристики і біологічну активність одержаних ферментів.

3. Розробити технологію створення інноваційної функціональної харчової добавки на основі пептидів з колагену луски риб Антарктичного регіону та оцінити її ефективність на моделі ожиріння щурів, індукованого споживанням висококалорійного корму.

4. Оцінити можливість застосування композицій на основі колагену, екстрагованого з луски риб та з тканин *D. antarctica*, як потенційного ранозагоювального засобу на моделі вирізаних площинних ран.

5. Розробити спосіб одержання з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону ендогенних пептидів з молекулярною масою до 5 кДа та провести

комплексну оцінку антиоксидантного потенціалу цих пептидів, а також дослідити їх потенційний вплив на функціонування окремих факторів системи гемостазу в тестах *in vitro*.

6. Одержати фракцію «гідролізних» пептидів з молекулярною масою до 5 кДа з біомаси гідробіонта *A. colbecki* та дослідити їх вплив на тригерні чинники виникнення порушень метаболізму (прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз, функціонування периферійної серотонінергічної системи) за ожиріння, індукованого споживанням висококалорійної дієти.

7. На основі отриманих результатів обґрунтувати можливість використання білкових молекул та пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону при створенні інноваційних біотехнологічних продуктів для біомедичного застосування чи використання в інших секторах сучасної економіки.

*Об'єкт дослідження* – підходи щодо створення інноваційних біотехнологічних продуктів на основі білків та пептидів

*Предмет дослідження* – методи отримання цільових молекул білкової природи, структурно-функціональна характеристика та оцінка біологічних ефектів отриманих молекул

*Методи дослідження* – у роботі використано методи афінної, іонообмінної хроматографії та хроматографії, що поділяє за розмірами (одержання ферментів); електрофоретичні методи – електрофорез в поліакриламідному гелі за денатуруючих умов, ензим-електрофорез, 2Д-електрофорез (аналіз білково-пептидного складу, оцінка гомогенності одержаних зразків, виявлення активних протеаз, визначення ізоелектричних точок); спектрофотометричні методи (визначення активності ферментів, вмісту окремих сполук, оцінка антиоксидантної, гемолітичної активностей); імуноферментний метод (визначення вмісту цитокінів та інсуліну); гістохімічні методи (виявлення гранул тучних клітин та волокон колагену); агрегатометрія та протокова цитометрія (оцінка функціонування

тромбоцитів), а також хронометричні тести та методи математичної статистики.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведено оцінку потенціалу окремих видів гідробіонтів Антарктичного регіону для отримання біотехнологічних продуктів, сформульовано концептуальні положення розроблення технологій використання біологічних ресурсів Антарктичного регіону на прикладі малоцінних видів гідробіонтів та потенційно інвазійних видів як альтернативного джерела молекул білкової природи для отримання на їх основі інноваційних біотехнологічних продуктів. Розроблено методологічні засади для створення цільових біотехнологічних продуктів на основі молекул білкової природи з гідробіонтів Антарктичного регіону від очищення цільових молекул і до тестування їх потенційних активностей на моделях *in vivo* та *ex vivo*.

Оптимізовано основні етапи одержання фібрино(гено)літичних ферментів з тканини гідробіонтів з урахуванням особливостей сировини; на прикладі одержання пептидів колагену запропоновано схему комплексної переробки сировини із застосуванням принципів економіки замкнутого циклу.

Результати дисертаційної роботи сприяють систематизації знань щодо фізико-хімічних та каталітичних властивостей ферментів з організмів, адаптованих до низьких температур середовища існування; дані щодо дослідження кінетичних характеристик трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* вносять певний вклад у розуміння механізмів біохімічної адаптації; отримані у роботі результати можуть бути використані у білковій інженерії під час конструювання молекул із заданими властивостями, характеристики яких би відповідали параметрам біотехнологічного процесу. Отримані в рамках роботи результати можуть бути використані як теоретичне підґрунтя під час розробки технологій створення фармакологічних засобів, дія яких є комплексною та спрямованою на покращення загального метаболічного



статусу організму, а також засобів направлених на корекцію чи попередження розвитку розладів у системі гемостазу.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати дисертаційної роботи можуть знайти практичне впровадження під час розробки технологій комплексного та раціонального використання біологічних ресурсів Антарктичного регіону і експериментально обґрунтовують можливість використання гідробіонтів цього регіону як сировини для одержання протеолітичних ферментів, фракцій біологічно активних пептидів та колагену. Отримані фібрино(гено)літичні ферменти можуть бути використані при створенні засобів діагностики та профілактики порушень у системі гемостазу чи у фундаментальній біології для дослідження білок-білкових взаємодій, вивчення закономірностей процесу полімеризації фібрину, досліджень взаємодій з іншими білками та як інструмент для спрямованого протеолізу фібриногену. Фібрино(гено)літичні ферменти з гідробіонтів Антарктичного регіону та серинові протеїнази можуть знайти застосування у медицині як складові ранозагоювальних засобів для лікування гнійно-некротичних уражень шкіри та м'яких тканин. Крім того, виражена колагенолітична активність серинових протеїназ з медузи, збереження активності у широкому діапазоні значень рН та за вищих температур відкриває перспективи їх потенційного використання за умов, що характеризуються нестійкістю чи зміною рН чи потребують підвищених температур, наприклад, обґрунтовує можливість використання серинових протеїназ з медузи Антарктичного регіону при переробці колагенвмісних відходів та/чи сировини.

Виявлена на моделі ожиріння, індукованого споживанням висококалорійної дієти, здатність пептидів, отриманих з колагену луски риб Антарктичного регіону та пептидів, отриманих шляхом гідролізу біомаси гідробіонтів, впливати на розвиток ожиріння, відкриває перспективи їх використання як нових лікарських засобів, складової біологічно активних добавок чи функціональних продуктів харчування, які спрямовані на

профілактику розвитку надмірної ваги та корекцію метаболічних розладів, що асоційовані з оксидативним стресом та порушенням енергетичного гомеостазу.

Розроблений у ході досліджень дизайн експерименту може слугувати прототипом під час планування досліджень подібного напрямку з використанням як сировини гідробіонтів інших кліматичних зон чи будь-якої білоквмісної сировини. Крім того, результати щодо біологічних ефектів білкових молекул з гідробіонтів потенційно можуть становити інтерес для державних та комерційних установ, діяльність яких пов'язана з розробкою та просуванням на ринок інноваційних лікарських засобів.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес під час викладання дисциплін «Лабораторний практикум з біохімії», «Методи практичної біохімії», «Молекулярні основи дії ферментів», «Методи очистки білків та пептидів», «Пілотні проекти в біотехнології», «Імунобіотехнології».

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, виконаним автором у рамках зазначених вище тем науково-дослідних робіт. Автором самостійно сформульовано концепцію роботи та розроблено структуру дослідження, обґрунтовано мету та задачі роботи, розроблено методологію експериментальних досліджень, проведено пошук і аналіз літературних джерел, сформульовано основні положення та висновки. Експериментальна частина дослідження була виконана автором особисто або за безпосередньої участі. Гістохімічний аналіз зразків жирової тканини було проведено спільно з доктором філософії (PhD) в галузі 091-біологія, асистентом кафедри цитології, гістології та репродуктивної медицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка Калмиковою О.О.; моделювання вирізаних площинних ран у щурів було здійснено за участі канд. біол. наук, завідувачої навчальної міжкафедральної лабораторії біомедицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені

Тараса Шевченка Степанової Л.І. Автор висловлює глибоку вдячність доктору біологічних наук, професору Савчуку О.М. за допомогу у створенні концепції дослідження та за слушні поради щодо методологічних аспектів роботи; доктору біологічних наук, професору Остапченко Л.І. за допомогу у формуванні основних положень дисертаційної роботи, а також всім колегам, співучасть яких у виконанні роботи відображена у спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертаційної роботи було апробовано на фахових конференціях: XI International Antarctic Conference Dedicated to the 160th Anniversary of the Birth of Volodymyr Vernadsky – the first President of the Ukrainian Academy of Sciences, Founder of the Study of Noosphere (Kyiv, 2023); X International Antarctic Conference Dedicated to the 25th Anniversary of Raising of the National flag of Ukraine at the Ukrainian Antarctic Akademik Vernadsky Station (Київ, 2021); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 90-річчю Київського національного університету технологій та дизайну та кафедри біотехнології, шкіри та хутра (Київ, 2020); The ISTH 2020 Virtual Congress; IX Міжнародній Антарктичній Конференції, присвяченій 60-річчю підписання Договору про Антарктику (Київ, 2019); VIII Міжнародній Антарктичній конференції присвяченій 25-річчю приєднання України до Договору про Антарктику (Київ, 2017); XIII International Scientific Conference of Young Scientists Shevchenkivska Vesna: Life Sciences (Kyiv, 2015).

**Публікації.** За результатами дисертаційної роботи опубліковано 35 наукових праць: 11 статей у фахових виданнях, затверджених МОН України; 3 статті у міжнародних фахових виданнях; 9 статей у виданнях, що індексуються міжнародними наукометричними базами даних Scopus та Web of Science; 2 розділи у монографіях, виданих закордонними видавництвами; 2 патенти на корисну модель; 8 матеріалів і тез доповідей на наукових конференціях та з'їздах.

**Структура та обсяг дисертації.** Структура дисертаційної роботи є типовою і включає вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати власних досліджень, заключення, висновки та список використаних літературних джерел, який нараховує 441 найменування. Дисертація викладена на 349 сторінках, з них основна частина займає 266 сторінок, робота містить 29 таблиць та 70 рисунків.

# РОЗДІЛ 1

## БІОЛОГІЧНО-АКТИВНІ СПОЛУКИ З ГІДРОБІОНТІВ ЯК ОСНОВА ДЛЯ СТВОРЕННЯ СУЧАСНИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОДУКТІВ

### 1.1. Сучасний ринок біотехнологічних продуктів на основі білкових молекул з гідробіонтів

За останній час значно зросла кількість публікацій, в яких морські організми розглядаються як джерело біологічно активних сполук. З морських організмів було отримано низку біологічно активних сполук, які викликають певну зацікавленість серед клініцистів та представників фарміндустрії. Окреме місце займають біотехнологічні продукти білкової природи – білки та, особливо в останні роки, в зв'язку зі значним попитом, пептиди, які позиціонуються як «біологічно активні молекули направленої дії». Отримання цього класу біотехнологічних речовин обмежується сировиною, яка повинна відповідати певним вимогам: якість, стабільність, кількість та дешевизна. Тому в даному сегменті розробки нових біотехнологічних продуктів актуальним є розширення джерел сировини за рахунок морських біоресурсів, наприклад, за рахунок антарктичного криля.

Світові розробки в даній області обґрунтовують можливість створення фармакологічних препаратів направленої дії на основі молекул, отриманих з морських гідробіонтів [9-11]. Існують певні технологічні підходи та створені препарати білкового походження з антарктичних організмів, які використовуються в медицині, косметології, агропромисловій галузь, харчовій промисловості. Кожного року інтерес до препаратів білкового походження з антарктичних організмів, переважно морських гідробіонтів, зростає, з'являються багато звітів, рекомендацій, розробок та наукових публікацій про перспективу розробок технологій виробництва біотехнологічних продуктів на

основі білків, а особливо пептидів, отриманих при переробці цієї сировини. Проте в Україні не існує на даний час біотехнологічних продуктів білкового походження з антарктичних організмів. Є певні науково-технологічні обґрунтування, наукові розробки та публікації про необхідність створення та впровадження технологій переробки антарктичних організмів, але це все потребує подальшого розвитку. Існує досить багато наукових статей про перспективу використання ферментних препаратів з антарктичного криля в якості біотехнологічних продуктів різного спектру дії та направленості [12, 13]. Це і медицина, косметологія, інші галузі, які потребують певних впроваджень з точки зору покращення виробництва продуктів чи послуг різного спектру дії. Останнім часом досить широко в науковій літературі обговорюються перспективи використання гідролізатів білків та окремих пептидів для створення на їх основі біотехнологічних продуктів [14, 15]. Що стосується, наприклад, використання антарктичних організмів як біотехнологічної сировини, то тут є певні переваги, пов'язані з низькою собівартістю, у порівнянні з традиційними джерелами білків та пептидів; можливістю використання відходів при переробці криля об'єктами харчової промисловості для створення біотехнологічного продукту; відсутність глобальних досліджень впливу окремих білкових компонентів антарктичного криля на перебіг окремих біохімічних процесів в організмі людини, в порівнянні знову таки з традиційними джерелами білків та пептидів. Все це разом створює досить привабливі передумови для розробки та тестування біотехнологічних продуктів білкової природи з антарктичних організмів різного спектру дії та впровадження.

Пептиди з вираженими біологічними активностями виявлені чи отримують з різних гідробіонтів – актиній, коралів, водоростів, бактерій, губок, молюсків, асцидій [16]. І якщо раніше досліджувалися властивості грубих екстрактів чи гідролізатів не надаючи значення ідентифікації діючої складової, то роботи останніх років сфокусовані на виявленні та очищенні з-

поміж суміші молекул тих, що обумовлюють ефекти, з перспективою включення цих біологічно активних молекул до складу лікарських, косметологічних засобів чи функціональних продуктів харчування.

Морські пептиди мають високу потенційну нутрицевтичну та лікарську цінність через широкий спектр біологічних активностей. Їх протимікробна, противірусна, протипухлинна, антиоксидантна, кардіопротекторна (антигіпертензивна, антиатеросклеротична та антикоагулянтна), імуномодуюча, знеболювальна, анксиолітична, антидіабетична, пригнічуюча апетит та нейропротекторна дії викликає зацікавленість фармацевтичної промисловості, як потенційних засобів для лікування та профілактики різних захворювань або як прототип для створення синтетичних аналогів.

Про перспективність створення комерційних засобів на основі білків та пептидів з морських організмів частково свідчить той факт, що у виробництві препаратів подібного типу задіяні такі відомі виробники як «Coralis Sea Solutions», «Biothalassol» (Франція), «Proper Nutrition», «Metagenics» (США), «Natural Factors Nutritional Products Ltd» та «Ocean Nutrition Canada Ltd» (Канада), «Nutrimarine Life Science AS» (Норвегія).

Аналізуючи сучасну літературу щодо особливостей ринку засобів на основі білкових молекул чи пептидів можна виділити декілька напрямків – включення в препарат натуральних молекул чи використання їх синтетичних аналогів. Перший випадок, то скоріше виключення, якщо мова йде про очищені молекули, у той час як другий – досить поширене явище.

Незважаючи на високу комерційну перспективність морських пептидів або їх похідних, впровадження таких засобів на ринок фармакологічних препаратів є досить складним процесом, необхідною умовою якого є проходження доклінічних і клінічних випробувань та схвалення Європейського органу з безпеки харчових продуктів (EFSA), Управління з

контролю за харчовими продуктами та ліками (FDA) і харчових продуктів для спеціального використання в медицині (FOSHU).

Прикладом пептидів, що отримали схвалення FDA і продаються як лікарські засоби є зіконотид (ziconotide). Зіконотид (Prialt®) – пептид, що складається з 25 амінокислотних залишків, був очищений з  $\omega$ -конотоксину морського конусного равлика *Conus magus*. Це був перший морський пептид, який отримав схвалення FDA у 2004 як анальгетик для лікування пацієнтів з хронічним больовим синдромом, зокрема, невропатичними болями [17]. Також він рекомендований для лікування пацієнтів з рефрактерністю до дії опіоїдів. Згідно клінічних даних анальгетичний ефект зіконотиду зберігається впродовж тривалого часу, і, на відміну від морфію, препарат не викликає залежності та пригнічення дихальної функції [18]. Оскільки морські гідробіоти не можуть забезпечити належну кількість сировини для масштабування виробництва, зіконотид був отриманий штучно шляхом хімічного синтезу. Схвалення зіконотиду FDA спонукало дослідників до вивчення властивостей інших конотоксинів для потенційного терапевтичного та клінічного застосування.

Деякі продукти, що містять як функціональний інгредієнт білковий гідролізат чи пептиди, отримали статус FOSHU, це, наприклад, Valturon® та Lapis Support™, обидва позиціонуються як такі, що виявляють гіпотензивну дію і рекомендовані до вживання пацієнтам з незначною гіпертензією [19]. Lapis Support™ доступний у вигляді напоїв, а Valturon® входить до складу 33 різних продуктів, включаючи безалкогольні напої, желе, порошкові супи та харчові добавки [20].

Ще один продукт PeptACE™, що отримав схвалення FOSHU, отримують шляхом ферментативного гідролізу тканин тунця *Katsuwonus pelamis* [21]. В традиційній японській кухні отриманий таким чином ферментований продукт – кацуобусі здавна використовують як інгредієнт під час приготування супів. Доведено, що діючою складовою, що забезпечує антигіпертензивний ефект PeptACE™, є біофункціональний пептид LKPNM, який значно знижує



систоличний кров'яний тиск у пацієнтів з легкою гіпертонією [22]. Окрім складової супів та навіть чаю, в Японії, цей очищений пептид, також продається у вигляді порошкоподібного інгредієнту та у формі таблеток, відомих як «Peptide ACE 3000». Схожі продукти також продаються у Сполучених Штатах під торговими назвами Vasotensin™ та у Канаді як Levenorm™ [23].

Прикладом засобів на основі натуральних пептидів є, зокрема, препарат Dermochlorella®, активним компонентом якого є олігопептид, екстрагований з зелених водоростей *Chlorella vulgaris* [24]. Наразі цей препарат продається як засіб догляду за шкірою.

Проте частіше природні пептиди використовуються як прототипи для синтезу хімічних аналогів [25], які задля посилення терапевтичного ефекту іноді кон'югують з іншими агентами. Так, монометилауристин Е є синтетичним аналогом високотоксичного пентапептиду доластатину 10, очищеного з морського моллюска *Dolabella auricularia*. Кон'югація монометилауристин Е з химерними антитілами проти CD30 значно підвищила його клінічну ефективність щодо деяких пухлин, такий підхід є прикладом адресної доставки ліків – фрагмент антитіла, зв'язуючись з CD30 на поверхні клітин лімфоми, забезпечував вибірккову доставку активної складової до пухлинних клітин, що мають специфічний антиген [26-28]. У 2011 році, FDA схвалила препарат Adcetris® на основі такої химерної молекули для лікування пацієнтів з лімфомою Ходжкіна, у яких виникли рецидиви після аутологічної трансплантації стовбурових клітин та для пацієнтів із системною антипластичною крупноклітинною пухлиною.

Проте набагато більше пептидних засобів знаходяться на різних стадіях клінічних чи доклінічних випробувань, як, наприклад, плітідепсин (plitidepsin) чи глембатумумаб ведотин (glembatumumab vedotin) відомий під назвою CDX011, які виявляють протипухлинну активність і знаходяться на I/II фазах клінічного тестування [29, 30]. Натуральний пептид кахалалід F (kahalalide F)

та його похідне елісидепсин (elisidepsin), які отримують з морського равлика *Elysia rufescens* знаходяться на I фазі клінічних досліджень як протипухлинні засоби [31, 32].

Варто відмітити, що незважаючи на високу ефективність деяких пептидів в експериментах *in vitro*, під час клінічних випробувань такі пептиди виявились не ефективними, або спричиняли побічні ефекти і тому були вилучені з подальших досліджень.

На ринку засобів на основі білкових молекул з гідробіонтів є ціла низка продуктів, які відносяться до харчових добавок і не потребують схвалення органів контролю за продуктами. Це, зокрема, Stabilium®200, Protizen®, Collagen NM, Glycollagen®, Marine Cartilage Powder, Protein M+, PeptiBal™, AntiStress24, Nutripeptin™, Seacure®, Fortidium Liquamen® та ін. [33]. Це переважно продукти, які отримують шляхом ферментативного гідролізу окремих частин гідробіонтів, відходів рибної промисловості [34]. Біологічні активності та призначення щодо споживання зазначених продуктів різні [35, 36]. Так, застосування Nutripeptin™, продукту на основі гідролізату м'язів тріски, та Hydro MN Peptide®, який отримують шляхом гідролітичного розщеплення відходів рибної промисловості понижує постпрандіальний рівень глюкози крові та полегшує симптоматику діабету 2-го типу [37, 38]. Окрім того, обидва продукти здатні впливати на зростання маси тіла, попереджуючи у такий спосіб прогресування ожиріння.

Засіб Seacure®, що в основі містить гідролізат хека (*Merluccius productus*), продається як дієтична добавка для покращення функціональної активності шлунково-кишкового тракту [39] та рекомендується як засіб зниження ступеню ураження тонкого кишківника у відповідь на терапію нестероїдними протизапальними препаратами [40], механізм його дії базується на стимуляції проліферації епідермальних та епітеліальних клітин. Fortidium Liquamen® позиціонується як засіб комплексної дії через його антиоксидантний, антистресовий ефекти та здатність знижувати глікемічний індекс [41, 42].

Імуномодулюючий ефект PeptiVal™ – ультра фільтрованого гідролізату білків акули, підтверджено клінічними дослідженнями на людях [43]. Запит споживачів на доступні безрецептурні засоби анксиолітичної дії спонукав виробників до впровадження на ринок нутрицевтиків чи харчових добавок на основі гідролізатів морського походження, які містять опіюїдні пептиди як активні інгредієнти [44]. Це, зокрема, Stabilium®, Gabolysat® PC60, Protizen® и Procalm®.

Говорячи про ринок продуктів на основі молекул з гідробіонтів не можна не згадати про цілий арсенал засобів на основі колагену, який має загальну назву морський колаген. Це, наприклад, Collagen NM, який містить суміш низькомолекулярних фрагментів колагену, екстрагованого з шкіри риб, та рекомендується як харчова добавка для посилення регенерації кістково-хрящової тканини, у той час як Glycollagen®, Marine Cartilage Powder та ProteinM+ позиціонуються як засоби для полегшення больових відчуттів у суглобах [45, 46]. Рибний желатин, який отримують шляхом гідролітичного розщеплення колагену з відходів переробки морепродуктів, таких як шкіра, кістки, луска та плавники риби є цінним джерелом білків. Рибний желатин зазвичай додають до складу протеїнових напоїв, протеїнових енергетичних батончиків, функціональних та спортивних продуктів харчування [47]. Пептиди колагену та желатину продаються як нутрицевтики для підтримки цілісності кісток, сухожиль, покращення здоров'я суглобів, лікування ламких нігтів, засоби для живлення волосся на шкірі голови [48]. Клінічні дослідження показали, що пептиди колагену беруть участь у синтезі хрящової матриці, і саме тому споживання пептидів колагену знижує біль у пацієнтів з остеоартритом. Тому вони є потенційними терапевтичними засобами для лікування остеоартриту та остеопорозу [49].

Окрім лікувально-профілактичних цілей, білки, очищені з тканин гідробіонтів, знаходять комерційне впровадження, як компоненти діагностичних чи експериментальних засобів. Так, GFP, зелений

флуоресцентний білок, був очищений з медузи *Aequorea victoria* і наразі активно використовується для маркування клітинних структур *in vitro* та *in vivo* [50]. За його виявлення, очищення та встановлення функцій дослідниці Осаму Шимомура, Мартін Чалфі та Роджер Ціен отримала Нобелівську премію у 2008 році.

Ще одним добре відомим прикладом застосування білків з морських гідробіонтів в експериментальній науковій роботі є білок KLN, який отримують з гемолімфи молюска *Megathura crenulata* і використовують як білок-носії під час імунізації тварин, як компонент вакцин, а також для лікування раку сечового міхура [51, 52].

Незважаючи на терапевтичну ефективність засобів на основі ферментів на сучасному фармацевтичному ринку не так багато препаратів, де активною складовою є протеази, отримані з організмів, що існують за понижених температур середовища, хоча такі засоби можуть бути більш ефективними через вищу питому активність ферментів у порівнянні з мезофільними аналогами [53]. Наприклад, каталітична ефективність трипсину з тріски у 17 разів вища, ніж у бичачого трипсину. Аналіз літератури свідчить, що на сьогодні Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA) схвалено 24 типи протеазних препаратів, з-поміж яких лише 5 містять протеази з психрофільних організмів.

Таким чином, аналіз ринку біотехнологічних продуктів на основі білкових та пептидних молекул з гідробіонтів свідчить про існування запитів на подібну продукцію.

## **1.2. Методологічні підходи до створення біотехнологічних продуктів на основі молекул з гідробіонтів**

Визначальним етапом створення біотехнологічних продуктів є отримання цільових молекул, які будуть входити до складу майбутнього продукту. В

залежності від вимог до ступеню гомогенності цільових молекул процедури отримання будуть включати різну кількість стадій та проводиться із використанням дещо відмінних методичних підходів. Ще одним важливим чинником, який необхідно враховувати при виборі процедури очищення, є джерело сировини. Зважаючи на можливість існування певних відмінностей фізико-хімічних характеристик молекул з морських організмів від тих, що зазвичай використовуються для створення препаратів та засобів, оптимізація існуючих та розробка нових методів їх очищення, а також вивчення їх властивостей є необхідним етапом. Отже, існуючі на сьогодні технології очищення молекул потребують оптимізації задля того, щоб можна було ідентифікувати та одержувати з гідробіонтів біологічно активні пептиди та білкові молекули. Суттєвою проблемою впровадження біоактивних пептидів як засобів для покращення стану здоров'я чи функціональних продуктів харчування для людей є необхідність перевірки та підтвердження їх ефектів не лише експериментах *in vitro*, а на відповідних моделях патологій у тварин.

Біоактивні пептиди або білкові гідролізати можна отримувати різними способами [54-56]. Відмінності у амінокислотному складі, послідовності розташування залишків амінокислот, довжині молекули обумовлюють застосування різних підходів для очищення біологічно активних пептидів. Більше того, застосування деяких методів може негативно вплинути на прояв біологічної активності очищеної молекули.

Хоча на сьогодні стратегія повного синтезу необхідної молекули є цілком можливою для багатьох відомих пептидів з гідробіонтів, економічно обґрунтованим застосування такого підходу є лише у випадку відносно структурно простих продуктів, як, наприклад синтез пептиду зіконотиду про який згадувалося у розділі 1.1. Іншим способом може бути напівсинтетичне виробництво, коли природна молекула піддається певним хімічним модифікаціям набуваючи у такий спосіб необхідних характеристик. В обох випадках мова йде про масштабування процесу одержання цільової молекули,

яке все ж таки передбачає одержання та дослідження властивостей молекули-прототипу задля виявлення встановлення взаємозв'язку між структурою та функцією та виявлення структурних ділянок у молекулі модифікація яких може покращити характеристики вихідної молекули.

Незважаючи на те, що метод органічного синтезу дозволяє налагодити виробництво потрібних кількостей цільових молекул у відносно короткі терміни, такий підхід є досить вартісним, трудомістким і потребує кропіткої роботи на етапах, що передують синтезу. Адже потрібно знати будову цільових молекул, що передбачає додаткове залучення технологій ідентифікації, одержання та належного очищення. З цих причин на сучасному етапі розвитку науково-технологічного прогресу перевага віддається скринінгу та очищенню молекул з використанням більш традиційних методів.

Узагальнена схема виявлення біологічно активних пептидів передбачає етап скринінгу вихідного екстракту чи гідролізату на присутність специфічної активності, фракціонування та подальше очищення конкретного пептиду, якщо задачею є отримати окремі молекули, що виявляють біологічну активність. Процедури екстракції можуть дещо різнитися з огляду на будову пептидної молекули, зокрема, чи це лінійна молекула чи циклічна. Перший етап екстракції циклічних пептидів передбачає використання органічних розчинників, зокрема, метанолу чи етилацетату [57, 58]. У подальшому метанольні чи етилацетатні екстракти концентрують і піддають обробці гексаном, дихлорметаном чи тетрачлорметаном, після чого частково очищений екстракт доочищують методом хроматографії, що поділяє за розмірами, та проводять елюцію цільових молекул більш полярними розчинниками. Процедура екстракції лінійних пептидів може включати комбінацію декількох хроматографічних підходів – так, водний екстракт спочатку ділять на фракції методом хроматографії, що поділяє за розмірами; отриману цільову фракцію концентрують та доочищують із застосуванням підходів іонообмінної хроматографії. В обох випадках, на останній стадії

доцільно застосувати обернено фазову хроматографію [59, 60]. У цілому, застосування методу екстракції молекул білкового походження органічними розчинниками, особливо якщо мова йде про промислові масштаби, є економічно не вигідним через дороговизну реагентів, тривалість методу та вплив на навколишнє середовище. Тому в сучасних умовах перевагу віддають таким методам, як екстракція шляхом надкритичної екстракції (SFE), екстракції розчинами під тиском, екстракція за допомогою ультразвуку (UAE), імпульсного електричного струму (PEF) технології мікрохвильової екстракції (MAE) [61-63].

Після процедури екстракції білки піддають гідролізу, під час якого відбувається утворення біоактивних пептидів, послідовності яких сховані у складі вихідної білкової молекули. Традиційним підходом для отримання суміші низькомолекулярних білків є застосування хімічного гідролізу, зокрема кислотного. Цей підхід особливо ефективний якщо сировиною є фібрилярні білки, наприклад, колаген. Кислотний гідроліз дозволяє в короткі терміни здійснювати деструктуризацію білоквмісної сировини до пептидів та амінокислот. Проте кислотний гідроліз передбачає значне нагрівання зразка, що є економічно невиправданим, особливо при масштабуванні процесу, а кінцевий гідролізат містить значну кількість солей, що обумовлює включення у процедуру очищення додаткового етапу знесолення. Крім того кислотний гідроліз викликає руйнування та рацемізацію деяких амінокислот, що негативно впливає на збереження та прояв цільових активностей [64]. Застосування лужного гідролізу як можливого варіанту хімічного гідролізу є значно менш поширеним, так як спричиняє утворення менш функціональних продуктів та продуктів з низькою поживною цінністю. Лужний гідроліз застосовують переважно на підготовчих стадіях, як первинну обробку, зокрема, колаген- і кератинвмісної сировини.

Відносно старим, але досить ефективним підходом, який не втрачає своєї актуальності та досить широко використовується для переробки білоквмісної

сировини та отримання гідролізатів з набором фрагментів різної молекулярної маси є ферментативна модифікація із застосуванням препаратів протеолітичних ферментів різної специфічності. Це можуть бути комерційні препарати на основі ферментів бактеріального походження – алкалаза, нейтраза чи флавозим, а також ферментів тваринного чи рослинного походження – трипсин, пепсин, папаїн, бромелаїн і субтилізин [65-67]. Як варіант можна використовувати нутроці риб як джерело високоактивних протеолітичних ферментів широкої субстратної специфічності, такий підхід є особливо доцільним у випадку комплексної переробки сировини, наприклад, відходів рибної промисловості, коли всі виробничі потужності по переробці та валоризації відходів об'єднані в один виробничий комплекс. Ферментативний гідроліз сировини застосовують для отримання молекул з перспективою їх використання у фармацевтичній промисловості та при одержанні молекул для харчової промисловості, так як відсутність жорсткої хімічної та фізичної обробки сировини дозволяє зберегти функціональну та харчову цінність отриманих молекул. Крім того, змінюючи такі параметри, як концентрація ферменту, температура, час екстракції та співвідношення вода/сировина можна контролювати ступінь гідролізу та молекулярну масу фрагментів, що утворюються. Отже, отримання біологічно активних пептидів залежить як мінімум від двох чинників: (1) первинної послідовності білкового субстрату та (2) специфічності ферменту(ів), що були використані для гідролізу. І хоча чіткий взаємозв'язок між будовою молекули та біологічною активністю пептидів ще до кінця не встановлено, на сьогодні ідентифіковано декілька структурних особливостей, які можуть впливати на прояв тієї чи іншої активності. Так, наприклад, антигіпертинзивна активність пептидів безпосередньо залежить від присутності у молекулі тирозину, фенілаланіну, триптофану, проліну, лізину, ізолейцину, валіну, лейцину та аргініну [68]; наявність позитивно заряджених амінокислот характерна для антимікробних пептидів [69]; такі амінокислотні залишки як гістидин, лейцин, тирозин,



метіонін і цистеїн, пов'язані з антирадикальною активністю пептидів [70], в той час як гідрофобні амінокислоти, такі як пролін і гідроксипролін, відіграють важливу роль в інгібуванні процесів перекисного окислення ліпідів [71].

У цілому для одержання та належного очищення з білкових гідролізатів пептидів, що виявляють біологічну активність, застосовують декілька методичних підходів. Це методи мембранного розділення, такі як нанофільтрація, ультрафільтрація, електромембранна фільтрація, які є зручними для одержання фракцій, збагачених на пептиди у певному діапазоні молекулярних мас [72, 73]. З огляду на той факт, що біологічна активність притаманна пептидам з молекулярною масою нижче 5 кДа, для фракціонування білкових гідролізатів зразок піддають фільтрації на мембранах з різною відсікаючою здатністю (MWCO) [74]. Для відділення пептидної фракції від нерозгідролізованого матеріалу використовують ультрафільтраційні мембрани з відсікаючим порогом 20 кДа та вище. Мембрани з MWCO 5-10 кДа використовують для фракціонування біологічно активних пептидів заданої молекулярної маси, а мембрани з відсікаючим порогом близько 0,2 кДа використовують для концентрування кінцевої пептидної фракції.

Доцільним є застосування технологій ультрафільтраційних мембранних біореакторів, коли в одному технологічному циклі поєднується ферментативний гідроліз білкової сировини та подальше відділення пептидної фракції шляхом ультрафільтрації [75]. Технологія дозволяє проводити послідовний ферментативний гідроліз білоквмісної сировини за допомогою багатоступінчастого рециркулярного мембранного реактора у поєднанні з ультрафільтраційною мембранною системою системою для фракціонування гідролізатів відповідно від заданого діапазону молекулярних мас [76].

Проте слід враховувати, що мембранні технології дозволяють одержувати лише загальну суміш пептидних молекул певної молекулярної маси без

врахування особливостей будови пептидних молекул. Очищення конкретних пептидів потребує поєднання методів мембранного розділення та, як приклад, хроматографічних методів. З точки зору масштабування процесу, затрати на одержання молекули із конкретною цільовою активністю мають бути оцінені у порівнянні з вартістю кінцевого продукту і з урахуванням необхідності включати в продукт саме очищену молекули. Саме тому напів- та препаративну хроматографію варто включати в процес очищення лише тоді, коли для комерціалізації продукту необхідною умовою є висока ступінь очищення активних пептидів. В процесі очищення важливим параметром є активність отриманої молекули. Крім того, по-можливості, необхідно знайти раціональні шляхи використання залишкової сировини чи побічних продуктів, що утворюються/накопичуються в процесі очищення цільових молекул. В протилежному випадку, ці всі чинники можуть обумовити завищену вартість кінцевого продукту, викликати додаткові труднощі, пов'язані з утилізацією побічних продуктів.

Отримання з сировини цільових молекул для створення біотехнологічних продуктів іноді передбачає проведення додаткових маніпуляцій для надання молекул відповідних характеристик чи посилення їх біологічних властивостей. Так, зокрема, активне використання желатину, отриманого з колагенвмісних відходів рибної промисловості, обмежується його нижчою температурою плавлення та гелеутворення [77]. Для покращення функціональних властивостей желатину використовують різні підходи, вибір яких визначається потенційною сферою застосування желатину. Це може бути змішування з іншими біополімерами (карагенани, хітозан, пектин) [78]; додавання пластифікаторів, у тому числі поліетиленгліколь, сахароза, гліцерин, сорбітол [79]; посилення міцності молекули шляхом введення хімічних зшиваючих агентів (глутаровий альдегід, гліоксаль) [80]. Оскільки зшиваючі агенти шкідливі для здоров'я це значно обмежує сфери застосування модифікованого у такий спосіб желатин, тому більше значення має

використання ферментів як зшиваючих агентів [81]. Опосередковане мікробною трансглютаміназою утворення поперечних зшивок між залишками  $\gamma$ -глутаміну і лізину підвищує температуру плавлення та гелеутворення, що може привести до покращення функціональних та реологічних властивостей желатину.

Говорячи про сучасні тенденції в області отримання білків, не можна не згадати про виробництво рекомбінантних ферментів, що може мати певні переваги, зокрема, у такий спосіб знімається залежність від сезонності сировини; рекомбінантні ферменти можуть бути отримані з використанням контрольованих систем, які можна оптимізувати задля підвищення продуктивності; можна застосовувати загальні стратегії очищення, напрацьовані для систем продукування рекомбінантних білків. Характеристики рекомбінантних трипсинів краще відповідають фармацевтичним стандартам і можуть забезпечити стабільне додаткове джерело ферментів для потреб медицини. Саме тому наразі триває активний науковий пошук та розробка систем експресії рекомбінантного трипсину з тріски у мікроорганізмах. Застосування сайт-направленого мутагенезу дозволяє покращувати характеристики та стабільність отриманого рекомбінантного аналога. Для експресії холодоадаптованих білків, у тому числі й трипсинів, зазвичай використовують *Escherichia coli* та *Pichia pastoris* [82], проте кожна з них має ряд недоліків і не дозволяє отримувати ферменти з належною активністю та у достатній кількості.

### **1.3. Перспектива подальшої розробки та впровадження цільових біотехнологічних продуктів на основі молекул з гідробіонтів**

З-поміж молекул, що мають значний біотехнологічний потенціал окреме місце займають ферменти, які активно використовуються у різних секторах промисловості, входять до складу багатьох лікарських засобів, є інструментом

під час проведення наукових експериментів. Біокаталіз є альтернативою хімічному синтезу, оскільки ферменти піддаються біодеградації, нетоксичні, їх отримують з відновлюваних джерел сировини, крім того вони характеризуються високою селективністю та приводять до утворення продуктів з високим виходом [83]. До 40 % промислових хімічних реакцій, що потребують органічних розчинників, є шкідливими для довкілля і можуть бути замінені на ферментативний каталіз [84]. Відтак, існуючий попит на ферменти спонукає, по-перше, до пошуку стабільного сировинного ресурсу задля отримання цих молекул; по-друге, до пошуку ферментів з певними властивостями і характеристиками задля їх використання у технологічних процесах чи створення ефективних препаратів.

І саме морське середовище може бути ресурсом для пошуку та одержання ферментів з унікальними властивостями, адже природні умови існування багатьох гідробіонтів, з-поміж яких понижені температури, солоність, тиск обумовлюють певні структурно-функціональні особливості молекул з цих організмів [85, 86]. Так, ферменти з гідробіонтів, температура існування яких нижче +10 °С, виявляють властивості (висока каталітична ефективність при нижчих температурах, термолабільність), які роблять їх зручними для застосування у харчовій промисловості, при переробці кормів, під час створення миючих засобів, у біоремедіації. Морські ферменти можуть бути ефективними добавками при виробництві харчових продуктів завдяки своїй специфічності, солестійкості, високій активності в широкому діапазоні значень рН. Дослідження гідробіонтів, середовище існування яких є екстремальним, привело до відкриття декількох ферментів, що виявляють потенційно корисні каталітичні властивості з позицій їх біотехнологічного використання [87, 88].

Незважаючи на той факт, що застосування морських ферментів має низку переваг у порівнянні з ферментами з інших джерел, говорити про їх активне впровадження у різні сектори промисловості та медицину поки що не можна.

Проте ферменти з морських організмів можуть бути унікальними за своїми властивостями молекулами, що не зустрічаються у наземних організмів, або це можуть бути ферменти аналогічні ферментам з наземних джерел, але з дещо відмінними характеристиками. Як, наприклад, трипсини, активність яких, на відміну від трипсинів з хребетних, залежить від присутності в середовищі іонів кальцію. Крім того характерною рисою трипсинів з безхребетних є низька стабільність молекули при кислих значеннях рН та значна кількість ізоформ [89]. Трипсин, очищений з *Mustelus mustelus* [90] зберігає високу активність при високих концентраціях NaCl (до 30 %), що робить можливим його впровадження у рибопереробну та харчову промисловість.

Серед гідробіонтів, найбільш дослідженими є ферменти, одержані з риб, зокрема, з тріски, сардини, тунця. Це переважно травні ферменти трипсин, пепсин, хімотрипсин, які на сьогодні використовуються у процесах холодного сичужного згортання молока, для екстракції каротинопротеїнів з відходів переробки креветок, для приготування гідролізатів та концентратів з відходів рибної промисловості, а також при виробництві сирів, приготуванні ікри та покращення стабільності молока [91].

Суттєвою перешкодою на шляху масштабування використання ферментів є певна обмеженість у доступності сировини, важливість належних умов зберігання сировини, недостатні економічні переваги пов'язані з вибором технології очищення, кількість побічних продуктів та наявність потенційних ризиків контамінації патогенами. Саме тому, морські гідробіонти, які є фактично необмеженим сировинним ресурсом, можуть бути ключем до розв'язання цієї проблеми і в цьому контексті варто звернути увагу на малоцінні види чи відходи переробки риби.

Проаналізувавши літературу можна знайти низку прикладів, що демонструють розумний та комерційно обґрунтований підхід по валоризації відходів рибної промисловості для отримання комерційно привабливих продуктів [92, 93]. Наочними прикладами є, зокрема, переробка мантий

*A. colbecki* для одержання колагену та колагенових пептидів, які надалі використовуються в косметичній промисловості для створення покращеного продукту спрямованого на відновлення пошкодженого волосся; біомедичне застосування  $\beta$ -хітину, отриманого із продуктів переробки кальмару; застосування травного соку гідробіонтів морського вушка та *A. colbecki*, збагаченого на гідролітичні ферменти, для розщеплення кристалічної целюлози з відходів рослинного походження у глюкозу.

Значний біотехнологічний потенціал мають ферменти з психрофільних організмів, використання яких зменшує споживання електроенергії; знижує ризик мікробного забруднення та вплив високих температур на кінцевий продукт. Психрофільні ферменти можуть каталізувати реакції при температурах, за яких конкурентні небажані хімічні реакції сповільнюються. Ця властивість особливо актуальна в харчовій промисловості, де псування та втрата термолабільних поживних речовин може відбуватися навіть за кімнатної температури. Крім того, висока питома активність ферментів з психрофільних організмів дозволяє використовувати менші кількості ферментів, а їх низька термостабільність дозволяє керувати перебігом ферментативної реакції змінюючи температуру реакційного середовища.

Систематичне дослідження взаємозв'язків між структурою та функцією ферментів з психрофілів, їх порівняння з мезофільними аналогами є необхідним для виявлення структурних особливостей, які забезпечують функціонування ферментів за понижених температур і які можуть бути використані для конструювання штучних ферментів із заданими властивостями.

Окрім промислового застосування, протеїнази досить активно використовуються у медицині під час лікування септичних станів, псоріазу, фіброзів, порушень процесів травлення, при лікуванні серцево-судинних захворювань, та ранових уражень [94, 95]. Проте більшість ферментів, що схвалені FDA, отримані з мезофільних організмів. Але використання

ферментів з психрофільних організмів може мати низку переваг, що пов'язані з функціональними властивостями цих ферментів, у тому числі їх високою каталітичною ефективністю та можливістю контролювати прояв ферментативної активності за рахунок зміни температури.

Перспективність використання ферментів з гідробіонтів можна проілюструвати на прикладі трипсину, одержаного з атлантичної тріски (*Gadus morhua*). Цей фермент може бути досить ефективним антипатогенним засобом – експериментальні дані на моделях *in vitro* підтверджують високу антипатогенну активність трипсину щодо вірусу герпесу HSV-1 та респіраторно-синцитіального вірусу RSV, двох найбільш поширених патогенних вірусів при інфекціях верхніх дихальних шляхів [96,97]. Більш того, дослідження *in vivo* підтвердили ефективність включення трипсину у засоби для загоєння ран [98]. Очевидно, висока активність трипсину з тріски по відношенню до високомолекулярних нативних білків відіграє визначальну роль в його ефективності проти патогенів та позитивному впливі на процеси гоєння ран – згідно результатів [99] трипсин з тріски у 3-12 рази ефективніше розщеплює нативні білки ніж бичачий трипсин. Вважається, що здатність трипсину з тріски ефективно розщеплювати поверхневі білки патогенів є основою його антипатогенної дії. На разі, трипсин з тріски проходить клінічні випробування як засіб проти метицилін-резистентного золотистого стафілокока (MRSA), який є однією з найпоширеніших внутрішньо лікарняних бактеріальних інфекцій [100]. Формуючи біоплівки на ранах, бактерії стають дуже стійкими до традиційної терапії антибіотиками. Роботами [101] показано, що трипсин з тріски може знижувати адгезію цих бактерій до клітин.

Незважаючи на всі переваги та перспективи активного впровадження ферментів з психрофілів чи інших організмів, що існують за екстремальних умов середовища, є низка викликів, які суттєво сповільнюють цей процес. Це, зокрема, 1) відсутність можливості отримувати необхідні молекули (у тому

числі й ферменти) у значних кількостях; 2) необхідність налагодження більш тісної співпраці та взаємодії між науковцями і представниками промисловості на початкових етапах розробки продукту, щоб компенсувати недостатнє фінансування фундаментальних досліджень; 3) необхідність створення або покращення шляхів передачі технологій і напрацьованих результатів до всіх зацікавлених сторін задля розповсюдження передового досвіду у цій сфері.

Відкриття біорегуляторної ролі ендогенних пептидів, а також розуміння молекулярних механізмів дії деяких нових біоактивних пептидів, отриманих з природних джерел, на специфічні клітинні мішені сприяли тому, що пептиди почали розглядати як можливі кандидати в лікарські засоби. Дослідження властивостей лінійних та циклічних пептидів, одержаних з морських гідробіонтів, значно розширили існуючі уявлення про механізми дії таких пептидів та стали передумовою для нових фармацевтичних розробок на основі оригінальних механізмів фармакологічної активності.

Дієтотерапія є одним з важливих інструментів покращення здоров'я. Будь який харчовий компонент, який після надходження до шлунково-кишкового тракту здатен позитивно впливати на фізіологічний стан організму, може розглядатися як потенційний кандидат для профілактики захворювань та підтримання здоров'я. З цих позицій пептиди через притаманний їм широкий спектр біологічних активностей привертають значну увагу [102]. Досить перспективним напрямком, який на сьогодні активно розвивається, є застосування пептидів як інгредієнтів функціональних дієт – пептиди використовують як підсолоджувачі, стабілізатори кольору, загущувачі, посилювачі смаку [103, 104]. Біоактивні пептиди також можуть покращувати якість харчових продуктів впливаючи на здатність утримувати вологу чи жири, пептиди забезпечують підтримання колоїдної стабільності та належної в'язкості готового продукту [105]. Одним із перспективних напрямків застосування антиоксидантних пептидів є переробка морепродуктів. Рибні продукти зазвичай збагачені на ненасичені жирні кислоти, такі як



ейкозапентаєнова кислота (ЕПК) та докозагексаєнова кислота (ДГК), які надзвичайно нестабільні за впливу світла та високих температурах і поступово розпадаються на альдегіди та кетони, що призводить до погіршення якості рибної продукції. Гідролізати та пептиди можуть не лише ефективно контролювати окислення ліпідів при зберіганні, але також покращують смак та підвищують харчову цінність продукту.

У цілому, широкий спектр біологічних активностей гідролізних пептидів, а також можливість отримувати пептиди з тими чи іншими характеристиками у залежності від параметрів процесу гідролізу та очищення відкриває перспективи їх використання у медицині, наприклад, для створення ранозагоювальних засобів. Нанесення композитів на основі анимікробних пептидів на ранову поверхню у мутантних тварин ob/ob покращувало реепітелізацію та пришвидшувало утворення грануляційної тканини [106]. Колагенові пептиди через виражені хемотаксисні властивості стимулюють міграцію та проліферацію клітин, що є необхідною умовою для ефективного гоєння ран [107]. В літературі представлено роботи [108] щодо перспективності застосування губок на основі колагену як кровоспинного засобу. Фізико-хімічні характеристики колагену чи його фрагментів дозволяють створювати ранозагоювальні засоби у різній формуляції з огляду на походження ран та стадію ранового процесу. Так, практичне застосування у лікування ран можуть знайти колагенові гелі, плівки, мембрани.

Значний антиоксидантний потенціал пептидів, отриманих з морських гідробіонтів, їх здатність пригнічувати утворення оксиду азоту та низки простагландинів, може бути аргументом на користь включення таких пептидів у терапію та профілактику інфекційних захворювань та часткової заміни синтетичних антиоксидантів при лікуванні захворювань подібного спектру [109, 110].

Незважаючи на досить спектр біологічної активності пептидів, одержаних з гідробіонтів, у літературі мало інформації щодо пептидів з

антикоагулянтними властивостями, проте враховуючи динаміку зростання патологій системи гемостазу, а також коштовність та наявність побічних ефектів у традиційних антикоагулянтних засобів, пошук пептидів, що здатні впливати на функціонування системи гемостазу, не втрачає своєї актуальності. Пептиди з антикоагулянтною активністю було одержано з таких морських організмів як морський ехіуроїдний черв'як, морська зірка, голуба мідія, більш того білки-антикоагулянти були очищені із стулок *Anadara ovalis* та плавників *Limanda aspera*. Антикоагулянтна властивість цих пептидів, оцінена за значенням активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТВ), протромбінового часу (РТ) та тромбінового часу (ТР) була подібна до активності гепарину.

Говорячи про можливості і перспективи застосування пептидів варто згадати про терапевтичний потенціал глікозильованих пептидів, адже успішна розробка засобів на основі пептидних молекул потребує певної оптимізації їх фармакологічних профілей. І саме глікозилювання може бути багатообіцяючою стратегією модулювання фізико-хімічних властивостей пептидних препаратів та покращення їх всмоктування через біологічні мембрани. Через глікозилювання можна покращити біорозподіл пептидів у тканинах, підвищити проникність окремих пептидів через біологічні мембрани, підвищити їх метаболічну стабільність, знизити швидкість виведення та стабілізувати фізичні властивості пептидів, такі як осадження, агрегацію [111-113]. У роботі Hong et al. [114] показано, що глікозилювання пептидів желатину із шкіри риб приводило до значного зростання їх антиоксидантної та антимікробної активностей. Є дані щодо залучення глікозильованих пептидів у розвиток неспецифічної і адаптивної імунної відповіді, запальних реакцій [115]. Глікозильований пептид, отриманий в результаті процесингу відходів камбали знижував продукцію прозапальних цитокінів IL-6, IL-1 $\beta$ , фактору некрозу пухлин TNF, пригнічував функціональну активність ядерного фактору NF- $\kappa$ B та MAPK-залежних

сигнальних шляхів [17]. Розуміння впливу глікозилювання на фармакологічні властивості пептидів необхідне для раціонального дизайну глікопептидів із підвищеною біологічною активністю. Ринок пептидних препаратів демонструє стабільну динаміку до зростання і все більше компаній, що займаються виробництвом лікарських засобів, звертають свою увагу на цей сегмент, інвестують у проведення відповідних наукових досліджень для розширення кейсу продуктів. Це, зокрема, такі компанії як Eli Lilly and Company, Pfizer, Inc., Amgen, Inc., Bristol-Myers Squibb Company, EVER NEURO PHARMA GMBH, Takeda Pharmaceutical Company Limited, Davigo Foods International, Tokiwa Yakuhin Co., Ltd., Reliv, Inc., Valio Ltd. та інші.

Поряд з ферментами та пептидами гідробіонти можуть слугувати джерелом для отримання структурних білків у тому числі й желатину. Будучи унікальним гідрокolloїдом з винятковими характеристиками, морський желатин знаходить широке застосування як у харчовій, так і у фармацевтичній промисловості. Він широко використовується як гелеутворювач, загусник, піноутворювач і емульгатор [116, 117]. Желатин також вважається легкозасвоюваним дієтичним продуктом, ідеальним для певних типів дієт, особливо як харчова добавка. Отже, желатин класифікується як самостійний харчовий продукт, який не підпадає під дію європейського законодавства про харчові добавки.

Проте, незважаючи на його широке використання у харчовій, фармакологічній та косметологічній промисловості, існують певні моменти пов'язані з релігійними обмеженнями на споживання продуктів на основі молекул з тканин ссавців чи певні морально-етичні упередження. Комплекс соціокультурних парадигм та проблем безпечного використання тваринної продукції для одержання цільових молекул обумовив інтенсивні дослідження по виявленню та розробці альтернативних джерел для одержання желатину та колагену. Саме гідробіонти можуть бути можливим шляхом вирішення наростаючої потреби у забезпеченні виробництва сировиною для одержання

желатину та колагену [118]. І хоча желатин, одержаний з гідробіонтів, є кращою альтернативою желатину з ссавців з етичної та релігійної точок зору, такі його властивості, як низька температура плавлення та недостатня міцність, впливають на його комерційне застосування і виробництво морського желатину становить лише близько 1 % від річного світового виробництва желатину. Тому одержання желатину для комерційних цілей передбачає введення додаткового етапу, спрямованого на модифікацію структури молекули желатину. Орієнтуючись на світові тенденції та враховуючи існуючі потреби і запити на доступну та недорого продукцію Україна має приділяти належну увагу розробці засобів на основі білкових молекул. Керуючись принципами циркуляційної економіки і використовуючи як сировину для одержання цільових білкових молекул білоквмісні відходи різних секторів промисловості. Перевагами таких продуктів перед існуючими аналогами перш за все може бути їх нижча собівартість, або відсутність на біотехнологічному ринку України (а можливо і світовому ринку) певних аналогів створеної біотехнологічної продукції. Це, в свою чергу, може дозволити Україні по-перше відмовитись від імпорту певних біотехнологічних продуктів (якість яких, ще потрібно підтверджувати, враховуючи появу з кожним роком все більшої кількості неякісної продукції), або експорт певних біотехнологічних продуктів на закордонні ринки біотехнологічної продукції. Можливо створення, так званих, *in bulk* форм біотехнологічної продукції, для продажу їх іншим біотехнологічним компаніям (шлях, по якому досить успішно йде азійський ринок біотехнологічних продуктів). Це може ще знизити собівартість цих біотехнологічних продуктів та можливість уникнення необхідності в створенні певних виробничих приміщень певних категорій складності. Зважаючи на все вищенаведене, представляє певний інтерес розробка оптимальних методологічних підходів для отримання, тестування білків та пептидів з антарктичних організмів з метою подальшого впровадження цих білкових молекул у біотехнологічне виробництво.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Реактиви та обладнання

У роботі було використано наступні реактиви та обладнання: акриламід, N,N'-метиленбісакриламід, персульфат амонію, N,N,N',N'-тетраметилен-1,2-діамін,  $\beta$ -меркаптоетанол, барвник Кумасі діамантовий синій (Sigma-Aldrich, США), маркери молекулярних мас білків для електрофорезу (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), ЕДТА, ПМСФ (Serva, США), хромогенні субстрати N $\alpha$ -benzoyl-L-Arg-pNA, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, pуроGlu-Pro-Arg-pNA, Bz-Ile-Glu( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-pNA, H-D-Val-Leu-Lys-pNA, N- $\alpha$ -p-tosyl-L-Arg-methylester (Chromogenix, Швеція), хроматографічні носії сефадекс Ж 25 (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), ДЕАЕ- та КМ-сефароза, голуба сефароза (Pharmacia, Швеція), хроматографічні колонки HiLoad 16/60 Superdex 75 PG і HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE HealthCare, США), електрофоретична система Mini-Protean Tetra Cell та електрофоретична система для 2Д-електрофорезу Protean IEF, хроматограф низького тиску BioLogic LP System, спектрофотометр SmartSpec™Plus, (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), спектрофлюориметр RF-1501 (Shimadzu, Японія), мікропланшетний спектрофотометр  $\mu$ Quant (BioTek Instruments), коагулометр (Rayto Life and Analytical Sciences, Китай), агрегометр (Медицина-Техніка, Білорусь), центрифуга з холодильником Allegra™64R та протоковий цитометр DxFLEx (Beckman Coulter Life Sciences, США), концентратори центрифужні (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Магнітні мішалки, піпетки автоматичні, термостат, шейкер, водяна баня та ін. є продукцією фірм, що працюють згідно стандарту ISO 9001. Пластиковий лабораторний посуд (планшети для імуноферментного аналізу, планшети з несорбуючою поверхнею, пластикові мікропробірки типу епендорф,) отримано від фірми Costar і ColeParmer (США). Скляний

лабораторний посуд (колби, стакани, пробірки, циліндри та ін.) отримано від фірм Kimax і Wheaton (США).

## 2.2. Одержання екстрактів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону

Як вихідний матеріал для одержання молекул білкової природи було використано заморожену масу гідробіонтів Антарктичного регіону – морського гребінця *Adamussium colbecki*, морського їжака *Sterechinus neumayeri*, морської зірки *Odontaster validus*, криля *Euphausia superba*, немертини *Parborlasia corrugatus* та медузи *Diplulmaris antarctica*. Об'єкти для дослідження було надано Національним антарктичним науковим центром. Зразки було зібрано біля острова Галіндез (географічні координати – 65°15' південної широти, 64°15' західної довготи) архіпелагу Аргентинські островів в рамках антарктичних експедицій. Солоність води біля острова складала 28,4-32,2 ‰, температура 1,1-0,8 °С.

Для одержання екстрактів тканин заморожену масу м'яких тканин гідробіонтів зважували та ретельно перетирали до порошкоподібного стану додаючи рідкий нітроген. Після чого переносили в гомогенізатор, додавали екстрагуючий розчин – 0,1 М трис-НСІ буфер (рН 7,4), що містить 130 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА, 0,25 % сахарозу, 0,5 % тритон Х-100 та гомогенізували впродовж 10 хв. Екстрагуючий розчин додавали з розрахунку 5 мл розчину на кожні 10 грам матеріалу. Проби залишали на 15 хв при +4 °С на лабораторному струшувачі з невеликою амплітудою, після чого центрифугували при 800 g впродовж 15 хв. Надосадову рідину піддавали повторному центрифугуванню (10 000 g, 30 хв), Очищені фракції ліофілізували та використовували для подальших досліджень. Перед безпосереднім використанням ліофілізати розчиняли у буфері, що визначався подальшим метод, та очищали методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці з носієм сефадекс Ж 25.

## **2.3. Одержання фракції серинових протеїназ з медузи Антарктичного регіону *Diplulmaris antarctica***

### **2.3.1. Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ- та КМ-сефарозі**

Ліофілізат тканин медузи Антарктичного регіону розчиняли у відповідних робочих буферах – 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 7,4 і 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 10,0 для нанесення на ДЕАЕ-сефарозу та у 10 мМ гліциновому буфері, рН 5,0 з розрахунку 0,5 г ліофілізату на 5 мл буферу. Проби залишали на 15 хв при +4 °С на лабораторному струшувачі з невеликою амплітудою, після чого центрифугували при 800 g впродовж 10 хв для відділення нерозчинних часток. Надосадову рідину наносили на колонку з ДЕАЕ- чи КМ-сефарозою врівноважену відповідним робочим буфером. Після відмивання колонки від незв'язаного матеріалу, білки, що зв'язалися з сорбентом, елюювали використовуючи буфера аналогічного складу за ступінчастого градієнту NaCl – 25 % NaCl (0,25 М); 40 % NaCl (0,4 М) та 100 % NaCl (1 М). Швидкість нанесення проб та елюції матеріалу становила 2 мл/хв.

### **2.3.2. Афінна хроматографія на бензамідин-сефарозі**

Ліофілізат тканин медузи Антарктичного регіону розчиняли у 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,0, що містить 250 мМ NaCl з розрахунку 0,5 г ліофілізату на 5 мл буферу та залишали на 15 хв при +4 °С на лабораторному струшувачі з невеликою амплітудою, після чого центрифугували при 800 g впродовж 10 хв. Надосадову рідину наносили на колонку з бензамідин-сефарозою врівноважену робочим буфером. Після відмивання сорбенту від незв'язаного матеріалу, білки, що зв'язалися з носієм, елюювали використовуючи 50 мМ гліциновий буфер, рН 3,0, що містить 1 М NaCl [119]. Швидкість нанесення проб та елюції матеріалу становила 2 мл/хв.

## **2.4. Одержання трипсиноподібного ферменту з гідробіонту антарктичний морський гребінець *Adamussium colbecki***

### **2.4.1. Афінна хроматографія на СІТ-сефарозі**

У роботі було використано СІТ-сефарозу синтезовану нами відповідно до методу [119]. Ліофілізат тканин гідробіонту антарктичний морський гребінець *A. colbecki* розчиняли у 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,0, що містив 250 мМ NaCl та 5 мМ CaCl<sub>2</sub> з розрахунку 0,5 г ліофілізату на 5 мл буферу та залишали на 30 хв при +4 °С, залишали на 15 хв при +4 °С на лабораторному струшувачі з невеликою амплітудою, після чого центрифугували при 800 g впродовж 10 хв. Надосадову рідину наносили на колонку з СІТ-сефарозою врівноважену робочим буфером. Після відмивання сорбенту від незв'язаного матеріалу білки, що зв'язалися з носієм, елюювали 50 мМ гліцин-НСІ буфером, рН 3,0, що містив 5 мМ CaCl<sub>2</sub> та 1 М NaCl. Одержану фракцію відразу нейтралізували до рН 8,0. Швидкість нанесення проб на колонку та швидкість елюції матеріалу становила 3 мл/хв.

### **2.4.2. Хроматографія, що поділяє за розмірами на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG**

Пробу, отриману після етапу афінної хроматографії на СІТ-сефарозі, надалі фракціонували на окремі фракції, відповідно до молекулярних мас білків, використовуючи метод хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG. Швидкість на всіх етапів хроматографічного процесу становила 0,75 мл/хв. Нанесення зразків здійснювали у 10 мМ трис-НСІ буфері (рН 8,0) з 130 мМ NaCl та 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, отримані фракції після позбавлення від солі на носієві сефадекс Ж 25 ліофілізували.



**2.5. Очищення фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів антарктичний морський гребінець *Adamussium colbecki*, морський їжак *Sterechinus neumayeri*, морська зірка *Odontaster validus*, криль *Euphausia superba* та немертина *Parborlasia corrugatus***

**2.5.1. Афінна хроматографія на голубій сефарозі**

Ліофілізат тканин гідробіонтів розчиняли у 10 мМ трис-НСl буфері (рН 8,0) з 250 мМ NaCl з розрахунку 0,5 г ліофілізату на 5 мл буферу та залишали на 30 хв при +4 °С, залишали на 15 хв при +4 °С на лабораторному струшувачі з невеликою амплітудою, після чого центрифугували при 800 g впродовж 5 хв. Надосадову рідину наносили на колонку з голубою сефарозою врівноважену робочим буфером. Після відмивання сорбенту від незв'язаного матеріалу білки, що зв'язалися з носієм, елюювали 10 мМ трис-НСl (рН 8,0), що містив 1 М NaCl. Швидкість нанесення проби на колонку та швидкість елюції матеріалу складала 2 мл/хв.

**2.5.2. Хроматографія, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200**

Зразки, отримані методом афінної хроматографії на голубій сефарозі, надалі розділяли на окремі фракції, відповідно до молекулярних мас білків, використовуючи метод хроматографії, що поділяє за розмірами (колонка HiLoad 16/60 Superdex 200). Швидкість на всіх етапів хроматографічного процесу становила 0,5 мл/хв. Нанесення зразків здійснювали у 10 мМ трис-НСl буфері (рН 8,0) з 130 мМ NaCl, отримані фракції після позбавлення від солі на носієві сефадекс Ж 25 ліофілізували.

## 2.6. Одержання колагену та його низькомолекулярних фрагментів

### 2.6.1. Одержання колагену з луски риб Антарктичного регіону

Як джерело для одержання колагену було використано луску риб Антарктичного регіону *Champsocephalus gunnari*, *Nototheniidae*. Спочатку луску ретельно промивали під холодною проточною водою. Далі проводили висолювання неколагенових білків додаючи до сировини 10 % NaCl у співвідношенні 1:10 (маса луски:об'єм розчину) [120]. На наступний день розчин зливали, а луску заливали 0,4 М HClO<sub>4</sub> за співвідношення 1:15 (маса луски:об'єм розчину) і залишали на 24 год. Цей етап необхідний для демінералізації сировини перед проведенням етапу екстракції колагену. Демінералізовану луску промивали холодною дистильованою водою, після чого додавали 0,5 М оцтову кислоту із 5 мМ ЕДТА (1:10, маса луски:об'єм розчину) і залишали на 12 години. Етапи висолювання неколагенових білків, демінералізації та екстракції колагену проводили при постійному інтенсивному перемішуванні. Зразок центрифугували при 10 000 г впродовж 40 хв. Отриманий осад розчиняли у 0,5 М оцтовій кислоті з 5 мМ ЕДТА і повторно залишали на 12 години. Після центрифугування проб (10 000 г, 40 хв) колаген висолювали додаванням до супернатанту NaCl до кінцевої концентрації 0,9 М. Етап екстракції колагену повторювали двічі. Отриманий на кінцевому етапі колаген діалізували проти дистильованої води та ліофілізували.

### 2.6.2. Одержання колагену з медузи *Diplulmaris antarctica* Антарктичного регіону

Для одержання колагену біомасу медуз гомогенізували, гомогенат змішували з рівним об'ємом 2 М оцтової кислоти і залишали на лабораторному

струшувачі на ніч. Надосадову рідину, отриману шляхом центрифугування проби при 1500 g, 30 хв, змішували з NaCl до кінцевої концентрації 0,9 М. Пробу залишали на струшувачі на ніч, після чого центрифугували за вище вказаних умов. Одержаний осад розчиняли у 0,2 М оцтовій кислоті, проводили діаліз проти дистильованої води, після чого ліофілізували

### **2.6.3. Одержання низькомолекулярних фрагментів колагену**

Пептиди колагену отримували шляхом ферментативного гідролізу колагену, екстрагованого з луски риб Антарктичного регіону, використовуючи як джерело ферментів фракцію серинових протеїназ, одержаних з *D. antarctica*. Ліофілізований колаген (1 г) розчиняли у 5 мл 50 мМ трис-НСl буферу (рН 7,4), що містить 130 мМ NaCl, залишали на 30 хв на струшувачі, після чого змішували з фракцією серинових протеїназ у співвідношенні 1:10 (фермент:колаген; маса/маса) та інкубували впродовж 24 год при +37°C. Гідроліз зупиняли нагріванням проб при +95 °С впродовж 5 хв, після чого центрифугували при 10 000 g, 15 хв. Пептиди колагену з молекулярною масою нижче 10 кДа відділяли шляхом ультрафільтрації з використанням концентраторів з відсікаючою здатністю 10 кДа. Отриману фракцію пептидів ліофілізували.

## **2.7. Одержання фракції пептидів**

### **2.7.1. Одержання фракції ендогенних пептидів з антарктичного криля *Euphausia superba* та медузи *Diplulmaris antarctica* Антарктичного регіону**

Фракцію ендогенних пептидів отримували з ліофілізованих екстрактів тканин *D. antarctica* та *E. superba* відповідно до методу [121]. Всі операції проводили на льоду. Для одержання фракції пептидів до 1 г ліофілізату,

розчиненого у 50 мМ трис-НСІ буфері, рН 7,4, що містить 130 мМ NaCl, додавали 1,2 М HClO<sub>4</sub> у співвідношенні 1:1, залишали на 30 хв при +4 °С, після чого центрифугували 15 хв при 1500 g. Надосадову рідину нейтралізували 5 н КОН до рН 7,0, залишали на 15 хв та повторно центрифугували. До надосадової рідини додавали 80 % етиловий спирт у співвідношенні 1:5, проби витримували 15 хв та знову центрифугували 15 хв при 1500 g. Для отримання фракції пептидів з молекулярною масою нижче 10 кДа, надосадову рідину піддавали ультрафільтрації з використанням концентраторів з відсікаючою здатністю 10 кДа. Отриману фракцію пептидів розводили вдвічі дистильованою водою та ліофілізували. Для позбавлення зразків від можливих домішок непептидної природи проводили проби розчиняли у 10 мМ гліциновому буфері (рН 10,0) і наносили на ДЕАЕ-сефарозу, елюцію проводили 70 % етиловим спиртом.

### **2.7.2. Одержання фракції гідролізних пептидів з гідробіонту антарктичний морський гребінець *Adamussium colbecki***

Для одержання фракції гідролізних пептидів використовували ліофілізат тканин *A. colbecki*, який розчиняли у 50 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,0 з розрахунку 1 г на 5 мл буферу. Гідроліз проводили з використанням трипсину (3000 од/мг білка), який додавали у співвідношенні 1:10 (фермент:субстрат). Після інкубації впродовж 24 год при +37 °С реакцію зупиняли кип'ятінням проб при +95 °С, 15 хв [122]. Фракцію пептидів з молекулярною масою менше 3 кДа отримували з використанням концентруючих систем з відсікаючою здатністю 3 кДа. Отриману фракцію пептидів ліофілізували. Концентрацію пептидів визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 210 нм. Для побудови калібрувального графіка використовували дипептид N-карбокси-гліцил-гліцин.

## **2.8. Електрофоретичні методи аналізу**

### **2.8.1. Приготування проб для електрофорезу**

Зразки для одновимірного та ензим-електрофорезу готували, додаючи до проб, рівний об'єм буферу для проб (5 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,3, що містив 38 мМ гліцин, 2 % додецилсульфат натрію, 10 % сахарозу та 0,01 % бромфеноловий синій). Проби для одновимірного електрофорезу перед внесенням в гель кип'ятили впродовж 45-50 с, в той час як проби для ензим-електрофорезу нагріванню не піддавали. Для електрофорезу за відновлюючих умов до проб попередньо додавали 5 %  $\beta$ -меркаптоетанол, проби піддавали нагріванню при +95 °С впродовж 40-50 с, після чого додавали буфер для приготування проб. Проби для 2Д-електрофорезу готували змішуючи з рівним об'ємом буферу

У випадку низької концентрація білка чи задля позбавлення від можливих супутніх домішок до проб додавали рівний об'єм 25 % трихлороцтової кислоти з подальшим відмиванням осаду від залишків ТХО 96 % етиловим спиртом. Після повного випаровування спирту осад розчиняли у відповідному об'ємі буферу для приготування проб для електрофорезу.

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

Електрофоретичний аналіз білків проб, гомогенність складу проб та оцінку чистоти препаратів проводили методом диск-електрофорезу у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію [123]. Залежно від молекулярної маси досліджуваних білків електрофорез проводили у пластинках 8 %, 10 % та 18 % поліакриламідного гелю за сили струму 19 мА для концентруючого гелю та 36 мА для розділяючого гелю. Для візуалізації

результатів використовували 2,5 % розчин барвника Кумасі діамантовий синій (R-250 чи G-250) у етиловому спирті та оцтовій кислоті. Для встановлення молекулярних мас білків використовували маркерні суміші «SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range» та «SDS-PAGE Molecular Weight Standards, High Range», «SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Peptides» (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Отримані електрофореграми аналізували за допомогою програми TotalLab 2.01.

### **2.8.3. Ензим-електрофорез (зимографія) у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію**

Ензим-електрофоретичний аналіз проводили відповідно до методу [124]. Розділяючий гель полімеризували за присутності одного з субстратних білків (желатин, колаген чи фібриноген) з розрахунку 1 мг/мл. Концентрація розділяючого гелю складала 12 %, що значно сповільнювало міграцію заполімеризованих у розділяючий гель субстратних білків. Електрофорез проводили за сили струму 19 мА для концентруючого гелю та 36 мА для розділяючого гелю. Після закінчення електрофоретичного розділення, гелі відмивали у 2,5 % розчині тритону X-100 впродовж години, після чого інкубували у 50 мМ трис-НСІ буфері, рН 7,4, що містив 130 мМ NaCl впродовж 12 год при +37 °С. Для оцінки прояву активності ферментів з медузи Антарктичного регіону при різних значеннях рН, гелі інкубували наступних буферах: 50 мМ лимонна кислота/цитрат натрію, рН 3,0; 50 мМ трис-НСІ, рН 7,4 та 50 мМ гліцин, рН 12,0. Для візуалізації результатів використовували 2,5 % розчин барвника Кумасі діамантовий синій (R-250 чи G-250) у етиловому спирті та оцтовій кислоті. Як маркери використовували плазмін, його деградовані форми та трипсин. Отримані електрофореграми аналізували за допомогою програми TotalLab 2.01.

#### **2.8.4. Двовимірний електрофорез**

Двовимірний електрофорез проводили відповідно до методу [125]. Ізоелектрофокусування (перший напрямок двовимірного електрофорезу) проводили у 7 см стрипах ПААГ Immobi DryStrip Gels з градієнтом рН від 3,0 до 10,0. Стрипи піддавали регідратації в DeSteak Rehydration Solution з IPG Buffer, рН 3,0-10,0 впродовж 12 год при температурі +20°C. Регідратаційний буфер містив досліджувані проби з розрахунку 1 мг білка на 1 мл буферу. Ізоелектрофокусування проводили у три етапи за наступних умов: 250 В, 30 хв для першого етапу; 4 000 В, 2 год для другого етапу та 4 000 В, 5 год для третього етапу. Після закінчення процесу ізофокусування стрипи послідовно урівнювали використовуючи буфер (0,375 М трис-НСІ буфер, рН 8,8, що містить 6 М сечовину, 2 % додецилсульфат натрію, 20 % гліцерол) у який на першому етапі додавали 0,13 М дитіотриетол, а на другому – 0,135 М йодацетамід. Далі стрипи піддавали аналізу методом електрофорезу у ПААГ згідно протоколу, описаного у розділі 1.8.1. Отримані електрофореграми аналізували за допомогою програми TotalLab 2.01.

#### **2.9. Визначення загальної протеолітичної активності**

Загальну протеолітичну активність визначали відповідно до методу [126]. Досліджувані проби (75 мкг білка) інкубували з 1 % казеїном при +37 °С впродовж 30 хв. Ферментативну реакцію зупиняли додаванням 15 % ТХО, після чого проби центрифугували при 10 000 g впродовж 30 хв. Оптичну щільність проб вимірювали при 280 нм. Загальну протеолітичну активність виражали в К.од/мг білка. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [127]. Для визначення активності, опосередкованої сериновими протеїназами та металозалежними ферментами, до проб додавали інгібітор

серинових протеїназ ФМСФ, хелатор металів ЕДТА за кінцевих концентрацій 2 мМ та 5 мМ, відповідно.

### **2.10. Визначення активності ферментів з використанням хромогенних субстратів**

В дослідженні було використано синтетичні хромогенні субстрати *N*-benzoyl-L-Arg-pNA (BArpNA), H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, pyroGlu-Pro-Arg-pNA, Bz-Ile-Glu( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-pNA, H-D-Val-Leu-Lys-pNA за кінцевої концентрації 0,3 мМ. Визначення проводили у 50 мМ трис-НСl буфері, рН 7,4, що містив 130 мМ NaCl, вміст білка становив 20 мкг. Оптичну щільність проб вимірювали при 405 та 492 нм. Для розрахунку активності ферменту використовували коефіцієнт молярної екстинкції пНА  $10,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . При використанні субстрату *N*- $\alpha$ -p-tosyl-L-Arg-methylester оптичну щільність проб вимірювали при 228 нм. Амідазну активність виражали у мкмоль пНА/хв·мг білка, естеразну у Од/мг білка.

### **2.11. Визначення активності фібрино(гено)літичних ферментів та оцінка їх впливу на здатність фібриногену до полімеризації**

Фібрино(гено)літичну активність ферментів визначали відповідно до методу [128]. Для цього ферменти інкубували з фібриногеном (1мг/мл) у 50 мМ трис-НСl буфері (рН 7,4), що містить 130 мМ NaCl при +37 °С. Співвідношення фермент:фібриноген складало 10:100. Аліквоти для аналізу відбирали через 0, 1, 2, 3, 4, 6, 24 та 48 год інкубації, змішували з 5 %  $\beta$ -меркаптоетанолом, кип'ятили впродовж 1 хв, після чого додавали рівний об'єм буферу для приготування проб для електрофорезу. Одержані таким чином зразки аналізували методом диск-електрофорезу у 10 % ПААГ. Для оцінки відсотку фібриногену, що зберігає здатність до полімеризації,



фібрино(гено)літичний фермент (25 мкг) інкубували з фібриногеном (0,5 мг/мл) впродовж 1, 6 та 24 год при +37 °С, після чого до проб додавали 10 НН тромбіну. Утворений згусток фібрину розчиняли у 0,125 % оцтовій кислоті. Оптичну щільність проб вимірювали при 280 та 320 нм. Фібриноген для аналізу отримували з плазми крові шляхом висолювання 16 % розчином сульфату натрію відповідно до методу [129].

### **2.12. Визначення рН та температурного оптимуму ферментів**

Визначення рН оптимуму ферментів проводили, використовуючи наступні буфери: 50 мМ лимонна кислота/цитрат натрію (рН 2,0-5,0); 50 мМ трис-НСl (рН 6,0-8,0) і 50 мМ гліцин (рН 9,0-13,0) [130]. Визначення температурного оптимуму проводили у діапазоні температур від +4°С до +65°С у 50 мМ трис-НСl буфері, рН 7,4 з 130 мМ NaCl. При дослідженні ферментів з *D. antarctica* використовували субстрат Na-benzoyl-L-Arg-pNA, при дослідженні ферменту з *A. colbecki* використовували субстрат pуроGlu-Pro-Arg-pNA. В обох випадках кінцева концентрація субстратів становила 0,3 мМ.

### **2.13. Визначення кінетичних параметрів реакції гідролізу хромогенного субстрату pуроGlu-Pro-Arg-pNA трипсиноподібним ферментом**

Визначення кінетичних параметрів гідролізу pуроGlu-Pro-Arg-pNA проводили у діапазоні концентрацій 0,01-3 мМ. Дослідження проводили за оптимальних значень рН та за температури +8 °С і +24 °С. Оптичну щільність проб вимірювали при 405 та 492 нм через кожні 5 хв впродовж 60 хв. Для розрахунку активності ферменту використовували коефіцієнт молярної екстинкції пНА  $10,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Розраховували початкову швидкість реакції  $V_0$  для кожної концентрації субстрату і будували криві залежності  $V_0$  від  $S_0$ .

Для визначення кінетичних констант  $K_M$  та  $V_{max}$  здійснювали лінеаризацію отриманих результатів у зворотних координатах Лайнуївера-Берка. Величину  $k_{cat}$  обраховували як відношення  $V_{max}$  до  $[E]$ .  $[E]$  – молярна концентрація ферменту, розрахована з огляду на молекулярну масу ферменту [131].

#### 2.14. Агрегатометрія

Агрегацію тромбоцитів досліджували на фотооптичному агрегометрі (Медицина-Техніка, Білорусь) згідно рекомендацій фірми виробника. Дослідження проводили використовуючи плазму кролів, збагачену на тромбоцити (ПЗТ). ПЗТ одержували шляхом центрифугування стабілізованої крові при 300 g, 15-20 хв при +20 °С. Плазму, «бідну» на тромбоцити (ПБТ), отримували шляхом подальшого центрифугування ПЗТ при 1000 g. Перед дослідженням визначали кількість тромбоцитів у ПЗТ і за необхідності розводили ПЗТ за допомогою ПБТ до концентрації 220-260 тис. клітин/мкл. Для індукції агрегації використовували АДФ за кінцевої концентрації  $5 \times 10^{-6}$  М. Дослідження проводили у трьох пробах плазми, збагаченої тромбоцитами, з різних кролів, при цьому дослід для кожної плазми повторювали тричі.

#### 2.15. Проточна цитометрія

Дослідження проводили на проточному цитометрі DxFLEX. Активацію тромбоцитів визначали реєструючи пряме та бічне світлорозсіювання, які характеризують, відповідно, розмір клітин та щільність цитоплазми [132]. У дослідженні використовували фракцію тромбоцитів, які отримували з плазми, збагаченої на тромбоцити, методом гель фільтрації на колонці з сефарозою 4В відповідно до методу [38]. Пептиди, розчинені у 0,9 % NaCl, використовували у концентрації 40 мкг/мл.

## 2.16. Хронометричні тести

Визначення тромбінового, протромбінового та активованого часткового тромбoplastинового часу зсідання плазми крові проводили згідно методу [133] використовуючи відповідні набори. Час зсідання плазми реєстрували у секундах на коагулологічному аналізаторі.

## 2.17. Дослідження антиоксидантного потенціалу пептидів та їх мембрано протекторної активності

Для проведення досліджень ліофілізат пептидів з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону розчиняли у 20 % етиловому спирті з розрахунку 2 мг/мл. Загальну антиоксидантну активність оцінювали за відновленням стабільного радикалу 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу (ДФПГ) [134]. Здатність пептидів знешкоджувати радикали оксиду азоту визначали відповідно до методу [135] в основі якого лежить здатності нітратів та нітритів вступати у реакцію з реактивом Гріса. Джерелом оксиду азоту слугував нітропрусид натрію. Редукуючу здатність пептидів визначали відповідно до методу [136]. Здатність знешкоджувати гідроксильні радикали визначали у реакції з фенантроліном відповідно до методу [137]. Здатність пептидів знешкоджувати перекис водню оцінювали відповідно до методу [138], який ґрунтується на здатності амонію молібденовокислого за присутності перекису водню утворювати забарвлену у зелений колір сполуку. Здатність знешкоджувати супероксидні аніон-радикали оцінювали за відновленням нітросинього тетразолію [139]. Для генерування супероксидних аніон-радикалів було використано систему НАДН<sup>+</sup> та фенозинмоносульфат. У залежності від методу як референтні сполуки було використано аскорбінову кислоту чи відновлений глутатіон.

Визначення мембрано протекторної активності пептидів проводили на

моделі індукованого гемолізу еритроцитів. У дослідженні використовували 2 % суспензію еритроцитів кроля (об/об), яку готували на натрій-фосфатному буфері, рН 7,2. Мембрано протекторну активність оцінювали інкубуючи пептиди з еритроцитами за присутності 5 мМ пероксиду водню [140]. Пептиди використовували у розрахунку 100 мкг на 1 мл суспензії еритроцитів. Для попередження знешкодження пероксиду водню каталазою, що потенційно може вивільнятися з еритроцитів, в інкубаційне середовище вносили азид натрію. Оптичну щільність проб вимірювали при довжині хвилі 541 нм. Оцінку мембрано протекторної активності пептидів проводили на трьох зразках суспензії еритроцитів, отриманої від різних кролів, при цьому дослід для кожної еритроцитарної суспензії повторювали тричі.

#### **2.18. Дослідження впливу пептидів на процес полімеризації фібриногену та на індуковане тромбіном згортання плазми крові**

Ліофілізат пептидів з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону розчиняли у 0,9 % хлориді натрію з розрахунку 2 мг/мл. Для дослідження впливу пептидів на процес полімеризації фібриногену використовували фібриноген у концентрації 1 мг/мл та тромбін (кінцева активність 0,1 МО). У першій серії експериментів фібриноген (100 мкг) інкубували з пробою пептидів, після чого додавали тромбін. У другій серії експериментів тромбін попередньо інкубували з досліджуваною пробою пептидів, після чого додавали фібриноген. Оптичну щільність проб вимірювали щохвилини впродовж 30 хв при 595 нм. Для дослідження впливу пептидів на індуковане тромбіном згортання плазми крові використовували плазму крові, яку попередньо розводили вдвічі 0,9 % хлоридом натрію та тромбін (кінцева активність 0,1 МО). Оптичну щільність проб вимірювали щохвилини впродовж 60 хв при 595 нм. Перед побудовою графіків від значень екстинкції проб віднімали значення відповідних бланків [141].

## 2.19. Дослідження на моделях *in vivo*

Маніпуляції з тваринами проводили у відповідності з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986р.), етичними принципами, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001р.) та чинним законодавством і нормативно-правовими актами про поводження та експериментальні дослідження з лабораторними тваринами. Експериментальні роботи з щурами здійснювали у акредитованому віварії Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно з правилами поводження з піддослідними тваринами, затверджені Вченою радою Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Робота виконана з дотриманням біоетичних вимог (додаток А). Тварини утримувались за стандартних умов з вільним доступом до води та їжі *ad libitum*, за постійного температурного режиму ( $22 \pm 3$  °C), режиму вологості ( $60 \pm 5$  %).

### 2.19.1. Відтворення моделі ожиріння, індукованого споживанням висококалорійного корму

У дослідах використовували нелінійних статевозрілих щурів-самців з початковою масою  $160 \pm 20$  г, кількість тварин, включена в експеримент складала 60. Модель ожиріння створювали утримуючи тварин впродовж 4 тижнів на висококалорійній дієті, яка складалась із стандартної їжі (60 %), свинячого жиру (10 %), курячих яєць (10 %), сахарози (9 %), арахісу (5 %), сухого молока (5 %) та рослинної олії (1 %) [142], після чого тварин рандомізовано ділили на 2 групи [143]: щури першої групи продовжували отримувати висококалорійний корм; щури другої групи також отримували

висококалорійний корм та розчин пептидів колагену чи гідролізних пептидів (у залежності від мети експерименту) з розрахунку 1 г/кг маси тіла тварин, впродовж наступних 6 тижнів. Тварини споживали пептиди замість води через день. Тварин зважували щотижня в один і той же день, споживання корму та води визначали щоденно. Індекс маси тіла (ІМТ) (відношення маси тіла (г) до квадрату довжини тіла (см<sup>2</sup>) розраховували в кінці експерименту. Умертвіння щурів здійснювалося шляхом дислокації шийного відділу хребта.

### **2.19.2. Відтворення моделі повношарових вирізаних площинних ран у щурів**

Дослідження проводили на нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 200-250 г, кількість тварин, включена в експеримент складала 18. Тварин утримували у віварії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно «Стандартні правила по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)». Тварини утримувались за стандартних умов з вільним доступом до води та їжі, за постійного температурного режиму ( $22 \pm 3$  °C), режиму вологості ( $60 \pm 5$  %), освітлення (12/12 год). Перед початком експерименту щурів витримували на карантині, по завершенню якого тварин оглядали і зважували. Всі больові процедури та операції проводились під загальним знеболюванням тіопенталом натрію (ВАТ "Київмедпрепарат", Україна) у дозуванні 60 мг/кг маси тварини. Тварин тримали в індивідуальних клітках в стандартних умовах віварію протягом всього експерименту. Для відтворення моделі повношарових вирізаних площинних ран тварини були поділені на III групи по 6 тварин у кожній. I – група, щурам моделювали вирізану площинну рану, загоєння відбувалось самостійно, без лікування; II – група, щурам моделювали вирізану площинну рану, уражену ділянку обробляли композитом на основі 0,5 % розчину

карбополу (універсальний розчинник препаратів для надання їм гелеподібної консистенції («Carbopol 980») та колагену (5 %), екстрагованого з *D. antarctica*; III – група, щурам моделювали вирізану площинну рану, уражену ділянку обробляли композитом на основі 0,5 % розчину карбополу (універсальний розчинник препаратів для надання їм гелеподібної консистенції («Carbopol 980») та колагену (5 %), екстрагованого з луски риб Антарктичного регіону. Площинні рани відтворювали на попередньо деепільованій ділянці шкіри щурів, яких попередньо наркотизували. Шкіру розміром  $1 \times 1 \text{ см}^2$  вирізали використовуючи хірургічний скальпель. Кровотечу зупиняли за допомогою стерильних марлевих тампонів змочених у 3 % розчині перексиду водню. Оброблення ран композиціями на основі колагену з гідробіонтів Антарктичного регіону розпочинали відразу після відтворення ран і до їхнього повного загоєння. Тварин виводили з експерименту шляхом дислокації шийного відділу хребта.

## 2.20. Отримання зразків біологічного матеріалу

Сироватку крові отримували центрифугуючи кров (15 хв, 1000 g) після її попереднього витримання при  $+37 \text{ }^\circ\text{C}$  впродовж 30 хв. Для отримання гомогенату жирової, 1 г вісцеральної білої жирової тканини з гонадальних, навколониркових, мезентеріальних ділянок і задньої стінки черевної порожнини гомогенізували у 9 мл 50 мМ трис-НСІ буферу, рН 7,4, що містив 130 мМ NaCl, після чого центрифугували при 1000 g 30 хв.

## 2.21. Гістологічні дослідження

Фрагменти білої та підшкірної жирової тканини розміром 1 см на 1 см фіксували в 4 % розчині параформальдегіду, після чого зневоднювали та заливали в парафін. З парафінових блоків виготовляли зрізи товщиною 5 мкм,

які надалі фарбували гематоксилином Бемера та еозином [144]. Вимірювали площу поперечного перерізу адипоцитів та кількість корона-подібних структур. Дослідження препаратів проводили використовуючи світловий мікроскоп Olympus BX41 (Японія), цифрову камеру Olympus DP20 (Японія), фотографії обробляли за допомогою програмного забезпечення QucikPHOTO MICRO (Чехія). Виявлення колагенових волокон у жировій тканині щурів здійснювали шляхом гістохімічного трихромного забарвлення пікрофуксином за Ван Гізоном із дозабарвленням ядер клітин гематоксилином Бемера [145]. Тучні клітини виявляли гістохімічним забарвленням у 0,1 % водному розчині толуїдинового синього [146].

## **2.22. Оцінка планіметричних показників**

Для оцінки динаміки гоєння ран, площу ранової поверхні фотографували цифровою фотокамерою Nikon-D3100 на початку експерименту та через кожні дві доби до повного загоєння. Розраховували наступні планіметричні показники [147]: площу гоєння  $S_{\text{заг}} \text{ (мм}^2\text{)} = S_{\text{вихід}} - S_{\text{досл}}$ ; швидкість гоєння  $V_{\text{заг}} \text{ (мм}^2\text{/добу)} = S_{\text{заг}}/a$ , де  $a$  – кількість днів до повного гоєння ран. Результати виражали у відсотках від початкової площі.

## **2.23. Визначення показників, що асоційовані з розвитком інсулінорезистентності**

### **2.23.1. Визначення концентрації глюкози у сироватці крові**

Концентрацію глюкози визначали використовуючи глюкометр «ГЛЮКОФОТ-II» («Норма», Україна) [148]. Вимірювання проводили згідно інструкцій фірми-виробника, концентрацію глюкози виражали в ммоль/л.



Кров для аналізу брали з хвостової вени щурів, яких перед початком визначення витримували не менше 2 годин на голоді.

### **2.23.2. Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну**

Визначення вмісту проводили використовуючи стандартні набори для визначення глікозильованого гемоглобіну («PLIVA-Lachema Diagnostika», Чехія) [149]. Для аналізу використовували гемолізат еритроцитів, який отримували згідно рекомендацій фірми-виробника. Оптичну густину проб реєстрували при 443, вміст глікозильованого гемоглобіну виражали у мкмоль фруктози/г гемоглобіну.

### **2.23.3. Визначення відносного вмісту інсуліну**

Вміст інсуліну у сироватці крові визначали імуноферментним методом згідно стандартного протоколу [150]. Сироватку крові попередньо розводили 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,4 до концентрації 10 мкг на мл. Використовували первинні антитіла проти інсуліну виробництва «Santa Cruz Biotechnology, Inc» (США) та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою («Sigma-Aldrich», США).

## **2.24. Оцінка оксидативного балансу**

### **2.24.1. Визначення активності антиоксидантних ферментів**

Супероксиддисмутазну активність визначали за рівнем інгібування ферментом реакції відновлення нітросинього тетразолію за присутності НАДН та фенозинметасульфату відповідно до методу [151]. Оптичну густину проб визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 540 нм, за одиницю

активності супероксиддисмутази приймали кількість ферменту, необхідну для 50 % інгібування нітросинього тетразолію. Ферментативну активність виражали в ум.од/мг білка. Визначення каталазної активності проводили відповідно до методу [152], який ґрунтується на здатності пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс, який реєструють за довжини хвилі 410 нм. Ферментативну активність розраховували за калібрувальним графіком та виражали у мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  / хв на мг білка.

#### **2.24.2. Визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів**

Для визначення вмісту первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів, та кінцевих продуктів ПОЛ – шиффових основ проби гомогенізували у суміші гептану та ізопропілового спирту [153]. Вміст шиффових основ визначали у гептановій фазі за довжини хвилі збудження 360 нм і поглинання 420 нм. Визначення вмісту дієнових кон'югатів проводили при 233 нм, для розрахунку використовували коефіцієнт молярної екстинкції для спряжених дієнів поліненасичених вищих жирних кислот  $2,2 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ . Вміст ТБК-активних продуктів визначали у реакції з тіобарбітуровою кислотою. Оптичну щільність проб вимірювали при 532 нм, для розрахунку використовували коефіцієнт молярної екстинкції, що дорівнює  $1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ .

#### **2.24.3. Визначення вмісту продуктів окиснювальної модифікації білків**

Вміст продуктів окиснювальної модифікації білків (альдегід- та кетондинітрофеніл-гідразонів) визначали за реакцією утворення 2,4-динітрофенілгідразонів нейтрального характеру при взаємодії карбонільних похідних білків та шиффових основ з 2,4-динітрофенілгідратином [154]. Виміри проводили за довжин хвиль 356 нм та 370 нм, відповідно, для

визначення альдегідних та кетонних продуктів окиснювальної модифікації білків нейтрального характеру. Для розрахунку вмісту альдегід- та кетондинітрофенілгідразонів використовували коефіцієнт молярної екстинкції  $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

#### **2.24.4. Визначення вмісту загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних груп**

Вміст сульфгідрильних груп визначали відповідно до методу [155], в основі якого лежить здатність 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойної кислоти взаємодіяти з сульфгідрильними групами з утворенням тіонітрофенільного аніону. Оптичну щільність проб вимірювали за довжини хвилі 412 нм. Вміст загальних сульфгідрильних груп розраховували використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції  $14,15 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ . Для визначення вмісту небілкових сульфгідрильних груп до проб додавали 5 % ТХО, вміст білок-зв'язаних сульфгідрильних груп розраховували як різницю між вмістом загальних та небілкових сульфгідрильних груп.

### **2.25. Оцінка стану периферійної серотонінергічної системи**

#### **2.25.1. Визначення концентрації серотоніну та триптофану**

Для одержання триптофану та серотоніну сироватку крові після осадження білків 0,4 М перхлорною кислотою наносили на колонку з КМ-сефарозою, урівноважену 0,01М Na-фосфатним буфером, рН 6,2 [156,157]. Для елюції триптофану використовували 0,01М Na-фосфатний буфер, рН 6,2, елюцію серотоніну здійснювали 0,03М Na-фосфатним буфером, рН 6,2. Визначення концентрації досліджуваних речовин проводили

спектрофлуорометрично за довжини хвилі збудження 295 нм та довжини хвилі поглинання 550 нм для триптофану і довжини хвилі збудження 359 нм та довжини хвилі поглинання 485 нм для серотоніну.

### **2.25.2. Визначення моноаміноксигеназної активності**

Моноамінооксидазну активність визначали спектрофотометрично за накопиченням гідразону у реакції з 2,3-динітрофенілгідразином відповідно до методу [158]. Оптичну щільність проб визначали за довжини хвилі 460 нм. Активність моноамінооксидази виражали в ум.од.

### **2.26. Статистична обробка отриманих результатів**

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерних програм OriginLab Origin® Pro 9.1 та Statsoft Statistica® 10. Підраховували показники середньої арифметичної ( $M$ ), середньої квадратичної помилки середньої арифметичної ( $m$ ). Перевірку гіпотези нормального розподілу вибірки проводили за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. При відповідності вибірки критеріям нормального розподілу, достовірність відмінностей між вибірками визначали за допомогою критерію Стюдента ( $t$ ). При невідповідності вибірки критеріям нормального розподілу, достовірність відмінностей між вибірками визначали за допомогою критерію Манна-Уїтні ( $U$ ). Достовірними вважалися різниці при  $p < 0,05$ .

### РОЗДІЛ 3

## ОЦІНКА ПЕРСПЕКТИВ ВИКОРИСТАННЯ ГІДРОБІОНТІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ ЯК ДЖЕРЕЛА МОЛЕКУЛ БІЛКОВОЇ ПРИРОДИ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ЦІЛЕЙ

На сучасному етапі розвитку науково-технологічного прогресу пошук нових природних джерел сировини для забезпечення потреб промислового та наукового секторів набуває особливої гостроти. Проблема пошуку нових сировинних ресурсів пов'язана не лише із стабільно зростаючим дефіцитом сировини для різних галузей промисловості, а й із зростаючим запитом споживачів на продукцію, отриману з дотриманням норм екологічної безпеки, що передбачає посилення впровадження у біотехнологічні виробництва технологій з використанням природних каталізаторів.

З-поміж об'єктів, які потенційно можуть слугувати джерелом сполук різної хімічної природи, особливу увагу привертають морські гідробіонти. Переваги використання морських гідробіонтів, як джерела сировини, обумовлені низкою чинників, зокрема, їхньою нижчою собівартістю у порівнянні з традиційними джерелами; можливістю використання відходів переробки первинної сировини для одержання цільових молекул; нижчими ризиками контамінації вихідної сировини збудниками, які характерні для сировини тваринного походження, що особливо актуально останніми роками.

В сегменті біотехнологічної продукції окреме місце займають продукти білкової природи та, особливо в останні роки, засоби на основі пептидів, які позиціонуються як «біологічно активні молекули направленої дії». Слід відмітити, що кожного року інтерес до препаратів білкового походження, створених на основі молекул, одержаних з морських гідробіонтів стабільно зростає, з'являється багато рекомендацій, наукових публікацій про перспективність розробок технологій виробництва біотехнологічних

продуктів на основі білків та пептидів, отриманих не лише як цільовий, але й як побічний продукт під час переробки основної сировини [159-161].

Отже, стабільно зростаючий попит на препарати, створені на основі білкових та пептидних молекул, певні складнощі з використанням традиційних джерел сировини, а також відсутність комплексних фундаментальних досліджень щодо впливу окремих білкових чи пептидних молекул з гідробіонтів Антарктичного регіону на перебіг біохімічних процесів в організмі людини та тварин свідчить про актуальність та доцільність досліджень, спрямованих на скринінг та одержання молекул білкової природи з гідробіонтів Антарктичного регіону.

Для виявлення об'єктів, найбільш придатних для одержання цільових білкових молекул – загальної фракції протеолітичних ферментів; окремих протеаз; суміші пептидів; колагену та його фрагментів з метою створення на їхній основі біотехнологічних продуктів різного призначення, перший етап роботи було присвячено дослідженню білкового складу деяких видів гідробіонтів Антарктичного регіону, зокрема, морського гребінця (*Adamussium colbecki*), морського їжака (*Sterechinus neumayeri*), морської зірки (*Odontaster validus*), криля (*Euphausia superba*), немертини (*Parborlasia corrugatus*) та антарктичної медузи (*Diplulmaris antarctica*). Вибір саме цих гідробіонтів, як об'єктів для дослідження, продиктований їхньою розповсюдженістю в регіоні, відносною простотою вилову та тим фактом, що аналогічні види гідробіонтів можна знайти в інших кліматичних широтах, а відтак, методологічні розробки, одержані в рамках представленої роботи, можна буде використати для інших гідробіонтів.

Спочатку визначали вміст загального білка у тканинах досліджуваних видів гідробіонтів Антарктичного регіону. Як видно з таблиці 3.1, за вмістом загального білка у перерахунку на грам вихідної сировини досліджувані гідробіонти можна було розділити на дві групи – в середньому 200-250 мг на

грам для *E. superba*, *D. antarctica*, *A. colbecki* і *S. neumayeri*, та 122,0-130,0 мг на грам вихідної сировини для *O. validus* та *P. corrugatus*.

Таблиця 3.1

**Вміст білка у перерахунку на г вихідної маси гідробіонтів  
Антарктичного регіону (M±m, n=6)**

<b>Гідробіонт</b>	<b>Загальний білок, мг/г вихідної сировини</b>
<i>E. superba</i>	195,5 ± 9,5
<i>O. validus</i>	130,0 ± 6,0
<i>S. neumayeri</i>	250,5 ± 10,5
<i>A. colbecki</i>	250,0 ± 10,5
<i>P. corrugatus</i>	122,0 ± 5,5
<i>D. antarctica</i>	210,0 ± 8,5

Результати електрофоретичного аналізу тканин гідробіонтів Антарктичного регіону в наведено на рис.3.1, відповідно до яких, білково-пептидний склад досліджуваних видів гідробіонтів є достатньо різноманітним за молекулярною масою білків. Найбільше білкових фракцій було виявлено у зразках *E. superba*, у той час як білковий спектр *D. antarctica* був менш різноманітним. Обрахунок електрофореграм за допомогою програми TotalLab показав, що молекулярні маси білків для всіх гідробіонтів знаходяться переважно у діапазоні молекулярних мас від 10 до 200 кДа, хоча у тканинах деяких видів (*E. superba*, *O. validus*, *S. neumayeri*) виявлено білки з молекулярною масою вище 200 кДа (табл.3.2).

Такий широкий розкид молекулярних мас білків підвищує ймовірність виділити з-поміж загального спектру білкових молекул ті, що можуть виявляти потенційно привабливі структурні чи функціональні характеристики. Особливо це стосується білків, молекулярна маса яких

складає 50 кДа і нижче. З огляду на певні теоретичні уявлення та ряд експериментальних підтверджень, саме білки, що мають молекулярну масу нижче 50 кДа, виявляють різноманітні активності, у тому числі й ферментативні [162-164]. Більш того, окремі їхні фрагменти, обумовлені протеолітичною деградацією вихідної молекули, також можуть виявляти ферментативну активність.

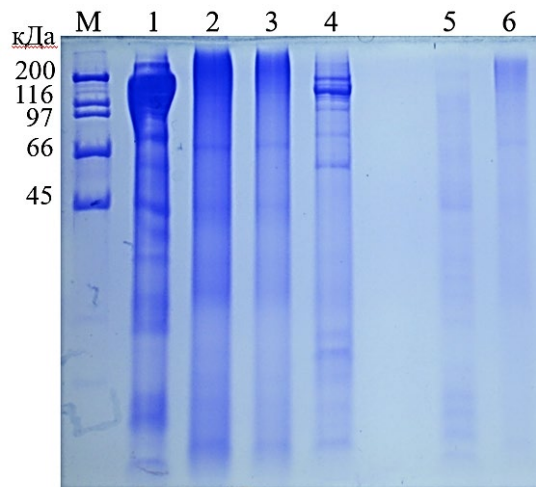


Рис. 3.1 Електрофореграма екстракту тканин гідробіонтів Антарктичного регіону: М – маркери молекулярних мас; 1 – *E. superba*; 2 – *O. validus*; 3 – *S. neumayeri*; 4 – *A. colbecki*; 5 – *P. corrugatus*; 6 – *D. antarctica*

З огляду на вищевикладене, завданням наступного етапу роботи було попередньо оцінити чи містять досліджувані зразки тканин гідробіонтів активні гідролітичні ферменти. Подібні дослідження є необхідними з огляду на той факт, що більшість ферментів, які використовуються у різних галузях промисловості, та ферментів, що входять до складу лікарських засобів, належать до протеаз [165, 166].

Вивчення протеолітичного потенціалу гідробіонтів є необхідною передумовою проведення подальших досліджень, оскільки, по-перше, дозволить оцінити доцільність використання гідробіонтів, як джерела для



одержання ферментів; по-друге, визначення загальної протеолітичної активності надасть інформацію про відносну стабільність ферментів та збереження належного рівня їхньої активності під час перших етапів одержання.

Таблиця 3.2

**Молекулярні маси білків, що присутні у тканинах гідробіонтів  
Антарктичного регіону**

Гідробіонти	Білковий профіль тканин гідробіонтів		
	Високомолекулярні білки, 200-70 кДа, (кількість фракцій)	Середньомолекулярні білки, 69-20 кДа (кількість фракцій)	Низькомолекулярні білки, 19-5 кДа (кількість фракцій)
<i>S. neumayeri</i>	<200; 154; 141; 125; 99; 74; 67 (7)	49; 45; 49; 36; 33; 21 (6)	19; 16; >10 (3)
<i>A. colbecki</i>	<200; 190; 157; 144; 130; 121; 115; 110; 98; 79 (10)	61; 55; 44; 35; 32; 29; 23; 20 (8)	15; >10 (2)
<i>D. antarctica</i>	<200; 175; 154; 141; 122; 117; 106; 75; 9 (9)	50; 45; 37; 32; 22 (5)	>10 (1)
<i>E. superba</i>	<200; 180; 175; 153; 140; 125; 107; 98; 74 (9)	67; 48; 46; 42; 31; 28; 26; 21 (8)	18; 15; 13; >10 (4)
<i>O. validus</i>	<200; 195; 190; 153; 137; 129; 125; 121; 113; 91; 85 (11)	67; 49; 46; 38; 28; 20 (6)	16; >10 (2)
<i>P. corrugatus</i>	157; 144; 132; 119; 102; 69 (6)	50; 47; 43; 39; 34; 25; 20 (7)	15; 12; >10 (3)

Для досягнення поставленої мети було проведено електрофоретичне розділення зразків екстракту тканин гідробіонтів у поліакриламідному гелі із заполімеризованими субстратними білками. Аналіз при використанні як субстрату желатину, колагену та фібриногену дозволив отримати результати, які наведено, відповідно, на рис. 3.2-3.4. Вибір саме цих субстратів обумовлений тим фактом, що одним із завдань роботи було одержати та охарактеризувати серинові протеїнази та фібрино(гено)літичні ферменти для яких субстратами є, відповідно, желатин, колаген та фібриноген.

Як видно з рис. 3.2, всі досліджувані зразки містили високо активні протеолітичні ферменти різної молекулярної маси, про що свідчать виражені зони гідролізу у площині гелю.

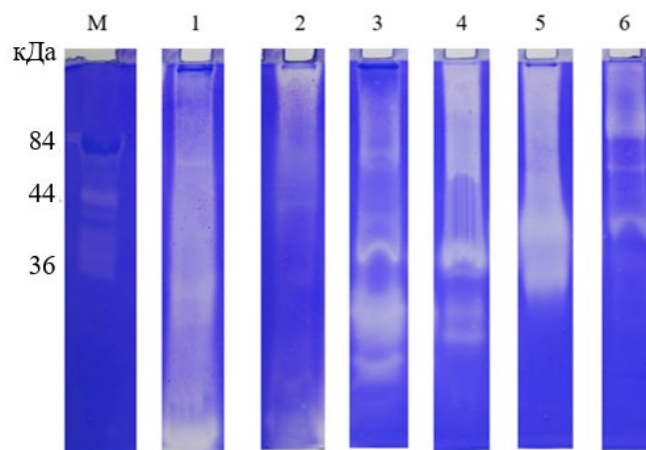


Рис. 3.2 Ензим-електрофореграма (субстратний білок желатин) гомогенату тканин гідробіонтів Антарктичного регіону: М – маркери молекулярних мас; 1 – *A. colbecki*; 2 – *E. superba*; 3 – *D. antarctica*; 4 – *S. neumayeri*; 5 – *O. validus*; 6 – *P. corrugatus*

Певний інтерес становлять результати ензим-електрофорезу з субстратним білком фібриногеном – як бачимо серед протеолітичних ферментів гідробіонтів є ферменти, що здатні розщеплювати фібриноген (рис. 3.3). Найвищу активність було виявлено у зразках *A. colbecki*, *S. neumayeri* та

*O. validus*. Порівнявши результати розташування зон гідролізу на рис. 3.2 та рис. 3.3, бачимо, що ферменти, здатні розщеплювати фібриноген, переважно мають молекулярну масу вище 50 кДа, у той час як молекулярна маса істинних фібриногеназ зазвичай знаходиться в межах 20-60 кДа. Слід підкреслити, що фібриноген належить до досить специфічних субстратів і не всі ферменти здатні до його гідролізу, тому отримані результати є досить перспективними, так як у випадку підтвердження належності цих ферментів саме до фібрино(гено)літичних, відкривають перспективи використання окремих гідробіонтів Антарктичного регіону як джерела фібрино(гено)літиків.

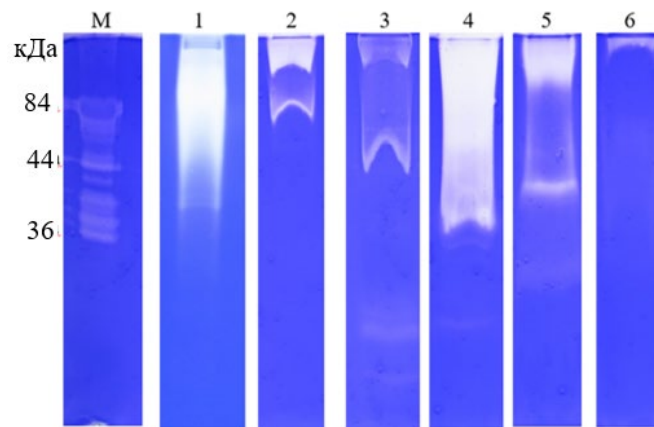


Рис. 3.3 Ензим-електрофореграма (субстратний білок фібриноген) екстракту тканин гідробіонтів Антарктичного регіону: М – маркери молекулярних мас; 1 – *A. colbecki*; 2 – *E. superba*; 3 – *D. antarctica*; 4 – *S. neumayeri*; 5 – *O. validus*; 6 – *P. corrugatus*

Ферменти з гідробіонтів Антарктичного регіону виявились досить активними й щодо колагену (рис. 3.4) – інтенсивність зон гідролізу та їхній розподіл по всій довжині треку свідчить про різну молекулярну масу ферментів, що виявляють колагенолітичну активність. Не виключено, що у деяких випадках гідроліз всіх трьох субстратів може відбуватися за участі одного й того ж ферменту.

Таким чином, гідробіонти Антарктичного регіону містять ряд активних гідролітичних ферментів з різною субстратною специфічністю.

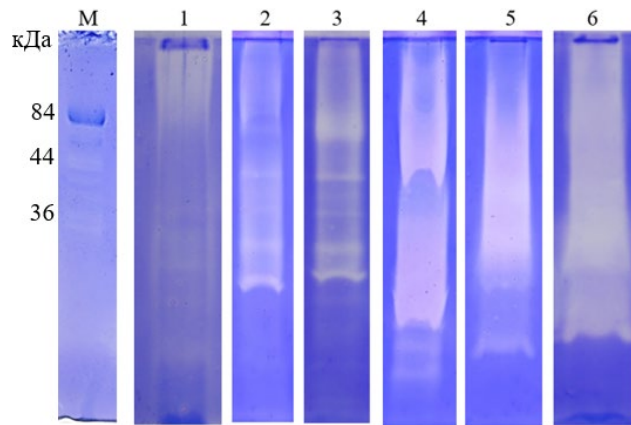


Рис. 3.4 Ензим-електрофореграма (субстратний білок колаген) екстракту тканин гідробіонтів Антарктичного регіону: М – маркери молекулярних мас; 1 – *A. colbecki*; 2 – *E. superba*; 3 – *D. antarctica*; 4 – *S. neumayeri*; 5 – *O. validus*; 6 – *P. corrugatus*

Для більш детальної характеристики профілю протеолітичних ферментів гідробіонтів було оцінено внесок ферментів з різною будовою активного центру, зокрема, металозалежних ферментів та серинових протеаз. Результати дослідження з використанням інгібітору серинових протеїназ ПМСФ та хелатору металів ЕДТА свідчать, що більшість ферментів у тканинах гідробіонтів Антарктичного регіону належить до серинових протеаз (табл. 3.3). Так, внесок серинових протеїназ у загальну протеолітичну активність становив 53 % від загальної протеолітичної активності для *A. colbecki* та *O. validus*; 45 % – для *E. superba*; 35 % – для *P. corrugatus*. Найвищий показник було виявлено для *D. antarctica* – 73 %. Щодо металозалежних ферментів, то найвищу активність було виявлено у екстракті тканин *E. superba* та *P. corrugatus* – 50 % і 45 %, відповідно.

Запропонований нами етап аналізу білкового складу та протеолітичного профілю тканин біологічних об'єктів може бути рекомендованим як перша скринінгова стадія комплексного підходу створення інноваційних білкових продуктів, так як за отриманими результатами можна оцінити доцільність використання окремих видів як джерела для одержання білкових молекул та визначити види найбільш придатні для очищення конкретних цільових молекул.

Таблиця 3.3

**Внесок ферментів з різною будовою активного центру у загальну протеолітичну активність у тканинах гідробіонтів Антарктичного регіону**

<b>Гідробіонти</b>	<b>Серинові протеїнази, %</b>	<b>Металозалежні ферменти, %</b>	<b>Аспартильні та цистеїнові протеїнази, %</b>
<i>A. colbecki</i>	53	20	27
<i>E. superba</i>	45	50	5
<i>D. antarctica</i>	73	17	10
<i>S. neumayeri</i>	49	30	21
<i>O. validus</i>	53	32	15
<i>P. corrugatus</i>	35	45	20

Отримані нами дані обґрунтовують можливість використання обраних видів гідробіонтів для одержання цільових молекул білкової природи, зокрема, серинових протеїназ, які є одними з найбільш широко використовуваних ферментів у промисловості і медицині, а також ферментів, здатних розщеплювати фібриноген. Беручи до уваги отримані результати, гідробіонти *A. colbecki* та *S. neumayeri* можна розглядати як джерело для одержання фібрино(гено)літичних ферментів, у той час як *D. antarctica* є потенційним джерелом для одержання серинових протеїназ. Крім того,

достатній вміст білка дозволяє використовувати більшість досліджуваних видів гідробіонтів Антарктичного регіону для отримання фракції пептидів.

Публікації, що висвітлюють результати автора, наведені у розділі 3:

1. **Raksha N**, Gladun D, Savchuk O, Ostapchenko L. Protease composition in tissue extracts of hydrobionts from Antarctic region. *Journal of Biology and Nature*. 2016;1:39-46. (здобувачем оцінено присутність у тканинах гідробіонтів *Odontaster validus* і *Glyptonotus antarcticus* ферментів з різною будовою активного центру, інтерпретовано результати та підготовлено публікацію до друку)
2. Gladun D, **Raksha N**, Savchuk O, Ostapchenko L. Methodological approach to the isolation of functionally active proteins from the tissues of marine hydrobionts: an example of *Adamussium colbecki*. *Advances in Polar Science*. 2015;26(4):299-304. (здобувачем сформульовано підхід щодо комплексного аналізу протеолітичного профілю тканин гідробіонту *Adamussium colbecki* та проведено оцінку ферментативної активності у загальному екстракті тканин)
3. 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 здійснено формування концепції дослідження, проаналізовано білковий спектр тканин гідробіонтів криль, морська зірка, гігантська ізопода, антарктичний морський їжак, антарктичний морський гребінець та актинія)
4. Гладун ДВ, **Ракша НГ**, Савчук АН, Остапченко ЛІ. Перспективи получения колагенолитических ферментов с гидробионтов Антарктического региона. *Український Антарктичний Журнал*. 2015;1(14):175-179. (здобувачем здійснено поділ екстракту тканин гідробіонту *Parborlasia corrugatus* на

*окремі білкові фракції методом хроматографії, що поділяє за розмірами, та проаналізовано протеолітичний профіль отриманих фракцій)*

**5.** Гладун ДВ, **Ракша НГ**, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Використання електрофоретичних методів для експрес-аналізу білків морських гідробіонтів Антарктичного регіону. Український Антарктичний Журнал. 2014;1(13):192-197. *(здобувачем розроблено концепцію експериментальної частини публікації)*

**6.** 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 підібрано оптимальні умови розділення екстрактів тканин гідробіонтів криль, морська зірка, немертина методом хроматографії, що поділяє за розмірами)*

**РОЗДІЛ 4**  
**РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ОДЕРЖАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНО**  
**ПЕРСПЕКТИВНИХ ФЕРМЕНТІВ З ГІДРОБІОНТІВ**  
**АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ**

**4.1. Оптимізація методу одержання серинових протеїназ на прикладі медузи *Diplulmaris antarctica* Антарктичного регіону та загальна біохімічна характеристика одержаних ферментів**

Актуальність проблеми пошуку нових економічно обґрунтованих джерел сировини для одержання ферментів обумовлена низкою чинників, у тому числі й інтенсивним розвитком біотехнології, зокрема розширенням тих сегментів промисловості, що передбачають активне використання ферментів та зростання частки продукції на основі ферментів [167, 168]. Застосування ферментів на різних етапах біотехнологічного виробництва дозволяє покращити якість продукції, зокрема за рахунок зниження температури оброблення сировини; дозволяє скоротити виробничі витрати, підвищити ефективність технологічних процесів [169]. З іншого боку, підвищення екологічної освіченості населення, орієнтація на використання максимально безпечних для довкілля засобів спонукає до впровадження у виробництво технологій, застосування яких мінімізує негативний вплив на навколишнє середовище та дозволяє вирішити проблему максимального використання відходів, отриманих в інших галузях промисловості. З цих позицій заміна технологій з використанням хімічних агентів на ферменти дозволяє зменшити забрудненість виробничих стоків; сприяє покращенню умов праці за рахунок зниження агресивних впливів хімічних засобів на здоров'я працівників, що у цілому відповідає потребам як виробників, так і споживачів продукції.

Незважаючи на стрімке зростання попиту на препарати на основі ферментів та потребу у високо ефективних промислових ферментах, ринок



ферментів все ще далекий від насичення. Окрім того, незначна частка ферментів вітчизняного виробництва обумовлює залежність цього сегменту від імпортової продукції, що безумовно впливає на вартість кінцевого продукту та спонукає до пошуку джерел сировини з метою переорієнтації ринку на ферментні препарати українського виробництва.

Поряд з традиційним одержанням ферментів з сировини тваринного походження чи біотехнологічним виробництвом бактеріальних ферментів, джерелом ферментів можуть слугувати морські організми, які становлять фактично необмежений ресурс для отримання білкових молекул [170]. У цьому контексті варто звернути увагу на так звані непромислові види гідробіонтів, розповсюдження яких внаслідок господарської діяльності людини може спричинити екологічну катастрофу у місцях їхнього надмірного скупчення.

Одним із завдань роботи було розробити методологію одержання серинових протеїназ з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону, яка б включала мінімальну кількість етапів очищення і, разом з тим, забезпечувала високий вихід цільових ферментів зі збереженням їхньої максимальної активності. У даному дослідженні як сировину для одержання серинових протеїназ було використано медузу виду *Diplulmaris antarctica*. Вибір саме цього гідробіонту як джерела серинових протеїназ продиктований результатами попереднього розділу роботи, відповідно до яких 73 % протеолітичної активності у тканинах *D. antarctica* обумовлено саме сериновими протеїназами. Відповідно до літератури [171], білки з організмів, що існують за понижених температур, мають певні структурні характеристики, які впливають на стабільність молекули, а відтак, застосування процедур очищення, які зазвичай використовуються для одержання ферментів з тканин ссавців, може виявитися менш ефективним і не привести до очікуваних результатів. Так, наприклад, серинові протеїнази, очищені з різних джерел, можуть відрізнятися за температурним та рН

оптимумом, молекулярною масою, ізоелектричними точками, певними кінетичними характеристиками. Саме тому у випадку «нетипових» сировинних ресурсів необхідно не лише підібрати метод, який би максимально відповідав поставленим задачам, а й оптимізувати певні параметри обраного методу. Етап оптимізації є виключно важливим з огляду на існування певних структурних особливостей білків гідробіонтів у порівнянні з аналогічними молекулами з мезофільних організмів. Так, наприклад, колагенази з крабів, зважаючи на їх певні фізико-хімічні характеристики, навіть виділяють в окрему підгрупу хімотрипсиноподібних серинових протеаз – брахіуринів [172]. Отже, відмінності у структурі білків гідробіонтів обумовлюють необхідність розробки та/чи оптимізації методів їх одержання, очистки та стабілізації.

Для одержання фракції серинових протеїназ було використано методи хроматографії, оскільки саме хроматографія дозволяє одержувати молекули з огляду на їхні певні фізико-хімічні характеристики, як то ізоелектричні точки, ступінь гідрофобності молекули, специфічність взаємодій з лігандами. В рамках сформульованого вище завдання було перевірено ефективність застосування іонообмінної та афінної хроматографії для одержання фракції серинових протеїназ. Так як обидва хроматографічні підходи ґрунтуються на взаємодії цільових білків з функціональними групами сорбенту, висока іонна сила проби буде перешкоджати таким взаємодіям. Тому перед початком проведення хроматографічного розділення зразки ліофілізату тканин *D. antarctica* очищали від можливих домішок методом хроматографії, що поділяє за розмірами. Для цього ліофілізат *D. antarctica* розчиняли у 50 мМ трис-НСІ буфері, (рН 7,4), що містив 130 мМ NaCl. Після відділення нерозчиненого матеріалу шляхом центрифугуванням, супернатант наносили на колонку с носієм сефадекс Ж 25. Очищені у такий спосіб зразки використовували у подальшій роботі.

Спочатку було апробовано ефективність використання аніонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-сефарозі як підходу для одержання фракції серинових протеїнів. До переваг іонообмінної хроматографії у порівнянні з іншими хроматографічними підходами можна віднести відносну дешевизну сорбенту та можливість варіювати окремі параметри хроматографічного процесу для досягнення максимального ступеню очищення цільових білків. Враховуючи, що ефективність поділу безпосередньо залежить від низки факторів, у тому числі сорбції матеріалу на носіїві, швидкості потоку нанесення та елюції матеріалу, складу робочого буферу для хроматографування, концентрації зразку при нанесенні, першочерговим нашим завданням було підібрати умови, які б забезпечили належний поділ зразка з використанням обраного нами методу. Аналіз літератури свідчить, що ізоелектричні точки більшості серинових протеїнів з різних джерел знаходяться в області слабо лужних та лужних значень рН [173,174], тому у нашому дослідженні пробу наносили в буферах з рН 7,4 та 10,0. Для елюції матеріалу, що зв'язався з сорбентом, було використано ступінчастий градієнт NaCl, що дозволило зібрати декілька фракцій.

Отже, як буфери для нанесення було використано 10 мМ трис-HCl буфери з рН 7,4 та 10,0. Елюцію матеріалу проводили 10 мМ трис-HCl буфером з рН 8,0 за градієнту NaCl - 25 % (0,25 М), 40 % (0,4 М) та 100 % (1 М). Типову хроматограму розділення зразка *D. antarctica* методом аніонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-сефарозі за нанесення проби в буфері з рН 7,4 наведено на рис. 4.1А.

Всі одержані фракції перед проведенням подальших досліджень піддавали очищенню методом хроматографії, що поділяє за розмірами. На рис. 4.1Б наведено хроматограму очищення першої фракції, так як представлення хроматограм очищення всіх трьох одержаних фракцій не є доцільним з огляду на типовість картини хроматографічного розділення.

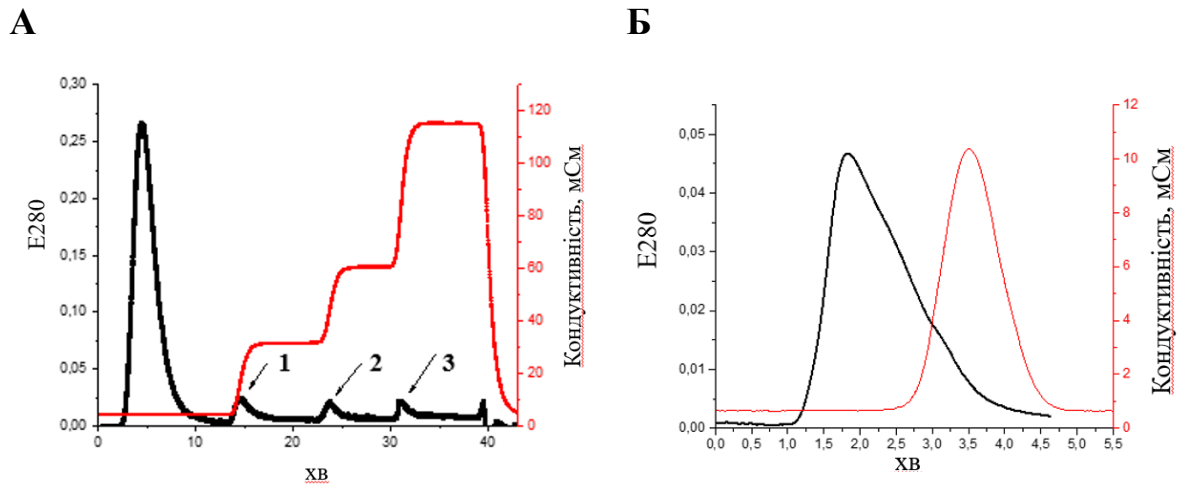


Рис. 4.1 Хроматограма очищення екстракту тканин *D. antarctica* методом аніонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-сефарозі за нанесення проби в буфері з рН 7,4 (А) та подальшого очищення одержаних фракцій (на прикладі першої фракції) методом хроматографії, що поділяє за розмірами (Б): 1 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,25 М NaCl; 2 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,4 М NaCl; 3 – фракція, елюйована з використанням буферу з 1 М NaCl

Для оцінки присутності активних ферментів фракції аналізували методом ензим-електрофорезу з використанням різних субстратних білків. Ензим-електрофоретичний аналіз з заполімеризованим у розділяючий гель желатином (рис. 4.2А) виявив присутність активних ферментів лише у фракції, елюйованій з використанням буферу з 0,25 М NaCl. Локалізація зон гідролізу вказує на присутність ферментів з молекулярною масою близько 80 кДа та 30-35 кДа. Застосування як субстрату фібриногену дозволило виявити ферменти з фібрино(гено)літичною активністю у фракціях, елюйованих з використанням буферів з 0,25 М і 1 М NaCl (рис. 4.2Б). Фракція, елюйована з використанням буферу з 0,25 М NaCl, містила лише одну чітко виражену зону гідролізу, локалізація якої відповідала білкам з молекулярною масою близько 70 кДа.

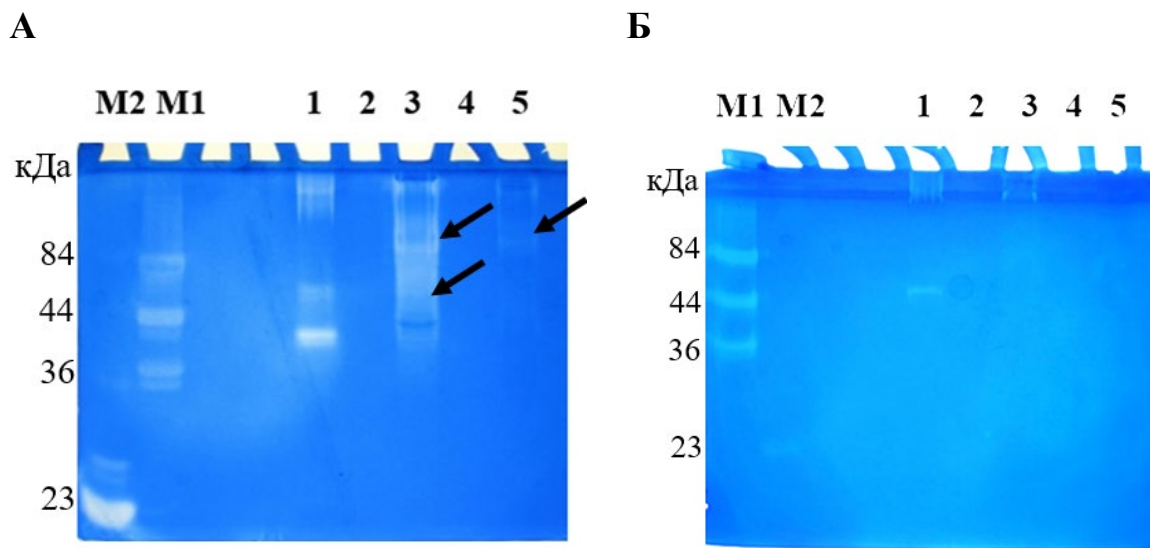


Рис. 4.2 Ензим-електрофореграми (субстратний білок желатин (А) та фібриноген (Б) фракцій, одержаних з екстракту тканин *D. antarctica* методом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-сефарозі за нанесення зразка в буфері з рН 7,4: М1 – плазмін (84 кДа) та його деградовані форми (44 кДа і 36 кДа) як маркери молекулярних мас; М2 – трипсин (23 кДа); 1 – вихідний зразок; 2 – незв'язана фракція; 3 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,25 М NaCl; 4 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,4 М NaCl; 5 – фракція, елюйована з використанням буферу з 1 М NaCl. Стрілкою позначено зони гідролізу субстратного білка ферментами, що присутні у фракції

Співпадіння зон гідролізу при використанні двох різних субстратних білків дозволяє припустити, що фермент з такою молекулярною масою з однаковою ефективністю розщеплює як фібриноген, так і желатин. Варто підкреслити, що фібриноген є більш специфічним субстратом, так як не всі ферменти здатні до його гідролізу, тому одержані нами результати щодо здатності ферментів з *D. antarctica* розщеплювати желатин на фоні відсутності активності щодо фібриногену можуть вказувати на присутність ферментів з різною субстратною специфічністю.

З огляду на існуючу на сьогодні нагальну потребу у високоефективних терапевтичних засобах, здатних впливати на окремі фактори системи гемостазу та позбавлених при цьому побічних ефектів, характерних для типових антикоагулянтів, одержані нами результати щодо присутності у тканинах *D. antarctica* ферментів з фібрино(гено)літичною активністю є досить перспективними та обґрунтовують доцільність проведення подальших досліджень, спрямованих на очищення та дослідження властивостей цих ферментів.

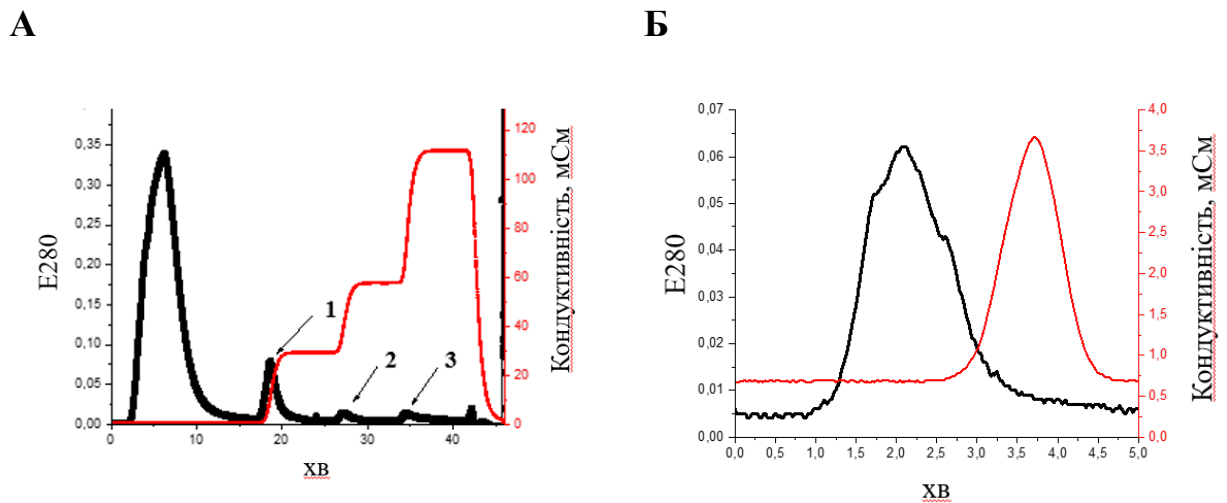


Рис. 4.3 Хроматограма очищення екстракту тканин *D. antarctica* методом аніонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-сефарозі за нанесення проби в буфері з рН 10,0 (А) та подальшого очищення одержаних фракцій (на прикладі першої фракції) методом хроматографії, що поділяє за розмірами (Б): 1 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,25 М NaCl; 2 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,4 М NaCl; 3 – фракція, елюйована з використанням буферу з 1М NaCl. Стрілкою позначено піки, що відповідають отриманим фракціям

На наступному етапі зразок *D. antarctica* наносили на колонку з ДЕАЕ-сефарозою у буфері з рН 10,0. Як видно з представленої хроматограми (рис.

4.3А), висота першого піку була вищою, ніж при нанесенні проби у буфері з рН 7,4, що вказує на вищий вміст білка у одержаній фракції.

Подальший аналіз фракцій методом ензим-електрофорезу виявив присутність ферментів, здатних розщеплювати желатин та фібриноген, лише у фракції, елюйованій з використанням буферу з 25 % NaCl (рис.4.4А, Б). Незважаючи на більшу кількість білка у фракції, одержаній при нанесенні проби у буфері з рН 10,0, активність, оцінена за вираженістю зон гідролізу, була нижчою у порівнянні з результатами при нанесенні проби у буфері з рН 7,4.

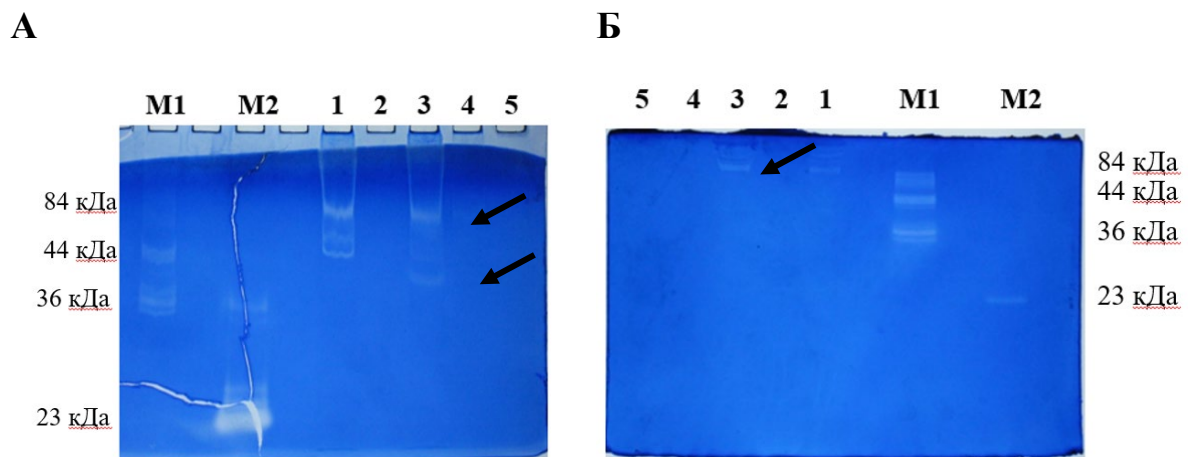


Рис. 4.4 Ензим-електрофореграми (субстратний білок желатин (А) та фібриноген (Б)) фракцій, одержаних з екстракту тканин *D. antarctica* методом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-сефарозі за нанесення зразка в буфері з рН 10,0: М1 – плазмін (84 кДа) та його деградовані форми (44 кДа і 36 кДа) як маркери молекулярних мас; М2 – трипсин (23 кДа); 1 – вихідний зразок; 2 – незв'язана фракція; 3 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,25 М NaCl; 4 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,4 М NaCl; 5 – фракція, елюйована з використанням буферу з 1 М NaCl. Стрілками позначено зони гідролізу субстратного білка ферментами, що присутні у фракції

Це може свідчити про меншу кількість гідролітичних ферментів чи їхню нижчу активність на тлі вищого вмісту сумарного білка у фракції. У цілому результати щодо розподілу активностей між фракціями співпадають з результатами попереднього етапу одержання серинових протеаз. Також було перевірено ефективність використання катіонообмінної хроматографії як одного з можливих підходів для одержання з тканин *D. antarctica* фракції серинових протеїназ. Варто відмітити, що ефективність підбору оптимальних умов одержання фракції цільових білків із застосуванням методів іонообмінної хроматографії значно зростає, якщо приблизно відомий амінокислотний склад білкових молекул чи їхні ізоелектричні точки. Так, наприклад, поділ на КМ-сефарозі з нанесенням зразка у буфері з рН 5,0 дозволяє виділяти білки, ізоелектричні точки яких знаходяться нижче значень рН 5,0. Незважаючи на те, що більшість серинових протеїназ належить до катіонних білків, з деяких об'єктів було одержано ферменти ізоелектричні точки яких лежать у області кислих значень рН [175], тому використання КМ-сефарози та обраного нами рН буферу нанесення зразка може виявитися досить ефективним. Результати хроматографічного розділення зразка *D. antarctica* на КМ-сефарозі представлено на рис. 4.5.

Відповідно до описаного вище алгоритму, одержані фракції було проаналізовано методом ензим-електрофорезу, що дозволило виявити, що активні ферменти знаходяться переважно у фракції, елюйованій з використанням буферу з 0,25 М NaCl (рис. 4.6). Незначну активність щодо желатину також було виявлено й у фракції, елюйованій з використанням буферу з 1 М NaCl. Незважаючи на присутність у вихідному зразку ферментів, здатних розщеплювати фібриноген, застосування катіонообмінної хроматографії не дозволило виділити ці ферменти, що може свідчити, що ізоелектричні точки фібрино(гено)літичних ферментів з *D. antarctica* знаходяться при значеннях рН вище 5,0.



Окрім ензим-електрофоретичного аналізу, протеолітичну активність у фракціях оцінювали спектрофотометрично використовуючи як субстрат казеїн.

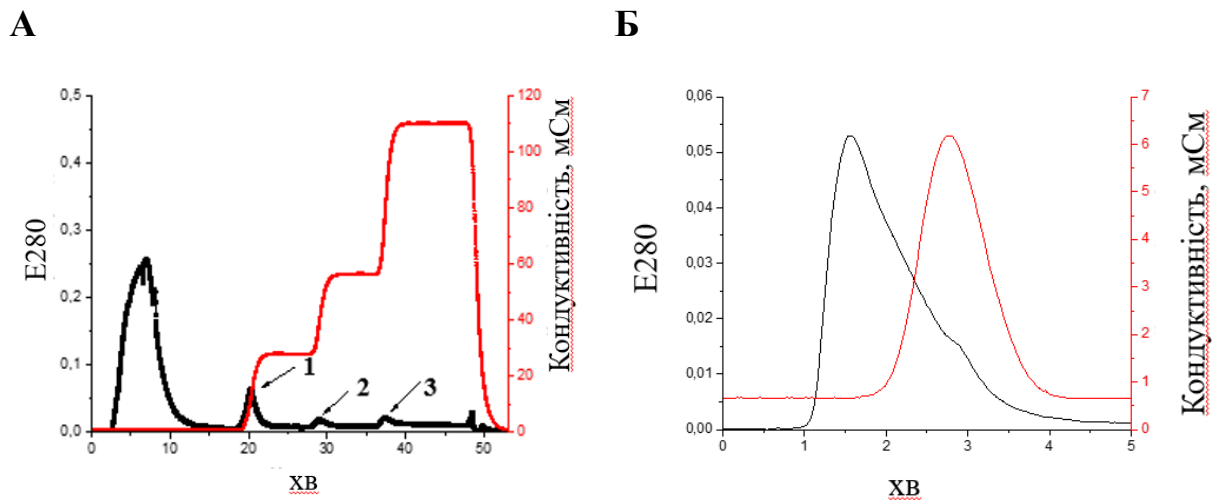


Рис. 4.5 Хроматограми очищення екстракту тканин *D. antarctica* методом катіонообмінної хроматографії на КМ-сефарозі за нанесення проби в буфері з рН 5,0 (А) та подальшого очищення одержаних фракцій (на прикладі першої фракції) методом хроматографії, що поділяє за розмірами (Б): 1 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,25 М NaCl; 2 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,4 М NaCl; 3 – фракція, елюйована з використанням буферу з 1 М NaCl. Стрілками позначено піки, що відповідають отриманим фракціям

Цей метод відомий у літературі як метод визначення казеїнолітичної активності і дозволяє оцінити загальну протеолітичну активність. Як видно з результатів, наведених у таблиці 4.1, найвищу активність було виявлено у фракціях, елюйованих з використанням 25 % NaCl.

З огляду на результати, найбільш ефективним виявився підхід з використанням катіонообмінної хроматографії – протеолітична активність

у фракціях, елюйованих з використанням буферів з 0,25 М та 0,4 М NaCl, складала  $22,34 \pm 1,10$  К.од/мг білка та  $19,82 \pm 0,92$  К.од/мг білка, відповідно.

Порівнявши результати спектрофотометричної оцінки протеолітичної активності з результатами ензим-електрофорезу можна побачити певні невідповідності.

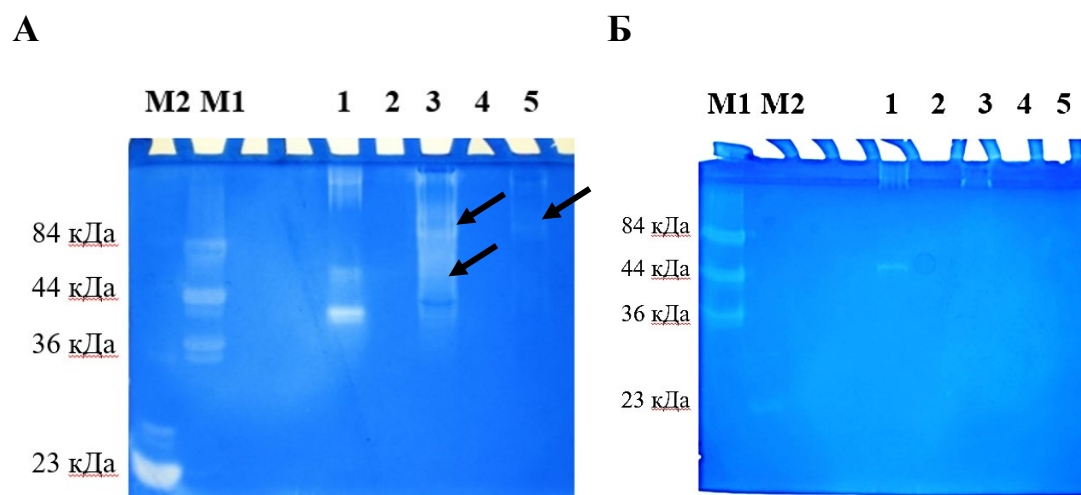


Рис. 4.6 Ензим-електрофореграми (субстратний білок желатин (А) та фібриноген (Б)) фракцій, одержаних з *D. antarctica* методом іонообмінної хроматографії на КМ-сефарозі за нанесення зразка в буфері з рН 5,0: М1 – плазмін (84 кДа) та його деградовані форми (44 кДа і 36 кДа) як маркери молекулярних мас; М2 – трипсин (23 кДа); 1 – вихідний зразок; 2 – незв'язана фракція; 3 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,25 М NaCl; 4 – фракція, елюйована з використанням буферу з 0,4 М NaCl; 5 – фракція, елюйована з використанням буферу з 1 М NaCl. Стрілками позначено зони гідролізу субстратного білка ферментами, що присутні у фракції

Так, наприклад, за відсутності зон гідролізу на електрофореграмах, було виявлено певну активність, оцінену спектрофотометричним методом. Це можна пояснити як нижчою чутливістю електрофоретичних

методів, так і різною субстратною специфічністю ферментів у фракціях. Іонообмінна хроматографія не належить до специфічних методів одержання серинових протеїназ, так як базується на відмінностях ізоелектричних точок білкових молекул, а не на особливостях будови активного центру та специфічних взаємодіях з лігандом.

Таблиця 4.1

**Протеолітична активність у фракціях, одержаних методами іонообмінної хроматографії ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Отримані фракції	КМ-сефароза, рН 5,0	ДЕАЕ- сефароза, рН 7,4	ДЕАЕ- сефароза, рН 10,0
	К.од/мг білка		
Фракція, елюйована з використанням буферу з 0,25 М NaCl	22,34±1,10	13,27±0,51	13,79±0,73
Фракція, елюйована з використанням буферу з 0,4 М NaCl	19,82±0,92	0,27±0,01	0,56±0,02
Фракція, елюйована з використанням буферу з 1 М NaCl	0,81±0,04	-	7,51±0,25

Тому щоб перевірити чи належать одержані нами ферменти саме до серинових протеїназ було оцінено протеолітичну активність у фракціях за додавання соєвого інгібітору трипсинів, який є інгібітором серинових протеїназ трипсинового ряду. Одержані результати (табл.4.2) свідчать, що у фракціях, елюйованих з використанням буферу з 0,25 М NaCl, міститься найбільше серинових протеїназ у порівнянні з фракціями, що були елюйовані за допомогою буферів з 0,4 М та 1 М NaCl.

Найбільш ефективною виявилась хроматографія на ДЕАЕ-сефарозі при рН 10,0 – відсоток інгібування складав 45 та 15 при використанні, відповідно, буферу, що містив 0,25 М та 1 М NaCl. Відсутність повного інгібування при

додаванні до проб соєвого інгібітору трипсинів може свідчити про те, що одержані фракції окрім серинових протеїназ містять також ферменти з іншою будовою активного центру.

Таким чином, застосування як аніонообмінної, так і катіонообмінної хроматографії не дозволило одержати з тканин *D. antarctica* серинові протеїнази, які були б сконцентровані в одній фракції і в достатній кількості. Тому надалі було використано більш специфічний метод афінної хроматографії.

Таблиця 4.2

**Протеолітична активність у фракціях, одержаних методами іонообмінної хроматографії, за внесення в інкубаційне середовище соєвого інгібітору трипсинів ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Отримані фракції	КМ-сефароза, рН 5,0	ДЕАЕ- сефароза, рН 7,4	ДЕАЕ- сефароза, рН 10,0
	Залишкова активність, %		
Фракція, елюйована з використанням буферу з 0,25 М NaCl	80,0±4,0	75,0±4,4	55,0±3,5
Фракція, елюйована з використанням буферу з 0,4 М NaCl	75,0±5,0	95,0±6,5	98,0±4,5
Фракція, елюйована з використанням буферу з 1 М NaCl	98,0±4,9	-	85,0±5,0

У цьому методичному підході сорбент кон'юговано з лігандом, який є специфічним до цільових молекул. Це дозволяє виділяти з-поміж пулу різних білків, присутніх у зразку, лише ті, що здатні зв'язатися з відповідним лігандом. Так як завданням роботи було одержати фракцію серинових протеїназ, як сорбент було використано бензамідин-сефарозу, де лігандом

служує амінобензамідин – синтетичний інгібітор трипсину та трипсиноподібних серинових протеїаз. Пробу після етапу очищення на сефадекс Ж 25 наносили на колонку за швидкості 2 мл/хв. Враховуючи наш попередній досвід очищення ферментів з відносно нетипових об'єктів, у тому числі й гідробіонтів, комах, секретів шкірних залоз рептилій, для елюції матеріалу, що зв'язався з сорбентом використовували буфер, який поєднував високу іонну силу (1 М NaCl) та низьке значення рН (рН 3,0), у той час як у стандартних протоколах застосовують якийсь один з чинників. Поєднання високої іонної сили та рН є обґрунтованим в умовах нашого експерименту, так як відмивання колонки після закінчення хроматографічного процесу з використанням буферу елюції або з низьким значенням рН, або з високою іонною силою приводила до «змивання» з сорбенту певної кількості білкового матеріалу, перевірка якого з використанням хромогенних субстратів виявила присутність активних ферментів.

Результати одержання фракції серинових протеїназ методом афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі наведено на рис.4.7. Фракцію, що відповідає піку № 2 і потенційно містить серинові протеїнази, було проаналізовано методом електрофорезу у ПААГ, що дозволило оцінити білковий склад фракції. Як видно з рис. 4.7Б, фракція №2 містила білкові смуги, що відповідають білкам з молекулярною масою 30 кДа, 45 кДа, 60 кДа. Також було виявлено смуги, що знаходяться в діапазоні 14-25 кДа. Окрім того, було проаналізовано фракцію №1, яка включала білки, що не виявляють афінності до бензамідин-сефарози і тому не зв'язуються з сорбентом. Відповідно до результатів електрофоретичного аналізу (рис.4.7Б), ця фракція містила значну кількість білків різної молекулярної маси. Враховуючи необхідність розроблення методології комплексної переробки сировини, фракцію, що не зв'язалась з бензамідин-сефарозою, було використано у подальших етапах роботи, зокрема як матеріал для одержання пептидів.

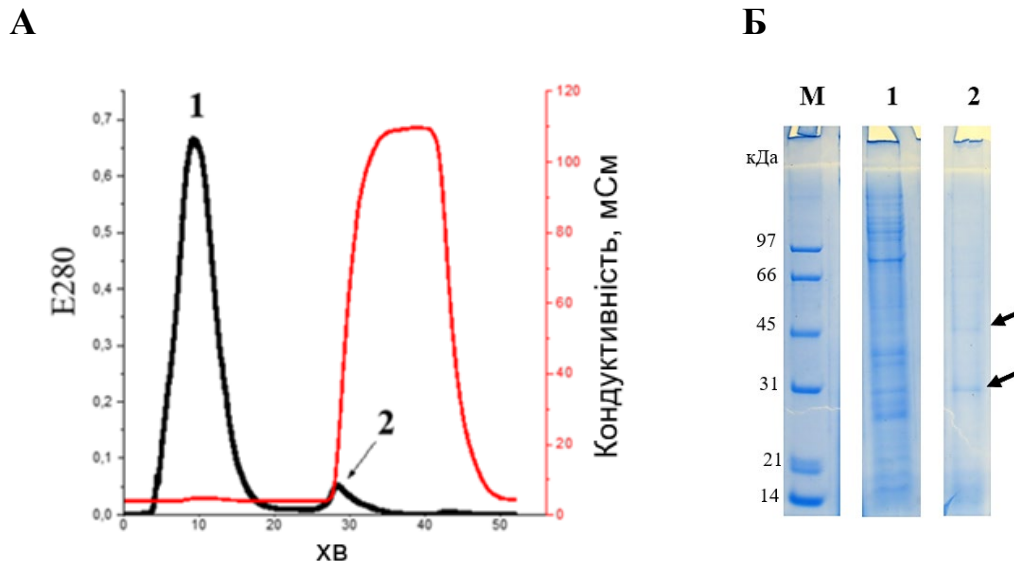


Рис. 4.7 Хроматограма одержання фракції серинових протеїназ методом афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі (А) та електрофореграма розділення білків фракції серинових протеїназ (Б): 1 – фракція, що не зв'язалась з сорбентом; 2 – фракція серинових протеїназ; М – маркери молекулярних мас. На хроматограмі стрілкою позначено пік, що відповідає фракції серинових протеїназ; на електрофореграмі стрілками позначено білкові смуги

Для більш детальної характеристики білків одержаної фракції було проведено аналіз методом двовимірного електрофорезу. Метод поєднує два етапи – ізоелектрофокусування у градієнті рН від 3,0 до 10,0 та подальше електрофоретичне розділення у поліакриламідному гелі, що у кінцевому результаті дозволяє розділяти молекули не лише за молекулярними масами, а й відповідно до їх ізоелектричних точок.

Отримані результати свідчать (рис.4.8), що фракція серинових протеїназ містить білки з різними ізоелектричними точками. Так, незначна кількість білків мала ізоелектричні точки при рН 3,0 та 6,0. Проте для більшості білків, присутніх у фракції, ізоелектричні точки знаходились при рН 9,0-10,0. Отримані нами результати опосередковано вказують на той факт, що частина

білків фракції серинових протеїназ представлена кислими білками, частина належить до нейтральних, проте домінуюча частка білків належить до лужних білків, що повністю узгоджується з тим фактом, що ізоелектричні точки серинових протеїназ зазвичай знаходяться при рН 9,0-11,0. Білки з ізоелектричними точками при рН 3,0 та 6,0, виявлені у досліджуваній фракції, можуть бути трипсиноподібними ферментами, адже на відміну від трипсинів вищих хребетних, які представлені переважно катіонними формами, трипсини морських безхребетних мають ізоелектричні точки в області кислих та сильно кислих значень рН [176].

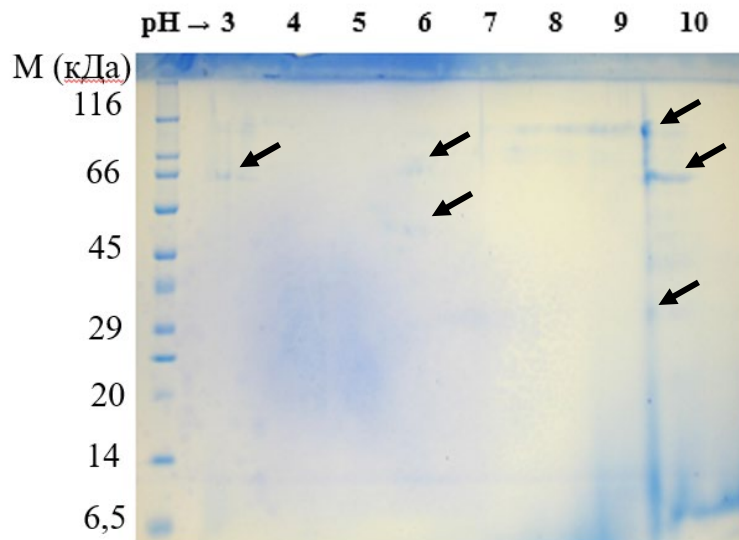


Рис. 4.8 2Д-електрофореграма фракції серинових протеїназ з *D. antarctica*: М – маркери молекулярних мас. Стрілками позначено білкові смуги

Відповідно до одержаних результатів, молекулярні маси білків, ізоелектричні точки яких знаходяться при рН 3,0, становлять приблизно 116 кДа та 66 кДа; білки з ізоелектричними точками при рН 6,0 мають молекулярні маси у діапазоні від 50 до 66 кДа. Молекулярні маси білків з

ізоелектричними точками при рН 9,0 мали найширший розкид молекулярних мас, що охоплює діапазон від 14 до 116 кДа.

Результати визначення ізоелектричних точок білків у фракції серинових протеаз частково пояснюють низьку ефективність іонообмінної хроматографії (як катіоно-, так аніонообмінної) як основного методу для одержання серинових протеїназ. Так, використання в умовах нашого дослідження КМ-сефарози дозволяє одержати фракцію, що містить білки з ізоелектричними точками нижче рН 5,0, проте при цьому втрачаються білки, ізоелектричні точки яких знаходяться вище цих значень. Протилежна ситуація має місце у випадку застосування ДЕАЕ-сефарози – за рН 7,4 та 10,0 з сорбентом зв'язуються білки з ізоелектричними точками вище цих значень.

Надалі, аналогічно до алгоритму, описаного вище, фракцію, що зв'язалась з бензамідин-сефарозою, було проаналізовано на наявність активних ферментів методом ензим-електрофорезу.

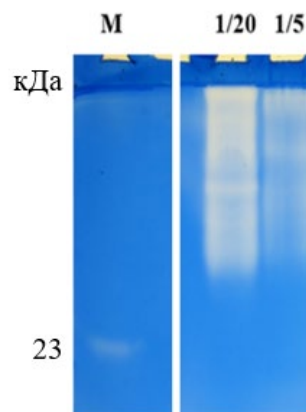


Рис. 4.9 Ензим-електрофореграма (субстратний білок желатин) фракції серинових протеїназ, одержаної з *D. antarctica*, методом афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі: 1 – фракція серинових протеїназ (нанесення, відповідно, у 20 та 5 мкл); М – трипсин

Порівнявши результати прояву ферментативної активності при використанні як субстрату желатину, колагену та фібриногену можемо



зробити висновок про здатність ферментів, присутніх в одержаній фракції, ефективно розщеплювати всі три білкові субстрати, причому найвищу активність було виявлено при використанні желатину та колагену. Схожа локалізація зон гідролізу на ензим-електрофореграмах, наведених на рис. 4.9 та 4.10, опосередковано доводить, що активність обумовлена одним і тим же ферментом чи ферментами. В обох випадках молекулярна маса активних ферментів була вищою 30 кДа. Таке значення молекулярної маси є вищим за молекулярну масу трипсинів чи трипсиноподібних ферментів, проте знаходиться у межах значень молекулярних мас деяких серинових протеїназ. Так, молекулярна маса серинової протеїнази з *Bacillus subtilis* складає 90 кДа [176].

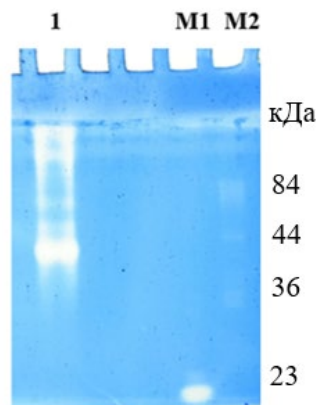


Рис. 4.10 Ензим-електрофореграма (субстратний білок колаген) фракції серинових протеїназ, одержаної з *D. antarctica*, методом афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі: 1 – фракція серинових протеїназ; M1 – трипсин (23 кДа); M2 – плазмін (84 кДа) та його деградовані форми (44 кДа і 36 кДа) як маркери молекулярних мас

Здатність ферментів з *D. antarctica* ефективно розщеплювати колаген та желатин може бути пов'язана з присутністю у фракції так званих «неспецифічних» колагеназ, для яких окрім нативного колагену субстратами є й інші білкові молекули. Відомо, що більшість протеаз можуть гідролізувати

лише одиночні спіралі або денатуровані колагенові молекули, і лише істинні колагенази здатні атакувати велику кількість сайтів уздовж колагенової спіралі обумовлюючи розщеплення молекули нативного колагену [177].

Як видно з рис. 4.11, активність ферментів, присутніх у фракції серинових протеїназ, щодо фібриногену є значно нижчою у порівнянні з активністю щодо желатину чи колагену.

Локалізація чітко вираженої зони гідролізу у верхній частині гелю та смуги нижчої інтенсивності в області, що відповідає білкам з молекулярною масою близько 40 кДа, свідчить про присутність у фракції серинових протеїназ декількох ферментів, що здатні розщеплювати фібриноген.

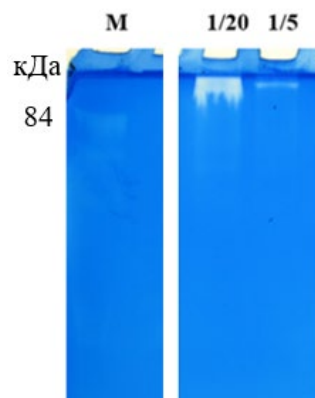


Рис. 4.11 Ензим-електрофореграма (субстратний білок фібриноген) фракції серинових протеїназ, одержаної з *D. antarctica*, методом афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі: 1 – фракція серинових протеїназ (нанесення, відповідно, у 20 та 5 мкл); М – плазмін (84 кДа) як маркер молекулярної маси

Враховуючи співпадіння зон гідролізу на електрофореграмах при використанні всіх трьох субстратних білків, не можна виключати того факту, що це може бути обумовлено проявом активності одного й того ж ферменту.

У цілому, присутність у фракції серинових протеїназ, ферментів, здатних розщеплювати фібриноген та колаген, свідчить про певний біотехнологічний

потенціал *D. antarctica* як джерела для одержання ферментів. Так, ферменти з колагенолітичною активністю можуть знайти застосування у шкіряній, текстильній галузях промисловості для пом'якшення вихідного матеріалу, позбавлення від супутніх білкових домішок або на стадії утилізації відходів виробництва. Варто відмітити, що ферменти, які здатні ефективно розщеплювати фібриноген не викликаючи при цьому утворення згустку, можуть бути потенційними антитромботичними агентами, тому отримані нами результати є цікавими та перспективними з позицій можливого використання ферментів з *D. antarctica* як фібрино(гено)літичних засобів.

Активність серинових протеїназ, одержаних з *D. antarctica*, також було оцінено спектрофотометрично використовуючи як субстрат казеїн, колаген I типу та синтетичні хромогенні субстрати. Відповідно до одержаних результатів (табл. 4.3), протеолітична активність у фракції складала  $25,4 \pm 1,2$  К.од/мг білка; даний показник був майже вдвічі вищим ніж у фракціях, отриманих методом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-сефарозі, проте був подібним до значень протеолітичної активності у фракції, отриманій на КМ-сефарозі. Було встановлено наявність у серинових протеїназ з *D. antarctica* колагенолітичної активності ( $48,7 \pm 1,6$  Од/мг білка), що повністю узгоджується з результатами оцінки присутності ферментів, що здатні розщеплювати колаген, методом ензим-електрофорезу. Визначення активності з використанням хромогенних субстратів, специфічних для трипсину (*N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-Arg-pNA), хімотрипсину (Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Phe-pNA) та еластази (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA), дозволяє говорити про належність серинових протеаз з *D. antarctica* до ферментів трипсинового ряду, оскільки активність було виявлено лише за використання BApNA, який є субстратом для трипсинів та трипсиноподібних ферментів.

Таблиця 4.3

**Загальна протеолітична активність та активність щодо окремих хромогенних субстратів у фракції серинових протеїназ ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Досліджувана фракція	Протеолітична активність, К.од/мг білка	Колагенолітична активність, Од/мг білка	Амідазна активність (мкмоль пНА/хв·мг білка) щодо субстратів для		
			трипсину	хімо-трипсину	еластази
Фракція серинових протеїназ	25,4±1,2	48,7±1,6	126,0±5,5	-	-

Наступний етап дослідження включав біохімічну характеристику отриманих серинових протеїназ, зокрема, визначення їх температурного та рН оптимуму. Такі дослідження є необхідними з огляду на потенційну можливість використання серинових протеїназ у технологічних процесах. Результати визначення залежності активності серинових протеїназ від температури наведено на рис. 4.12. Як бачимо, незначна активність спостерігалась за температури нижче +15 °С. Підвищення температури обумовлювало поступове зростання ферментативної активності. Оскільки найвища активність ферменту була визначена при +55 °С, саме ця температура є оптимальною для прояву ферментативної активності серинових протеїназ з *D. antarctica*.

У цілому встановлене нами значення температурного оптимуму для серинових протеїназ з *D. antarctica* було вищим ніж для канонічних трипсинів (+40 °С-45 °С) чи ферментів з організмів, адаптованих до низьких температур існування (+20 °С-40 °С). Разом з тим, показник температурного оптимуму співпадав з таким для деяких гідробіонтів Антарктичного регіону – камчатського краба *Paralithodes camtschatica* та антарктичного криля *Euphausia superba* [178, 179].

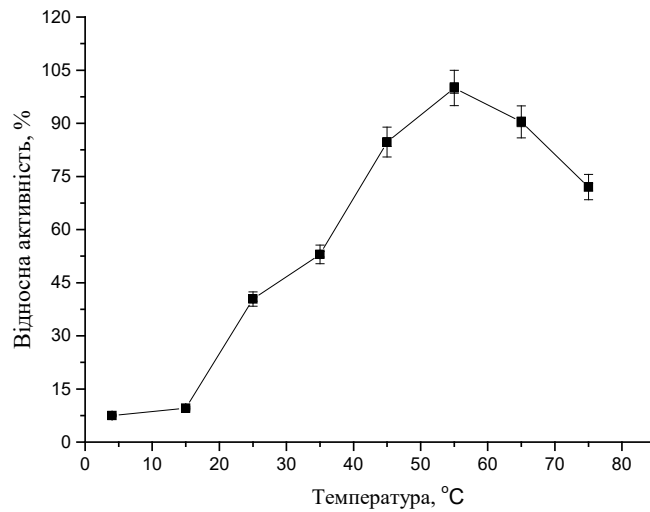


Рис. 4.12 Залежність активності серинових протеїназ, одержаних з *D. antarctica*, від температури

Надалі було визначено оптимальне для прояву ферментативної активності значення рН. Як видно з рис. 4.13, ферментативна активність у фракції серинових протеїназ була досить низькою при рН нижче 4,0; зберігалась на приблизно одному рівні при рН від 5,0 до 10,0 та стрімко зростала при підвищенні значень рН до 12,0.

Прояв максимальної ферментативної активності в області сильно лужних значень рН дозволяє говорити про належність ферментів, одержаних з *D. antarctica*, до лужних серинових протеїназ. Відповідно до літератури, ферменти з рН оптимумом вище 10,0 виділено з низки мікроорганізмів [180, 181], грибів [182], дріжджів [183], актиноміцетів [184], у той час як для більшості серинових протеїназ, одержаних з тканин ссавців чи безхребетних, рН оптимум знаходиться в діапазоні рН від 7,0 до 9,0.

Зазвичай джерелом лужних протеаз для промислових потреб слугують мікроорганізми. Проте враховуючи значний біотехнологічний потенціал лужних протеаз, зокрема їх застосування на різних етапах технологічних процесів обробки сировини у шкіряній, текстильній промисловості;

включення до складу миючих засобів; використання у харчовій промисловості, а також під час відновлення фото-, рентгенівських плівок та регенерації срібла, виявлення альтернативних джерел лужних протеаз для їх впровадження у вітчизняне біотехнологічне виробництво сприятиме здешевшанню продукції на тлі покращення її якості.

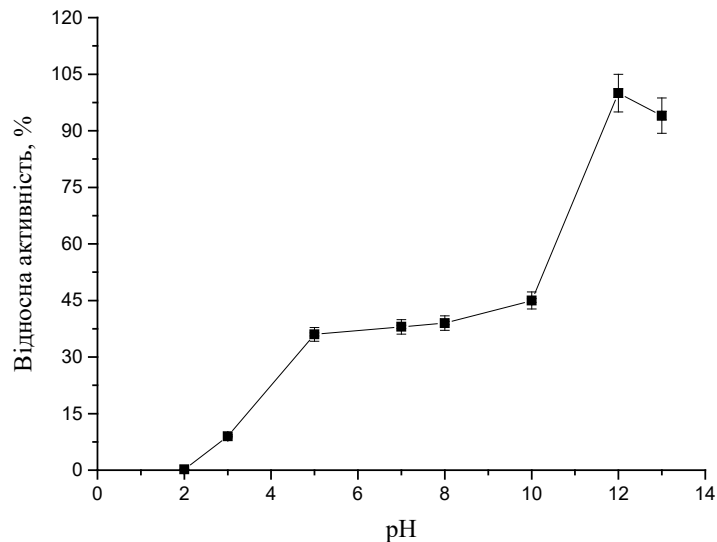


Рис. 4.13 Залежність активності серинових протеїназ, одержаних з *D. antarctica*, від значень рН

Оскільки перспектива використання ферментів у промисловості значною мірою залежить від їх здатності зберігати активність впродовж тривалого часу, надалі було оцінено активність серинових протеїназ, одержаних з тканин *D. antarctica*, при їх тривалій інкубації за кислих та лужних умов. Для цього гелі із заполімеризованим желатином після електрофоретичного розділення білків фракції серинових протеаз інкубували впродовж 15 годин у буферах з рН 3,0; 7,4 та 12,0. Порівнявши інтенсивність зон гідролізу (рис. 4.14) бачимо, що найвища ферментативна активність спостерігалась за інкубації у буфері з рН 12,0, що повністю співпадає з результатами спектрофотометричного визначення рН оптимуму.

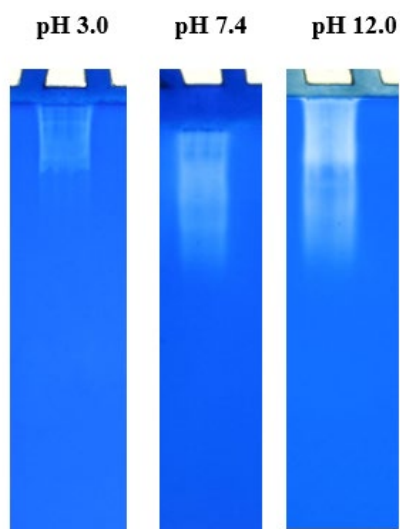


Рис. 4.14 Ензим-електрофореграма (субстратний білок желатин) фракції серинових протеїназ з *D. antarctica* після 12-ти годинної інкубації гелів при різних значеннях рН

На відміну від результатів спектрофотометричної оцінки ферментативної активності, інкубація гелю у буфері з рН 3,0 супроводжувалась появою вираженої зони гідролізу, що свідчить про здатність серинових протеїназ з *D. antarctica* виявляти активність і за низьких значень рН. Розбіжність результатів визначення впливу рН на активність серинових протеїназ можна пояснити дещо відмінними умовами проведення експерименту, зокрема, використанням синтетичного пептидного субстрату під час спектрофотометричного аналізу та білкового субстрату у методі ензим-електрофорезу.

Таким чином, у результаті порівняння ефективності декількох хроматографічних підходів для одержання фракції серинових протеїназ рекомендованим є 1) застосування афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі та елюція матеріалу, який зв'язався з хроматографічним носієм, буфером, що поєднує низьке значення рН і високий вміст солі для одноетапного одержання фракції серинових протеїназ; 2) застосування хроматографії на КМ-сефарозі чи ДЕАЕ-сефарозі при рН 10,0 та елюція

матеріалу, який зв'язався з хроматографічним носієм, буфером з 25 % NaCl для одержання фракції протеолітичних ферментів з різною будовою активного центру.

У цілому, отримані результати свідчать про доцільність використання *D. antarctica* як джерела для одержання серинових протеїназ; враховуючи консервативність будови окремих класів та родин ферментів, використані нами підходи можуть бути застосовані для одержання ферментів з медуз інших кліматичних зон. Температурний оптимум серинових протеїназ з *D. antarctica* при +55 °C та збереження активності в широкому діапазоні значень рН з максимальним проявом активності при рН 12,0 відкриває перспективи їхнього можливого використання у виробництвах, що потребують вищих температур та характеризуються нестійкістю або зміною значень рН впродовж технологічного процесу.

З іншого боку, з огляду на здатність серинових протеїназ ефективно розщеплювали желатин, колаген і, меншою мірою, фібриноген клінічно перспективним може бути їхнє використання для лікування інфікованих та гнійно-некротичних ран, створення профілактично-лікувальних гідролізатів чи навіть усунення дефіциту власних ферментів.

Суттєвою характеристикою, яку необхідно враховувати під час розробки методології одержання цільових молекул, особливо за перспективи масштабування, є сумарна вартість процесу. У запропонованому нами методі використання бензамідин-сефарози може бути лімітуючим фактором, так як цей сорбент належить до досить коштовних. Як дешевший аналог можна використати сорбент у якому лігандом слугуватиме соєвий інгібітор трипсинів. Соєвий інгібітор трипсинів є відносно дешевим, доступним, колонки на його основі є досить стабільні, що дозволяє їхнє багаторазове використання. Застосування СІТ-сефарози є доцільним для одержання серинових протеїназ трипсинового ряду.



Враховуючи вище викладене, наступний етап роботи передбачав синтез сорбенту у якому лігандом слугує соєвий інгібітор трипсинів та апробацію методу афінної хроматографії на СІТ-сефарозі для одержання з гідробіонтів Антарктичного регіону фракції серинових протеїназ, збагаченої саме на трипсиноподібні ферменти.

#### **4.2. Одержання трипсиноподібного ферменту з морського гребінця *Adamussium colbecki* та дослідження його деяких фізико-хімічних і каталітичних властивостей**

До протеїназ, які найбільш інтенсивно використовуються у різних галузях промисловості та у медицині, належать трипсини. З огляду на їх широке застосування та доступність джерел одержання, трипсини досить детально вивчені та охарактеризовані [185-188]. Проте, незважаючи на значну кількість досліджень, робіт, присвячених одержанню та характеристиці ферментів з гідробіонтів і, зокрема гідробіонтів Антарктичного регіону, у сучасній науковій літературі не багато. Беручи до уваги особливості умов існування, гідробіонти Антарктичного регіону потенційно можуть містити ферменти з властивостями дещо відмінними від наземних аналогів. Підставою для такого припущення є низка робіт по вивченню властивостей ферментів з психрофільних організмів [189-191]. Завдяки високій каталітичній ефективності та термолабільності ці ферменти викликають певний інтерес через можливість їхнього впровадження у технологічні процеси, де оптимальним є проведення реакцій при нижчих температурах [192-194]. Одержання ферментів для їх подальшого використання як основи для створення фармакологічних, косметичних засобів чи їх застосування у науковій сфері як інструментарію для здійснення спрямованого протеолізу та вивчення білок-білкових взаємодій передбачає належний ступінь очищення цільових молекул.

Основною метою цього етапу роботи було розробити ефективну схему очищення трипсиноподібного ферменту на прикладі *A. colbecki* та вивчити його деякі фізико-хімічні і каталітичні властивості. Вибір *A. colbecki* як джерела трипсиноподібного ферменту продиктований результатами першого розділу роботи, де, з огляду на дані інгібіторного аналізу та вміст загального білка, зроблено висновок про можливість використання цього гідробіонту для одержання серинових протеаз.

Для реалізації поставленої задачі було застосовано двохетапний хроматографічний підхід, що поєднував афінну хроматографію та хроматографію, що поділяє за розмірами. Застосування афінної хроматографії, як ключового етапу очищення ферментів, у тому числі і трипсинів, є досить поширеним підходом. Зазвичай це афінна хроматографія на бензамідин-сефарозі, якій передуює висолювання фракції, збагаченої на цільовий фермент, сульфатом амонію. Оскільки етап висолювання супроводжується неминучою втратою білкового матеріалу, а нашим завданням було мінімізувати втрати ферменту, етап висолювання було відкинуто. Як зазначалося у попередньому розділі роботи використання бензамідин-сефарози є досить коштовним підходом для одержання ферментів. Тому нами було синтезовано колонку з дешевшим лігандом – соєвим інгібітором трипсинів (СІТ). Оскільки соєвий інгібітор трипсинів ми отримували самостійно з соєвого шроту використовуючи відносно простий і недорогий метод екстракції, такий підхід є економічно виправданим. Застосування СІТ-сефарози дозволяє одержувати серинові протеїнази трипсинового ряду. Зразок після очищення від домішок, що можуть вплинути на процес афінних взаємодій, та переведення у 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, що містив 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  та 250 мМ  $\text{NaCl}$ , наносили на колонку з СІТ-сефарозою за швидкості потоку 2 мл/хв. Після відмивання сорбенту, матеріал, що зв'язався з хроматографічним носієм, елюювали 50 мМ гліциновим буфером, рН 3,0, що містив 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  та 1 М  $\text{NaCl}$ . Хроматограму

одержання трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* методом афінної хроматографії на СІТ-сефарозі наведено на рис.4.15.

Щоб оцінити ефективність застосування СІТ-сефарози було визначено ферментативну активність у зв'язаній фракції та у матеріалі, що не зв'язався з хроматографічним носієм, використовуючи специфічний для трипсинів хромогенний субстрат. Згідно з отриманими результатами, активність у фракції, елюйованій з сорбенту, складала  $17,35 \pm 0,75$  мкмоль пНА/хв·мг білка у порівнянні з  $1,54 \pm 0,02$  мкмоль пНА/хв·мг білка у фракції, яка містила білки, що не зв'язалися з носієм.

Оцінка білкового складу фракції методом електрофорезу у ПААГ виявила присутність білків різної молекулярної маси – верхня межа молекулярної маси складала близько 200 кДа, нижня – біля 25-30 кДа.

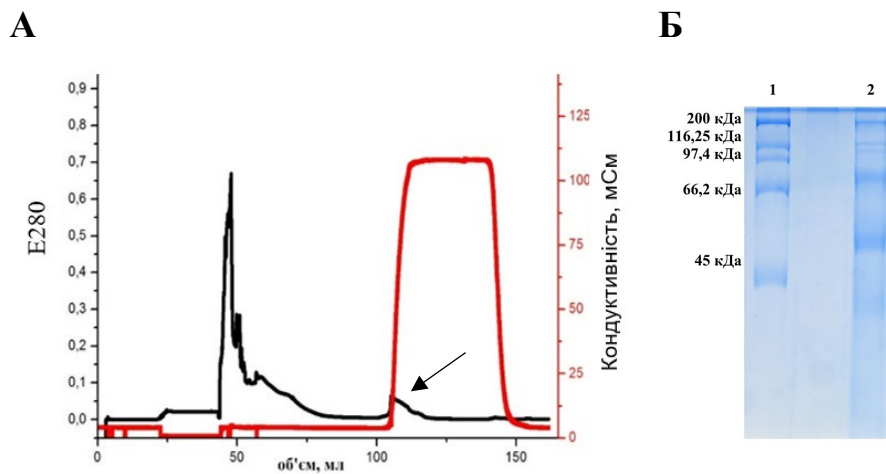


Рис. 4.15 Хроматограма одержання трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* методом афінної хроматографії на СІТ-сефарозі (А) та електрофореграма одержаної фракції (Б): 1 – маркери молекулярних мас; 2 – фракція, що містить трипсиноподібний фермент. На хроматограмі стрілкою позначено пік, що відповідає фракції трипсиноподібного ферменту

Зважаючи на те, що молекулярна маса більшості трипсинів та трипсиноподібних ферментів знаходиться у діапазоні 20-35 кДа, локалізація білкових смуг в області, що відповідає високомолекулярним білка, може свідчити про присутність у фракції ферментів, що не належать до істинних трипсинів. Такі результати можна пояснити специфічністю обраного ліганду – адже СІТ, окрім трипсинів, є інгібітором для деяких інших серинових протеїназ, у тому числі плазміногену, калікреїну, прекалікреїну, колагеназ – білків з молекулярною масою вище 30 кДа.

Оскільки завданням роботи було одержати гомогенний трипсиноподібний фермент, фракцію після етапу афінної хроматографії, піддавала подальшому очищенню методом хроматографії, що поділяє за розмірами. Попередні експерименти по розділенню білків використовуючи хроматографічні носії супердекс 200 та супердекс 75 показали вищу ефективність останнього, тому фракціонування зразка проводили на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG. У результаті хроматографічного поділу фракції після етапу афінної хроматографії було одержано дві фракції, які значно відрізнялися висотою піків, а отже і вмістом білка (рис. 4.16А). Для того, щоб знизити ймовірність потрапляння білків з фракції №1 у фракцію №2 внаслідок перекривання піків, збирали лише верхівку другого піка, що безумовно вплинуло на кількість одержаного матеріалу, проте дозволило отримати зразок, позбавлений домішок білків з сусіднього піку. Фракцію №2 надалі було проаналізовано методом диск-електрофорезу у ПААГ (рис. 4.16Б), який показав що фракція №2 містить одну чітко виражену смугу, що відповідає білку з молекулярною масою біля 23 кДа.

В цілому визначена нами молекулярна маса трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* знаходиться у діапазоні мас, типових для більшості трипсинів хребетних та безхребетних. Так, молекулярна маса трипсину бика становить близько 24 кДа [195], трипсину з акули та *O. validus* – 28 кДа [2, 3], трипсину з асцидії – 23 кДа [196].

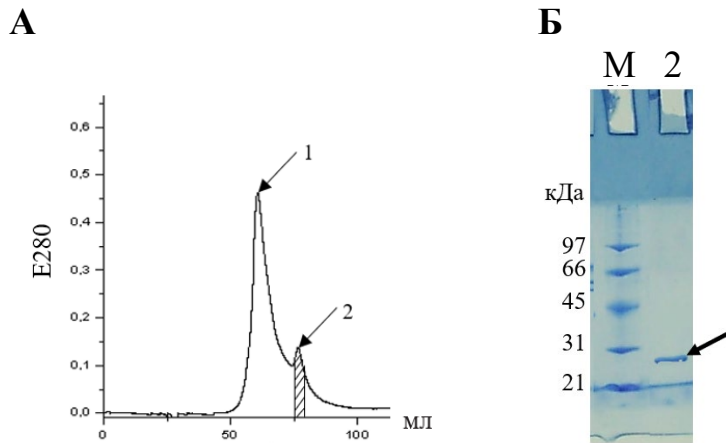


Рис. 4.16 Хроматограма (А) розділення білків фракції, одержаної після етапу афінної хроматографії, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG та електрофореграма (Б) фракції №2: 1, 2 – номери одержаних фракцій; М – маркери молекулярних мас. На хроматограмі стрілками позначено піки, що відповідають отриманим фракціям; на електрофореграмі стрілкою позначено білкову смугу, що відповідає трипсиноподібному ферменту

Молекулярні маси трипсинів, виділених з криля, краба, омара, є дещо вищими і складають відповідно 30 кДа, 34 кДа та 35 кДа [197, 198]. У цілому вища молекулярна маса трипсинів безхребетних є результатом посттрансляційної модифікації молекули ферменту, зокрема її глікозилювання, що є одним з механізмів захисту від автолітичного розщеплення [199].

Для оцінки наявності у фракції активних ферментів було проведено ензим-електрофоретичний аналіз з заполімеризованим у розділяючий гель желатином.

Як видно з наведеної електрофореграми (рис. 4.17), фракція, одержана у результаті поєднання двох хроматографічних етапів, містила лише один активний фермент, що підтверджується чітко вираженою зоною гідролізу в області, що відповідає білкам з молекулярною масою 20-25 кДа. У цілому, молекулярна маса трипсиноподібного ферменту, визначена методами ензим-електрофорезу та звичайного електрофорезу, повністю співпадала і становила

23-24 кДа. Варто зазначити, що незважаючи на присутність білкових смуг у фракції №1, більшість з них не належали до ферментів, так як ензим-електрофоретичний аналіз цієї фракції виявив лише незначну за інтенсивністю зону гідролізу, локалізовану в області високомолекулярних білків (дані не представлено).

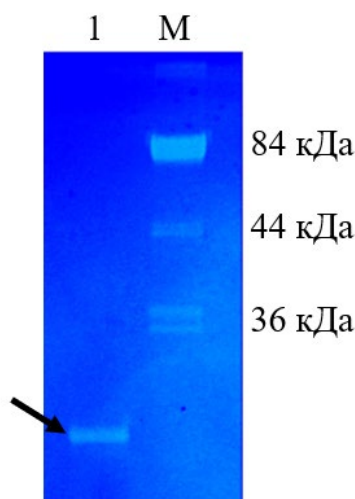


Рис. 4.17 Ензим-електрофореграма фракції, що містить трипсиноподібний фермент: 1 – досліджувана фракція; М – плазмін (84 кДа) та його деградовані форми (44 кДа і 36 кДа) як маркери молекулярних мас. Стрілкою позначено зону гідролізу субстратного білка трипсиноподібним ферментом

Додатково наявність трипсиноподібної активності було оцінено спектрофотометричним методом використовуючи хромогенний субстрат, специфічний для трипсинів. Порівнявши результати визначення активності в обох фракціях можна говорити про ефективність використаного нами підходу одержання трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki*, так як основну активність було виявлено саме у фракції №2. Незначна активність, ідентифікована у фракції №1, є цілком закономірною і може бути пояснена

присутністю інших серинових протеїназ, що виявляють специфічність до хромогенного субстрату.

Узагальнюючу таблицю очищення трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* наведено нижче.

Таким чином, у результаті поєднання двох хроматографічних етапів – афінної хроматографії на СІТ-сефарозі та хроматографії, що поділяє за розмірами, на супердекс 75, з *A. colbecki* було одержано трипсиноподібний фермент з виходом 50,3 %. Питома активність після заключного етапу очищення ферменту становила 31,6 Од/мг білка у порівнянні з 4,2 Од/мг білка у вихідному зразку, що відповідає ступеню очищення 7,5.

Таблиця 4.4

**Етапи очищення трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki***

Етапи	Загальний вміст білка (мг)	Загальна активність (Од активності)	Питома активність (Од/мг білка)	Ступінь очищення	Вихід (%)
Вихідний зразок	10,5	44,1	4,2	1,0	100
Афінна хроматографія на СІТ-сефарозі	1,2	22,7	18,9	4,5	51,4
Хроматографія, що поділяє за розмірами (сорбент супердекс 75)	0,7	22,1	31,6	7,5	50,3

Надалі було охарактеризовано деякі фізико-хімічні та каталітичні властивості трипсиноподібного ферменту. Подібні дослідження є важливими, так як знання механізмів, які визначають структурно-функціональні взаємозв'язки у білкових молекулах з організмів, що адаптовані до понижених температур існування, потребують уточнення та доповнення.

Крім того, такі дослідження можуть бути корисними з позицій можливого практичного застосування одержаного нами трипсиноподібного ферменту, адже дозволять визначити умови, найбільш оптимальні для прояву активності ферменту, та встановити можливі межі застосування трипсиноподібного ферменту з огляду на різне значення рН середовища, температурний показник, тощо.

Субстратну специфічність трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* оцінювали, визначаючи його амідазну та естеразну активність. Амідазну активність визначали використовуючи низку низькомолекулярних хромогенних субстратів, зокрема  $\text{puroGlu-Pro-Arg-pNA}$ ,  $\text{H-D-Phe-Pip-Arg-pNA}$ ,  $\text{N-}\alpha\text{-benzoyl-DL-Arg-pNA}$ ,  $\text{H-D-Val-Leu-Lys-pNA}$ , що застосовуються у рутинній практиці оцінки активності серинових протеаз. Враховуючи фізіологічну роль трипсинів, як основних травних ферментів, пептидні субстрати не є оптимальними для цих ферментів, проте їхнє застосування дозволяє визначити первинну субстратну специфічність трипсиноподібних ферментів, одержання з різних джерел.

Як видно з таблиці 4.5, трипсиноподібний фермент з *A. colbecki* виявляв активність щодо всіх специфічних хромогенних субстратів, що може слугувати певним підтвердженням його належності до трипсинів. Адже відомо, що трипсини гідролізують пептидний зв'язок в утворенні якого задіяні залишки Arg чи Lys [200]. У випадку досліджуваного трипсиноподібного ферменту такі фактори як наявність Arg у P1-положенні субстрату та довжина молекули субстрату впливали на прояв активності. Так, заміна у P1-положенні субстрату залишку Arg на Lys або використання субстрату  $\text{N-}\alpha\text{-benzoyl-DL-Arg-pNA}$ , який складається лише з одного модифікованого амінокислотного залишку призводило до суттєвого зниження активності. Такі результати у цілому узгоджуються з даними наведеними у літературі [201, 202], де автори відмічали залежність активності трипсину від довжини субстрату.



Таблиця 4.5

**Активність трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* щодо деяких хромогенних субстратів (M±m, n=6)**

<b>Субстрат</b>	<b>Амідазна активність, мкмоль пНА/хв·мг білка</b>
pyroGlu-Pro-Arg-pNA	97,28±4,85
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	36,79±1,75
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	23,75±1,20
<i>N</i> -α-benzoyl-DL-Arg-pNA	5,54±2,54
Ac-Phe-pNA	-
<b>Субстрат</b>	<b>Естеразна активність, Од/мг білка</b>
<i>N</i> -α- <i>p</i> -tosyl-L-Arg-methylester	15,42 ± 1,23

Оскільки для належної орієнтації молекули субстрату важливими є взаємодії між групами ферменту та субстрату, що просторово віддалені від ділянки S1-P1, отримані результати можуть вказувати на важливість залучення більш віддалених амінокислотних залишків субстрату у забезпечення належної просторової орієнтації субстрату відносно активного центру трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki*.

Трипсиноподібний фермент з *A. colbecki* не виявляв активності щодо субстрату Ac-Phe-pNA, який є специфічним для хімотрипсину, що опосередковано може свідчити про його належності саме до ферментів трипсинового ряду.

Окрім амідазної активності для трипсинів та трипсиноподібних ферментів притаманна й естеразна активність [195]. У цілому, здатність гідролізувати ефірні субстрати є навіть більш вираженою у порівнянні із здатністю розщеплювати амідні субстрати. Тому з метою одержання більш детальної інформації щодо субстратної специфічності трипсиноподібного

ферменту було визначено чи виявляє цей фермент естеразну активність. Відповідно до отриманих нами результатів активність ферменту щодо субстрату *N*- $\alpha$ -*p*-tosyl-L-Arg-methylester складала  $25,44 \pm 1,23$  Од/мг білка, що дозволяє говорити про відносно високу естеразну активність трипсиноподібного ферменту з гідробіонту Антарктичного регіону.

Фізико-хімічна характеристика будь якого ферменту передбачає визначення його температурного та рН оптимуму. З огляду на той факт, що об'єктом дослідження є фермент з гідробіонту Антарктичного регіону, визначення залежності активності ферменту від температури є особливо цікавим, оскільки дозволяє очікувати, що фермент виявлятиме високу активність і при низьких температурах. Так як найвищу активність трипсиноподібного ферменту було виявлено при використанні ругоGlu-Pro-Arg-*p*NA, всі подальші дослідження властивостей ферменту проводили використовуючи саме цей субстрат. Як видно з рис. 4.18А, крива залежності активності трипсиноподібного ферменту від температури має типову дзвоноподібну форму і описує плавне зростанням відносної активності при підвищенні температури від +8 °С до +25 °С.

Найвищий прояв ферментативної активності було визначено при +25 °С. Подальше підвищення температури включно до +50 °С обумовлювало поступове зниження активності трипсиноподібного ферменту. Варто відмітити, що при +8 °С активність трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* становила 40 % від максимальної, що свідчить про здатність ферменту каталізувати перебіг ферментативної реакції за понижених температур.

Аналіз літературних джерел свідчить про досить широкий діапазон температур, оптимальних для прояву активності трипсинів з різних джерел. У цілому, встановлений температурний оптимум трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* знаходиться у межах температур, оптимальних для функціонування ферментів з психрофільних бактерій – +20-40 °С [203, 204]. У той час як

температурний оптимум трипсинів з риб є значно вищим і складає  $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$  для сардини [205],  $+55\text{ }^{\circ}\text{C}$  для кефалі і тріски [206].

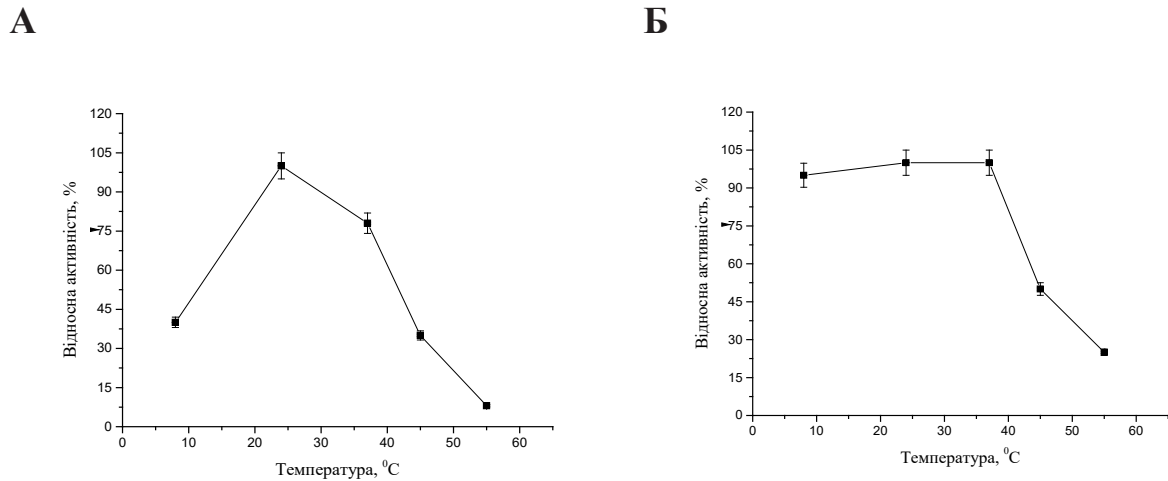


Рис. 4.18 Залежність активності трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* від температури (А) та відносна активність ферменту після його інкубації впродовж 30 хв за різних температур (Б)

Більш того, температурний оптимум для трипсину з лосося та каракатиці знаходиться при  $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$  та  $+70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , відповідно [207, 208].

Для ферментів з організмів, що адаптовані до низьких температур середовища існування, характерна низька стабільність білкової молекули, що є одним з механізмів, які забезпечують належну каталітичну ефективність ферментів за понижених температур. Підвищення каталітичної ефективності безпосередньо пов'язано з менш компактною упаковкою білкової глобули частково внаслідок зростання кількості та довжини петельних структур, а також зростання кількості нековалентних взаємодій між доменами та окремими ділянками поліпептидного ланцюга під час формування вищих рівнів організації молекули білка [209]. Згідно концепції «локальної гнучкості», ділянки молекули ферменту, що беруть участь у каталізі, характеризується значною гнучкістю, у той час як ділянки молекули, які безпосередньо не залучені у процес каталізу, зберігають відносно жорстку

конформацію. Підвищення рухливості окремих ділянок молекули ферменту забезпечує необхідну комплементарність до субстрату, а відтак, і вищу питому активність. Проаналізувавши літературу, можна виокремити певні структурні особливості притаманні білкам з холодадаптованих організмів. На рівні первинної структури це, зокрема, підвищення гідрофільності молекули внаслідок зниження кількості гідрофобних амінокислот; зростання кількості залишків метіоніну, серину та гліцину на фоні зменшення кількості проліну; зниження співвідношення аргінін/лізін+аргінін [210-213]. Для вторинної та третинної структури характерна менша кількість дисульфідних та водневих зв'язків [214-216].

Створення загальної концепції, в рамках якої було б узагальнено наявну у літературі інформацію щодо особливостей будови білкових молекул з організмів, адаптованих до понижених температур, та встановлення взаємозв'язків між їх структурою і функціями ускладняється недостатньою кількістю експериментальних даних з цієї проблематики. Саме тому дослідження, спрямовані на з'ясування структурно-функціональних характеристик білків, і, зокрема ферментів, є актуальним так як дозволяють доповнити сучасні уявлення щодо механізмів холодової адаптації. Окрім теоретичного аспекту, подібні дослідження мають і суто практичний інтерес. У роботах [203,217,218] показано, ферменти, у тому числі й трипсини, одержані з риб холодних регіонів, відрізняються від трипсинів ссавців вищою каталітичною ефективністю за низьких температур. Також ці ферменти більш чутливі до інактивації за нагрівання чи низьких значень рН у порівнянні з мезофільними аналогами та характеризуються ширшою субстратною специфічністю. Такі властивості є привабливими з позицій їх застосування у біотехнологічних виробництвах. Наразі зростає тенденція до промислової обробки продуктів за м'яких, порівняно з традиційними, умов, зокрема за понижених температур, для того, щоб уникнути небажаних змін властивостей продукції та пониження харчової цінності чи якості [217, 218]. Ферменти, що

каталізують реакції за нижчих температур, можуть бути особливо корисними в тих промислових процесах, які вимагають ферментативної обробки впродовж короткого часу з наступною швидкою зупинкою реакції для того, щоб запобігти надлишковим чи шкідливим змінам продукту. Будучи термолабільними, такі ферменти можуть інактивуватися за незначного підвищення температури, яке не вплине на властивості кінцевого продукту.

Враховуючи вище викладене було оцінено стабільність трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* після його інкубації впродовж 30 хв у діапазоні температур від +8 °C та +55 °C. Відповідно до результатів, наведених на рис. 4.19Б, фермент зберігав активність на рівні майже 100 % за умов його інкубації при +8 °C, +24 °C та +37 °C; активність ферменту різко знижувалась при інкубації за вищих температур. Так, активність трипсиноподібного ферменту знижувалась на 50 % та 75 % після прогрівання зразків відповідно при +45 °C та +55 °C. За цією властивістю трипсиноподібний фермент з *A. colbecki* відрізнявся від трипсину бика, який зберігав майже 100 % активності після 30 хв інкубації при +80°C [219] чи від трипсинів з деяких видів риб [220].

Отримані в ході дослідження результати свідчать про досить низьку термостабільність ферменту, що у цілому узгоджується зі згаданою вище концепцією підвищення термолабільності білків із організмів, адаптованих до понижених температур, для яких характерне збереження достатньої активності за температур +20 °C і нижче та інактивація ферменту при температурах вище +40-45 °C.

Також було досліджено залежність активності трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* від значень рН та визначено чи зберігається активність ферменту після його інкубації впродовж 3 год у буферах з рН від 3,0 до 12,0. Встановлено, що оптимальним для прояву ферментативної активності є рН 9,0 (рис. 4.20А).

Залишкову активність було виявлено при значеннях рН нижче 5,0, а також при рН 12,0 та 13,0, що може бути обумовлено як зміною іонізації амінокислотних залишків в активному центрі ферменту чи сайті зв'язування субстрату, так і денатурацією молекули ферменту.

У цілому, рН оптимум трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* знаходиться у межах значень рН, що характерні для більшості трипсинів з різних джерел. Так, рН оптимум для трипсину бика, сардини, лосося, криля складає 8,0 [33, 34]; дещо нижче значення рН було виявлено для трипсинів з тріски чи краба – 7,5.

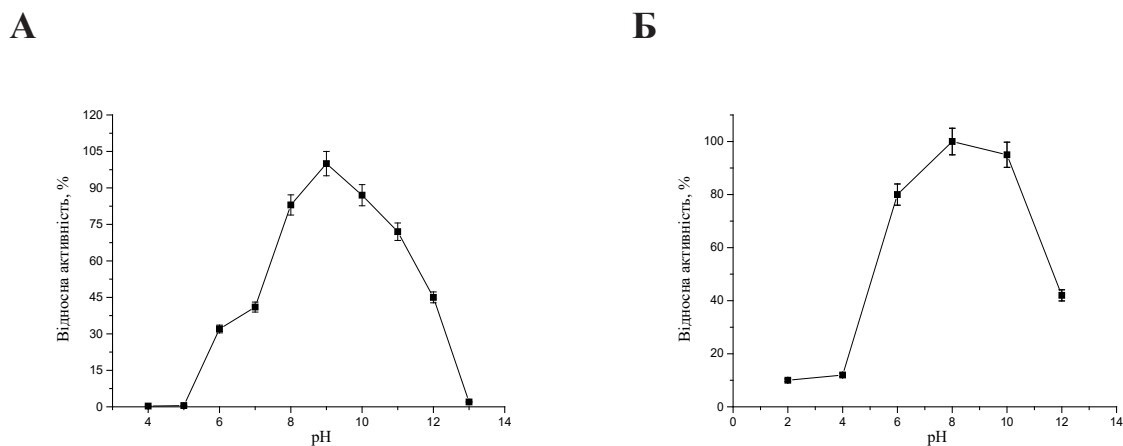


Рис. 4.20 Залежність активності трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki*, від значень рН (А) та відносна активність ферменту після його інкубації впродовж 3 год у буферах із різним значенням рН (Б)

Результати оцінки стійкості ферменту після його інкубації за різних значень рН свідчать про виражену нестійкість молекули трипсиноподібного ферменту при рН нижче 4,0 – залишкова активність, визначена за кімнатної температури та оптимального значення рН, складала менше 10 %, у той час як при інкубації в діапазоні рН від 6,0 до 10,0 фермент зберігав стабільність, що підтверджується залишковою активністю на рівні 80 %, 100 % та 95 % при значеннях рН 6,0, 8,0 та 10,0, відповідно (рис. 4.20Б).

Як уже зазначалося, для білків з організмів, що існують за понижених температур середовища, характерна гнучкість та лабільність молекули, що обумовлює зниження їх стійкості до дії зовнішніх чинників. З цих позицій отримані нами результати знаходяться у руслі вище описаного явища та збігаються з даними літератури, відповідно до яких трипсини, виділені з деяких гідробіонтів Антарктичного регіону, зберігають стабільність при рН 7,0-9,9 [221, 222] і є нестабільними при кислих значеннях рН.

Не зважаючи на те, що трипсини та трипсиноподібні ферменти не потребують іонів металів для прояву активності, наявність іонів може опосередковано впливати на активність цих ферментів обумовлюючи стабілізацію молекули ферменту. Так, наприклад, наявність двох високоафінних сайтів зв'язування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у молекулі трипсиногену бика необхідна для стабілізації молекули та попередження автолізу [223].

Таблиця 4.6

**Активність трипсиноподібного ферменту за внесення до інкубаційного середовища іонів кальцію ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Досліджувані проби	мкмоль пНА/хв·мг білка
Базальна активність	9,8±0,73
+ 5 мМ ЕДТА	10,8±0,67
+ 5 мМ $\text{Ca}^{2+}$	10,6±0,75
+ 10 мМ $\text{Ca}^{2+}$	10,4±0,65

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

У той час як дані щодо важливості іонів  $\text{Ca}^{2+}$  для прояву активності трипсинів з гідробіонтів є неоднозначними і свідчать як про їхній активуючий вплив, так і про відсутність будь-якого впливу [220, 224, 225]. Як видно з таблиці 4.6, іони  $\text{Ca}^{2+}$  за концентрацій 5 та 10 мМ не впливали на активність

трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki*, яка залишалася у межах значень базальної активності.

Отримані нами результати збігаються з результатами інших авторів, які виявили відсутність впливу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  на активність трипсинів з каракатиці *S. officinalis* [225], рака *P. clarki* [226], морської зірки *A. pectinifera* [227].

Також було визначено основні кінетичні константи для трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki*. Подібні дослідження становлять інтерес не лише для академічної науки, а є цікавими з позицій можливого застосування ферментів з організмів, що адаптовані до низьких температур середовища існування, у біотехнологічних процесах. Відповідно до літератури такі ферменти виявляють високу каталітичну ефективність при понижених температурах, що дозволяє розглядати їх як перспективні біокаталізатори під час виробництв, які з огляду на необхідність збереження властивостей кінцевого продукту, бажано проводити за нижчих температур.

В умовах нашого дослідження визначення кінетичних параметрів було проведено з використанням субстрату ругоGlu-Pro-Arg-pNA та за температури  $+24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , яка була визначена як оптимальна для трипсиноподібного ферменту і при  $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . На рис. 4.21 наведено графіки залежності початкової швидкості реакції гідролізу субстрату від його концентрації та лінеаризація графіків у координатах Лайнувера-Берка.

Розрахунок основних кінетичних констант виявив певні відмінності значень, визначених за обох температур. Так, значення  $K_M$  при  $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$  становило  $0,39 \pm 0,09\text{ мМ}$ , що майже вдвічі нижче за значення  $K_M$  визначене при  $+24\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Також було виявлено зниження значень каталітичної константи  $k_{cat}$  з  $10,41 \pm 0,3\text{ с}^{-1}$  при  $+24\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $6,34 \pm 0,1\text{ с}^{-1}$  при  $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Подібні результати були отримані авторами роботи [228], які досліджували кінетичні властивості трипсину із камчатського краба при  $+21\text{ }^{\circ}\text{C}$  та  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Як бачимо з даних таблиці 4.7, значення  $k_{cat}/K_M$  залишалося майже незмінним за обох температур, що



свідчить про однакову каталітичну ефективність трипсиноподібного ферменту за різних температур.

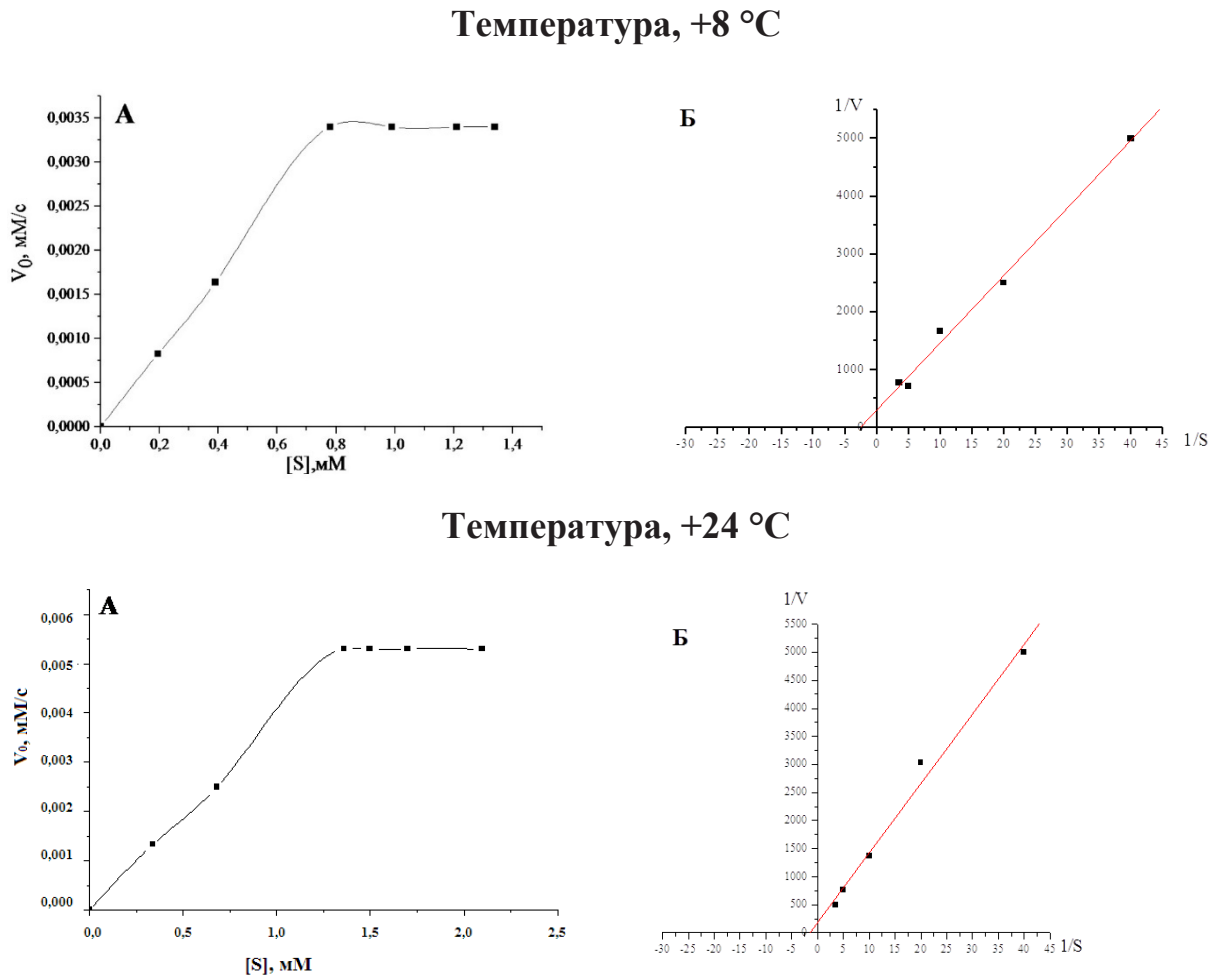


Рис. 4.21 Залежність початкової швидкості реакції гідролізу субстрату  $\gamma$ -Glu-Pro-Arg-pNA від його концентрації (А) та лінеаризація у координатах Лайнувера-Берка (Б) за різних температур

Аналізуючи отримані результати з позицій концепції холодової адаптації, можна виділити певні особливості, притаманні трипсиноподібному ферменту з *A. colbecki*. Як відомо, зниження температури призводить до зниження значень  $k_{cat}$  внаслідок експоненціальної залежності швидкості ферментативної реакції від температури. Температура також впливає і на спорідненість між ферментом та субстратом, так як їхні взаємодії визначаються не лише будовою

активного центру ферменту, а й сукупністю слабких зв'язків. Відповідно до згаданої концепції, один з механізмів компенсації температурного коефіцієнта  $Q_{10}$  у організмів, адаптованих до понижених температур середовища існування, полягає у зростанні значень каталітичної константи  $k_{cat}$ . Саме така адаптивна стратегія є найбільш поширеною [229].

Таблиця 4.7

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

$K_M$ , мМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M$ , мМ <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>
<i>Температура, +8 °C</i>		
0,39±0,09	6,34±0,1	16,33±0,3
<i>Температура, +24 °C</i>		
0,68±0,07	10,41±0,3	15,32±0,2

Проте для трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* характерним було залучення механізму, пов'язаного зі зниженням значень  $K_M$ , тобто концентрації субстрату, необхідної для насичення активного центру ферменту. Такі результати певною мірою узгоджуються з встановленою нами низькою стабільністю трипсиноподібного ферменту, зокрема при кислих значеннях рН, адже висока лабільність молекули, у тому числі внаслідок дестабілізації домену активного центру, є одним з чинників що сприяють зниженню енергії активації.

Таким чином, у результаті поєднання двох хроматографічних етапів (афінної хроматографії на СІТ-сефарозі та хроматографії, що поділяє за розмірами, на супердекс 75) з *A. colbecki* було одержано трипсиноподібний фермент, який за основними фізико-хімічними характеристиками – молекулярною масою, здатністю розщеплювати зв'язки в утворенні яких задіяні залишки аргініну чи лізину, а також значенням рН оптимуму при рН

8,0 був подібний до канонічних трипсинів. Разом з тим, температурний оптимум при +24 °С, нестабільність молекули при значеннях рН нижче ніж 4,0 та відсутність впливу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  на активність ферменту є рисами, що відрізняють трипсиноподібний фермент з *A. colbecki* від трипсинів ссавців.

Виявлена нами властивість трипсиноподібного ферменту зберігати активність при +8 °С та його температурний оптимум при +24 °С може бути досить перспективною характеристикою ферменту у контексті його можливого впровадження у біотехнологічні виробництва, що потребують нижчих температур перебігу процесу.

### **4.3. Методологічні основи отримання фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону**

Одним із завдань роботи було розробити ефективний та простий метод одержання фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону та дослідити їх потенційний вплив на окремі фактори системи гемостазу. Актуальність проведення подібних досліджень обумовлена поширеністю серцево-судинних захворювань та зростанням частки цих патологій серед населення віком до 60 років. Основною молекулою, що бере участь в утворенні тромбів, є фібриноген – фактор системи зсідання крові. Встановлено, що підвищений рівень фібриногену є фактором ризику розвитку ішемічного інсульту, артеріальної гіпертензії, інфаркту міокарду, асоційований з потовщенням інтими судин та субклінічними проявами їх атеросклеротичного ураження. На сьогодні доведеним є факт, що до ключових патогенетичних механізмів розвитку ускладнень за COVID-19 належать порушення у системі гемостазу, проявом чого є гіперфібриногенемія [230-232].

В сучасній клінічній практиці призначення тромболітичної терапії, зокрема застосування активаторів плазміногену (зокрема стрептокінази та

рекомбінантних препаратів тканинного та урокіназного активатору плазміногену, урокінази чи стафілокінази), є одним з основних підходів щодо лікування тромбозів. Незважаючи на їх безумовну ефективність, застосування цих препаратів супроводжується розвитком низки побічних ефектів серед яких підвищений ризик внутрішніх кровотеч у шлунково-кишковому тракті за перорального ведення, неконтрольоване посилення фібринолізу та висока імуногенність [233-235]. До того ж, наприклад ТАП, є досить коштовним засобом. Використання активаторів плазміногену дозволяє знижувати рівень фібринових згустків шляхом активації основного ферменту системи фібринолізу – плазміну. Ще одним підходом щодо зниження рівня тромбів може бути застосування плазмін-подібних ферментів. Проте, всі ці засоби діють вже на утворений згусток, а не попереджують його формування. За умов вираженої гіперфібриногенемії, виправданим може бути використання засобів, що здатні діяти безпосередньо на молекулу фібриногену, попереджуючи у такий спосіб, утворення фібринових згустків, а відтак, і розвиток тромбозів. З цієї позиції потенційно перспективними можуть бути фібрино(гено)літичні ферменти. Фібрино(гено)літичні ферменти або фібриногенази – це ендопептидази прямої дії, що розщеплюють фібриноген з утворенням фрагментів, що не здатні до полімеризації, а отже і утворення тромбів. Зростаючий інтерес до фібрин(оген)олітичних ферментів обумовлений можливістю їх використання для дослідження структурних взаємодій з іншими білками і ферментами, а також як прокоагулянтів для розчинення фібринових згустків при венозних тромбозах, інфаркті міокарда, інсультах, легеневій емболії [236, 237]. Прикладом застосування фібринолітичних ферментів у клінічній практиці є Alfimeprase – рекомбінантно створений фермент, введення якого викликало нормалізацію кровотоку у 40 % хворих, що мали різноманітні тромботичні ускладнення [238].

Більшість фібрино(гено)літичних ферментів обумовлюють пригнічення процесу агрегації тромбоцитів, що слугує додатковим чинником зниження ризику тромбоутворення. Так як мішенню цих ферментів виступає безпосередньо молекула фібриногену, а реалізація ферментативної активності не потребує залучення додаткових факторів, фібрино(гено)літичні ферменти можуть бути включені в протоколи антикоагулянтної терапії під час лікування захворювань, що супроводжуються патологічним тромбоутворенням. Крім того, фібрино(гено)літичні ферменти можуть знайти застосування в фундаментальній біології як додатковий інструмент дослідження білок-білкових взаємодій та закономірностей процесу полімеризації фібрину.

На сьогодні основним природним джерелом ферментів, що здатні розщеплювати фібриноген і/або фібрин, є отрути змій родин *Viperidae*, *Elapidae* та *Crotalidae*, з яких одержано і детально охарактеризовано десятки ферментів з фібринолітичною активністю [239-242]. Також фібрино(гено)літичні ферменти досить активно одержують з мікроорганізмів чи створюють з використанням генно-інженерних технологій. Проте, створення рекомбінантних білків часто є економічно не виправданим з огляду на дороговизну методології; використання білків бактеріального походження передбачає багатостадійність процедури очищення, що також впливає на кінцеву вартість продукції, а зміїні отрути є досить коштовною сировиною. З цих міркувань пошук ефективних фібрино(гено)літичних ферментів серед представників більш доступних та безпечних видів є виправданим та доцільним.

Враховуючи дані, отримані нами у попередньому розділі дослідження, а саме результати ензим-електрофоретичного аналізу, що підтверджують присутність у тканинах гідробіонтів Антарктичного регіону ферментів, здатних розщеплювати фібриноген, наступний етап роботи передбачав розробку методики одержання і очищення фібрино(гено)літичних ферментів, а також вивчення їх фізико-хімічних властивостей для можливого

використання цих ферментів як прототипу для розробки антикоагулянтних засобів.

Слід наголосити, що присутність в тканинах гідробіонтів ферментів, що виявляють активність, не пов'язану їх харчовими звичками чи життєвим циклом, не суперечить інформації, представленій у літературі. Так, ферменти з фібрино(гено)літичною активністю одержано з тканин дощових черв'яків [243-245], комах та їх яєць [246-248], слини кажанів [249] і навіть лікарських рослин [250-251], грибів [252-254] та водоростей [255].

Незважаючи на значний біотехнологічний потенціал гідробіонтів та значну кількість сполук, одержаних з цих об'єктів, що знайшли застосування в промисловому секторі і медицині, робіт, присвячених одержанню та вивченню властивостей молекул, здатних впливати на систему гемостазу, не так вже й багато. Аналізуючи сучасну наукову літературу можна знайти лише поодинокі роботи, де автори досліджують вплив сполук з морських гідробіонтів на окремі ланки системи гемостазу і то, це, переважно, пептиди з антикоагулянтною активністю [256-258].

Підходи, що застосовують для одержання фібрино(гено)літичних ферментів, досить різноманітні і включають низку етапів, що поєднують різні види хроматографії. Автори роботи [259] для очищення фібринолітичного ферменту з отрути змії *A. c. contorix* застосували чотирьохстадійну процедуру – іонообмінну хроматографію на КМ-целюлозі, хроматографію, що поділяє за розмірами, на сефадексі G-100, афінну хроматографію на бензамідин-сефарозі і іонообмінну хроматографію на ДЕАЕ-целюлозі; авторам роботи [260] вдалося виділити фібрино(гено)літичний фермент з міцелію гриба *S. commune*, процедура очищення включала три стадії – хроматографію гідрофобних взаємодій на феніл-сефарозі, іонообмінну хроматографію на Mono QTM 5/50 та хроматографію, що поділяє за розмірами, на сефадексі G-75; у результаті поєднання іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі, хроматографії, що поділяє за розмірами, на сефадексі G-75 та афінної хроматографії на гепарин-

агарозі з отрути змії *B. alternatus* було одержано два високоактивні фібрино(гено)літики BaltMP I і BaltMP II [261]. Ще одним прикладом трьохстадійної процедури одержання ферменту є метод, запропонований авторами роботи [262], який включав хроматографію гідрофобних взаємодій на феніл-сефарозі, іонообмінну хроматографію на ДЕАЕ-сефарозі та хроматографію, що поділяє за розмірами, на сефакрилі S-100.

Як бачимо, процес одержання фібрино(гено)літичних чи фібринолітичних ферментів є досить громіздким, потребує значних витрат часу і матеріалів. Крім того, на кожному етапі очищення неминуче відбувається часткова втрата матеріалу. Тому у своїй роботі ми ставили за мету розробити відносно простий та водночас ефективний метод одержання фібрино(гено)літичного ферменту з мінімальною кількістю стадій, що є особливо важливим з огляду на порівняно незначну кількість цільового білка у вихідному матеріалі.

Зважаючи на результати робіт [263, 264] було вирішено використати для реалізації сформульованого нами завдання блакитну сефарозу – хроматографічний носій, що містить іммобілізований барвник цибакрон блакитиний F3GA. Цей сорбент характеризується відносно широкою специфічністю до різних білків, у тому числі і щодо факторів системи гемостазу, та досить широко застосовується при очищенні різних ферментів. Крім того, барвник цибакрон дешевий, синтез сорбентів на його основі методично не складний, що у комплексі з високою ємністю такого сорбенту робить його цілком прийнятним та доцільним для першого етапу очищення ферментів.

Отже, обраний нами підхід включав два хроматографічні етапи – афінну хроматографію на блакитній сефарозі та подальше фракціонування одержаної фракції методом хроматографії, що поділяє за розмірами. Кожен етап передбачав аналіз одержаних фракцій на присутність ферментів, що виявляють фібрино(гено)літичну активність.

Вихідним матеріалом для одержання фракції фібрино(гено)літичних ферментів слугували ліофілізати екстрактів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону – *S. neumayeri*, *P. corrugatus*, *O. validus* та *A. colbecki*, отримані після етапу очищення шляхом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці з сефадекс Ж 25. Ліофілізати *E. superba* та *D. antarctica*, незважаючи на присутність в пробах ферментів, здатних розщеплювати фібриноген, на даному етапі дослідження використані не були, так як у літературі є роботи присвячені одержанню та характеристиці хімотрипсин-подібних серинових протеїназ з фібринолітичною активністю з отрути медуз [265, 266], а використання *E. superba*, як джерела для одержання саме фібрино(гено)літичних ферментів, є менш доцільним враховуючи значний промисловий потенціал цього гідробіонту зокрема як джерела омега-3 жирних кислот [267, 268].

Розробку методології отримання фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону було здійснено на прикладі *A. colbecki*. Для цього 50 мг ліофілізату розчиняли у 15 мл робочого буферу 10 мМ трис-НСІ, рН 8,0. Пробу залишали на 30 хв на лабораторному струшувачі з невеликою амплітудою для максимального розчинення білкового матеріалу. Після відділення шляхом центрифугування часток, що не розчинилися, супернатант наносили на колонку з блакитною сефарозою, врівноважену цим же буфером. Швидкість нанесення зразка складала 2 мл/хв. Після відмивання носія від незв'язаного матеріалу, білки, що зв'язалися, елюювали використовуючи 10 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,0, що містив 1 М NaCl за швидкості 2 мл/хв. Хроматограму одержання фракції фібрино(гено)літичних ферментів з ліофілізату тканин *A. colbecki* методом афінної хроматографії на блакитній сефарозі наведено на рис.4.22А. Згідно розрахунків, із сорбентом зв'язалося близько 12 % від загальної кількості нанесеного білкового матеріалу.



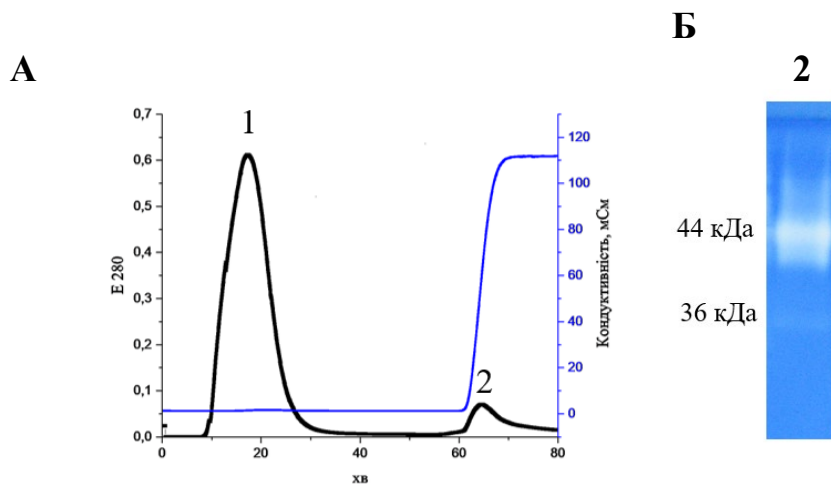


Рис. 4.22 Хроматограма (А) одержання фракції фібрино(гено)літичних ферментів з екстракту тканин *A. colbecki* методом афінної хроматографії на блакитній сефарозі та ензим-електрофореграма (субстратний білок фібриноген) (Б) розділення білків фракції №2: 1 – фракція, що не зв’язалась з носієм; 2 – фракція, що містить фібрино(гено)літичні ферменти

Фракцію №2 було проаналізовано методом ензим-електрофорезу із заполімеризованим у розділяючий гель фібриногеном для перевірки наявності у фракції цільової активності. Одержані результати (рис.4.22Б) свідчать про присутність у зв’язаній фракції ферментів, здатних ефективно розщеплювати фібриноген, на що вказує поява у площині гелю декількох зон гідролізу, які за своєю локалізацією відповідають білкам з молекулярною масою в діапазоні 30-36 кДа та близько 40-45 кДа.

Додатковим підтвердженням здатності ферменту/ферментів, присутніх у зв’язаній фракції, розщеплювати фібриноген слугують результати електрофоретичного аналізу зразків фібриногену після його інкубації з одержаною фракцією ферментів впродовж 1, 2, 3, 5 та 24 годин.

Як видно з рис. 4.23, розщеплення молекули фібриногену починається через три години інкубації з досліджуваною фракцією, на що вказує незначне

зниження інтенсивності білкової смуги у верхній частині гелю. На 24 годину інкубації фібриногену з одержаною фракцією фібрино(гено)літичних ферментів відбувалося повне розщеплення фібриногену, про що свідчить поява на електрофореграмі білкових смуг з молекулярними масами близько 150, 100, 85 та 40 кДа на фоні зникнення смуги, що відповідає білкам з молекулярною масою вище 200 кДа.

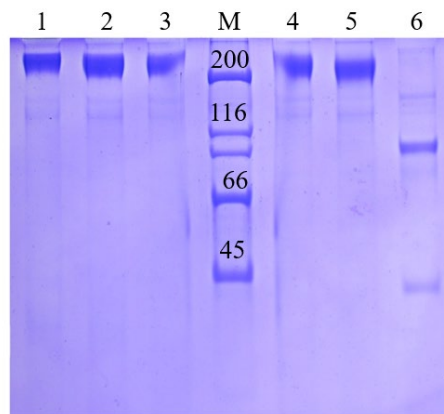


Рис. 4.23 Електрофореграма зразків фібриногену після його інкубації з фракцією №2: 1 – зразок фібриногену без інкубації; 2 – 1 год інкубації; 3 – 2 год інкубації; М – маркери молекулярних мас, кДа; 4 – 3 год інкубації; 5 – 5 год інкубації; 6 – 24 год інкубації

Такі результати повністю узгоджуються з результатами ензим-електрофоретичного аналізу зв'язаної фракції та підтверджують присутність в одержаній фракції ферменту/ферментів з фібрино(гено)літичною активністю.

Зважаючи на властивість блакитної сефарози зв'язувати широкий спектр білкових молекул, надалі фракцію, одержану із застосуванням цього сорбенту, було перевірено методом диск-електрофорезу у 10 % ПААГ. Проведений аналіз виявив присутність у досліджуваній фракції білків різної молекулярної маси (від 30 кДа до 150 кДа), що обумовлює необхідність включення в схему одержання фібрино(гено)літичних ферментів додаткового етапу очищення. Для того щоб виділити з-поміж загальної кількості білків, присутніх у фракції

після етапу хроматографії на блакитній сефарозі, саме фібрино(гено)літичні ферменти нами було застосовано хроматографію, що поділяє за розмірами. Такий підхід є виправданим, оскільки з огляду на результати ензим-електрофорезу, нам відома приблизна молекулярна маса ферментів, які виявляють фібрино(гено)літичну активність, а отже підібравши належний сорбент можна розділити білки саме за їх молекулярною масою. Додатковою перевагою використання хроматографії, що поділяє за розмірами, є той факт, що поряд із поділом проби на окремі фракції відбувається її очищення від NaCl, концентрація якого у зразку є високою після етапу афінної хроматографії. Порівнявши технічні характеристики сорбентів супердекс 75 та супердекс 200, ми зупинили свій вибір на останньому, так як його застосування дозволяє розділяти білки молекулярні маси яких знаходяться у діапазоні від 10 кДа до 600 кДа.

Отже, фракцію, одержану на етапі афінної хроматографії на блакитній сефарозі, наносили на колонку з сорбентом супердекс 200; швидкість нанесення та елюції зразка складала 0,5 мл/хв. Оскільки в даному варіанті хроматографії об'єм нанесення зразка не має перевищувати 5 % від загального об'єму колонки, пробу наносили в декілька етапів, ретельно відмиваючи колонку після кожної процедури нанесення. В результаті вихідну фракцію було поділено на дев'ять фракцій (рис. 4.24А). Для виявлення фракції, що містить фібрино(гено)літичні ферменти, під час хроматографічного розділення досліджуваної проби відбирали верхівки піків, які в подальшому аналізували методом ензим-електрофорезу із заполімеризованим фібриногеном.

Відповідно до отриманих результатів, певну активність було виявлено у фракціях № 4, 5, 6 та 7, проте найбільш виражену активність було виявлено у фракції № 7, на що вказує чітка зона гідролізу в площині гелю (рис. 4.24Б). Розрахована молекулярна маса ферменту становила близько 44 кДа. Таке значення молекулярної маси фібрино(гено)літичного ферменту з *A. colbecki* в

цілому відповідає молекулярній масі фібрино(гено)літичних ферментів з інших об'єктів – 20-40 кДа [269-271]

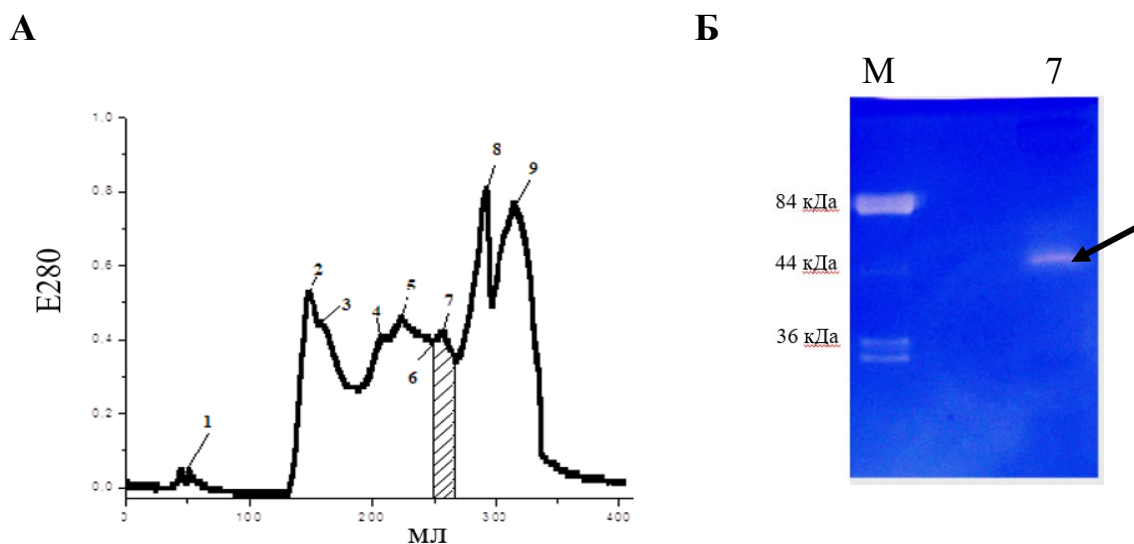


Рис. 4.24 Хроматограма (А) розділення білків вихідної фракції методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на носіїві супердекс 200 та ензим-електрофореграма (субстратний білок фібриноген) (Б) фракції №7: М – маркери молекулярних мас; 7 – номер досліджуваної фракції. Стрілкою позначено зону гідролізу субстратного білка фібрино(гено)літичним ферментом

Стадії очищення фібрино(гено)літичного ферменту з *A. colbecki* наведено у таблиці 4.8. Підсумовуючи, в результаті поєднання двох хроматографічних етапів – афінної хроматографії на блакитній сефарозі та хроматографії, що поділяє за розмірами, на супердекс 200 нами було одержано фібрино(гено)літичний фермент з молекулярною масою 40 кДа. Гомогенність отриманої фракції за проявом фібрино(гено)літичної активності дозволяють рекомендувати запропонований нами методологічний підхід для одержання фібрино(гено)літичних ферментів з інших гідробіонтів Антарктичного регіону.

Таблиця 4.8

## Стадії очищення фібрино(гено)літичного ферменту

Стадії очищення	Загальний вміст білка (мг)	Питома активність (Од/мг білка)	Загальна активність (Од. активності)	Ступінь очистки	Вихід (%)
Ліофілізат тканин гідробіонту	22,2	3,6	79,9	1,0	100,0
Афінна хроматографія на блакитній сефарозі	4,4	24,5	108,8	5,0	19,8
Хроматографія, що поділяє за розмірами (сорбент супердекс 200)	1,1	254,5	280,0	20,2	4,9

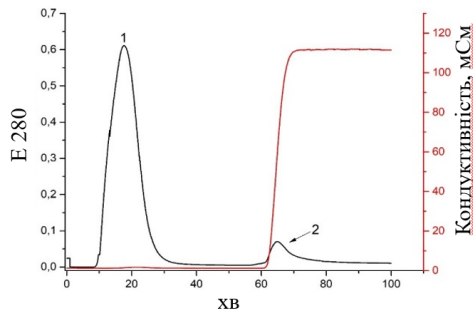
Хроматограми розділення білків ліофілізатів тканин *S. neumayeri*, *P. corrugatus* та *O. validus* методом афінної хроматографії на голубій сефарозі наведено на рис. 4.25. У цілому отримана картина розділення зразків не відрізнялася від такої для *A. colbecki* – ефективність зв'язування з сорбентом не перевищувала 15 % для *S. neumayeri* та *P. corrugatus*, проте становила близько 35 % для *O. validus*.

Відповідно до вищеописаного алгоритму, фракції, елюйовані з блакитної сефарози, та фракції білків, що не зв'язалися з сорбентом, було проаналізовано методом ензим-електрофорезу, який підтвердив присутність у зв'язаних фракціях ферментів, що здатні розщеплювати фібриноген (рис. 4.26).

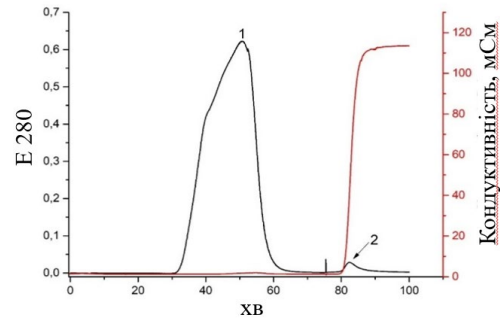
Оскільки перед нанесенням у гель всі дослідні проби були вирівняні за концентрацією білка, ми можемо порівняти активність ферментів, присутніх у зв'язаних фракціях, для всіх трьох гідробіонтів. За результатами ензим-електрофоретичного аналізу найвищу активність було виявлено в екстракті

тканин *S. neumayeri*. Так, у треку, що відповідає зв'язаній фракції, видно виражену зону гідролізу, яка локалізується у верхній частині площини гелю і охоплює до 30 % треку.

А



Б



В

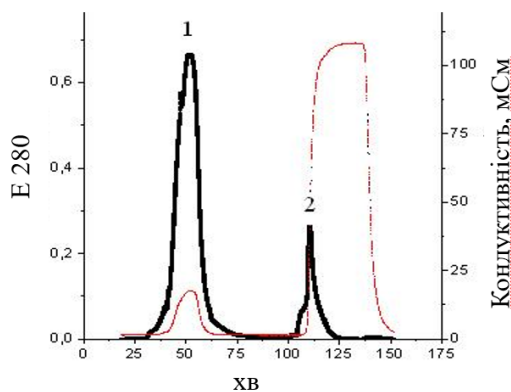


Рис. 4.25 Хроматограми розділення ліофілізатів тканин *S. neumayeri* (А), *P. corrugatus* (Б) та *O. validus* (В) методом афінної хроматографії на блакитній сефарозі: 1 – фракція, що не зв'язалась з сорбентом; 2 – фракція, елюйована 10 мМ трис-НСІ буфером, рН 8,0, що містив 1 М NaCl

Аналіз зв'язаної фракції, одержаної під час хроматографічного розділення зразка *O. validus*, також виявив присутність досить активних ферментів (рис. 4.26В), проте порівняно з результатами для *S. neumayeri* зони гідролізу були не так виражені. Найменш активним виявилися ферменти з *P. corrugatus* (рис. 4.26Б).

У цілому отримані нами результати щодо присутності у зв'язаних фракціях зразків досліджуваних гідробіонтів ферментів, здатних гідролізувати фібриноген, співпадають з результатами, описаними у першому розділі роботи. Так, найбільш активні ферменти було виявлено у екстракті тканин

*S. neimayeri*, у той час як ферменти з тканин *P. corrugatus* виявилися найменш активними щодо фібриногену.

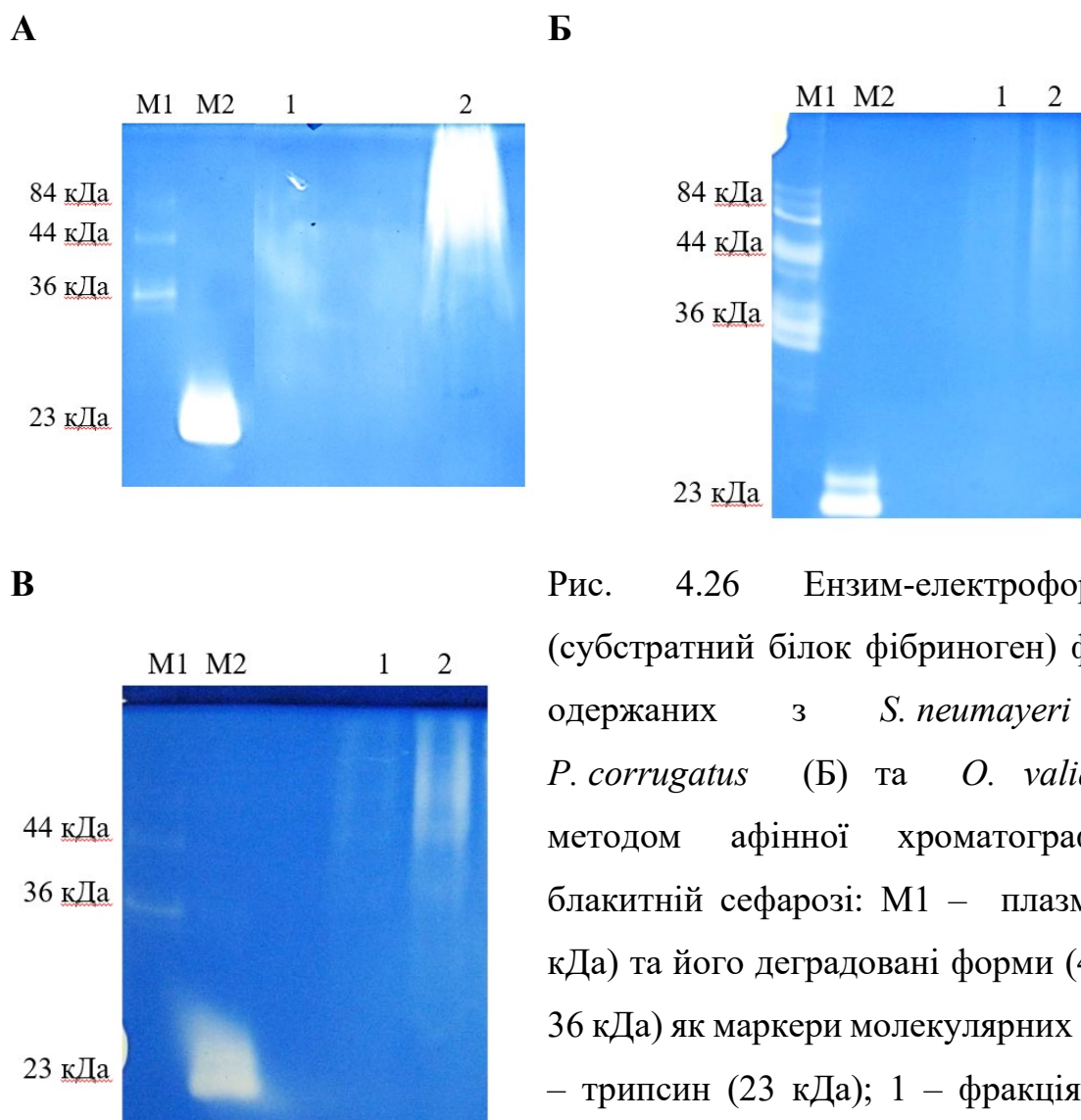


Рис. 4.26 Ензим-електрофореграми (субстратний білок фібриноген) фракцій, одержаних з *S. neimayeri* (А), *P. corrugatus* (Б) та *O. validus* (В) методом афінної хроматографії на блакитній сефарозі: М1 – плазмін (84 кДа) та його деградовані форми (44 кДа і 36 кДа) як маркери молекулярних мас; М2 – трипсин (23 кДа); 1 – фракція, що не зв'язалась з носієм; 2 – фракція, елюйована 10 мМ трис-НСІ буфером, рН 8,0, що містив 1 М NaCl

Також нами було проаналізовано фракції, що не зв'язалися з сорбентом, оскільки це дозволяє зробити певні висновки про ефективність обраного методу очищення цільових ферментів. Всі незв'язані фракції містили лише слідові кількості ферментів з фібрино(гено)літичною активністю, оскільки у

жодному з треків не було виявлено чітких зон гідролізу. Відсутність вираженої активності доводить доцільність застосування методу афінної хроматографії на блакитній сефарозі як основного етапу під час одержання фібрино(гено)літичних ферментів, зокрема з морських гідробіонтів.

Наступний етап очищення фібрино(гено)літичних ферментів включав хроматографію, що поділяє за розмірами, на на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200, у результаті чого вихідні проби було поділено на ряд фракцій, кількість яких була різною для різних гідробіонтів – 7, 6 та 5, відповідно, для *S. neumayeri*, *O. validus* та *P. corrugatus* (рис. 4.27).

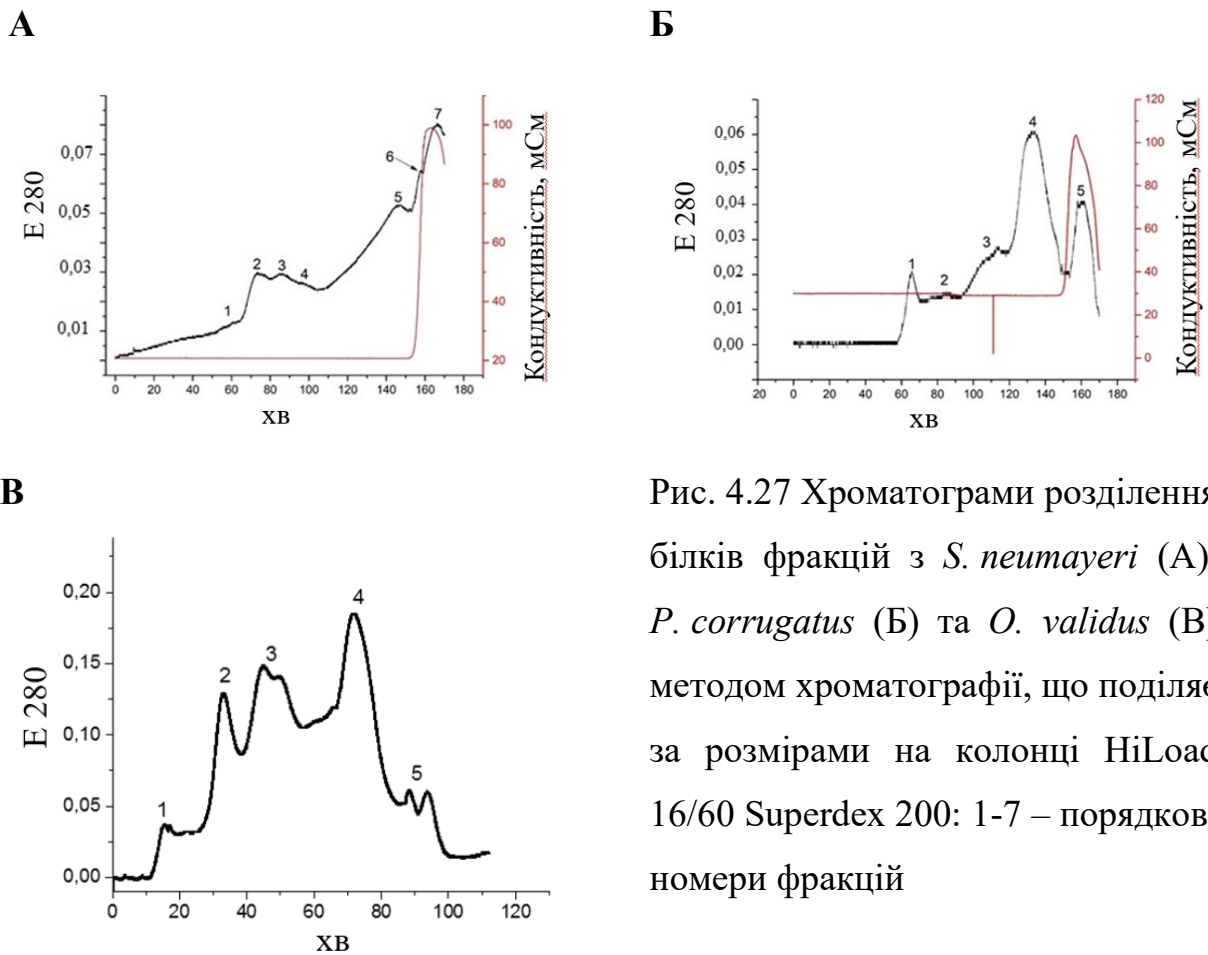


Рис. 4.27 Хроматограми розділення білків фракцій з *S. neumayeri* (А), *P. corrugatus* (Б) та *O. validus* (В) методом хроматографії, що поділяє за розмірами на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200: 1-7 – порядкові номери фракцій

Обраний підхід виявився найбільш ефективним для фракціонування білків *O. validus*, про що свідчить більш виражені піки на хроматограмі. Вихід першого піку на 20 хв хроматографічного процесу у порівнянні з 60 хв у випадку фракціонування проб *S. neumayeri* та *P. corrugatus* може вказувати на



присутність у тканинах *O. validus* білків з вищою молекулярною масою. Так як за застосованих нами умов хроматографування чіткого поділу аналізованих проб на окремі фракції не відбулося, для подальших досліджень відбирали лише верхівки піків, що дозволило знизити ймовірність потрапляння білків з одних піків до інших внаслідок їх перекривання. Фракції №6-7 для *S. neumayeri*, №5 для *P. corrugatus* та №6 для *O. validus* не аналізувалися з огляду на високий рівень кондуктивності, що свідчить про вихід з колонки небілкового матеріалу.

Всі фракції, отримані в результаті хроматографічного розділення, було проаналізовано на наявність фібрино(гено)літичної активності методом ензим-електрофорезу із заполімеризованими у розділяючий гель фібриногеном. За результатами проведеного аналізу ферменти з вираженою фібрино(гено)літичною активністю було виявлено у фракції №3 для *S. neumayeri*, фракції №5 для *O. validus* та у фракції №4 для *P. corrugatus* (рис. 2.40); слід відмітити, що у випадку *P. corrugatus* активність ферментів, здатних розщеплювати фібриноген, була найнижчою, що у цілому узгоджується з результатами, одержаними на попередніх етапах нашого дослідження – ферменти з тканин цього гідробіонту виявляли низьку активність щодо фібриногену. Фракції №1 і 5 для *S. neumayeri* та фракція №4 для *O. validus* містили слідові кількості ферментів і у подальших дослідженнях використані не були.

Таким чином, фібрино(гено)літичні ферменти було виявлено переважно в останніх піках, що свідчить, що молекулярна маса цих ферментів є нижчою 40 кДа. Для точного визначення молекулярних мас ферментів, присутніх у цільових фракціях, та підтвердження однорідності складу одержаних фракцій було проведено електрофоретичний аналіз проб. Відповідні електрофореграми наведено на рис. 4.28.

Фракція фібрино(гено)літичних ферментів з *S. neumayeri* була гомогенною і містила лише одну білкову смугу, яка відповідала білкам з

молекулярною масою 34 кДа (рис. 4.28А), що повністю співпадає з даними ензим-електрофореграфічного аналізу цієї фракції.

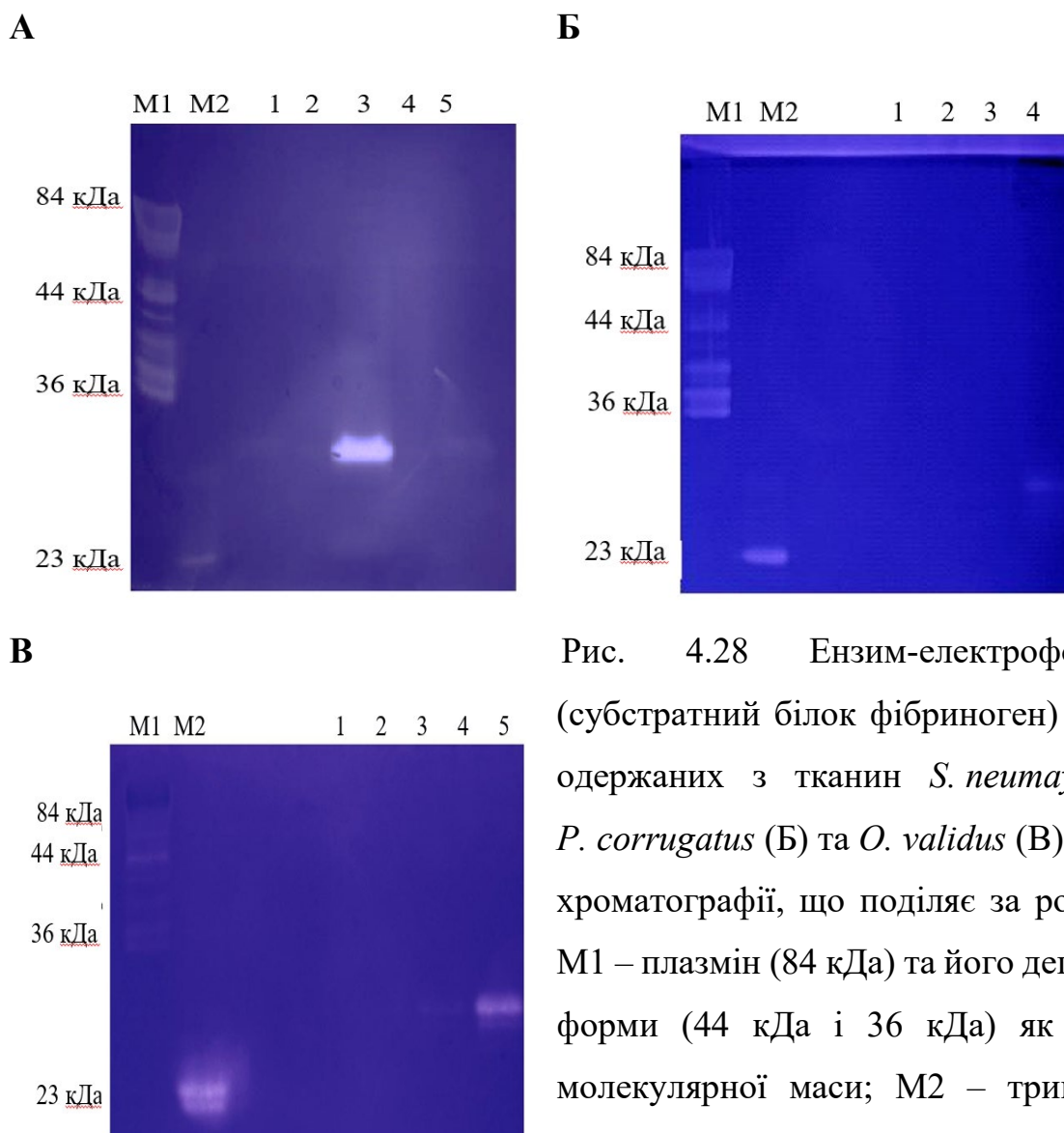


Рис. 4.28 Ензим-електрофореграми (субстратний білок фібриноген) фракцій, одержаних з тканин *S. neumayeri* (А), *P. corrugatus* (Б) та *O. validus* (В) методом хроматографії, що поділяє за розмірами: М1 – плазмін (84 кДа) та його деградовані форми (44 кДа і 36 кДа) як маркери молекулярної маси; М2 – трипсин (23 кДа); номер треку (1-5) збігається з номером фракції

До складу фракції фібрино(гено)літичних ферментів з *O. validus* входило два білки з молекулярними масами 28 кДа та 44 кДа (рис. 4.28В). Оскільки на ензим-електрофореграмі цієї фракції було виявлено лише один активний фермент з молекулярною масою біля 28 кДа, можемо припустити, що білок з

масою 44 кДа – це або фермент з іншою, ніж фібрино(гено)літична активністю, або білок, що не є ферментом.

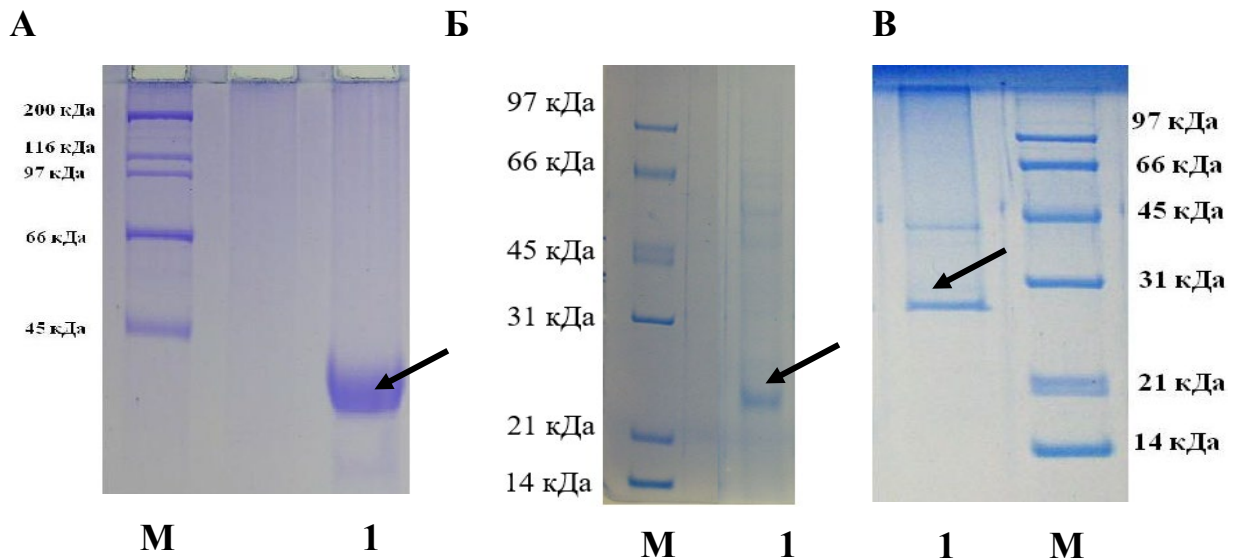


Рис. 4.29 Електрофореграми розділення білків фракції №3 *S. neumayeri* (А), фракції №4 *P. corrugatus* (Б) та фракції №5 *O. validus* (В): М – маркери молекулярних мас; 1 – досліджувана фракція. Стрілками позначено білкові смуги, що відповідають фібрино(гено)літичним ферментам з окремих гідробіонтів

Фракція №4 одержана з тканин *P. corrugatus* містила смугу, що відповідає білкам з молекулярною масою 26-30 кДа.

Молекулярні маси одержаних нами фібрино(гено)літичних ферментів – 26 кДа для *P. corrugatus*, 28 кДа для *O. validus*, 34 кДа для *S. neumayeri* та 40 кДа для *A. colbecki* у цілому знаходилися у діапазоні молекулярних мас ферментів, одержаних з інших джерел. Так, молекулярні маси фібрино(гено)літичних ферментів з отрути змії *Bothrops leucurus*, *Lachesis stenophrys*, *Agkistrodon blomhoffi brevicadus* складала, відповідно, 23 кДа [272], 24 кДа [273] та 37 кДа [274]; з бактерій *Bacillus sp. strain DJ-4* – 29 кДа [275]; з отрути медузи *Nemopilema nomurai* було одержано низку ферментів з фібрино(гено)літичною активністю з молекулярними масами 70 кДа, 35 кДа,

28 кДа [276]. Зазвичай молекулярну масу до 45 кДа мають серинові фібрино(гено)літичні ферменти, у той час як для металопротеїназ характерні молекулярні маси у діапазоні від 60 до 100 кДа.

Також було визначено загальну протеолітичну активність фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону. Відповідно до отриманих результатів (табл. 4.9), найвищу протеолітичну активність, оцінену за здатністю розщеплювати казеїн, виявляв фібрино(гено)літичний фермент з *S. neumayeri* (95,55±4,75 К.од/мг білка); найнижчу – фібрино(гено)літичний фермент з *O. validus* (15,35±0,75 К.од/мг білка).

Таблиця 4.9

**Загальна протеолітична активність фібрино(гено)літичних ферментів з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону, оцінена з використанням казеїну як субстрату (M±m, n=6)**

<b>Гідробіонт</b>	<b>Загальна протеолітична активність, К.од/мг білка</b>
<i>S. neumayeri</i>	95,55±4,75
<i>O. validus</i>	15,35±0,75
<i>P. corrugatus</i>	47,50±2,25
<i>A. colbecki</i>	76,23±3,71

Таким чином, нами було підібрано оптимальний метод одержання з гідробіонтів Антарктичного регіону фракції фібрино(гено)літичних ферментів, який включав декілька хроматографічних етапів, зокрема, афінну хроматографію на блакитній сефарозі та подальше доочищення одержаної фракції методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на супердекс 200.

**4.3.1. Оцінка антитромботичного потенціалу фібрино(гено)літичних ферментів, одержаних з гідробіонтів Антарктичного регіону**

Для того щоб оцінити антитромботичний потенціал фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону було визначено час зсідання плазми крові у хронометричних тестах «Активованій частково тромбопластиновий час» (АЧТЧ), «Протромбіновий час» (ПЧ) та «Тромбіновий час» (ТЧ). Коагуляційний або плазменний гемостаз включає низку ферментативних реакцій, в результаті яких відбувається перетворення фібриногену у нерозчинний фібриновий згусток. Весь процес реалізується за участі специфічних факторів, кожен з яких активується попереднім і, в свою чергу, активує наступний. Ключовим етапом при цьому є утворення протромбіназного комплексу, в залежності від механізму утворення якого розрізняють внутрішній та зовнішній шлях активації. Визначення часу зсідання плазми крові у тестах АЧТЧ та ПЧ дозволяє зробити висновок про функціонування, відповідно, внутрішнього та зовнішнього шляхів зсідання крові, у той час як тест ТЧ характеризує останню фазу гемостазу – перетворення фібриногену на фібрин.

Відповідно до одержаних результатів (табл. 4.10) за інкубації плазми крові з фракціями фібрино(гено)літичних ферментів спостерігалось значне подовження часу зсідання плазми у тесті АЧТЧ – показник зростав з  $18,6 \pm 0,8$  с у контролі до  $55,8 \pm 2,5$  с у випадку ферментів з *S. neumayeri*, до  $31,9 \pm 1,2$  с для ферментів з *O. validus* та  $68,8 \pm 2,7$  с для ферментів з *A. colbecki*. Нами не було виявлено змін досліджуваного показника при інкубації плазми з фібрино(гено)літичними ферментами з *P. corrugatus*. Лише фібрино(гено)літичні ферменти з *S. neumayeri* та *A. colbecki* впливали на час зсідання плазми у тесті ПЧ, який в обох випадках був на 27 % вищим за контрольний показник.

У результаті проведеного експерименту було встановлено, що фібрино(гено)літичні ферменти, одержані з тканин досліджуваних видів гідробіонтів, значно подовжували час, необхідний для утворення фібринового згустку, у тесті ТЧ. Найбільш ефективним виявився фермент з *A. colbecki*, для

якого було встановлено перевищення інтервалу вимірів. Час зсідання плазми крові у тесті ТЧ за інкубації з фібрино(гено)літичними ферментами з *P. corrugatus* залишався у межах контрольної величини.

Таблиця 4.10

**Час зсідання плазми крові у хронометричних тестах за дії  
фібрино(гено)літичних ферментів з тканини гідробіонтів Антарктичного  
регіону (M±m, n=6)**

Тест	Контроль	<i>S. neumayeri</i>	<i>O. validus</i>	<i>P. corrugatus</i>	<i>A. colbecki</i>
АЧТЧ, с	<b>18,6±0,8</b>	55,8±2,5*	31,9±1,2*	20,8±1,1	68,8 ± 2,7*
ПЧ, с	<b>7,2 ± 0,3</b>	9,2 ± 0,4*	7,1±0,2	6,8±0,3	9,2 ± 0,3*
ТЧ, с	<b>28,7±1,3</b>	49,1±1,6*	34,3±1,7*	30,9±1,6	> 90*

\* –  $p \leq 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контролем

Оскільки показники ТЧ не залежать від зовнішнього та внутрішнього шляхів активації коагуляції, проте безпосередньо залежать від концентрації та властивостей фібриногену, застосування цього тесту дозволяє зробити висновок про вплив досліджуваних ферментів саме на молекулу фібриногену.

За результатами трьох хронометричних тестів, бачимо, що найбільш ефективним є фермент з *A. colbecki*, у той час як фібрино(гено)літичні ферменти з *P. corrugatus* не впливали на час зсідання плазми у жодному з хронометричних тестів. Співставляючи результати тестів АЧТЧ, ПЧ та ТЧ найбільш обґрунтованим видається припущення, що дія фібрино(гено)літичних ферментів реалізується саме на етапі загального шляху.

Таким чином, отримані нами результати свідчать про здатність фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону впливати на коагуляційний гемостаз. Беручи до уваги, що функціональна активність фібриногену безпосередньо залежить від цілісності молекули,

порушення структури фібриногену, зокрема розщеплення його А $\alpha$ - чи В $\beta$ -ланцюгів, впливатиме на здатність фібриногену формувати полімерний фібрин у відповідь на дію тромбіну. Тому на наступному етапі роботи було проаналізовано продукти гідролізу фібриногену після інкубації з фібрино(гено)літичними ферментами. Всі фібрино(гено)літичні ферменти в залежності від їх специфічності щодо ланцюгів фібриногену поділяються  $\alpha$ - та  $\beta$ -фібриногенази – ферменти, що розщеплюють переважно А $\alpha$ - чи В $\beta$ -ланцюги фібриногену. Як правило,  $\alpha$ -фібриногенази належать до металопротеїназ, у той час як  $\beta$ -фібриногенази – це серинові протеїнази [271]. Певні відмінності між  $\alpha$ - і  $\beta$ -фібриногеназами пов'язані зі значенням їх ізоелектричних точок (6,8-7,0 для  $\alpha$ -фібриногеназ і близько 3 для  $\beta$ -фібриногеназ), рН оптимумом (7,1-7,4 для  $\alpha$ -фібриногеназ і 8,5-9,5 для  $\beta$ -фібриногеназ), термостабільністю ( $\beta$ -фібриногенази є більш термостабільними). Більшість  $\beta$ -фібриногеназ є глікопротеїнами і, на відміну від  $\alpha$ -фібриногеназ, не здатні розщеплювати стабілізований фібрин. Слід підкреслити, що такий поділ є до певної міри умовним, оскільки за тривалої інкубації деякі  $\alpha$ -фібриногенази здатні гідролізувати В $\beta$ -ланцюг і навпаки, деякі  $\beta$ -фібриногенази з отрути змій, можуть розщеплювати А $\alpha$ -ланцюг фібриногену.

Для того щоб визначити належність одержаних нами фібрино(гено)літичних ферментів до  $\alpha$ - чи  $\beta$ -фібриногеназ необхідно було з'ясувати, який з ланцюгів фібриногену є першочерговою мішенню для дії ферментів. Специфічність дії ферментів щодо ланцюгів фібриногену було оцінено за результатами електрофоретичного аналізу зразків фібриногену після його інкубації з фібрино(гено)літичними ферментами з гідробіонтів Антарктичного регіону. Аналіз складу гідролізатів фібриногену проводили за присутності 0,2 %  $\beta$ -меркаптоетанолу. Попередньо нами було підібрано оптимальне співвідношення між вмістом ферменту та фібриногену, яке в умовах нашого дослідження становило 1:50. Аліквоти для аналізу відбирали у нульовій точці, а також через 1, 2, 3, 4, 6, 24 та 48 годин інкубації та

аналізували методом електрофорезу за відновлюючих умов. Як контроль було взято зразок фібриногену без інкубації з досліджуваними фібрино(гено)літичними ферментами.

Як видно з результатів, представлених на рис. 4.30-4.33, всі одержані нами фібрино(гено)літичні ферменти обумовлювали розщеплення як А $\alpha$ -, так і В $\beta$ -ланцюгів фібриногену, що визначалося тривалістю інкубації. Проте, у першу чергу розщеплення зазнавав А $\alpha$ -ланцюг фібриногену.

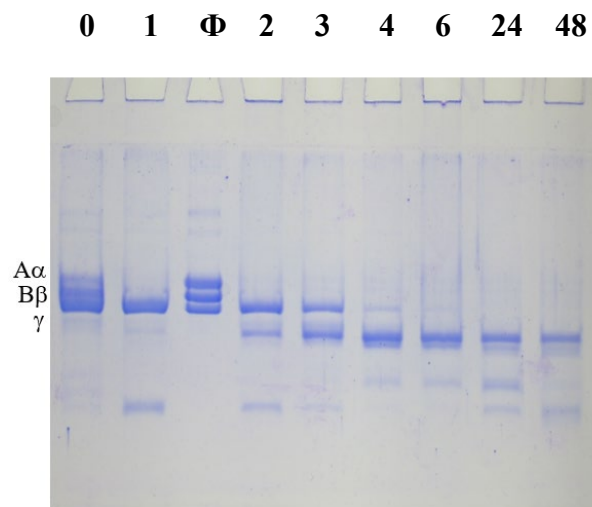


Рис. 4.30 Електрофореграма зразків фібриногену після його інкубації з фібрино(гено)літичним ферментом з *S. neumayeri*: Ф – зразок фібриногену без інкубації з ферментом (67 кДа – А $\alpha$ -ланцюг, 54 кДа – В $\beta$ -ланцюг, 48 кДа –  $\gamma$ -ланцюг); 0-48 – години інкубації. Електрофорез проведено за відновлюючих умов

Порівнявши результати електрофоретичного аналізу зразків фібриногену після його інкубації з фібрино(гено)літичними ферментами, можна зробити висновок, що найбільш активним є фермент з *S. neumayeri*, що повністю узгоджується з даними, отриманими на попередніх етапах роботи. Як бачимо з рис. 4.30, вже через одну годину інкубації спостерігалось повне розщеплення А $\alpha$ - та В $\beta$ -ланцюгів фібриногену. У третці лишилась лише смуга, яка відповідає



$\gamma$ -ланцюгу фібриногену. Розщеплення ланцюгів фібриногену супроводжувалася появою продуктів деградації різної молекулярної маси, кількість яких зростала пропорційно до часу інкубації. Оскільки ми не аналізували проби впродовж першої години інкубації з фібрино(гено)літичним ферментом, точний час, коли саме відбулося розщеплення  $A\alpha$ - та  $B\beta$ -ланцюгів фібриногену встановлено не було. З цієї причини однозначно сказати про належність досліджуваного фібрино(гено)літичного ферменту до  $\alpha$ - і  $\beta$ -фібриногеназ неможливо.

Слід наголосити, що фермент з тканин досліджуваного гідробіонту виявився здатними розщеплювати і  $\gamma$ -ланцюг фібриногену, про що свідчить зниження з часом інтенсивності смуги, яка відповідає цьому ланцюгу. Вже через 6 годин інкубації мало місце повне розщеплення  $\gamma$ -ланцюг. Зауважимо, що  $\gamma$ -ланцюг фібриногену не належить до першочергових мішеней фібриногеназ і його розщеплення за участі фібрино(гено)літичних ферментів є досить рідкісним явищем. У літературі можна знайти лише поодинокі роботи [277], де описано ферменти здатні до гідролізу саме  $\gamma$ -ланцюга. Це, зокрема, ферменти одержані з отрути змій *A. acutus*, *B. moojeni*, *B. colombiensis*, проте і в цьому випадку повне розщеплення  $\gamma$ -ланцюга спостерігалася не раніше ніж через 5 годин інкубації з ферментом.

Як бачимо з електрофореграми, наведеної на рис. 4.31, фібрино(гено)літичні ферменти з *O. validus* подібно до ферменту з *S. neumayeri* першим розщеплювали  $A\alpha$ -ланцюг. Вже через одну годину інкубації з досліджуваною фракцією  $A\alpha$ -ланцюг фібриногену повністю зникав. Одержані нами результати узгоджуються з результатами робіт, де автори відмічали повну деградацію  $A\alpha$ -ланцюга через годину інкубації з фібрино(гено)літичним ферментом із отрути *A. blomhoffi*. Відповідно до одержаних нами результатів, швидкість розщеплення  $B\beta$ -ланцюга фібриногену не була такою високою, як у випадку ферменту з тканин

*S. neumayeri* – через годину інкубації з фібрино(гено)літичними ферментами В $\beta$ -ланцюг фібриногену залишався інтактним. Проте при більш тривалій інкубації відбувається деградація В $\beta$ -ланцюга. Так, незначне розщеплення В $\beta$ -ланцюга спостерігалось вже через 2 години інкубації. Зі збільшенням часу інкубації інтенсивність смуги, що відповідає В $\beta$ -ланцюгу, поступово знижувалася і дана смуга повністю зникла через 4 години інкубації з фракцією фібрино(гено)літичних ферментів. Такі наші результати не суперечать даним літератури, оскільки, як вже зазначалося, незважаючи на виражену специфічність щодо одного з ланцюгів фібриногену, за умов тривалої інкубації фібрино(гено)літичні ферменти також здатні гідролізувати й другий ланцюг фібриногену.

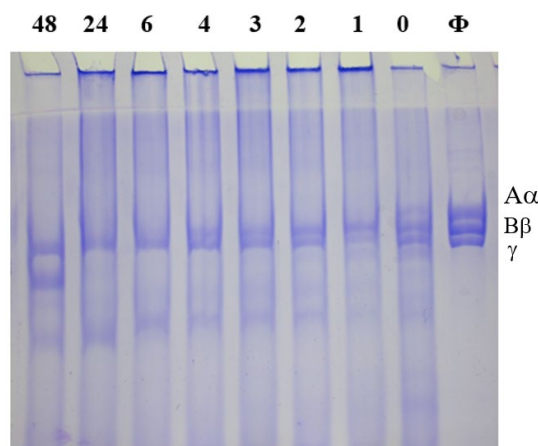


Рис. 4.31 Електрофореграма зразків фібриногену після інкубації з фібрино(гено)літичним ферментом з *O. validus*: Ф – зразок фібриногену без інкубації з ферментом (67 кДа – А $\alpha$ -ланцюг, 54 кДа – В $\beta$ -ланцюг, 48 кДа –  $\gamma$ -ланцюг); 0-48 – години інкубації. Електрофорез проведено за відновлюючих умов

Нами не було виявлено здатності ферментів з *O. validus* розщеплювати  $\gamma$ -ланцюг фібриногену – інтенсивність смуги, що відповідає  $\gamma$ -ланцюгу, залишалась незмінною впродовж всього терміну інкубації. Розщеплення

фібриногену супроводжувалося накопиченням продуктів його деградації з молекулярною масою нижче 45 кДа, кількість яких зростала пропорційно до часу інкубації. Слід відмітити, що інкубація фібриногену з фібриногеназами із отрути деяких видів змій також супроводжувалася утворенням фрагментів, молекулярна маса яких в залежності від виду змій варіювала від 45 до 10 кДа. Таким чином, з огляду на одержані нами результати можемо говорити про належність фібриногенолітичних ферментів з тканин *O. validus* до  $\alpha$ -фібриногеназ.

Надалі було проаналізовано зразки фібриногену після його інкубації з ферментом, одержаним з тканин *P. corrugatus* (рис. 4.32).

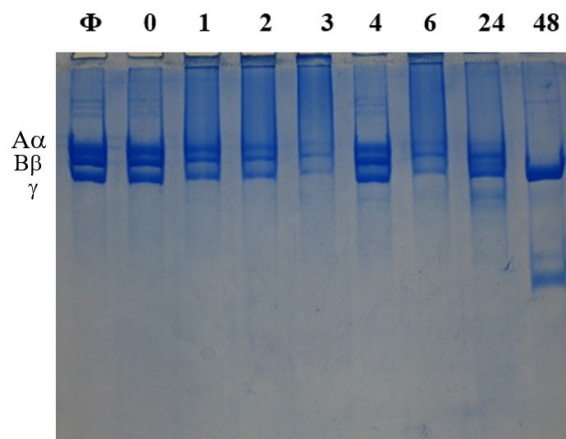


Рис. 4.32 Електрофореграма зразків фібриногену після інкубації з фібрино(гено)літичним ферментом з *P. corrugatus*: Ф – зразок фібриногену без інкубації з ферментом (67 кДа – А $\alpha$ -ланцюг, 54 кДа – В $\beta$ -ланцюг, 48 кДа –  $\gamma$ -ланцюг); 0-48 – години інкубації. Електрофорез проведено за відновлюючих умов

Відповідно до результатів, отриманих на попередніх етапах дослідження, фермент з цього гідробіонту виявляв найменшу фібрино(гено)літичну активність у порівнянні з результатами для інших двох досліджуваних об'єктів. Електрофоретичний аналіз проб, що були відібрані у різні часові

інтервали, підтвердив низьку активність ферменту щодо фібриногену про що свідчить присутність всіх трьох ланцюгів фібриногену у треках. Незважаючи на досить низьку ефективність ферменту, незначне розщеплення А $\alpha$ -ланцюга все ж таки мало місце, оскільки інтенсивність смуги, що відповідає цьому ланцюгу, незначно знижувалася впродовж досліджуваних термінів інкубації. Нами було виявлено лише залишкові сліди А $\alpha$ -ланцюга фібриногену через 24 години інкубації з фракцією фібрино(гено)літичних ферментів з *P. corrugatus*.

Фібрино(гено)літичний фермент з тканини *P. corrugatus* не виявляв активності й щодо В $\beta$ -ланцюгів фібриногену, оскільки смуга, що за молекулярною масою відповідає цьому ланцюгу, реєструвалася на електрофореграмі у всі часові точки.

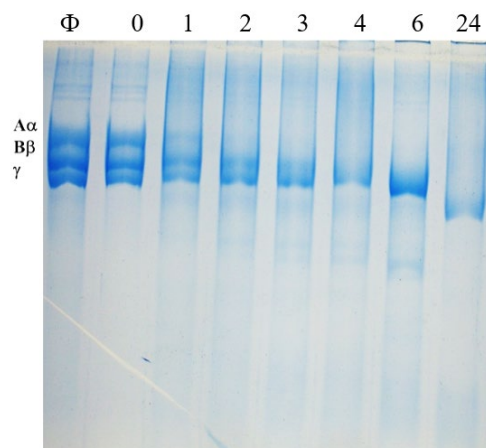


Рис. 4.33 Електрофореграма зразків фібриногену після інкубації з фібрино(гено)літичним ферментом з *A. colbecki*: Ф – зразок фібриногену без інкубації з ферментом (67 кДа – А $\alpha$ -ланцюг, 54 кДа – В $\beta$ -ланцюг, 48 кДа –  $\gamma$ -ланцюг); 0-48 – години інкубації. Електрофорез проведено за відновлюючих умов

Лише через 48 годин інкубації спостерігалось повне розщеплення як А $\alpha$ , так і В $\beta$ -ланцюгів фібриногену. Проте з огляду на досить тривалий час інкубації такі результати не становлять практичного інтересу.

Відповідно до результатів електрофоретичного аналізу зразків фібриногену після його інкубації з фібрино(гено)літичним ферментом з *A. colbecki* незначне розщеплення А $\alpha$ -ланцюга фібриногену спостерігалася вже через годину інкубації, подальша інкубація супроводжувалася деградацією В $\beta$ -ланцюга, в той час як  $\gamma$ -ланцюг залишається інтактним впродовж всього досліджуваного періоду.

Порівнявши отримані нами дані щодо швидкості розщеплення фібриногену за дії ферменту з *A. colbecki* з ефективністю дії фібрино(гено)літичних ферментів з отрути *B. colombiensis*, *V. ammodytes*, *B. Alternatus* можемо зробити висновок про значно нижчу активність досліджуваного ферменту. Так, розщеплення фібриногену за дії ферментів зміїних отрут відбувалася впродовж 15-45 хв [278, 279].

Таким чином, на основі отриманих нами результатів можемо висунути припущення про належність одержаних нами ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону до  $\alpha$ -фібриногеназ. Однак для підтвердження цього необхідно провести інгібіторний аналіз з використанням інгібіторів для серинових та металозалежних протеїназ, адже фібрино(гено)літичні ферменти, що специфічні по відношенню до А $\alpha$ -ланцюга фібриногену, належать переважно до металопротеїназ. Хоча є дані, що деякі металопротеїнази здатні ефективно розщеплювати і В $\beta$ -ланцюг. Серинові протеїнази з фібрино(гено)літичною активністю діють переважно на В $\beta$ -ланцюг фібриногену та виявляють низьку активність щодо А $\alpha$ -ланцюга. Також встановлено, що серинові протеїнази не виявляють геморагічну активність, що потенційно свідчить про можливість їхнього впровадження у клінічну практику.

Варто підкреслити, що інкубація фібриногену з фібрино(гено)літичними ферментами з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону не призводила до утворення фібринових згустків ні на початку, ні в кінці експерименту. Це свідчить, що дія ферментів не пов'язана з відщепленням від молекули

фібриногену фібринопептидів А і/чи В, які важливі для запуску процесу полімеризації фібрину та формування згустку. Саме вивільнення фібринопептиду А запускає процес полімеризації фібрину, так як приводить відбувається експонування двох активних центрів полімеризації у домені Е молекули фібриногену, які надалі взаємодіють з комплементарними центрами домену Д. Як наслідок фібриноген  $(A\alpha, B\beta, \gamma)_2$  перетворюється на фібрин  $(\alpha, \beta, \gamma)_2$ . Молекули фібрину агрегують у протофібрили, що ростуть у різних напрямках, формуючи фібриновий гель. Відщеплення фібринопептиду В є важливим для стабілізації Д-блоків та посилення латеральних контактів між протофібрилами, що сприяє укріпленню структури протофібрил, зростанню ступеню галуження волокон та підвищенні еластичності фібринового гелю. У цілому виявлена нами здатність фібрино(гено)літичних ферментів розщеплювати фібриноген без ініціації процесу його полімеризації у фібрин частково доводить належність ферментів саме до фібриногеназ, а не тромбіноподібних ферментів.

Розщеплення  $A\alpha$ -ланцюг фібриногену, у тому числі його  $\alpha C$ -домену, впливає на функціональну активність фібриногену, адже  $\alpha C$ -домен необхідний для латеральної агрегації фібрил та відіграє певну роль у поперечному зшиванні протофібрил під час формування фібринового згустку. Крім того,  $\alpha C$ -домен забезпечує взаємодію з деякими факторами системи гемостазу, зокрема, з фібронектином, FXIII, плазміногеном, тканинним активатором плазміногену. Саме через взаємодію з  $\alpha C$ -доменами фібриногену, білки плазми включаються у структуру фібринового згустку.

Враховуючи важливість збереження цілісності  $A\alpha$ -ланцюга для прояву функціональної активності фібриногену та беручи до уваги належність фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону саме до  $\alpha$ -фібриногеназ, надалі було визначено концентрацію фібриногену, що не здатен до полімеризації після його інкубації з фібрино(гено)літичними

ферментами. Для цього до зразків фібриногену (0,5 мг/мл) після його інкубації з фібрино(гено)літичними ферментами впродовж 1, 3 та 6 годин додавали тромбін, фібриновий згусток, який при цьому утворювався відділяли та розчиняли у 0,125 % оцтовій кислоті. Концентрацію функціонально неактивного фібриногену розраховували як різницю вихідної концентрації фібриногену та його концентрації в лізатах фібринових згустків і виражали у відсотках.

Одержані в ході дослідження результати (табл. 4.11), свідчать, що інкубація фібриногену з фібрино(гено)літичними ферментами з досліджуваних гідробіонтів призводила до зростання концентрації фібриногену, що не здатен полімеризуватися у фібриновий згусток.

Таблиця 4.11

**Відсоток фібриногену, з порушеною здатністю до полімеризації, після його інкубації з фібрино(гено)літичними ферментами з гідробіонтів Антарктичного регіону ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Гідробіонт	Час інкубації, год		
	1	3	6
Зразок фібриногену без інкубації з ферментами	12,4±0,5	12,8±0,5	12,8±0,5
<i>A. colbecki</i>	87,8±5,0*	95,0±5,0*	97,6±5,0*
<i>S. neumayeri</i>	100,0±5,0*	100,0±5,0*	100,0±5,0*
<i>O. validus</i>	92,6±5,0*	96,0±5,0*	96,6±5,0*
<i>P. corrugatus</i>	52,6±2,5*	53,6±2,5*	60,4±3,0*

\* -  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні зі зразком фібриногену без інкубації з ферментами

Подібно до результатів, отриманих на попередніх етапах дослідження, ферменти з *P. corrugatus* виявилися найменш ефективними і у цьому тесті. Так, відсоток функціонально неактивного фібриногену через 1 годину

інкубації з фібрино(гено)літичним ферментом з *P. corrugatus* складав 52,6 і незначно зростав з часом інкубації. Для порівняння – цей показник після інкубації фібриногену з ферментом з *S. neumayeri* вже через 1 годину становив 100 %. Виявлені зміни концентрації функціонально неактивного фібриногену підтверджувалися візуальною оцінкою розмірів фібринового згустку, який утворювався при додавання до проб тромбіну. Розмір фібринового згустку зменшувався з часом інкубації фібриногену з фібрино(гено)літичним ферментом, і через 6 годин інкубації фібриногену з фібрино(гено)літичним ферментом внесення тромбіну не викликало утворення фібринового згустку.

Зниження концентрації функціонально активного фібриногену за інкубації з фібрино(гено)літичними ферментами, одержаними з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону можна пояснити дією досліджуваних ферментів саме на А $\alpha$ -ланцюги фібриногену, що певною мірою узгоджується з їхньою належністю до  $\alpha$ -фібриногеназ. Адже для латеральної асоціації протофібрил у фібрили необхідними є  $\alpha$ C-домени, що розташовані на С-кінцях А $\alpha$ -ланцюгів фібриногену.

Дія багатьох фібрино(гено)літичних ферментів, зокрема тих, що належать до металопротеїназ, призводить до розвитку кровотеч внаслідок підвищення проникності кровоносних судин та порушення взаємодії між базальною мембраною і ендотеліальними клітинами. Саме тому, незважаючи на високу ефективність та перспективність фібрино(гено)літичних ферментів, як тромболітичних агентів прямої дії, їх використання в медицині суттєво обмежено. Так як всі одержані нами фібрино(гено)літичні ферменти, з огляду на їхню специфічність щодо ланцюгів фібриногену, скоріш за все є металопротеїназами, на наступному етапі роботи було досліджено їхню здатність розщеплювати колаген, який є одним з ключових білків позаклітинного матриксу. Для цього, зразки колагену після його інкубації з ферментами, аналізували методом електрофорезу у 18 % ПААГ.



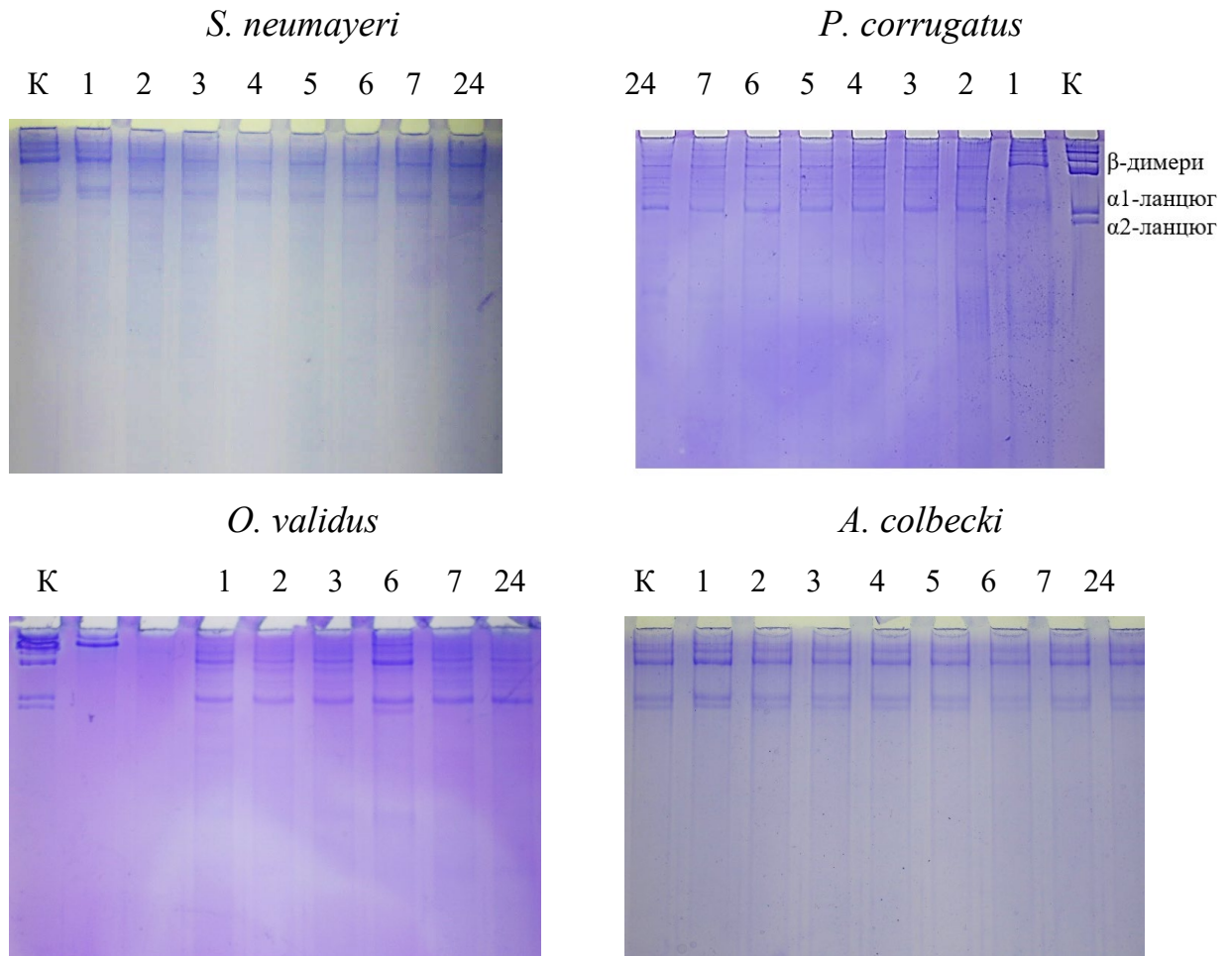


Рис. 4.34 Електрофореграми зразків колагену після його інкубації з фібрино(гено)літичними ферментами з гідробіонтів Антарктичного регіону: К – зразок колагену без інкубації з ферментами; 1-24 – години інкубації

Відповідно до отриманих результатів (рис. 4.34), лише фібрино(гено)літичний фермент з *A. colbecki* не виявляв здатності розщеплювати колаген, про що свідчить ідентичність всіх білкових смуг у треках, незалежно від терміну інкубації з ферментом, контрольному зразку колагену. Решта ферментів, одержаних з гідробіонтів, більшою чи меншою мірою розщеплювали колаген. Найбільш ефективним виявився фібрино(гено)літичний фермент з *P. corrugatus* – вже через одну годину інкубації з колагеном спостерігалось розщеплення  $\alpha 2$ -ланцюга, також

відмічалось зниження інтенсивності смуг, що відповідають  $\beta$ -ланцюгам колагену.

Фібрино(гено)літичні ферменти з *S. neumayeri* та *O. validus* також обумовлювали розщеплення  $\alpha 2$ -ланцюгів колагену, відповідно, на другу та третю годину інкубації, у той час як повний гідроліз  $\beta$ -ланцюгів було виявлено лише у випадку ферментів з *O. validus*. Подібні результати можуть бути свідченням широкої субстратної специфічності ферментів з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону, що може бути суттєвою перешкодою для їх використання як тромболітичних засобів.

Також було визначено активність фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону щодо хромогенних субстратів для ключових факторів системи гемостазу. Отримані у ході дослідження результати наведено у таблиці 4.12. Всі досліджувані ферменти виявляли найвищу активність при використанні хромогенного субстрату для протеїну С, активність щодо решти субстратів була різною для фібрино(гено)літичних ферментів з різних гідробіонтів. Але у цілому, ферменти з *S. neumayeri* та *A. colbecki* ефективніше розщеплювали аргінінові субстрати, ніж ті, що містили у Р1-положенні залишок лізину. Так, активність фібрино(гено)літичного ферменту з *S. neumayeri* при використанні субстрату  $\text{pyroGlu-Pro-Arg-pNA}$  була у 1,85 рази вищою, ніж при використанні субстрату  $\text{H-D-Val-Leu-Lys-pNA}$ . Слід відмітити, що фібрино(гено)літичні ферменти, одержані з *P. corrugatus*, виявляли найнижчу активність, у той час як фермент з *S. neumayeri* був найбільш активним. Виявлені відмінності в активності фібрино(гено)літичних ферментів при використанні різних аргінінових субстратів можуть бути обумовлені природою амінокислотних залишків у Р2- та Р3-положеннях субстрату. Порівнявши будову використаних нами аргінінових субстратів та прояв активності фібрино(гено)літичних ферментів, можна зробити висновок про важливість розташування у Р2-положенні субстрату залишку неполярної амінокислоти.

Таблиця 4.12

**Активність фібрино(гено)літичних ферментів, одержаних з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону, щодо хромогенних субстратів для деяких факторів системи гемостазу ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Гідробіонт	Питома активність ферменту, мкмоль пНА/хв·мг білка			
	Субстрат для протеїну С (pyroGlu-Pro-Arg-pNA)	Субстрат для тромбіну (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA)	Субстрат для плазміну (H-D-Val-Leu-Lys-pNA)	Субстрат для фактору Ха (Bz-Ile-Glu( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-pNA)
<i>S. neumayeri</i>	3,31 $\pm$ 0,064	2,94 $\pm$ 0,028	1,78 $\pm$ 0,035	1,96 $\pm$ 0,057
<i>O. validus</i>	1,93 $\pm$ 0,024	1,78 $\pm$ 0,019	1,53 $\pm$ 0,035	1,42 $\pm$ 0,017
<i>P. corrugatus</i>	1,78 $\pm$ 0,025	0,87 $\pm$ 0,015	1,05 $\pm$ 0,017	1,24 $\pm$ 0,027
<i>A. colbecki</i>	3,0 $\pm$ 0,063	2,63 $\pm$ 0,025	0,88 $\pm$ 0,035	0,94 $\pm$ 0,047

Так, у випадку ферментів з *O. validus* найвища активність спостерігалася стосовно субстрату pyroGlu-Pro-Arg-pNA, у P<sub>2</sub>-положенні якого знаходиться залишок проліну. Заміна даного амінокислотного залишку на полярну амінокислоту приводила до зниження активності – активність фібрино(гено)літичного ферменту щодо субстрату Bz-Ile-Glu( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-pNA була у 1,35 рази нижчою у порівнянні з активністю щодо субстрату pyroGlu-Pro-Arg-pNA. Чітко вираженої кореляції між полярністю амінокислотного залишку у P<sub>3</sub>-положенні субстрату та активністю ферменту виявлено не було, оскільки, незважаючи на те, що субстрати pyroGlu-Pro-Arg-pNA та Bz-Ile-Glu( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-pNA містили у P<sub>3</sub>-положенні залишок глютамінової кислоти, ступінь їх гідролізу фібрино(гено)літичними ферментами значно розрізнявся.

У цілому, отримані нами результати щодо визначення активності фібрино(гено)літичних ферментів з використанням хромогенних субстратів та їхня здатність розщеплювати колаген опосередковано можуть свідчити про

широку субстратну специфічність фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону, що може бути пов'язано з описаною у літературі більшою структурною гнучкістю білкових молекул, у тому числі й активного центру ферментів, з організмів, адаптованих до понижених температур існування [280-282].

Оскільки, відповідно до літератури [283, 284], для більшості фібрино(гено)літичних ферментів характерною є антитромбоцитарна активність, надалі було досліджено чи впливають фібрино(гено)літичні ферменти, одержані з гідробіонтів Антарктичного регіону, на процес агрегації тромбоцитів. Дослідження проводили у плазмі, збагаченій тромбоцитами (ПЗТ); як індуктор агрегації використовували АДФ ( $5 \times 10^{-6}$  моль/л). Типові агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів наведено на рис. 4.35.

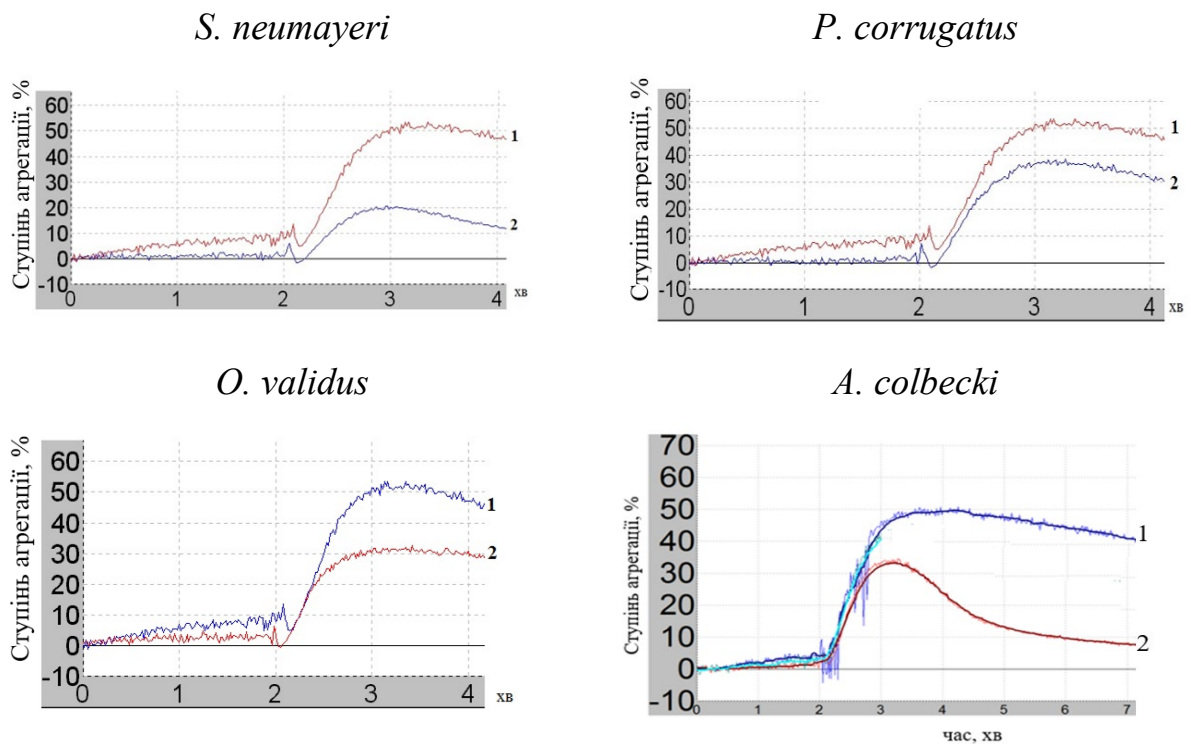


Рис. 4.35 Агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів за інкубації з фібрино(гено)літичними ферментами з гідробіонтів Антарктичного регіону: 1 – контроль; 2 – досліджувані ферменти

Одержані у ході дослідження результати свідчать про здатність всіх фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону впливати на агрегацію тромбоцитів, що виявляється у пригніченні цього процесу. Як видно з таблиці 4.13 найефективніше агрегацію тромбоцитів пригнічував фібрино(гено)літичний фермент з *S. neumayeri* – при додаванні до плазми, збагаченої на тромбоцити, ферменту з *S. neumayeri* ступінь агрегації становив 20 % у порівнянні з 51 % у контрольному зразку. Такий показник відповідає інгібуванню процесу агрегації на 61 %.

Таблиця 4.13

**Вплив фібрино(гено)літичних ферментів, одержаних з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону, на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів (M±m, n=6)**

Гідробіонти	Ступінь агрегації, %	% інгібування
<b>Контроль</b>	51 ± 5	-
<i>S. neumayeri</i>	20 ± 3*	61
<i>O. validus</i>	31 ± 3*	39
<i>P. corrugatus</i>	38 ± 4*	26
<b>Контроль</b>	46 ± 4	-
<i>A. colbecki</i>	31 ± 4*	33

\* –  $p \leq 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контролем

Фібрино(гено)літичний фермент з тканин *P. corrugatus* виявляв найменш виражений вплив на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів – ступінь агрегації зберігався на рівні 38 %, що відповідає інгібуванню процесу на 26 %. Дослідження впливу ферментів з *O. validus* та *A. colbecki* на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів показали, що при їх додаванні до інкубаційного середовища відсоток інгібування складав, відповідно, до 39 та 33. Так як дослідження проводили не на чистій суспензії тромбоцитів, а у плазмі, виявлене нами порушення процесу агрегації тромбоцитів за інкубації з

фібрино(гено)літичними ферментами, найімовірніше може бути пов'язано з розщепленням фібриногену, який відіграє важливу роль у процесі агрегації тромбоцитів. Агрегація тромбоцитів та формування тромбоцитарної пробки у місці порушення цілісності судин передбачає активацію інтегринового рецептору GPIIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) та підвищення його спорідненості до лігандів, у тому числі й до фібриногену [285, 286]. Тромбоцитарні рецептори GPIIb/IIIa обумовлюють взаємодію двох сусідніх тромбоцитів за участі молекули фібриногену, що сприяє стабілізації тромбоцитарного агрегату [287].

Саме тому порушення цілісності молекули фібриногену внаслідок розщеплення його A $\alpha$ -ланцюгів фібрино(ено)літичними ферментами впливатиме на ступінь агрегації тромбоцитів. Важливість A $\alpha$ - та  $\gamma$ -ланцюгів фібриногену для взаємодій між фібриногеном та тромбоцитами продемонстровано у роботах [288, 289]. Беліцер Н.В. та ін. [290] показали, що фібриноген у ході його розщеплення плазміном втрачає здатність бути кофактором індукованої АДФ агрегації тромбоцитів. Фрагменти X, що утворюються в процесі розщеплення фібриногену плазміном, менш активні, у порівнянні з фібриногеном, а фрагменти У и Д взагалі неактивні. Такі результати свідчать, що розщеплення  $\alpha$ C-домену A $\alpha$ -ланцюга послаблює кофакторну активність фібриногену.

Молекула фібриногену містить шість основних сайтів зв'язування з рецепторами тромбоцитів, це, зокрема додекапептид на С-кінці  $\gamma$ -ланцюга ( $\gamma$ 400-411), та дві RGD-послідовності A $\alpha$ -ланцюга фібриногену –  $\alpha$ 95-97 (RGDF) та  $\alpha$ 572-574 (RGDS). У той час як  $\gamma$ -ланцюг необхідний для початкового зв'язування молекули фібриногену з тромбоцитами, A $\alpha$ -ланцюг забезпечує міцність взаємодій. Саме тому відщеплення від молекули фібриногену фрагментів, що містять RGD-послідовність, потенційно може впливати на взаємодію фібриногену з тромбоцитами. З іншого боку, продукти розпаду фібриногену/фібрину, що містять RGD-послідовності, можуть інгібувати процес агрегації тромбоцитів за рахунок конкуренції з молекулами

нативного фібриногену за сайти зв'язування з інтегриновими рецепторами на поверхні тромбоцитів, проте їх зв'язування, на відміну від інтактного фібриногену, не приводить до формування тромбоцитарних конгломератів.

Отже, зниження ступеню АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у відповідь на дію фібрино(гено)літичних ферментів з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону повністю узгоджується зі встановленою нами здатністю цих ферментів розщеплювати переважно А $\alpha$ -ланцюг фібриногену призводячи до утворення фібриногену зі зниженою здатністю до полімеризації. Варто відмітити, що фермент з *S. neumayeri*, який найефективніше розщеплював фібриноген та обумовлював утворення фібриногену, що не здатен до полімеризації, виявляв найбільш виражений вплив і на процес АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів, у той час як фібрино(гено)літичні ферменти з *P. corrugatus* були найменш ефективними за всіма згаданими показниками. Пригнічення АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів та відсутність агрегаційного впливу всіх досліджуваних фібрино(гено)літичних ферментів за умов інкубації з плазмою, збагаченою на тромбоцити, до внесення індуктора агрегації слугує опосередкованим підтвердженням їхньої дії на фактори, що присутні у плазмі, у тому числі і на фібриноген, а не на безпосередньо тромбоцити.

Як вже зазначалося, фібрино(гено)літичні ферменти, що виявляють специфічність до А $\alpha$ -ланцюгів фібриногену, є переважно металопротеїназам, у той час як ферменти, що розщеплюють В $\beta$ -ланцюг фібриногену належать до серинових протеїназ. Незважаючи на те, що одержані нами фібрино(гено)літичні ферменти першочергово розщеплювали А $\alpha$ -ланцюг фібриногену, однозначно класифікувати їх як металопротеїнази ми не можемо. Для того щоб з'ясувати природу активного центру фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону було досліджено вплив інгібіторів серинових та металопротеїназ на активність ферментів. Активність

визначали, використовуючи хромогенний субстрат для протеїну С, стосовно якого ферменти виявляли найвищу активність.

Таблиця 4.14

**Активність фібрино(гено)літичних ферментів (мкмоль пНА/хв·мг білка)  
з гідробіонтів Антарктичного регіону за дії інгібіторів протеїназ  
( $M \pm m$ , n=6)**

Показник	Гідробіонт			
	<i>S. neumayeri</i>	<i>O. validus</i>	<i>P. corrugatus</i>	<i>A. colbecki</i>
Базальна активність	3,31 ± 0,06	1,93 ± 0,02	1,78 ± 0,02	3,0 ± 0,06
<b>ЕДТА (10 мМ)</b>				
Питома активність	0,97±0,02 *	1,77 ± 0,02	0,33±0,02 *	0,75±0,02 *
% інгібування	71	8	82	75
<b>ФМСФ (5 мМ)</b>				
Питома активність	2,98 ± 0,04*	0,30±0,02 *	1,76 ± 0,02	2,80±0,03
% інгібування	10	85	2	7

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

Згідно одержаних результатів (табл. 4.14), фібрино(гено)літичні ферменти з *S. neumayeri*, *P. corrugatus* та *A. colbecki* є металопротеїназами, так як відсоток інгібування активності при внесенні до інкубаційного середовища ЕДТА становив відповідно 71, 82 та 75, у той час додавання інгібітору серинових протеїназ обумовлювало незначне пригнічення активності ферментів.

Належність фібрино(гено)літичних ферментів до металопротеїназ можна розглядати як певну перевагу у випадку їхнього впровадження у клінічну практику – оскільки фактори системи гемостазу належать до серинових протеїназ у кровотоці немає інгібіторів металозалежних ферментів, отже



фібрино(гено)літичні ферменти довше зберігатимуть ферментативну активність.

За даними інгібіторного аналізу лише фібрино(гено)літичний фермент з *O. validus* належав до серинових протеїназ, що з огляду на його специфічність щодо А $\alpha$ -ланцюга фібриногену є дещо неочікуваним. Проте в літературі є роботи [271], де автори відмічають розщеплення А $\alpha$ -ланцюга фібрино(гено)літичними ферментами, які належать до серинових протеїназ.

Таким чином, у результаті поєднання методів афінної хроматографії на блакитній сефарозі та хроматографії, що поділяє за розмірами на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200, з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону було одержано фібрино(гено)літичні ферменти, які за результатами інгібіторного аналізу належать до металопротеїназ (ферменти з *S. neumayeri*, *A. colbecki*) та серинових протеїназ (фермент з *O. validus*). Ферменти, одержані з *P. corrugatus*, виявились найменш ефективними, так як не викликали значного розщеплення ланцюгів фібриногену, незначно впливали на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів та характеризувалися найнижчою активністю щодо хромогенних субстратів для ключових факторів системи гемостазу; натомість, ферменти з *P. corrugatus* ефективно розщеплювали колаген, що повністю збігається з результатами скринінгової оцінки протеолітичних активностей, присутніх у тканинах досліджуваних гідробіонтів (розділ 1).

Фібрино(гено)літичні ферменти з *S. neumayeri*, *O. validus* та *A. colbecki* виявляли виражені антикоагуляційні властивості, що підтверджується їхньою здатністю специфічно розщеплювати молекулу фібриногену з утворенням фібриногену зі зниженою здатністю до полімеризації при додаванні тромбіну. Антикоагуляційний ефект фібрино(гено)літичних ферментів реалізувався також через їхню здатність впливати на тромбоцитарну ланку системи гемостазу, зокрема, через здатність інгібувати АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів.

Отримані результати дозволяють розглядати гідробіонти Антарктичного регіону як можливе джерело для одержання фібрино(гено)літичних ферментів, які потенційно можуть знайти застосування у клінічній практиці як основа для створення засобів діагностики та профілактики патологічних змін у системі гемостазу; компоненту багатофункціональних композитів ранозагоювальної дії, а також можуть бути використані у фундаментальній біології для дослідження білок-білкових взаємодій, закономірностей процесу полімеризації фібрину та як інструмент спрямованого протеолізу фібриногену.

Отже, в ході виконання завдань, передбачених в рамках розділу «Розроблення методології одержання деяких ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону» експериментально підтверджено біотехнологічний потенціал гідробіонтів Антарктичного регіону як джерела для одержання протеолітичних ферментів різної субстратної специфічності.

Публікації, що висвітлюють результати автора, наведені у розділі 4:

1. **Raksha N**, Halenova T, Vovk T, Beregova T, Maievskа T, Tomchuk V, Savchuk O, Ostapchenko L. Isolation and partial characterization of serine proteases from jellyfish of the Antarctic region. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 2023;11(2):144-150. DOI:10.7324/JABB.2023.110214 (Scopus, **Q3**) *(здобувачем розроблено методологію отримання фракції серинових протеїназ, досліджено їх температурний та рН оптимум, оцінено активність щодо різних білкових субстратів)*

2. **Raksha N**, Halenova T, Kravchenko O, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. Purification and biochemical characterization of Trypsin-like enzyme from Antarctic Hydrobiont *Adamussium colbecki*. *Research Journal of Biotechnology*. 2020;15(1):1-7. (Scopus) *(здобувачем оптимізовано метод очищення трипсиноподібних ферментів з екстракту тканин гідробіонту Adamussium colbecki, проведено електрофоретичний аналіз одержаних ферментів,*

*визначено температурний та рН оптимум, визначено кінетичні константи та підготовлено публікацію до друку)*

3. **Raksha N**, Udovychenko I, Halenova T, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. Purification and biochemical characterization of fibrino(geno)lytic enzymes from tissues of Antarctic hydrobionts. *Ukrainian Antarctic Journal*. 2020;1:69-81. DOI:10.33275/1727-7485.1.2020.380 (здобувачем очищено фібрино(гено)літичні ферменти з екстракту тканин гідробіонтів *Parborlasia corrugatus*, *Sterechinus neumayeri* та *Odontaster validus*, визначено їх специфічність щодо ланцюгів фібриногену, оцінено амідазну активність, досліджено вплив ферментів на тромбоцити та коагуляційну ланку системи гемостазу, узагальнено результати, підготовлено публікацію до друку)

4. Абрамова М, **Ракша Н**. Оптимізація методологічних підходів щодо одержання цільових білків із гідробіонтів Антарктичного регіону. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2019;2(78):7-13. (здобувачем оптимізовано хроматографічний підхід щодо отримання цільових білкових фракцій з екстракту тканин гідробіонтів, проведено електрофоретичний аналіз отриманих фракцій, підготовлено публікацію до друку)

5. **Raksha N**, Halenova T, Vovk T, Ishchuk T, Savchuk O, Ostapchenko L. Novel fibrinogenolytic metalloprotease from the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*). *Advances in Marine Biology*. Nova Science Publishers, Inc. 2018;3(1):1-28. (Scopus) (здобувачем розроблено трьохстадійну схему очищення фібрино(гено)літичних ферментів на прикладі гідробіонту *Adamussium colbecki*, досліджено специфічність ферментів щодо ланцюгів фібриногену, визначено каталітичні константи, інтерпретовано результати та підготовлено публікацію до друку)

6. Gladun D, **Raksha N**, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. New fibrinogenases isolated from marine hydrobiont *Adamussium colbecki*. *Journal of Biochemistry International*. 2016;3(1):9-18. (здобувачем оптимізовано метод

отримання фібрино(гено)літичних ферментів, визначено активність одержаних ферментів методом ензим-електрофорезу та за використання хромогенних субстратів, оцінено належність ферментів до серинових чи металозалежних протеїназ, підготовлено публікацію до друку)

7. Gladun D, **Raksha N**. Detergent-stable proteases from the antarctic scallop *Adamussium colbecki*. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;20(1):62-65. (здобувачем проведено визначення протеолітичної активності у екстрактах тканин гідробіонту *Adamussium colbecki* за присутності детергентів)

8. **Raksha N**, Gladun D, Vovk T, Galenova T, Savchuk O, Ostapchenko L. New Fibrinogenases Isolated from Marine Hydrobiont *Adamussium colbecki*. In New Insights on Chemical Research Vol. 1 (E ISBN No: 978-93-89246-83-4). 2019, Book Publisher International, Chapter 13, 148-159. (здобувачем розроблено методологію очищення фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонту *Adamussium colbecki*, здійснено біохімічну характеристику одержаних ферментів, узагальнено результати та підготовлено публікацію)

9. Савчук ОМ, Остапченко ЛІ, **Ракша НГ**, Галенова ТІ, Вовк ТБ, Джулай АО. Спосіб отримання трипсиноподібного ферменту з екстракту тканин медузи *Diplulmaris antarctica*. Патент на корисну модель. 2023, u202106489.

10. Савчук ОМ, Остапченко ЛІ, **Ракша НГ**, Галенова ТІ, Вовк ТБ, Маланчук ВМ. Спосіб отримання фібрино(гено)літичного ферменту з екстракту тканин морського гребінця. Патент на корисну модель. 2023, u202106490.

## РОЗДІЛ 5

### ПЕПТИДНІ МОЛЕКУЛ З ГІДРОБІОНТІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ, ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ ЗАСІБ КОРЕКЦІЇ МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ

#### 5.1. Пептиди колагену з луски риб Антарктичного регіону як основа для створення функціональних харчових добавок

Розширення уявлень щодо участі та ролі пептидів в підтриманні належного фізіологічного статусу та узагальнення накопиченого масиву клінічних і експериментальних у вигляді концепції «пептидоергічної регуляції гомеостазу» створює передумови для розроблення принципово нових підходів для корекції метаболічних порушень. Відповідно до концепції пептидної регуляції, пептиди розглядаються як універсальні біорегулятори, що контролюють перебіг багатьох процесів та задіяні у підтримці структурного і функціонального гомеостазу [291, 292]. З огляду на певний позитивний досвід використання пептидних препаратів, а також стабільно зростаючий попит населення на препарати, де діючим компонентом є біологічно активні сполуки природного походження, пошук природніх молекул з вираженими біологічними активностями з метою створення на їх основі інноваційних засобів набуває особливої актуальності. До переваг пептидних препаратів можна віднести їхню безпечність навіть при довготривалому застосуванні, відсутність побічних ефектів, виражені терапевтичні ефекти навіть за незначних доз та той факт, що вони не накопичуються в організмі і швидко метаболізують [293].

На сьогоднішній день досить популярними є препарати на основі колагену та його похідних, які знайшли широке застосування у медицині, біотехнології, косметичній та харчовій промисловості [294-296]. Висока гомологічність молекули колагену у різних видів тварин, а отже низька

імуногенність, значно полегшують його застосування [297]. Відповідно до наведених у літературі даних низькомолекулярним фрагментам колагену притаманний широкий спектр біологічної активності. Так, виявлено їх антигіпертонічну, антитромботичну, гепатопротекторну, антиоксидантну, протизапальну, протипухлинну, ранозаживляючу дію, також колагенові фрагменти мають виражений пролонгуючий ефект та здатні стимулювати процеси регенерації пошкоджених тканин [298, 299]. Цікавими є дані щодо впливу фрагментів колагену на толерантність до глюкози та чутливість до інсуліну в осіб із надмірною вагою [300, 301]. Відкриття корисних фізіологічних ефектів біоактивних пептидів, отриманих в результаті гідролізу колагену, дозволяє розглядати їх як засоби зниження ризику розвитку ускладнень при хронічних захворюваннях пов'язаних із порушенням ліпідного та вуглеводного обміну, зокрема, ожиріння. Крім того, з'ясування механізмів дії пептидних препаратів сприятиме обґрунтуванню їхнього призначення з урахуванням індивідуальних та вікових особливостей пацієнтів.

Впродовж багатьох років як основну сировину для отримання колагену використовували шкіру, кістки великої рогатої худоби чи свиней, які містять до 95 % колагену, а також відходи шкіряної промисловості. Однак на сьогодні, з огляду на часті спалахи інфекційних захворювань серед худоби, використання цього сировинного ресурсу різко знизилось. Крім того, застосування в повсякденному житті засобів на основі молекул тваринного походження є неприйнятним для окремих верств населення через їхні релігійні, морально-етичні переконання та/або спосіб життя. Це все на тлі стабільно зростаючого попиту на продукцію на основі колагену спонукає до пошуку нових джерел колагену.

Морські гідробіоти, у тому числі й безхребетні, які складають близько половини світового біорізноманіття, можуть слугувати альтернативним (а в перспективі й основним) джерелом для одержання продуктів білково-пептидної природи, так як вміст білка в тканинах гідробіотів знаходиться у

межах 14-17 %, а іноді навіть 20-25 % від маси сухого залишку. На сьогодні переробка промислових видів гідробіонтів є доволі низькорентабельним процесом, адже близько 70 % від загальної маси становлять відходи, які вилучаються з циклу переробки, проте потенційно можуть бути використані як сировина для наступного біотехнологічного етапу одержання речовин різної хімічної природи. Такий підхід призводить не лише до втрати значної кількості потенційно цінної сировини, а й до забруднення навколишнього середовища відходами рибної промисловості. До відходів рибної промисловості, що зазвичай не використовуються для повторної переробки, відносять луску риб, яка з огляду на досить високий вміст колагену (до 30 %) може слугувати дешевою, необмеженою та доступною сировиною для отримання колагену та його фрагментів.

Доступним джерелом для одержання колагену можуть бути відходи рибної промисловості, зокрема, луска, а також види непромислових гідробіонтів, неконтрольоване зростання чисельності яких може становити певну загрозу для екологічної рівноваги у регіоні. Запропонований нами підхід дозволяє одночасно вирішувати дві важливі задачі, що знаходяться в сфері інтересів державної політики щодо імпортозаміщення на фармацевтичному ринку та відповідає національній стратегії управління відходами в Україні до 2030 року, а саме створення високо ефективних вітчизняних засобів та використання як сировини відходів різних галузей промисловості, що дозволить вирішити проблему утилізації відходів та сприятиме зниженню ціни на кінцеву продукцію.

З урахуванням вищевикладеного, однією із задач представленого етапу роботи було розробити методологію отримання з луски риб *Champscephalus gunnari* (крижана риба) та *Nototheniidae* Антарктичного регіону фракції фрагментів колагену з молекулярною масою нижче 10 кДа. Враховуючи особливості сировини спочатку необхідно оптимізувати метод екстракції колагену з луски. У цілому, у залежності від джерел сировини існує

декілька ключових методик екстракції колагену, зокрема, екстракція кислотами після попереднього видалення домішок (неколагенових білків та кислих протеогліканів), ферментативна та лужно-сольова екстракція. Застосування методу кислотної екстракції дозволяє одержати нативну трьохланцюгову молекулу колагену з непошкодженими С- та N-кінцевими телопептидами – ділянками, що збагачені на гістидин, гідроксилізин та норлейцин [302]. Ферментативну екстракцію проводять з використанням ферментів пепсину, трипсину, пронази, які не діють на потрійну спіраль, проте впливають на неколагенові домени та неколагенові білки. При застосуванні ферментативного гідролізу зростає ймовірність одержати колаген з пошкодженими або й повністю відсутніми телопептидами [298]. Такий колаген характеризується нижчою імуногенністю, проте містить менше цінних амінокислотних залишків [303]. Лужно-сольова екстракція полягає в обробці колагенвмісної сировини лугами за присутності насиченого розчину сірчанокислого натрію з подальшою екстракцією кислотою. Цей метод забезпечує високий вихід розчинного колагену зі збереженням потрійної спіралі, проте з дезамінованими аспарагіновими та глутаміновими залишками.

Нами було оптимізовано класичний підхід щодо екстракції колагену, який базується на використанні оцтової кислоти. Взагалі, кислотна екстракція колагену є однією з найбільш ефективних, проте використання як сировини луски потребує певних модифікацій базової методики, зокрема, включення у методику додаткового етапу демінералізації, обумовленого високим вмістом кальцію у лусці (вміст мінералів становить 16–59 % від сухої ваги) [304]. Зазвичай для демінералізації сировини використовують ЕДТА чи HCl, проте в нашій модифікації було використано 0,4 М HClO<sub>4</sub>, що дозволило скоротити час етапу демінералізації з 48 годин до 24; для підвищення ступеню екстракції колагену до 0,5 М оцтової кислоти додавали 0,005 М ЕДТА; висолювання розчинного колагену здійснювали 0,9 М NaCl; беручи до уваги низький вміст проліну та гідроксипроліну у колагені гідробіонтів, а відтак і нижчу порівняно



з колагеном ссавців температуру денатурації (+25-30 °С), всі маніпуляції проводили за температури не вище +15 °С (методика 1). Також було апробовано методику без етапу демінералізації, що дозволило скоротити процедуру одержання колагену на 24 години (методика 2) та методику, у якій екстракцію проводили лише за участі оцтової кислоти без додавання ЕДТА (методика 3). За кожною методикою колаген виділяли з 10 г сировини.

Результати електрофоретичного аналізу зразків колагену, отриманих за методиками 1-3, наведено на рис.5.1. Всі зразки колагену не містили низькомолекулярних домішок та неколагенових білків, що у цілому свідчить про ефективність процедури екстракції. Відповідно до результатів, наведених на рис.3.1, зразки колагену містили низку смуг, які за молекулярною масою відповідають  $\alpha$ -ланцюгам колагену – близько 117 кДа для  $\alpha 1$ -ланцюгів колагену та 110 кДа для  $\alpha 2$ -ланцюгів колагену, що опосередковано свідчить про належність колагену з луски риб Антарктичного регіону до колагену I типу.

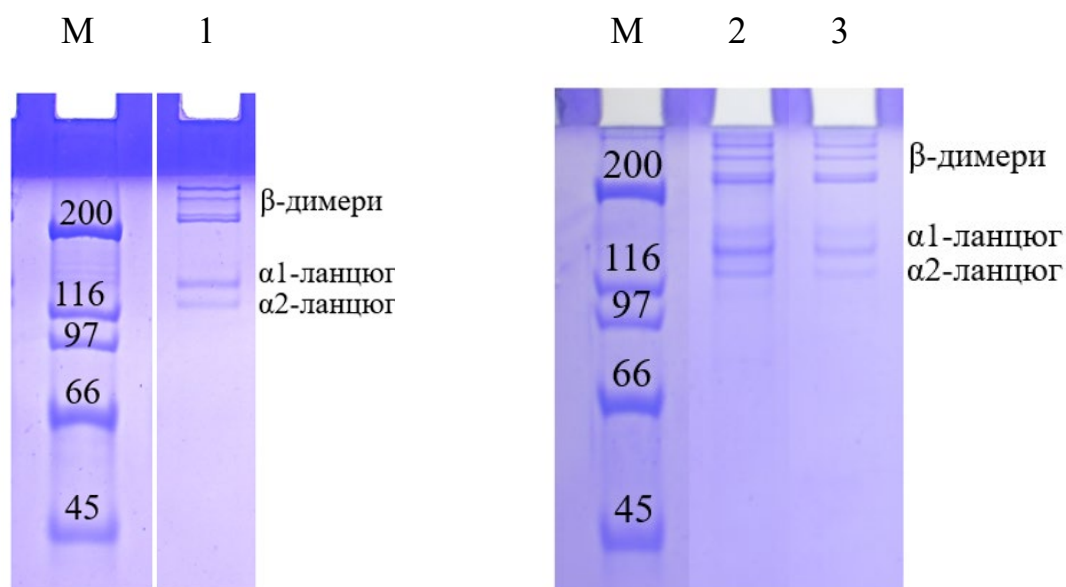


Рис. 5.1 Електрофореграма зразків колагену, одержаного з луски риб Антарктичного регіону, при використанні різних методик: М – маркери молекулярних мас, кДа; 1, 2, 3 – зразки колагену, отримані, відповідно, за методикою 1, 2 та 3

Додатковим підтвердженням цього є співвідношення  $\alpha$ -ланцюгів колагену 2:1 ( $\alpha_1:\alpha_2$ ), що за даним літератури характерно саме для колагенів I типу. Наявність смуг з молекулярною масою 200 кДа і вище може бути обумовлена димеризацією  $\alpha$ -ланцюгів колагену та утворенням  $\beta_1$ -димерів з молекулярною масою близько 215 кДа та/і  $\beta_2$ -димерів з молекулярною масою близько 200 кДа. У зразках колагену, отриманих при застосуванні методик 2 та 3, була присутня смуга незначної інтенсивності, яка за молекулярною масою не відповідає ні  $\alpha$ -ланцюгам колагену, ні його димерам чи тримерам. Незважаючи на те, що всі апробовані методики у цілому забезпечували екстракцію електрофоретично чистого колагену, застосування методики 1 виявилось найефективнішим, оскільки обумовлювало вищий, порівняно з іншими методиками, вихід колагену – 6,15 %; виключення з процедури одержання колагену етапу демінералізації суттєво впливало на вихід цільового білка, який у цьому випадку становив лише 2,8 % (табл. 5.1). Відносно низький відсоток виходу колагену з луски риб Антарктичного регіону можна пояснити тим фактом, що вихідна сировина містила низку домішок небілкової природи, неколагенові білки, а вміст колагену у лусці не такий високий, як наприклад, у кістках чи шкірі.

Таблиця 5.1

**Кількість колагену, отриманого при застосуванні різних методик екстракції, з 10 г вихідної сировини**

<b>Методика</b>	<b>мг колагену на 10 г вихідної сировини</b>	<b>Вихід продукту, %</b>
1	615,7	6,15
2	545,8	5,45
3	280,6	2,80

Отже, для екстракції колагену з луски риб Антарктичного регіону було використано методику 1, яка є комбінацією деяких етапів загальноприйнятих

методик і включає етап демінералізації сировини 0,4 М  $\text{HClO}_4$  та екстракцію колагену 0,5 М оцтовою кислотою у поєднанні з 0,005 М ЕДТА.

Одержаний колаген слугував сировиною для отримання фракції пептидів колагену з метою оцінки їхнього можливого терапевтичного потенціалу на моделі ожиріння у щурів. Можна виділити декілька підходів щодо одержання з вихідної білкової сировини пептидів та низькомолекулярних фрагментів, це, зокрема, кислотний, лужний гідроліз та гідроліз за дії протеолітичних ферментів. Зважаючи на сформульовану нами задачу перевірити можливий терапевтичний вплив низькомолекулярних фрагментів колагену, важливою умовою було одержати фрагменти колагену, які б максимально зберігали свою біологічну активність. Тому найоптимальнішим методом видається метод ферментативного гідролізу. Так, відповідно до літератури саме ферментативний гідроліз є ефективним інструментом для одержання пептидів з, наприклад, антиоксидантними, імуностимулюючими, антигіпертензивними властивостями [305, 306]. Слід відмітити, що специфічність ферментів, а також підтримання сталості параметрів процесу гідролізу впродовж всього періоду, тривалість гідролізу є важливими чинниками, які обумовлюють утворення різноманітних за біологічною активністю пептидів. Найчастіше для забезпечення належного ступеню гідролізу використовують пепсин, трипсин, колагеназу чи їх комбінацію. Проте колаген є досить складним матеріалом для ферментативного гідролізу. Зазвичай досягти його ефективного розщеплення можна лише за участі специфічних колагеназ. Неспецифічні протеолітичні ферменти малоефективні щодо нативного колагену через утруднену доступність сайтів розщеплення у молекулі тропоколагену. Саме тому використання суміші протеолітичних ферментів є більш ефективним ніж однокомпонентні ферментні засоби.

У нашому дослідженні для гідролізу колагену на низькомолекулярні фрагменти було використано фракцію серинових протеїназ, одержану з *D. antarctica* на попередньому етапі роботи. Такий підхід є виправданим з

огляду на широку субстратну специфічність серинових протеїназ з *D. antarctica*, зокрема виявлену нами здатність ефективно розщеплювати низку білкових субстратів та найвищу активність щодо колагену. Ще одним доводом на користь використання фракції серинових протеїназ з *D. antarctica* є їхня властивість зберігати ферментативну активність у широкому діапазоні рН. Підтримання значень рН на рівні, оптимальному для функціонування обраного для гідролізу ферменту, є необхідною умовою ефективного розщеплення колагену. Досягти цього буває досить складно, оскільки ферментативний гідроліз колагену є тривалим процесом. З цих міркувань, використання серинових протеїназ з *D. antarctica* є цілком обґрунтованим.

Ступінь гідролізу колагену оцінювали методом диск електрофорезу у 18 % поліакриламідному гелі відбираючи аліквоти для аналізу через різні часові проміжки (3, 6, 9 та 24 година) та порівнюючи їх склад з вихідним зразком колагену. В результаті було встановлено, що через 24 години інкубації молекула колагену розщеплювалася на низку фрагментів з молекулярною нижче 10 кДа (рис. 5.2А); отриманий у такий спосіб гідролізат також містив певну кількість високомолекулярних домішок. Оскільки нашою метою було отримати фракцію пептидів колагену з молекулярною масою нижче 10 кДа, гідролізат очищали від фрагментів вищої молекулярної маси на мембрані з відсікаючою здатністю 10 кДа. Електрофоретичний аналіз зразків підтвердив відсутність білків з молекулярною масою вище 10 Да. Такі результати цілком відповідають поставленій меті і дозволяють використовувати одержану фракцію пептидів колагену у подальших дослідженнях.

Дослідження можливого терапевтичного потенціалу пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону було проведено на моделі ожиріння, індукованого споживанням висококалорійного корму. Вибір саме цієї патології для вивчення ефектів колагенових пептидів обумовлений низкою причин.

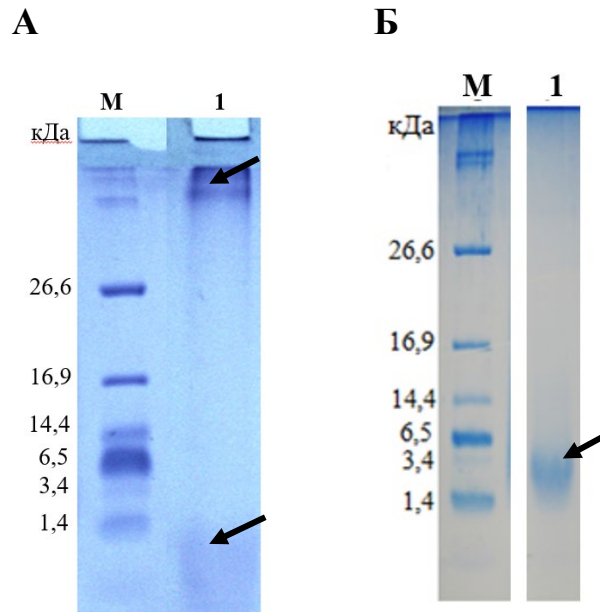


Рис. 5.2 Електрофореграми гідролізату колагену, отриманого через 24 години інкубації з фракцією серинових протеїназ з *D. antarctica* (А) та фракції пептидів колагену (Б): М – маркери молекулярних мас; 1 – досліджуваний зразок. Стрілками позначено білкові смуги та фракцію пептидів

По-перше, проблема ожиріння з огляду на стрімку динаміку поширення набуває масштабу глобальної епідемії, а отже потребує консолідації зусиль науковців, лікарів та виробників фармакологічних препаратів для зниження темпів розповсюдження та запобігання розвитку супутніх патологій, типових для цього захворювання. Так, за даними ВОЗ, у світі на надмірну вагу страждає близько 1,9 мільярда людей, з них понад 600 мільйонів хворі на ожиріння і з кожним роком кількість людей з цією проблемою зростає. [307] Враховуючи серйозні економічні та соціальні наслідки розповсюдження ожиріння, доцільною та обґрунтованою є розробка стратегій, спрямованих на попередження та зниження ризиків розвитку цього захворювання. Частиною такої стратегії в рамках комплексного підходу боротьби з ожирінням має бути розробка недорогих, ефективних препаратів профілактичної дії.

По-друге, ожиріння – це системне мультифакторне захворювання [308] патогенез якого протікає із залученням каскаду взаємопов'язаних реакцій та

механізмів, активізація яких часто відбувається у відповідь на зміни вмісту чи функціональної активності молекул у спряжених системах, а відтак, вплинувши на одну ланку в ланцюзі метаболічних порушень, можна знизити чи навіть попередити ймовірність розвитку порушень в інших.

Для того щоб оцінити можливість використання пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону для створення засобів профілактично-лікувальної дії щодо ожиріння, необхідно було вирішити декілька задач, зокрема дослідити чи впливають пептиди колагену на деякі показники, що опосередковано характеризують загальний метаболічний статус організму, а також вивчити їхній вплив на структурно-функціональний стан жирової тканини.

Оскільки типовою морфологічною ознакою пацієнтів з ожирінням є надмірна вага за рахунок збільшення маси жирової тканини на фоні зниження маси м'язової тканини, спочатку було вивчено вплив пептидів колагену на показники, що свідчать про зміну маси тіла. Серед таких показників досить інформативним параметром є індекс маси тіла (ІМТ), який дозволяє оцінити ступінь відповідності ваги та зросту, і тим самим визначити чи є вага надмірною. Окрім того, ІМТ використовують як інтегральний параметр, який характеризує композицію тіла та ступінь відкладання жирової тканини, адже саме характер розподілу жирової тканини визначає ризик розвитку супутніх ожирінню метаболічних ускладнень, що необхідно враховувати при обстеженні пацієнтів з ожирінням. Відповідно одержаних результатів (табл. 5.2), ІМТ тварин, що отримували пептиди колагену, знаходився у межах контрольних величин, у той час як для тварин з ожирінням ІМТ у 1,2 рази перевищував значення контролю. У більшості випадків розвиток ожиріння супроводжується порушенням механізмів контролю апетиту та підтримання маси тіла у межах визначених вікових та гендерних норм, що призводить до надмірного споживання їжі і, відповідно, зростання маси тіла.

Таблиця 5.2

**Вплив пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону на деякі показники, що асоційовані з розвитком ожиріння ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Досліджувані показники	Дослідні групи		
	Контроль	Ожиріння	Ожиріння + фракція пептидів колагену
Індекс маси тіла, г/см <sup>2</sup>	0,70±0,05	0,83±0,07*	0,74±0,07
Відносна маса вісцеральної жирової тканини, %	0,98±0,17	2,93±0,31*	1,78±0,03*#
Відносна маса підшкірної жирової тканини, %	1,43±0,08	1,87±0,17*	1,34±0,08#
Споживання корму, г/добу	28,5±1,2	31,0±1,5*	25,5±1,3*#
Споживання води, мл/день	38,9±0,7	32,2±0,4*	34,0±1,9*

\* -  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# -  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

На рис. 5.3 наведено криві збільшення ваги тварин у динаміці розвитку ожиріння та тварин, що отримували пептиди колагену. На початку дослідження середня вага тварин контрольної групи становила  $183,8 \pm 4,1$  г і за час експерименту зросла на 202 г. У групі щурів з моделлю ожиріння мало місце більш виражене зростання значень цього показника і на останньому тижні дослідження середня маса тварин була більшою за початкову на 272 г. Пептиди колагену обумовлювали менш виражене зростання маси тіла тварин у порівнянні з масою тварин з моделлю ожиріння.

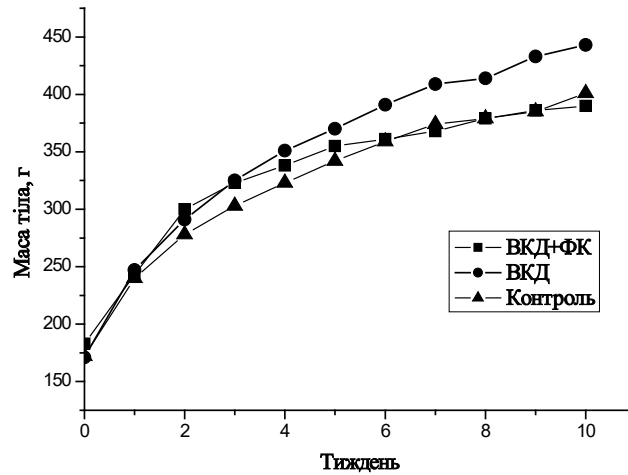


Рис. 5.3 Маса тіла щурів з моделлю ожиріння, що отримували пептиди колагену з луски риб Антарктичного регіону, в динаміці розвитку патології ( $M \pm n$ ,  $n=10$ )

\* -  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# -  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

У відсотковому співвідношенні приріст маси тіла щурів на 10-й тиждень експерименту складав 110 %, 142 % та 105 % від початкового значення, відповідно, для тварин контрольної групи, тварин з моделлю ожиріння та тварин, що отримували пептиди колагену.

Загальновідомо, що розвиток ожиріння супроводжується збільшенням маси жирової тканини, що власне і є причиною надмірної ваги, надалі було досліджено чи впливають пептиди колагену на накопичення жирової тканини. Встановлено збільшення маси обох типів жирової тканини за експериментального ожиріння у щурів – маса вісцеральної жирової тканини зростала майже втричі, підшкірної жирової – у 1,3 рази (табл. 5.2). За введення пептидів колагену маса вісцеральної жирової тканини була вища за показник у контролі, проте була у 1,8 рази нижчою ніж у тварин з моделлю ожиріння;



при цьому маса підшкірного жиру була навіть меншою, ніж у групі контрольних тварин.

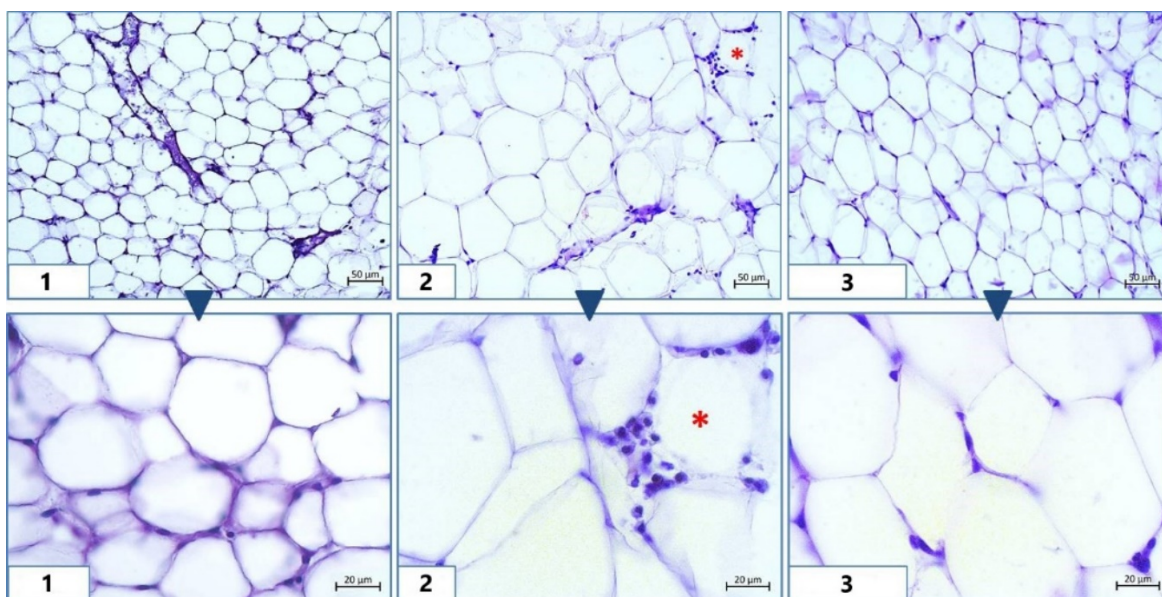
Отримані нами результати щодо впливу пептидів колагену на масу жирової тканини за розвитку ожиріння є досить цікавими та перспективними, адже згідно сучасних уявлень жирова тканина, продукуючи широкий спектр біологічно активних речовин, активно залучена у патогенез ожиріння. Саме вісцеральне ожиріння найчастіше пов'язано з порушенням синтезу та секреції інсуліну, лептину, і чим вищий ступінь вісцерального ожиріння, тим сильніше виражений негативний вплив [309]. Надмірна вага, обумовлена зростанням маси жирової тканини, є не лише наслідком метаболічних порушень за розвитку ожиріння, а й важливим чинником, що провокує та значно ускладнює перебіг захворювання сприяючи розвитку тяжких супутніх розладів.

Враховуючи важливість та залученість адипоцитів у патогенез ожиріння, вплив пептидів на структурно-функціональний стан жирової тканини було досліджено більш детально, зокрема, було проведено гістопатологічну оцінку морфології вісцеральної та підшкірної білої жирової тканини. Як видно з результатів, наведених на рис. 5.4, розвиток ожиріння призводить до гіперплазії та гіпертрофії морфологічно округлих адипоцитів у вісцеральній білій жировій тканині, що відбувається на тлі вираженої інфільтрації імунними клітинами (рис. 5.4). Такі зміни є типовим для слабо вираженого запального процесу. Наслідком збільшення кількості макрофагів, які оточують гіпертрофовані апоптотичні адипоцити, є формування короно-подібних структур – характерної морфо-функціональної ознаки розвитку хронічного запалення у жировій тканині та відмирання адипоцитів.

Споживання пептидів колагену обумовлювало зниження ступеню гіпертрофії адипоцитів у вісцеральній та підшкірній жировій тканині – площа перерізу адипоцитів у тварин, що отримували пептиди колагену, була меншою, відповідно, на 23 % та 31 % ніж цей показник у групі тварин з моделлю ожиріння. Також відмічається суттєве зниження кількості корона-

подібних структур, що свідчить про покращення функціонального стану адипоцитів за умов введення пептидів колагену.

### Вісцеральна біла жирова тканини



### Підшкірна біла жирова тканини

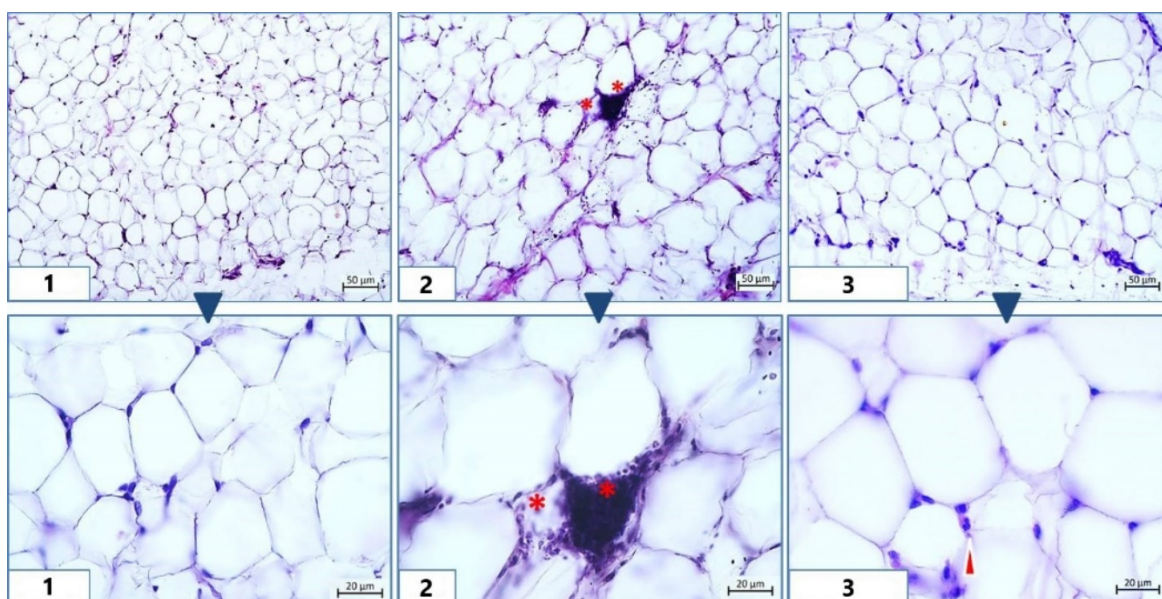


Рис. 5.4 Мікрофотографії зрізів білої жирової тканини щурів: 1 – контроль; 2 – ожиріння; 3 – ожиріння+пептиди колагену. **Зірочкою** позначено корона-подібні структури (мертві адипоцити, оточені макрофагами); **стрілкою** позначено інфільтрацію гранулоцитами. Збарвлення гематоксилін-еозин

Одним з наслідків хронічного запального процесу у жировій тканині за ожиріння є розвиток фіброзу, що супроводжується відкладенням колагенових волокон навколо кожної клітини, розростанням сполучнотканинних міжчасточкових септ (рис.5.5) та збільшенням відносної площі, яку займають колагенові волокна (рис.5.5). Також показано зростання кількості тучних клітин у стані активної секреції (частково дегранульованих) у паренхімі жирової тканини.

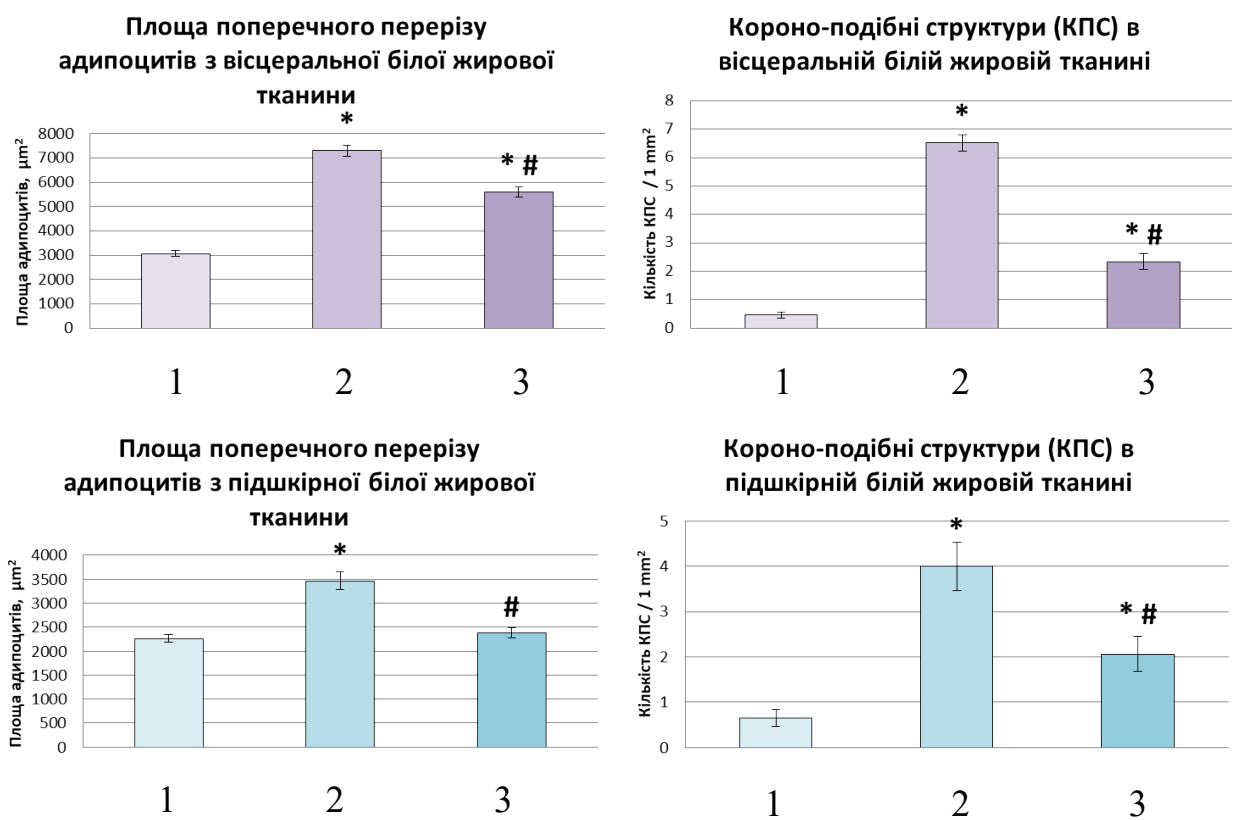


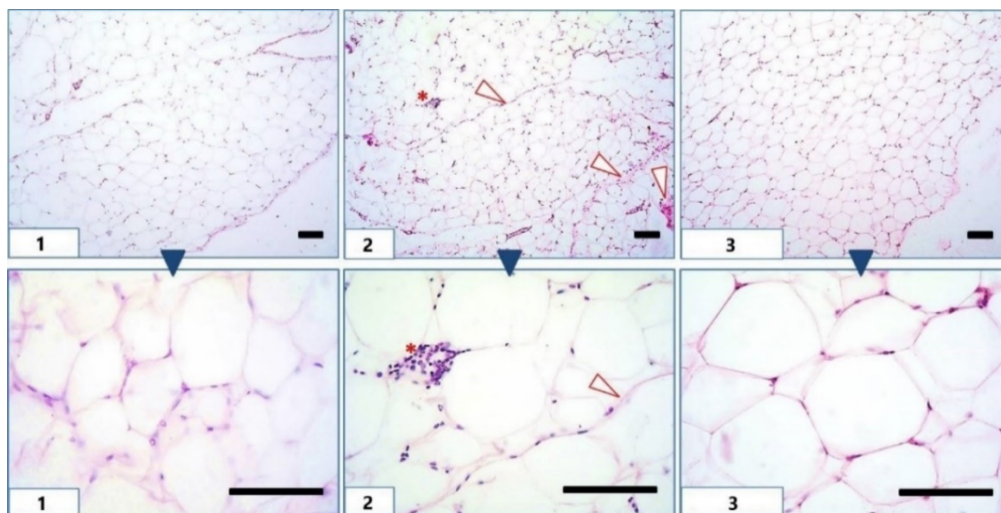
Рис. 5.5 Результати морфометричного аналізу вісцеральної та підшкірної білої жирової тканини у тварин дослідних груп: 1 – контроль; 2 – ожиріння; 3 – ожиріння+фракція пептидів колагену

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

Введення тваринам з моделлю ожиріння пептидів колагену чинило позитивний вплив на структурно-функціональний стан обох типів жирової тканини, що виявлялося у зниженні рівня фіброзу та кількості активованих тучних клітин.

### Вісцеральна біла жирова тканина



### Підшкірна біла жирова тканина

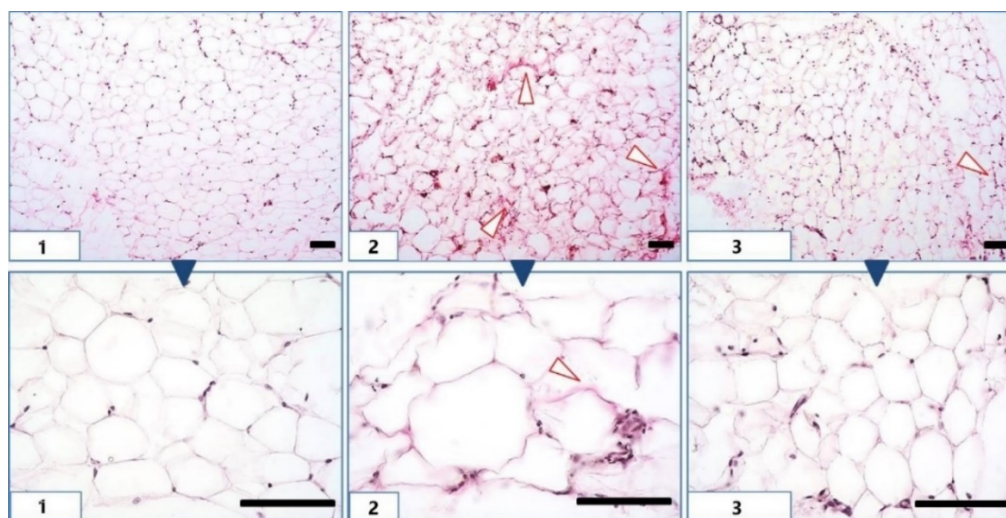
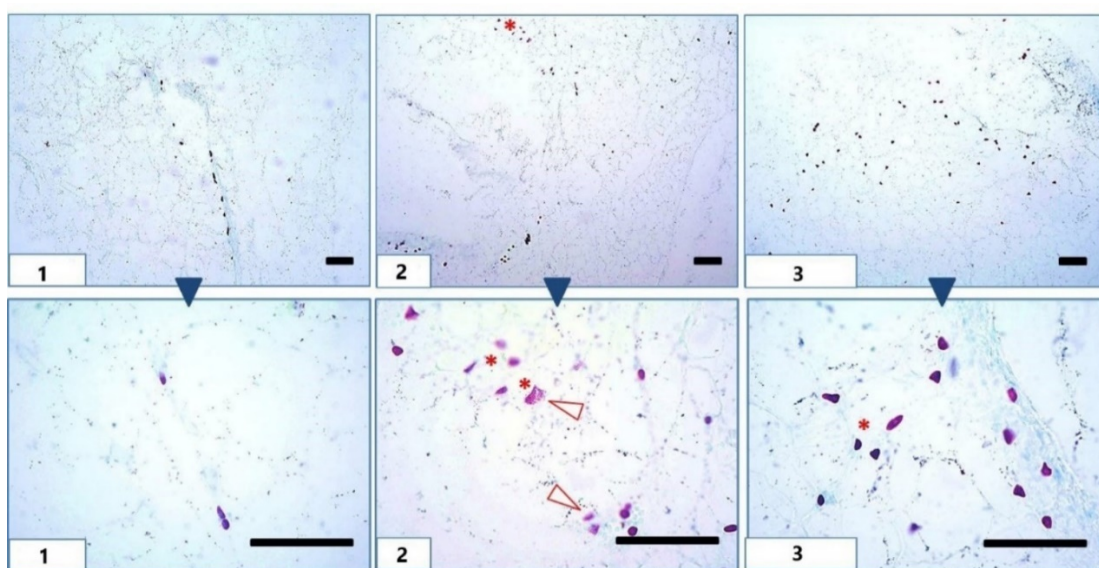


Рис. 5.6 Мікрофотографії гістохімічного виявлення колагенових волокон у білій жировій тканині: 1 – контроль; 2 – ожиріння; 3 – ожиріння+фракція пептидів колагену. **Зірочкою** позначено корона-подібні структури (мертві адипоцити, оточені макрофагами); **стрілкою** позначено колагенові волокна. Забарвлення за Ван Гізоном; колагенові волокна забарвлені в червоний колір; шкала 100 мкм

### Вісцеральна біла жирова тканини



### Підшкірна біла жирова тканини

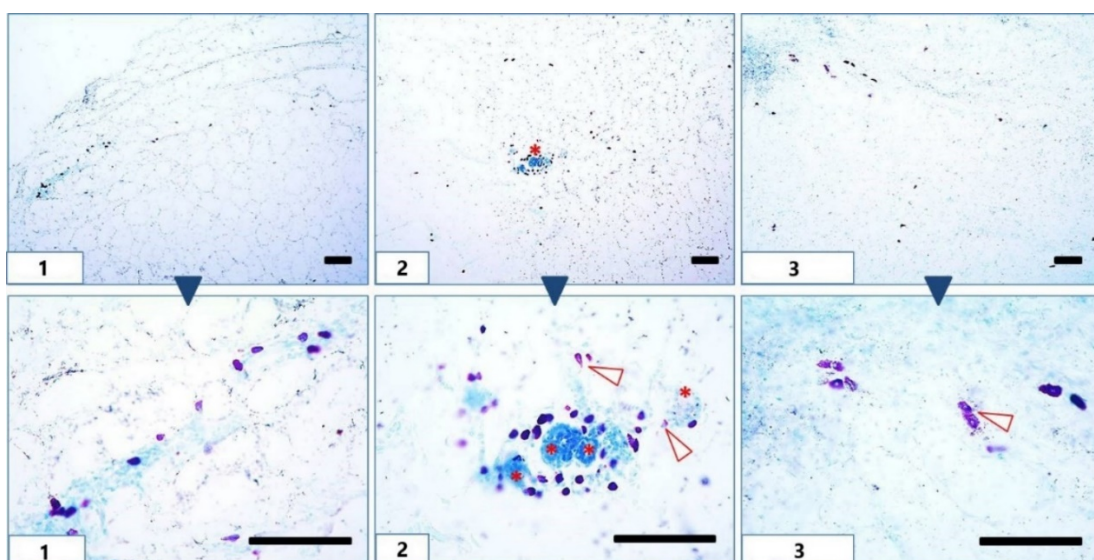


Рис. 5.7 Мікрофотографії цитохімічного виявлення тучних клітин у білій жировій тканині: 1 – контроль; 2 – ожиріння; 3 – ожиріння+фракція пептидів колагену. **Зірочкою** позначено корона-подібні структури (мертві адипоцити, оточені макрофагами та тучними клітинами); **стрілкою** позначено дегранульовані тучні клітини. Збарвлення толуїдиновим синім; гранули тучних клітин мають рожевий колір; шкала 100 мкм

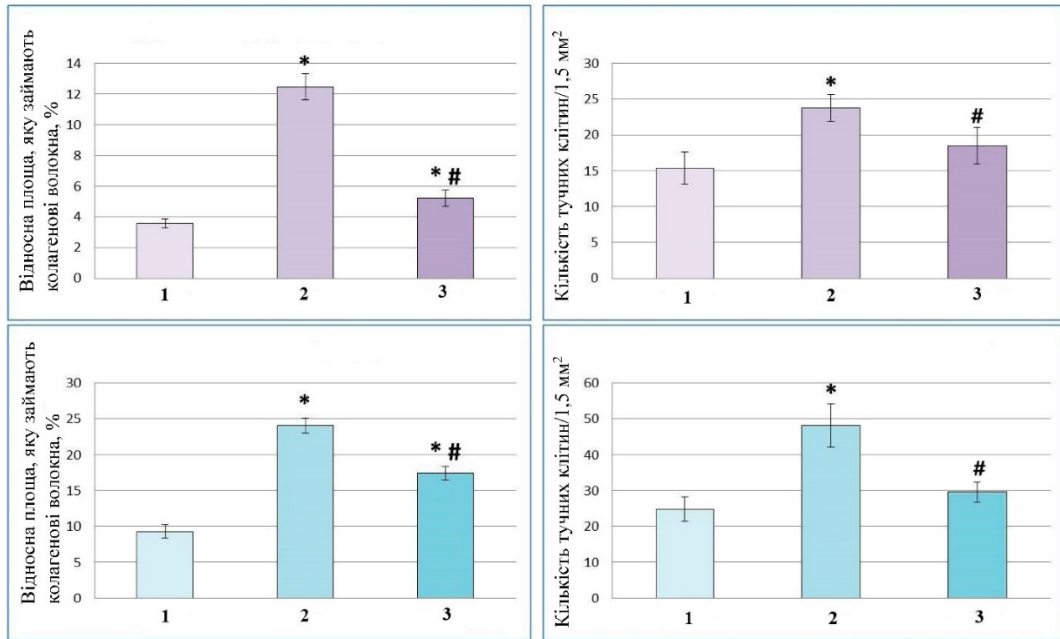


Рис. 5.8 Результати морфометричного аналізу стану вісцеральної та підшкірної білої жирової тканини: 1 – контроль; 2 – ожиріння; 3 – ожиріння+пептиди колагену

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

Причиною зростання маси тіла та накопичення жирової тканини може бути надмірне споживання їжі, енергетичний еквівалент якої більший за енергетичні потреби організму. Добре відомо, що розвиток ожиріння внаслідок порушення узгодженої координації між роботою ряду нейромедіаторних та гормональних систем, призводить до розладів на рівні контролю апетиту та відчуття насиченості, що спонукає до надмірного споживання їжі та супроводжується розвитком гіперфагії [310]. Для того щоб з'ясувати можливі механізми виявленого нами впливу пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону на приріст маси тіла у тварин з моделлю ожиріння, зокрема з'ясувати чи пов'язаний виявлений нами ефект з кількістю спожитого їжі, було проаналізовано скільки корму та рідини споживають тварини.

Одержані нами результати (табл. 5.2) свідчать про здатність пептидів колагену впливати на відчуття насиченості, адже маючи вільний доступ до їжі тварин, що отримували пептиди колагену, споживали менше корму у порівнянні з щурами з моделлю ожиріння. Так, тварини, що отримували пептиди колагену, споживали в середньому  $25,0 \pm 1,3$  г корму за добу, що було навіть дещо нижче показника ( $28,0 \pm 1,2$  г), визначеного для тварин контрольної групи. У той час, як щури, які перебували на висококалорійній дієті, щоденно з'їдали у середньому  $31,5 \pm 1,5$  г корму.

Точний механізм дії колагенових пептидів достеменно не відомий, однак, враховуючи, що у нашому дослідженні було використано суміш пептидів, можемо припустити, що встановлений ефект є комплексним і реалізується із залученням різних механізмів. Застосований нами неконтрольований ферментативний гідроліз колагену для отримання його низькомолекулярних фрагментів обумовлював утворення пептидів, що різняться за молекулярною масою, поєднанням та співвідношенням амінокислот, деякі з утворених пептидних молекул потенційно могли виявляти біологічні активності. Не виключеною є можливість утворення пептидів, структурно подібних до кишкових гормонів та/або нейропептидів, які беруть участь у регуляції енергетичного гомеостазу. А отже, колагенові пептиди можуть впливати на споживання їжі та насичення у щурів із ожирінням, імітуючи дію кишкових пептидних гормонів. Так, наприклад, автори роботи [311] виявили здатність пептидів з креветок впливати на вивільнення STC-1 клітинами дванадцятипалої кишки холецистокініну – пептидного гормону гастроінтестинального тракту, який залучений у регуляцію відчуття насичення [312], наслідком чого є пригнічення апетиту. Ще один механізм впливу пептидів може бути реалізуватися через зв'язування з серотоніновими рецепторами, що також приводить до пригнічення відчуття голоду [313].

Зниження кількості спожитої їжі і, відповідно, зниження динаміки зростання маси тіла тварин з ожирінням на тлі введення пептидів колагену

деякою мірою можна пояснити добре відомим фактом, що помірна дієта з переважанням в раціоні білків та пептидів виявляє виражений ефект, особливо на початкових стадіях розвитку ожиріння, за рахунок, зокрема посилення відчуття ситості та стимуляції посталіментарного термогенезу [314]. Доведено, що посталіментарний термогенез у хворих на ожиріння є достовірно нижчим, ніж в осіб з нормальною вагою, внаслідок порушення активності симпатичної нервової системи, а також порушення чутливості β<sub>3</sub>-адренорецепторів до катехоламінів.

Щодо споживання води, то нами не було виявлено вірогідних змін цього показниками у порівнянні з результатами у групі тварин з моделлю ожиріння, можемо лише відзначити певну тенденцію до зростання кількості спожитої води тваринами, що отримували пептиди колагену.

Таким чином, результати, отримані на даному етапі дослідження свідчать про позитивний вплив пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону на розвиток ожиріння, що виявляється у зниженні кількості спожитого за добу корму і супроводжується, відповідно, меншим приростом маси тіла меншим вмістом жирової тканини у порівнянні з аналогічними показниками для тварин з ожирінням.

Доведеним є факт, що жирова тканина це не лише енергетичне депо організму, а ще й орган, який активно залучений у регуляцію загального метаболізму через комплекс ендокринних, паракринних та аутокринних сигналів, які модулюють відповідь багатьох тканин і органів, включаючи гіпоталамус, гіпофіз, підшлункову залозу, печінку, скелетні м'язи, нирки, ендотелій, імунну систему і ін. [315]. Так, жирова тканина секретує понад 50 білкових факторів та гормоноподібних сполук, які задіяні в регуляції та кооперації ряду метаболічних та імунних процесів в організмі, відповідно зміна об'єму жирової тканини (ожиріння чи ліпоатрофія) викликає порушення продукції цих сигнальних молекул [316].



На сьогодні активно розвивається концепція щодо стану субклінічного хронічного запалення у жировій тканині, яке розглядається як одна з ключових ланок патогенезу ожиріння та пов'язаних з ним супутніх розладів [317]. Хронічне запалення жирової тканини характеризується клітинною інфільтрацією, фіброзом, змінами мікроциркуляції, порушенням секреції адипокінів та розладами метаболізму жирової тканини, а також підвищенням у крові рівня таких неспецифічних маркерів запалення як С-реактивний білок, фібриноген, лейкоцити, що безпосередньо корелює з вираженістю запального процесу. Особливістю запального процесу у жировій є підвищення у крові концентрації прозапальних цитокінів. Цитокіни, як ендогенні біологічно активні медіатори, регулюють міжклітинні і міжсистемні взаємодії, визначають виживаність клітин, стимуляцію або пригнічення їх росту, диференціацію, функціональну активність клітин і процеси апоптозу [318]. Вони забезпечують узгодженість дії імунної, ендокринної та нервової систем за фізіологічних умов та у відповідь на патологічні впливи. Раніше вважалося, що цитокіни продукуються лімфоцитами, моноцитами і тканинними макрофагами. Проте, згідно з результатами досліджень останніх років, при ожирінні, як і при будь-якому запальному процесі, на ранній стадії відбувається інфільтрація жирової тканини нейтрофілами, Т-лімфоцитами, а потім макрофагами-резидентами, які і визначають початкові механізми розвитку запалення. Показано, що макрофаги сприяють гіпертрофії адипоцитів, що супроводжується зростанням їх функціональної активності, посиленням синтезу цитокінів та призводить до подальшої інтенсифікації запальної реакції. Окрім того, гіпертрофовані адипоцити посилено секретують хемокіни, що стимулює подальше залучення до жирової тканини нових нейтрофілів, макрофагів і лімфоцитів та сприяє подальшій гіпертрофії адипоцитів і посиленню запальної реакції. Встановлено, що гіпертрофовані адипоцити, подібно до лімфоцитів і макрофагів, активно продукують цитокіни

та беруть участь в активації комплементу, запускаючи ланцюг запальних процесів, при цьому запалення набуває стійкого, системного характеру.

Таким чином, зростаюча маса жирової тканини є постійним джерелом прозапальних цитокінів, що синтезуються як самими адипоцитами, так і інфільтрованими у жирову тканину макрофагами, що призводить до формування та підтримання в організмі хронічного запального процесу. Його невисока інтенсивність не дає прямих клінічних симптомів, але, в той же час, процес носить системний характер, тобто впливає на широкий спектр органів і тканин, що впливає на їхню метаболічну активність, викликає порушення функції та активізує імунної системи.

Враховуючи вищевикладене та виявлену нами здатність пептидів колагену знижувати масу вісцеральної та підшкірної жирової тканини у тварин з ожирінням наступним завданням роботи було оцінити цитокіновий профіль у крові тварин, що отримували пептиди колагену.

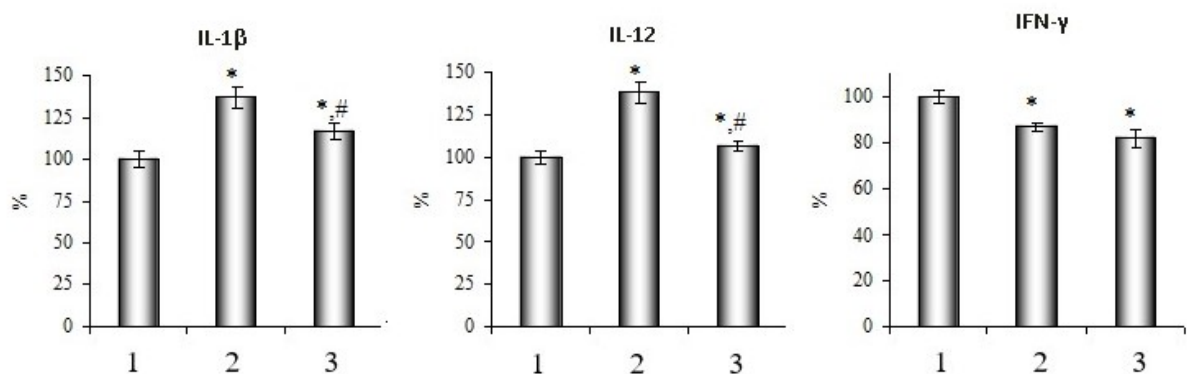


Рис. 5.9 Відносний вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів дослідних груп: 1 – контроль; 2 – ожиріння; 3 – ожиріння+фракція пептидів колагену

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожирінням

Відповідно до одержаних результатів за ожиріння спостерігалось зростання вмісту прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-12 у сироватці крові щурів – цей показник перевищував значення контролю, відповідно у 1,36 та 1,38 рази. Введення пептидів колагену обумовлювало менш виражене зростання вмісту IL-1 $\beta$  та IL-12. Один з механізмів контролю вмісту, а отже і біологічних ефектів прозапальних цитокінів, реалізується за участі групи протизапальних цитокінів, які здатні пригнічувати синтез прозапальних цитокінів впливаючи на транскрипцію відповідних генів, а також індукувати синтез рецепторних антагоністів інтерлейкінів RAII, посилювати утворення розчинних рецепторів та знижувати щільність рецепторів до прозапальних цитокінів [319]. Тому надалі було досліджено чи змінюється вміст ключових протизапальних цитокінів у відповідь на введення пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону.

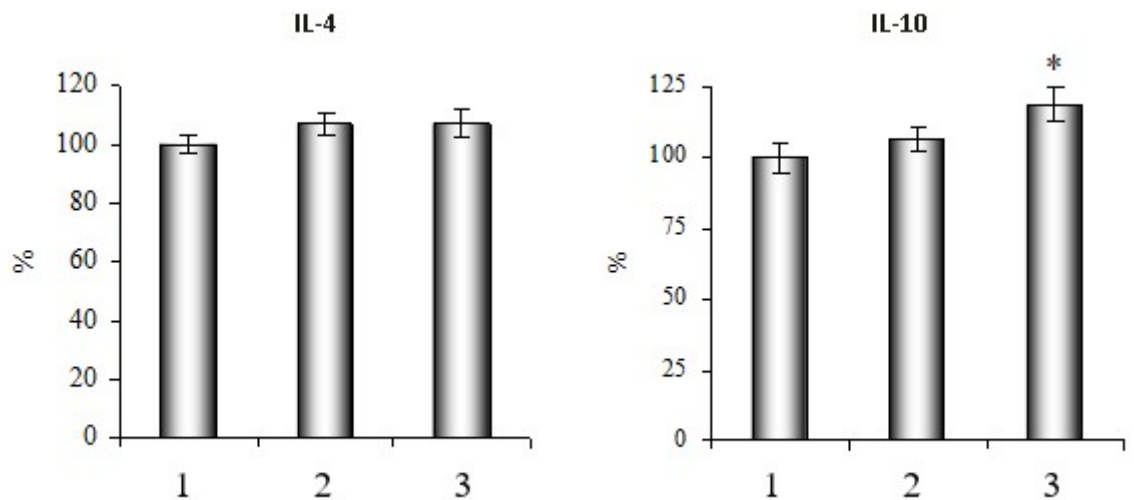


Рис. 5.10 Відносний вміст протизапальних цитокінів у сироватці крові щурів дослідних груп: 1 – контроль; 2 – ожиріння; 3 – ожиріння+фракція пептидів колагену

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожирінням

Як видно з даних, наведених на рис. 5.10, розвиток ожиріння не призводив до змін відносного вмісту цитокінів IL-4 та IL-10. Відносний вміст IL-4 у сироватці крові тварин, яким вводили пептиди колагену, також не відрізнявся від показників у контрольній групі та групі тварин з ожирінням, в той час як відносний вміст IL-10 перевищував значення контролю на 19 %.

Таким чином, зниження концентрації прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів, що одержували розчин пептидів, частково можна пояснити підвищенням концентрації протизапальних цитокінів, зокрема IL-10. Крім того, зважаючи на існування тісного зв'язку між масою жирової тканини та кількістю прозапальних цитокінів, що при цьому продукуються, можна припустити, що виявлені нами ефекти за введення розчину пептидів, пов'язані з їх здатністю впливати на масу тіла, а отже і на кількість жирової тканини у тварин з моделлю ожиріння.

Зазвичай ожиріння призводить до зниження чутливості скелетних м'язів, печінки і жирової тканини до дії інсуліну та розвитку стану інсулінорезистентності [320]. Саме тривалі підвищені рівні прозапальних цитокінів є одним з тригерів інсулінорезистентності. З-поміж прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  здатен як безпосередньо через активацію IkB- $\beta$  кінази, так і опосередковано, посилюючи ліпогенез у печінці, зростання концентрації тригліцеридів та вільних жирних кислот, впливати на передачу інсулінового сигналу всередину клітини. Крім того, хронічно підвищені рівні вільних жирних кислот в плазмі крові чинять токсичну дію на  $\beta$ -клітини підшлункової залози та є додатковими індукторами інсулінорезистентності в периферійних тканинах. Апоптоз  $\beta$ -клітин, спричинений дією прозапальних цитокінів є ще одним механізмом розвитку переддіабетичного стану у хворих на ожиріння.

Тому надалі було досліджено чи впливають пептиди колагену на біохімічні показники (концентрацію глюкози, вміст глікозильованого гемоглобіну та вміст інсуліну), які є основними маркерами переддіабетичного стану.

Зростання концентрації глюкози у сироватці крові тварин з ожирінням є негативним прогностичним маркером розвитку інсулінорезистентності і в подальшому діабету 2 типу. Тому показане нами збереження рівня глюкози у тварин, яким водили пептиди колагену, у рамках, що відповідають фізіологічній нормі, слугує вагомим підтвердженням певного терапевтичного потенціалу пептидів колагену (табл. 5.4).

Оскільки визначення концентрації глюкози було проведено разово і лише на 10-му тижні розвитку ожиріння, ми не можемо однозначно стверджувати про відсутність змін цього показника впродовж всього терміну експерименту, тим більше, беручи до уваги тісний взаємозв'язок між зростанням маси жирової тканини та порушеннями вуглеводного обміну.

Таблиця 5.4

**Концентрація глюкози, вміст гемоглобіну та відносний рівень інсуліну у сироватці крові тварин дослідних груп (M±m, n=10)**

Досліджуваний показник	Експериментальна група		
	Контроль	Ожиріння	Ожиріння + фракція пептидів колагену
Концентрація глюкози, ммоль/л	4,5±0,4	7,3±0,5*	5,2±0,5
Вміст глікозильованого гемоглобіну, мкмоль фруктози/г гемоглобіну	0,206±0,04	0,805±0,06*	0,519±0,06*#
Відносний вміст інсуліну, %	100±5	159±7*	105±6#

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

Тому для підтвердження здатності пептидів колагену нормалізувати концентрацію глюкози було визначено концентрацію глікозильованого

гемоглобіну, який є більш інформативним показником. Адже відомо, що навіть незначне підвищення глюкози у крові спричиняє реакції неферментативного глікозилювання білків, що безпосередньо впливає на їх функціональну активність та є одним з вагомих патогенетичних чинників розвитку порушень на рівні різних органів і систем. Глікозилюваний гемоглобін є важливим маркером, який використовується для оцінки середнього рівня глюкози у крові за тривалий період.

Отримані нами результати узгоджуються з попередніми даними – вміст глікозилюваного гемоглобіну у сироватці крові тварин, що отримували пептиди колагену був у 1,6 рази нижчим за показник у групі тварин з моделлю ожиріння.

Незначне підвищення концентрації глюкози у сироватці крові щурів з ожирінням, підтвержене накопиченням глікозилюваного гемоглобіну, може бути результатом порушення секреції інсуліну підшлунковою залозою, адже відомо, що за ожиріння рівень інсуліну може варіювати. Так, при ожирінні та метаболічному синдромі часто спостерігається як розвиток гіперінсулінемії, так і зниження рівня інсуліну внаслідок дисфункції  $\beta$ -клітин підшлункової залози.

Тому нами було досліджено вміст інсуліну у сироватці крові щурів з моделлю ожиріння, яким вводили пептиди колагену. Встановлено зростання відносного вмісту інсуліну (табл. 5.4) у крові тварин з моделлю ожирінням на 60 % порівняно зі значенням у контрольній групі. Такі результати можуть бути проявом компенсаторної реакції, яка часто має місце на початкових етапах розвитку патологій асоційованих зі станом інсулінорезистентності і полягає у надмірному продукуванні та секреції інсуліну  $\beta$ -клітинами підшлункової залози у відповідь на зниження чутливості периферичних тканин до дії гормону. Компенсаторна гіперінсулінемія здатна в деякій мірі підтримувати нормоглікемічний стан, проте хронічна прогресуюча резистентність до інсуліну, і гіперсекреція інсуліну може викликати стрес  $\beta$ -

клітин і, в кінцевому рахунку, незворотне ушкодження цих клітин, що призводить до тяжкої гіперглікемії та цукрового діабету 2-го типу. У тварин, що отримували пептиди колагену, відносний вміст інсуліну не відрізнявся від контрольного показника.

Одержані нами результати цілком узгоджуються з даними літератури, відповідно до яких пептиди колагену, одержані з відходів морських риб, виявляли нормалізуючий вплив на рівень глюкози, глікозильованого гемоглобіну, інсуліну і позитивно впливати на низку показників вуглеводного та ліпідного метаболізму у пацієнтів, хворих на цукровий діабет 2-го типу [321, 322].

Узагальнюючим тестом, який було використано для перевірки можливого впливу пептидів колагену на розвиток стану інсулінорезистентності у тварин з моделлю ожиріння, був глюкозотолерантний тест.

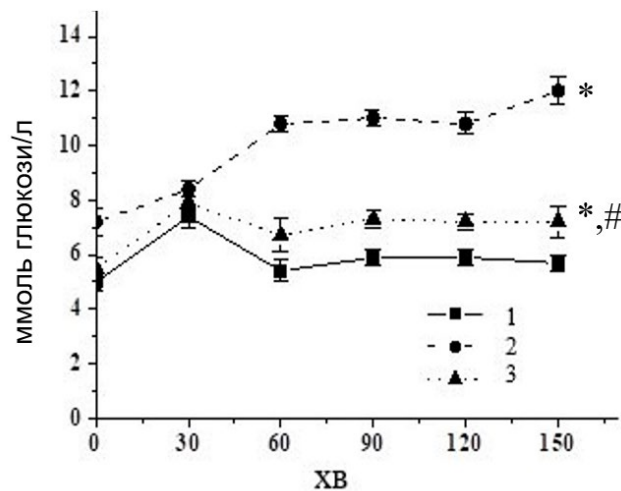


Рис. 5.11 Глікемічні криві отримані в ході глюкозотолерантного тесту щурів дослідних груп ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ): 1 – контроль; 2 – ожиріння; 3 – ожиріння+фракція пептидів колагену

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

Цей тест дозволяє оцінити здатність організму ефективно метаболізувати глюкозу за умов підвищення її концентрації у крові. Відповідно до отриманих результатів (рис. 5.11), щури з моделлю ожиріння характеризувалися зниженою чутливістю периферичних тканин до дії ендogenous інсуліну, про що свідчить швидке зростання концентрації глюкози у сироватці крові на 30 хв експерименту та подальше стабільне зростання її концентрації впродовж всього терміну дослідження – на 150 хв експерименту концентрація глюкози становила  $12,0 \pm 0,5$  ммоль/л у порівнянні з  $7,2 \pm 0,5$  ммоль/л на початку тесту. Динаміка змін концентрації глюкози у тварин, які отримували пептиди колагену, була подібна до результатів у контрольній групі – спостерігалось зростання концентрації глюкози на 30 хв та її поступове зниження починаючи з 60 хв.

Слід зазначити, що задля перевірки доцільності застосування запропонованого нами підходу переробки колагенвмісної сировини (на прикладі гідробіонтів Антарктичного регіону) у пептиди, нами також було отримано пептиди з колагену *D. antarctica* та перевірено чи впливає їх споживання на розвиток ожиріння, індукованого споживанням висококалорійної дієти. Отримані результати висвітлено у статті, яка зазначена у переліку публікацій за темою дисертації. Узагальнюючи, можна зробити висновок про ефективність пептидів, отриманих шляхом ферментативного гідролізу колагену з *D. antarctica*, що підтверджується показниками приросту маси тіла, індексу маси тіла тварин та кількістю спожитого корму. Порівняння зазначених показників з такими за впливу пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону, свідчить навіть про дещо вищу ефективність таких пептидів.

Отже, в результаті проведених досліджень було оптимізовано метод одержання пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону, який включав етап екстракції колагену та подальший його гідроліз з використанням фракції серинових протеїназ з *D. antarctica*, одержаної в ході реалізації



попереднього етапу роботи. Вперше проведено комплексне дослідження біологічних ефектів пептидів колагену на моделі ожиріння у щурів та встановлено їхню здатність впливати на розвиток ожиріння, зокрема, у тварин знижувався потяг до їжі, що підтверджується меншою кількістю спожитого за добу корму; відмічалось зниження ваги, маси вісцеральної і підшкірної жирової тканини та індексу маси тіла у порівнянні з аналогічними показниками для щурів з моделлю ожиріння. Виявлено певний модулюючий ефект пептидів колагену на ряд показників (рівень глюкози, глікозильованого гемоглобіну та інсуліну), що слугують предикторами розвитку стану інсулінорезистентності та діабету 2-го типу. Використання пептидів колагену, одержаних з луски риб Антарктичного регіону, сприяло покращенню структурно-функціонального стану жирової тканини та зниженню відносного вмісту прозапальних цитокінів та тлі підвищення вмісту деяких протизапальних цитокінів.

Узагальнюючи результати, отримання в ході виконання даного етапу дослідження, можемо констатувати певний терапевтичний потенціал пептидів колагену з луски антарктичних риб, що обґрунтовує доцільність їхнього використання як основи для створення фармакологічних препаратів профілактично-лікувальної дії, біологічно активних добавок чи функціональних продуктів харчування, спрямованих не лише на корекцію надмірної ваги у людей з ожирінням, а й на попередження розвитку ускладнень супутніх цьому захворюванню.

## **5.2. Композиції на основі колагену з гідробіонтів Антарктичного регіону як потенційні ранозагоювальні засоби**

Одним з можливих шляхів використання колагену може бути його включення до складу ранозагоювальних засобів. Незважаючи на широкий арсенал засобів, що використовуються у практиці лікування ранових уражень

шкіри, проблема створення нових ранозагоювальних засобів не лише не втрачає своєї актуальності, а навпаки набуває все більшої значимості у зв'язку зі стрімким зростанням кількості постраждалих внаслідок розв'язаної росією військової агресії.

Варто зазначити, що спричинене воєнними діями на території України порушення напрацьованих логістичних маршрутів та шляхів постачання субстанцій для фармацевтичного сектору промисловості, а також готових лікарських засобів оголило проблему необхідності розвитку імпортозамінних виробництв в Україні з метою максимального заміщення імпортованих лікарських засобів вітчизняними та розширення асортименту м'яких лікарських засобів, що сприяють загоєнню ран.

Аналіз літератури з проблематики лікування ран свідчить про високий терапевтичний потенціал засобів на основі білкових молекул, у тому числі й колагену, для лікування шкірних пошкоджень різного ступеню складності та генезу. Впровадження у терапію засобів на основі колагену є виправданим з огляду на його безпосередню залученість у регуляцію деяких реакцій, асоційованих з рановим процесом (запалення, ангиогенез, ремоделювання позаклітинного матриксу). Біодеградація колагену, його висока біосумісність [299, 323], помірна осмотична активність відкриває перспективи використання колагену не лише як одного з активних складових композитів, але й як основи для створення ранозагоювальних колагенових губок чи матриць для пролонгування дії біологічно активних речовин, у тому числі пептидів, введених у колагенову матрицю. Позитивний вплив колагену на процеси гоєння підтверджується значним різноманіттям колагенвмісної продукції на світовому фармакологічному ринку.

Незважаючи на консервативність будови, колаген з гідробіонтів дещо відрізняється від колагену, одержаного з ссавців, зокрема, за співвідношенням амінокислот – меншим є вміст аланіну, проліну, гідроксипроліну; дещо вищим – вміст аргініну, аспарагінової кислоти, треоніну, тирозину, цистеїну та

метіоніну [324, 325]. До беззаперечних переваг колагену, одержаного з морських гідробіонтів, належить його нижча імуногенність [297, 299]. Крім того, вища гідрофільність та нижча термостабільність «морського» колагену роблять його зручним компонентом для приготування дерматотропних засобів [296, 301].

Вибір площинних ран як моделі для оцінки можливого ранозагоювального ефекту композицій на основі колагену з гідробіонтів Антарктичного регіону продиктований тим фактом, що відсоток різаних ран у структурі ранових уражень є стабільно високим, що часто є наслідком виробничого та побутового травматизму, тобто чинників, які супроводжують наше повсякденне життя. І хоча цей вид ран характеризується легшим перебігом патологічного процесу та кращою динамікою загоєння у порівнянні з опіковими чи гнійно-некротичними ранами, поширеність таких ран обґрунтовує пошук засобів, які б пришвидшували процес загоєння різаних ран та знижували ймовірність утворення рубців. Це особливо актуально для пацієнтів, що хворіють на діабет 1-го, 2-го типу чи метаболічний синдром, для яких процес гоєння ран часто є ускладненим. У таких випадках особливо доцільним є застосування засобів, які б впливаючи на процес гоєння попереджували розвиток хронічних ран. Нормальний процес гоєння включає контрольовані процеси запалення, проліферації та ремоделювання, порушення перебігу яких може спровокувати хронічний характер процесу, загоєння ран з формуванням виражених рубців, що окрім функціональних відхилень є ще й косметологічною проблемою, яка часто впливає на самооцінку та психологічний стан потерпілих. Тому своєчасна та правильна терапія ранової поверхні може попередити виникнення багатьох незручностей та проблем у житті пацієнта.

Враховуючи патофізіологічні характеристики різаних площинних ран, композиції на основі колагену з гідробіонтів Антарктичного регіону наносили у вигляді мазі, яку готували на 0,5 % карбополі. Нанесення композицій у формі

мазі є атравматичним, крім того, за таких умов забезпечується стабільне підтримання вологого середовища, що згідно сучасних принципів терапії ран, є обов'язковою умовою успішного лікування [326]. Шар мазі на поверхні рани створює своєрідний захисний бар'єр, який попереджує проникнення до рани мікроорганізмів, а відтак знижується ймовірність розвитку гнійно-некротичних ускладнень.

Оскільки наші дослідження є лише попереднім етапом, спрямованим на з'ясування чи виявляє колаген з гідробіонтів Антарктичного регіону ранозагоювальні властивості, було оцінено лише декілька показників – площу та швидкість загоєння ран. Загоєння ран є складним процесом, який включає низку етапів і пов'язаний з відновленням пошкоджених та втрачених клітинних структур, тканинних шарів. В процесі гоєння ран можна виділити декілька фаз: фаза запалення настає безпосередньо після травми і триває 2-3 доби; фаза регенерації і формування грануляційної тканини починається з 3-4 доби; фаза рубцювання і епітелізації (загоєння) починається з 8-ї доби після отримання травми. Відповідно до наведеного поділу на фази вимірювання площі ран проводили через кожні три доби починаючи з 6, проведення вимірювань раніше є недоцільним, так як ранове ложе характеризується вираженим запальним процесом, що значно ускладнює здійснення коректних замірів. За нашими результатами, на початку експерименту площа вирізаних площинних ран у середньому складала 110-113 мм<sup>2</sup> (табл. 5.5). На 6-ту добу гоєння площа рани у групі тварин, рани яких гоїлись без нанесення будь-яких композицій, становила 80,64±4,21 мм<sup>2</sup>, у той час як у групі тварин, яким наносили композицію на основі колагену з *D. antarctica* цей показник був 44,56±2,00 мм<sup>2</sup>, а у групі тварин, яким наносили композицію з луски – 33,00±1,50 мм<sup>2</sup>, що є у 2,5 та 3,4 рази меншим, ніж на початку експерименту.

Такі результати свідчать про певний ранозагоювальний ефект досліджуваних композицій. Аналіз площі ранової поверхні у динаміці гоєння лише підтвердив виявлений ефект – композиції на основі колагену

пришвидшували процес загоєння і повна епітелізація ран спостерігалася на 18 добу у порівнянні з результатом у групі тварин без нанесення композицій для яких повне загоєння мало місце на 22 добу.

Незважаючи на те, що композиція на основі колагену з луски риб Антарктичного регіону, була більш ефективною у перший тиждень дослідження, оцінка площі ран на момент повного загоєння свідчить про дещо кращий ранозагоювальний ефект композиції на основі колагену з *D. antarctica* – площа рани на 16-ту добу складала  $0,20 \pm 0,01$  мм<sup>2</sup> у порівнянні з  $0,41 \pm 0,01$  мм<sup>2</sup> при використанні композиції на основі колагену з луски риб.

Таблиця 5.5

**Вплив композицій на основі колагену з гідробіонтів Антарктичного регіону на площу повношарових вирізаних площинних ран в динаміці загоєння (M±m, n=6)**

Доба	Площа рани, мм <sup>2</sup>		
	Без нанесення композицій	Композиція на основі колагену з <i>D. antarctica</i>	Композиція на основі колагену з луски риб Антарктичного регіону
0	110,33±5,00	113,82±5,50	112,63±5,54
6	80,64±4,21	44,56±2,00*	33,00±1,50*
9	36,17±1,80	6,94±0,31*	8,44±0,45*
12	18,60±0,81	1,50±0,07*	1,92±0,07*
14	7,10±0,30	0,61±0,03*	0,54±0,02*
16	2,22±0,11	0,20±0,01*	0,41±0,01*
18	0,44±0,02	Повне загоєння	Повне загоєння
20	0,08±0,004	Повне загоєння	Повне загоєння
22	Повне загоєння	Повне загоєння	Повне загоєння

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин без нанесення композицій

Як видно з таблиці 5.6, застосування обох композицій є найбільш ефективним саме у перший тиждень лікування вирізаних площинних ран так,

як саме у цей період швидкість загоєння була максимальною –  $11,56 \pm 0,50$  мм<sup>2</sup>/добу та  $13,28 \pm 0,51$  мм<sup>2</sup>/добу при нанесенні на ранову поверхню композицій на основі колагену з луски риб Антарктичного регіону та колагену з *D. antarctica*.

У групі тварин, рани яких гоїлися природним шляхом, швидкість загоєння у перший тиждень складала лише  $4,94 \pm 0,21$  мм<sup>2</sup>/добу. Застосування обох композицій на основі колагену з *D. antarctica* та луски риб Антарктичного регіону обумовлювало регенерацію шкіри без ознак формування гіпертрофічного рубця, з нормальною пігментацією та відновлення волосяного покриву.

Таблиця 5.6

**Вплив композицій на основі колагену з гідробіонтів Антарктичного регіону на швидкість загоєння повношарових вирізаних площинних ран в динаміці процесу гоєння (M±m, n=6)**

Доба	Швидкість загоєння рани, мм <sup>2</sup> /доба		
	Без нанесення композицій	Композиція на основі колагену з <i>D. antarctica</i>	Композиція на основі колагену з луски риб Антарктичного регіону
0-6	$4,94 \pm 0,21$	$11,56 \pm 0,50^*$	$13,28 \pm 0,51^*$
6-9	$14,83 \pm 0,74$	$12,53 \pm 0,60$	$8,19 \pm 0,35^*$
9-12	$5,83 \pm 0,29$	$1,78 \pm 0,08^*$	$2,17 \pm 0,10^*$
12-14	$5,75 \pm 0,25$	$0,46 \pm 0,02^*$	$0,71 \pm 0,02^*$
14-16	$2,46 \pm 0,11$	$0,23 \pm 0,01^*$	$0,04 \pm 0,002^*$
16-18	$0,92 \pm 0,045$	Повне загоєння	Повне загоєння
18-20	$0,17 \pm 0,06$	Повне загоєння	Повне загоєння
20-22	Повне загоєння	Повне загоєння	Повне загоєння

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин без нанесення композицій

Наочним підтвердженням ранозагоювального ефекту композицій на основі колагену з гідробіонтів Антарктичного регіону є фотографії, які відображають процес гоєння ран в динаміці.

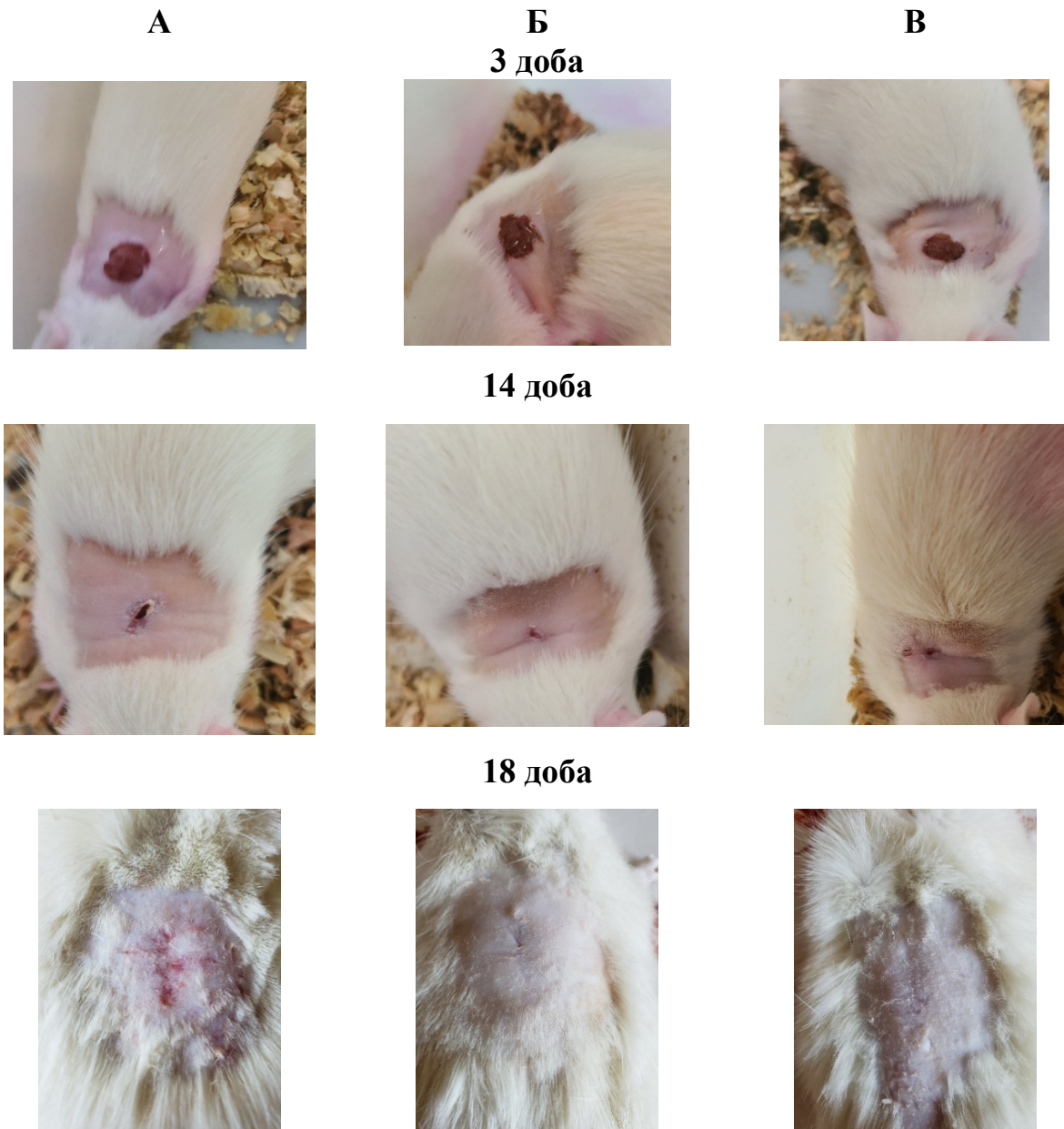


Рис. 5.12 Фотографії вирізаних площинних ран в динаміці гоєння: А – без нанесення композицій; Б – композиція на основі колагену з *D. antarctica*; В – композиція на основі колагену з луски риб Антарктичного регіону

Як бачимо з рис. 5.12, для третьої доби після моделювання ран характерний посттравматичний запальний процес, краї ран набрякли,

валикоподібні рана вкрита товстими кірками, більш вираженими у тварин, рани яких гоїлися природнім шляхом.

На 14-ту добу, яка відповідає фазі рубцювання і епітелізації, відмічається суттєве зменшення площі ран у тварин, яким наносили аплікації на основі колагену, видно ознаки грануляційної тканини, вкритої з країв епітелієм. Візуальний огляд тварин на 18-ту добу свідчить, що лікування вирізаних площинних ран з використанням композицій на основі колагену, одержаного з гідробіонтів Антарктичного регіону, приводить до скорочення термінів епітелізації рани до 18 діб та протікає без формування рубців. Застосування композицій виявилось найбільш ефективним в перший тиждень після одержання ранового пошкодження.

Отже, виявлений нами ранозагоювальний ефект композицій на основі колагену з луски риб Антарктичного регіону та колагену, отриманого з *D. antarctica* відкриває перспективи використання відходів рибної промисловості, зокрема, луски та непромислових видів гідробіонтів як сировини для отримання колагену та його пептидів. Такі результати становлять певний інтерес для розробки технологій комплексного раціонального використання відходів рибної промисловості.

### **5.3. Одержання фракції ендогенних пептидів з гідробіонтів антарктичний криль *Euphausia superba* та медуза *Diplulmaris antarctica* та дослідження їх біологічних активностей**

Новітні наукові дослідження доводять значний потенціал морських гідробіонтів як цінного джерела нутрицевтиків та сполук з різноманітними біологічними активностями [327-329], з-поміж яких потенційно цікавими можуть бути пептидні молекули. Розуміння біорегуляторної ролі ендогенних пептидів, а також розшифрування механізмів дії деяких біоактивних пептидів,



одержаних з природних джерел, на специфічні клітинні мішені, сприяли тому, що пептиди розглядаються як потенційно перспективні молекули для створення засобів направленої дії. З огляду на певний терапевтичний потенціал пептидів, одним з підходів щодо профілактики, а у деяких випадках і терапії низки захворювань, може бути використання препаратів на основі пептидів. Відповідно до існуючих уявлень, пептиди як безпосередньо, так і опосередковано можуть впливати на перебіг багатьох біохімічних реакцій [330].

До безумовних переваг пептидних препаратів належить їхня фізіологічність: застосування засобів на основі пептидів не чинить навантаження на імунну систему; не призводить до розвитку анафілактичних реакцій та інших побічних ефектів; пептидні препарати добре засвоюються при різних способах введення; характеризуються значним терапевтичним ефектом та виявляють дію за використання у порівняно невеликих дозах [331-333]. Крім того, зниження споживчих ризиків, пов'язаних з можливою контамінацією продукції інфекційними агентами, характерними для сировини тваринного походження, та відсутність у зв'язку з цим додаткових стадій очищення слугують додатковим аргументом на користь використання гідробіонтів як сировинного ресурсу для отримання білкових та пептидних молекул.

Використання гідробіонтів як можливого джерела пептидів пов'язана, перш за все з тим фактом, що особливості умов їхнього існування (низькі температури, солоність, високий тиск) обумовлюють присутність у тканинах морських гідробіонтів деяких метаболітів, що є структурно унікальними та іноді виявляють активність навіть вищу ніж у наземних аналогів. На основі деяких з цих речовин створено лікувально-профілактичні засоби, спрямовані на підтримання гомеостазу та корекцію порушень за умов патологічно зміненого метаболізму [334].

У більшості випадків біологічна активність пептидів з гідробіонтів не пов'язана безпосередньо з їх функцією *in situ* [40] і є результатом складної модуляції метаболічних шляхів, що задіяні у біосинтезі «морських» пептидів. Пептиди гідробіонтів можуть бути необхідні для забезпечення функціонування морських гідробіонтів за екстремальних умов середовища і, разом з тим, виявляти активність потенційно привабливу для біотехнологічного сектору [335, 336].

У сучасній науковій літературі є низка публікацій, які присвячені характеристиці біологічних активностей пептидів, одержаних з гідробіонтів, зокрема, виявлено антибактеріальну, антикоагулянтну, протипухлинну, імуномодулюючу та інші активності [337-339]. Проте більшість цих досліджень стосується пептидів, отриманих шляхом гідролізу сировини і майже відсутні роботи щодо дослідження біологічно активних природних пептидів.

Тому наступною нашою задачею було отримати фракцію ендогенних пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону та оцінити деякі їхні біологічні активності, зокрема, антиоксидантну та здатність впливати на окремі фактори системи гемостазу. Пошук пептидів саме з такими біологічними активностями продиктований важливістю підтримання, наприклад, антиоксидантного статусу організму, виснаженість якого зростає з віком, в умовах зростаючого техногенного навантаження, за розвитку патологічних станів. Відомо, що багато хвороб (цукровий діабет, ішемічна хвороба серця, атеросклероз, хвороба Альцгеймера та ін.) супроводжуються порушенням антиоксидантної рівноваги та розвитком оксидативного стресу. Більш того, доведеним є факт, що оксидативний стрес – це не лише наслідок прогресування патологічного процесу, а часто один з тригерів розвитку захворювання. З огляду на це, пошук ефективних антиоксидантів природного походження набуває особливої актуальності. Підтримка антиоксидантного статусу організму за рахунок систематичного вживання продуктів чи біологічно активних добавок,

компоненти яких виявляють антиоксидантну активність, може розглядатися як етап превентивної стратегії профілактики розвитку станів, асоційованих з оксидативним стресом [340]. Застосування препаратів комплексної дії, що знижують ймовірність утворення вільних радикалів дозволяє здійснювати корекцію метаболічних та функціональних змін на рівні окремих клітинних структур, попереджуючи таким чином розвиток органних та системних порушень [341, 342].

З іншого боку невпинний ріст серцево-судинних захворювань викликає необхідність розширення арсеналу лікарських засобів, здатних вибірково впливати на функціонування окремих компонентів системи гемостазу. Тому пошук нових природних та економічно обґрунтованих джерел сировини знаходиться у сфері інтересів науковців та відповідає стратегії держави в галузі охорони здоров'я. З цих позицій, пептиди, одержані з тканин морських гідробіонтів, що виявляють біологічні ефекти, можуть бути використані безпосередньо як фармацевтичні субстанції або слугувати вихідними сполуками під час розробки підходів щодо створення засобів з покращеними фармакологічними характеристиками.

Оскільки завданням було виявити природні пептиди з певними активностями, всі дослідження, представлені в цьому розділі, проводили в експериментах *in vitro* з перспективою подальшої верифікації результатів на тваринних моделях.

Важливим етапом процесу одержання будь-яких цільових молекул є вибір належного методу їхнього виділення та очищення з урахуванням особливостей джерела сировини. Відповідно до літератури, біологічна активність притаманна переважно пептидам з молекулярною масою не більше 5 кДа. Так, молекулярна маса більшості антимікробних пептидів становить близько 5 кДа [343, 344], а пептиди з вираженою антиоксидантною активністю характеризуються молекулярною масою від 0,5 до 1,5 кДа [345, 346]. Тому спочатку було оптимізовано метод одержання фракції природних пептидів з

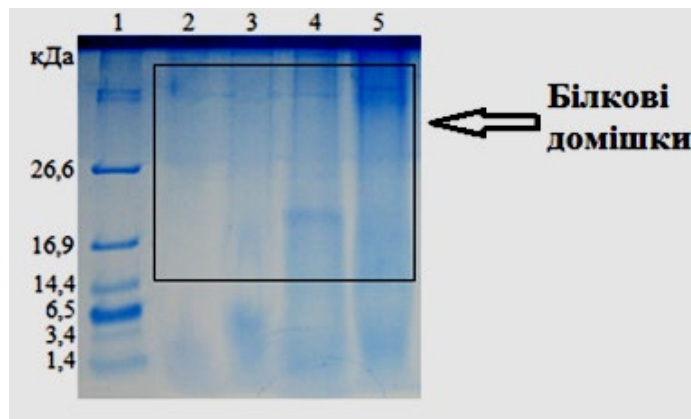
молекулярною масою до 5 кДа, який би забезпечував максимальну екстракцію пептидних молекул, присутніх у тканинах гідробіонтів.

У цілому, отримання ендогенних пептидів є менш економічно вигідним, так як весь білковий матеріал при цьому відкидається, а вихід пептидів зазвичай є меншим у порівнянні з виходом пептидів при гідролізі білоквмісної сировини. Проте, це дозволяє одержувати пептиди, притаманні лише даному об'єкту. Оскільки завданням роботи було одержати загальну фракцію пептидних молекул, основною характеристикою яких є молекулярна маса нижче 5 кДа, застосування гідрофобної чи іонообмінної хроматографії – підходів, які дозволяють виділяти молекули з огляду на більш конкретні характеристики, було не виправданим. Для одержання ендогенних пептидів застосували метод поетапного осадження високомолекулярного білкового матеріалу спочатку хлорною кислотою, а потім етиловим спиртом, за таких умов кінцева проба міститиме олігопептиди та пептиди. Метод є швидким, відносно простим у виконанні, але потребує використання значних об'ємів 96 % етилового спирту, що значно знижує його рентабельність. Тому було апробовано можливість доосадження білків спиртом меншої концентрації. Підбір умов одержання фракції пептидів проводили на прикладі гідробіонту південно-антарктичне блюдце. Фракцій пептидів одержували відповідно до згаданої вище методики, але на етапі додавання до проб спирту, окрім 96 % етилового спирту, було використано спирт у концентраціях 60 %, 80 %, а також ізопропиловий спирт у концентрації 80 %.

Як видно з результатів, наведених на рисунку 5.13, застосування ізопропилового спирту виявилось найменш ефективним, оскільки при цьому сумарна пептидна фракція була найменшою і проба містила багато білкових домішок різної молекулярної маси. Нами не було виявлено суттєвої різниці при використанні 96 % чи 80 % етилового спирту – в обох випадках у треках (трек 2 і 3, відповідно) реєструвалася зона, що відповідає пептидам з

молекулярною масою до 6,5 кДа і незначна кількість білків з молекулярною масою вище 15 кДа.

Враховуючи відсутність суттєвої різниці при застосуванні 96 % і 80 % етилового спирту, а також коштовність етилового спирту, як основного реактиву у цьому методі, економічно обґрунтованим є використання 80 % етилового спирту для доосадження олігопептидів.



№ фракції	Білкові домішки, кДа
2	31; 27
3	31; 27
4	31; 27; 25; 18
5	31; 29; 27; 25; 17

Рис. 5.13 Електрофореграма фракцій пептидів, одержаних з гідробіонту південно-антарктичне блюдце при використанні етилового спирту різної концентрації та ізопропилового спирту: 1 – маркери молекулярних мас; 2 – 96 % етиловий спирт; 3 – 80 % етиловий спирт; 4 – 60 % етиловий спирт; 5 – 80% ізопропиловий спирт

У цілому, застосування цього методичного підходу не дозволило відразу отримати фракцію чистих пептидних молекул про що свідчить присутність на електрофореграмі смуг білкових домішок.

Подальше доочищення одержаної фракції пептидів проводили методом ультрафільтрації використовуючи мембрани з відсікаючою здатністю 10 кДа. Контроль білково-пептидного складу одержаної проби проводили методом електрофорезу у 18 % ПААГ. Відсутність на електрофореграмі (рис. 5.14) смуг, що відповідають білкам з молекулярною масою вище 10 кДа, доводить ефективність обраного нами підходу доочищення пептидної фракції.

Таким чином, в результаті поєднання двох методичних підходів, що включали метод одержання фракції пептидів з використанням хлорної кислоти та з незначною модифікацією у вигляді заміни 96 % етилового спирту на 80 % і подальшого доочищення проби методом ультрафільтрації з гідробіонтів *E. superba* та *D. antarctica* було одержано фракції пептидів, які використовували у подальших дослідженнях.

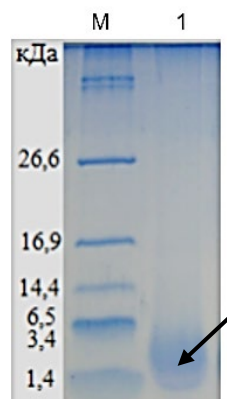


Рис. 5.14 Електрофореграма фракції пептидів, одержаної після етапу ультрафільтрації: М – маркери молекулярних мас; 1 – пептидна фракція (показано стрілкою)

Для визначення молекулярної маси та ізоелектричних точок пептидів, фракції аналізували методом двовимірного електрофорезу. Застосування двовимірного електрофорезу є доцільним з огляду на той факт, що за результатами електрофоретичного аналізу пептидна фракція не розділялась на окремі молекули відповідно до молекулярної маси, а ідентифікувалась на електрофореграмі як загальна пляма в зоні нижче 5 кДа. Крім того, незважаючи на однакову молекулярну масу, пептиди можуть мати різні ізоелектричні точки. Тому проведення аналізу досліджуваних пептидів у двох напрямках може надати додаткову інформацію щодо особливостей будови пептидів з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону та деталізувати молекулярну масу пептидів, присутніх у фракції.

На рис. 5.15-5.16 наведено 2Д-електрофореграми розділення пептидних фракцій. Проведений аналіз виявив, що пептиди з обох гідробіонтів характеризуються значенням ізоелектричних точок в діапазоні лужних значень рН.



Рис. 5.15 2Д-електрофореграма фракції пептидів, одержаної з *E. superba*: М – маркери молекулярних мас. Стрілками позначено смуги, що відповідають пептидам

Фракція пептидів з *E. superba* з огляду на значення їхніх ізоелектричних точок розділилася на три групи – пептиди з ізоелектричними точками при рН 8,0; 9,0 та 10,0.

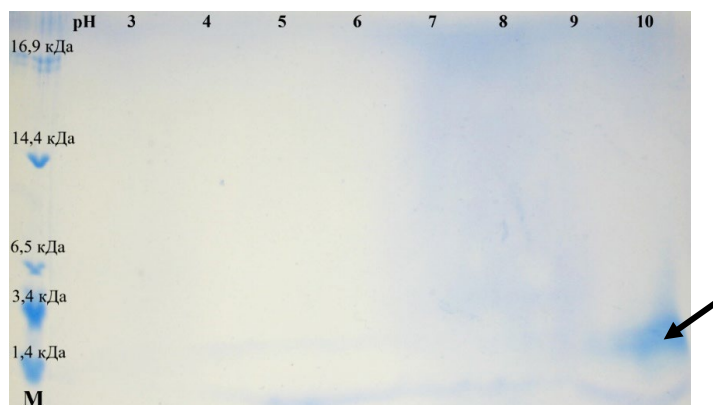


Рис. 5.16 2Д-електрофореграма фракції пептидів, одержаної з *D. antarctica*: М – маркери молекулярних мас. Стрілкою позначено смугу, що відповідає пептидам

Найбільше пептидів було виявлено в зоні, що відповідає значенню рН 8,5 (рис. 5.15). Пептиди з *D. antarctica* були представлені однією фракцією, для якої ізоелектричні точки пептидів знаходились при рН 10,0 (рис. 5.16).

Для обох видів гідробіонтів молекулярна маса пептидів була нижчою 3,4 кДа, що відповідає молекулярній масі пептидів, які згідно літератури виявляють антиоксидантну активність [347-349].

Присутність у тканинах гідробіонтів пептидів з ізоелектричними точками в області лужних значень рН вказує на той факт, що домінуюча частина пептидів досліджуваних об'єктів представлена катіонними пептидами. Це може бути обумовлено як нижчим вмістом у молекулах пептидів залишків негативно заряджених амінокислот (аспарагінової, глутамінової кислоти), так і/або наявністю значної кількості залишків позитивно заряджених амінокислот, зокрема, лізину та аргініну. Наявність у молекулі пептидів позитивно заряджених амінокислот є характеристикою, типовою для пептидів з антибактеріальними властивостями – відповідно до літератури саме катіонні пептиди здатні пригнічувати ріст та розмноження деяких мікроорганізмів. Реалізація антимікробної активності відбувається переважно за рахунок двох основних механізмів – дестабілізації зовнішньої мембрани грам-негативних бактерій за рахунок взаємодії позитивно заряджених амінокислотних залишків у молекулі пептидів з негативно зарядженими залишками ліпосахаридів на поверхні мембрани бактерій [350]. Інший механізм передбачає хелатування пептидами вільного заліза – важливого фактору для росту мікроорганізмів.

Надалі одержані пептидні фракції тестували на наявність антиоксидантної активності, яку оцінювали за здатністю впливати на рівень окремих кисневих радикалів. Вільно радикальні реакції є невід'ємною частиною метаболізму за умов фізіологічної норми; ці реакції лежать в основі низки життєво важливих процесів, зокрема знешкодження чужорідних сполук, реалізації імунної відповіді, вільні радикали виконують сигнальну та регуляторну функції; за їх участі контролюються найважливіші гомеостатичні



фізико-хімічні параметри клітини: в'язкість, вибіркова проникність, цілісність клітинних мембран.

Разом з тим, неконтрольована активізація вільно радикальних реакцій на тлі порушення/виснаження функціонального резерву антиоксидантної системи захисту організму чи незбалансованість про- та антиоксидантних систем призводить до розвитку оксидативного стресу – стану, який відіграє суттєву роль в патогенезі нейродегенеративних, онкологічних, серцево-судинних, запальних хвороб, є визначальним механізмом зниження функціональної активності під час старіння організму [351-353]. Доведено, що оксидативний стрес є не лише наслідком патологічного процесу, а часто слугує одним з тригерних механізмів, що лежать в основі розвитку захворювання.

Одним з можливих підходів щодо збереження та/чи підтримання належного антиоксидантного статусу організму, зокрема, у людей похилого віку чи спортсменів у періоди інтенсивних фізичних навантажень, є вживання антиоксидантів. Проте останні дослідження на тваринах показали, що систематичний прийом високоактивних антиоксидантних засобів є потенційним тригером розвитку пухлин та посилення метастазування при раку легень, меланомах, пухлинах кишківника [340, 354, 355]. Такі результати викликають занепокоєння щодо доцільності включення активних синтетичних антиоксидантів у протоколи тривалої антиоксидантної терапії та спонукають до пошуку менш шкідливих речовин з антиоксидантними властивостями. З цих причин більш доцільним є вживання продуктів чи біологічно активних добавок природного походження, компоненти яких виявляють помірну антиоксидантну активність. Перевагою природних антиоксидантів є відсутність кумулятивного ефекту та токсичності за умов тривалого прийому чи високих доз. Застосування природних антиоксидантів помірної дії, що знижують ймовірність утворення вільних радикалів, дозволяє здійснювати корекцію метаболічних та функціональних змін на рівні окремих клітинних

структур, попереджуючи таким чином розвиток органних та системних порушень і може розглядатися як етап превентивної стратегії профілактики розвитку станів, асоційованих з оксидативним стресом.

У ході виконання сформульованої задачі спочатку було визначено загальну антиоксидантну активність одержаних пептидів, яка є інтегральним показником і дає змогу попередньо визначити чи виявляє сполука антиоксидантні властивості. Принцип визначення ґрунтується на здатності реагентуДФПГ приєднувати електрон, донором якого слугує досліджувана сполука. Як референтну сполуку було використано аскорбінову кислоту, загальна антиоксидантна активність якої у нашому експерименті становила  $98 \pm 5 \%$ , пептиди використовували у концентрації 1 мг/мл. Відповідно до одержаних результатів (табл. 5.12), загальна антиоксидантна активність пептидів з тканини досліджуваних об'єктів виявилась значно нижчою у порівнянні з антиоксидантною активністю референтної сполуки. Так, антиоксидантна активність пептидів з *E. superba* була визначена на рівні 36 %, у той час як загальна антиоксидантна активність фракції пептидів з *D. antarctica* становила лише 10 %.

Такі результати не дозволяють говорити про високий антиоксидантний потенціал пептидів з тканин гідробіонтів. Проте даний тест є лише одним з можливих тестів визначення антиоксидантної активності сполук. Зазвичай для комплексної оцінки антиоксидантного потенціалу проводять декілька тестів, які базуються на різних підходах визначення антиоксидантної активності [341, 342, 356]. З-поміж тестів, які дозволяють оцінити здатність сполук донувати електрони чи гідроген є визначення їхньої редукуючої здатності. Результати визначення редукуючої здатності пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону узгоджуються з даними, отриманими на попередньому етапі дослідження, що є цілком закономірним враховуючи ідентичність механізмів реалізації загальної антиоксидантної активності та редукуючої здатності.

Таблиця 5.12

**Результати оцінки антиоксидантного потенціалу ендогенних пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

<b>Антиоксидантна активність</b>	<b>Референтна сполука</b>	<i>E. superba</i>	<i>D. antarctica</i>
Загальна антиоксидантна активність, оцінена за відновленням радикалу 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу (ДФПГ), %	98,0±5,0 <sup>ак</sup>	36,0±2,5	10,0±1,5
Редукуюча здатність, %	95,0±4,5 <sup>гв</sup>	64,0±4,5	2,5±0,5
Здатність знешкоджувати гідроксильні радикали, %	85,0±4,5 <sup>ак</sup>	3,0±0,2	13,0±1,5
Здатність знешкоджувати супероксидні аніон-радикали, %	55,0±2,5 <sup>ак</sup>	20,0±2,5	2,3±0,5
Здатність знешкоджувати радикали оксиду азоту, %	90,0±4,0 <sup>гв</sup>	34,0±3,5	1,2±0,07
Здатність знешкоджувати пероксид водню, %	57,0±2,8 <sup>ак</sup>	10,5±0,5	16,8±0,7

<sup>ак</sup> – аскорбінова кислота

<sup>гв</sup> – глутатіон відновлений

В обох експериментах саме пептиди з *E. superba* виявляли найвищу активність – редукуюча здатність пептидів з *E. superba* становила 64 %; у той час редукуюча здатність пептидів з *D. antarctica* була значно нижчою і складала лише 2,5 %. До найбільш агресивних радикалів, накопичення яких спричиняє пошкодження клітинних структур, білкових та ліпідних молекул, а також викликає ураження ДНК і впливає на синтез білків належать гідроксильні радикали. Саме тому, речовини, що здатні впливати на рівень гідроксильних радикалів, є одними з найбільш перспективних в контексті їхнього використання як антиоксидантних засобів. Тому нами було оцінено чи впливають пептиди з гідробіонтів на рівень гідроксильних радикалів. Отримані результати свідчать про не високу ефективність пептидів з щодо

гідроксильних радикалів – здатність пригнічувати утворення гідроксильних радикалів становила  $13,0 \pm 1,5$  % та  $3,0 \pm 0,15$  % відповідно для пептидів з *E. superba* та *D. antarctica*.

Наступний етап дослідження антиоксидантних властивостей пептидів передбачав оцінку їхньої здатності знешкоджувати супероксидні аніон-радикали, які хоча й належать до слабких окисників, проте є джерелом більш реакційно здатних форм, у тому числі й гідроксильних радикалів. На додачу, супероксидні аніон-радикали, вступаючи в реакцію з оксидом азоту (II), призводять до утворення пероксинітриту, надпродукція якого спричиняє розвиток «нітрузуючого стресу». Нітрування іонів металів і тіольних груп у білкових молекулах за умов нітрузуючого стресу обумовлює порушення та/чи втрату останніми їхніх канонічних функцій, провокує апоптотичну загибель клітин.

Результати проведеного дослідження (табл. 5.12) виявили незначну активність пептидів з *D. antarctica* щодо супероксидних аніон-радикалів – 5 %. Цей показник для пептидів з *E. superba* був вищим і становив 21 %. Пептиди з *E. superba* виявилися ефективнішими за пептиди з *D. antarctica* і щодо їхньої здатності впливати на рівень радикалів оксиду-азоту – здатність знешкоджувати радикали оксиду-азоту становила  $34,0 \pm 3,5$  %, у той час як пептидів з *D. antarctica* цей показник становив лише  $1,2 \pm 0,07$  %.

Виявлена нами здатність пептидів з *E. superba* впливати на рівень оксиду азоту та супероксидних аніон-радикалів є доволі перспективною характеристикою, адже знижуючи вміст цих радикалів пептиди попереджують утворення більш реакційно здатних радикалів, таких як гідроксильний та/чи пероксинітрит та певною мірою знижують ймовірність генералізації оксидативного стресу.

Останній показник, який було визначено в рамках оцінки антиоксидантних властивостей пептидів – це здатність впливати на рівень пероксиду водню. На відміну від інших активних кисневих метаболітів,

пероксид водню відносно інертна та стабільна сполука, що дозволяє їй дифундувати крізь гідрофобні мембрани на значні відстані від місця утворення, сприяючи у такий спосіб, поширенню оксидативного стресу. Пероксид водню є потенційним джерелом утворення більш реакційно здатних гідроксильного радикалу та гіпохлорит-аніону – сполук з високим окисним потенціалом, які є основними чинниками, що спричиняють окиснювальну модифікацію молекул, у тому числі ДНК. Крім того, пероксид водню належить до месенджерних молекул, що активують запуск проапоптичних сигнальних каскадів.

Відповідно до одержаних нами результатів, здатність знешкоджувати перекис водню становила  $10,5 \pm 0,5$  % для пептидів з *E. superba* і  $16,8 \pm 0,7$  % для *D. antarctica*. У цілому, виявлена нами здатність пептидних фракцій з гідробіонтів нехай незначно, але впливати на рівень пероксиду водню може опосередковано свідчити про їхню потенційну ефективність щодо попередження накопичення у тканинах та біологічних рідинах організму гідроксильних радикалів. В організмі не існує спеціальних ферментних систем інактивації гідроксильних радикалів, тому сполуки, що здатні безпосередньо чи опосередковано можуть впливати на рівень цих радикалів викликають особливий інтерес та є перспективним з позицій їхнього можливого застосування для попередження активізації вільно радикальних реакцій, особливо за умов станів гіпоксії та подальшої реоксигенації.

Молекули, що здатні знижувати рівень активних кисневих метаболітів, можуть виявляти і мембрано протекторні властивості захищаючи клітинні мембрани від пошкоджуючої дії активних кисневих метаболітів, тому надалі було оцінено можливий мембрано протекторний ефект пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону. Зручною моделлю для перевірки мембрано протекторних властивостей речовин слугують еритроцити, які є досить чутливими до змін середовища, особливо до порушень оксидантної рівноваги. За дії несприятливих чинників мембрани еритроцитів руйнуються (гемоліз) і

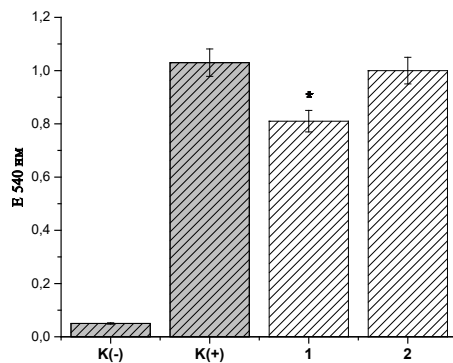
гемоглобін вивільнюється у навколишнє середовище. Реєструючи зміни показника оптичної щільності проб можна оцінити вплив тих чи інших речовин чи факторів на цілісність мембран еритроцитів. В умовах нашого дослідження гемоліз еритроцитів викликали, інкубуючи клітини за присутності пероксиду водню, концентрацію якого підбирали таким чином, щоб викликати максимальне пошкодження еритроцитів.

Як бачимо з рис. 5.17А, пептиди з *D. antarctica* не виявляли мембрано протекторних властивостей. У той час як за інкубації еритроцитів з пептидами з *E. superba* значення оптичної щільності проби було на 27 % нижчим за значення проби, яка містила пероксид водню, що свідчить про певний протекторний ефект пептидів. Такі результати у цілому узгоджуються з вищим антиоксидантним потенціалом пептидів з *E. superba* у порівнянні з пептидами з *D. antarctica*.

Враховуючи, що здатність пептидів з *E. superba* знешкоджувати пероксид водню була відносно невисокою, виявлений мембрано протекторний ефект пептидів скоріш за все реалізується із залученням інших механізмів. В сучасній науковій літературі є низка робіт, де автори відмічають стабілізуючий вплив пептидів на, зокрема, інтегральні мембранні білки [18, 19]. Обидві досліджувані фракції пептидів не викликали гемолізу еритроцитів, що вказує на відсутність гемолітичної активності та підтверджує їхню безпечність у випадку надходження у кровоток.

Узагальнюючи отримані результати можемо зробити висновок про певну антиоксидантну активність пептидів з *E. superba*; невисокі показники в тестах комплексної оцінки антиоксидантного потенціалу пептидів з *D. antarctica* не дозволяють говорити про перспективи використання цих пептидів як молекул з антиоксидантними властивостями. Суттєва різниця у прояві антиоксидантної активності пептидів з досліджуваних гідробіонтів є досить цікавою враховуючи схожу молекулярну масу пептидів з обох гідробіонтів та їхню належність до катіонних пептидів.

А



Б

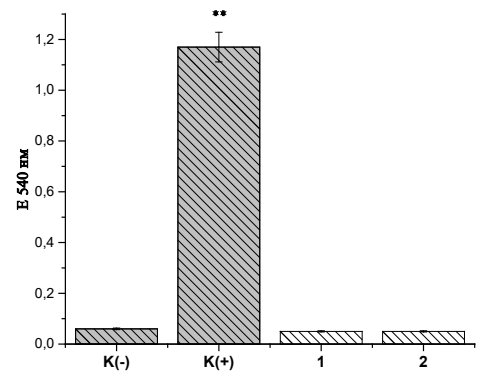


Рис. 5.17 Мембрано протекторна (А) та гемолітична (Б) активність пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону, оцінена за ступенем гемолізу еритроцитів: К(-) – негативний контроль; К(+)<sup>+</sup> – позитивний контроль; 1 – *E. superba*; 2 – *D. antarctica*. Пептиди використовували у концентрації 0,1 мг на 1 мл суспензії еритроцитів. Дані виражено як оптичну щільність проб при 540 нм

*Негативний контроль* – еритроцитарна суспензія без внесення перексиду водню (визначення мембрано протекторної активності) та еритроцитарна суспензія до якої додавали рівний об'єму пептидів об'єм ультра чистої води (визначення та гемолітичної активності); *позитивний контроль* – еритроцитарна суспензія за додавання 50 мМ перексиду водню (визначення мембрано протекторної активності) та еритроцитарна суспензія за додавання 1 % розчину тритон Х-100 (визначення та гемолітичної активності).

\*  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з позитивним контролем;

\*\*  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з негативним контролем

Подібні результати можна пояснити, перш за все, за рахунок відмінностей амінокислотного складу пептидів з *E. superba* та *D. antarctica*. Доведено, що антиоксидантна активність пептидів безпосередньо залежить від наявності у складі молекули залишків триптофану, тирозину, гістидину, фенілаланіну, які

є донорами протонів, а також цистеїну та метіоніну [357,358,359]. Пептиди з *E. superba*, на відміну від пептидів з *D. antarctica*, виявляли відносно високу загальну антиоксидантну активність та редуруючу здатність, що може вказувати на присутність у молекулі пептидів вище згаданих амінокислотних залишків. Таке припущення не суперечить катіонній природі пептидів з *E. superba*, адже ізоелектричні точки більшості пептидів були в діапазоні значень рН від 8,0 до 10,0. Домінуюча частина пептидів з *D. antarctica* згідно з даними 2Д-електрофорезу мала ізоелектричні точки при рН 10,0, а отже містила переважно позитивно заряджені амінокислоти, з-поміж яких аргінін та лізин характеризуються нижчим антиоксидантним потенціалом. Крім того, прояв антиоксидантної активності залежить від послідовності розташування амінокислотних залишків, їхньої конфігурації та співвідношення гідрофобних і гідрофільних амінокислотних залишків [360-362].

Таким чином, у ході виконання даного етапу досліджень було виявлено певний антиоксидантний потенціал пептидів з *E. superba*, підтверджений у тестах оцінки загальної антиоксидантної активності ( $36,0 \pm 2,5$  %), редуруючої здатності ( $64,0 \pm 4,5$  %) та здатності знешкоджувати радикали оксиду азоту ( $34,0 \pm 3,5$  %). Нижчі, у порівнянні з референтною сполукою, значення досліджуваних показників свідчать про належність пептидів з *E. superba* до сполук з помірними антиоксидантними властивостями. Помірний антиоксидантний ефект у поєднанні зі здатністю впливати на рівні вільних радикалів, що різняться за своєю деструктивною дією, дозволяє розглядати пептиди з *E. superba* як можливий додатковий інгредієнт функціональних продуктів харчування.

Разом з тим, застосування сполук, у тому числі і антиоксидантів, дія яких не передбачає спрямованого впливу на систему гемостазу, можливе лише за умов експериментально та клінічно підтвердженої відсутності здатності впливати на фактори системи гемостазу. Тому наступний блок досліджень у рамках вирішення задачі оцінки біологічних ефектів пептидів з гідробіонтів



Антарктичного регіону передбачав вивчення впливу одержаних пептидів на функціонування окремих компонентів системи гемостазу.

Пошук молекул, що здатні модулювати активність ключових факторів системи гемостазу, набуває особливої значимості у світлі невідомо зростаючого відсотка пацієнтів, що страждають від патологій, зумовлених дисбалансом у системі гемостазу. Порушення у коагуляційній та/чи фібринолітичній ланках, надмірна реактивність тромбоцитів – ці процеси типові не лише для кардіоваскулярних захворювань та системних коагулопатій, а часто є супутніми патогенезу цукрового діабету, ожиріння, метаболічного синдрому [335, 336], тобто хвороб, що на сьогодні домінують у загальній структурі захворюваності населення. Більш того, порушення у системі гемостазу часто діагностуються при бактеріальних і вірусних інфекціях та згідно останніх наукових досліджень є важливим патогенетичним механізмом, що визначає характер перебігу та наслідки захворювання [363]. З огляду на сучасні світові реалії не можна не згадати про асоційовані з COVID-19 коагулопатії та схильність пацієнтів з COVID інфекцією до тромбоемболічних ускладнень [364, 365].

Незважаючи на той факт, що пептидні молекули виявляють різноманітні біологічні активності, що доведено значною кількістю публікацій та експериментальних даних, не так багато робіт присвячених дослідженню потенційного впливу пептидів на систему гемостазу. Проте застосування пептидів, як антикоагулянтних засобів, поряд з класичними антикоагулянтними препаратами може бути одним із підходів щодо профілактики та/чи корекції порушень у системі гемостазу. Аналіз сучасної літератури з даної проблематики виявив певну кількість робіт, де автори досліджували антикоагулянтні властивості пептидів, одержаних з різних джерел – молока та молочнокислих продуктів [366], комах [367], водоростей, отрути скорпіонів та змій [368]. Є дані щодо антикоагулянтних пептидів з гідробіонтів [369-372]. Проте у більшості випадків це були пептиди, отримані

шляхом гідролізу і практично відсутні дані щодо здатності природних пептидів з різних джерел впливати на функціонування системи гемостазу.

У наших дослідженнях ми зосередилися на вивченні можливого впливу пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону безпосередньо на фібриноген та тромбін – ключові фактори системи гемостазу. Фібриноген – фактор І зсідання крові – основний білок системи зсідання крові. У механізмі зсідання крові йому відводиться роль субстрату, з якого під дією тромбіну утворюється волокниста сітка фібрину – основа згустку, що попереджає крововтрату. Зростання концентрації фібриногену, характерне для низки патологічних станів, є небезпечним фактором, адже за таких умов значно зростає ймовірність утворення фібринових згустків, а отже й ймовірність розвитку тромбозів. Ефективних та безпечних препаратів, що здатні нормалізувати рівень фібриногену, на сьогодні фактично не існує, а оскільки зростання його вмісту є проявом комплексних порушень метаболізму то, перш за все, потрібно лікувати основне захворювання. Проте на цьому етапі як частина превентивної стратегії тромбоутворення можуть бути використані засоби, що впливають на процес полімеризації фібриногену у фібриновий згусток. Один з підходів полягає у застосуванні фібриногеназ – ферментів, які розщеплюють фібриноген без ініціації процесу полімеризації. Інший підхід ґрунтується на використанні сполук, що не впливають на цілісність молекули фібриногену, проте здатні попереджувати або знижувати швидкість утворення фібринового згустку взаємодіючи з ключовими учасниками процесу полімеризації, у тому числі й з фібриногеном. Так, автори роботи [373], показали здатність синтетичного пептиду – аналогу  $\gamma$ 365-380 фібриногену – зв'язуватися з фібриногеном, що індукує конформаційні зміни у молекулі останнього та впливає на процес латеральної асоціації протофібрил фібрину. Варто відмітити, що увага до пептидів, як можливих регуляторів процесу полімеризації фібриногену не є чимось новим – пошуки пептидів, які здатні взаємодіяти з молекулою фібриногену, активно ведуться ще з 70-х років

минулого століття [374, 375]; свого часу синтетичні пептиди використовували для виявлення та дослідження функціональних сайтів у молекулі фібриногену [376, 377].

Відповідно до отриманих результатів (рис. 5.18), попередня інкубація фібриногену з пептидами з *E. superba* та *D. antarctica* не впливала на процес полімеризації фібриногену, індукований додавання тромбіну, – як динаміка процесу, так і значення екстинкції проб знаходилися у межах контрольних показників. Також було вивчено можливий вплив пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону на функціональну активність тромбіну, зокрема, на його здатність перетворювати фібриноген у фібрин з подальшою полімеризацією останнього та здатністю розщеплювати специфічні хромогенні субстрати.

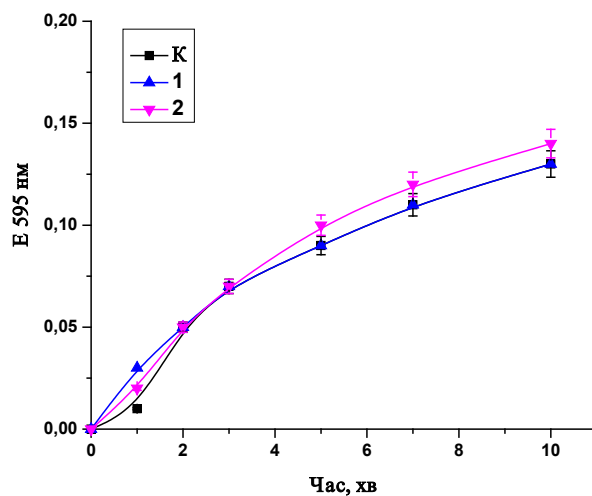


Рис. 5.18 Динаміка процесу полімеризації фібриногену після його інкубації з пептидами з гідробіонтів Антарктичного регіону: К – контроль; 1 – *D. antarctica*; 2 – *E. superba*

Дані представлено як оптичну щільність проб при 595 нм. Процес полімеризації ініціювали додаванням до проб тромбіну (0,1 МО)

Доцільність пошуку інгібіторних пептидів серед фракцій пептидів, одержаних з гідробіонтів Антарктичного регіону, обумовлена тим фактом, що

пептиди з *E. superba* та *D. antarctica* збагачені на позитивно заряджені амінокислоти, у тому числі аргінін та лізин, а розщеплення субстратів сериновими протеїназами відбувається саме за зв'язками, в утворені яких задіяні згадані амінокислоти.

У першій серії експериментів до тромбіну, попередньо проінкубованого з пептидами, додавали фібриноген та реєстрували зміни оптичної щільності проб при 595 нм. Нами не було виявлено інгібуючого ефекту пептидів на активність тромбіну. Як видно з рис. 5.19, інкубація пептидів з тромбіном обумовлювала зростання значень оптичної щільності проб починаючи з 2 хв, що може бути свідченням пришвидшення процесу полімеризації фібриногену або бути наслідком зміни структури утвореного згустку.

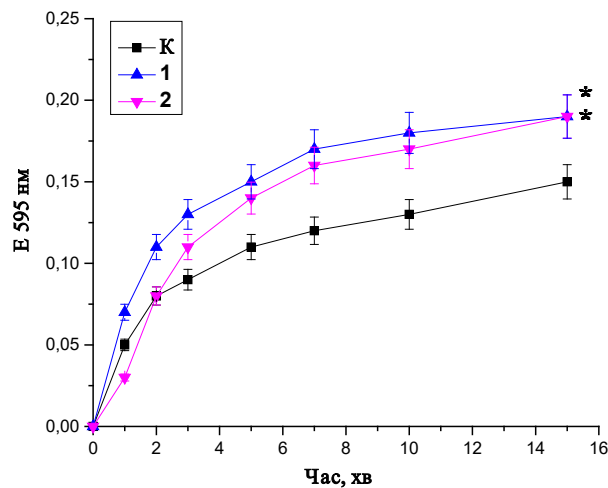


Рис. 5.19 Динаміка процесу полімеризації фібриногену, індукована додаванням тромбіну, проінкубованого з пептидами: К – контроль; 1 – *E. superba*; 2 – *D. antarctica*

Дані представлено як оптичну щільність проб при 595 нм

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

На даному етапі ми можемо лише висловлювати припущення так, як остаточний висновок можна зробити лише на основі даних електронної мікроскопії. Оптична щільність проб на 15 хв експерименту перевищувала

значення у контролі на 26 % для пептидів з обох гідробіонтів. Пептиди з *E. superba*, подібно до результатів всіх попередніх етапів дослідження, чинили дещо більш виражений вплив ніж пептиди з *D. antarctica*. Отримані результати щодо зміни процесу полімеризації фібриногену за участі тромбіну, попередньо проінкубованого з пептидами з гідробіонтів Антарктичного регіону, навряд чи є наслідком взаємодії пептидів з сайтами зв'язування лігандів (екзосайт-1 та екзосайт-2), що розташовані поблизу активного центру ферменту.

Адже, по-перше, ініціація полімеризації фібриногену тромбіном відбувається після зв'язування фібриногену з активним центром та екзосайтом-1 молекули тромбіну, а отже у випадку блокування цього сайту досліджуваними пептидами процес полімеризації фібриногену навпаки був би пригніченим. По-друге, обидва екзосайти сформовані переважно позитивно зарядженими амінокислотами, що унеможлиблює їхню взаємодію з позитивно зарядженими пептидами з *E. superba* та *D. antarctica*.

На даному етапі роботи ми не можемо зробити однозначний висновок щодо механізмів впливу пептидів на активність тромбіну та пояснити отримані нами результати, проте, враховуючи все вище викладене, можемо припустити, що пептиди з гідробіонтів Антарктичного регіону можуть зв'язуватися з іншими, ніж екзосайти, ділянками на молекулі тромбіну впливаючи у такий спосіб на прояв активності. За даними Колодзейської М.В. та співавт. [378], а також низки інших дослідників [379, 380], тромбін може існувати у двох конформаціях – повільній (виявляє більшу спорідненість до протеїну С) та швидкій (виявляє більшу спорідненість до фібриногену), які за умов фізіологічної норми знаходяться у рівновазі, підтримуючи, у такий спосіб, баланс між анти- та прокоагулянтною активністю тромбіну. Зв'язування пептидів з тромбіном, подібно до ефектів, опосередкованих іонами  $\text{Na}^+$ , може індукувати перехід повільної форми у швидку, що відповідно призводить до пришвидшення полімеризації фібриногену. Ще одним поясненням може бути спричинене пептидами покращення умов

перебігу ферментативної реакції, можливо внаслідок створення відповідних умов для зв'язування з субстратом. Висунуте нами припущення є досить сміливим та безумовно потребує подальшого експериментального підтвердження чи спростування.

Отримані результати є досить цікавими, так як більшість досліджень спрямовані на пошук молекул, здатних інгібувати активність тромбіну, що є абсолютно виправданим враховуючи його ключову роль у коагуляційному каскаді та залучення у регуляцію перебігу інших процесів (запальних, проліферативних). У літературі наведено публікації щодо природних інгібіторів тромбіну, одержаних з різних джерел [381], проте ми не знайшли робіт присвячених речовинам пептидної чи будь-якої іншої природи, які б навпаки підвищували ефективність тромбіну щодо фібриногену. Можливо, такі сполуки не мають особливих клінічних перспектив, проте можуть бути корисним інструментом вивчення білок-білкових взаємодій між факторами системи гемостазу, тим більше враховуючи багатофункціональність тромбіну та дані щодо його аллостеричної природи [378].

Інкубація тромбіну з пептидами *E. superba* та *D. antarctica* також не впливала на його амідазну активність за концентрації пептидів у пробі 40 мкг/мл та 0,4 мкг/мл (рис. 5.20), що вказує на відсутність серед фракції природних пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону потенційних інгібіторів активності тромбіну.

Додаткову інформацію щодо можливих механізмів дії сполук можна отримати за умов, максимально наближених до фізіологічних, тобто коли дослідження проводяться не на окремих субстратах, а, наприклад, у плазмі чи сироватці крові, де присутні фактори, що також можуть впливати на досліджувані показники. Тому надалі було досліджено чи впливають пептиди з гідробіонтів Антарктичного регіону на утворення згустку плазми крові після її преінкубації з пептидами. Як і в попередніх дослідженнях процес полімеризації ініціювали додаванням до проб тромбіну.

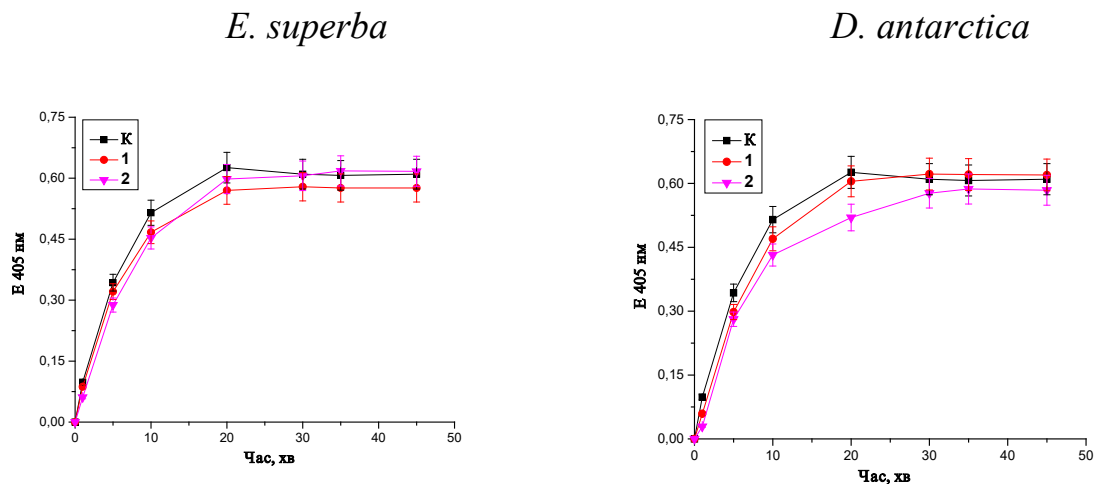


Рис. 5.20 Динаміка процесу розщеплення специфічного хромогенного субстрату тромбіном після його інкубації з пептидами з гідробіонтів Антарктичного регіону: 1 – концентрація пептидів 40 мкг/мл; 2 – концентрація пептидів 0,4 мкг/мл

Дані представлено як оптичну щільність проб при 405 нм

Отримані результати (рис. 5.21) свідчать про посилення процесу полімеризації плазми крові після її інкубації з пептидами, що збігається із результатами, отриманим при вивченні впливу пептидів на тромбін-індуковану полімеризацію фібриногену після інкубації останнього з пептидами. Ефект пришвидшення процесу полімеризації плазми крові спостерігався для пептидів з обох гідробіонтів, проте був більш вираженим у випадку використання пептидів з *D. antarctica*. Інкубація плазми з пептидами не лише приводила до пришвидшення процесу полімеризації плазми крові на що вказує різна динаміка кривих на рис. 5.20, а й обумовлювала залучення у процес більшої кількості молекул фібриногену, про що опосередковано свідчить вище значення оптичної щільності проб. Так, у контрольному зразку крива виходила на плато на 20 хв експерименту, у той час як за дії досліджуваних пептидів вихід кривих на плато спостерігався на 5 хв для пептидів з *D. antarctica* та на 10 хв для пептидів з *E. superba*. На 20 хв

експерименту значення оптичної щільності проби з пептидами з *D. antarctica* та *E. superba* перевищували значення у контролі відповідно у 2,5 та 1,66 рази.

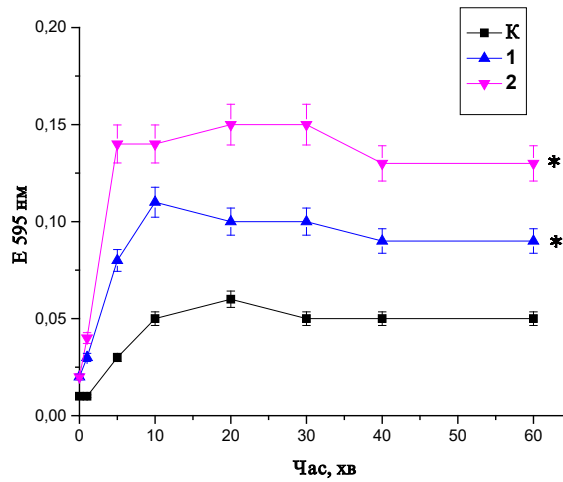


Рис. 5.21 Динаміка процесу полімеризації плазми крові після її преінкубації з пептидами з гідробіонтів Антарктичного регіону та подальшого додавання тромбіну: К – контроль; 1 – *E. superba*; 2 – *D. antarctica*

Дані представлено як оптичну щільність проб при 595 нм

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

Отже, згідно з отриманими результатами, пептиди з *E. superba* та *D. antarctica* здійснювали модулюючий вплив на здатність тромбіну перетворювати фібриноген у фібрин, а також впливали на динаміку процесу полімеризації плазми крові. Такі дані є новими і потребують проведення подальших досліджень спрямованих на виявлення механізмів реалізації виявлених ефектів пептидів.

Всебічне дослідження впливу пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону на функціонування системи гемостазу неможливе без оцінки їхнього впливу на тромбоцитарну ланку цієї системи. Пошук сполук, що здатні впливати на процес активації та/чи агрегації тромбоцитів не втрачає своєї актуальності – ефектори агрегації тромбоцитів можуть бути корисними не



лише з позицій їхнього застосування як засобів для лікування станів, асоційованих з порушенням тромбоутворення, такі сполуки можна використовувати і як інструментарій для досліджень функціонального стану тромбоцитів.

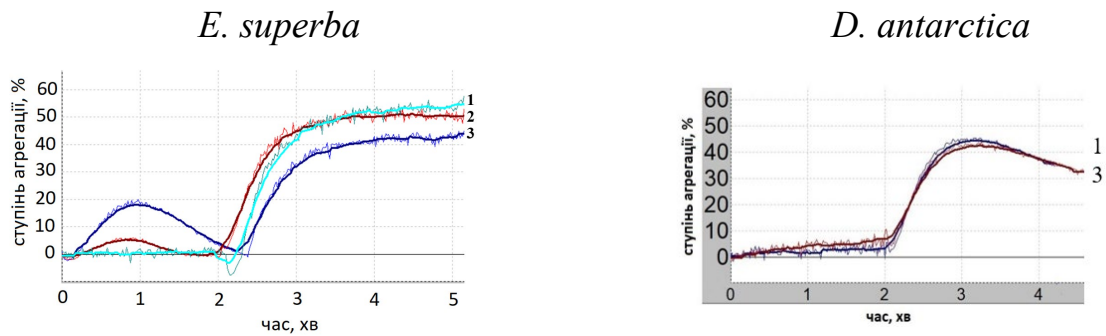


Рис. 5.22 Агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів за попередньої інкубації з пептидами з гідробіонтів Антарктичного регіону: 1 – контроль; 2 – концентрація пептидів 0,4 мкг/мл; 3 – концентрація пептидів 40 мкг/мл

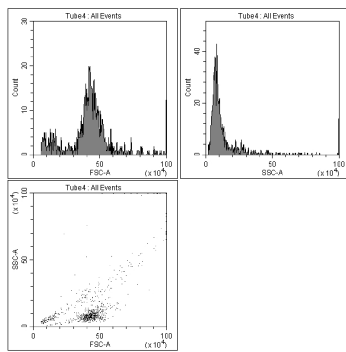
Тому наступний етап роботи було присвячено аналізу впливу пептидів, одержаних з гідробіонтів Антарктичного регіону, на процес агрегації тромбоцитів; дослідження проводили у плазмі, збагаченій тромбоцитами (ПЗТ). Нами не було виявлено проагрегаційної активності у пептидів з *D. antarctica*, так як їхня інкубація з ПЗТ не призводила до змін у параметрах агрегатограми (рис. 5.22А). Оскільки основний механізм активації тромбоцитів реалізується через взаємодію індуктора з відповідними рецепторами на поверхні клітини, такі результати опосередковано можуть свідчити про відсутність спорідненості досліджуваних пептидів до рецепторів тромбоцитів.

На противагу, пептиди з *E. superba* при їх внесенні до ПЗТ виявляли незначний проагрегаційний ефект, який виявлявся у концентраційно залежному зростанні ступеню агрегації тромбоцитів – при внесенні пептидів

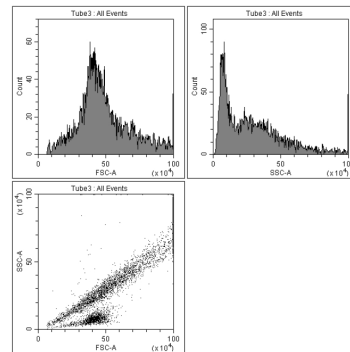
у концентрації 25 мкг на 1 мл плазми, збагаченої на тромбоцити, ступінь агрегації тромбоцитів становив 5 %, за концентрація пептидів 40 мкг/мл цей показник був 20 %.

*D. antarctica*

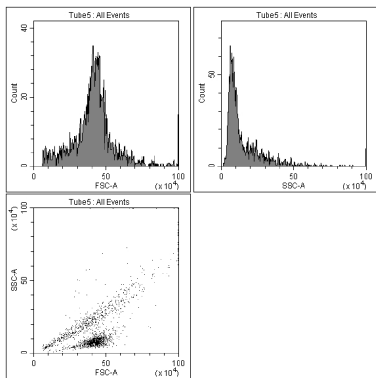
А) контрольний зразок



Б) внесення АДФ



В) внесення пептидів



Г) внесення пептидів та АДФ

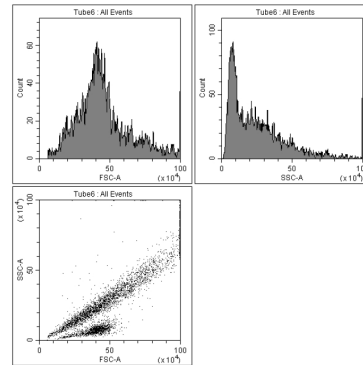


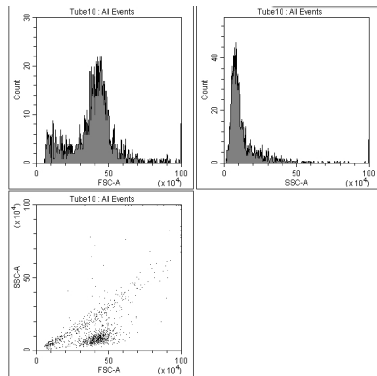
Рис. 5.23 Гістограми, що демонструють вплив пептидів з *D. antarctica* Антарктичного регіону на процеси активації та агрегації тромбоцитів: FSC-A – інтенсивність прямого світлорозсіювання; SSC-A – інтенсивність бічного світлорозсіювання. Пептиди вносили у концентрації 40 мкг/мл; АДФ у концентрації  $5 \times 10^{-6}$  М.

Варто зазначити, що ні пептиди з *D. antarctica*, ні пептиди з *E. superba*, не виявляли антитромбоцитарного ефекту, оскільки не впливали на процес агрегації тромбоцитів, індукований додаванням АДФ.

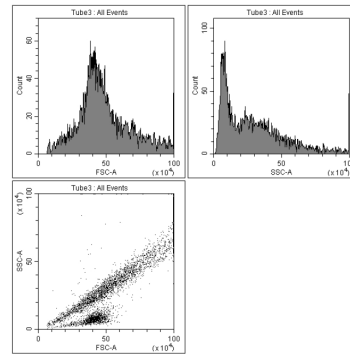
Вплив пептидів на функціональний стан тромбоцитів також було досліджено методом протокової цитофлуориметрії.

*E. superba*

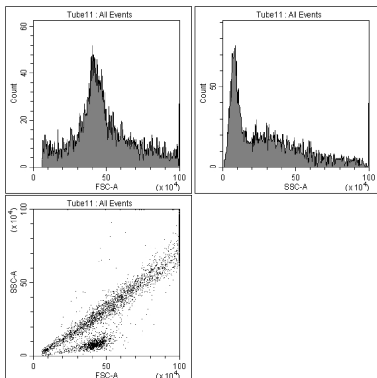
## А) контрольний зразок



## Б) внесення АДФ



## В) внесення пептидів



## Г) внесення пептидів та АДФ

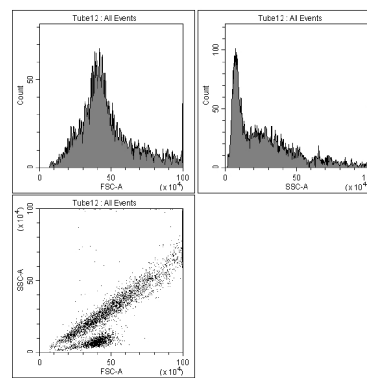


Рис. 5.24 Гістограми, що демонструють вплив пептидів з *E. superba* на процеси активації та агрегації тромбоцитів: FSC-A – інтенсивність прямого світлорозсіювання; SSC-A – інтенсивність бічного світлорозсіювання. Пептиди вносили у концентрації 40 мкг/мл; АДФ у концентрації  $5 \times 10^{-6}$  М

Отримані результати у вигляді гістограм наведено на рис. 5.23, 5.24. Додавання до тромбоцитів індуктору агрегації тромбоцитів – АДФ – викликало одночасне зростання інтенсивності прямого та бічного світлорозсіювання, що свідчить про утворення агрегатів клітин (рис. 5.23Б, 5.24Б). При внесенні до тромбоцитів пептидів з *D. antarctica* (рис. 5.23В) показники світлорозсіювання майже не змінювалися, у той час як додавання до тромбоцитів пептидів з *E. superba* (рис. 5.24В) викликало зростання інтенсивності прямого та бічного світлорозсіювання, що є свідченням

утворення агрегатів. Такі результати повністю узгоджуються з даними, отриманими на агрегометрі, та підтверджують певний проагрегаційний ефект пептидів з *E. superba*.

Важливим структурно-функціональним елементом первинної (судинно-тромбоцитарної) ланки гемостазу є ендотелій кровеносних судин, який через синтез та секрецію низки біологічно активних речовин активно залучається у підтримку тканинного гомеостазу, регулюючи місцевий кровотік, коагуляцію, фібриноліз, запалення. Фактори, що секретуються ендотеліоцитами, умовно можна розділити на тромбогенні та атромбогенні. У нормі секреція ендотелієм атромбогенних речовин переважає над секрецією тромбогенних, що є одним з механізмів підтримання тромборезистентності ендотелію. Проте порушення збалансованості вивільнення ендотелієм прокоагулянтів, антикоагулянтів та фібринолітиків призводить до порушення мікроциркуляції, підвищення схильності до тромбоутворення та розглядається як універсальна неспецифічна ланка патогенезу багатьох захворювань, в першу чергу серцево-судинних.

З цих позицій, молекули, що здатні впливати на секреторну активність ендотеліоцитів, потенційно можуть бути використані для корекції чи терапії порушень спричинених ендотеліальною дисфункцією. Оскільки реалізація ефектів багатьох фізіологічних пептидів відбувається саме за рахунок взаємодії з клітинними рецепторами та ініціації відповідних внутрішньоклітинних каскадів [382, 383], було перевірено здатність пептидів з Антарктичного регіону впливати на секрецію ендотеліоцитами фактору фон Вілебранда, тканинного активатора плазміногену (ТАП), інгібітор активатора плазміногену типу 1 (ПАІ-1), тромбомодуліну та ендотеліну. Експерименти проводили на культурі ендотеліальних клітин, які інкубували з пептидними фракціями з *E. superba* та *D. antarctica*, після чого у культуральному середовищі визначили вміст згаданих факторів. Вибір саме цих факторів продиктований їхньою вагомою роллю у регуляції судинно-тромбоцитарного

гемостазу та системи фібринолізу. Так, фактор фон Віллебранда стимулює початок тромбоутворення, посилює адгезію та агрегацію тромбоцитів; ендотелін є потужним вазоконстриктором, який через вивільнення іонів кальцію викликає стимуляцію всіх фаз гемостазу, починаючи з агрегації тромбоцитів і закінчуючи утворенням червоного тромбу; тромбомодулін та ТАП залучені в активацію фібринолізу. За присутності фібрину, ТАП перетворює плазміноген у його активну форму – плазмін, впливаючи у такий спосіб на швидкість фібринолізу. Основним фізіологічним механізмом регуляції активності тканинного активатору плазміногену, а отже і процесу активації плазміногену, є його взаємодія з інгібітором активатору плазміногену типу 1.

Відповідно до одержаних результатів (табл. 5.7), інкубація ендотеліоцитів з пептидами з *D. antarctica* не впливала на секреторну функцію клітин, так як вміст в інкубаційному середовищі досліджуваних факторів залишався у межах контрольних показників.

Таблиця 5.7

**Відносний вміст деяких факторів у культуральному середовищі за інкубації ендотеліоцитів з пептидами з гідробіонтів Антарктичного регіону ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Ендотеліальні фактори	Контроль	<i>E. superba</i>	<i>D. antarctica</i>
	Відносний вміст, ум.од/мл інкубаційного середовища		
Ендотелін	0,145 ± 0,003	0,25 ± 0,004*	0,15 ± 0,006
Фактор фон Віллебрандта	0,104 ± 0,004	0,126 ± 0,001*	0,086 ± 0,004*
Тромбомодулін	0,045 ± 0,001	0,047 ± 0,001	0,048 ± 0,001
ТАП	0,076 ± 0,001	0,159 ± 0,003*	0,087 ± 0,008
ПАІ-1	0,069 ± 0,003	0,104 ± 0,007*	0,07 ± 0,005

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

Єдиним виключенням є фактор фон Віллебранда, рівень якого був у 1,2 рази нижчим за значення контролю. Такі дані у комплексі відсутністю впливу пептидів з *D. antarctica* на процес активації тромбоцитів можна розцінювати як доказ відсутності серед фракції пептидів біологічно активних молекул, що здатні взаємодіяти з клітинними рецепторами, викликаючи у такий спосіб клітинну відповідь у вигляді секреторної активності.

Пептиди з *E. superba* на противагу пептидам з *D. antarctica* стимулювали секрецію ендотеліоцитами всіх досліджуваних факторів, окрім тромбомодуліну. Рівні ендотеліну, фактору фон Віллебранда, ТАП та ПАІ-1 перевищували контрольні показники відповідно у 1,7 рази, 1,2 рази, 2 рази та 1,5 рази.

Беручи до уваги умови експерименту, а саме інкубацію ендотеліоцитів з пептидами впродовж 60 хв, зростання вмісту досліджуваних факторів скоріш за все є наслідком секреції факторів, що вже зберігалися в ендотеліоцитах до моменту стимуляції, а не вивільнення ново синтезованих молекул. Секреція ендотеліоцитами чотирьох з п'яти досліджуваних факторів у відповідь на інкубацію з пептидами з *E. superba* може бути пов'язана з гетерогенністю пептидної фракції та присутністю пептидних молекул різної будови і ефективності, зокрема й тих, що зв'язуючись з різними рецепторами на поверхні ендотеліоцитів викликають прояв різних за направленістю змін гемостатичного балансу. Варто зазначити, що результати дослідження можуть становити інтерес як для фундаментальної клітинної біології та біохімії, так і для біотехнологічної розробки потенційних лікарських препаратів, методів діагностики та способів лікування порушень системи гемостазу. У цілому, отримані нами результати щодо впливу пептидів з *E. superba* на секреторну активність ендотеліоцитів відкривають певні перспективи їхнього використання як можливих засобів направленої регуляції гемостатичного балансу; безумовно, це передбачає фракціонування вихідної пептидної фракції

на окремі пептиди, ідентифікацію та виділення з загального пулу пептидів тих молекул, що виявляють перспективні активності.

З-поміж досліджених факторів найбільше зацікавлення викликає здатність пептидів з *E. superba* впливати на секрецію ендотеліоцитами ТАП, так як саме ТАП є основним фізіологічним активатором внутрішньосудинного фібринолізу. Патології судин, спричинені посиленням локального тромбоутворення, займають значний відсоток серед судинних захворювань і за відсутності належної терапії часто призводять до летальних наслідків. Тому пошук ефективних природних тромболітиків не лише не втрачає своєї актуальності, а навпаки набуває особливого значення в світлі зростання частки таких захворювань серед населення молодше 35 років. На сьогодні на сучасному фармакологічному ринку представлено цілий спектр препаратів рекомбінантного тканинного активатора плазміногену (рТАП), призначення яких, як і більшості тромболітичних засобів, спряжене з певними ризиками. У деяких випадках терапія із застосуванням препаратів, що впливають на секрецію ТАП клітинами власного організму, може бути більш виправданою.

З іншого боку, виявлена здатність пептидів з *E. superba* стимулювати секрецію низки ендотеліальних факторів свідчить про присутність у фракції пептидів, молекул з високою спорідненістю до рецепторів ендотеліоцитів. Детальний аналіз структури таких пептидів та з'ясування послідовностей, відповідальних за зв'язування з рецепторами, може сприяти розробці засобів адресної доставки ліків. Адже клітини ендотелію судин є важливою терапевтичною мішенню при багатьох патологіях, включаючи запалення, окиснювальний стрес і тромбози; однак локальна терапія та доставка ліків до безпосередньо до цього місця часто обмежена відсутністю специфічної спорідненості терапевтичних засобів для клітин ендотелію.

Таким чином, отримані результати свідчать про певні відмінності пептидного складу гідробіонтів Антарктичного регіону, які, незважаючи на подібну молекулярну масу та належність до катіонних пептидів, різняться за

проявом біологічної активності. Фракція ендогенних пептидів з тканин *E. superba* містить молекули, що виявляють помірні антиоксидантні властивості, а також молекули, що здатні впливати на окремі фактори коагуляційної та судинно-тромбоцитарної ланок системи гемостазу, у той час результати оцінки біологічних ефектів пептидів з *D. antarctica* не дозволяють розглядати цей гідробіонт як можливе джерело пептидів, потенційно цікавих з біотехнологічних чи фармакологічних позицій.

#### **5.4. Одержання фракції гідролізних пептидів з морського гребінця *Adamussium colbecki* та дослідження їх ефектів на моделі ожиріння у щурів**

Попередній розділ роботи було присвячено одержанню та дослідженню властивостей ендогенних пептидів, що присутні в організмі гідробіонтів, проте такий підхід є не зовсім виправданим з економічної точки зору. Значно більш комерційно перспективним є отримання пептидів шляхом гідролізу білоквмісних відходів, що залишаються на різних етапах переробки сировини або отримання пептидних сумішей шляхом гідролізу вихідної біомаси. У цьому контексті морські гідробіонти можуть бути перспективною сировинною, що зумовлено не лише значною кількістю промислових відходів, а й тим фактом, що ця сировина зазвичай збагачена на білки. Відомо, що до складу морських гідробіонтів, у тому числі й безхребетних, входять білки, які за своїм амінокислотним складом не поступаються білкам наземних тварин.

Завдання, що вирішувалося у рамках представленого розділу, полягало в одержанні з біомаси гідробіонту *A. colbecki* суміші пептидів з молекулярною масою до 5 кДа. Вибір для дослідження пептидів саме такої молекулярної маси продиктований даними літератури, відповідно до яких виражена біологічна активність притаманна переважно пептидам з молекулярною



масою від 0,5 до 2 кДа, за деякими даними до 5 чи навіть 10 кДа [384, 385]. Експериментально доведено, що, наприклад, пептиди з вираженими антиоксидантними властивостями містять в середньому 4-16 амінокислотних залишків [386, 387].

До традиційних підходів одержання з вихідної білкової сировини пептидів та/чи низькомолекулярних фрагментів білків відносять хімічний (кислотний чи лужний) гідроліз та гідроліз за дії протеолітичних ферментів. З огляду на необхідність одержання фракції пептидів, які б повною мірою зберігали біологічну активність, застосування кислотного чи лужного гідролізу, незважаючи на їхню високу ефективність, видається невиправданим, оскільки при цьому має місце руйнування одних та рацемізація інших амінокислот, що у кінцевому результаті значно впливає на прояв біологічних ефектів пептидів. Кислотний гідроліз часто супроводжується дезамінуванням аспарагіну, глутаміну; відбувається руйнування триптофану, треоніну, лізину та серину – амінокислот, присутність яких у молекулі пептиду є необхідною умовою прояву антиоксидантних та антимікробних властивостей. Крім того, при кислотному гідролізі, окрім розриву пептидних зв'язків, також відбуваються різні супутні реакції, наприклад, циклізація молекули, а при розщепленні циклу можуть виникати пептиди зі зворотним розташуванням амінокислотних залишків. Подібні реакції складно контролювати навіть при збереженні постійних умов проведення гідролізу в різних повторах отримання цільових молекул, що ускладнює стандартизацію результатів та отримання суміші пептидних молекул сталого складу. На додачу, нейтралізація кислоти, наприкінці гідролізу, призводить до зростання концентрації солі у зразках, що потребує включення в технологічні протоколи додаткових етапів очищення.

Перевагою ферментативних методів гідролізу є висока ефективність процесу при відносно м'яких умовах проведення реакції: атмосферному тиску і температурі не вище +50 °С (зазвичай +34-50 °С). Тому в результаті

ферментативного гідролізу практично не відбувається руйнування амінокислот та зниження біологічної активності кінцевого продукту. Саме ферментативний гідроліз білоквмісної сировини застосовується для одержання пептидів з, наприклад, антиоксидантними властивостями [388-391]. Слід відмітити, що відносна специфічність використаних ферментів та тривалість гідролізу є тими основними чинниками, що дозволяють контролювати утворення пептидів різної молекулярної маси та амінокислотного складу.

Нами було оцінено ефективність гідролізу сировини при використанні трипсину та пепсину; молекулярну масу пептидів, отриманих у результаті гідролітичного розщеплення білків гідробіонту *A. colbecki*, оцінювали методом диск електрофорезу у 18 % поліакриламідному гелі після відділення негідролізованого матеріалу шляхом центрифугування та подальшого одержання фракції пептидів використовуючи мембрани з відсікаючою здатністю 3 кДа. Як видно з електрофореграми, наведеної на рис. 5.25А, принципової різниці при проведенні гідролізу з використанням трипсину чи пепсину немає – в обох випадках було отримано фракції пептидів приблизно однакової молекулярної маси. Аналіз проб методом електрофорезу дозволяє отримати інформацію лише про молекулярну масу пептидів та відсутність в одержаній фракції білкових та олігопептидних домішок. Проте, оскільки основна мета представленого етапу роботи полягала у виявленні можливих біологічних ефектів пептидів *in vivo*, перед проведенням експерименту на тваринній моделі, потрібно було визначити чи виявляють пептиди біологічну активність. Для цього було досліджено загальну антиоксидантну активність пептидних фракцій, одержаних у результаті ферментативного гідролізу за дії трипсину та пепсину. Відповідно до одержаних нами результатів (рис. 5.25Б), загальна антиоксидантна активність у фракції пептидів, одержаній при використанні трипсину, була дещо вищою ніж при проведенні гідролізу за участі пепсину –  $32,0 \pm 3,5$  % та  $28,5 \pm 2,5$  % відповідно. Беручи до уваги

результати визначення загальної антиоксидантної активності, як одного з можливих тестів наявності в одержаних фракціях пептидів з біологічною активністю, в подальших дослідженнях було використано фракцію гідролізованих пептидів, отриманих в результаті дії трипсину.

Варто зазначити, більшість результатів щодо біологічних ефектів пептидів отримано *in vitro*, і дуже мало експериментів на тваринних моделях, а тим більше клінічних досліджень, що значно сповільнює темпи впровадження пептидів у фармакологічне виробництво. Крім того, висока біологічна активність пептидів, визначена поза організмом, може бути значно зниженою у випадку надходження пептидів до шлунково-кишкового тракту, що пов'язано з інтенсивністю їхнього розщеплення, всмоктування та можливими модифікаціями у кишківнику, судинній системі і печінці [392-394].

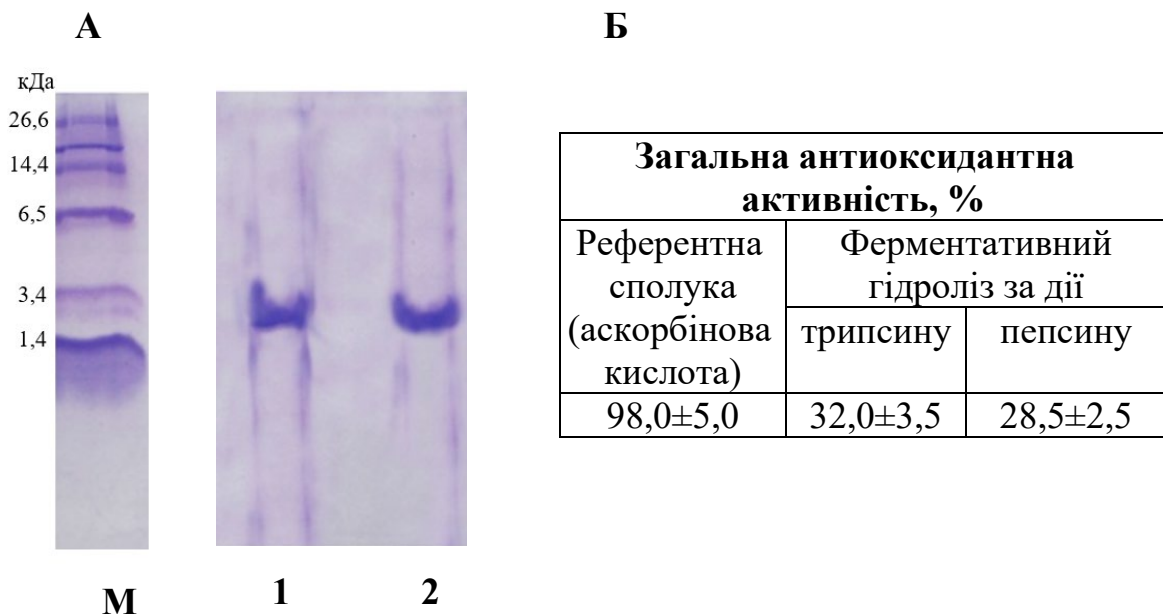


Рис. 5.25 Електрофореграма (А) розділення фракцій пептидів, одержаних шляхом ферментативного гідролізу біомаси гідробіонту *A. colbecki*, та результати визначення загальної антиоксидантної активності (Б): М – маркери молекулярних мас; 1 – гідроліз трипсином; 2 – гідроліз пепсином

Саме тому обґрунтованим підходом щодо вивчення потенційних ефектів пептидів є проведення досліджень саме на моделях *in vivo*, що і визначило напрямок наступного фрагменту роботи. Подібно до алгоритму, описаного у підрозділі 5.2, спочатку було досліджено чи виявляють пептиди з *A. colbecki* ефект щодо ожиріння; для цього було оцінено декілька параметрів, які дозволяють зробити попередній висновок про наявність чи відсутність у досліджуваної сполуки здатності впливати на розвиток ожиріння, це, зокрема, індекс маси тіла (ІМТ) та приріст маси тварин.

З огляду на отримані результати можемо говорити про здатність пептидів з *A. colbecki* впливати на розвиток експериментального ожиріння, індукованого споживанням висококалорійної дієти, що підтверджується нижчим у порівнянні з групою тварин з ожирінням значенням ІМТ та меншим приростом маси тіла на 10 тижень експерименту. Так, приріст маси тіла щурів на кінець дослідження складав 125 % від початкового значення у контрольній групі; 162 % у групі тварин з моделлю ожиріння (табл. 5.8).

Таблиця 5.8

**Індекс маси тіла, споживання корму та приріст маси тіла тварин з моделлю ожиріння та тварин, що отримували розчин пептидів з *A. colbecki* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Досліджувані показники	Дослідні групи		
	Контроль	Ожиріння	Ожиріння+гідролізні пептиди з <i>A. colbecki</i>
Індекс маси тіла, г/см <sup>2</sup>	0,72±0,05	0,85±0,07*	0,75±0,07
Споживання корму, г/добу	19,5±2,4	24,5±2,4*	20,5±2,2
Приріст маси тіла тварин на кінець експерименту, %	125,5±6,2*	162,0±7,5*	137,5±6,0*

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою

У тварин, що споживали розчин пептидів з *A. colbecki*, приріст маси тіла становив 137 %, що було на 18 % нижче ніж показник у групі тварин з ожирінням. Такі результати узгоджуються з меншим споживанням корму тваринами, що отримували розчин пептидів. Як видно з результатів, наведених у таблиці 5.8, тварини, яким споживали пептиди з *A. colbecki*, з'їдали у середньому  $20,5 \pm 2,2$  г корму за добу, що було на рівні показника, визначеного для тварин контрольної групи. Щури, які перебували на висококалорійній дієті, споживали у середньому  $24,5 \pm 2,4$  г висококалорійного корму.

Порівнявши результати за введення пептидів з *A. colbecki* з аналогічними показниками за ведення щурам пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону (підрозділ 5.2) можемо зробити висновок про дещо нижчу ефективність пептидів з *A. colbecki*. За ідентичних умов експерименту, концентрації та термінів дослідження пептиди колагену спричиняли більш виражений вплив на приріст маси тіла тварин. На відміну від результатів за введення пептидів з *A. colbecki*, тварини, які отримували розчин пептидів колагену, споживали навіть менше корму ніж тварини контрольної групи.

Таким чином, отримані нами результати обґрунтовують доцільність проведення подальших досліджень спрямованих на з'ясування можливих механізмів реалізації виявленого ефекту пептидів з *A. colbecki*.

Згідно новітніх даних оксидативний стрес є одним із провідних патогенетичних механізмів розвитку низки порушень за ожиріння. Підтримання сталого рівня оксидативного стресу на початку розвитку захворювання та у віддалені терміни реалізується через залучення багатьох чинників, серед яких зростання рівня ліпідів та концентрації глюкози, накопичення продуктів глікозилювання, дефіцит мікроелементів та мінералів, гіперпродукція лептину, але всі вони тією чи іншою мірою торкаються жирової тканини. Зростання концентрації глюкози, вільних жирних кислот спричиняє активізацію гліколізу, циклу трикарбонових кислот – за таких умов значно зростає навантаження на електрон-транспортний ланцюг мітохондрій,

що супроводжується гіперпродукцією супероксидних аніон-радикалів у комплексах I та III [4-6]. У роботах [395-397] показано, що глюкоза та пальміат стимулюють продукцію АКМ адипоцитами також за рахунок активації НАДН-оксидази, зокрема, притаманної адипоцитам ізоформи Nox4, внесок якої у зростання рівня АКМ у цих клітинах є навіть вищим, ніж витік АКМ спричинений порушеннями у роботі електрон-транспортного ланцюга мітохондрій.

Варто відмітити, що жирова тканина є не лише джерелом активних кисневих метаболітів, а й виступає мішенню для дії цих радикалів, що в свою чергу викликає подальше наростання продукції активних форм кисню, рівень яких зростає експоненційно із збільшенням маси жирової тканини. Надлишок активних форм кисню через активацію редокс-чутливих сигнальних шляхів, опосередкованих переважно транскрипційним фактором NF- $\kappa$ B, кіназами JNK, p38-MAPK, активує ряд протеїнкіназ (ПКВ, ПКС та ін.), наслідком чого є посилення проліферації і диференціювання преадипоцитів. Є низка робіт, де автори демонструють існування чіткої кореляції між зростанням рівня АКМ у жировій тканині та збільшенням маси цієї тканини [398-401]. Варто відмітити той факт, що АКМ відіграють виключно важливу роль як сигнальні молекули і в центральній нервовій системі. Згідно останніх даних, вільні радикали, впливаючи на гіпоталамус, зокрема на POMC- та NPY/AgRP-нейрони, задіяні в регуляції енергетичного гомеостазу [402-404]. Накопичення АКМ при ожирінні провокує активацію центру голоду та спонукає до надмірного споживання їжі. Опосередкована АКМ індукція експресії MCP-1 – хемоатрактанта для моноцитів і макрофагів – сприяє додатковому залученню цих клітин, що, у свою чергу, сприяє зростанню рівня прозапальних цитокінів [9]. За таких умов формується своєрідне замкнене коло – зростаюча маса жирової тканини підтримує персистуючий оксидативний стрес та низькоінтенсивний запальний процес не лише безпосередньо в самій тканині, а й у кровотоці, сприяючи у такій спосіб генералізації оксидативного стресу та

його розповсюдженню до «віддалених» від жирового депо органів: печінки, скелетних м'язів, підшлункової залози, а за умов тривалого збереження провокує розвиток стану інсулінорезистентності. Надлишок АФК може безпосередньо активізувати ряд серин-треонінових кіназ, зокрема, ПКС, Akt/ПКВ, mTOR, GSK-3 та p38 MAPK. Ці протеїнкінази, діючи синергічно, знижують чутливість клітин до інсуліну шляхом селективного фосфорилування залишків серину та треоніну у молекулах IRS та сприяють формуванню резистентності інсулін-залежних клітин до дії цього гормону.

Активізація прооксидантної ланки за ожиріння відбувається на тлі зниження активності ключових антиоксидантних ферментів та виснаження резерву неферментативних антиоксидантів [405]. За цих умов, засоби, що здатні впливати на антиоксидантний баланс, можуть виявляти певний терапевтичний ефект щодо прогресування спричинених оксидативним стресом порушень за ожиріння.

Враховуючи дані літератури щодо антиоксидантних властивостей, що притаманні багатьом пептидам з морських гідробіонтів, а також результати визначення загальної антиоксидантної активності пептидів з *A. colbecki* (рис. 5.13Б), наступний завданням у рамках цього розділу було дослідити можливий вплив пептидів на стан оксидантно-прооксидантної системи у тварин з моделлю ожиріння. До загальновідомих маркерів, що дозволяють оцінити інтенсивність оксидативного стресу належать продукти вільно радикального окиснення ліпідів – первинні, проміжні та кінцеві. Оскільки саме адипоцити є одним з основних джерел утворення активних кисневих метаболітів за розвитку ожиріння, першочергово було проаналізовано вміст продуктів ПОЛ у жировій тканині тварин з моделлю ожиріння та досліджено чи впливає споживання пептидів з *A. colbecki* на рівень вільно радикальних реакцій. Для цього визначали вміст первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів (ДК), вторинних продуктів ПОЛ – ТБК-активних продуктів та кінцевих продуктів ПОЛ – шиффових основ (ШО). Результати проведених досліджень наведено у

таблиці 5.9. Незважаючи на той факт, що у адипоцитах міститься значна кількість субстратів для перекисного окиснення ліпідів, нами було виявлено зниження вмісту ДК у жировій тканині щурів з моделлю ожиріння. Слід відмітити, що перекисне окиснення ліпідів може відбуватися і без зміни розміщення подвійних зв'язків у молекулах ліпідів, тобто без збільшення вмісту ДК, хоча при цьому і утворюються гідроперекиси. Типовим прикладом є приєднання до олефінів синглетного кисню. В той же час, розпад гідроперекисів супроводжується утворенням вторинних продуктів ПОЛ, у тому числі й МДА, вміст яких оцінюють за рівнем ТБК-активних продуктів. Проте, згідно одержаних результатів, рівень ТБК-активних продуктів у жировій тканині щурів з моделлю ожиріння також був нижчим за значення контролю (табл. 5.9).

Таблиця 5.9

**Вплив пептидів з *A. colbecki* на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у жировій тканині щурів з моделлю ожиріння (M±m, n=6)**

Дослідні групи	Продукти перекисного окиснення ліпідів		
	Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка	ТБК-активні продукти, нмоль/мг білка	Шиффові основи, ум.од/мг білка
Контроль	0,468±0,02	0,674±0,04	160,4±8,17
Ожиріння	0,112±0,005*	0,097±0,005*	165,2±7,56
Ожиріння+гідролізні пептиди з <i>A. colbecki</i>	0,373±0,02*.#	0,183±0,01*.#	119,7±6,45*.#

\* – p < 0,05 різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# – p < 0,05 різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

Одночасне зниження вмісту ДК та ТБК-активних продуктів не дозволяє говорити про гостру стадію оксидативного стресу у жировій тканині тварин з



моделлю ожиріння. Проте, оскільки визначення вмісту продуктів ПОЛ проводили на 10-му тижні розвитку ожиріння, а відповідно до літератури, активізація вільно радикальних процесів відбувається вже в перші тижні розвитку захворювання, можемо припустити, що зниження вмісту первинних та проміжних продуктів ПОЛ за умов нашого дослідження може бути свідченням довготривалого стресу та спричиненого ним виснаженням вмісту ненасичених жирних кислот у складі фосфоліпідів мембран адипоцитів, які є основною мішенню вільних радикалів. До того ж, зниження вмісту ТБК-активних продуктів може бути наслідком їхнього вивільнення з мембран у кровотік. На додачу, МДА здатен швидко метаболізувати перетворюючись, з одного боку, у малонову кислоту і далі до кінцевих продуктів ( $\text{CO}_2$  і  $\text{H}_2\text{O}$ ), а з іншого, взаємодіючи з  $\epsilon$ -аміногрупами лізину білків, утворювати шиффові основи, відносний вміст яких був незначно підвищений у жировій тканині тварин з моделлю ожиріння (табл. 5.9). За будь-яких причин, суттєве відхилення досліджуваних показників від значень контролю є свідченням порушень за умов розвитку патології.

За введення тваринам з моделлю ожиріння розчину пептидів з *A. colbecki* вміст ДК та ТБК-активних продуктів хоча і не наближався до значень у контрольній групі, проте перевищував показники у щурів з моделлю ожиріння – у 3,3 рази у випадку ДК та у 1,9 рази для ТБК-активних продуктів, що є свідченням менш виражених порушень у прооксидантно-антиоксидантній системі за введення пептидів.

Для більш комплексної оцінки загального прооксидантно-антиоксидантного статусу організму у відповідь на введення пептидів з *A. colbecki* було визначено вміст маркерів оксидативного стресу у сироватці крові. Встановлено зростання вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів на 10-му тижні розвитку ожиріння (табл. 5.10), особливо виражене для проміжних та кінцевих продукту ПОЛ – вміст ТБК-активних продуктів зростав у 30,5 рази; вміст Шиффових основ у 4 рази. Значне зростання рівня

продуктів ПОЛ у сироватці крові тварин частково можна пояснити за рахунок їхнього надходження у кровотік з жирової тканини чи інших органів. Такі результати з одного боку, підтверджують системний характер оксидативного стресу, з іншого – свідчать про хронічний перебіг процесу, що є вкрай несприятливим прогностичним маркером. Адже продукти ПОЛ належать до досить агресивних сполук, негативна дія яких є комплексною, реалізується на клітинному та органному рівнях та призводить до суттєвих структурно-функціональних та метаболічних порушень.

Нормалізація вмісту первинних та кінцевих продуктів ПОЛ у сироватці крові тварин з моделлю ожиріння за введення пептидів з *A. colbecki* свідчить про їхню здатність підтримувати загальний прооксидантно-антиоксидантний статус організму на рівні, наближеному до фізіологічного.

Таблиця 5.10

**Вплив пептидів з *A. colbecki* на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові щурів з моделлю ожиріння (M±m, n=6)**

Дослідні групи	Продукти перекисного окиснення ліпідів		
	Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка	ТБК-активні продукти, нмоль/мг білка	Шиффові основи, ум.од/мг білка
Контроль	0,019±0,0009	0,02±0,001	40,3±2,45
Ожиріння	0,036±0,002*	0,61±0,003*	163,7±8,15*
Ожиріння+гідролізні пептиди з <i>A. colbecki</i>	0,019±0,0007#	0,71±0,004*,#	46,2±4,23*,#

\* – p < 0,05 різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# – p < 0,05 різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

Відповідно до сучасних уявлень, активні кисневі метаболіти зумовлюють не лише активізацію процесів пероксидації ліпідів, а й викликають

окиснювальну деструкцію білкових молекул, що виявляється у зростанні рівня окиснювально модифікованих білків, поява яких, зокрема, у сироватці крові вважається значимим маркером виснаження потенціалу антиоксидантної системи захисту організму. Тому для всебічної оцінки здатності пептидів впливати на прооксидантно-антиоксидантний баланс було визначено вміст продуктів окиснювальної модифікації білків, зокрема альдегіддинітрофенілгідрозонів та кетондинітрофенілгідрозонів, які, відповідно, є ранніми та пізніми маркерами окиснювальної деструкції білків. Як бачимо з табл. 5.11, ожиріння супроводжується суттєвим зростанням вмісту обох маркерів, що на тлі результатів визначення рівня продуктів ПОЛ лише підтверджує довготривалість та хронічний перебіг оксидативного стресу за цієї патології.

Таблиця 5.11

**Вплив пептидів з *A. colbecki* на вміст продуктів окиснювальної модифікації білків у сироватці крові щурів з моделлю ожиріння (M±m, n=6)**

Дослідні групи	Продукти окиснювальної модифікації білків	
	Альдегіддинітрофеніл-гідрозони, нмоль/мг білка	Кетондинітрофеніл-гідрозони, нмоль/мг білка
Контроль	0,187±0,009	0,255±0,023
Ожиріння	0,698±0,041*	0,571±0,035*
Ожиріння+пептиди з <i>A. colbecki</i>	0,253±0,012*,#	0,2±0,024*,#

\* – p < 0,05 різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# – p < 0,05 різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

Окиснювально модифіковані білки втрачають притаманну їм біологічну активність, більш того, такі молекули схильні до утворення агрегатів.

Накопичення структурно модифікованих білкових молекул потенційно може спровокувати утворення аутоантитіл та розвиток імунної відповіді, які згідно новітніх досліджень [406] часто виявляються у пацієнтів з ожирінням.

Так, ожиріння пов'язано з вищим ризиком виникнення ревматоїдного артриту, псоріазу, псоріатичного артриту, розсіяного склерозу, тиреоїдиту Хашимото, та може бути фактором індукції запальних уражень кишківника і розвитку цукрового діабету 1 типу. Зростання рівня аутоантитіл – характерної ознаки аутоімунних розладів, було продемонстровано на моделях тварин із ожирінням та у людей [407].

Визначення рівня продуктів окиснювальної модифікації білків у сироватці крові тварин, що отримували розчин пептидів з *A. colbecki*, підтверджує певний нормалізуючий ефект пептидів, виявлений нами і за вмістом інших маркерів оксидативного стресу. Вміст альдегіддинітрофенілгідрозонів був у 2,7 рази нижчим за показник у групі тварин з ожирінням. Щодо кетондинітрофенілгідрозонів, то їхній вміст знаходився у межах контрольних величин. Такі результати корелюють зі зниженням вмісту продуктів ПОЛ у сироватці крові тварин, що одержували розчин пептидів, та є свідченням зниження рівня вільних радикалів, що може бути наслідком покращення функціонування антиоксидантної ланки системи антиоксидантного захисту організму та/чи зниження інтенсивності утворення вільних радикалів у відповідь на введення пептидів з *A. colbecki*.

Згідно з сучасними уявленнями, у клітинах поряд з модифікацією білків за участю кисневих метаболітів, існує так званий неокиснювальний шлях утворення карбонільних похідних, який полягає у модифікації білкової молекули альдегідами. Так, в експериментах було показано, що інкубація білків з деякими альдегідами, у тому числі МДА, концентраційно-залежним чином індукує зростання рівня окиснювально модифікованих білкових молекул. А оскільки введення тваринам з ожирінням розчину пептидів приводило до зниження вмісту продуктів пероксидації ліпідів можемо

припустити, що виявлене нами зниження ступеня окиснювальної модифікації білків частково реалізується через пригнічення неокиснювального шляху утворення карбонільних похідних.

Порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу часто супроводжується змінами вмісту сульфгідрильних груп у білках та пептидах, які зазнають окиснення не лише за дії активних кисневих метаболітів, а й у відповідь на дію гідроперекисів ліпідів. Визначення вмісту SH-груп є ще одним тестом щодо оцінки загального редокс-статусу організму та, у випадку його істотного порушення, дозволяє зробити висновок про інтенсивність оксидативного стресу.

Результати визначення сульфгідрильних груп за розвитку ожиріння цілком узгоджуються з встановленими порушеннями прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та відображають зміщення редокс-балансу у бік домінування прооксидантних реакцій. Так, у сироватці крові тварин з моделлю ожиріння вміст загальних, білкових та небілкових SH-груп був нижчим у 1,28, 1,23 та 1,3 рази у порівнянні з результатами у контрольній групі (табл. 5.12).

Слід зазначити, що окрім, власне, безпосереднього окиснення SH-груп вільними радикалами, виявлене нами зниження вмісту небілкових SH-груп частково може бути пов'язано із залученням глутатіону – основного SH-вмісного трипептиду у реакції S-глутатіонілювання та утворення змішаних дисульфідів з тіоловими групами білків, що забезпечує захист функціональних SH-груп білків від пошкоджуючої дії АФК та їх незворотного окиснення. За введення піддослідним тваринам розчину пептидів вміст загальних та небілкових сульфгідрильних груп у сироватці крові тварин був навіть вище ніж показники у контрольній групі – у 1,18 рази та 3,1 рази, відповідно. Зростання рівня небілкових сульфгідрильних груп за умов введення розчину пептидів, частково може бути спричинене нормалізацією інтенсивності вільно радикальних процесів, а відтак зниженням залучення глутатіону у реакції утворення змішаних дисульфідів.

Таблиця 5.12

**Вплив пептидів з *A. colbecki* на вміст сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів з моделлю ожиріння (M±m, n=6)**

Дослідні групи	Загальні SH-групи, мкмоль/мг білка	Білок-зв'язані SH-групи, мкмоль/мг білка	Не білкові SH-групи, мкмоль/мг білка
Контроль	0,64±0,03	0,43±0,02	0,21±0,01
Ожиріння	0,52±0,03*	0,33±0,01*	0,17±0,007*
Ожиріння+гідролізні пептиди з <i>A. colbecki</i>	0,76±0,03* <sup>#</sup>	0,11±0,006* <sup>#</sup>	0,66±0,04* <sup>#</sup>

\* – p < 0,05 різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# – p < 0,05 різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

Як відомо, контроль та регуляція перебігу вільно радикальних процесів здійснюється за участі складної багатокомпонентної та багаторівневої системи антиоксидантного захисту, яка включає неферментативну та ферментативну ланки. Складові неферментативної ланки виконують переважно функцію швидкої інактивації вільних радикалів кисню і азоту, у той час як ферментативна ланка належить до термінальних систем довготривалого захисту організму від дії активних кисневих метаболітів. З-поміж причин збереження сталого оксидативного стресу, зокрема не на початку розвитку захворювання, коли оксидативний стрес слугує пусковим механізмом наростання патологічних змін, а у динаміці захворювання, може бути зниження активності антиоксидантних ферментів. Враховуючи провідну роль супероксиддисмутази (СОД) та каталази, а також суттєвий внесок супероксидних аніон-радикалів та перекису водню в індукцію і розвиток оксидативного стресу надалі було досліджено чи впливає введення пептидів з *A. colbecki* на активність обох ферментів у тварин з моделлю ожиріння.

Нами встановлено незначне зниження активності СОД (у 1,36 рази) та каталази (у 1,28 рази) у тварин з ожирінням (рис. 5.26), що є проявом певного виснаження антиоксидантної системи захисту внаслідок поступового ушкодження її компонентів вільними радикалами та продуктами пероксидації ліпідів.

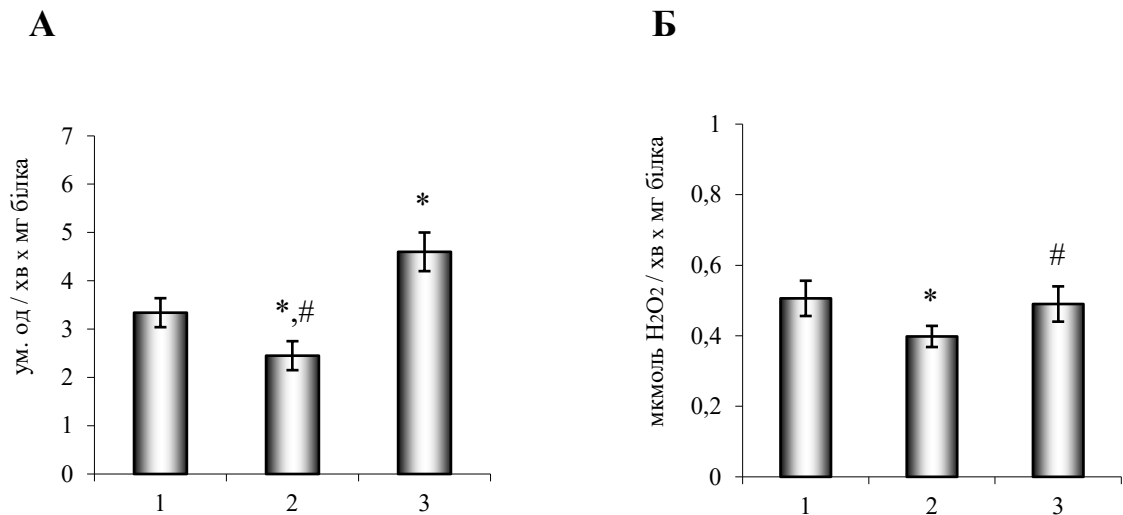


Рис. 5.26 Супероксиддисмутаза (А) та каталазна (Б) активність у сироватці крові щурів з моделлю ожиріння та тварин, що споживали розчин пептидів з *A. colbecki* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ): 1 – контроль, 2 – група тварин з моделлю ожиріння, 3 – група тварин, які споживали розчин пептидів

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

У цілому, літературні дані щодо активності цих ферментів за ожиріння досить неоднозначні – так, деякі автори відмічають значне пригнічення активності обох ферментів [408], у той час як інші, навпаки, говорять про активізацію СОД та каталази [409, 410].

Така різнонаправленість змін може бути обумовлена різними термінами на яких проводилися дослідження, зокрема, зростання активності

антиоксидантних ферментів більш характерне для початкових етапів розвитку патології, тоді як пригнічення їхньої активності може бути свідченням виснаження потенціалу ферментативної ланки АОС з часом. За введення тваринам з моделлю ожиріння розчину пептидів з *A. colbecki* спостерігалась нормалізація каталазної активності та зростання активності СОД вище значень контролю.

Виявлений нами ефект пептидів з *A. colbecki* узгоджуються з даними, представленими у літературі, де показано зростання активності супероксиддисмутази, каталази та глутатіон-пероксидази на тлі введення пептидів, отриманих шляхом гідролізу білоквмісних відходів промисловості [411, 412]. Хоча результати нашої роботи не дозволяють однозначно говорити про конкретні механізми через які реалізується вплив пептидів на антиоксидантний гомеостаз, можемо висунути декілька припущень для пояснення виявлених нами ефектів пептидів з *A. colbecki*. Так, нормалізація прооксидантно-антиоксидантного статусу за введення пептидів частково може бути пов'язана з їхньою здатністю безпосередньо обривати ланцюги вільно радикальних реакцій. Пептиди, одержані з тканин морських гідробіонтів, виявляють значний антиоксидантний потенціал, що підтверджується низкою робіт. Такий ефект пептидів пов'язаний з їх здатністю уловлювати вільні радикали, хелатувати ряд прооксидантних металів. Є публікації, де показано антиоксидантні властивості пептидів на рівні  $\alpha$ -токоферолу [413].

Антиоксидантний потенціал пептидів у першу чергу визначається вмістом та порядком розташування в молекулі певних амінокислотних залишків. Встановлено, що такі амінокислоти як гістидин, лейцин, тирозин, метіонін, цистеїн підвищують антиоксидантну активність пептидів за рахунок передачі атома водню або передачі електрону з молекули пептиду на вільний радикал [387, 414]. Саме за подібним механізмом реалізують свій вплив ряд пептидів, виділених з різних морських організмів. Разом з тим, антиоксидантні



ефекти більшості сполук реалізуються за змішаним типом – послідовне донатування електрону з депротонуванням або послідовне депротонування з донатуванням електрону. Антиоксидантний потенціал пептидів корелює з наявністю у молекулі пептиду гідрофобних амінокислот, оскільки гідрофобні пероксидні радикали, що утворюються під час окиснення, наприклад, ненасичених жирних кислот, зокрема лінолевої кислоти, нейтралізуються за участі гідрофобних амінокислот.

Певний антиоксидантний потенціал пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону було виявлено і в рамках представленої роботи – відповідна інформація наведена у розділі 3.3. У цьому контексті також варто згадати, що розчин пептидів з гідробіонту *A. colbecki*, який використовували для корекції розвитку ожиріння у щурів, містив молекули з антиоксидантними властивостями, про що свідчать результати визначення загальної антиоксидантної активності наведеної на початку розділу (рис. 4.13Б).

Літературні дані щодо участі АФК в деструкції білків дозволяють припустити, що нормалізація активності антиоксидантних ферментів за введення тваринам з моделлю ожиріння розчину пептидів з *A. colbecki*, може бути наслідком зниження рівня окиснювальної модифікації молекул ферментів. Цей фактор особливо вагомий у випадку металовмісних ферментів, адже пошкодуючі білок активні кисневі метаболіти можуть утворюватися безпосередньо в активному центрі ферменту. При цьому безпосереднім агентом, інактивуючим фермент, виступає гідроксильний радикал  $\text{OH}^-$ , що утворюється у реакціях Фентона і Хабер-Вайса з перекису водню за умови надлишку супероксиду. Крім того, є дані, що надмірне утворення продуктів пероксидації ліпідів також чинить вплив на функціональну активність антиоксидантних ферментів – МДА може спричиняти модифікацію бічних ланцюгів амінокислот та окиснення тіолових груп ферментів, що призводить до часткової чи повної втрати активності та функцій [415]. Отже, зниження рівня вільних радикалів та продуктів пероксидації ліпідів у відповідь на

введення пептидів знижує ймовірність порушення структурно-функціональних властивостей ферментів.

Нормалізуючий ефект пептидів на загальний антиоксидантний статус організму також може реалізуватися через їхню здатність впливати на експресію генів антиоксидантних ферментів, рівень яких знижений за розвитку ожиріння [416, 417]. Механізм впливу включає декілька шляхів, серед яких активація Nrf2-ARE-опосередкованого транскрипційного шляху, що відіграє виключно важливу роль у контролі експресії генів супероксиддисмутази та глутатіон-синтетази, а також вплив на експресію транскрипційного фактору DAF-16/FOXO-SOD-3 [418, 419].

Таким чином, виявлене нами зниження вмісту ранніх та пізніх маркерів оксидативного стресу, а також нормалізація активності ключових антиоксидантних ферментів у сироватці крові тварин з моделлю ожиріння, що отримували розчин пептидів з *A. colbecki*, свідчить про підтримання належної внутрішньоклітинної редокс-сигналізації та резерву антиоксидатної системи на рівні, необхідному для контролю інтенсивності вільно радикальних процесів та зниження ступеню пошкодження макромолекул у порівнянні з тваринами з моделлю ожиріння.

Згідно існуючої на сьогодні парадигми кишківник розглядається як складна та метаболічно активна система. Виробляючи близько 100 біоактивних пептидів і експресуючи понад 30 генів, що кодують гормони, задіяні у регуляції апетиту та енергетичних потреб організму [420], кишківник є невід'ємною складовою складної мережі контролю та регуляції метаболізму. Кишкові гормони диференційовано секретуються ентероендокринними клітинами у відповідь на коливання вмісту поживних речовин, створюючи секреторний профіль натщесерце та після їжі [421]. Разом із пептидами, що секретуються жировою тканиною, гормони кишківника мають вирішальне значення для гомеостатичного контролю маси тіла шляхом регулювання споживання їжі та витрат енергії [422]. Ці гормони опосередковують свої

ефекти безпосередньо, впливаючи на ділянки мозку, де відсутній гематоенцефалічний бар'єр, або опосередковано, стимулюючи вагусні аферентні нейрони [423].

З-поміж гормонів, зміни рівня яких не лише безпосередньо корелюють зі стадією розвитку ожирінням, а й відповідно до сучасних уявлень можуть бути серед першопричин виникнення цієї хвороби, виділяють серотонін [423, 424]. Саме цей гормон бере участь у регуляції харчової поведінки, зокрема, апетиту і відчуття насиченості [425]. Основними органами-продуцентами серотоніну у ссавців є головний мозок та кишківник. Так як серотонін не проникає через гематоенцефалічний бар'єр, система синтезу серотоніну поділена на центральну та периферичну, які певною мірою функціонують окремо одна від одної. Серотонін, асоційований з центральною нервовою системою, задіяний переважно у регуляції емоційної і харчової поведінки і на нього припадає лише 5 % загального вмісту серотоніну в організмі, тоді як решта 95 % є периферійним серотоніном, що синтезується ентерохромафінними клітинами гастроінтестинального тракту.

При ожирінні мають місце порушення на рівні обох серотонінергічних систем – спостерігається недостатність центральної серотонінергічної системи (знижується швидкість синтезу серотоніну на тлі посилення його зв'язування з рецепторами 5-ГТ1А, 5-ГТ1В, 5-ГТ2А та підвищення ефективності його зворотного захоплення). Це веде до зміни харчової поведінки й спонукає до споживання їжі, виходячи не стільки з потреб основного обміну, а через необхідність стимулювати серотонінергічну систему.

Отже, беручи до уваги концепцію активного залучення кишківника у регуляцію і підтримання енергетичного гомеостазу, а також дані, представлені у літературі щодо впливу пептидів з гідробіонтів на секрецію кишківником низки гормонів [426] і наші власні результати про зниження споживання корму тваринами з моделлю ожиріння, що отримували розчин пептидів з *A. colbecki*, наступний фрагмент роботи було присвячено дослідженню

потенційного впливу пептидів з гідробіонту *A. colbecki* на окремі показники, що характеризують стан периферійної серотонінергічної системи. Для цього було визначено вміст сироваткового серотоніну, основного попередника його синтезу триптофану та визначено активність моноамінооксидази – ферменту, що забезпечує деградацію серотоніну.

Подібні дослідження є особливо доцільними саме в умовах нашого експерименту, адже умови надходження пептидів в організм тварин передбачають їх надходження в шлунково-кишковий тракт, а тому можемо припустити, що первинною мішенню дії біологічно-активних пептидів, що потенційно можуть бути серед суміші досліджуваних пептидів, є саме клітини кишківника.

В результаті проведених досліджень (рис. 5.27) було виявлено підвищення концентрації серотоніну (у 1,6 рази) та триптофану (у 1,3 рази) у сироватці крові щурів з моделлю ожиріння, що повністю узгоджуються з даними літератури щодо рівня сироваткового серотоніну за розвитку ожиріння.

Зростання вмісту периферичного серотоніну може бути однією з причин, що ускладнюють патогенез даного захворювання та сприяють розвитку низки супутніх розладів, зокрема, на рівні серцево-судинної системи. У групі тварин з ожирінням, яким вводили розчин пептидів з *A. colbecki* концентрація серотоніну була у 1,5 рази нижчою за показник у щурів з моделлю ожиріння. Такі результати є досить перспективними з позицій можливого застосування пептидів з *A. colbecki* як основи для створення функціональних продуктів харчування або, у випадку очищення та виділення з-поміж суміші пептидів молекул, що виявляють вплив на функціонування периферійної серотонінергічної системи, створення препаратів для корекції порушень за ожиріння.

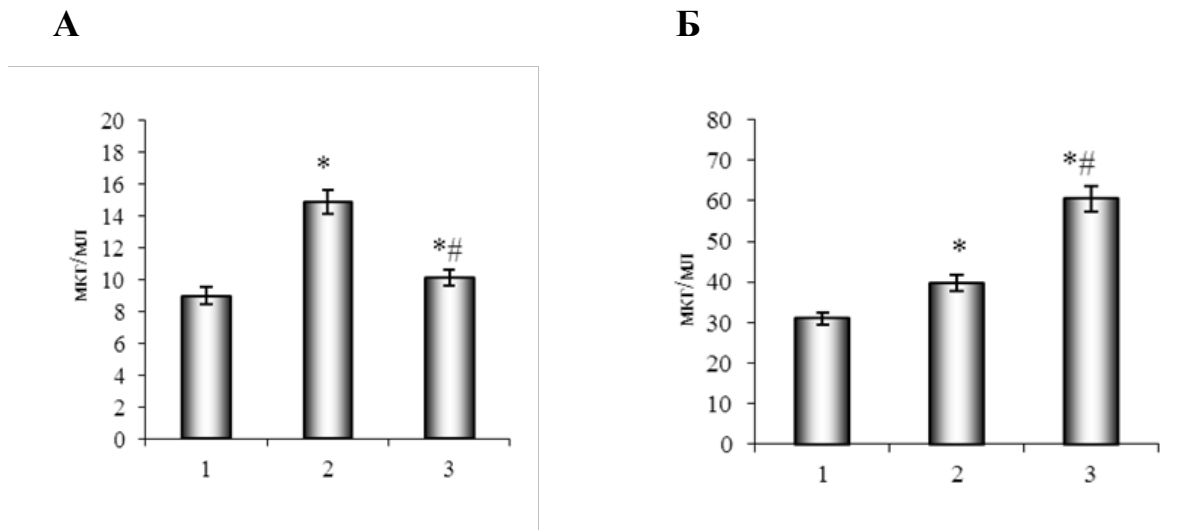


Рис. 5.27 Концентрація серотоніну (А) та триптофану (Б) у сироватці крові щурів з моделлю ожиріння та тварин, що споживали розчин пептидів з *A. colbecki* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ): 1 – контроль, 2 – група тварин з моделлю ожиріння, 3 – група тварин, що споживали розчин пептидів

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

Аналіз сучасної літератури з проблематики лікування ожиріння показав значний інтерес дослідників до розробки препаратів, які впливаючи на рівень серотоніну здатні попереджувати розвиток ожиріння [427]. Як вже неодноразово зазначалося, розвиток ожиріння супроводжується надмірною акумуляцією жирової тканини, зокрема білої, основною функцією якої є збереження енергії у вигляді тригліцеридів. З іншого боку, бура жирова тканина, що збагачена на мітохондрії, є одним з основних місць термогенезу, посилення якого відбувається після зв'язуванням адреналіну з  $\beta 3$ -адренорецепторами на поверхні адипоцитів. Постійний термогенез залучає надлишок вільних жирних кислот та глюкозу з периферичних тканин для окиснення у бурій жировій тканині, у той час як високі концентрації периферичного серотоніну пригнічують  $\beta$ -адренергічну індукцію

термогенезу, що, відповідно, призводить до зростання частки білої жирової тканини, а відтак розвитку ожиріння та супутньої інсулінорезистентності [428].

Низкою робіт [429] доведено, що зниження рівня циркулюючого серотоніну внаслідок інгібування активності триптофан-гідроксилази або делеції гена цього ферменту підвищує чутливість адипоцитів бурої жирової тканини до норадреналінової сигналізації, наслідком чого є посилення термогенезу.

Варто відмітити, що концентрація триптофану у сироватці крові тварин, що одержували розчин пептидів, майже вдвічі перевищувала контрольний показник. Зростання концентрації триптофану частково можна пояснити за рахунок надходження до організму цієї амінокислоти у складі пептидів. Зниження концентрації серотоніну на тлі значного зростання концентрації основного попередника його синтезу – триптофану – опосередковано вказує на порушення механізмів його синтезу за введення пептидів з *A. colbecki*. Можливо, це відбувається внаслідок інгібуючого впливу пептидів на активність триптофан-гідроксилази 1 чи реалізується за рахунок вже згаданої здатності пептидів впливати на рівень експресії певних генів.

Також було визначено активність моноаміноксидази А (МАО-А) – ферменту, що каталізує окисне дезамінування серотоніну з утворенням 5-гідроксиіндолальдегіду, у сироватці крові тварин з моделлю ожиріння та тварин, що отримували розчин пептидів з *A. colbecki*. Відповідно до одержаних результатів (рис. 5.28), моноаміноксидазна активність була підвищеною у щурів з ожирінням та залишалася у межах контрольних величин у тварин, яким вводили розчин пептидів. Отже, зниження концентрації периферійного серотоніну за введення пептидів з *A. colbecki* не пов'язано з активацією основного шляху катаболізму серотоніну.

Слід зазначити, що активація моноаміноксидази може бути додатковим чинником, який сприяє посиленню оксидативного стресу за розвитку

ожиріння, адже функціонування цього ферменту супроводжується утворенням активних кисневих метаболітів, у той час як зниження моноамінооксидазної активності у відповідь на введення пептидів частково сприятиме зниженню ступеню оксидативного стресу у сироватці крові.

У цілому, беручи до уваги дані щодо участі серотоніну у регуляції енергетичного балансу організму, нижчий приріст маси тіла та показник індексу маси тіла у тварин, що одержували розчин пептидів, у порівнянні з групою тварин з ожирінням, частково може бути пов'язаний з нормалізацією функціонування серотонінергічної системи.

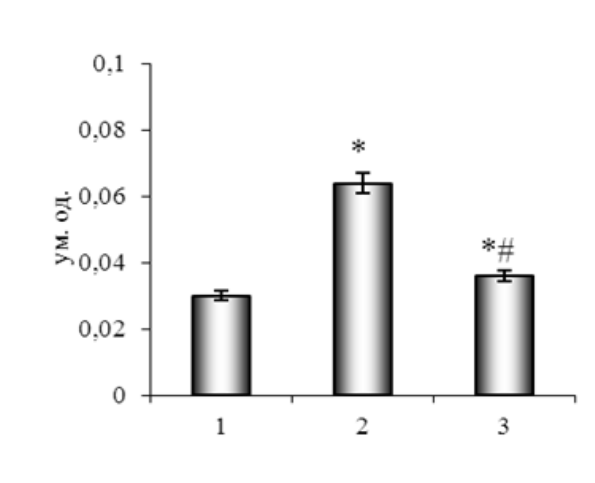


Рис. 5.28 Моноамінооксидазна активність у сироватці крові щурів з моделлю ожиріння та тварин, що споживали розчин пептидів з *A. colbecki* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ): 1 – контроль, 2 – група тварин з моделлю ожиріння, 3 – група тварин, що споживали розчин пептидів

\* –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з контрольною групою;

# –  $p < 0,05$  різниця значуща у порівнянні з групою тварин з моделлю ожиріння

Ще одним показником, що доводить позитивний ефект пептидів, одержаних шляхом ферментативного гідролізу білків тканин *A. colbecki*, на розвиток ожиріння, є нормалізація якісно-кількісного складу пептидного пулу

плазми крові тварин, що отримували розчин пептидів. Незважаючи на відносну стабільність і незмінність складу пептидних пулів органів і, зокрема, плазми крові, розвиток низки захворювань, внаслідок активації катаболічних реакцій, порушення механізмів транспортування та елімінації проміжних і кінцевих продуктів патологічно зміненого метаболізму призводить до зміни якісних і кількісних характеристик пептидних пулів, що розглядається як прояв суттєвого виснаження адаптаційного резерву організму. Оцінка пептидного пулу плазми крові дозволяє зробити висновок про метаболічний статус організму, оскільки є інтегральним параметром, який безпосередньо залежить від біохімічного статусу клітин і фізіологічного стану організму. Аналіз хроматографічних профілів пептидних пулів, одержаних з плазми крові контрольних тварин та тварин з ожирінням, показав певні відмінності, зокрема, різну висоту піків, що свідчить про зростання частки пептидів відповідної молекулярної маси (рис. 5.29).

Також було виявлено додатковий пік, що відповідає частці низькомолекулярних пептидів. Хроматографічний профіль пептидного пулу плазми крові тварин, які перебували на висококалорійній дієті та отримували розчин пептидів з *A. colbecki*, був подібним до контролю, при цьому додаткового піку виявлено не було.

Оскільки у дослідженні ми використовували суміш пептидів, найбільш вірогідним видається припущення, що вплив пептидів на розвиток ожиріння відбувається із залученням різних механізмів, що притаманні окремим пептидам у складі загальної фракції. Покращення загального метаболічного статусу у тварин з моделлю ожиріння, що отримували пептиди з *A. colbecki*, є наслідком такого комплексного синергічного впливу окремих пептидів. Так, як в умовах нашого експерименту, тварини споживали пептиди як розчин, найімовірніше, що реалізація біологічних ефектів пептидів відбувається перш за все на рівні шлунково-кишкового тракту.



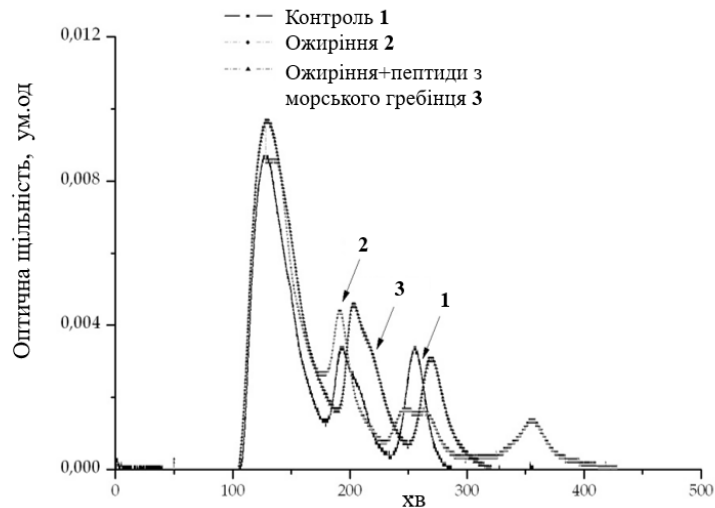


Рис. 5.29 Хроматографічний профіль пептидних пулів, одержаних з плазми крові щурів з моделлю ожиріння та тварин, що споживали розчин пептидів з *A. colbecki* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Не виключено, що певна кількість ди- та трипептидів може надходити безпосередньо у кровотік уникаючи транспортування до ентероцитів і далі до печінки, проте частка цих молекул є наскільки незначною, що її внесок у виявлене нами покращення антиоксидантного статусу у сироватці крові тварин можна не брати до уваги.

Разом з тим, зниження потягу до їжі у тварин, що отримували розчин пептидів, та, відповідно, менший приріст маси тіла, може свідчити про анорексогенний ефект пептидів, пов'язаний з присутністю у складі пептидної суміші молекул, що структурно подібні до кишкових гормонів, відповідальних за регуляцію апетиту (гастрину, греліну, холіцистокініну, глюкагон-подібного пептиду1) або молекул, що здатні стимулювати секрецію, наприклад, холіцистокініну STC-1 клітинами кишківника. Таке припущення ґрунтується на описаній у літературі здатності білкових гідролізатів впливати на вивільнення пептидних гормонів кишківника, у тому числі і холіцистокініну.

Варто зазначити, що вплив пептидів не обмежується локальною дією на клітини кишківника. Через складну сигнальну мережу, яка поєднує як нервові,

так і гормональні сигнали, формується своєрідна вісь двох направленої взаємодії між ЦНС та кишківником. Тому, впливаючи на рівень кишкових пептидних гормонів або імітуючи їхню дію через структурну подібність, пептиди з *A. colbecki* можуть опосередковано впливати на активність відповідних нейронів у головному мозку обумовлюючи у такий спосіб зміни харчової поведінки.

Обговорюючи можливі механізми ефектів пептидів з *A. colbecki* на розвиток ожиріння у щурів не можна не згадати новітні літературні дані щодо вагової ролі кишкової мікробіоти у контролі енергетичного гомеостазу хазяїна, а відтак, опосередковано, і кількості жирової тканини [430, 431]. Саме тому на сьогодні, у практиці лікування ожиріння значної популярності набувають терапевтичні підходи, що включають модуляцію мікробіоти кишківника. Так, наприклад, є дані, що препарат «Темпол» впливає на зниження приросту маси тіла тварин саме за рахунок зменшення представництва *Lactobacillus* [432]; один з механізмів дії екстракту журавлини [433] на розвиток ожиріння, індукованого високо калорійної дієтою, полягає у збільшенні частки бактерій *Akkermansia muciniphila*. Останніми роками отримано докази, що мікробіом у хворих на ожиріння відрізняється від такого у здорових осіб за своїм складом та функціональною активністю і ці зміни є частиною патогенетичних механізмів індукції та розвитку порушень за ожиріння. Так, певні види молочнокислих і пропіоновокислих бактерій можуть синтезувати серотонін [434]; деякі продукти метаболізму мікроорганізмів, зокрема бутират, пропіонат, ацетат здатні впливати на секрецію пептидних гормонів [435-437], що за умови порушення балансу кишкової мікробіоти може спричинити дисбаланс факторів, які задіяні у регуляції апетиту. У світлі сучасних уявлень про залученість кишкової мікробіоти у регуляцію метаболічних реакцій за фізіологічних умов і, що особливо цікаво, за патологічних процесів [438], не виключеним є вплив пептидів з *A. colbecki* на метаболічну функцію та/чи представництво окремих

штамів мікроорганізмів. Відповідно до результатів, описаних у роботі [439], пероральне введення синтетичного пептиду D3 обумовлювало відновлення кишкової мікробіоти у тварин з ожирінням, у тому числі зростання кількості метаболічно сприятливих бактерій.

Крім того, пептиди, діючи локально у шлунково-кишковому тракті, можуть впливати на інтенсивність оксидативного стресу та запального процесу безпосередньо у кишківнику – порушень, які згідно останніх досліджень є типовими для патогенезу ожиріння, спричиненого дієтою з високим вмістом жирів [440, 441].

Підсумовуючи результати, отримані у ході виконання представленого етапу роботи, можемо констатувати певний терапевтичний потенціал пептидів з *A. colbecki*, зокрема, їхній вплив на розвиток ожиріння, індукованого споживанням висококалорійної їжі, що підтверджується нижчим значенням індексу маси тіла, приросту маси тіла і корелює зі зниженням потягу тварин до споживання корму. Відповідно до отриманих даних, зазначений ефект пептидів реалізується через нормалізацію прооксидантно-антиоксидантного балансу та впливу на функціонування периферійної серотонінергічної системи – факторів, що не лише відіграють тригерну роль в індукції ускладнень за ожиріння, а й згідно новітніх уявлень входять до когорти пускових механізмів виникнення ожиріння. Комплексний ефект пептидів обґрунтовує доцільність включення суміші пептидів з *A. colbecki* до складу функціональних харчових продуктів чи створення на їхній основі засобів направленої корекції метаболічних зрушень, що асоційовані з оксидативним стресом та порушенням енергетичного гомеостазу.

Публікації, що висвітлюють результати автора, наведені у розділі 5:

1. Kalmukova O, **Raksha N**, Vovk N, Halenova T, DzerzhynskyM, Mitrecic D, Savchuk O, Ostapchenko L. Low Molecular Mass Fragments of Collagen Improve

Parameters Related to Mass and Inflammation of the Adipose Tissue in the Obese Rat. *Food Technology and Biotechnology*. 2023;61(1):51-63. DOI:10.17113/ftb.61.01.23.7926 (Scopus, **Q2**), (здобувачем отримано низькомолекулярні фрагменти колагену з луски риб Антарктичного регіону та оцінено вплив їх вплив на індекс маси тіла тварин)

2. **Raksha N**, Halenova T, Vovk T, Kostyuk O, Synelnyk T, Andriichuk T, Maievska T, Savchuk O, Ostapchenko L. Anti-obesity effect of collagen peptides obtained from *Diplulmaris antarctica*, a jellyfish of the Antarctic region. *Croatian Medical Journal*. 2023;64(1):21-28. DOI:10.3325/cmj.2023.64.21 (Scopus, **Q3**) (здобувачем отримано колагенові пептиди з медузи, оцінено їх вплив на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та на показники, що характерні для стану інсулінорезистентності, інтерпретовано результати та підготовлено публікацію до друку)

3. **Raksha N**, Kalmukova O, Vovk T, Halenova T, Dzerzhynsky M, Savchuk O, Ostapchenko L. Effects of peptides derived from the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* on obese rats' adipose tissue histophysiology. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*. 2021;13(4):24-34. DOI:10.34302/crpjfst/2021.13.4.3 (Scopus) (здобувачем отримано фракцію гідролізних пептидів, оцінено вплив пептидів на показники, що асоційовані з розвитком ожиріння)

4. **Raksha N**, Halenova T, Vovk T, Savchuk O, Tomchuk V, Maievska T, Ostapchenko L. Biologically active peptides derived from the Antarctic hydrobionts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2021;11(08):126-133. DOI:10.7324/JAPS.2021.110817 (Scopus, **Q2**) (здобувачем отримано фракцію ендогенних пептидів з гідробіонтів *Nacella concinna*, *Euphausia superba*, *Diplulmaris antarctica*, оцінено їх антиоксидантний потенціал, досліджено вплив на функціональну активність тромбіну та здатність фібриногену до полімеризації, інтерпретовано результати, підготовлено публікацію до друку)

5. **Ракша Н**, Маєвська Т, Савчук О. Одержання пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка Біологія. 2021;1(84):38-43. *(здобувачем оптимізовано метод отримання ендogenous пептидів з молекулярною масою нижче 5 кДа, підготовлено публікацію до друку)*

6. **Raksha N**, Potalitsyn P, Yurchenko A, Halenova T, Savchuk O, Ostapchenko L. Prevention of diet-induced obesity in rats by oral application of collagen fragments. Archives of Biological Sciences. 2018;70(1):77-86. [doi.org/10.2298/ABS170401027R](https://doi.org/10.2298/ABS170401027R) (Scopus, **Q3**) *(здобувачем оптимізовано методику отримання колагену з луски риб Антарктичного регіону, отримано низькомолекулярні фрагменти колагену, оцінено показники, що характеризують антиоксидантно-прооксидантний баланс, досліджено цитокіновий профіль плазми крові та підготовлено публікацію до друку)*

7. Нагірняк ОЮ, **Ракша НГ**, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Вплив низькомолекулярних фрагментів колагену, одержаних з луски риб Антарктичного регіону, на розвиток ожиріння. Український антарктичний журнал. 2016;15:128-136. *(здобувачем сформульовано концепцію дослідження, оптимізовано методику отримання колагену з луски риб Антарктичного регіону, отримано низькомолекулярні фрагменти колагену, інтерпретовано результати щодо впливу фрагментів колагену на динаміку розвитку ожиріння та підготовлено публікацію до друку)*

8. **Raksha N**, Halenova T, Vovk T, Yurchenko A, Nikolaiava I, Savchuk O, Ostapchenko L. Prevention of diet-induced obesity in rats by administration of peptides derived from marine hydrobiont. In Advances in health and disease Vol. 11, 2019, Nova Science Publishers, Inc. New York, 165-199. *(здобувачем отримано фракцію гідролізних пептидів, досліджено стан антиоксидантно-прооксидантної системи та периферійної серотонінергічної системи, узагальнено результати, підготовлено публікацію до друку)*

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Сучасний етап розвитку науково-технологічного прогресу, зокрема, в галузі біотехнології, характеризується низкою проблем та задач, вирішення яких передбачає залучення передового досвіду та консолідацію зусиль академічної науки і представників промислово-виробничого сектору.

Значні темпи та обсяги використання біологічної сировини для одержання широкого спектру засобів та препаратів обумовлюють поступове виснаження цього ресурсу, що, відповідно, сповільнює темпи розвитку певних секторів промисловості. З іншого боку, потреба у такій сировині не встигає задовольняти потреби зростаючих виробництв, що виводить проблему дефіциту сировини в ранг першочергових за своєю актуальністю та впливом на темпи розвитку промислового сектору. Проблема «жаги» сировини особливо гостро проявляється в області створення ефективних фармакологічних препаратів на основі біологічно активних речовин природного походження серед яких досить поширеними є засоби на основі молекул, очищених з тваринних об'єктів.

На сьогодні використання сировини тваринного походження ускладнюється низкою факторів, з-поміж яких високі споживчі ризики пов'язані з існуючою загрозою зараження тварин коров'ячим сказом, ящуром, пташиним чи свинячим грипом, спалахи яких є регулярними і передбачають повне вилучення джерел такої сировини. Окрім того, сировина тваринного походження може бути контамінована пріонами, інфекційними агентами, проонкогенами та іншими потенційно-небезпечними для здоров'я речовинами, що потребує включення в технологічні процеси додаткових стадій очищення і контролю чистоти продукції на всіх етапах виробничого процесу та негативно впливає на собівартість кінцевої продукції.

Слід зазначити, що частковий відхід від сировини тваринного походження, зокрема, органів та тканин ссавців, як джерела для одержання

природних молекул, певною мірою обумовлений значною кількістю споживачів для яких застосування в повсякденному житті засобів на основі молекул, одержаних з тканин теплокровних тварин, є неприйнятним через релігійні, морально-етичні переконання та/або спосіб життя. А відтак зростає потреба у розробленні продукції аналогічного спектру дії, де активною складовою є молекули, одержані не з тканин ссавців. Незважаючи на значні досягнення в області рекомбінантних технологій, застосування цих методів для створення молекул із заданими властивостями часто є економічно невиправданим з огляду на значну вартість кінцевого продукту, з цих позицій більш виправданим є пошук та використання альтернативних природних молекул, властивості яких відповідають запитам дослідників. Ці всі чинники на тлі споживчого буму на ринку білкових інноваційних продуктів актуалізують пошук альтернативних джерел сировини, а також обґрунтовують необхідність оптимізації підходів щодо швидкого скринінгу, очищення та характеристики цільових молекул.

Говорячи про нагальні проблеми пов'язані з використанням сировини та інтенсифікацією виробництва не можна не згадати про той факт, що в процесі переробки частина сировини відкидається як побічні відходи, що не дозволяє досягти повного економічного ефекту від переробки та призводить до накопичення відходів і забруднення навколишнього середовища. Проблема зменшення кількості відходів потребує переосмислення традиційних підходів щодо використання сировини та має вирішуватися через впровадження комплексних маловідходних технологій глибокої переробки біологічної сировини з максимальним використанням цінних компонентів вилучених на всіх етапах процесу.

Отже, проблема пошуку альтернативних джерел сировини для одержання природних молекул, а також розроблення технологій, що сприятимуть максимально повному використанню вихідної сировини чи включенню в технологічний цикл відходів, отриманих в інших галузях промисловості, без

перебільшення є однією з вагомих задач сьогодення в тому числі й біотехнології.

У дисертаційній роботі пропонується підхід щодо часткового вирішення окреслених вище проблем, зокрема, обґрунтовується перспективність використання гідробіонтів як можливого альтернативного джерела молекул для створення інноваційних біотехнологічних продуктів різного спектру дії.

Використання гідробіонтів як сировинного ресурсу є економічно рентабельним з огляду на їх розповсюдженість, видове розмаїття, чисельність і швидкі темпи відтворюваності, а також нижчі ризики контамінації вихідної сировини збудниками, що типові для матеріалу з теплокровних тварин. Увага до гідробіонтів саме Антарктичного регіону продиктована унікальністю природних умов регіону, що обумовлює певні структурно-функціональні характеристики молекул, одержаних з цих гідробіонтів, які можуть бути перспективними з позицій їх використання в медицині чи впровадження у промисловість. Крім того, біотехнологічний потенціал гідробіонтів Антарктичного регіону вивчений не достатньо, що відкриває перспективи пошуку молекул з потенційно привабливими властивостями. Окрім практичного інтересу, проведення всебічних досліджень біологічних ресурсів Антарктиди відповідає політиці держави, адже Україна досить потужно представлена на антарктичному науковому полі.

У своїй роботі як один з можливих шляхів для вирішення проблеми дефіциту сировини та максимально ефективної експлуатації доступних біологічних ресурсів ми пропонуємо використовувати види гідробіонтів, що не мають безпосередньої промислової цінності, а деякі взагалі належать до потенційно інвазивних видів. Чисельність таких видів, їх загальна кількість у перерахунку на масу сировини, а також легкість вилову дозволяють розглядати малоцінні види гідробіонтів Антарктичного регіону як вагомий ресурс для одержання біологічно активних сполук різної природи. Увага до малоцінних видів гідробіонтів обумовлена ще й тим фактом, що під час вилову



риби тралом у сітки часто потрапляють види, що не становлять комерційної цінності або придонні види, викид яких назад у океан заборонений згідно міжнародної директиви 2013 року, а відтак проблема утилізації такої сировини існує.

Отже, стабільно зростаючий попит на препарати, створені на основі природних молекул, у тому числі білкових та пептидних, певні складнощі з використанням традиційних джерел сировини, а також відсутність комплексних фундаментальних досліджень щодо впливу окремих білкових чи пептидних молекул з гідробіонтів Антарктичного регіону на перебіг біохімічних процесів в організмі людини та тварин свідчать про актуальність та доцільність досліджень, спрямованих на скринінг та одержання молекул білкової природи з гідробіонтів Антарктичного регіону.

Для масштабування процесу одержання молекул білкової природи з гідробіонтів та забезпечення максимальної економічної ефективності запропонованих підходів важливо розробити загальні технології очищення молекул, які можуть бути використані як основа для одержання цільових білкових молекул – протеолітичних ферментів різної субстратної специфічності, колагену та його низькомолекулярних фрагментів, фракцій біологічно активних пептидів з сировини певного типу, зокрема, різних видів гідробіонтів Антарктичного регіону чи гідробіонтів інших кліматичних зон.

Частиною стратегії використання як джерела для одержання цільових молекул сировини, яка за своїми характеристиками може відрізнятися від загальноприйнятих сировинних ресурсів, має бути оптимізація методологічних підходів з урахуванням особливостей сировини, що у широкому сенсі передбачає створення комплексної технології отримання кінцевого продукту. Включення до протоколів отримання цільових молекул етапу скринінгу сировини на наявність певних цільових молекул, рекомендації щодо інтерпретації одержаних результатів з позицій вибору оптимального об'єкту, а також фізико-хімічна характеристика одержаних білкових молекул

і пептидів дозволить обирати сировину та враховувати особливості цільових молекул задля належного вибору методів екстракції.

У ході виконання завдань дослідження було розроблено методичні основи очищення біотехнологічно перспективних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону (рис.1). Апробація запропонованих підходів на прикладі різних видів гідробіонтів підтвердила ефективність обраної стратегії. Так, було розроблено двохстадійний метод (афінна хроматографія на блакитній-сефарозі та хроматографії, що поділяє за розмірами, на супердекс 200) очищення фібрино(гено)літичних ферментів, який дозволив одержати з гідробіонтів *S. neumayeri*, *O. validus* та *A. colbecki* фібрино(гено)літичні ферменти з вираженими антикоагуляційними властивостями. Порівнявши ефективність різних методів для одержання серинових протеїназ з гідробіонтів рекомендованим є застосування загальноприйнятого методу очищення на бензамідин-сефарозі для одержання загальної фракції серинових протеїназ чи поєднання декількох хроматографічних етапів (афінної хроматографії на СІТ-сефарозі та хроматографії, що поділяє за розмірами, на супердекс 75) для одержання гомогенного трипсиноподібного ферменту; разом з тим, застосування катіонообмінної хроматографії на КМ-сефарозі та елюція матеріалу буфером, що містить 25 % NaCl є доцільним для одержання фракції протеолітичних ферментів з різною будовою активного центру. З огляду на консервативність будови окремих класів та родин ферментів, використані нами підходи можуть бути застосовані для одержання протеїназ з гідробіонтів інших кліматичних зон.

Результати дослідження біохімічних властивостей та кінетичних характеристик трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* вносять певний вклад у розуміння молекулярних механізмів холодової адаптації та можуть бути використані у білковій інженерії та генетичній інженерії під час конструювання рекомбінантних аналогів, що

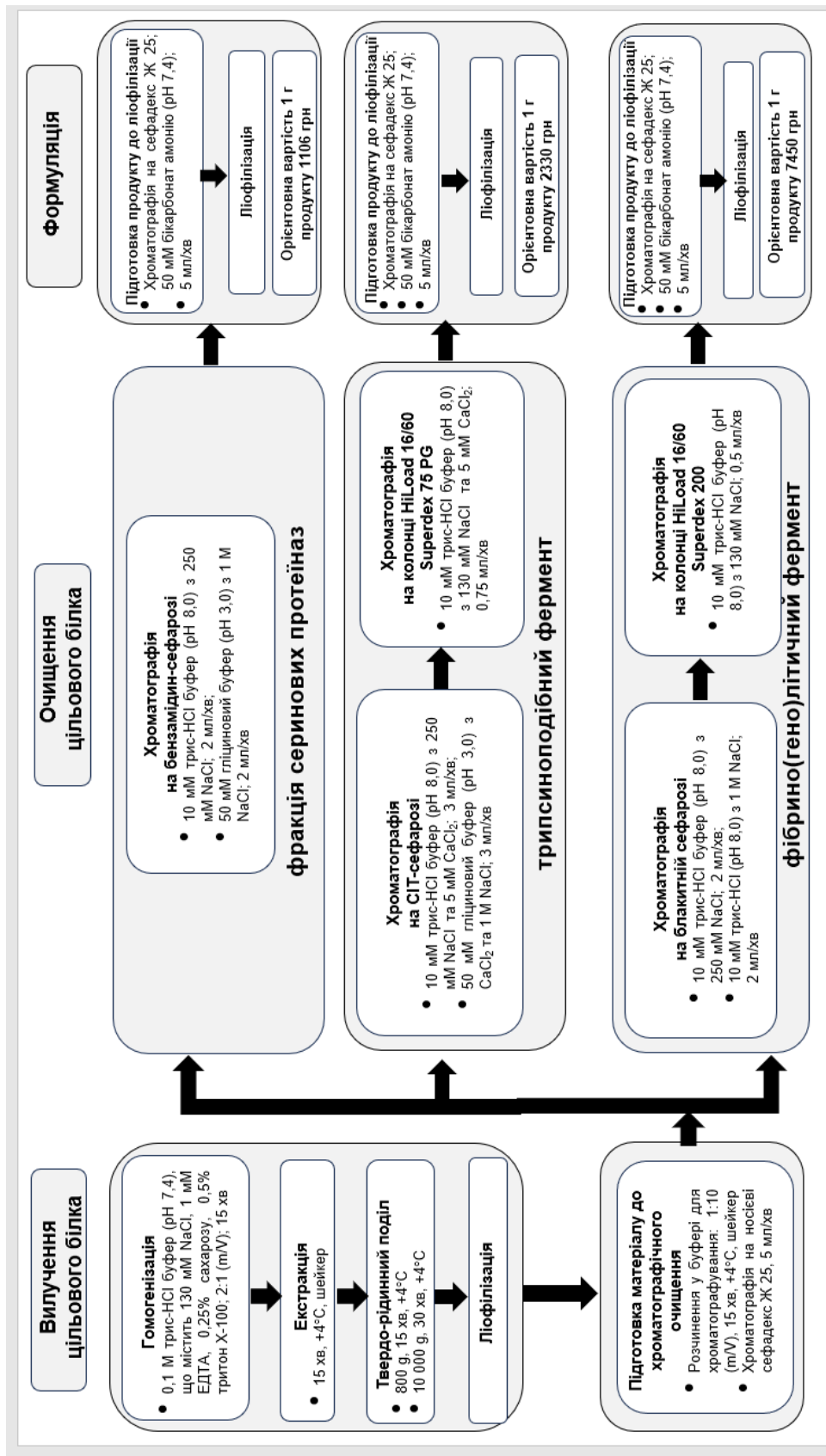


Рис. 1. Основні етапи очищення цільових ферментів з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону

здатні зберігати високу ферментативну активність за понижених температур. Серинові протеїнази з *D. antarctica* а також фібрино(гено)літичні ферменти з *S. neumayeri*, *O. validus* та *A. colbecki* можуть бути включені до складу інноваційних ранозагоювальних засобів направленої дії для лікування гнійно-некротичних уражень шкіри та м'яких тканин. З огляду на специфічність дії фібрино(гено)літичні ферменти можуть знайти застосування у фундаментальній біології для дослідження білок-білкових взаємодій, закономірностей процесу полімеризації фібрину та як інструмент спрямованого протеолізу фібриногену. Колагенолітична активність, виявлена у серинових протеїназ з *D. antarctica*, у поєднанні з максимальним проявом активності при рН 12,0 та збереженням активності у широкому діапазоні значень рН відкриває перспективи використання цих ферментів у різних галузях промисловості, зокрема, обґрунтовує їхнє включення у довготривалі технологічні процеси переробки колагенвмісних відходів та/чи сировини. У представленій роботі застосування фракції серинових протеїназ, одержаних з *D. antarctica*, для гідролізу колагену в рамках вирішення задачі по отриманню низькомолекулярних фрагментів колагену підтвердило їхню ефективність так як дозволило отримати гідролізат колагену, що містив фрагменти з молекулярною нижче 10 кДа.

Як вже зазначалось вище, раціональне використання сировини має базуватися на принципах принцип безвідходного виробництва, а відтак сучасні стратегії створення біотехнологічних продуктів мають розроблятися з урахуванням принципів системності та комплексності використання ресурсів, що передбачає максимально повне використання всіх складових сировини на всіх етапах її переробки та мінімізацію кількості відходів. В роботі апробовано підхід щодо переробки колагенвмісних відходів рибної промисловості на прикладі луски риб як спосіб валоризації відходів та отримання продукції з доданою вартістю. Такий підхід має подвійну перевагу – дозволяє отримувати колаген для його подальшого використання в різних секторах промисловості,

косметології чи медицині та через зниження кількості відходів сприятиме покращенню санітарного та екологічного стану довкілля.

Експериментальні дослідження на моделі ожиріння, індукованого споживанням висококалорійного корму, підтвердили дієвість та ефективність запропонованого нами підходу переробки колагенвмісних відходів (луски риб Антарктичного регіону) задля отримання біологічно активних фрагментів колагену. Нормалізація ключових органометричних показників, покращення структурно-функціонального стану жирової тканин та зниження рівня показників, що асоціюються з розвитком переддіабетичного стану, обґрунтовують перспективність застосування низькомолекулярних фрагментів колагену з луски риб як можливої складової функціональних харчових добавок спрямованих на попередження подальшого зростання маси тіла у осіб з надмірною вагою.

Запропонована у роботі технологія створення біотехнологічного продукту, що включає використання відходів переробки основної сировини, як джерела для одержання цільових молекул, відповідає принципам економіки замкнутого циклу (або циркулярної економіки) та сприяє реалізації цілей Національної стратегії поводження з відходами у рамках Стратегії сталого розвитку України до 2030 року.

Задля виявлення найбільш раціональних шляхів використання малоцінних видів гідробіонтів чи сировини, яка певний час зберігалась без дотримання належних умов зберігання, а відтак не може бути джерелом для одержання ферментів чи структурних білків, нами було оцінено можливість застосування ферментативного гідролізу вихідної біомаси гідробіонтів для отримання фракції біологічно активних пептидів. Технологічну схему отримання з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону фракцій біологічно-активних пептидів наведено на рис.2. Варіювання умов ферментативного гідролізу та вибір ферменту, застосування якого приводило до утворення пептидів з більш вираженою біологічною активністю (оцінена за показниками

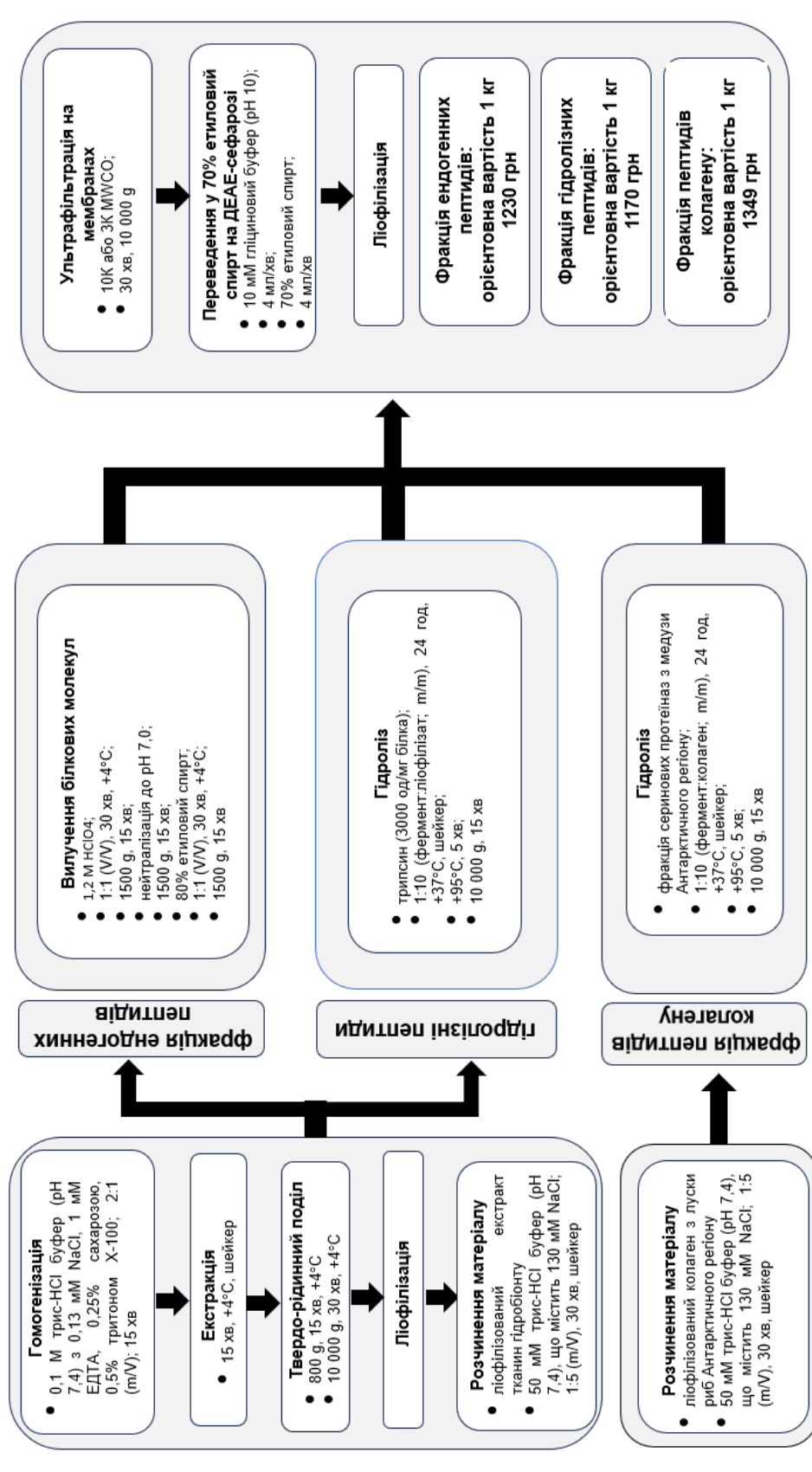


Рис. 2. Основні етапи отримання пептидів з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону

значень антиоксидантної активності в тестах *in vitro*), дозволило отримати фракцію пептидів з молекулярною масою до 5 кДа. Одержані результати по перевірці ефективності пептидів на моделі ожиріння у щурів свідчать про ефективність запропонованих нами підходів створення технологій отримання потенційно перспективних молекул та обґрунтовують такий підхід як спосіб раціонального використання малоцінних видів гідробіонтів. Підходи, що лягли в основу створення цієї технології можуть знайти успішне застосування при одержанні біологічно активних пептидів з інших видів білоквмісної сировини, у тому числі різних видів гідробіонтів. Крім того, запропоноване нами технологічне рішення по одержанню пептидних фракцій може бути одним з проміжних етапів загальної стратегії комплексної переробки сировини спрямованої на отримання низки продуктів різної хімічної природи.

Відносна інертність та стабільність пептидних молекул обґрунтовує можливість екстракції нативних пептидів з продуктів переробки вихідної сировини, як, наприклад, борошно криля. Комплексний підхід щодо одержання та тестування властивостей нативних пептидів з криля на модельних системах *in vitro* виявив їх помірні антиоксидантні властивості та здатність впливати на секреторну активність ендотеліоцитів, зокрема, секрецію ТАП, що відкриває певні перспективи їх використання як можливих засобів направленої регуляції гемостатичного балансу.

Варто відмітити, що тематика досліджень дисертаційної роботи знаходиться у сфері державних інтересів, оскільки отримані результати певною мірою сприятимуть створенню ефективної конкурентоспроможної продукції вітчизняного виробництва для заміщення імпортованих лікувальних засобів, зниження залежності України від закордонних розробок лікарських препаратів та забезпечення населення якісними і доступними за ціною засобами ранозагоювальної дії та функціональними харчовими домішками для направленої корекції метаболічних порушень. Зниження залежності фармацевтичної промисловості від імпортованих матеріалів є особливо

актуальним в наш час, коли напрацьовані логістичні маршрути та шляхи постачання субстанцій для фармацевтичного сектору промисловості виявились під загрозою через воєнні дії на території України.

Отже, у ході виконання дисертаційної роботи розроблено підходи створення технологій отримання молекул білкової природи та пептидів, які з огляду на сучасні тенденції у сфері створення безпечних та ефективних фармакологічних засобів та безрецептурних препаратів на основі природних молекул, а також тенденції до екологізації виробничих процесів, можуть знайти практичне впровадження.

Запропоновані технології отримання цільових білків з вираженими біологічними властивостями є загальними і можуть бути застосовані для різних видів гідробіонтів, що підтверджується їх апробацією на прикладі інших гідробіонтів Антарктичного регіону. Так, із застосуванням розробленої методології було одержано фібрино(гено)літичні ферменти з *S. neumayeri*, *O. validus* та *A. colbecki*; серинові протеїнази – з *D. antarctica* та *A. colbecki*, фракцію натуральних пептидів – з *E. superba* та *D. antarctica*. Разом з тим, напрацьовані результати щодо очищення та характеристики білкових молекул (протеолітичних ферментів, колагену) та пептидних фракцій можуть слугувати прототипом для створення технологій одержання аналогічних молекул з гідробіонтів інших регіонів та кліматичних зон.

Підходи, що були використані в роботі для отримання окремих молекул, можуть бути об'єднані в загальну технологічну схему, яка передбачає використання матеріалу, що залишився на попередньому етапі як сировину для наступного. Застосування такого підходу дозволяє отримувати з тканин гідробіонтів фібрино(гено)літичні ферменти чи серинові протеїнази, а решту матеріалу використовувати для одержання нативних пептидів чи пептидів із застосуванням ферментативного гідролізу.

За результатами виконання дисертаційної роботи сформульовано положення наукової концепції використання гідробіонтів Антарктичного



регіону як можливого шляху розв'язання нагальних проблем біотехнологічного сектору, зокрема, розширення сировинної бази для одержання молекул білкової природи за рахунок залучення малоцінних видів гідробіонтів (*S. neumayeri*, *O. validus*, *A. colbecki*, *P. corrugatus*); потенційно інвазійних видів (*D. antarctica*), які через зміни кліматичних умов і підвищення температури можуть становити небезпеку експансії та порушення екологічної рівноваги в регіоні, а також використання відходів переробки рибної сировини (луски) та нерибних об'єктів промислу (*E. superba*).

Розробка на прикладі гідробіонтів Антарктичного регіону підходів створення технологій отримання продуктів на основі білкових молекул сприятиме впровадженню у виробництво наукоємних технологій, що є необхідною умовою формування інноваційного потенціалу країни, підвищення конкурентоспроможності отриманої продукції та зниженню екологічного навантаження на довкілля.

Включення в технології отримання кінцевих біотехнологічних продуктів відходів від переробки основної сировини, некондиційованого матеріалу та впровадження підходів цільової переробки сировини з метою максимальної екстракції всіх потенційно привабливих молекул відкриває перспективи валоризації таких відходів та напрацювання стійких ланцюжків створення продуктів з доданою вартістю задля досягнення економічного та екологічного ефектів.

Експериментальний доробок, отриманий у ході виконання завдань дослідження, матиме певну інформаційну цінність так, як дозволить науково обґрунтовувати технологічні рішення у сфері забезпечення сталого розвитку та може бути інструментом під час оцінки природноресурсного потенціалу нашої країни.

## ВИСНОВКИ

За результатами проведених досліджень сформульовано концептуальні положення розроблення технологій використання біологічних ресурсів Антарктичного регіону на прикладі малоцінних видів гідробіонтів, потенційно інвазійних видів та відходів рибної промисловості як альтернативного джерела молекул білкової природи для отримання на їх основі інноваційних біотехнологічних продуктів з метою використання у медицині та інших секторах промисловості. Оптимізовані методи вилучення та очищення цих молекул інтегровано у загальний методологічний підхід створення технологій інноваційних продуктів на основі білкових молекул, який може бути рекомендовано для впровадження в пілотне біотехнологічне виробництво одержання цільових білкових молекул з білоквмісної сировини різного походження.

1. За результатами аналізу білкового профілю тканин гідробіонтів Антарктичного регіону та оцінки протеолітичної активності обґрунтовано можливість використання досліджуваних видів гідробіонтів (*A. colbecki*, *S. neumayeri*, *O. validus*, *E. superba*, *P. corrugatus* та *D. antarctica*) як джерела молекул білкової природи для біотехнологічних цілей, зокрема, ферментів та пептидів. Встановлено, що домінуюча частина протеолітичної активності у тканинах таких гідробіонтів, як *D. antarctica*, та *O. validus* обумовлена сериновими протеїназами, у той час тканини *P. corrugatus* містять переважно металозалежні ферменти.

2. У результаті поєднання методів афінної хроматографії та хроматографії, що поділяє за розмірами, з тканин гідробіонтів *A. colbecki*, *S. neumayeri* та *O. validus* очищено фібрино(гено)літичні ферменти та виявлено їх виражені антикоагуляційні властивості. Так, встановлено, що фібрино(гено)літичні ферменти з гідробіонтів пригнічують АДФ-індуковану

агрегацію тромбоцитів та викликають модифікацію молекули фібриногену, що обумовлює його знижену здатність до полімеризації за дії тромбіну.

3. Запропоновано оптимальний метод очищення серинових протеїназ з тканини гідробіонтів Антарктичного регіону та встановлено, що серинові протеїнази з *D. antarctica* виявляють найвищу активність за температури +55 °C і значенні pH 12,0, а трипсиноподібний фермент за *A. colbecki* – за температури +24 °C і значенні pH 9,0. За результатами визначення кінетичних параметрів реакції гідролізу субстрату S2366 трипсиноподібним ферментом встановлено, що значення каталітичної ефективності зберігається на одному рівні за температури +8 °C та +24 °C і становить, відповідно,  $16,3 \pm 0,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  і  $15,3 \pm 0,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ .

4. Розроблено технологію одержання пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону та встановлено, що споживання таких пептидів тваринами з моделлю ожиріння приводить до покращення загального метаболічного статусу, що виявляється у зниженні динаміки приросту маси тіла тварин, у тому числі, маси вісцеральної та підшкірної жирової тканини; зниженні потягу тварин до споживання висококалорійного корму; нормалізації цитокінового профілю у крові та показників, асоційованих з розвитком переддіабетичного стану (концентрація глюкози, рівень глікозильованого гемоглобіну, відносний вміст інсуліну).

5. Виявлено, що застосування композицій на основі колагену з луски риб та колагену з *D. antarctica* на моделі вирізаних площинних ран у щурів приводить до скорочення термінів епітелізації ран до 18 діб, причому більша ефективність була притаманна композиції на основі колагену з *D. antarctica*.

6. В результаті застосування оптимізованого методу екстракції пептидів з тканин *E. superba* було очищено фракцію ендогенних пептидів, що виявляють помірну антиоксидантну та мембрано-протекторну активності. Встановлено модулюючий вплив пептидів з *E. superba* на здатність тромбіну перетворювати фібриноген у фібрин, а також показано їх здатність пришвидшувати процес

полімеризації плазми крові в експериментах *in vitro*. Також виявлено здатність пептидів з *E. superba* викликати агрегацію тромбоцитів та впливати на секреторну функцію ендотеліоцитів.

7. Шляхом контрольованого гідролізу з тканин *A. colbecki* було отримано фракцію «гідролізних» пептидів з молекулярною масою нижче 5 кДа та встановлено, що споживання таких пептидів сприяє відновленню прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу у тварин з моделлю ожиріння, що виявлялося у зниженні сироваткового рівня первинних, проміжних та кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів, продуктів окиснювальної модифікації білків на тлі підвищення супероксиддисмутазної активності та зростання вмісту загальних сульфгідрильних груп. Також виявлено нормалізуючий вплив пептидів на функціонування периферійної серотонінергічної системи, зокрема, зниження концентрації сироваткового серотоніну та зниження моноамінооксидазної активності.

8. Обґрунтовано можливість використання білкових молекул та пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону як основи при створенні інноваційних біотехнологічних продуктів для потенційного використання у медицині та інших секторах сучасної економіки.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Muttenthaler M, King GF, Adams DJ, Alewood PF. Trends in peptide drug discovery. *Nat. Rev. Drug Disco.* 2021;20:309–325.
2. Fisher E, Pavlenko K, Vlasov A, Ramenskaya G. Peptide-based therapeutics for oncology. *Pharm. Med.* 2019;33:9–20.
3. Sharma P, Sharma N. Industrial and biotechnological applications of algae: A review. *Journal of Advances in Plant Biology.* 2017;1(1):1-25.
4. Soloviy C, Malovanyy M, Nykyforov V, Dihtyar S. Critical analysis of biotechnologies on using resource potential of hydrobionts. *Journal of Water and Land Development.* 2020;44 (I–III):143-150.
5. Gudmundsdottir A, Palsdottir HM. Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications. *Marine Biotechnology.* 2005;7:77-88.
6. Al-Ghanayem AA, Joseph B. Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020;104 (7): 2871-2882.
7. Bala A, Singh B. Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. *Renew. Energ.* 2019;136: 1231-1244.
8. Fornbacke M, Clarsund M. Cold-adapted proteases as an emerging class of therapeutics. *Infect. Dis. Ther.* 2013;2(1):15-26.
9. Kumoro AC, Wardhani DH, Kusworo TD, Djaeni M, Ping TC. Fish protein concentrate for human consumption: A review of its preparation by solvent extraction methods and potential for food applications. *Ann. Agric. Sci.* 2022;67:42–59/
10. Lacou L, Leonil J, Gagnaire V. Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptideas in food products. *Food Hydrocoll.* 2016;57:187–199.

11. Tahergorabi R, Hosseini SV. Proteins, peptides, and amino acids. In *Nutraceutical and Functional Food Components*, 1st ed.; Galanakis, C.M., Ed.; Elsevier, Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 15–38.
12. Sjö Dahl J, Emmer A, Vincent J, Roeraade J. Characterization of proteinases from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Protein Expr Purif.* 2002;26(1):153-61.
13. Si YX, Song JJ, Fang NY, Wang W, Wang ZJ, Yang JM, Qian GY, Yin SJ, Park YD. Purification, characterization, and unfolding studies of arginine kinase from Antarctic krill. *Int J Biol Macromol.* 2014 Jun;67:426-32.
14. Nygård LAK, Mundal I, Dahl L, Šaltytė Benth J, Rokstad AMM. Nutrition and physical performance in older people-effects of marine protein hydrolysates to prevent decline in physical performance: a randomised controlled trial protocol. *BMJ Open.* 2018;8(10):e023845.
15. Bonnefoy M, Gilbert T, Bruyère O, Paillaud E, Raynaud-Simon A, Guérin O, Jeandel C, Le Sourd B, Haine M, Ferry M, Rolland Y, Berrut G. Protein supplementation to prevent loss in muscle mass and strength in frail older patients: a review. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil.* 2019;17(2):137-143.
16. Anjum K, Abbas SQ, Shah SA, Akhter N, Batool S, Hassan SS. Marine sponges as drug treasure. *Biomol.Ther. (Seoul).* 2016;24:347-362.
17. Miljanich GP. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem.* 2004;11:3029-3040.
18. Klotz U. Ziconotide - a novel neuron-specific calcium channel blocker for the intrathecal treatment of severe chronic pain - a short review. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2006;44:478-483.
19. Kawasaki T, Seki E, Osajima K, Yoshida M, Asada K, Matsui T, Osajima Y. Antihypertensive effect of Valyl-Tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *Journal of Human Hypertension.* 2000;14:519-523.

20. Osajima K, Ninomiya T, Harwood M, Danielewska-Nikiel B. Safety evaluation of a peptide product derived from sardine protein hydrolysates (valtyron). *Int J Toxicol*. 2009;28(5):341-56.
21. Tomohide HF, Ohshima YK. Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutrition Research*. 2001;21(8):1149-1158.
22. Fujita N, Yoshikawa M. Marine-derived protein hydrolysates, their biological activities and potential as functional food ingredients: ACE-inhibitory peptides derived from bonito/Barrow C, Shahidi F (Eds.), *Marine nutraceuticals and functional foods*. CRC Press, Boca Raton, FL. 2008; 247-258.
23. Thorkelsson G, Kristinsson HG. Bioactive peptides from marine sources. State of art. Report to the NORA fund, Skrsla Matís. 2009;14-09.
24. Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Mar. Drugs*. 2014;12:1066-1101.
25. Supungul P, Tang S, Maneeruttanarungroj C, Rimphanitchayakit V, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology*. 2008; 32: 61-80.
26. Turner T, Jackson WH, Pettit GR, Wells A, Kraft AS. Treatment of human prostate cancer cells with dolastatin 10, a peptide isolated from a marine shell-less mollusc. *The Prostate*. 1998;34: 175-181.
27. Sutherland MS, Sanderson RJ, Gordon KA, Andreyka J, Cerveny CG, Yu C, Lewis TS, Meyer DL, Zabinski RF, Doronina SO, Senter PD, Law CL, Wahl AF. Lysosomal trafficking and cysteine protease metabolism confer target-specific cytotoxicity by peptide-linked anti-CD30-auristatin conjugates. *J Biol Chem*. 2006;281:10540-10547.
28. Deng C, Pan B, O'Connor OA. Brentuximab Vedotin. *Clin Cancer Res*. 2013;19:22-27.

29. Leal M, Sapra P, Hurvitz SA, Senter P, Wahl A, Schutten M, Shah DK, Haddish-Berhane N, Kabbarah O. Antibody-drug conjugates: An emerging modality for the treatment of cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2014;1321:41-54.
30. Younes A, Gopal AK, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, Ramchandren R, Bartlett NL, Cheson BD, de Vos S, Forero-Torres A, Moskowitz CH, Connors JM, Engert A, Larsen EK, Kennedy DA, Sievers EL, Chen R. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2012;30:2183-2189.
31. Cruz LJ, Luque-Ortega JR, Rivas L, Albericio F. Kahalalide F, an Antitumor Depsipeptide in Clinical Trials, and Its Analogues as Effective Antileishmanial Agents. *Mol. Pharmaceutics.* 2009; 6(3); 813-824.
32. Sewell JM, Mayer I, Langdon SP, Smyth JF, Jodrell DI, Guichard SM. The mechanism of action of kahalalide F: Variable cell permeability in human hepatoma cell lines. *Eur. J. Cancer.* 2005;41:1637-1644.
33. Guerard F, Decourcelle N, Sabourin C, Floch-Laizet C, Le Grel L, Le Floch P, Gourlay F, Le Delezirc R, Jaouen P, Bourseau P. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: A review. *Journal des Sciences Halieutiques et Aquatiques.* 2010;2:21-27.
34. Torres-León C, Ramírez-Guzman N, Londoño-Hernandez L, Martinez-Medina GA, Díaz-Herrera R, Navarro-Macias V, Alvarez-Pérez OB, Picazo B, Villarreal-Vázquez M, Ascacio-Valdes J, et al. Food waste and byproducts: an opportunity to minimize malnutrition and hunger in developing countries. *Front. Sustain. Food Syst.* 2018;2:52.
35. Hou H, Fan Y, Wang S, Si L, Li B. Immunomodulatory activity of Alaska pollock hydrolysates obtained by glutamic acid biosensor-artificial neural network and the identification of its active central fragment. *J. Funct. Foods.* 2016;24((Suppl. C)):37-47.



36. Halim NRA, Yusof HM, Sarbon NM. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends Food Sci. Technol.* 2016;51((Suppl. C)):24-33.
37. Evert AB, Boucher JL, Cypress. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care.* 2014;37(1):S120 -S143.
38. Harnedy PA, Parthasarathy V, McLaughlin CM, O’Keeffe MB, Allsopp PJ, McSorley EM, O’Harte FPM, FitzGerald RJ. Atlantic salmon (*Salmo salar*) co-product-derived protein hydrolysates: A source of antidiabetic peptides. *Food Res. Int.* 2018;106:598-606.
39. Englender C. Symptom reduction in irritable bowel syndrome with pre-digested fish protein supplement. *Townsend Letter.* 2000; 205 (206):60-64.
40. Marchbank T, Limdi JK, Mahmood A, Elia G, Playford RJ. Clinical trial: Protective effect of a commercial fish protein hydrolysate against indomethacin (NSAID)-induced small intestinal injury. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* 2008;28: 799-804.
41. Chakrabarti S, Guha S, Majumder K. Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. *Nutrients.* 2018;10:1738.
42. Guerard F, Decourcelle N, Sabourin C, Floch-Laizet C, Le Grel L, Le Floch P, Gourlay F, Delezir L, Jaouen R, Bourseau P. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. *Journal des Sciences Halieutiques et Aquatiques.* 2010;2: 21-27.
43. Farnworth ER, ed. *Handbook of fermented functional foods.* Boca Raton, Florida: CRC Press. 2003.
44. Bernet F, Montel V, Noel B, Dupouy JP. Diazepam-like effects of a fish protein hydrolysate (Gabolysat PC60) on stress responsiveness of the rat pituitary-adrenal system and sympathoadrenal activity. *Psychopharmacology (Berl.)* 2000;149:34-40.

45. Vareltzis K. Fish proteins from unexploited and underdeveloped sources. In: Doxastakis G, Kiosseoglou V, eds. 2000, *Novel Macromolecules in Food Systems*. Amsterdam: Elsevier, 133 -159.
46. Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC, Lee RL, Lejeune E, Bruyere O, Giacovelli G, Henrotin Y, Dacre JE, Gossett C. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet*. 2001; 357: 251-256.
47. Wasswa J, Tang J, Gu X. Utilization of fish processing by-products in the gelatin industry. *Food Rev. Int.* 2007;23:159-174.
48. Kim SK, Mendis E. Bioactive compounds from marine processing byproducts. A review. *Food Res. Int.* 2006;39:383-393.
49. Moskowitz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin. Arthritis Rheum.* 2000;30:87-99.
50. Shimomura O. Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel lecture) *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48:5590-5602.
51. Harris JR, Markl J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron.* 1999;30:597-623.
52. Mcfadden DW, Riggs DR, Jackson BJ, Vona-Davis L. Keyhole limpet hemocyanin, a novel immune stimulant with promising anticancer activity in Barrett's esophageal adenocarcinoma. *The American Journal of Surgery.* 2003; 186: 552-555.
53. Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2016;33:382-431.
54. Bhat ZF, Morton JD, Bekhit AEDA, Kumar S, Bhat HF. Emerging processing technologies for improved digestibility of muscle proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 2021;110:226–239.
55. Momen S, Alavi F, Aider M. Alkali-mediated treatments for extraction and functional modification of proteins: Critical and application review. *Trends Food Sci. Technol.* 2021;110:778–797.

56. Bhat ZF, Morton JD, Kumar S, Bhat HF, Aadil RM, Bekhit AEDA. Ultrasonication as an emerging technology for processing of animal derived foods: A focus on *in vitro* protein digestibility. *Trends Food Sci. Technol.* 2022;124:309–322.
57. Gullón P, Gullón B, Romani A, Rocchetti G, Lorenzo JM. Smart advanced solvents for bioactive compounds recovery from Agri-food by-products: a review. *Trends Food Sci Technol.* 2020; 101:182-197.
58. Carullo D, Abera BD, Casazza AA, Donsì F, Perego P, Ferrari G, et al. Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenisation on the aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Algal Res.* 2018;31: 60-69.
59. Ganesh RJ, Nazeer RA Sampath Kumar NS. Purification and identification of antioxidant peptide from black pomfret, *Parastromateus niger* (Bloch, 1975) viscera protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology.* 2011; 20 (4): 1087-1094.
60. Zhang Y, Duan X, Zhuang Y. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides.* 2012; 38(1): 13-21.
61. Cheng F, Shu G, Chen L, Dai C, Wan H, Chen H, Dong X. Ultrasound-microwave assisted extraction of proteins from *Moringa Oleifera* leaves: comparative optimization study and Lc-MS analysis of the protein concentrate. *J Food Proc Preserv.* 2021; 45:15547.
62. Behere M, Patil SS, Rathod VK. Rapid extraction of watermelon seed proteins using microwave and its functional properties. *Prep Biochem Biotechnol.* 2021; 51:252-259.
63. Dai JH, Luo XF, Shi CY, Zhao CC, Sheng J, Tian Y, Tao L. Optimization of extraction process for water-soluble protein of *Moringa Oleifera* leaves by response surface methodology. *J Yunnan Agric Univ.* 2020; 35:130-138.

64. Kristinsson HG, Rasco BA. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2000; 40(1): 43-81.
65. Sila A, Sayari N, Balti R et al. Biochemical and antioxidant properties of peptidic fraction of carotenoproteins generated from shrimp by-products by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*. 2014; 148: 445-452.
66. Salampessy J, Reddy N, Kailasapathy K, Phillips M. Functional and potential therapeutic ACE-inhibitory peptides derived from bromelain hydrolysis of trevally proteins. *Journal of Functional Foods*. 2015; 14: 716-725.
67. Moreda-Piñeiro A, Moreda-Piñeiro J, Herbello-Hermelo P et al. Application of fast ultrasound water-bath assisted enzymatic hydrolysis—high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry procedures for arsenic speciation in seafood materials. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(39): 6970-6980.
68. Erdmann K, Grosser N, Schipporeit K, et al. The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *J. Nut.* 2006;136: 2148-2152.
69. Lopez Exposito I, Recio I. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *Int. Dairy J.* 2006;16: 1294-1305.
70. Mendis E, Rajapakse N, Kim S. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J. Agri. Food Chem.* 2005; 53: 581-587.
71. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*. 2010; 31: 1949-1956.
72. Picot L, Ravallec R, Fouchereau-Péron M, Vandanjon L, Jaouen P, Chaplain-Derouiniot M, Guérard F, Chabeaud A, Legal Y, Martinez Alvarez O, Bergé JP, Piot JM, Batista I, Pires C, Thorkelsson G, Delannoy C, Jakobsen G, Johansson I, Bourseau P. Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein

hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010; 90: 1819-1826.

73. Bourseau P, Vandanjon L, Jaouen P, Chaplain-Derouiniot M, Massé A, Guérard F, Chabeaud A, Fouchereau-Péron M, Le Gal Y, Ravallec-Plé R, Bergé JP, Picot L, Piot JM, Batista I, Thorkelsson G, Delannoy C, Jakobsen G, Johansson I. Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on peptidic populations. *Desalination*. 2009; 244: 303-320.

74. Chabeaud A, Vandanjon L, Bourseau P, Jaouen P, Guerard F. Fractionation by ultrafiltration of a saithe protein hydrolyzate (*Pollachius virens*): Effect of material and molecular weight cut-off on the membrane performances. *J. Food Eng.* 2009; 91: 408-414.

75. Vandanjon L, Johannsson R, Derouiniot M, Bourseau P, Jaouen P. Concentration and purification of blue whiting peptide hydrolysates by membrane processes. *J. Food Eng.* 2007; 83: 581-589.

76. Nath A, Szécsi G, Csehi B, Mednyánszky Z, Kiskó G, Bányai E, Dernovics M, Koris A. Production of Hypoallergenic Antibacterial Peptides from Defatted Soybean Meal in Membrane Bioreactor: A Bioprocess Engineering Study with Comprehensive Product Characterization. *Food Technol Biotechnol.* 2017;55(3): 308-324.

77. Arnesen JA, Gildberg A. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technol.* 2007; 98:53-57.

78. Chen T, Embree H, Brown E, Taylor M, Payne G. Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications. *Biomaterials.* 2003;24:2831-2841.

79. Cheng LH, Lim BL, Chow KH, Chong SM, Chang YC. Using fish gelatin and pectin to make a low-fat spread. *Food Hydrocoll.* 2008; 22: 1637-1640.

80. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials.* 2001; 22:763.

81. Kolodziejska I, Kaczorowski K, Piotrowska B, Sadows M. Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. *Food Chem.* 2004; 86: 203-209.
82. J'onsd'ottir G, Bjarnason JB, Gudmundsd'ottir A. Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod - expression, purification, and identification. *Protein Expression and Purification.* 2004; 33(1): 110-122.
83. Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature.* 2012; 485: 185-194.
84. Martinez-Martinez M, Coscolin C, Santiago G, Chow J, Stogios PJ, Bargiela R, Gertler C, Navarro-Fernandez J, Bollinger A, Thies S, et al. Determinants and Prediction of Esterase Substrate Promiscuity Patterns. *ACS Chem. Biol.* 2018; 13:225 -234.
85. Parvizpour S, Hussin N, Shamsir MS, Razmara J. Psychrophilic enzymes: structural adaptation, pharmaceutical and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021;105(3):899-907.
86. Yang G, Mozzicafreddo M, Ballarini P, Pucciarelli S, Miceli C. An In-Silico Comparative Study of Lipases from the Antarctic Psychrophilic Ciliate *Euplotes focardii* and the Mesophilic Congeneric Species *Euplotes crassus*: Insight into Molecular Cold-Adaptation. *Mar Drugs.* 2021;19(2):67.
87. Coker JA. Extremophiles and biotechnology: Current uses and prospects. *F1000Res.* 2016; 5.
88. Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrews D, Sowers KR. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002; 13: 253-261.
89. Miyazaki K, Wintrode PL, Greyling RA, Rubingh DN, Arnold FH. Direct evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J Mol Biol.* 2000; 297(4): 1015 -1026.
90. Bougatef A, Balti R, Nasri R, Jellouli K, Soussi N, Nasri M. Biochemical properties of anionic trypsin acting at high concentration of NaCl purified from the

intestine of a carnivorous fish: smooth hound (*Mustelus mustelus*). *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 5763-5769.

91. Fernandes P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Res.* 2010; 862537.

92. Kratky L, Zamazal P. Economic feasibility and sensitivity analysis of fish waste processing biorefinery. *J. Clean. Prod.* 2020;243:118677.

93. Caruso G, Floris R, Serangeli C, Di Paola L. Fishery wastes as a yet undiscovered treasure from the sea: biomolecules sources, extraction methods and valorization. *Mar Drugs.* 2020;18(12):622.

94. Craik CS, Page MJ, Madison EL. Proteases as therapeutics. *Biochem. J.* 2011; 435: 1-16.

95. Fornbacke M, Clarsund M. Cold-adapted proteases as an emerging class of therapeutics. *Infect. Dis. Ther.* 2013; 2: 15 -26.

96. Hilmarsson H, Stefansson B, Gudmundsd'ottir A. Antipathogenic activity of trypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) against Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and Respiratory syncytial virus (RSV). Science Institute Reports, Science Institute University of Iceland, University Press, Reykjavik, Iceland. 2012.

97. Balasingamand S, Blanc S. A study to evaluate the inactivation of Avian H5N1 Influenza NIBRG-14 virus in the presence of 2 test articles at 2 time points. Retroscreen Virology Ltd., London, UK. 2006.

98. Gudmundsd'ottir A, Palsdottir HM. Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications,» *Marine Biotechnology.* 2005; 7(2): 77 -88.

99. Stefansson B, Helgad'ottir L, Olafsdottir S, Gudmundsd'ottir A, Bjarnason JB. Characterization of cold-adapted Atlantic cod (*Gadusmorhua*) trypsin I-Kinetic parameters, autolysis and thermal stability. *Comparative Biochemistry and Physiology B.* 2010; 155(2): 186-194.

100. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2009; 73(2): 310-347.

101. Molobela IP, Cloete TE, Beukes M. Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria,” African Journal of Microbiology Research. 2010; 4(14): 1515-1524.
102. Bhandari D, Rafiq S, Gat Y, Gat P, Waghmare R, Kumar V. A review on bioactive peptides: physiological functions, bioavailability and safety. *Int J Pept Res Ther*. 2020; 26:139-150.
103. Lam RSH, Nickerson MT. Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chem*. 2013;141:975 -84.
104. Alvarez D, Delles RM, Xiong YL, Castillo M, Payne FA, Laencina J. Influence of canola-olive oils, rice bran and walnut on functionality and emulsion stability of frankfurters. *LWT Food Sci Technol*. 2011; 44:1435 -1442.
105. Karami Z, Akbari-adergani B. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *J Food Sci Technol*. 2019; 56:535 -547.
106. Carretero M, Escámez MJ, García M, Duarte B, Holguín A, Retamosa L, et al. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. *J Investig Dermatol*. 2008; 128:223-236.
107. Banerjee P, Suguna L, Shanthi C. Wound healing activity of a collagen-derived cryptic peptide. *Amino Acids*. 2015; 47:317-328.
108. Cheng X, Shao Z, Li C, Yu L, Raja MA, Liu C. Isolation, characterization and evaluation of collagen from jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye for use in hemostatic applications. *PLoS ONE*. 2017; 12:e0169731.
109. Karnjanapratum S, O’Callaghan YC, Benjakul S, et al. Antioxidant, immunomodulatory and antiproliferative effects of gelatin hydrolysate from unicorn leatherjacket skin. *J of the Science of Food and Agriculture*. 2016.
110. Alemán A, Pérez-Santín E, Bordenave-Juchereau S, et al. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*. 2011;44(4):1044-51.



111. Polt R, Dhanasekaran M, Keyari CM. Glycosylated neuropeptides: a new vista for neuropsychopharmacology? *Med. Res. Rev.* 2005;25:557 -585.
112. Banks DD. The effect of glycosylation on the folding kinetics of erythropoietin. *J. Mol. Biol.* 2011;412:536 -550.
113. Varamini P, Mansfeld FM, Blanchfield JT, Wyse BD, Smith MT, Toth I. Synthesis and biological evaluation of an orally active glycosylated endomorphin-1. *J. Med. Chem.* 2012;55:5859 -5867.
114. Hong PK, Gottardi D, Ndagijimana M. Glycation and transglutaminase mediated glycosylation of fish gelatin peptides with glucosamine enhance bioactivity. *Food Chemistry.* 2014;142:285-93.
115. Wolfert MA, Boons GJ. Adaptive immune activation: glycosylation does matter. *Nature Chemical Biology.* 2013;9(12):776-784.
116. Choe IH, Jeon HJ, Eom SH, et al. The anti-inflammatory effect of a glycosylation product derived from the high hydrostatic pressure enzymatic hydrolysate of a flatfish byproduct. *Food & Function.* 2016;7:2557-2565.
117. Benjakul S, Kittiphattanabawon P, Regenstein JM. Fish Gelatin. *J. Food Biochem.* 2012; 388-405
118. Karayannakidis PD, Zotos A. Fish Processing by-Products as a Potential Source of Gelatin: A Review. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 2016; 25: 65-92.
119. Affinity Chromatography. Principles and Methods. Amersham Pharmacia Biotech AB. 2011;156.
120. Zhang F, Wang A, Li Z, He S, Shao L. Preparation and characterisation of collagen from freshwater fish scales. *Food Nutr Scie.* 2011;2:818-23.
121. Nykolaychyk BB, Moyn VM, Kyrkovskyy VV. Method for determining of the peptide pool molecular. *Laboratory case.* 1991;10:13-18.
122. Huang Q, Li S, Teng H, Jin Y, Ma M, Song H. Optimizing Preparation Conditions for Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysates of Ovalbumin. *Food Sci. Biotechnol.* 2015;24(6):2193-2198.

123. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
124. Ostapchenko L, Savchuk O, Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system. *Adv Biosci Biotech*. 2011;2:20-26.
125. 2-D Electrophoresis Principles and Methods Amersham Biosciences UK Limited Amersham Place Little Chalfont. 2004;168.
126. Munilla-Moran R, Stark JR. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture*. 1989; 8:315-327.
127. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;2:248-254.
128. Costa J, Petric C, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo M, Oliveira C, Soares A, Oliveira F. Purification and functional characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2007;13(3):640-654.
129. Варецька ТВ. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген. *Український біохімічний журнал*. 1960;32(2):13 - 24
130. Raksha N, Halenova T, Kravchenko O, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. Purification and biochemical characterization of Trypsin-like enzyme from Antarctic Hydrobiont *Adamussium colbecki*. *Res. J. Biotech*. 2020;15(1):1-7.
131. Fuchise T, Sekizaki H, Kishimura H, Klomklao S, Nalinanon S, Benjakul S, Chun BS. Simple Preparation of Pacific Cod Trypsin for Enzymatic Peptide Synthesis. *Journal of Amino Acids*. 2011; Article ID 912382, 8 pages
132. Selliah N, Eck S, Green C, Oldaker T, Stewart J, Vitaliti A, Litwin V. Flow Cytometry Method Validation Protocols. *Curr Protoc Cytom*. 2019;87(1):e53.
133. Козлов АА, Берковский АЛ, Качалова НД. Пособие для врачей-лаборантов. Работа с отечественными коагулометрами и реагентами НПО «Ренам». 2013;44.

134. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. 1995;22(4):375-383.
135. Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem*. 1999;47:1035-1040.
136. Jayaprakash GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in-vitro. *J. Agric. Food Chem*. 2001;55:1018-1022.
137. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*. 1995;269:P.337-341.
138. Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogen*. 1989;10:1003-1008.
139. Chakraborty G. Free radical scavenging activity of *Aesculus indica* leaves. *International J PharmTech Research*. 2009;1(3):524-526.
140. Xiong YL. Effect and Mechanism of Exhaustive Exercise Induced Oxidative Stress in Erythrocytes of Rat. Chongqing University, Chongqing, China. 2014.
141. Bijak M, Ziewiecki R, Saluk J, Ponczek M, Pawlaczyk I, Krotkiewski H, Wachowicz B, Nowak P. Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds. *Med Chem Res*. 2014;23:2324-2337.
142. Shen X-H, Tang Q-Y, Huang J, Cai W. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. *Exp Biol Med*. 2010;235:47-51.
143. Altaman DG, Bland JM. Statistics notes. Treatment allocation in controlled trials: Why randomize? *BMJ*. 1999;318:1209.

144. Spencer M, Unal R, Zhu B, Rasouli N, McGehee RE Jr, Peterson CA, et al. Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Dec;96(12):E1990-8.
145. Mishra NS, Wanjari SP, Parwani RN, Wanjari PV, Kaothalker SP. Assessment of collagen and elastic fibres in various stages of oral submucous fibrosis using Masson's trichrome, Verhoeff van Gieson and picrosirius staining under light and polarizing microscopy. *J Dent Special.* 2015;3(2):170-175.
146. Altintas MM, Azad A, Nayer B, Contreras G, Zaias J, Faul C, et al. Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *J Lipid Res.* 2011;52(3):480-8.
147. Okhmat OA, Plavan VP, Mokrousova OP, Danilkovich AG. Chemical analysis and physical and mechanical tests of skin and fur: methodological instructions for laboratory work on the discipline "Analytical control in fur and leather production". KNUTD. Kiev. 2006;60-4.
148. Інформаційний лист комплекс "Глюкофот-іі"- "Гемоглан" виробництва ПВП "Норма" для визначення цукру крові. Київ: Норма, 2008:12.
149. Гликозилированный гемоглобин / Диагностический набор // Pliva-lachema diagnostika. 2008; 10003258.
150. Halenova TI, Vareniuk IM, Roslova NM, Dzerzhynsky ME, Savchuk OM, Ostapchenko LI, Prylutskyu YuI, Ritter U, Scharff P. Hepatoprotective effect of orally applied water-soluble pristine C60 fullerene against CCl4-induced acute liver injury in rats. *RSC Adv.* 2016;6:100046-55.
151. Nishikimi M, Rao A, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972;46(2):849-854.
152. Королюк МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988;1:44-67.

153. Nedzvetsky V, Andrievsky G, Chachibaia T, Tykhomyrov A. Differences in antioxidant/protective efficacy of hydrated C60 fullerene nanostructures in liver and brain of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Diabetes Metab.* 2012;3(8):1-9.
154. Вартамян ЛС, Гуревич СМ. NADH-и NADPH-зависимое образование супероксидных радикалов в ядрах печени. *Биохимия.* 1989;54(6):1020-1025.
155. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70-77
156. Gaitonde МК. A fluorimetric method for the determination of tryptophan in animal tissues. *Biochem. S.* 1974;139:625-631.
157. Weissbach H, Waalkes TP, Udenfriend S. A simplified method for measuring serotonin in tissue; simultaneous assay of both serotonin and histamine. *J Biol Chem.* 1957;230(2):865-71.
158. Балаклеевский АИ. Колориметрический способ определения активности моноаминоксидазы в сыворотки крови. *Лабораторное дело.* 1976;3:151-152.
159. Sharma P, Sharma N. Industrial and biotechnological applications of algae: A review. *Journal of Advances in Plant Biology.* 2017;1(1):1-25.
160. Soloviy C, Malovanyy M, Nykyforov V, Dihtyar S. Critical analysis of biotechnologies on using resource potential of hydrobionts. *Journal of Water and Land Development.* 2020;44 (I–III):143-150.
161. Gudmundsdottir A, Palsdottir HM. Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications. *Marine Biotechnology.* 2005;7:77-88.
162. Al-Ghanayem AA, Joseph B. Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020;104 (7): 2871-2882.
163. Bala A, Singh B. Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. *Renew. Energ.* 2019;136: 1231-1244.
164. Fornbacke M, Clarsund M. Cold-adapted proteases as an emerging class of therapeutics. *Infect. Dis. Ther.* 2013;2(1):15-26.

165. Solanki P, Putatunda C, Kumar A, Bhatia R, Walia A. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *Biotech.* 2021;11(10):428.
166. Homaei A, Lavajoo F, Sariri R. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *Int J Biol Macromol.* 2016;88:542-552.
167. Di Donato P, Buono A, Poli A, Finore I, Abbamondi G R, Nicolaus B, Lama L. Exploring marine environments for the identification of extremophiles and their enzymes for sustainable and green bioprocesses. *Sustainability.* 2019; 11: 149.
168. Новіков В, Сидоров Ю, Швед О. Тенденції розвитку комерційної біотехнології. *Вісн. НАН України.* 2008;2:25-39.
169. Katsimpouras C, Stephanopoulos G. Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development. *Curr Opin Biotechnol.* 2021;69:91-102.
170. Dinarvand M, Spain M. Identification of bioactive compounds from marine natural products and exploration of structure-activity relationships (SAR). *Antibiotics (Basel).* 2021; 10 (3):337.
171. Khan S, Farooq U, Kurnikova M. Exploring Protein Stability by Comparative Molecular Dynamics Simulations of Homologous Hyperthermophilic, Mesophilic, and Psychrophilic Proteins. *J. Chem. Inf. Model.* 2016, 56, 2129–2139.
172. Руденская Г. Брахиурины – сериновые коллагенолитические ферменты крабов. *Биоорганическая химия.* 2003; 29(2):117–128.
173. [https://www.worthington-biochem.com/TRY/#:~:text=Isoelectric%20Point%3A&text=Trypsin%3A%20pH%2010.5%20\(Cunningham%201954\).](https://www.worthington-biochem.com/TRY/#:~:text=Isoelectric%20Point%3A&text=Trypsin%3A%20pH%2010.5%20(Cunningham%201954).)
174. Kunitate A, Okamotoand M, Ohmori I. Purification and characterization of a thermostable serine protease from bacillus thuringiensis. *Agric. Biol. Chem.* 1989; 53(12): 3251 -3256.
175. Kato T, Yamagata Y, Arai T, Ichishima E. Rapid paper purification of a new extracellular 90-kda serine proteinase with isoelectric point of 3.9 from bacillus

sutilis (natto) and elucidation of its distinct mode of action. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992; 56 (7): 1166-1168.

176. Kishimura H, Hayashi K. Isolation and characteristics of trypsin from pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2002;132(2):485-90.

177. Мацелюх О В, Варбанець Л Д. Колагенолітичні ферменти колагенолітичні ферменти мікроорганізмів. *Біотехнологія.* 2008; 1(3): 13-23.

178. Ching-San Chen, Tsong-Rong Yan, Her-Yuan Chen. Purification and properties of trypsin-like enzymes and a carboxypeptidase a from *Euphausia superba*. *Journal of Food Biochemistry.* 1978;2:349-366.

179. Šimat V, Elabed N, Kulawik P, Ceylan Z, Jamroz E, Yazgan H, Čagalj M, Regenstein JM, Özogul F. Recent Advances in Marine-Based Nutraceuticals and Their Health Benefits. *Mar. Drugs.* 2020;18:627.

180. Vijay K E, Srijana M, Kiran K K, Harikrishna N, Reddy G. A novel serine alkaline protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application as a dehairing agent. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2011; 34: 403-409.

181. Guleria S, Walia A, Chauhan A, Shirkot C. K. Purification and characterization of detergent stable alkaline protease from *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 isolated from apple rhizosphere. *J Basic Microbiol.* 2016; 56(2): 138-152.

182. Salihi A, Asoodeh A, Aliabadian M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *Int J Biol Macromol.* 2017; 94(Pt B): 827-835.

183. Ni X, Chi Z, Ma C, Madzak C. Cloning, characterization, and expression of the gene encoding alkaline protease in the marine yeast *Aureobasidium pullulans* 10. *Mar. Biotechnol.* 2008; 10(3): 319-327.

184. Elhoul M B et al. A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650. *Int J Biol Macromol.* 2015; 79: 871-882.

185. Li JL, Yu QL, Zhang L, Liu LL, Guo ZB. Purification and characteristics of trypsin from the pancreas of tibetan sheep. *Journal of Food Biochemistry*. First published: 23 September 2011 <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00588.x>
186. Kanno G, Yamaguchi T, Kishimura H, Yamaha E, Saeki H. Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh-water. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2010; 36:637-645.
187. Castillo-Yanez FJ, Pacheco-Aguilar R, Garcia-Carreno FL et al. Isolation and characterization of trypsin from pyloric ceca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comp Biochem Physiol*. 2005;140B:91-98.
188. Jesús-de la Cruz K, Álvarez-González CA, Peña E, Morales-Contreras JA, Ávila-Fernández Á. Fish trypsins: potential applications in biomedicine and prospects for production. *3 Biotech*. 2018;8(4):186.
189. Kasana RC. Proteases from psychrotrophs: an overview. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36:134-145.
190. Arcus VL, van der Kamp MW, Pudney CR, Mulholland AJ. Enzyme evolution and the temperature dependence of enzyme catalysis. *Curr Opin Struct Biol*. 2020;65:96-101.
191. Bhatia RK, Ullah S, Hoque MZ et al. Psychrophiles: a source of cold-adapted enzymes for energy efficient biotechnological industrial processes. *J Environ Chem Eng*. 2021;9:104607.
192. Bougatef A. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications - comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*. 2013; 57:257-265.
193. Cold-Adapted Enzymes: Fundamentals and Biotechnological Aspects. January 2009. Editors: Meshram, S.U. and Shinde, G.B. In book: *Applied Biotechnology*. Chapter: 22. Publisher: I.K. International Publishing House Pvt. Limited.
194. Joshi S, Satyanarayana T. Biotechnology of cold-active proteases. *Biology*. 2013;2:755-783.



195. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*. 2002; 102(12):4501-24.
196. Pancer Z, Leuck J, Rinkevich B, Steffen R, Muller I, Muir WEG. Molecular cloning and sequence analysis of two cDNA coding for putative anionic trypsinogen from the colonial urochordate *Botryllus schlosseri* (Ascidacea). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1996;5(4): 326-333.
197. Kimoto K, Kusama S, Murakami K. Purification and characterization of serine proteinases from *Euphausia superba*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1983;47:529-534.
198. Sainz J, García-Carreño F, Hernández-Cortés P. *Penaeus vannamei* isotrypsins: Purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 2004;138:155-162.
199. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. In: *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY, USA: 2009.
200. Di Cera F. Serine Proteases. *IUBMB Life*. 2009; 61:510-515.
201. Silvestre M, Morais H, Silva V. Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2013;38(3):278-290.
202. Asgeirsson B, Cekan P. Microscopic rate-constants for substrate binding and acylation in cold-adaptation of trypsin I from Atlantic cod. *FEBS Letters*. 2006;580:4639-4644.
203. Bakermans C, Tollaksen S, Giometti C, Wilkerson C, Tiedje J, Thomashow M. Proteomic analysis of *Psychrobacter cryohalolentis* K5T during growth at subzero temperatures. *Extremophiles*. 2007;11:343-354.
204. Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2002;59:15-32.

205. Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FI, Navarrete Del Toro M. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterrey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem Mol. Biol.* 2005;140: 91-98.
206. Guizani N, Rolle RS, Marshall MR, Wei CI. Isolation and characterization of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1991;98:517-521.
207. Kurtovic I, Marshall SN, Simpson BK. Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric caeca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol.* 2006; 143:432-440.
208. Balti R, Barkia A, Bougategf A, Ktari N, Nasri M. A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterisation. *Food Chem.* 2009;113: 146-154.
209. Ahmad F, Coleman SK, Kaila K, Blaesse P. Coldadapted protease enables quantitation of surface proteins in the absence of membrane trafficking. *BioTechniques.* 2011;50(4):255-257.
210. Benjamin DC, Kristjansdottir S, Gudmundsdottir A. Increasing the thermal stability of euphauserase: a cold active and multifunctional serine protease from Antarctic krill. *Eur J Biochem.* 2001;268(1):127-131.
211. Feller G. Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(4): 648-662.
212. Gerike U, Danson MJ, Hough DW. Cold-active citrate synthase: mutagenesis of active-site residues. *Protein Eng.* 2001;1489: 655-661.
213. Gudmundsdottir A. Cold-adapted and mesophilic brachyurins. *Biol Chem.* 2002;383(7-8):1125-1131.
214. DeMaayer P, Anderson D, Cary C, Cowan D. Somelike it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports.* 2014;15(5):508-17.

215. Leiros H, Willassen N, Smalas A. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. Elucidating the molecular basis of cold-adaptation European Journal of Biochemistry. 2000;267:1039-1049.
216. Genicot S, Feller G, Gerday C. Trypsin from antarctic fish (*Papanotothenia magellanica* forster) as compared with trout (*Salmo gairdneri*) trypsin. Comparative Biochemistry and Physiology. 1988;90:601-609.
217. Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. Trends in Biotechnology. 2000;18(3):103-107.
218. Leiros HKS, Willassen NP, Smalas AO. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins: elucidating the molecular basis of cold-adaptation. European Journal of Biochemistry. 2000;267(4): 1039-1049.
219. Simpson BK, Haard NF. Trypsin from Greenland cod, *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem Mol. Biol. 1984;79: 613-622.
220. Klomklao S, Benjakul S. Two trypsin isoforms from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) liver: Purification and physicochemical and biochemical characterization, International Journal of Biological Macromolecules. 2018;107:1864-1870.
221. Genicot S, Feller G, Gerday C. Trypsin from antarctic fish (*Papanotothenia magellanica* forster) as compared with trout (*Salmo gairdneri*) trypsin. Comparative Biochemistry and Physiology. 1988;90:601-609.
222. Osnes K, Mohr V. On the purification and characterization of three anionic, serine-type peptide hydrolases from Antarctic krill, *Euphausia superba*, Comparative Biochemistry and Physiology. 1985;82(B):607-619.
223. Bode W, Schwager P. The refined crystal structure of bovine betatrypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. Journal of Molecular Biology. 1975;98:693-717.
224. El Hadj Ali N, Hmidet N, Bougatef A, Nasri R, Nasri M. A Laundry Detergent-Stable Alkaline Trypsin from Striped Seabream (*Lithognathus*

- mormyrus) Viscera: Purification and Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57:10943-10950.
225. Balti R, Barkia A, Bougatef A, Ktari N, Nasri M. A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterization. *Food Chemistry*. 2009;113:146-154.
226. Guizani N, Marshall M, Wei C. Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the hepatopancreas of crayfish (*Procambarus clarkii*) *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 1992;103(4):809-815.
227. Kishimura H, Hayashi K. Isolation and characteristics of trypsin from pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2002;132(2):485-90.
228. Bjelic S, Brandsdal BO, Aqvist J. Cold adaptation of enzyme reaction rates. *Biochemistry*. 2008;47(38):10049-57.
229. Siddiqui KS, Cavicchioli R. Cold-adapted enzymes. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:403-33.
230. Thachil J, Tang N, Gando S, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J. Thromb Hemost*. 2020; 18(5): 1023-1026.
231. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(4): 844-847.
232. Huan H, Lan Y, Liu R, et al. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-Cov2 infection. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58(7): 1116-1120.
233. Oden A, Fahlen M. Oral anticoagulation and risk of death: a medical record lineage study. *BMJ*. 2002;325:1073-1075.
234. Fitzmaurice DA, Blann AD, Lip GY. Bleeding risks of antithrombotic therapy. *BMJ*. 2002;325:828-831.

235. Blann AD, Landray MJ, Lip GY. An overview of antithrombotic therapy. *BMJ*. 2002;325:762-765.
236. Altaf F, Wu S, Kasim V. Role of Fibrinolytic Enzymes in Anti-Thrombosis Therapy. *Front Mol Biosci*. 2021;8:680397.
237. Kumar SS, Sabu A. Fibrinolytic Enzymes for Thrombolytic Therapy. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1148:345-381.
238. Toombs CF, Deitcher SR. Nonclinical and clinical characterization of a novel acting thrombolytic: Alfimeprase. *Toxin Rev*. 2006;25:375-388.
239. Amiconi G, Amoresano A, Boumis G, Brancaccio A, De Cristofaro R, De Pascalis A, Di Girolamo S, Maras B, Scaloni A. A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. *Biochemistry*. 2000;39:10294-10308.
240. Petretski JH, Kanashiro M, Silva CP, Alves EW, Kipnis TL. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33:1293-1300.
241. Jin Y, Lu QM, Wei JF, Li DS, Wang WY, Xiong YL. Actions of two serine proteases from *Trimeresurus jerdonii* venom on chromogenic substrates and fibrinogen. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2002;132:529-534.
242. Komori Y, Tanaka K, Nikai T. Characterization of Habu thrombin-like enzyme (THLE) with a new n-terminal sequence from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu). *J Nat Toxins*. 2002;11:205-212.
243. Mihara H, Sumi H, Akazawa K. Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm. *Thromb Haemostasis*. 1983;50:258-263.
244. Xu Y, Liang G, Sun Z, Chen F, Fu SH, Chai YB, Hou YD. Cloning and expression of the novel gene-PV242 of earthworm fibrinolytic enzyme. *Prog Biochem Biophys*. 2002;29:610-614.

245. Wang F, Wang C, Li M, Gui L, Zhang J, Chang W. Purification, characterization and crystallization of a group of earthworm fibrinolytic enzymes from *Eisenia fetida*. *Biotechnol Lett*. 2003;25:1105-1109.
246. Dametto M, David AP, Azzolini SS, Campos ITN, Tanaka AM, Gomes A, Andreotti R, Tanaka AS. Purification and characterization of a trypsin-like enzyme with fibrinolytic activity present in the abdomen of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *J Protein Chem*. 2000;19:515-521.
247. Ahn MY, Hahn BS, Ryu KS. Purification and characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from the dung beetles, *Catharsius molossus*. *Thromb Res*. 2003;112:339-347.
248. Pinto AF, Dobrovolski R, Veiga AB, Guimaraes JA. Lonofibrase, a novel alpha-fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thromb Res*. 2004;113:147-154.
249. Zhang S, Wang Y, Zhang N, Sun Z, Shi Y, Cao X, Wang H. Purification and Characterisation of a Fibrinolytic Enzyme from *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus*. *Food Technol Biotechnol*. 2015;53(2): 243–248.
250. Aníbia Vicente da Silva, Jéssica Miranda do Nascimento, Cláudio Henrique Rodrigues, Débora Cristina Silva Nascimento, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa, Daniela de Araújo Viana Marques, Ana Cristina Lima Leite, Márcia do Vale Barreto Figueiredo, Lorenzo Pastrana, Attilio Converti, Thiago Pajeú Nascimento, Ana Lúcia Figueiredo Porto. Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;27:101669.
251. Kolodziejczyk-Czepas J, Czepas J. Plant-Derived Compounds and Extracts as Modulators of Plasmin Activity - A Review. *Molecules* 2023;28(4):1677.
252. Choi HS, Sa YS. Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum*. *Mycologia*. 2000;92:545-552.

253. Batomunkueva BP, Egorov NS. Isolation, purification and resolution of the extracellular proteinase complex of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities. *Microbiology*. 2001;70:519-522.
254. Kim JH, Kim YS. Characterization of a metalloenzyme from a wild mushroom, *Tricholoma saponaceum*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001;65:356-362.
255. Jeon OH, Moon WJ, Kim DS. An anticoagulant fibrinolytic protease from *Lumbricus rubellus*. *J Biochem Mol Biol*. 1995;28:138-142.
256. Rajapakse N, Jung W, Mendis E. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Science*. 2005;76:2607-2619.
257. Jo H, Jung W, Kim S. Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, *Urechis unicinctus*. *Process Biochemistry* 2008;43:179-184.
258. Juang W, Kim S. Isolation and characterisation of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Food chemistry*. 2009;117:687-692.
259. Swenson S, Bush LR, Markland FS. Chimeric derivative of fibrolase, a fibrinolytic enzyme from southern copperhead venom, possesses inhibitory activity on platelet aggregation. *Arch Biochem Biophys*. 2000;384(2):227-37.
260. Shiu Nan Chen, Chung Lun Lu, Jung Fu Wu, Sherwin Chen. Process of producing fibrinolytic enzyme from mushroom. 2009; <https://patents.google.com/patent/US20100279353>.
261. Costa JO, Petri CB, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo MI, Oliveira CZ, Soares AM, Oliveira F. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 2007;13(3):640-654.
262. Deng Z, Wang S, Li Q, Ji X, Zhang L, Hong M. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from the polychaete, *Neanthes japonica* (Iznka). *Bioresource Technology*. 2010;101:1954-1960.

263. Skopes R. Dye-ligands and multifunctional adsorbents; An empirical approach to affinity chromatography. Review. Analytical Biochemistry. 1987;165(2):235-246.
264. Peichoto ME, Teibler P, Mackessy SP, Leiva L, Goncalves LRC, Tanaka-Azevedo AM, Santoro ML. Purification and characterization of patagonfibrase, metalloproteinase showing  $\alpha$ -fibrinogenolytic and hemorrhagic activities, from *Philodryas patagoniensis* venom. Biochimica et Biophysica Acta. 2007;1770:810-819.
265. Lee H, Jung ES, Kang C, Yoon WD, Kim JS, Kim E. Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. Toxicon. 2011;58(3):277-84.
266. Bae SK, Lee H, Heo Y, Pyo MJ, Choudhary I, Han CH, Yoon WD, Kang C, Kim E. In vitro characterization of jellyfish venom fibrin(ogen)olytic enzymes from *Nemopilema nomurai*. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2017;23:35.
267. Zheng W, Wang X, Cao W, Yang B, Mu Y, Dong Y, Xiu Z. E-configuration structures of EPA and DHA derived from *Euphausia superba* and their significant inhibitive effects on growth of human cancer cell lines in vitro. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2017;117:47-53.
268. Colletti A, Cravotto G, Citi V, Martelli A, Testai L, Cicero AFG. Advances in Technologies for Highly Active Omega-3 Fatty Acids from Krill Oil: Clinical Applications. Mar Drugs. 2021;19(6):306.
269. Qiu Y, Choo YM, Yoon HJ, Jia J, Cui Z, Wang D, Kim DH, Sohn HD, Jin BR. Fibrin(ogen)olytic activity of bumblebee venom serine protease. Toxicology and Applied Pharmacology. 2011;255:207-213.
270. Costa JO, Petri CB, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo MI, Oliveira CZ, Soares AM, Oliveira F. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 2007;13(3):640-654.



271. Swenson S, Markland FS. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Jr Toxicon*. 2005;45:1021-1039.
272. Bello CA, Hermogenes ALN, Magalhaes A, SS Veiga, Gremski LH, Richardson M, Sanchez EF. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie*. 2006;88(2):189-200.
273. Leonardi A, Aragon-Ortiz F, Gubensek F, Krizaj I. Partial primary structure of a fibrinogenase from the venom of the snake *Lachesis stenophrys*. *J. Chromatogr. A*. 1999;852(1):237-243.
274. Lee JW, Seu JH, Rhee IK, Jin I, Kawamura Y, Park W. Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1999;260(3):665-670.
275. Kim SH, Choi NS. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000;64:1722-5.
276. Bae SK, Lee H, Heo Y, Pyo MJ, Choudhary I, Han CH, Yoon WD, Kang C, Kim E. In vitro characterization of jellyfish venom fibrin(ogen)olytic enzymes from *Nemopilema nomurai*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2017;23:35.
277. Liang X, Zhou Y, Chen J, Qiu P, Chen H, Sun H, Wu Y, Yan G. Enzymological characterization of FII(a), a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005;26:1474–1478.
278. Giron M, Rodríguez-Acosta A, Salazar A, Sánchez E, Galán J, Ibarra C, Guerrero B. Isolation and characterization of two new non-hemorrhagic metalloproteinases with fibrinogenolytic activity from the mapanare (*Bothrops colombiensis*) venom. *Archives of Toxicology*. 2013;87:197.
279. Costa J, Petri C, Hamaguchi A. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. *Journal of*

Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases Dis. 2007;13(3):640-654.

280. Chiuri R, Maiorano G, Rizzello A, Del Mercato LL, Cingolani R, Rinaldi R. Exploring Local Flexibility/Rigidity in Psychrophilic and Mesophilic Carbonic Anhydrases. *Biophys J*. 2009;96:1586-96.

281. Benrezkallah D, Sediki H, Krallafa AM. The structural flexibility of cold- and warm-adapted enzymes (endonucleases i) by molecular dynamics simulation. *Chem. Proc.*2021;3:128.

282. Siglioccolo A, Gerace R, Pascarella S. “Cold spots” in protein cold adaptation: Insights from normalized atomic displacement parameters (B'-factors). *Biophys Chem*. 2010;153(1):104-14.

283. Скалка ВВ, Краснобрижая ЕН, Волков ГЛ, Гаврилюк СП, Жукова АИ, Нандинцэцэг Н, Туваансурэн Ч, Ганболд О, Буянбадрах Б, Бямбасурэн С, Дашням П, Дармостук МС, Гаврилюк ЕС. Получение и характеристика фибрино(гено)литического фермента из яда щитомордника рода *Agkistrodon blomhoffi*. *Биофармацевтический журнал*. 2010;2(2):32-39.

284. Altaf F, Wu S, Kasim V. Role of Fibrinolytic Enzymes in Anti-Thrombosis Therapy. *Front Mol Biosci*. 2021;8:680397.

285. Bennett JS. Platelet -fibrinogen interactions. *Ann NY Acad Sci*. 2001;936:340-54.

286. Ni H, Yuen PS, Papalia JM, Trevithick JE, Sakai T, Fassler R, Hynes RO, Wagner DD. Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2415-9.

287. Yang H, Reheman A, Chen P, Zhu G, Hynes RO, Freedman J, Wagner DD, Ni H. Fibrinogen and von Willebrand factor-independent platelet aggregation in vitro and in vivo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4:2230-2237.

288. Lisman T, Weeterings C, G. de Groot P. Platelet aggregation: involvement of thrombin and fibrin(ogen). *Frontiers in Bioscience*. 2005;2504-2517.

289. Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW, Davie EW. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(22): 10729-10732.
290. Белицер НВ, Анищук МГ, Веклич ЮИ и др. Роль экзогенного фибриногена в процессах дегрануляции тромбоцитов, стимулированных тромбином. Ультраструктурное исследование с применением фибриногена, меченного коллоидным золотом. *Цитол. и генетика*. 1992;26(1):3-8.
291. Foreman RE, George AL, Reimann F, Gribble FM, Kay RG. Peptidomics: a review of clinical applications and methodologies. *J Proteome Res*. 2021;20(8):3782-3797.
292. Schulz-Knappe P, Schrader M, Zucht HD. The peptidomics concept. *Comb Chem High Throughput Screen*. 200;8(8):697-704.
293. Kumar MS. Peptides and peptidomimetics as potential antiobesity agents: overview of current status. *Front. Nutr., Sec. Nutrition and Food Science Technology*. 2019;6.
294. Shenoy M, Abdul NS, Qamar Z, Al Bahri BM, Al Ghalayini KZK, Kakti A. Collagen structure, synthesis, and its applications: a systematic review. *Cureus*. 2022;14(5):e24856.
295. Barati M, Jabbari M, Navekar R, Farahmand F, Zeinalian R, Salehi-Sahlabadi A, Abbaszadeh N, Mokari-Yamchi A, Davoodi SH. Collagen supplementation for skin health: A mechanistic systematic review. *J Cosmet Dermatol*. 2020;19(11):2820-2829.
296. Silva TH, Moreira-Silva J, Marques AL, Domingues A, Bayon Y, Reis RL. Marine origin collagens and its potential applications. *Mar. Drugs*. 2014;12:5881-5901.
297. Cruz MA, Araujo TA, Avanzi IR, Parisi JR, de Andrade ALM, Rennó ACM. Collagen from marine sources and skin wound healing in animal experimental studies: A Systematic Review. *Mar. Biotechnol*. 2021;23:1-11.

298. Lodish H, Berk A, Zipursky S. Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix. *Molecular Cell Biology*, 4th edition. New York: W.H. Freeman. 2000.
299. Yamada S, Yamamoto K, Ikeda T, Yanagiguchi K, Hayashi Y. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. *BioMed Res Int*. 2014;302932.
300. Woo M, Song YO, Keon-Hee Kang KH, Noh JS. Anti-obesity effects of collagen peptide derived from skate (*raja kenoei*) skin through regulation of lipid metabolism. *Mar Drugs*. 2018;16(9):306.
301. Lim YS, Ok YJ, Hwang SY, Kwak JY, Yoon S. Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications. *Mar. Drugs*. 2019;17:467.
302. Yamauchi M, Sricholpech M. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem*. 2012;52:113-133.
303. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2004;71B:343-354.
304. Gauza-Włodarczyk M, Kubisz L, Mielcarek S, Włodarczyk D. Comparison of thermal properties of fish collagen and bovine collagen in the temperature range 298-670 K. *Mater. Sci. Eng. C*. 2017;80:468-471.
305. Nasri M. Protein hydrolysates and biopeptides: production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A Review. *Adv Food Nutr Res*. 2017;81:109-159.
306. Jia L , Wang L , Liu C , Liang Y , Lin Q . Bioactive peptides from foods: production, function, and application. *Food Funct*. 2021;12(16):7108-7125.
307. Reilly JJ, El-Hamdouchi A, Diouf A, Monyeki A, Somda SA. Determining the worldwide prevalence of obesity. *Lancet*. 2018;391:1773-4.
308. Kessler C. Pathophysiology of Obesity. *Nurs Clin North Am*. 2021;56(4):465-478.
309. Kumar R, Mal K, Razaq MK, Magsi M, Memon MK, Memon S, Afroz MN, Siddiqui HF, Rizwan A. Association of leptin with obesity and insulin resistance. *Cureus*. 2020;12(12):e12178.

310. van der Valk ES, Kleinendorst L, Delhanty PJD, van der Voorn B, Visser JA, van Haelst MM, de Graaff LCG, Huisman M, White A, Ito S, Wakamatsu K, de Rijke YB, van den Akker ELT, Iyer AM, van Rossum EFC. Obesity and hyperphagia with increased defective ACTH: A Novel POMC Variant. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(9):e3699-e3704.
311. Cudennec B, Ravallec-Plé R, Courois E, Fouchereau-Peron M. Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chem.* 2008;111:970-5.
312. Moran TH. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition.* 2000;16(10):858-865.
313. Nongonierma AB, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF, FitzGerald RJ. Milk protein hydrolysates activate 5-HT(2C) serotonin receptors: influence of the starting substrate and isolation of bioactive fractions. *Food Funct.* 2013;4(5):728-37.
314. Seale P, Lazar M. Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. *Diabetes.* 2009;58(7):1482-1484.
315. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(4):371-6.
316. Pogodziński D, Ostrowska L, Smarkusz-Zarzecka J, Zyśk B. Secretome of adipose tissue as the key to understanding the endocrine function of adipose tissue. *Int J Mol Sci.* 2022;23(4):2309.
317. Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2021;320(3):C375-C391.
318. Hopkins SJ. The pathophysiological role of cytokines. *Leg Med (Tokyo).* 2003;5(1):45-57.
319. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: from clinical significance to quantification. *Adv Sci (Weinh).* 2021;8(15):e2004433.
320. Barazzoni R, Cappellari GG, Ragni M, Nisoli E. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eat Weight Disord.* 2018;23(2):149-157.

321. Zhu CF, Li GZ, Peng HB, Zhang F, Chen Y, Li Y. Treatment with marine collagen peptides modulates glucose and lipid metabolism in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2010;35(6):797-804.
322. Sasaoka Y, Takagi T, Michiba S, Yamamoto Y, Kumagai Y, Kishimura H. Study on the mechanism of the blood-glucose-lowering effect of collagen peptides from sturgeon by-products. *Mar Drugs*. 2021;19(10):584.
323. Chattopadhyay S, Raines RT. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*. 2014;101(8):821-833.
324. Zeng S, Yin J, Yang S, Zhang C, Yang P, Wu W. Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). *Food Chem*. 2012;135(3):1975-84.
325. Singh P, Benjakul S, Maqsood S, Kishimura H. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chem*. 2011;124(1):97-105.
326. Шапринський ВО, Скальський СС, Паламарчук СВ, Шапринський ЄВ. Сучасні підходи до лікування гнійних ран. Невирішені проблеми. Шпитальна Хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука. 2015;3:70-73.
327. Cheng S, Yu X, Zhang Y. Extraction of polysaccharides from *Mytilus edulis* and their antioxidant activity in vitro. *Shipin Gongye Keji*. 2010;31:132-134.
328. Lordan S, Ross RP, Stanton C. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar. Drugs*. 2011;9:1056-1100.
329. Ganesan P, Noda K, Manabe Y, Ohkubo T, Tanaka Y, Maoka T, et al. Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011;1810:497-503.
330. Lovejoy DA, Hogg DW, Dodsworth TL, Jurado FR, Read CC, D'Aquila AL, Baryte-Lovejoy D. Synthetic peptides as therapeutic agents: lessons learned from evolutionary ancient peptides and their transit across blood-brain barriers. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:730.

331. Kaspar AA, Reichert JM. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discov. Today*. 2013;18:807-817.
332. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm. Res.* 2010; 27:544-575.
333. Larsen B. Zealand Pharma A/S. Pharmacologically active peptide conjugates having a reduced tendency towards enzymatic hydrolysis. US 6,528,486 B1, WO 99/46283
334. Mayer A, Rodríguez A, Taglialatela-Scafati O, Fusetani N. Marine pharmacology in 2009-2011: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar. Drugs*. 2013; 11:2510-2573.
335. Schmidt AM. Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 Apr;39(4):558-568.
336. Koliaki C, Liatis S, Kokkinos A. Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship. *Metabolism*. 2019;92:98-107.
337. Kima SK, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J Functional Foods*. 2010;2:1-9.
338. Bougatef N, Nedjar-Arroume L, Manni. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*. 2010;118(3):559-565.
339. Su Y. Isolation and identification of pelteobagrins, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;158(2):149-154.
340. Zou ZV. Antioxidants promote intestinal tumor progression in mice. *Antioxidants*. 2021;10:241.
341. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta*. 2008;613:1-19.

342. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002;127:183-198.
343. Shen Y, Ai HX, Song R, Liang ZN, Li JF, Zhang SQ. Expression and purification of moricin CM4 and human beta-defensins 4 in *Escherichia coli* using a new technology. *Microbiol Res*. 2010;165(8):713-8.
344. Ajibola CF, Fashakin JB, Fagbemi TN, Aluko RE. Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(10):6685-6702.
345. Duan X, Ocen D, Wu FF, Li M, Yang N, Xu J, Chen HY, Huang LQ, Jin ZY, Xu XM. Purification and characterization of a natural antioxidant peptide from fertilized eggs. *Food Res*. 2014;56:18-24.
346. Xie Z, Huang J, Xu X, Jin Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 2008;111:370-376.
347. Escudero E, Sentandreu MA, Toldrá F. Characterization of peptides released by in vitro digestion of pork meat. *J. Agric. Food Chem*. 2010;58:5160-5165.
348. Chen C, Chi Y-J, Zhao M-Y, Lv L. Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. *Amino Acids*. 2012;43:457-466.
349. Liu Q, Kong B, Xiong YL, Xia X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chem*. 2010;118:403-410.
350. Vorland LH. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. *APMIS* 1999;107:971-981.
351. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(1):44-84.
352. Mena S, Ortega A, Estrela J. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2009;674(1):36-44.



353. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757-772.
354. Sayin VI. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci. Transl Med*. 2014;6:221-215.
355. Le Gal K. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Sci. Transl Med*. 2015;7:308-308.
356. Pan M, Jiang TS, Pan JL. Antioxidant activities of rapeseed protein hydrolysates. *Food Bioprocess Technol*. 2011;4:1144-1152.
357. Hu P, Xu S, Chen M, Wang S, Hong J, Chen T, Cai T. Preparation and Characterization of Antioxidant Peptides from Carrot Seed Protein. *Journal of Food Quality*. 2018;Article ID 8579094.
358. Liu R, Xing L, Fu Q, Zhou GH, Zhang WG. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. *Antioxidants*. 2016;5:32.
359. Pownall TL, Udenigwe CC, Aluko RE. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *J. Agric. Food Chem*. 2010;58:4712-4718.
360. Pena-Ramos EA, Xiong YL. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. *J. Dairy Sci*. 2001;84:2577-2583.
361. Mendis E, Niranjan Rajapakse A, Kim SK. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem*. 2005;53:581-587.
362. Uchida K, Kawakishi S. Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper (II)/ascorbate. *J. Agric. Food Chem*. 1992;40:13-16.
363. Subramaniam S, Scharrer I. Procoagulant activity during viral infections. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;23(6):1060-1081.
364. Sathler PC. Hemostatic abnormalities in COVID-19: A guided review. *An Acad Bras Cienc*. 2020;92(4):e20200834.

365. Słomka A, Kowalewski M, Żekanowska E. Hemostasis in coronavirus disease 2019-lesson from viscoelastic methods: a systematic review. *Thromb Haemost.* 2021;121(9):1181-1192.
366. Shimizu M, Sawashita N, Morimatsu F, Ichikawa J, Taguchi Y, Ijiri Y, Yamamoto J. Antithrombotic papainhydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thrombosis Research.* 2009;123:753-757.
367. Kong Y, Huang SL, Shao Y, Li S, Wei JF. Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2013;145:182-186.
368. Tran TV, Hoang AN, Nguyen TTT, Phung TV, Nguyen KC, Osipov AV, Ivanov IA, Tsetlin VI, Utkin YN. Anticoagulant activity of low-molecular weight compounds from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxins.* 2017;9:343.
369. Mendis E, Rajapakse N, Kim SK. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolyzate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005;53:581-587.
370. Jung WK, Kim SK. Isolation and characterization of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Food Chemistry.* 2009;117:687-692.
371. Kim SK. *Marine proteins and peptides - Biological activities and applications* (1st ed.). 2013; JohnWiley & Sons, Ltd. Wiley-Blackwell Publishers.
372. Rajapakse N, Jung WK, Mendis E, Moon SH, Kim SK. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences.* 2005;76:2607-2619.
373. Dempfle CE, Bindeballe N, Nchbach M, Blume C, Borggreffe M, Mosesson MW. Changes in fibrinogen and fibrin induced by a peptide analog of fibrinogen. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2019;5:1707-1714.
374. Laudano AP, Doolittle RF. Studies on synthetic peptides that bind to fibrinogen and prevent fibrin polymerization. Structural requirements, number of binding sites, and species differences. *Biochemistry.* 1980;19:1013-9.

375. Laudano AP, Doolittle RF. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978;75:3085-9.
376. Kirschbaum NE, Mosesson MW, Amrani DL. Characterization of the gamma chain platelet binding site on fibrinogen fragment D. *Blood*. 1992;79:2643-8.
377. Gartner TK, Loudon R, Taylor DB. The peptides APLHK, EHIPA and GAPL are hydrophatically equivalent peptide mimics of a fibrinogen binding domain of glycoprotein IIb/IIIa. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;180:1446-52.
378. Колодзейская МВ, Соколовская ЛИ, Чернышенко ВА, Луговской ЭВ. Тромбин и антикоагулянтная терапия. *Укр. біохім. журн*. 2009; 81(2).
379. Fenton II JW, Olson TA, Zabinski MP, Wilner GD. Anion-binding exosite of human  $\alpha$ -thrombin and fibrin(ogen) recognition. *Biochemistry*. 1988;27(18):7106-7112.
380. Naski MC, Fenton II JW, Maraganore JM, Olson ST, Shafer JA. The COOH-terminal domain of hirudin. An exosite-directed competitive inhibitor of the action of  $\alpha$ -thrombin on fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(23):13484-13489.
381. Koh CY, Kazimirova M, Trimmell A, Takac P, Labuda M, Nuttall PA, Kini RM. Variegin, a novel fast and tight binding thrombin inhibitor from the tropical bont tick. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2007;282(40):29101-29113.
382. Cunha FM, Berti DA, Ferreira ZS, Markus RP, Ferro ES. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2008;283(36):24448-24459.
383. Shpakov AO. Signal protein-derived peptides as functional probes and regulators of intracellular signaling. *Journal of Amino Acids*. 2011;Article ID 656051, 25.
384. Li XX, Han LJ, Chen LJ. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *J Sci Food Agric*. 2008;88:1660-6.

385. Fazhi X, Huihui P, Yang L, Lumu L, Kun Q, Xioling D. Separation and purification of small peptides from fermented sesame meal and their antioxidant activities. *Protein Pept Lett.* 2014;21:966-74.
386. Toldra F, Reig M, Aristoy MC, Mora L. Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chem.* 2018;267:395-404.
387. Esfandi R, Walters ME, Tsopmo A. Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. *Heliyon.* 2019;5:e01538.
388. Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:3661-3667.
389. Sun Y, Pan D, Guo Y, Li J. Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. *Food Chem. Toxicol.* 2012;50:3397-3404.
390. Di Bernardini R, Mullen AM, Bolton D, Kerry J, O'Neill E, Hayes M. Assessment of the angiotensin-i-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmic proteins produced by papain and characterisation of associated bioactive peptidic fractions. *Meat Sci.* 2012;90:226-235.
391. Kim E-K, Lee S-J, Jeon B-T, Moon S-H, Kim B, Park T-K, Han J-S, Park P-J. Purification and characterisation of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein. *Food Chem.* 2009;114:1365-1370.
392. Webb K, Dirienzo D, Matthews J. Recent developments in gastrointestinal absorption and tissue utilization of peptides: A review. *J. Dairy Sci.* 1993;76:351-361.
393. Rubas W, Grass GM. Gastrointestinal lymphatic absorption of peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1991;7:15-69.
394. Roberts PR, Burney JD, Black KW, Zaloga GP. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion.* 1999;60:332-337.

395. Han CY, Umemoto T, Omer M, Den Hartigh LJ, Chiba T, LeBoeuf R. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. *J Biol Chem.* 2012;287:10379-93.
396. Den Hartigh LJ, Omer M, Goodspeed L, Wang S, Wietecha T, O'Brien KD. Adipocyte-specific deficiency of NADPH oxidase 4 delays the onset of insulin resistance and attenuates adipose tissue inflammation in obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:466-75.
397. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114:1752-61.
398. Sakurai T, Ogasawara J, Shirato K, Izawa T, Oh-Ishi S, Ishibashi Y. Exercise training attenuates the dysregulated expression of adipokines and oxidative stress in white adipose tissue. *Oxid Med Cell Longev.* 2017:9410954.
399. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114:1752-61.
400. Lee H, Lee YJ, Choi H, Ko EH, Kim JW. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J. Biol. Chem.* 2009;284:10601-10609.
401. Higuchi M, Dusting GJ, Peshavariya H, Jiang F, Hsiao ST, Chan EC, Liu GS. Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and forkhead box o1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells Dev.* 2013;22:878-888.
402. Timper K, Brüning JC. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. *Dis. Model. Mech.* 2017;10:679-689.
403. Drougard A, Fournel A, Valet P, Knauf C. Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front Neurosci.* 2015;9:56.

404. Horvath TL, Andrews ZB, Diano S. Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009;20:78-87.
405. Čolak E, Pap D. The role of oxidative stress in the development of obesity and obesity-related metabolic disorders. *J. Med. Biochem.* 2021;40:1-9.
406. Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmun Rev.* 2014;13(9):981-1000.
407. Khayat A., Vitola B. Prevalence and clinical significance of autoantibodies in children with overweight and obesity with nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr.* 2021;239:155-160.
408. Brown LA, Kerr CJ, Whiting P, Finer N, McEneny J, Ashton T. Oxidant stress in healthy normal-weight, overweight and obese individuals. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17(3):460-6.
409. Koboyasi R, Akamine EH, Davel AP, Rodrigues MA, Cavalho CR, Rossoni LV. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens.* 2010;28(10):2111-9.
410. Nakao C, Ookawara T, Sato Y, Kizaki T, Imazeki N, Matsubara O. Extracellular superoxide dismutase in tissues from obese (ob/ ob) mice. *Free Radic Res.* 2000;33(3):229-41.
411. Nazeer RA, Kumar NS, Jai Ganesh R. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides.* 2012;35:261-268.
412. Kumar N, Rasool Abdul N, Jaiganesh R. In vivo antioxidant activity of peptide purified from viscera protein hydrolysate of horse mackerel (*Magalaspis cordyla*). *Int. J. Food Sci. Technol.* 2012;47:1558-1562.
413. Qian ZJ, Jung WK, Kim SK. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresour. Technol.* 2008;99(6):1690-1698.

414. Acquah C, Stefano ED, Udenigwe CC. Role of hydrophobicity in food peptide functionality and bioactivity. *J Food Bioactiv.* 2018;4:88-98.
415. Doğruer ZN, Unal M, Eskandari G, Pata YS, Akbaş Y, Cevik T, Cimen MY. Malondialdehyde and antioxidant enzymes in children with obstructive adenotonsillar hypertrophy. *Clin Biochem.* 2004;37:718-721.
416. Li SL, Valente AJ, Zhao SJ, Clark RA. PU.1 is essential for p47(phox) promoter activity in myeloid cells. *J Biol Chem.* 1997;272:17802-17809.
417. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114:1752-1761.
418. Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;591:66-72.
419. Xia E, Zhu X, Gao X, Ni J, Guo H. Antiaging potential of peptides from underused marine bioresources. *Mar. Drugs.* 2021;19:513.
420. Latorre R, Sternini C, De Giorgio R, Greenwood-Van Meerveld B. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol. Motil.* 2016;28:620-630.
421. Lénárd L, Karádi Z. Regulatory processes of hunger motivated behavior. *Acta Biol. Hung.* 2012;63(1):80-88.
422. Sam AH, Troke RC, Tan TM, Bewick GA. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology.* 2012;46-56.
423. Marić G, Gazibara T, Zaletel I, Labudović Borović M, Tomanović N, Cirić M, Puškaš N. The role of gut hormones in appetite regulation (review). *Acta Physiol. Hung.* 2014;395-407.
424. Sumara G, Sumara O, Kim JK, Karsenty G. Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. *Cell Metab.* 2012;16:588-600.

425. Donovan MH, Tecott LH. Serotonin and the regulation of mammalian energy balance. *Front Neurosci.* 2013;7(36):1-15.
426. Cudennec B, Ravallec-Plé R. Biological active peptides from marine sources related to gut hormones. *Current Protein and Peptide Science.* 2013;14(3).
427. Yadav VK. Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. *Nat Med.* 2010;16:308-312.
428. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* 2009;9:203-209.
429. Crane JD, Palanivel R, Mottillo EP, Bujak AL, Wang H, Ford RJ, Collins A, Blümer RM, Fullerton MD, Yabut JM, Kim JJ, Ghia JE, Hamza SM, Morrison KM, Schertzer JD, Dyck JRB, Khan WI, Steinberg GR. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat Med.* 2015;21(2):166-172.
430. Backhed F, Ding H, Wang T. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:15718-23.
431. Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut.* 2018;67:1716-25.
432. Li F, Jiang C, Krausz KW, et al. Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat Commun.* 2013;4:2384.
433. Anhk FF, Roy D, Pilon G, et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut.* 2015;64:872-83.
434. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res.* 2018;1693:128-133.
435. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Front Endocrinol.* 2020;11:25.



436. Plovier H, Cani PD. Enteroendocrine cells: metabolic relays between microbes and their host. In: *Endocrine Dev.* 2017;139-164.
437. Schalla MA, Stengel A. Effects of microbiome changes on endocrine ghrelin signaling - a systematic. *Peptides.* 2020;133.
438. Bo TB, Zhang XY, Wen J. The microbiota-gut-brain interaction in regulating host metabolic adaptation to cold in male Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). *ISME J.* 2019;13:3037-3053.
439. Zhanzhan L, Zhang B, Wang N, Zuo Z, Wei H, Zhao F. A novel peptide protects against diet-induced obesity by suppressing appetite and modulating the gut microbiota. *Gut.* 2022;0:1-13.
440. Wang J, Chen WD, Wang YD. The relationship between gut microbiota and inflammatory diseases: The role of macrophages. *Front. Microbiol.* 2020;11:1065.
441. De Bandt J, Waligora-Dupriet A, Butel M. Intestinal microbiota in inflammation and insulin resistance: relevance to humans. *Curr Opin Clin Nutr Metabol Care.* 2011.

**Наукові праці,  
в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Kalmukova O, Raksha N, Vovk N, Halenova T, Dzerzhynsky M, Mitrecic D, Savchuk O, Ostapchenko L. Low Molecular Mass Fragments of Collagen Improve Parameters Related to Mass and Inflammation of the Adipose Tissue in the Obese Rat. Food Technology and Biotechnology. 2023;61(1):51-63. DOI:10.17113/ftb.61.01.23.7926 (Scopus, **Q3**), *(здобувачем отримано низькомолекулярні фрагменти колагену з луски риб Антарктичного регіону та оцінено вплив їх вплив на індекс маси тіла тварин)*
2. Raksha N, Halenova T, Vovk T, Kostyuk O, Synelnyk T, Andriichuk T, Maievska T, Savchuk O, Ostapchenko L. Anti-obesity effect of collagen peptides obtained from Diplulmaris antarctica, a jellyfish of the Antarctic region. Croatian Medical Journal. 2023;64(1):21-28. DOI:10.3325/cmj.2023.64.21 (Scopus, **Q3**) *(здобувачем отримано колагенові пептиди з медузи, оцінено їх вплив на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та на показники, що характерні для стану інсулінорезистентності, інтерпретовано результати та підготовлено публікацію до друку)*
3. Raksha N, Halenova T, Vovk T, Beregova T, Maievska T, Tomchuk V, Savchuk O, Ostapchenko L. Isolation and partial characterization of serine proteases from jellyfish of the Antarctic region. Journal of Applied Biology and Biotechnology. 2023;11(2):144-150. DOI:10.7324/JABB.2023.110214 (Scopus, **Q3**) *(здобувачем розроблено методологію отримання фракції серинових протеїназ, досліджено їх температурний та рН оптимум, оцінено активність щодо різних білкових субстратів)*
4. Raksha N, Kalmukova O, Vovk T, Halenova T, Dzerzhynsky M, Savchuk O, Ostapchenko L. Effects of peptides derived from the Antarctic scallop Adamussium

colbecki on obese rats' adipose tissue histophysiology. Carpathian Journal of Food Science and Technology. 2021;13(4):24-34. DOI:10.34302/crpjfst/2021.13.4.3 (Scopus) (здобувачем отримано фракцію гідролізних пептидів, оцінено вплив пептидів на показники, що асоційовані з розвитком ожиріння)

5. Raksha N, Halenova T, Vovk T, Savchuk O, Tomchuk V, Maievskaya T, Ostapchenko L. Biologically active peptides derived from the Antarctic hydrobionts. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2021;11(08):126-133. DOI:10.7324/JAPS.2021.110817 (Scopus, Q2) (здобувачем отримано фракцію ендогенних пептидів з гідробіонтів *Nacella concinna*, *Euphausia superba*, *Diplulmaris antarctica*, оцінено їх антиоксидантний потенціал, досліджено вплив на функціональну активність тромбіну та здатність фібриногену до полімеризації, інтерпретовано результати, підготовлено публікацію до друку)

6. Ракша Н, Маєвська Т, Савчук О. Одержання пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. 2021;1(84):38-43. (здобувачем оптимізовано метод отримання ендогенних пептидів з молекулярною масою нижче 5 кДа, підготовлено публікацію до друку)

7. Raksha N, Halenova T, Kravchenko O, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. Purification and biochemical characterization of Trypsin-like enzyme from Antarctic Hydrobiont *Adamussium colbecki*. Research Journal of Biotechnology. 2020;15(1):62-68. (Scopus) (здобувачем оптимізовано метод очищення трипсиноподібних ферментів з екстракту тканин гідробіонту *Adamussium colbecki*, проведено електрофоретичний аналіз одержаних ферментів, визначено температурний та рН оптимум, визначено кінетичні константи та підготовлено публікацію до друку)

8. Raksha N, Udovychenko I, Halenova T, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. Purification and biochemical characterization of fibrino(geno)lytic enzymes from tissues of Antarctic hydrobionts. Ukrainian Antarctic Journal. 2020;1:69-81.

DOI:10.33275/1727-7485.1.2020.380 (здобувачем очищено фібрино(гено)літичні ферменти з екстракту тканин гідробіонтів *Parborlasia corrugatus*, *Sterechinus neumayeri* та *Odontaster validus*, визначено їх специфічність щодо ланцюгів фібриногену, оцінено амідазну активність, досліджено вплив ферментів на тромбоцити та коагуляційну ланку системи гемостазу, узагальнено результати, підготовлено публікацію до друку)

9. Абрамова М, Ракша Н. Оптимізація методологічних підходів щодо одержання цільових білків із гідробіонтів Антарктичного регіону. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2019;2(78):7-13. (здобувачем оптимізовано хроматографічний підхід щодо отримання цільових білкових фракцій з екстракту тканин гідробіонтів, проведено електрофоретичний аналіз отриманих фракцій, підготовлено публікацію до друку)

10. Raksha N, Potalitsyn P, Yurchenko A, Halenova T, Savchuk O, Ostapchenko L. Prevention of diet-induced obesity in rats by oral application of collagen fragments. Archives of Biological Sciences. 2018;70(1):77-86. doi.org/10.2298/ABS170401027R (Scopus, Q3) (здобувачем оптимізовано методику отримання колагену з луски риб Антарктичного регіону, отримано низькомолекулярні фрагменти колагену, оцінено показники, що характеризують антиоксидантно-прооксидантний баланс, досліджено цитокіновий профіль плазми крові та підготовлено публікацію до друку)

11. Raksha N, Halenova T, Vovk T, Ishchuk T, Savchuk O, Ostapchenko L. Novel fibrinogenolytic metalloprotease from the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*). Advances in Marine Biology. Nova Science Publishers, Inc. 2018;3(1):109-136. (Scopus) (здобувачем розроблено трьохстадійну схему очищення фібрино(гено)літичних ферментів на прикладі гідробіонту *Adamussium colbecki*, досліджено специфічність ферментів щодо ланцюгів фібриногену, визначено каталітичні константи, інтерпретовано результати та підготовлено публікацію до друку)

12. Gladun D, Raksha N. Detergent-stable proteases from the antarctic scallop *Adamussium colbecki*. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;20(1):62-65. *(здобувачем проведено визначення протеолітичної активності у екстрактах тканин гідробіонту Adamussium colbecki за присутності детергентів)*
13. Нагірняк ОЮ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Вплив низькомолекулярних фрагментів колагену, одержаних з луски риб Антарктичного регіону, на розвиток ожиріння. Український антарктичний журнал. 2016;15:128-136. *(здобувачем сформульовано концепцію дослідження, оптимізовано методику отримання колагену з луски риб Антарктичного регіону, отримано низькомолекулярні фрагменти колагену, інтерпретовано результати щодо впливу фрагментів колагену на динаміку розвитку ожиріння та підготовлено публікацію до друку)*
14. Gladun D, Raksha N, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. New fibrinogenases isolated from marine hydrobiont *Adamussium colbecki*. Journal of Biochemistry International. 2016;3(1):9-18. *(здобувачем оптимізовано метод отримання фібрино(гено)літичних ферментів, визначено активність одержаних ферментів методом ензим-електрофорезу та за використання хромогенних субстратів, оцінено належність ферментів до серинових чи металозалежних протеїназ, підготовлено публікацію до друку)*
15. Raksha N, Gladun D, Savchuk O, Ostapchenko L. Protease composition in tissue extracts of hydrobionts from Antarctic region. Journal of Biology and Nature. 2016;1:1-8. *(здобувачем оцінено присутність у тканинах гідробіонтів *Odontaster validus* і *Glyptonotus antarcticus* ферментів з різною будовою активного центру, інтерпретовано результати та підготовлено публікацію до друку)*
16. Gladun D, Raksha N, Savchuk O, Ostapchenko L. Collagenolytic activity in tissue extract of *Parborlasia corrugatus* from Antarctic region. Biomedical Research

and Therapy. 2015;9(2):354-358. DOI 10.7603/s40730-015-0021-1 (Web of Science) *(здобувачем розроблено концепцію дослідження та оптимізовано умови отримання фракцій, збагачених на колагенолітичні ферменти)*

17. Gladun D, Raksha N, Savchuk O, Ostarchenko 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 сформульовано підхід щодо комплексного аналізу протеолітичного профілю тканин гідробіонту *Adamussium colbecki* та проведено оцінку ферментативної активності у загальному екстракті тканин)*

18. 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 здійснено формування концепції дослідження, проаналізовано білковий спектр тканин гідробіонтів криль, морська зірка, гігантська ізопода, антарктичний морський їжак, антарктичний морський гребінець та актинія)*

19. 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 оптимізовано умови хроматографічного розділення екстракту тканин гідробіонту *Adamussium colbecki* на окремі фракції та оцінено присутність у фракціях протеолітичних ферментів методом ензим-електрофорезу)*

20. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук АН, Остапченко ЛІ. Перспективи получения колагенолитических ферментов с гидробиионтов Антарктического региона. Український Антарктичний Журнал. 2015;1(14):175-179. *(здобувачем здійснено поділ екстракту тканин гідробіонту *Parborlasia corrugatus* на окремі білкові фракції методом хроматографії, що поділяє за розмірами, та проаналізовано протеолітичний профіль отриманих фракцій)*

21. 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;1(69):19-22. *(здобувачем підібрано умови отримання трипсиноподібних ферментів з екстракту тканин гідробіонтів методом афінної хроматографії та здійснено електрофоретичний аналіз отриманих фракцій)*
22. Гладун ДВ, Ракша НГ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Використання електрофоретичних методів для експрес-аналізу білків морських гідробіонтів Антарктичного регіону. Український Антарктичний Журнал. 2014;1(13):192-197. *(здобувачем розроблено концепцію експериментальної частини публікації)*
23. 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 підібрано оптимальні умови розділення екстрактів тканин гідробіонтів криль, морська зірка, немертина методом хроматографії, що поділяє за розмірами)*

#### Окремі розділи в книгах:

1. **Raksha N**, Halenova T, Vovk T, Yurchenko A, Nikoliaeva I, Savchuk O, Ostapchenko L. Prevention of diet-induced obesity in rats by administration of peptides derived from marine hydrobiont. In Advances in health and disease Vol. 11, 2019, Nova Science Publishers, Inc. New York, 165-199. *(здобувачем отримано фракцію гідролізних пептидів, досліджено стан антиоксидантно-прооксидантної системи та периферійної серотонінергічної системи, узагальнено результати, підготовлено публікацію до друку)*
2. **Raksha N**, Gladun D, Vovk T, Galenova T, Savchuk O, Ostapchenko L. New Fibrinogenases Isolated from Marine Hydrobiont *Adamussium colbecki*. In New Insights on Chemical Research Vol. 1 (E ISBN No: 978-93-89246-83-4). 2019, Book

Publisher International, Chapter 13, 148-159. (здобувачем розроблено методологію очищення фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонту *Adamussium colbecki*, здійснено біохімічну характеристику одержаних ферментів, узагальнено результати та підготовлено публікацію)

#### Патенти:

3. Савчук ОМ, Остапченко ЛІ, **Ракша НГ**, Галенова ТІ, Вовк ТБ, Джулай АО. Спосіб отримання трипсиноподібного ферменту з екстракту тканин медузи *Diplulmaris antarctica*. Патент на корисну модель. 2023, u202106489.
4. Савчук ОМ, Остапченко ЛІ, **Ракша НГ**, Галенова ТІ, Вовк ТБ, Маланчук ВМ. Спосіб отримання фібрино(гено)літичного ферменту з екстракту тканин морського гребінця. Патент на корисну модель. 2023, u202106490.

#### Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

5. **N.G. Raksha**, S.A. Shchypanskyi, T.M. Maievska, O.M. Savchuk. Effect of collagen peptides from the hydrobiont *diplulmaris antarctica* on obesity development. XI International Antarctic Conference Dedicated to the 160th Anniversary of the birth of Volodymyr Vernadsky – the first President of the Ukrainian Academy of Sciences, Founder of the Study of Noosphere. May 10–12 2023, Kyiv, Ukraine, Book of Abstracts, p. 45-47.
6. **Nataliia Raksha**, Tetiana Halenova, Tetiana Vovk, Olexiy Savchuk, Ludmila Ostapchenko. Antioxidant peptides derived from the antarctic hydrobionts. International Antarctic Conference Dedicated to the 25th Anniversary of Raising of the National Flag of Ukraine at the Ukrainian Antarctic Akademik Vernadsky Station. Kyiv, May 11-13, 2021, Kyiv, Ukraine, Book of Abstracts, p. 42-23.



7. **N. Raksha**, O. Savchuk, L. Ostapchenko. The Effect of the Fibrino(geno)lytic Enzymes from Tissues of Antarctic Hydrobionts on Hemostasis. ISTH 2020 Congress, July 12-14 2020. Virtual Congress, Abstract number: PB0765.
8. Л.О. Семенюк, **Н.Г. Ракша**, Т.М. Маєвська, О.М. Савчук. Розробка методологічних підходів до отримання пептидів з відходів рибної промисловості, що виявляють цільові активності. Міжнародна науково-практична конференція, присвяченої 90-річчю Київського національного університету технологій та дизайну та кафедри біотехнології, шкіри та хутра. 14-15 травня 2020, м. Київ, збірник тез, С. 46.
9. **N.G. Raksha**, A.Y. Yurchenko. Peptides derived from the tissues of hydrobiont of the Antarctic region as the substances for treatment of obesity induced metabolic disorders. IX Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 60-річчю підписання Договору про Антарктику 959 р. 14-16 травня 2019, м. Київ, збірник тез, С.93.
10. D.V. Gladun, **N.G. Raksha**, A.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko. Obtaining and characterization of trypsin-like enzyme from antarctic scallop (*Adamussium colbecki*). VIII Міжнародна Антарктична конференція, присвячена 25-річчю приєднання України до договору про Антарктику. 16-18 травня 2017, м. Київ, збірник тез, С.54.
11. D.V. Gladun, **N.G. Raksha**, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko. Hydrolytic enzymes marine organisms as an instrument for investigating protein–protein interaction. FEBS Journal, 282 (Suppl. 1), 2015, Abstract number: P14-061, P. 146.
12. А. Сорокін, Д.В. Гладун, **Н.Г. Ракша**. Тестування екстрактів морських гідробіонтів Антарктичного регіону для виявлення цільових активностей. XIII International Scientific Conference of Young Scientists Shevchenkivska Vesna: Life Sciences, April 1-3 2015, Kyiv, Ukraine, Book of Abstracts, P. 87.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
Проректор з наукової роботи  
Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка



Ганна ТОЛСТАНОВА  
\_\_\_\_\_ 2023 р.

з протоколу № 5 засідання комісії з питань біоетики  
Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини"  
Київського національного університету імені Тараса Шевченка

від «05» вересня 2023 року

**Присутні:** головуєчий на засіданні, заст. голови комісії, д.б.н., проф. Макачук М.Ю.; секретар комісії, к.б.н. Юет А.С.; члени комісії: д.б.н., проф. Фалалєєва Т.М., д.м.н., проф. Маєвський О.Є., д.в.н., проф. Малюк М.О., Левків М.Ю.

**СЛУХАЛИ:**

3. Про дотримання біоетичних вимог у проєкті фундаментального дослідження Ракші Н.Г., Берегової Т.В. на тему: «Концепція розробки інноваційних ранозагоювальних матеріалів на основі білкових молекул» для участі в Конкурсі Міністерства освіти і науки України проєктів фундаментальних наукових досліджень, прикладних наукових досліджень та науково-технічних (експериментальних) розробок, фінансування яких розпочнеться в 2024 р.

**Мета та задачі дослідження:** мета - розробити концепцію створення інноваційних ранозагоювальних засобів (композитів) на основі білкових молекул (протеолітичні ферменти, колаген, пептиди), дослідити механізми та оцінити ефективність їх дії на моделях ран різного генезу, задачі - оптимізувати методологію одержання протеолітичних ферментів, колагену і біологічно активних пептидів з відходів рибної, шкіряної промисловості і непромислових видів гідробіонтів та дослідити їх основні фізико-хімічні характеристики і властивості, які потенційно можуть бути використані для створення біотехнологічних продуктів з ранозагоювальною та протиопіковою дією; створити на основі одержаних молекул ранозагоювальні засоби (композити) в оптимальній для нанесення на ранові поверхні різного генезу формуляції та поєднанням активних складових (протеолітичні ферменти, колаген, пептиди); протестувати ефективність одержаних ранозагоювальних композитів на моделях ран (площинно-різані, гнійно-некротичні, опікові) і з'ясувати молекулярно-біохімічні механізми гоєння у відповідь на дію активних компонентів композитів; з огляду на одержані результати розробити загальну концепцію створення композитів на основі білкових молекул, що виявляють найбільш виражену ранозагоювальну та протиопікову дію.

**Об'єкт дослідження:** Розроблення інноваційних ранозагоювальних засобів (композитів) на основі білкових молекул та пептидів для лікування ранових уражень шкіри різної етіології..

**Предмет дослідження:** Фізико-хімічні властивості діючих складових інноваційних ранозагоювальних композитів та їхнє оптимальне поєднання; молекулярно-біохімічна характеристика стану шкірного покриву за умов ранових уражень та використання і ранозагоювальних композитів.

**Методи дослідження:** хроматографічні та електрофоретичні методи; спектрофотометричні методи; імуноферментний метод; гістохімічні методи та методи математичної статистики.

**Очікувані результати дослідження:** Буде оптимізовано методологію одержання гідролітичних ферментів, колагену та біологічно активних пептидів з урахуванням особливостей вихідної сировини та необхідності одержання цільових молекул зі

збереженням їхньої максимальної функціональної активності. Буде оцінено молекулярну масу одержаних ферментів та пептидів; визначено субстратну специфічність протеолітичних ферментів з використанням низки білкових та хромогенних субстратів; визначено їхній рН та температурний оптимум. Буде проведено якісно-кількісну характеристику отриманого колагену та оцінено можливість його використання як основи для створення колагенових гелів. Також буде визначено антиоксидантну та антимікробну активність одержаних пептидних молекул. Будуть підібрані умови, а також найбільш ефективні комбінації білкових молекул та пептидів для створення ранозагоювальних засобів у формуляції, оптимальній для нанесення на ранову поверхню та з огляду на фазу перебігу ранового процесу. Буде оцінено ефективність ранозагоювальних засобів на моделях ран у щурів, у тому числі вирізаних площинних, гнійно-некротичних, опікових. Для цього буде проаналізовано білковий профіль, визначено загальну протеолітичну активність, вміст окремих матриксних протеаз у гомогенаті шкіри та плазмі крові тварин; а також визначено рівні про- і антизапальних цитокінів та активність ключових антиоксидантних ферментів. Задля оцінки ефективності регенерації тканин ранового ложа за дії композитів будуть проведені гістологічні дослідження. Ранозагоювальні композити, що виявились найбільш ефективними за результатами попереднього етапу проекту, будуть протестовані на пацієнтах хірургічних відділень, зокрема буде оцінено площу ранових уражень шкіри в динаміці гоєння та оцінено рівень запальних процесів та стан системи протеолізу у плазмі крові хворих. На основі узагальнення результатів, отриманих в ході реалізації всіх етапів проекту, буде розроблена концепція створення інноваційних ранозагоювальних засобів на основі молекул білкової природи.

***Дотримання біоетики при виконанні експериментальних досліджень:***

*Відтворення моделі повношарових вирізаних площинних ран у щурів.* Дослідження буде проведено на нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 200-250 г, кількість тварин, включена в експеримент складатиме 150. Тварин утримуватимуть у віварії Навчально-наукового центру "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно "Стандартні правила по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". Тварини утримуватимуться за стандартних умов з вільним доступом до води та їжі («Purina rodent chow»), за постійного температурного режиму ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ), режиму вологості ( $60 \pm 5\%$ ), освітлення (12/12 год). Перед початком хронічного експерименту щурів витримуватимуть на карантині, по завершенню якого тварин оглядатимуть та зважуватимуть. Всі больові процедури та операції проводитимуться під загальним знеболюванням тіопенталом натрію (Thiopental sodium, BiochemieGmbH/Austria) у дозуванні 60 мг/кг маси тварини. Для відтворення моделі повношарових вирізаних площинних ран тварини будуть поділені на групи, кількість яких визначатиметься кількістю тестованих ранозагоювальних засобів, попередньо, це засоби на основі колагену, пептидів, протеолітичних ферментів та їх поєднання, також буде група контрольних тварин та тварин, у яких створювали модель ран, але рани не зазнавали лікування, до кожної групи входить 6 тварин. Як основу для створення ранозагоювальних композитів буде використано 0,3 % розчин карбополу ((універсальний розчинник препаратів для надання їм гелеподібної консистенції («Carbopol 980»)). Площинні рани відтворюватимуть на попередньо деепільованій ділянці шкіри щурів, яких попередньо наркотизують тіопенталом натрію (Thiopental sodium, BiochemieGmbH/Austria) у дозуванні 60 мг/кг маси тварини. Шкіру розміром  $1 \times 1\text{cm}^2$  вирізали використовуючи хірургічний скальпель. Кровотечу зупинятимуть за допомогою стерильних марлевих тампонів змочених у 3 % розчині перексиду водню. Оброблення ран композитами на тестованих компонентах розпочинатимуть відразу після відтворення ран і до їхнього повного загоєння. Тварин виводитимуть з експерименту шляхом дислокації шийного відділу хребта.

Дослідження будуть проведені у відповідності з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986р.), етичними принципами, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001р.) та чинним законодавством і нормативно-правовими актами про поводження та експериментальні дослідження з лабораторними тваринами.

**УХВАЛИЛИ:**

3. За результатами відкритого голосування («за» – 6, «проти» – немає, «утримались» – немає):

Визнати матеріали проекту фундаментального дослідження Ракші Н.Г., Берегової Т.В. на тему: «*Концепція розробки інноваційних ранозагоювальних матеріалів на основі білкових молекул*» для участі в Конкурсі Міністерства освіти і науки України проектів фундаментальних наукових досліджень, прикладних наукових досліджень та науково-технічних (експериментальних) розробок, фінансування яких розпочнеться в 2024 р. такими, що відповідають Європейській конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), згідно з угодою, схваленою Першим Національним Конгресом з біоетики України (Київ, 2001 р.), та чинному законодавству (зокрема: Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження») і нормативно-правовим актам про поводження та експериментальні дослідження з лабораторними тваринами.

Надати допуск Ракші Н.Г., Береговій Т.В. до роботи з лабораторними тваринами на базі віварію ННЦ "Інститут біології та медицини" із неухильним дотриманням загально-прийнятих біоетичних норм і відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних досліджень для реалізації проекту фундаментальних наукових досліджень на тему: «*Концепція розробки інноваційних ранозагоювальних матеріалів на основі білкових молекул*» у разі реалізації проектів-переможців Конкурсу Міністерства освіти і науки України проектів фундаментальних наукових досліджень, прикладних наукових досліджень та науково-технічних (експериментальних) розробок, фінансування яких розпочнеться в 2024 р.

Головуючий на засіданні,  
заступник голови комісії

Секретар комісії



Микола Макарчук

Алевтина ЮЕТ

**ДОВІДКА ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ**

результатів дисертаційного дослідження Ракші Наталії Григорівни  
 «Розробка біотехнологічних підходів створення білкових інноваційних  
 продуктів з гідробіонтів Антарктичного регіону»  
 на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю  
 03.00.20 «Біотехнологія»

Результати дисертаційного дослідження Ракші Наталії Григорівни «Розробка біотехнологічних підходів створення білкових інноваційних продуктів з гідробіонтів Антарктичного регіону» на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія» впроваджені в освітній процес Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Результати, отримані у рамках виконання державних цільових науково-технічних програм проведення досліджень в Антарктиці на 2011-2023 роки «Отримання та характеристика цільових біотехнологічних продуктів з тканин антарктичної медузи» (№ д/р 0121U112501, 2021 р.) та «Отримання та характеристика пептидних молекул, що виявляють цільові активності, з гідробіонтів Антарктичного регіону» (№ д/р 0120U104207, 2020 р.) впроваджено у навчальний процес курсів «Лабораторний практикум з біохімії», «Методи практичної біохімії», «Молекулярні основи дії ферментів», «Методи очистки білків та пептидів» для студентів освітнього рівня «Бакалавр» та «Пілотні проекти в біотехнології», «Імунобіотехнології» для студентів освітнього рівня «Магістр» кафедри біохімії (протокол засідання кафедри біохімії від 9 грудня 2020 р., № 6 та протокол від 02 листопада 2021 р., № 4, відповідно); «Пептиди, отримані з антарктичного морського гребінця *Adamussium colbecki*, як потенційний засіб корекції метаболічних порушень організму, спричиненої розвитком ожиріння» (№ д/р 0117U004992, 2017 р.) – у курси «Лабораторний практикум з біохімії», «Методи практичної біохімії» для студентів освітнього рівня «Бакалавр» (протокол засідання кафедри біохімії від 07 грудня 2017 р., № 7).

Завідувач кафедри біохімії

Олексій САВЧУК

