

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

РАКША НАТАЛІЯ ГРИГОРІВНА



УДК 577.112.7: 612.115

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

03.00.20 «Біотехнологія»

Реферат
на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ-2024

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Циганкова Вікторія Анатоліївна,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України, провідний науковий співробітник відділу хімії біоактивних азотовмісних гетероциклічних сполук;

доктор біологічних наук, старший дослідник
Чернишенко Володимир Олександрович,
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України, заступник директора з наукової роботи;

доктор біологічних наук, професор
Прилуцька Світлана Володимирівна,
Національний університет біоресурсів і природокористування України, завідувач кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики

Захист відбудеться 22 травня 2024 р. об 11:00 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького (Осиповського), 2а. Тел/факс: (044) 463-05-32, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» та на офіційному сайті <http://ifbg.or.ua/uk/pidgotovka-kadriv/specializovana-vchena-rada>

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
канд.біол.наук, доцент



Наталія ПАСТУХОВА

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 (Muttenthaler et al., 2020). 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 (<https://www.marketsandmarkets.com>). Стрімкі темпи розвитку спостерігаються і у сегменті препаратів на основі пептидних молекул, які з огляду на широкий спектр біологічних активностей (Luo et al., 2021; Zhang et al., 2021), 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 (Kumar et al., 2019; Acquah et al., 2022).

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. Незважаючи на те, що біотехнологічний потенціал гідробіонтів досліджується досить інтенсивно (Soloviy et al., 2020), 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 (Fornbaske et al., 2013; Al-Ghanayem et al., 2020), 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. 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. Вперше 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*.

Вперше 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 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 колагеновмісних 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 впроваджено 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, завідуючої 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 ISTD 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

В роботі було використано гідробіонти Антарктичного регіону – морський гребінець *Adamussium colbecki*, морський їжак *Sterechinus neumayeri*, морську зірку *Odontaster validus*, криль *Euphausia superba*, немертину *Parborlasia corrugatus*, медузу *Diplulmaris antarctica* та луску риб *Champscephalus gunnari* і *Nototheniidae*. Об'єкти для дослідження було надано Національним антарктичним науковим центром в рамках виконання спільних наукових проектів Екстракт тканин

гідробіонтів отримували шляхом перетирання замороженої маси м'яких тканин гідробіонтів до порошкоподібного стану у рідкому нітрогені з подальшою гомогенізацією в екстрагуючому розчині – 0,1 М трис-НСІ буфер (рН 7,4), що містить 0,13 М NaCl, 1 мМ ЕДТА, 0,25 % сахарозу, 0,5 % тритон X-100. Отримані проби ліофілізували; перед початком досліджень ліофілізати піддавали очищенню на носіїві сефадекс Ж 25. Фракцію серинових протеїназ з *D. antarctica* отримували методом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ- і КМ-сефарозі та методом афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі. Процедура очищення трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* включала етапи афінної хроматографії на сефарозі, де лігандом слугував соєвий інгібітор трипсинів (СІТ) та фракціонування одержаної проби на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG (GE HealthCare, США). У роботі було використано СІТ-сефарозу синтезовану нами за стандартною методикою (Kim et al., 2006). Для очищення фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів *A. colbecki*, *S. neumayeri*, *O. validus*, *E. superba* та *P. corrugatus* було використано метод афінної хроматографії на блакитній сефарозі з подальшою доочисткою на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE HealthCare, США). Процедура одержання колагену з луски риб *Champscephalus gunnari*, *Nototheniidae* включала етапи висолювання неколагенових білків, демінералізації сировини та екстракції колагену 0,5 М оцтовою кислотою з подальшим переосадженням отриманого колагену та його ліофілізацією (Zhang et al., 2019). Гідроліз колагену до низькомолекулярних фрагментів проводили за участі серинових протеїназ з *D. antarctica* за співвідношення фермент:колаген 1:10 (маса/маса). Фракцію ендогенних пептидів з *D. antarctica* та *E. superba* отримували, беручи за основу метод (Nykolaychuk et al., 1991). Фракцію гідролізних пептидів з *A. colbecki* отримували використовуючи трипсин (3000 од/мг білка), який додавали у співвідношенні 1:10 (фермент:субстрат). Для отримання пептидів колагену, ендогенних пептидів з молекулярною масою нижче 10 кДа та «гідролізних» пептидів з молекулярною масою нижче 3 кДа застосовували концентруючі системи з відсікаючою здатністю 10 кДа та 3 кДа, відповідно. Для позбавлення зразків від можливих домішок непептидної природи було включено етап іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-сефарозі, використовуючи як елюент 70 % етиловий спирт. Контроль чистоти отриманих ферментів, визначення молекулярної маси білків і пептидів та оцінку білкового профілю зразків проводили методом диск-електрофорезу за присутності додецилсульфату натрію (Weber et al., 1969). Присутність в пробах активних протеїназ оцінювали методом ензим-електрофорезу з використанням як субстратів желатину, фібриногену та колагену (Ostapchenko et al., 2011). Електрофореграми аналізували за допомогою програми TotalLab 2.01. Визначення концентрації білка проводили методом Бредфорда (1976). Концентрацію пептидів визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 210 нм. Загальну протеолітичну активність визначали відповідно до методу (Munilla-Moran et al., 1989) використовуючи казеїн як субстрат. Для оцінки внеску металопротеїназ та серинових протеїназ до реакційної суміші додавали, відповідно, етилендіамінтетраацетат та фенілметилсульфоніл флуорид. Визначення специфічності фібрино(гено)літичних ферментів щодо ланцюгів фібриногену

проводили відповідно до методу (Costa et al., 2007). Відсоток фібриногену з порушеною здатністю до полімеризації визначали відповідно до (Савчук та ін., 2006). Визначення температурного та рН оптимуму ферментів проводили за методом (Raksha et al., 2020), використовуючи хромогенний субстрат $N\alpha$ -benzoyl-L-Arg-pNA для ферментів з *D. antarctica* та субстрат ругоGlu-Pro-Arg-pNA для ферменту з *A. colbecki*. Для визначення кінетичних параметрів реакції гідролізу хромогенного субстрату ругоGlu-Pro-Arg-pNA трипсиноподібним ферментом з *A. colbecki* будували криві залежності V_0 від S_0 . Для визначення кінетичних констант K_M та V_{max} проводили лінеаризацію отриманих результатів у зворотних координатах Лайнуївера-Берка. Агрегатометрію виконували в плазмі крові збагаченій тромбоцитами у фотооптичному агрегометрі. Оцінювали ступінь агрегації – максимальний рівень світлопропускання збагаченої тромбоцитами плазми крові після внесення АДФ. Визначення тромбінового (ТЧ), протромбінового (ПЧ) та активованого часткового тромбопластинового (АЧТЧ) часу зсідання плазми крові проводили згідно методу (Козлов и др., 2013). Загальну антиоксидантну активність пептидів оцінювали за відновленням стабільного радикалу 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу (ДФПГ) (Shimada et al., 1992). Здатність пептидів знешкоджувати радикали оксиду азоту визначали у реакції з реактивом Гріса відповідно до методу (Fogliano et al., 1999). Редукуючу здатність пептидів досліджували відповідно до методу (Dorman et al., 2003). Здатність пептидів знешкоджувати перекис водню оцінювали відповідно до методу (Ruch et al., 1989). Здатність пептидів знешкоджувати супероксидні аніон-радикали оцінювали за відновленням нітросинього тетразолію (Chakraborty et al., 2009), а здатність знешкоджувати гідроксильні радикали – у реакції з фенантроліном (Fan et al., 1998). Вміст ТБК-активних продуктів визначали у реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) (Орехович и др., 1977). Визначення вмісту шифових основ та дієнових кон'югантів проводили спектрофлуориметрично в гептан-ізопропанольному екстракті (Гаврилов и др., 1988; Колесова и др., 1984). Вміст продуктів окиснювальної модифікації білків (альдегід- та кетондинітрофеніл-гідразонів) визначали за рівнем карбонільних похідних, які виявляються в реакції з 2,4-динітрофенілгідразином (Дубініна, 1995). Вміст сульфгідрильних груп визначали відповідно до методу (Ellman, 1959) в реакції з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою. Супероксиддисмутазу (СОД) та каталазну активності визначали відповідно до методів (Чевари и др., 1985; Корольок и др., 1988). Концентрацію глюкози визначали за допомогою глюкометра «Глюкофот-II» відповідно до інструкції фірми-виробника. Визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну проводили використовуючи стандартні набори фірми «Pliva-Lachema Diagnostika» (Чехія). Відносний вміст інсуліну у сироватці крові та вміст про- і протизапальних цитокінів визначали імуноферментним методом згідно стандартного протоколу використовуючи відповідні первинні антитіла виробництва «Santa Cruz Biotechnology, Inc» (США) та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою («Sigma-Aldrich», США). Визначення концентрації серотоніну та триптофану проводили спектрофлуориметричним методом після їх одержання з сироватки крові на КМ-сефарозі (Максименко, 2000). Моноамінооксидазну активність визначали за

накопиченням гідразону у реакції з 2,3-динітрофенілгідразином (Карповець та ін., 2014). Виявлення колагенових волокон у жировій тканині щурів здійснювали шляхом гістохімічного трихромного забарвлення пікрофуксином за Ван Гізоном із дозбарвленням ядер клітин гематоксилином Бемера (Mishra et al., 2015). Тучні клітини виявляли гістохімічним забарвленням водним розчином толуїдинового синього (Altintas et al., 2011). Мікрофотографії отримано за допомогою мікроскопу Olympus BX41 з цифровою камерою Olympus DP20. Рівень фіброзу, (площу поперечного перерізу адипоцитів) та кількість тучних клітин вимірювали на цифрових мікрофотографіях з використанням програмного забезпечення ImageJ (США).

В експериментах *in vivo* використовували нелінійних статевозрілих щурів-самців розведення віварію ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 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. Результати роботи схвалено комісією з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 5 від 05 вересня 2023 року). Модель ожиріння відтворювали утримуючи тварин з початковою масою 160 ± 20 г 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 %) (Shen et al., 2010). Починаючи з 4-го тижня тварини впродовж наступних 6 тижнів отримували *per os* розчин пептидів з розрахунку 1 г/кг маси тіла. Повношарові вирізані площинні ран у щурів моделювали за методом, описаним Табурець та ін. (2016). Ранові поверхні обробляли композитами на основі 0,5 % розчину карбополу та 5 % колагену, екстрагованому з *D. antarctica* і луски риб Антарктичного регіону. Планіметричні показники розраховували відповідно до (Okhmat et al., 2006), для оцінки динаміки гоєння ран, площу ранової поверхні фотографували цифровою фотокамерою Nikon-D3100 на початку експерименту та через кожні дві доби до повного загоєння. Статистичну обробку одержаних результатів проводили з використанням програм OriginLab Origin® Pro 9.1 та Statsoft Statistica® 10. 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). Достовірним вважалась різниця при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Оцінка перспектив використання гідробіонтів Антарктичного регіону як джерела молекул білкової природи для біотехнологічних цілей. На першому етапі роботи було проаналізовано білковий склад та оцінено протеолітичний профіль окремих 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*) задля виявлення об'єктів найбільш придатних для одержання цільових білкових молекул – фракції серинових протеїназ, фібрино(гено)літичних ферментів та пептидів.

Відповідно до отриманих результатів, білковий профіль тканин гідробіонтів представлено фракціями високо-, середньо- та низькомолекулярних білків (табл. 1), з-поміж яких присутні ферменти, що здатні ефективно розщеплювати фібриноген та колаген (рис. 1). 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.

Таблиця 1

Загальна характеристика білкової складової тканин гідробіонтів Антарктичного регіону (M±m, n=6)

Гідробіонти	Загальний білок, мг/г вихідної сировини	Білковий профіль тканин гідробіонтів		
		200-70 кДа,	69-20 кДа	19-5 кДа
<i>S. neumayeri</i>	250,5 ± 10,5	<200; 154; 141; 125; 99; 74; 67	49; 45; 49; 36; 33; 21	19; 16; 10
<i>A. colbecki</i>	250,0 ± 10,5	<200; 190; 157; 144; 130; 121; 115; 110; 98; 79	61; 55; 44; 35; 32; 29; 23; 20	15; >10
<i>D. antarctica</i>	210,0 ± 8,5	<200; 175; 154; 141; 122; 117; 106; 75; 9	50; 45; 37; 32; 22	>10
<i>E. superba</i>	195,5 ± 9,5	<200; 180; 175; 153; 140; 125; 107; 98; 74	67; 48; 46; 42; 31; 28; 26; 21	18; 15; 13; >10
<i>O. validus</i>	130,0 ± 6,0	<200; 195; 190; 153; 137; 129; 125; 121; 113; 91; 85	67; 49; 46; 38; 28; 20	16; >10
<i>P. corrugatus</i>	122,0 ± 5,5	157; 144; 132; 119; 102; 69	50; 47; 43; 39; 34; 25; 20	15; 12; >10

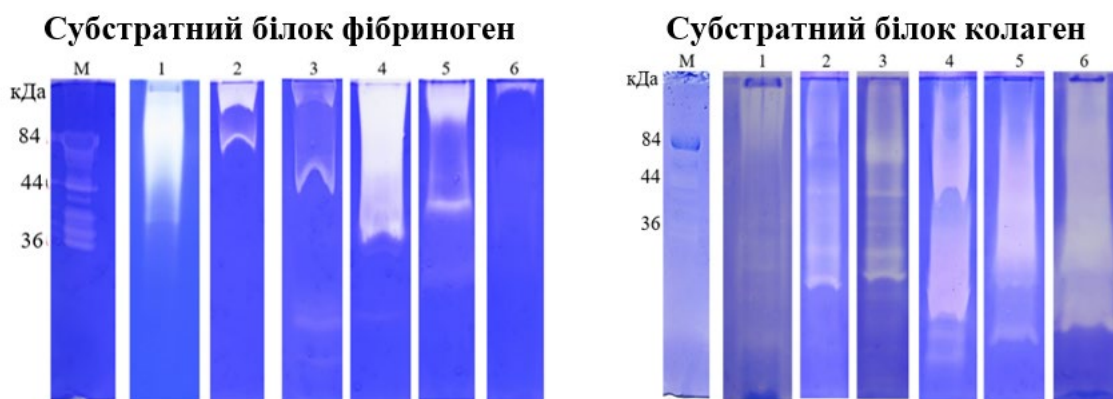


Рис. 1. Ензим-електрофореграми зразків тканин гідробіонтів Антарктичного регіону за використання різних субстратних білків: М – маркери молекулярних мас; 1 – *A. colbecki*; 2 – *E. superba*; 3 – *D. antarctica*; 4 – *S. neumayeri*; 5 – *O. validus*; 6 – *P. corrugatus*

Протеолітична активність у тканинах більшості гідробіонтів представлена переважно сериновими та металозалежними ферментами, у той час як внесок аспартильних та цистеїнових протеїназ був значно нижчим (табл. 2).

Отже, 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, що здатні розщеплювати фібриноген.

Таблиця 2

Розподіл протеолітичної активності у тканинах гідробіонтів Антарктичного регіону

Гідробіонти	Серинові протеїнази, %	Металозалежні ферменти, %	Аспартильні та цистеїнові протеїнази, %
<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

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 гідробіонти *D. antarctica* та *A. colbecki* можуть слугувати джерелом серинових протеїназ. Крім того, вміст загального білка в залежності від виду гідробіонту від $130,0 \pm 6,0$ мг/г вихідної сировини до $250,5 \pm 10,5$ мг/г вихідної

сировини дозволяє використовувати гідробіонти Антарктичного регіону як сировину для отримання фракції пептидів.

Розробка підходів одержання біотехнологічно перспективних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону. 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 ферментних засобів українського 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 вітчизняного виробництва. З огляду на вище викладене, частина роботи була присвячена розробці технологій очищення біотехнологічно перспективних ферментів, у тому числі й серинових протеїназ з гідробіонтів Антарктичного регіону. Враховуючи, що найвищий відсоток протеолітичної активності (73%), опосередкований сериновими протеїназами, було виявлено у тканинах *D. antarctica*, саме цей об'єкт було використано як джерело серинових протеїназ.

Згідно літератури, ізоелектричні точки більшості серинових протеїназ знаходяться в області слабо лужних значень рН (Salihi et al., 2017; Vijay et al., 2017), тому для одержання фракції серинових протеїназ було використано метод іонообмінної хроматографії, зокрема, на ДЕАЕ-сефарозі за нанесення проби у 10 мМ трис-НСІ буфері з рН 7,4 та рН 10,0. Також було використано КМ-сефарозу з нанесенням зразка у 10 мМ гліциновому буфері з рН 5,0, адже деякі серинові протеїнази з гідробіонтів мають ізоелектричні точки в області кислих значень рН (Kato et al., 1992). Елюцію матеріалу проводили з використанням, відповідно, 10 мМ трис-НСІ буферу з рН 7,4 та 10,0 та 10 мМ гліцинового буферу з рН 5,0 за ступінчастого градієнту NaCl - 25 % (0,25 М), 40 % (0,4 М) та 100 % (1 М). Швидкість нанесення проб та елюції матеріалу складала 2 мл/хв.

Таблиця 3

Перерозподіл протеолітичної активності у фракціях, одержаних методами іонообмінної хроматографії ($M \pm m$, $n=6$)

Хроматографія	Фракції, елюйовані за використанням буферів з					
	0,25 М NaCl		0,4 М NaCl		1 М NaCl	
	К.од/мг білка	АСП, %	К.од/мг білка	АСП, %	К.од/мг білка	АСП, %
КМ-сефароза, рН 5,0	22,3±1,1	20	19,8±0,9	25	0,8±0,04	2
ДЕАЕ-сефароза, рН 7,4	13,2±0,5	25	0,2±0,0	5	-	-
ДЕАЕ-сефароза, рН 10,0	13,7±0,7	45	0,5±0,02	2	7,5±0,2	15

АСП, % - відсоток активності серинових протеїназ від загальної активності

Розподіл протеолітичної активності між фракціями, що були елюйовані буферами з 0,25 М і 0,4 М NaCl у випадку застосування КМ-сефарози, та нижче

значення протеолітичної активності у фракціях, отриманих при використанні ДЕАЕ-сефарози (табл. 3), не дозволяє розглядати іонообмінну хроматографію як оптимальний метод одержання серинових протеїназ, які були б сконцентровані в одній фракції і в достатній кількості.

Тому надалі було використано більш специфічний метод афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі (рис.2А), в результаті чого було отримано фракцію серинових протеїназ (рис. 2Б), які ефективно розщеплювали желатин та колаген і виявляли незначну активність щодо фібриногену (рис. 2В).

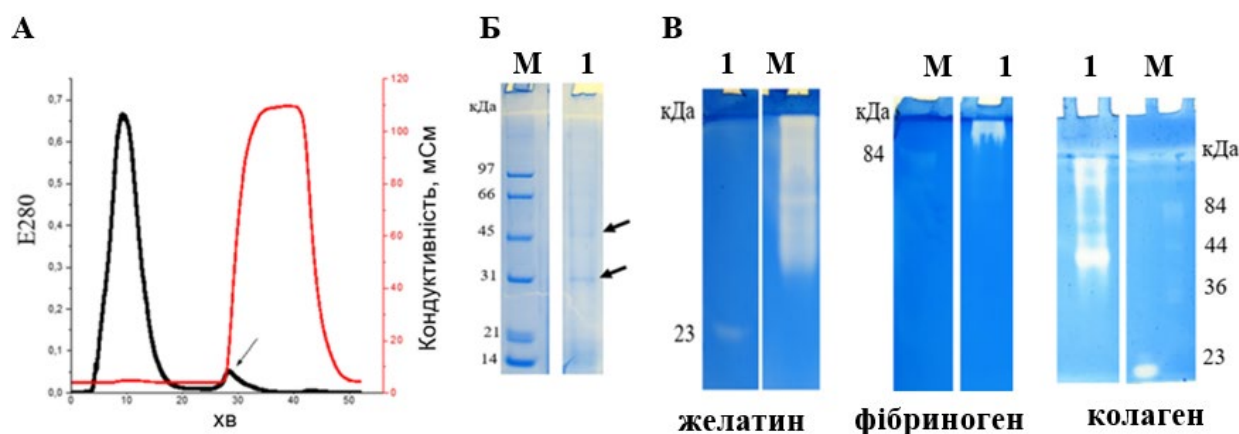


Рис. 2. Хроматограма очищення фракції серинових протеїназ на бензамідин-сефарозі (А), електрофореграма одержаної фракції (Б) та ензим-електрофореграми за використання різних субстратних білків (В): 1 – фракція серинових протеїназ; М – маркери молекулярних мас

На хроматограмі стрілкою позначено пік, що відповідає фракції серинових протеїназ; на електрофореграмі стрілками позначено білкові смуги

Відсутність активності при використанні хромогенних субстратів, специфічних для хімотрипсину (Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA) і еластази (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA) та виражена активність ($126,0 \pm 5,5$ мкмоль пНА/хв·мг білка) при використанні субстрату для трипсину (N- α -benzoyl-DL-Arg-pNA), свідчить про належність серинових протеїназ з *D. antarctica* до ферментів трипсинового ряду.

Також було досліджено залежність активності серинових протеїназ від температури та значень рН і встановлено, що температурний оптимум серинових протеїназ з *D. antarctica* знаходиться при +55°C, а рН оптимум - при 12,0 (рис. 3А, Б), що свідчить про належність ферментів до лужних протеїназ.

Висока колагенолітична активність, притаманна сериновим протеїназам з *D. antarctica*, виявлений температурний і рН оптимуми та результати ензим-електрофоретичного аналізу, відповідно до яких, 12-ти годинна інкубація гелів у буферах з рН 3,0 та рН 12,0 (рис. 3В) не приводила до зниження активності серинових протеїназ відкривають перспективи використання цих ферментів у різних галузях промисловості, зокрема, обґрунтовують можливість їх використання під час переробки колагеновмісної сировини чи включення до технологічних процесів, що потребують вищих температур та характеризуються нестійкістю або зміною рН.

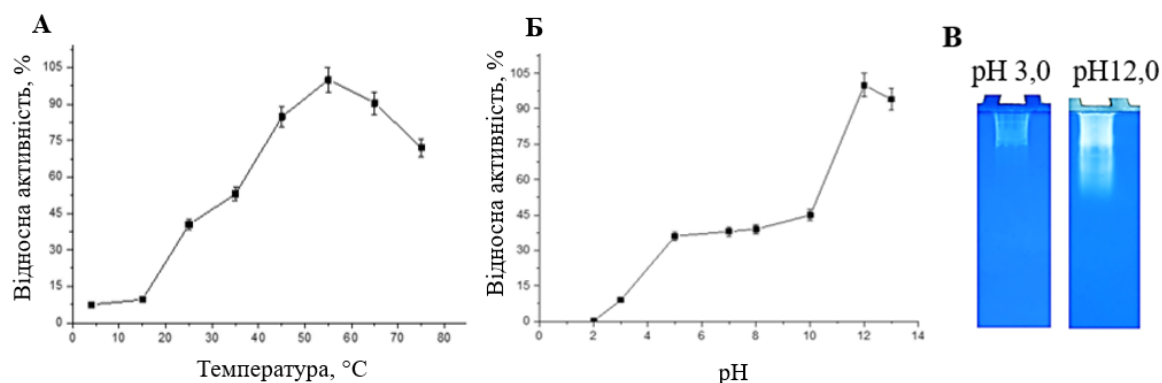


Рис. 3. Залежність активності серинових протеїназ з *D. antarctica* від температури (А), значень рН (Б) та ензим-електрофореграма фракції серинових протеїназ за умов 12-ти годинної інкубації гелів у буферах з рН 3,0 і 12,0 (В)

Суттєвою характеристикою, яку необхідно враховувати під час розробки методології одержання цільових молекул, особливо за перспективи масштабування, є сумарна вартість процесу. Бензамідин-сефароза належить до досить коштовних сорбентів, тому задля здешевлення процедури очищення нами було синтезовано колонку з соєвим інгібітором трипсинів, який дозволяє очищувати серинові протеїнази трипсинового ряду і є значно дешевшим у порівнянні з бензамідин-сефарозою. З огляду на дані інгібіторного аналізу та вміст загального білка, як джерело для одержання трипсиноподібного ферменту було використано гідробіонт *A. colbecki*. Зразок після очищення від домішок, що можуть вплинути на взаємодію ферменту з лігандом, та переведення у 10 мМ трис-НСІ буфер з рН 8,0, що містив 5 мМ CaCl_2 , наносили на колонку з СІТ-сефарозою за швидкості 2 мл/хв. Матеріал, що зв'язався з хроматографічним носієм, елюювали 50 мМ гліциновим буфером з рН 3,0, що містив 5 мМ CaCl_2 і 1 М NaCl та відразу нейтралізували до рН 7,4. Отриману фракцію піддавали подальшому очищенню на колонці HiLoad 16/60 Superdex 75 PG.

Таблиця 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 (колонка HiLoad 16/60 Superdex 75 PG)	0,7	22,1	31,6	7,5	50,3

Етапи очищення трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* наведено у табл. 4. У результаті застосування запропонованої нами методики, з гідробіонту *A. colbecki* було одержано трипсиноподібний фермент з виходом 50,3 %. Питома активність ферменту після заключного етапу очищення складала 31,6 Од/мг білка у порівнянні з 4,2 Од/мг білка у вихідному зразку, що відповідає ступеню очищення 7,5.

Надалі було досліджено залежність активності ферменту від температури та значень рН, а також визначено каталітичні константи K_M , k_{cat} та k_{cat}/K_M – характеристики, що можуть бути корисні з позицій практичного застосування трипсиноподібного ферменту, адже дозволять визначити умови, найбільш оптимальні для прояву активності ферменту, та встановити можливі межі застосування трипсиноподібного ферменту з огляду на різні значення рН середовища, температурний показник, тощо.

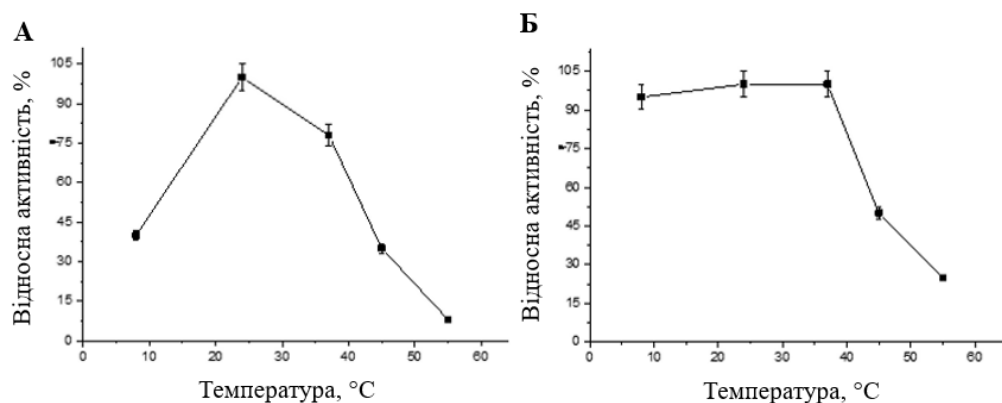


Рис. 4. Вплив температури на активність трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki*: А) температурний оптимум; Б) залишкова активність після інкубації ферменту впродовж 30 хв за різних температур

На відміну від серинових протеїназ з *D. antarctica*, температурний оптимум трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* складає +24°C, а рН оптимум було виявлено при 9,0 (рис. 4А та рис. 5А). Варто відмітити, що за температури +8°C активність ферменту зберігалась на рівні 40 % від максимальної, що свідчить про здатність ферменту досить ефективно каталізувати перебіг ферментативних реакцій і за понижених температур.

Отримані нами результати свідчать про досить низьку стабільність трипсиноподібного ферменту – інкубація ферменту впродовж трьох годин у буферах з низьким значенням рН та 30-ти хвилинна інкубація при температурі вище +45°C призводила до різкого зниження активності (рис. 4Б та рис. 5Б). Такі результати узгоджуються з даними літератури (Khan et al., 2016), відповідно до яких для ферментів з організмів, які адаптовані до низьких температур середовища існування, характерна низька стабільність молекул, що є одним з механізмів, які забезпечують належну каталітичну ефективність ферментів за понижених температур.

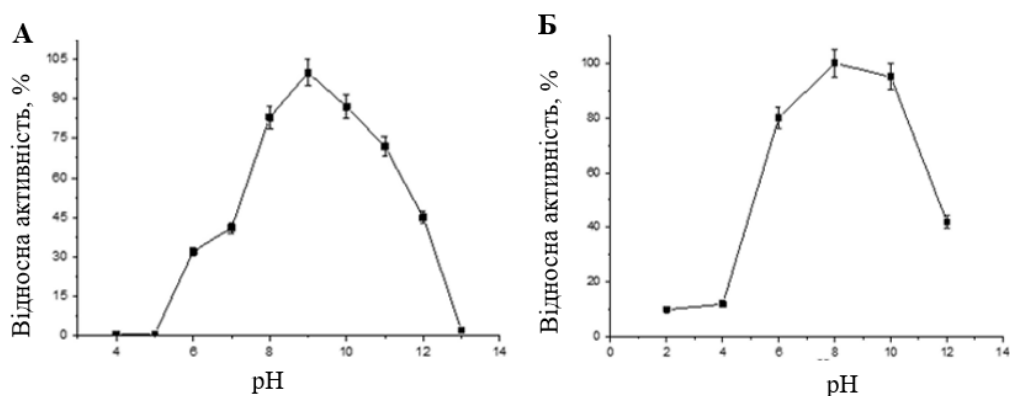


Рис. 5. Вплив рН на активність трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki*: А) рН оптимум; Б) залишкова активність після інкубації ферменту впродовж 3 год у буферах із різних значеннях рН

Визначення кінетичних констант виявило певні особливості, притаманні трипсиноподібному ферменту з *A. colbecki*, зокрема, значення каталітичної ефективності k_{cat}/K_M складало $16,33 \pm 0,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ за температури $+8 \text{ }^\circ\text{C}$ і $15,32 \pm 0,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ за температури $+24 \text{ }^\circ\text{C}$ (табл. 5) і згідно наших даних це досягалось не за рахунок зростання значень каталітичної константи k_{cat} , що є більш поширеним механізмом адаптації до функціонування за понижених температур (Siddiqui et al., 2006; Vjelic et al., 2008), а за рахунок зниження концентрації субстрату K_M , необхідної для насичення активного центру ферменту.

Таблиця 5

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

K_M , мМ	k_{cat} , c^{-1}	k_{cat}/K_M , $\text{mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$
<i>Температура, +8 °C</i>		
$0,39 \pm 0,09$	$6,34 \pm 0,1$	$16,33 \pm 0,3$
<i>Температура, +24 °C</i>		
$0,68 \pm 0,07$	$10,41 \pm 0,3$	$15,32 \pm 0,2$

Виявлена властивість трипсиноподібного ферменту з *A. colbecki* зберігати активність за понижених температур, його температурний оптимум при $+24 \text{ }^\circ\text{C}$ та нестійкість молекули може бути досить перспективною характеристикою ферменту у контексті його можливого впровадження у біотехнологічні виробництва, що потребують нижчих температур перебігу процесу та можливостей швидкої інактивації каталізатору.

З огляду на результати ензим-електрофоретичного аналізу, що підтверджують присутність у тканинах гідробіонтів Антарктичного регіону ферментів, здатних розщеплювати фібриноген, наступним завданням роботи було розробити простий та ефективний метод одержання фібрино(гено)літичних ферментів та дослідити їх потенційний вплив на окремі фактори системи гемостазу. Актуальність подібних досліджень обумовлена стрімким зростанням частки захворювань, що супроводжуються надмірним тромбоутворенням, а також зростанням таких

випадків серед населення віком до 60 років. Застосування фібрино(гено)літичних ферментів може бути частиною стратегії попередження розвитку ускладнень у пацієнтів з високою тромботичною загрозою.

Метод очищення фібрино(гено)літичних ферментів включав афінну хроматографію на блакитній сефарозі та подальше фракціонування одержаної фракції методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200. Зразок (ліофілізат тканини) розчиняли у робочому буфері - 10 мМ трис-НСІ буфер з рН 8,0, що містив з 0,25 М NaCl, залишали на 15 хв на лабораторному струшувачі з невеликою амплітудою для максимального розчинення білкового матеріалу. Після відділення шляхом центрифугування часток, що не розчинилися, супернатант наносили на колонку при швидкості 2 мл/хв. Білки, що зв'язалися з носієм, елюювали робочим буфером що містив 1 М NaCl за такої самої швидкості.

Кожен етап очищення фібрино(гено)літичних ферментів передбачав аналіз одержаних фракцій на присутність ферментів, що виявляють активність щодо фібриногену, оцінку чистоти отриманих ферментів та визначення молекулярної маси білків, присутніх у пробі. На рис. 6 та рис. 7 наведено етапи очищення фібрино(гено)літичного ферменту на прикладі гідробіонту *S. neumayeri*.

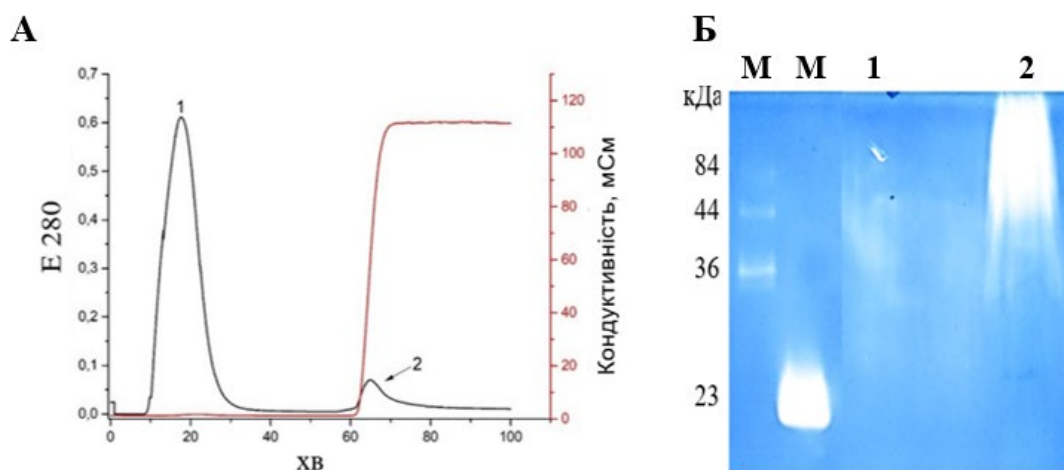


Рис. 6. Хроматограма очищення фібрино(гено)літичного ферменту з *S. neumayeri* (А) на блакитній сефарозі та ензим-електрофореграма одержаної фракції (Б): М – маркери молекулярних мас; 1 – фракція, що не зв'язалась з сорбентом; 2 – фракція, що містить фібрино(гено)літичний фермент

Згідно одержаних результатів (табл. 6), молекулярна маса фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону знаходилася у діапазоні від 26 кДа для *P. corrugatus* до 40 кДа для *A. colbecki*, що у цілому відповідає діапазону молекулярних мас фібрино(гено)літичних ферментів, одержаних з інших джерел (Bello et al., 2006).

З-поміж отриманих ферментів найвищу протеолітичну активність та відносну активність, у порівнянні з активністю плазміну, виявляв фібрино(гено)літичний фермент з *S. neumayeri*.

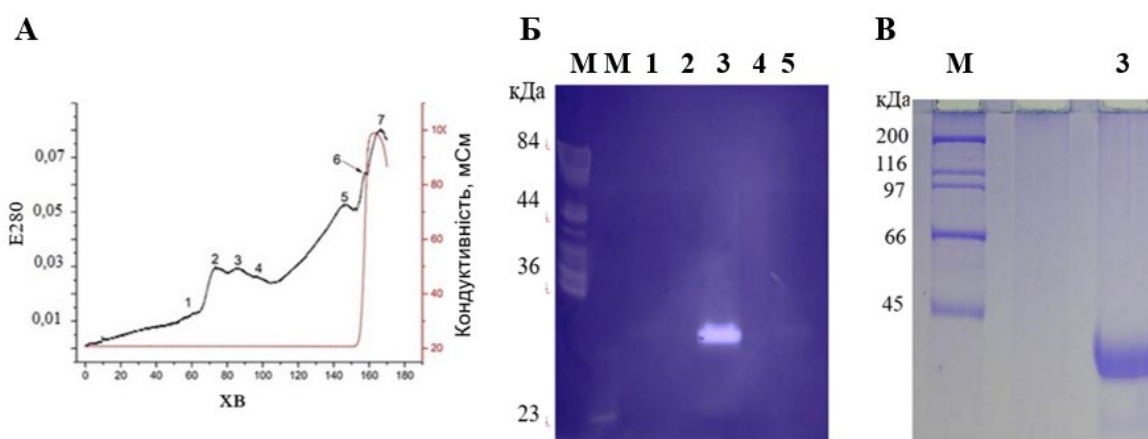


Рис. 7. Хроматограма розділення білків фракції з *S. neumayeri* на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200 (А), ензим-електрофореграма (субстратний білок фібриноген) (Б) та електрофореграма (В) одержаних фракцій: М – маркери молекулярних мас; 1-7 – порядкові номери фракцій

Таблиця 6

Загальна характеристика фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону (M±m, n=6)

Гідробіонти	Молекулярна маса ферменту (кДа)	Загальна протеолітична активність (К.од/мг білка)	Відносна активність ферменту (%)*
<i>S. neumayeri</i>	34 кДа	95,55±4,75	300
<i>O. validus</i>	28 кДа	15,35±0,75	150
<i>A. colbecki</i>	40 кДа	76,23±371	110
<i>P. corrugatus</i>	26 кДа	47,50±2,25	65

*за результатами ензим-електрофоретичного аналізу; розрахунок активності здійснювали відносно активності плазміну

Непрямим свідченням антитромботичного потенціалу фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів є подовження часу зсідання плазми крові у хронометричних тестах АЧТЧ, ПЧ і, що особливо показово, у тесті ТЧ (табл. 7).

Таблиця 7

Час зсідання плазми крові у хронометричних тестах за дії фібрино(гено)літичних ферментів з 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	18,6±0,8	55,8±2,5*	31,9±1,2*	20,8±1,1	68,8 ± 2,7*
ПЧ, с	7,2 ± 0,3	9,2 ± 0,4*	7,1±0,2	6,8±0,3	9,2 ± 0,3*
ТЧ, с	28,7±1,3	49,1±1,6*	34,3±1,7*	30,9±1,6	> 90*

Контролем слугував зразок плазми без додавання досліджуваних фібрино(гено)літичних ферментів

* – $p \leq 0,05$ 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, подовження часу зсідання плазми крові у тесті «тромбіновий час» може вказувати на вплив ферментів саме на молекулу фібриногену, що підтверджується результатами електрофоретичного аналізу зразків фібриногену після його інкубації з досліджуваними ферментами (рис. 8).

Згідно отриманих даних, фібрино(гено)літичні ферменти з гідробіонтів Антарктичного регіону з різною інтенсивністю розщеплювали А α - та В β -ланцюги фібриногену, що залежало від тривалості інкубації зразків фібриногену з фібрино(гено)літичними ферментами та від джерела ферменту.

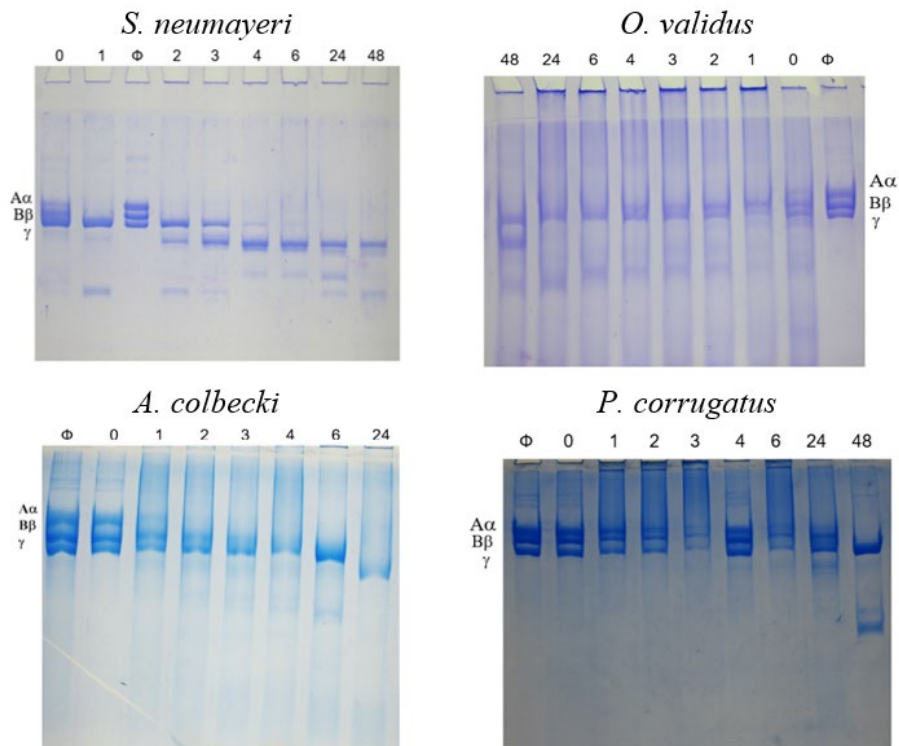


Рис. 8. Електрофореграми зразків фібриногену після інкубації з фібрино(гено)літичними ферментами з гідробіонтів Антарктичного регіону: Ф – зразок фібриногену без інкубації з ферментом (А α -, В β -, γ -ланцюги фібриногену); 0-48 – години інкубації. Електрофорез проведено за відновлювальних умов

Так, фермент з *S. neumayeri* обумовлював розщеплення А α - та В β -ланцюгів фібриногену вже через годину інкубації, в той час як через годину інкубації з ферментом з *A. colbecki* А α -ланцюг фібриногену зазнавав лише незначного розщеплення. Варто відмітити, що фібрино(гено)літичний фермент з *S. neumayeri* розщеплював і γ -ланцюг фібриногену, що у цілому нетипово для фібрино(гено)літичних ферментів. Оскільки, у першу чергу розщеплення зазнавав саме А α -ланцюг фібриногену, це може опосередковано свідчити про належність фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону до α -фібриногеназ. Варто підкреслити, що 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.

Збереження цілісності ланцюгів фібриногену є важливим для реалізації його біологічних ефектів; розщеплення А α -ланцюгів фібриногену впливає на функціональну активність молекули, одним з проявів чого є порушення здатності фібриногену до полімеризації. Одержані в ході дослідження результати (табл. 8), свідчать, що інкубація фібриногену з фібрино(гено)літичними ферментами з гідробіонтів призводить до зростання відсотка фібриногену, який не здатен утворювати фібриновий згусток при додаванні тромбіну. Найбільш ефективним виявився фермент з *S. neumayeri*, що повністю узгоджується з попередніми результатами.

Таблиця 8

Вплив фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону на процес полімеризації фібриногену тромбіном (% фібриногену, що не здатний полімеризуватися) (M \pm m, n=6)

Гідробіонт	Час інкубації з фібрино(гено)літичним ферментом, год		
	1	3	6
Контроль	12,4 \pm 0,5	12,8 \pm 0,5	12,8 \pm 0,5
<i>A. colbecki</i>	87,8 \pm 5,0*	95,0 \pm 5,0*	97,6 \pm 5,0*
<i>S. neumayeri</i>	100,0 \pm 5,0*	100,0 \pm 5,0*	100,0 \pm 5,0*
<i>O. validus</i>	92,6 \pm 5,0*	96,0 \pm 5,0*	96,6 \pm 5,0*
<i>P. corrugatus</i>	52,6 \pm 2,5*	53,6 \pm 2,5*	60,4 \pm 3,0*

Контролем слугував зразок фібриногену без інкубації з досліджуваними фібрино(гено)літичними ферментами

* - $p < 0,05$ різниця значуща у порівнянні зі зразком фібриногену без інкубації з фібрино(гено)літичним ферментом

Також виявлено здатність фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону впливати на тромбоцитарну ланку системи гемостазу, що виявляється у пригніченні процесу АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів. Як видно з даних, наведених у табл. 9, найефективніше агрегацію тромбоцитів пригнічував фібрино(гено)літичний фермент з *S. neumayeri*. Так як дослідження проводили не на чистій суспензії тромбоцитів, а у плазмі, збагаченій на тромбоцити, 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.

Отже, отримані результати дозволяють розглядати гідробіонти Антарктичного регіону як можливе джерело для одержання фібрино(гено)літичних ферментів з перспективою їх застосування у клінічній практиці як основи для створення засобів діагностики та профілактики патологічних змін у системі гемостазу; компоненту багатофункціональних композитів ранозагоювальної дії, крім того

фібрино(гено)літичні ферменти можуть знайти застосування у фундаментальній біології для дослідження білок-білкових взаємодій, закономірностей процесу полімеризації фібрину та слугувати інструментом спрямованого протеолізу фібриногену.

Таблиця 9

Вплив фібрино(гено)літичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів ($M \pm m$, $n=6$)

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

Контролем слугував зразок плазми, збагаченої на тромбоцити, без додавання досліджуваних фібрино(гено)літичних ферментів

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

Пептидні молекули з гідробіонтів Антарктичного регіону, як потенційний засіб корекції метаболічних порушень. 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 підходів профілактики та корекції метаболічних порушень, що ґрунтуються на використанні пептидних молекул. Стабільно зростаючий інтерес та попит на препарати на основі пептидів актуалізує пошук сировини для отримання цих молекул. Одним з можливих рішень може бути використання білоквмісних відходів, які накопичуються на різних етапах переробки сировини як побічні продукти. Тому, в рамках дослідження було апробовано підхід щодо переробки колагеновмісних відходів рибної промисловості, на прикладі луски риб Антарктичного регіону *Champscephalus gunnari* і *Nototheniidae*, як спосіб валоризації відходів та отримання продукції з доданою вартістю. Такий підхід має подвійну перевагу – дозволяє отримувати колаген і/чи пептиди колагену для їх подальшого використання в різних секторах промисловості, косметології чи медицині та через зниження кількості відходів сприятиме покращенню санітарного та екологічного стану довкілля.

Процедура одержання пептидів колагену включала два етапи – екстракцію колагену та його подальший гідроліз до пептидів з молекулярною масою нижче 5 кДа. Задля оптимізації процедури екстракції колагену за такими параметрами як тривалість процесу, вихід та чистота продукту, було модифіковано метод оцтовокислої екстракції колагену, зокрема, введено етап замочування сировини у 5 мМ ЕДТА та включено ЕДТА до екстрагуючого розчину; на етапі демінералізації

використано 0,4 М хлорну кислоту замість хлоридної та скорочено час екстракції до 12 годин. За результатами електрофоретичного аналізу (рис. 9А) використаний нами підхід дозволив отримати колаген, що не містить супутніх білкових домішок; вихід колагену складає 6,15 %. З огляду на молекулярну масу та співвідношення ланцюгів (рис. 9А), одержаний колаген можна віднести до колагену першого типу, який є найпоширенішим у організмі людини, а відтак є більш комерційно затребуваним у порівнянні з колагеном інших типів.

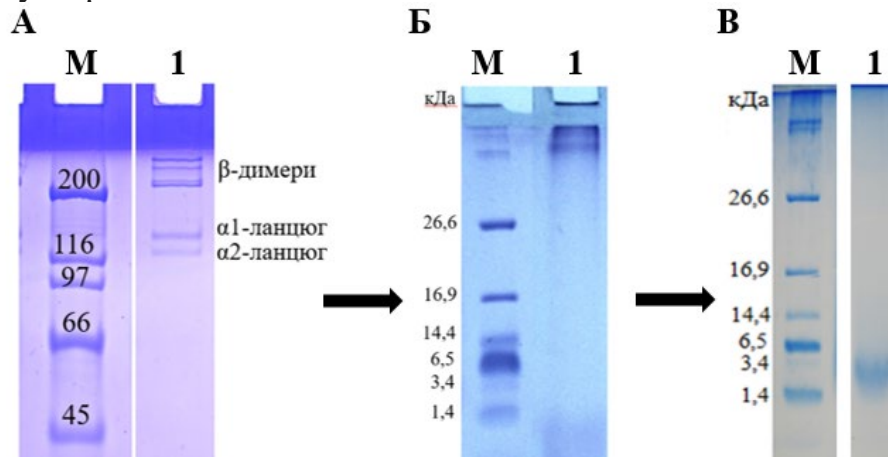


Рис. 9. Електрофореграми зразків колагену, одержаного з луски риб Антарктичного регіону (А), гідролізату колагену, отриманого через 24 години інкубації з фракцією серинових протеїназ з *D. antarctica* (Б) та фракції пептидів колагену після етапу ультрафільтрації на мембранах з відсікаючою здатністю 10 кДа (В): М – маркери молекулярних мас; 1 – досліджуваний зразок

Беручи до уваги здатність серинових протеїназ з *D. antarctica* ефективно розщеплювати колаген та їх достатню стабільність, для гідролізу колагену до низькомолекулярних фрагментів було використано фракцію серинових протеїназ у співвідношенні 1:10 (фермент:колаген; маса/маса), інкубація тривала 24 год при +37°C. Отриманий у такий спосіб гідролізат містив низку фрагментів з молекулярною нижче 10 кДа та певну кількість високомолекулярних домішок (рис. 9Б). Надалі гідролізат піддавали ультрафільтрації на мембранах з відсікаючою здатністю 10 кДа в результаті чого було отримано фракцію пептидів (рис. 9В), яку використовувати у подальших дослідженнях.

Дослідження можливого терапевтичного ефекту пептидів колагену проводили на моделі ожиріння у щурів, індукованого висококалорійною дієтою. З огляду на темпи поширюваності та високий відсоток смертності, ожиріння є однією з найскладніших медико-соціальних проблем сучасності. За таких умов виправданою може бути стратегія, спрямована на попередження прогресування ожиріння та виникнення ускладнень супутніх цьому захворюванню. Згідно отриманих результатів, споживання тваринами з ожирінням пептидів колагену приводило до зниження значення показників, що асоційовані з розвитком ожиріння, зокрема, спостерігалось зниження індексу маси тіла, відносної маси вісцеральної та підшкірної жирової тканини у порівнянні з тваринами з моделлю ожиріння (табл. 10).

Таблиця 10

Вплив пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону на показники, що характерні для ожиріння (M±m, n=6)

Досліджувані показники	Дослідні групи		
	Контроль	Ожиріння	Ожиріння + фракція пептидів колагену
Індекс маси тіла, г/см ²	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*#

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

Такі зміни можуть бути наслідком зниження потягу тварин до їжі, адже маючи вільний доступ до корму тварин, що отримували пептиди колагену, споживали менше корму у порівнянні з щурами з моделлю ожиріння. Споживання пептидів колагену супроводжувалося нормалізацією низки показників, які слугують предикторами розвитку інсулінорезистентності, стану, який передуює цукровому діабету 2-го типу і часто спостерігається у осіб з ожирінням (табл. 11).

Таблиця 11

Концентрація глюкози, вміст гемоглобіну та відносний рівень інсуліну у сироватці крові тварин експериментальних груп (M±m, n=6)

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

Так, було виявлено нормалізуючий вплив пептидів колагену на відносний вміст інсуліну, виявлено зниження концентрації глюкози, причому цей ефект пептидів не був разовим, а підтримувався впродовж тривалого часу, що підтверджується зниженням рівня глікозильованого гемоглобіну.

Також було виявлено зниження ступеню запального процесу, про що опосередковано свідчать результати визначення вмісту цитокінів у сироватці крові тварин з ожирінням, що споживали пептиди колагену (рис. 10) та покращення структурного стану жирової тканини, зокрема, зниження рівня фіброзу, оцінене за накопиченням колагенових волокон (рис. 11А) та зниженням кількості активованих тучних клітин у жировій тканині (рис. 11Б).

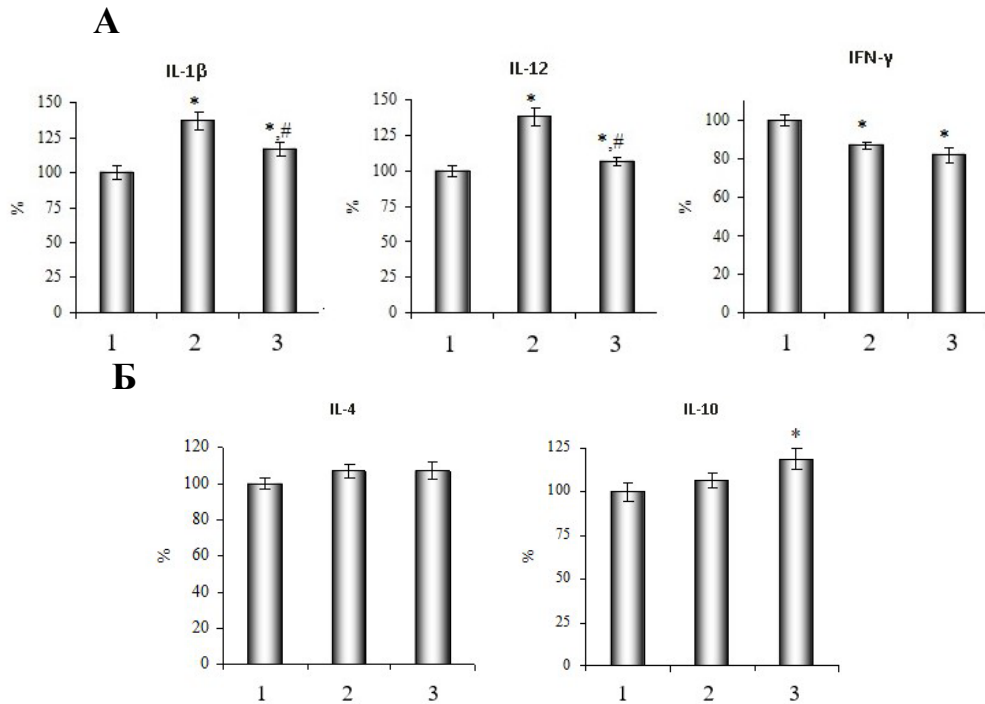


Рис. 10. Відносний вміст про- (А) та протизапальних (Б) цитокінів у сироватці крові щурів дослідних груп: 1 – контроль; 2 – ожиріння; 3 – ожиріння + фракція пептидів колагену

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

Отже, на основі отриманих результатів можна зробити висновок про здатність пептидів колагену з луски риб Антарктичного регіону впливати на розвиток ожиріння, що обґрунтовує доцільність їх використання як основи для створення засобів 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. Водночас, виявлені ефекти пептидів колагену можуть слугувати свідченням перспективності запропонованої нами технології переробки колагеновмісних відходів рибної промисловості задля отримання продукції з доданою вартістю.

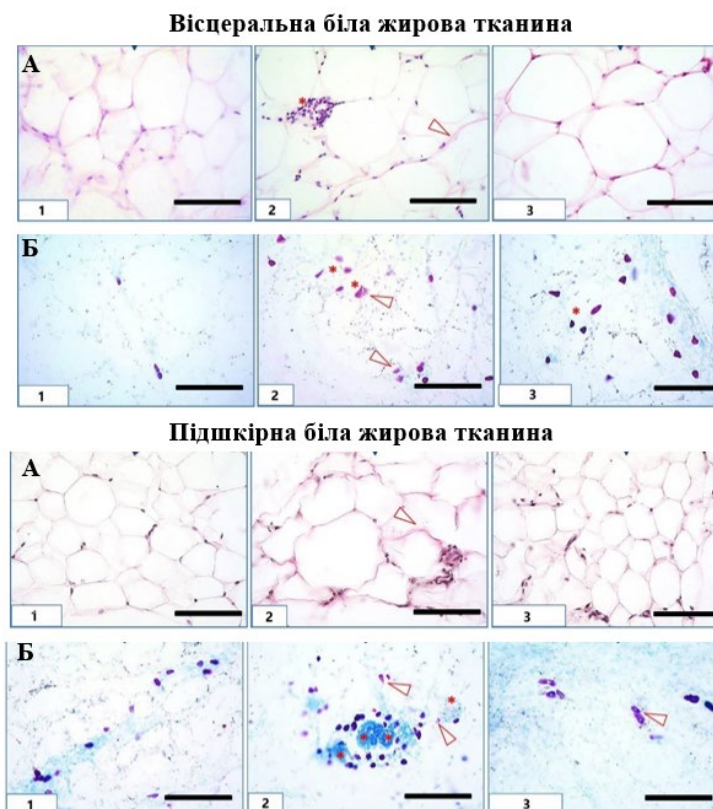


Рис. 11. Мікрофотографії гістохімічного виявлення колагенових волокон (А) (зірочки - корона-подібні структури; стрілки - колагенові волокна. Забарвлення за Ван Гізоном; колагенові волокна забарвлені в червоний колір; шкала 100 мкм) та тучних клітин (Б) (зірочки - корона-подібні структури; стрілки - дегранульовані тучні клітини. Забарвлення толудіновим синім; гранули тучних клітин мають рожевий колір; шкала 100 мкм) у білій жировій тканині: 1 – контроль; 2 – ожиріння; 3 – ожиріння + фракція пептидів колагену

Окрім гідролізу до пептидів, ще одним можливим шляхом застосування колагену може бути його включення до складу ранозагоювальних засобів. Незважаючи на широкий арсенал препаратів, 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.

Дослідження можливих ефектів композицій на основі колагену з гідробіонтів Антарктичного регіону проводили на моделі вирізаних площинних ран, відсоток яких у структурі ранових уражень є стабільно високим через виробничий та побутовий травматизм. Нами виявлено певний ранозагоювальний ефект досліджуваних композицій – за їх використання повна епітелізація ран спостерігалася на 18 добу у порівнянні з результатом у групі тварин, де рани гоїлись природним чином і 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*.

Таблиця 13

Вплив колагену з гідробіонтів Антарктичного регіону на процеси загоєння ран ($M \pm m$, $n=6$)

Доба	Площа рани, мм ²		
	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

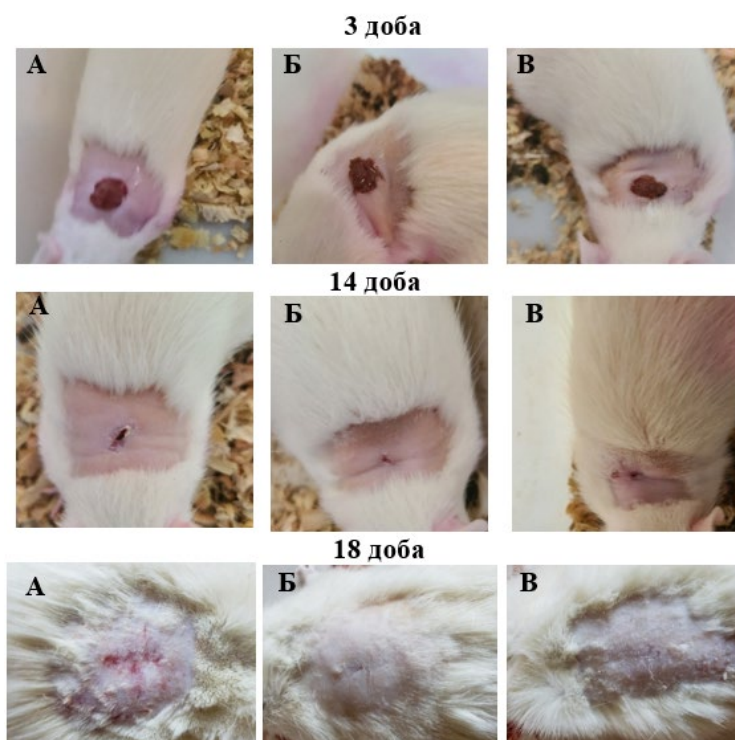


Рис. 12. Фотографії вирізаних площинних ран в динаміці загоєння: А – без нанесення композицій; Б – композиція на основі колагену з *D. antarctica*; В – композиція на основі колагену з луски риб Антарктичного регіону

Наочним підтвердженням ранозагоювального ефекту композицій на основі колагену з гідробіонтів Антарктичного регіону слугують фотографії, які відображають процес загоєння ран в динаміці (рис. 12).

Зазвичай біологічно-активні пептиди отримують шляхом гідролізу і майже відсутні роботи щодо ефектів ендогенних пептидів, які фізіологічно присутні в тканинах організму. Тому надалі було оптимізовано метод отримання ендогенних пептидів та досліджено деякі їхні біологічні активності, зокрема, антиоксидантну та здатність впливати на окремі фактори системи гемостазу. Пошук пептидів саме з такими активностями продиктований важливістю підтримання антиоксидантного статусу організму, виснаженість якого зростає з віком, в умовах зростаючого техногенного навантаження, за розвитку патологічних станів. З іншого боку невпинний ріст серцево-судинних захворювань викликає необхідність розширення арсеналу лікарських засобів, здатних вибірково впливати на функціонування окремих компонентів системи гемостазу.

У результаті застосування тристадійної процедури очищення пептидів, яка включала етапи осадження білкової складової 0,6 М хлорною кислотою, доосадження олігопептидів 67 % етиловим спиртом та ультрафільтрацію на мембранах з відсікаючою здатністю 10 кДа, було отримано фракцію ендогенних пептидів з молекулярною масою нижче 5 кДа.

Узагальнюючи отримані результати можемо зробити висновок про помірний антиоксидантний потенціал ендогенних пептидів з *E. superba*, підтверджений у тестах оцінки загальної антиоксидантної активності ($36,0 \pm 2,5$ %), редуруючої здатності ($64,0 \pm 4,5$ %), здатності знешкоджувати радикали оксиду азоту ($34,0 \pm 3,5$ %) та супероксидні аніон-радикали ($20,0 \pm 2,5$ %) і відсутність такого у пептидів з *D. antarctica* (табл.14).

Таблиця 14

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

Тест для оцінки антиоксидантного потенціалу	Референтна сполука	<i>E. superba</i>	<i>D. antarctica</i>
Загальна антиоксидантна активність, оцінена за відновленням радикалу 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (ДФПГ), %	$98,0 \pm 5,0^{ак}$	$36,0 \pm 2,5$	$10,0 \pm 1,5$
Редукуюча здатність, %	$95,0 \pm 4,5^{гв}$	$64,0 \pm 4,5$	$2,5 \pm 0,5$
Здатність знешкоджувати гідроксильні радикали, %	$85,0 \pm 4,5^{ак}$	$3,0 \pm 0,2$	$13,0 \pm 1,5$
Здатність знешкоджувати супероксидні аніон-радикали, %	$55,0 \pm 2,5^{ак}$	$20,0 \pm 2,5$	$2,3 \pm 0,5$
Здатність знешкоджувати радикали оксиду азоту, %	$90,0 \pm 4,0^{гв}$	$34,0 \pm 3,5$	$1,2 \pm 0,07$
Здатність знешкоджувати пероксид водню, %	$57,0 \pm 2,8^{ак}$	$10,5 \pm 0,5$	$16,8 \pm 0,7$

^{ак} – аскорбінова кислота; ^{гв} – глутатіон відновлений

Надалі було досліджено вплив пептидів з гідробіонтів Антарктичного регіону на тромбоцитарну ланку системи гемостазу. 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.

Згідно отриманих результатів, досліджувані пептиди не інгібували процес АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів (рис. 13). Натомість пептиди з *E. superba* при їх внесенні до плазми, збагаченої тромбоцитами, чинили незначний проагрегаційний ефект, який виявлявся у концентраційно залежному зростанні ступеню агрегації тромбоцитів.

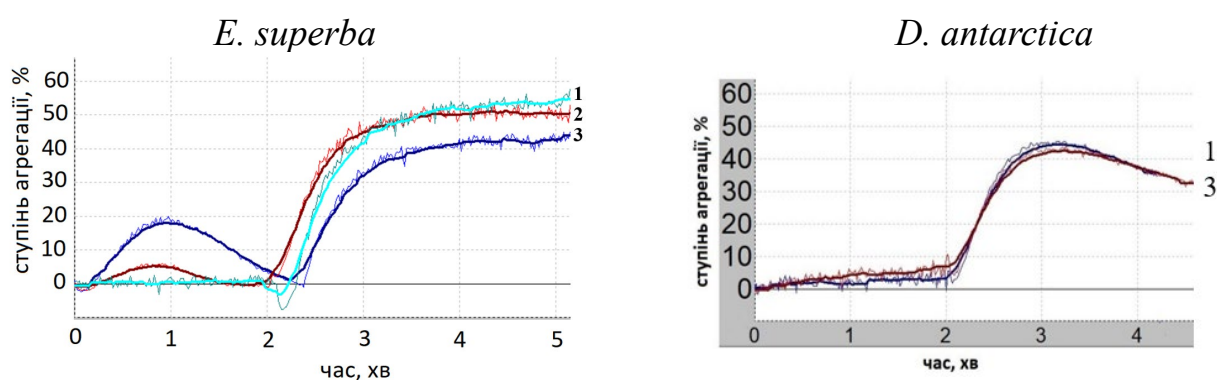


Рис. 13. Агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів за попередньої інкубації з пептидами з гідробіонтів Антарктичного регіону: 1 – контроль; 2 – концентрація пептидів 0,4 мкг/мл; 3 – концентрація пептидів 40 мкг/мл

Важливим структурно-функціональним елементом судинно-тромбоцитарної ланки гемостазу є ендотелій кровоносних судин, який через синтез та секрецію низки біологічно активних речовин активно залучається у підтримку тканинного гомеостазу, регулюючи місцевий кровотік, коагуляцію, фібриноліз, запалення. Молекули, що здатні впливати на секреторну активність ендотеліоцитів, потенційно можуть бути використані для корекції чи терапії порушень спричинених ендотеліальною дисфункцією.

Відповідно до одержаних результатів (табл. 15), інкубація ендотеліоцитів з пептидами з *E. superba* викликала секрецію клітинами низки факторів, у той час як пептиди з *D. antarctica* не впливали на секреторну функцію ендотеліоцитів. Єдиним виключенням був фактор фон Віллебранда, рівень якого був 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. З-поміж досліджених факторів найбільший інтерес становить здатність пептидів з *E. superba* впливати на секрецію ТАП, оскільки ТАП є основним

фізіологічним активатором фібринолізу, а відтак молекули, які можуть впливати на його вивільнення, мають перспективи використання як профібринолітичні засоби.

Таблиця 15

Відносний вміст деяких факторів у культуральному середовищі за інкубації ендотеліоцитів з пептидами з гідробіонтів Антарктичного регіону (M±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
Тканинний активатор плазміногену (ТАП)	0,076 ± 0,001	0,159 ± 0,003*	0,087 ± 0,008
Інгібітор активатора плазміногену I типу (ПАІ-1)	0,069 ± 0,003	0,104 ± 0,007*	0,07 ± 0,005

* $p < 0,05$ різниця значуща у порівнянні з контролем

Згідно з отриманими результатами, пептиди з *E. superba* та *D. antarctica* здійснювали модулюючий вплив на здатність тромбіну перетворювати фібриноген у фібрин – 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. 14А). Також було виявлено здатність пептидів впливати на динаміку процесу полімеризації плазми крові (рис. 14Б).

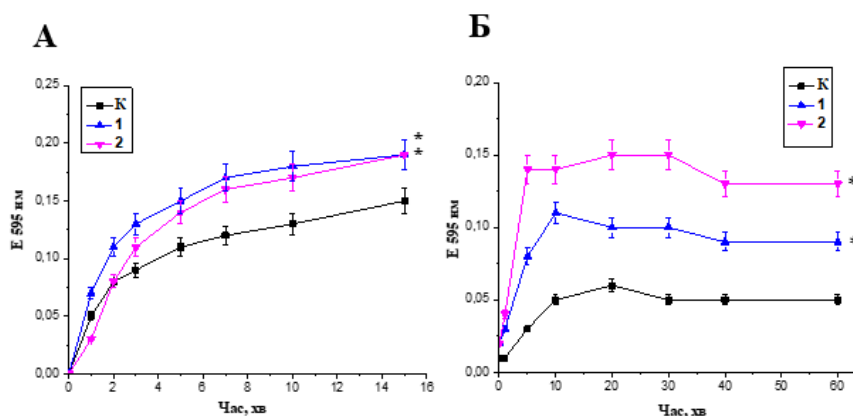


Рис. 14. Динаміка процесу полімеризації фібриногену, індукованої додаванням тромбіну, проінкубованого з пептидами (А) та динаміка процесу полімеризації плазми крові після її преінкубації з пептидами (Б): К – контроль; 1 – *E. superba*; 2 – *D. antarctica*. Дані представлено як оптичну щільність проб при 595 нм

* $p < 0,05$ різниця значуща у порівнянні з контролем

Такі дані є новими і потребують проведення подальших досліджень спрямованих на виявлення механізмів реалізації виявлених ефектів пептидів. Отже, фракція ендогенних пептидів з тканин *E. superba* містить молекули, що виявляють помірні антиоксидантні властивості, а також молекули, що здатні впливати на окремі фактори судинно-тромбоцитарної ланки системи гемостазу, у той час результати оцінки біологічних ефектів пептидів з *D. antarctica* не дозволяють розглядати цей гідробіонт як можливе джерело біологічно-активних пептидів.

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, було оцінено доцільність ферментативної конверсії біомаси гідробіонтів (на прикладі *A. colbecki*) як способу отримання фракції біологічно активних пептидів, зокрема, пептидів з антиоксидантними властивостями. Наявність у пептидів антиоксидантної активності, як один з критеріїв оцінки ефективності гідролізу сировини, продиктована тим фактом, що хронічний оксидативний стрес належить до провідних патогенетичних механізмів розвитку порушень за різних патологій, у тому числі й ожиріння. За цих умов, засоби, що здатні впливати на антиоксидантний баланс, можуть виявляти певний профілактичний чи коригуючий ефект.

Порівнявши ефективність гідролізу екстракту тканини *A. colbecki* за участі трипсину і пепсину за такими параметрами як молекулярна маса пептидів та їх загальна антиоксидантна активність, оцінена у тесті з 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилом, ми зупинили свій вибір на трипсині, так як загальна антиоксидантна активність у фракції пептидів, отриманій при використанні трипсину, була дещо вищою і становила $32,0 \pm 3,5$ % у порівнянні з $28,5 \pm 2,5$ % при використанні пепсину.

Виявлено, що споживання тваринами з моделлю ожиріння, індукованого споживанням висококалорійної дієти, розчину «гідролізних» пептидів з *A. colbecki* приводило до покращення показників, що характеризують прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз (табл. 16), порушення якого є одним із провідних патогенетичних механізмів розвитку низки ускладнень за ожиріння. Так, спостерігалась нормалізація вмісту первинних та кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів, а також вмісту альдегіддинітрофенілгідразонів та кетондинітрофенілгідразонів, які, відповідно, є ранніми та пізніми маркерами окиснювальної деструкції білків.

Ефект пептидів є комплексним і реалізується на рівні ферментативної ланки антиоксидантної системи захисту, що виявляється у зростанні активності ключових антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази та каталази у порівнянні з результатами за ожиріння та на рівні неферментативної ланки антиоксидантної системи, свідченням чого може бути зростання вмісту загальних і, зокрема, небілкових сульфгідрильних груп (табл. 16).

Вплив «гідролізних» пептидів з *A. colbecki* на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз щурів з моделлю ожиріння (M±m, n=6)

	Дослідні групи		
	Контроль	Ожиріння	Ожиріння+«гідролізні» пептиди з <i>A. colbecki</i>
Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів			
Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка	0,019±0,0009	0,036±0,002*	0,019±0,0007#
ТБК-активні продукти, нмоль/мг білка	0,02±0,001	0,61±0,003*	0,71±0,004*,#
Шиффові основи, ум.од/мг білка	40,3±2,45	163,7±8,15*	46,2±4,23*,#
Вміст продуктів окиснювальної модифікації білків			
Альдегіддинітрофеніл-гідрозони, нмоль/мг білка	0,187±0,009	0,698±0,041*	0,253±0,012*,#
Кетондинітрофеніл-гідрозони, нмоль/мг білка	0,255±0,023	0,571±0,035*	0,2±0,024*,#
Активність ключових ферментів антиоксидантного захисту			
Супероксиддисмутазна активність, ум.од/хв на мг білка	3,25±0,15	2,57±0,11*,#	4,35±0,19*
Каталазна активність, мкмоль H ₂ O ₂ /хв на мг білка	0,51±0,02	0,39±0,01*	0,50±0,02#
Вміст сульфгідрильних груп			
Загальні SH-групи, мкмоль/мг білка	0,64±0,03	0,52±0,03*	0,76±0,03*,#
Білок-зв'язані SH групи, мкмоль/мг білка	0,43±0,02	0,33±0,01*	0,11±0,006*,#
Небілкові SH-групи, мкмоль/мг білка	0,21±0,01	0,17±0,007*	0,66±0,04*,#

* – 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, за ожиріння мають місце порушення у функціонуванні центральної та периферійної серотонінергічних систем, що призводить до зміни харчової поведінки й спонукає до споживання їжі, виходячи не стільки з потреб основного обміну, а через необхідність стимулювати серотонінергічну систему. Беручи до уваги той факт, що тварини, які споживали «гідролізні» пептиди з *A. colbecki* виявляли менший потяг до їжі у порівнянні з тваринами з моделлю ожиріння (20,5±2,2 г/добу проти 24,5±2,4 г/добу) надалі було

досліджено деякі показники, що характеризують стан периферійної серотонінергічної системи – системи, яка безпосередньо задіяна у регуляцію апетиту та харчової поведінки (рис. 17).

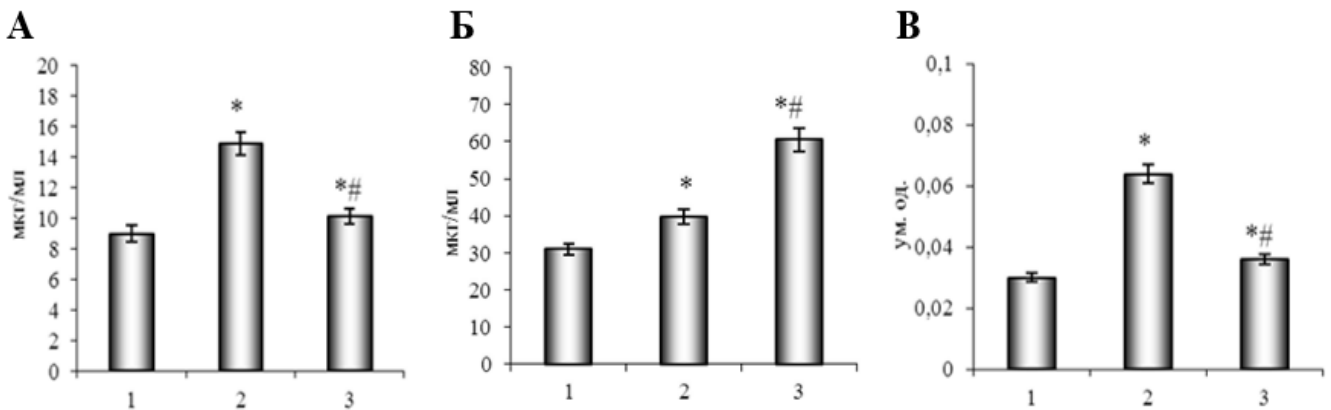


Рис. 17. Концентрація серотоніну (А), триптофану (Б) та моноамінооксидазна активність (В) у сироватці крові шурів з моделлю ожиріння та тварин, що споживали розчин «гідролізних» пептидів з *A. colbecki* ($M \pm m$, $n=6$): 1 – контроль; 2 – група тварин з моделлю ожиріння; 3 – група тварин, що споживала 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

Встановлене зниження концентрації серотоніну на тлі значного зростання концентрації попередника його синтезу – триптофану та зниження активності ферменту основного шляху катаболізму серотоніну опосередковано вказує на порушення механізмів синтезу серотоніну у тварин, які споживали гідролізні пептиди з *A. colbecki*. Корируючий ефект пептидів частково реалізується через вплив на серотонінергічну систему, що приводить не лише до певної нормалізації енергетичного гомеостазу, а й попереджує розвиток супутніх ожирінню ускладнень, адже відомо, що високі рівні сироваткового серотоніну асоційовані з, наприклад, серцево-судинними патологіями. 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 конкретних молекул, що виявляють вплив на функціонування периферійної серотонінергічної системи, і про створення препаратів для корекції порушень за ожиріння. Оскільки в умовах нашого дослідження розчин пептидів отримували тварини, у яких уже розвинулось ожиріння, результати щодо ефектів пептидів з *A. colbecki* дозволяють говорити не стільки про профілактичну дію, скільки про коригуючий ефект пептидів.

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. 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 білоквмісної сировини.

Оптимізовані методи вилучення та очищення цільових білкових молекул інтегровано у загальний методологічний підхід, який за потреби можна використовувати для комплексного одержання з одного об'єкту всього спектру цільових білкових молекул, що дозволить максимально повністю використовувати сировину, мінімізувати накопичення відходів і досягти у такий спосіб більшого економічного ефекту. Разом з тим, запропоновану нами технологію можна поділити на окремі блоки, які дозволять у залежності від потреб та цілей отримувати окремі білкові молекули, наприклад, серинові чи фібрино(гено)літичні ферменти, колаген чи пептидні молекули (рис. 18 та рис. 19). Всі отримані цільові молекули виявляли біологічні активності та ефекти, підтверджені в експериментах *in vitro* та *in vivo*, що є ще одним свідченням ефективності запропонованого підходу.

За результатами виконання дисертаційної роботи обґрунтовано можливість використання гідробіонтів Антарктичного регіону як сировинної бази для одержання молекул білкової природи за рахунок залучення 1) малоцінних видів гідробіонтів (*S. neumayeri*, *O. validus*, *A. colbecki*, *P. corrugatus*), яким на сьогодні приділяється недостатньо уваги як можливого сировинному ресурсу; 2) потенційно інвазійних видів (*D. antarctica*), які через зміни кліматичних умов і підвищення температури можуть становити небезпеку експансії та порушення екологічної рівноваги в регіоні, 3) а також використання відходів рибної промисловості (луски) та нерибних об'єктів промислу (*E. superba*).

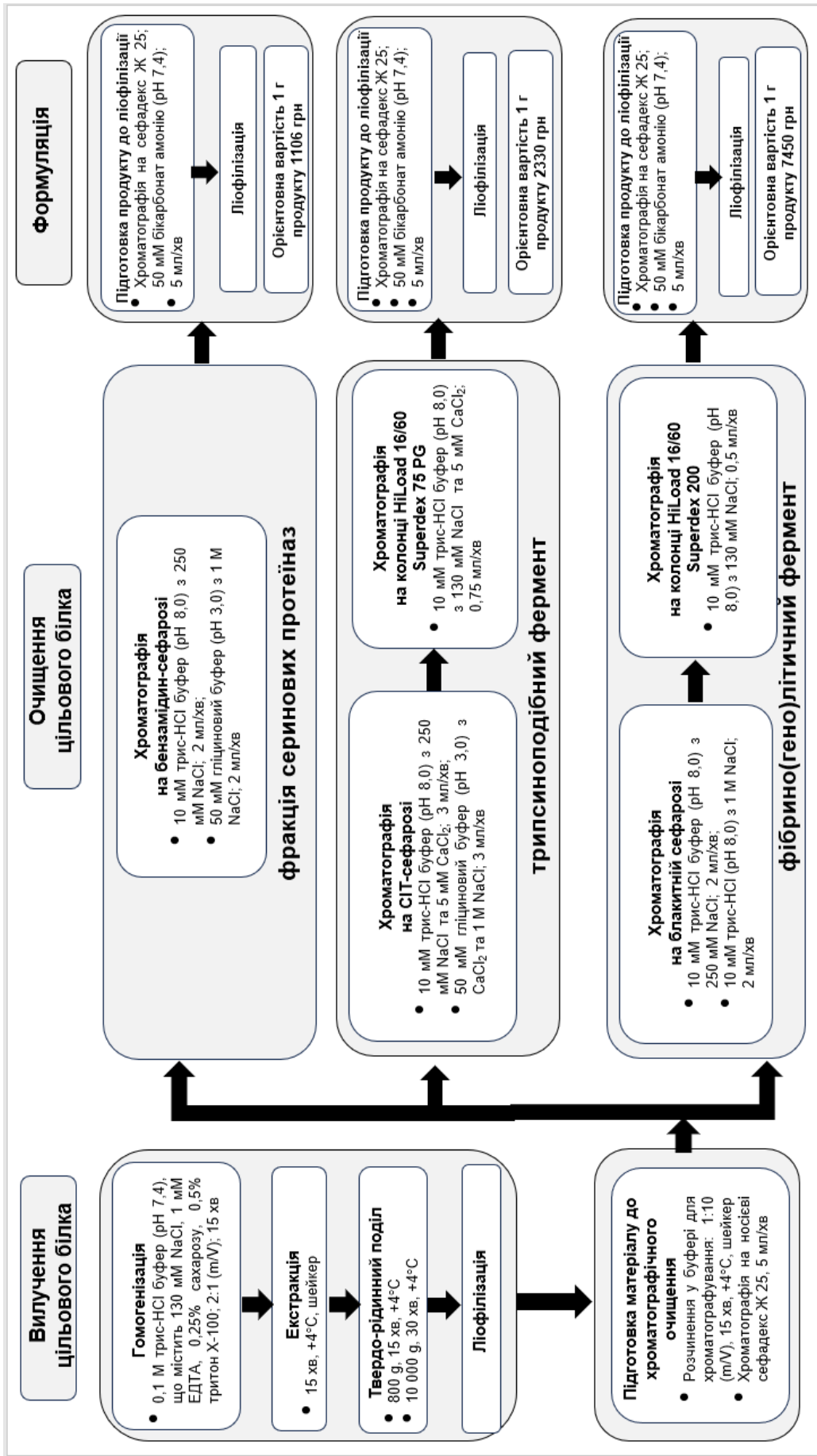


Рис. 18. Основні етапи очищення цільових ферментів з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону

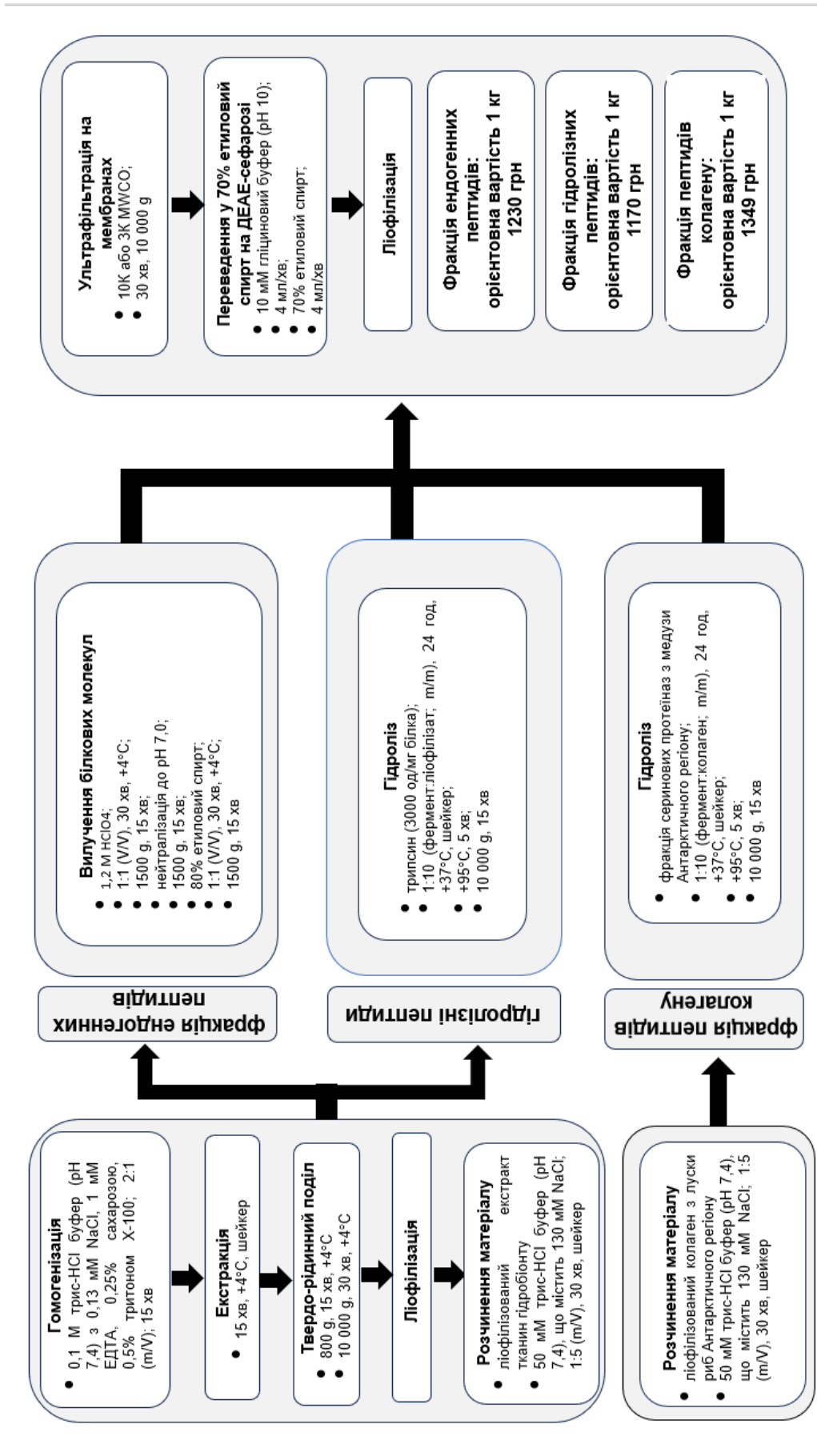


Рис. 19. Основні етапи отримання пептидів з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону

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 рН 12,0, а трипсиноподібний фермент за *A. colbecki* – за температури +24 °C і значенні рН 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 супероксиддисмутази 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.

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, **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 гідролітичних 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*, *Eurhaisia 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 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)*

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 гідролітичних 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 екстракту 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.

АНОТАЦІЯ

Ракша 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.

Дисертацію присвячено розробці біотехнологічних підходів створення інноваційних продуктів з гідробіонтів Антарктичного регіону, на основі білкових молекул та пептидів. У результаті поєднання хроматографічних підходів очищення білків було запропоновано методи, найбільш ефективні для очищення

фібрино(гено)літичних ферментів, трипсиноподібного ферменту та фракції серинових протеїназ. Встановлено, що фібрино(гено)літичні ферменти з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону належать як до металопротеїназ (ферменти з *S. neumayeri*, *A. colbecki*), так і до серинових протеїназ (фермент з *O. validus*); очищені ферменти виявляють виражені антикоагуляційні властивості, зокрема, пригнічують АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів та специфічно розщеплюють молекулу фібриногену, що призводить до утворення фібриногену зі зниженою здатністю до полімеризації при додаванні тромбіну.

Запропоновано спосіб валоризації відходів рибної промисловості на прикладі луски риб задля отримання колагену і біологічно-активних пептидів колагену та виявлено ранозагоювальний ефект колагену на моделі вирізанних площинних ран та коригуючий ефект пептидів колагену на моделі ожиріння у щурів, індукованого споживанням висококалорійної дієти.

Оптимізовано метод екстракції з тканин ендогенних пептидів з молекулярною масою нижче 5 кДа та виявлено наявність помірних антиоксидантних властивостей та мембрано-протекторної активності у ендогенних пептидів з *E. superba*, а також їх здатності впливати на окремі фактори коагуляційної та судинно-тромбоцитарної ланок гемостазу.

Обґрунтовано доцільність застосування методу ферментативного гідролізу як способу конверсії білоквмісної сировини у продукцію, що потенційно може знайти застосування у медицині та інших секторах промисловості, зокрема, пептидів, які виявляють вплив на функціонування периферійної серотонінергічної системи та прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз за патологічних станів.

За результатами проведених досліджень сформульовано концептуальні положення розроблення технологій використання біологічних ресурсів Антарктичного регіону на прикладі малоцінних видів гідробіонтів (*S. neumayeri*, *O. validus*, *A. colbecki*, *P. corrugatus*), потенційно інвазійних видів (*D. antarctica*), а також використання відходів переробки рибної сировини (луски) та нерибних об'єктів промислу (*E. superba*) як альтернативного джерела молекул білкової природи для отримання на їх основі інноваційних біотехнологічних продуктів з метою використання у медицині та інших секторах промисловості.

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

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 biotechnological approaches to the creation of innovative products from the hydrobionts of the Antarctic region based on protein molecules and peptides. As a result of the combination of chromatographic approaches for protein purification, the most effective methods for the purification of fibrin(gen)olytic enzymes, trypsin-like enzymes, and fraction of serine proteinases were proposed.

It was established that fibrino(geno)lytic enzymes from the tissues of hydrobionts of the Antarctic region belong to both metalloproteinases (enzymes from *S. neumayeri* and *A. colbecki*) and serine proteinases (enzyme from *O. validus*); the purified enzymes show pronounced anticoagulant properties, in particular inhibiting ADP-induced aggregation of platelets and specifically cleaving the fibrinogen molecule, which leads to the formation of fibrinogen with a reduced ability to polymerize upon addition of thrombin.

A method of valorization of fish industry waste is proposed using the example of fish scales to obtain collagen and biologically active collagen peptides. The wound-healing effect of collagen on the model of excised planar wounds and the corrective effect of collagen peptides on the model of obesity in rats induced by the consumption of a high-calorie diet are revealed.

The method of extraction of endogenous peptides with a molecular weight below 5 kDa from tissues was optimized, and the presence of moderate antioxidant properties and membrane-protective activity of endogenous peptides from *E. superba*, as well as their ability to influence certain factors of coagulation and vascular-platelet links of hemostasis, were found.

The expediency of using the method of enzymatic hydrolysis as a method of converting protein-containing raw materials into products that can potentially be used in medicine and other sectors of industry, in particular, peptides that have an effect on the functioning of the peripheral serotonergic system and pro-oxidant-antioxidant homeostasis in pathological conditions, is substantiated.

Based on the results of the research, conceptual provisions for the development of technologies for the use of biological resources of the Antarctic region were formulated using the example of low-value species of hydrobionts (*S. neumayeri*, *O. validus*, *A. colbecki*, and *P. corrugatus*), potentially invasive species (*D. antarctica*), as well as the use of fish waste (scales) and non-fishery species (*E. superba*) as an alternative source of protein molecules for obtaining innovative biotechnological products based on them for use in medicine and other sectors of industry.

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