

ЕКОЛОГІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ ВОДНИХ ТВАРИН

УДК 594.3:[577.151.64+577.152.3]

В.А. ТОПТИКОВ, к. б. н., ст. наук. співроб.,
Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна
e-mail: v.a.toptikov@gmail.com
ORCID 0000-0002-7881-6726

І.І. РОМАНОВСЬКА, д. б. н., професор,
Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна
e-mail: romairina@gmail.com
ORCID 0000-0002-3326-987X

О.О. КОВТУН, к. б. н., доцент,
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна
e-mail: hydrobiostation@gmail.com
ORCID 0000-0001-8820-5606

ПРОТЕОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ В ОРГАНАХ ЧОРНОМОРСЬКИХ МОЛЮСКІВ

Досліджено протеолітичні активності до різних субстратів в органах моллюсків Чорного моря: рапани венозної (*Rapana venosa*, Valenciennes, 1846), мідії середземноморської (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) та донаксу обрізаного (*Donax trunculus*, Linnaeus, 1758). В слинних залозах рапани і гепатопанкреасі мідії виявлена значна колагенолітична активність, певний рівень фібринолітичної. Встановлено органноспецифічність наборів протеолітичних ензимів з різною субстратною специфічністю. Шляхом електрофорезу розраховані молекулярні маси желатинази. Желатиназні зимограми показали різноманітність протеїнази, серед яких значну кількість займають матриксні металопротеїнази. Результати дозволяють рекомендувати рапану і мідію як перспективне джерело отримання препаратів з колагено- і фібринолітичною активністю, важливих з медичної точки зору.

Ключові слова: *Rapana venosa*, *Mytilus galloprovincialis*, *Donax trunculus*, протеїнази, колагеназна і фібринолітична активності.

Протеолітичні ензими грають ключову роль у життєдіяльності всіх організмів від вірусів до вищих рослин та тварин. Важливість цих ензимів визначається безліччю їх функціональних можливостей та різноманітністю процесів, в яких вони виконують провідну роль [29]. Крім забезпечення перетравлення протеїнових компонентів їжі та його регуляції [3] протеолітичні ензими вкрай важливі для процесу згортання крові [46],

Ц и т у в а н н я: Топтіков В.А., Романовська І.І., Ковтун О.О. Протеолітична активність ензимів в органах чорноморських моллюсків. *Гідробіол. журн.* 2023. Т. 59. № 6. С. 73—85.

модуляції імунної відповіді [23, 32], регуляції генетико-біохімічних процесів на різних рівнях клітинної організації та реалізації сигнальних шляхів [5, 13, 16, 28, 32, 36, 42]. Відповідно до властивостей протеолітичних ензимів вони знаходять різноманітне застосування у медицині [8, 19, 24, 33, 47]. Протеїнази також широко використовуються як інструмент в наукових дослідженнях [34].

Таким чином, з вищесказаного зрозуміло важливість вивчення протеїназ та знаходження їх нових форм з особливими властивостями. Морські гідробіонти вважаються перспективними джерелами різноманітних біологічно активних речовин для використання в першу чергу з медичною метою [4, 15, 30, 38, 43]. Незважаючи на інтенсивне наукове та комерційне вивчення, залишаються нез'ясованими багато особливостей молюсків, біохімічних зокрема [18, 25]. В даний час особливу увагу у біохімічному аспекті привертають до себе протеази з колагенолітичною активністю, зокрема матриксні металопротеїнази (ММП), та фібринолітичні ензими. У зв'язку з цим метою роботи було визначити наявність протеолітичної активності та субстратну специфічність ензимів в органах найбільш розповсюджених молюсків північно-західної частини Чорного моря: рапани венозної (*Rapana venosa*, Valenciennes, 1846), мідії середземноморської (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) та донаксу обрізаного (*Donax trunculus*, Linnaeus, 1758).

Матеріал і методика досліджень

Мідію та рапану збирали в Одеській затоці в районі Малого Фонтана (північно-західна частина Чорного моря) за допомогою аквалангу в липні-серпні 2021 року на твердих кам'яних субстратах (природний черепаший пашик) на глибині 5—12 м (географічні координати: 46°44'09.05"N; 30°77'40.74"E). Донаксів, які зариваються у пісок на глибину до 10 см, вилловлювали у тому ж регіоні на глибині 5—7 м. До аналізу молюсків зберігали у морозильній камері за температурою -28 °С.

Як джерело протеїназ у рапани використовували слинні залози, лейбленівську залозу та гепатопанкреас, у мідії — гепатопанкреас і м'яке тіло повністю, у донаксу — тільки м'яке тіло. Вік особин рапани складав 3—5 років. Довжина дослідних особин мідій — 65—85 мм, донаксів — 40—45 мм. Препарування молюсків і екстракцію проводили відповідно [45]. Готували гомогенати з 15—30 особин із застосуванням буферу для екстракції, що містив детергент Тритон Х-100, у відношенні тканина : буфер 1 : 2 з наступним центрифугуванням при 4 °С 30 хв. при 2500 g (центрифуга Laborfuge 400 R, ThermoScientific, Німеччина). В отриманій надосадовій рідині визначали протеолітичну активність з використанням різних субстратів.

Загальну протеолітичну активність визначали за казеїном з коров'ячого молока (Sigma) за схемою, запропонованою у роботі [1] з деякими модифікаціями. Желатинолітичну активність встановлювали, використовуючи 0,5 % розчин желатину (Serva). Колагенолітичну активність

визначали за колагеном бичачого ахіллового сухожилля (Sigma-Aldrich) (2 мг в інкубаційній суміші), за методом [31] з деякими змінами.

Модифікації у вище зазначених методах полягали у наступному: тривалість інкубації при 37 °С у 2,5 мл 0,05 М Трис-НСІ буферу, рН 7,5 з 20 ммоль СаСl₂ складала 1 год. Реакцію починали доданням 0,1 мл досліджуваного препарату та зупиняли доданням розчину трихлороцтової кислоти (ТХО) до кінцевої концентрації 5%. Фібринолітичну активність визначали за вищевказаних умов у інкубаційному середовищі, що містить 1 мг фібрину з плазми людини (Sigma-Aldrich). Ступінь гідролізу протеїнів вимірювали спектрофотометрично (Cary 60, Agilent Technologies) за лейцином та розраховували активність у мкмоль лейцину/мг протеїну/хв.

Визначення трипсиноподібної (амідазної) активності здійснювали за гідролізом БАПНА (бензоїл-аргінін-4(р)-нітроаніліду гідрохлориду) за продуктом розщеплення — *n*-нітроаніліну [12].

Як референтний зразок для порівняльного аналізу визначали активність серратіопептидази (STP) кишкової бактерії *Serratia* E15, виділеної та очищеної з комерційного препарату «Серрата» (Kusum Healthcare Pvt Ltd) [2].

Концентрацію протеїну вимірювали за методом Лоурі у модифікації Хартрі [20]. Для побудови калібрувальної кривої використовували розчини альбуміну сироватки бика.

Вимірювання протеолітичної активності та кількості протеїну здійснювали у 3—5 незалежних повторюваннях з урахуванням значень контрольних зразків.

Для визначення молекулярної маси електрофоретичних форм з протеолітичною активністю (желатиназного спектру) проводили електрофорез за методом Леммлі [26] у присутності детергенту додецилсульфату натрію (SDS) без додавання відновлюваних агентів у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ). При приготуванні гелів для визначення форм з протеолітичною активністю застосовували розчин желатину до кінцевої концентрації 0,125 %.

Електрофорез проводили в апараті Cleaver Scientific Ltd у гелях розміром 15×15 см і товщиною 1 мм. В окрему доріжку вносили маркери молекулярної маси (CSL-PPL Prestained Protein Ladder, Великобританія). Для отримання желатиназного спектру гелі після електрофорезу відмивали від SDS 0,5 % розчином Тритону X-100 у дистильованій воді (5 змін по 20—30 хв.), потім приливали 0,01 М Трис-НСІ буфер рН 7,5 з доданням СаСl₂ до кінцевої концентрації 2 ммоль та витримували 16—18 годин за температурою 37 °С. Після інкубації гелі ополіскували водою і вносили у фарбуючий розчин складу: 25 мл ізопропанолу, 10 мл крижаної оцтової кислоти, 5 г ТХО, 250 мг кумасі бриліантового синього R-260, дистильованої води до 100 мл. Гелі від фарби відмивали сумішшю: 7 % оцтова кислота, 2 % ізопропанол.

Для скринінгу металопротеїназ у желатиназному спектрі застосовували реагент, що зв'язує катіони металів — етилендіамінотетраацетат

(ЕДТА). Гелі після електрофорезу витримували 30 хв у водному розчині ЕДТА концентрації 10 ммоль і після ополіскування обробляли для отримання желатиназного спектру, як описано вище.

Електрофореграми документували за допомогою скануючої приставки до комп'ютеру і провадили кількісний аналіз отриманих денситограм за комп'ютерною програмою АнаИС (М.А. Поджарський, Д.Г. Рибалка, podzharsky@ukr.net). Визначали кількість електрофоретичних форм, їх відносну електрофоретичну рухливість та частку у загальному спектрі. Ензимну активність обчислювали в умовних одиницях (пікселях) за площею під окремим піком електрофоретичного спектру (у випадку желатиназної зимограми зображення інвертували). Для зручності аналізу протейни з близькими значеннями маси об'єднували в окремі електрофоретичні фракції.

Ступінь інгібування протеолітичної активності розраховували у відсотках за формулою:

$$I = (1 - A_{\text{інт}}/A_{\text{н}}) \times 100,$$

де I — ступінь інгібування (%), $A_{\text{інт}}$ — активність фракції після обробки інгібітором, $A_{\text{н}}$ — активність без обробки.

Статистичну обробку результатів, побудову діаграм, графіків та апроксимацію функцій проводили у пакеті Microsoft Excel. Розраховували середні арифметичні значення та їх стандартну похибку (\pm SE). Достовірність результатів оцінювали за допомогою t -критерію Ст'юдента та дисперсійного аналізу. За критичний рівень достовірності приймали значення нульової гіпотези $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати визначення протеолітичної активності з різними субстратами представлені на рис. 1 і 2. Вибір лейцину як референтної амінокислоти на відміну від визнаних способів обумовлений тим, що дозволяє порівнювати рівень активності різних протейназ. Крім того, колаген та його похідне — желатин містять незначну кількість тирозину, за яким найчастіше визначають загальну протеолітичну активність.

Показано, що дослідні екстракти з молюсків виявляли гідролітичну активність по відношенню до всіх використаних субстратів. Незважаючи на те, що препарати з органів молюсків за протеолітичною активністю щодо казеїну та желатину поступалися референтному зразку, активність до колагену в них була такою ж, а в деяких випадках — істотно вище (див. рис. 1). Так, максимальна колагенолітична активність спостерігалась в екстрактах з гепатопанкреасу мідій та слинних залоз рапани. За трипсиноподібною активністю сerratіопептидаза поступалася екстрактам з мідії та з гепатопанкреасу рапани.

Особливості субстратної специфічності у досліджуваних зразків добре виявляються за аналізу співвідношень ступеня гідролізу різних субстратів (табл. 1). Як видно, навіть у неочищених екстрактах зі слинних залоз

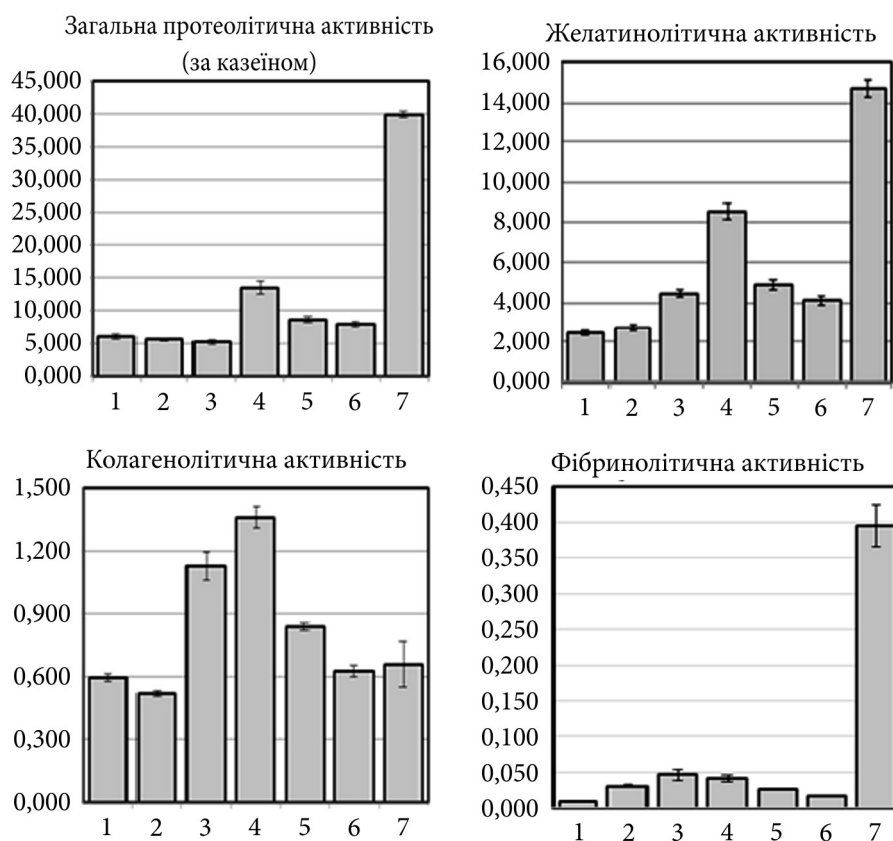


Рис. 1. Протеолітична активність за різних субстратів в органах досліджуваних молюсків: *а* — загальна (за казеїном), *б* — желатинолітична, *в* — колагенолітична, *г* — фібринолітична; 1, 2, 3 — *R. venosa*, 4, 5 — *M. galloprovincialis*, 6 — *D. trunculus*; (1 — лейбленівська залоза, 2, 4 — гепатопанкреас, 3 — слинна залоза, 5, 6 — м'яке тіло, 7 — сerratіопептидаза)

рапани колагенолітична активність складала майже чверть від загальної, тоді як у препараті сerratіопептидази — біля 4 %. У препараті сerratіопептидази, який заявлений як фібринолітичний, міститься біля 1 % специфічної активності від загальної протеолітичної. В неочищених екстрактах слинних залоз та гепатопанкреасу рапани частка фібринолітичної активності сягає майже подібного рівня. В тканинах м'якого тіла мідії виявлена досить помітна трипсиноподібна активність (див. рис. 2).

Таким чином, можна вважати, що досліджувані молюски можуть слугувати джерелом протеїназ, специфічних зокрема. В залежності від необхідності отримання того чи іншого ензиму як такого джерела перспективними з практичної точки зору є слинні залози і гепатопанкреас рапани та гепатопанкреас і м'яке тіло мідії.

Як вище відмічалось, ензими з колагенолітичною активністю викликають значний інтерес в зв'язку з їх великою роллю у життєдіяльності організмів і розвитку різних патологій [5—7, 9—11, 14, 22, 35, 44].

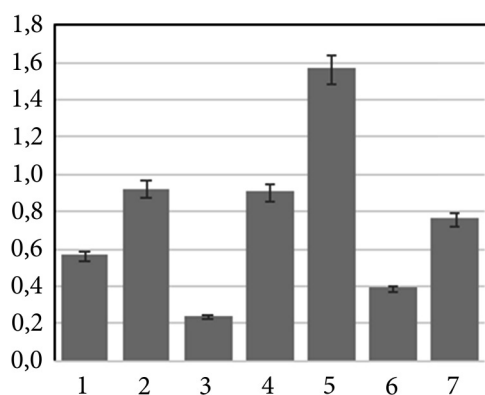


Рис. 2. Трипсиноподібна активність в органах досліджуваних молюсків: 1, 2, 3 — *R. venosa*, 4, 5 — *M. galloprovincialis*, 6 — *D. trunculus*; (1 — лейбленівська залоза, 2, 4 — гепато-панкреас, 3 — слинна залоза, 5, 6 — м'яке тіло, 7 — препарат серратіопептидази).

начити одночасно як активні, так й латентні форми желатиназ у біологічних об'єктах [40]. На підставі визначення молекулярних мас протеїнів з протеолітичною активністю та впливу певних реагентів на їх активність можна здійснити їх попередню ідентифікацію.

ти із зазначеною активністю займають особливе місце у комбустіології, оскільки здатні розщеплювати нерозчинні протеїни опікового струпу [37]. Фізико-хімічні властивості, структура молекул цих ензимів та їх функціонально активних ділянок, амінокислотний склад, регуляція експресії різною мірою вивчені у людині, миші, щура, деяких амфібій, крабів, бактерій [10, 22, 27, 35, 39, 41, 44]. Але про зазначені ензими у морських молюсків відомо вкрай недостатньо.

По теперішній час вивчення протеїназ із колагеназною активністю шляхом електрофорезу в гелях, що містить желатин, залишається актуальним. Желатин-зимографія дозволяє визначити одночасно як активні, так й латентні форми желатиназ у біологічних об'єктах [40].

Таблиця 1

Питома частка протеолітичної активності до різних субстратів в загальній активності за казеїном (%)

Протеолітична активність до	Джерело протеолітичної активності						СТР
	Рапана			Мідія		До-накс	
	Лейбленівська залоза	Гепато-панкреас	Слинні залози	Гепато-панкреас	М'яке тіло	М'яке тіло	
Казеїну	100	100	100	100	100	100	100
Желатину	40,9	49,0	86,1	60,1	59,9	50,7	36,9
Колагену	9,8	9,3	21,7	10,1	9,7	8,0	1,6
Фібрину ($\times 10^2$)	15,0	54,1	89,0	30,5	29,8	21,8	98,9
БАПНА*	9,3	15,2	4,0	14,9	25,9	6,4	8,8

П р и м і т к а. * Зазначене співвідношення є умовним, оскільки вимірювання протеолітичної активності здійснювали в різних одиницях; ці дані можна використовувати лише для порівняльної оцінки досліджуваних препаратів.

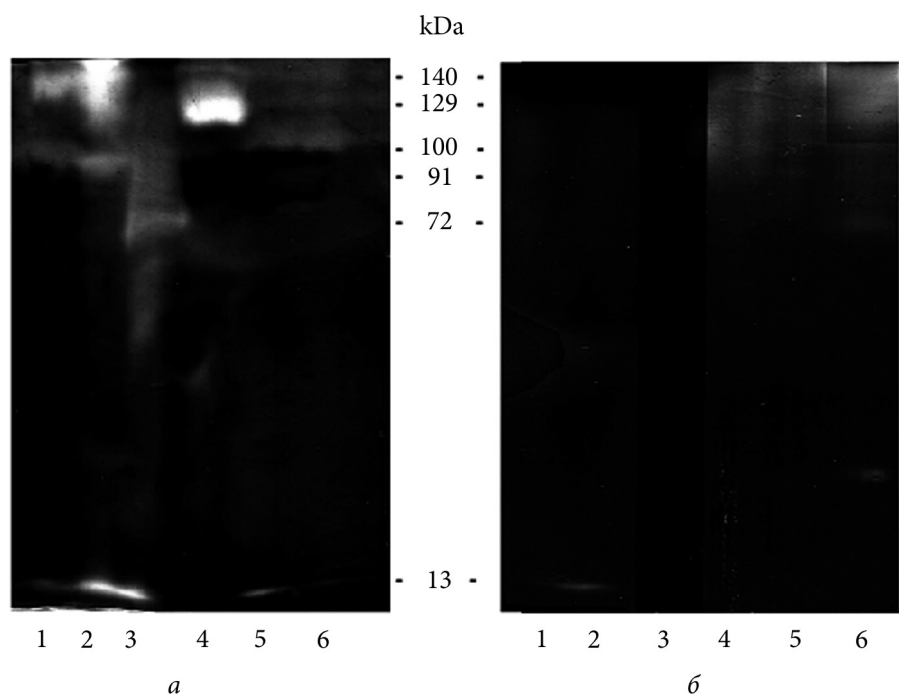


Рис. 3. Желатиназні спектри досліджуваних зразків: 1, 2, 3 — *R. venosa*, 4, 5 — *M. galloprovincialis*, 6 — *D. trunculus*; (1 — лейбленівська залоза, 2, 4 — гепатопанкреас, 3 — слинна залоза, 5, 6 — м'яке тіло); а — без обробки гелів, б — після обробки ЕДТА; kDa — середні значення молекулярної маси основних фракцій

Розподіл за молекулярною масою протеїнів досліджуваних препаратів з желатинолітичною активністю продемонстровано на рис. 3 і в табл. 2.

З представлених даних видно, що електрофоретичні спектри желатинолітичних протеїнів характеризуються видовою і тканинною специфічністю. З досліджуваних залоз рапани виділяються слинні. В них у порівнянні з іншими органами не тільки найвища желатиназна активність (див. рис. 1), але й найбільша різноманітність форм та своєрідний набір желатиназ. Ензими лейбленівської залози і гепатопанкреасу представлені в основному (більше половини загальної активності) високомолекулярними формами желатиназ з М.м.100-140 kDa, тоді як у слинних залозах мажорна фракція має середню електрофоретичну рухливість з М.м. 72 kDa і складає майже третину всієї активності (див. табл. 2).

У тканинах досліджуваних двостулкових переважна кількість (біля 80 %) желатиназ зосереджена у високомолекулярній зоні електрофоретичного спектру: розподіл ензимів у них подібний розподілу в лейбленівській залозі та гепатопанкреасі рапани.

На підставі аналізу отриманих зимограм можна зробити наступні припущення. Спираючись на літературні джерела [17, 40, 27], протеїн з ISSN 0375-8990. Гідробіологічний журнал. 2023. 59(6)

Таблиця 2

Питома частка в електрофоретичному спектрі фракцій з желатиназною активністю (%) і вплив обробки гелів ЕДТА

Показники	Молекулярна маса виявлених фракцій, середнє значення (kDa) ± SE								
	138±1	123±1	107±2	96±1	91±2	72±	58±1	43	13
Лейбленівська залоза рапани									
Питома частка фракції	55,9	немає	6,5	26,9	немає	3,3	немає	немає	7,4
Ступінь інгібування, %	100	немає	0	89,9	немає	3,0	немає	немає	100
Гепатопанкреас рапани									
Питома частка фракції	19,1	24,2	20,3	немає	14,2	6,4	немає	немає	15,8
Ступінь інгібування, %	100	100	95,9	немає	92,7	75,4	немає	немає	66,5
Слинні залози рапани									
Питома частка фракції	3,4	5,6	6,4	8,5	10,8	27,9	9,3	13,9	14,2
Ступінь інгібування, %	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Гепатопанкреас мідії									
Питома частка фракції	7,2	48,0	26,2	4,8	немає	немає	13,8	немає	немає
Ступінь інгібування, %	0	72,6	33,8	0	немає	немає	95,9	немає	немає
М'яке тіло мідії									
Питома частка фракції	15,7	28,3	31,9	немає	немає	немає	10,4	немає	13,7
Ступінь інгібування, %	0	43,3	50,1	немає	немає	немає	100	немає	100
М'яке тіло донаксу									
Питома частка фракції	25,0	20,0	26,8	немає	немає	19,5	немає	немає	8,7
Ступінь інгібування, %	54,4	0	50,4	немає	немає	81,8	немає	немає	100

П р и м і т к а. жирним шрифтом позначені мажорні фракції спектрів; немає — активність у зазначених зонах не виявлена; 0 — інгібування не спостерігалось.

молекулярною масою 91±2 kDa можливо аналогічний желатиназі В (ММП 9), протеїн 72±2 kDa — желатиназі А (ММП 2). Виявлено також

ензимами з масою 58, 23 і 13 kDa, які можуть представляти інші форми численного сімейства матриксних металопротеїназ. Протеїн 58 kDa можливо відноситься до стромелізинів. Низькомолекулярні протеїни (23 і 13 kDa) можливо є активованими формами деяких желатиназ. Інгібування їх активності хелатним реагентом (ЕДТА) підтверджує їх приналежність до групи ММП.

Високомолекулярні форми (більше 100 kDa) можна вважати, згідно з даними [17, 21], полімерним комплексом різних желатиназ. За думкою вище згаданих авторів ці комплекси призначені для зменшення в тканинах пулу активних ензимів. Стоткентне інгібування в залозах рапани желатиназної активності ЕДТО свідчить про металопротеїназну природу ензимів даної високомолекулярної фракції. Неповне гальмування активності цієї групи протеїнів у тканинах двостулкових можливо зв'язано з присутністю інших класів протеїназ з подібною молекулярною масою, не залежних від катіонів металів. Висока амідазна активність в препаратах з мідії (див. рис. 2) дозволяє припустити, що принаймні частина з них відноситься до трипсиноподібних ензимів.

Переважає присутність неактивних високомолекулярних комплексів ензимів з желатиназною активністю у всіх досліджуваних зразках, крім слинних залоз рапани, вочевидь слугує захисним механізмом від неконтрольованого руйнування тканин. Лише у слинних залозах рапани, де є потреба в активних ензимах [45], відбувається активація желатиназ. Зіставлення різних зразків мідії за часткою желатиназ з молекулярною масою менше 91 kDa підтверджує цей висновок. Так, у гепатопанкреасі низькомолекулярні желатинази складають 13,8 %, тоді як у м'якому тілі — 24,1 %. Збільшення питомої ваги активних низькомолекулярних ензимів у м'якому тілі мідії в першу чергу за рахунок появи металопротеїнази 13 kDa можливо обумовлено із здійсненням позаклітинного травлення у шлунку та інших відділах травної системи молюска.

Цілком зрозуміло наявність високої желатино- та колагенолітичної активності в травних органах рапани (див. рис. 1). Цей молюск є ненажерливим хижаком и для успішного засвоєння їжі, що містить багато сполученої тканини, використовує колагеназу і желатиназу. Складніше пояснити дуже високий рівень желатино- та колагенолітичної активності у двостулкових, які є класичними фільтратами. Ймовірно, до їх їжі потрапляє детрит тваринного походження та личинки невеликих безхребетних, перетравлення яких потребує вищезазначених ензимів. Однак, слід підкреслити, що функції колагеназ зв'язані не тільки з процесами травлення. В даний час добре відомо, що колагенази/желатинази/матриксні металопротеїнази виконують важливу роль у гісто- і ембріогенезі, формуванні органів, метаморфозі амфібій та інших процесах розвитку, ремодельовання та патологіях [5—7, 9—11, 14, 22, 35, 44]. Крім того, встановлено [9, 41], що до складу бісусу мідій входить колаген і це, можливо, має відношення до наявності в мідій значної колагенолітичної активності.

Раніше нами [45] було показано, що у рапани у кожному органі травної системи існує своєрідний набір різних гідролаз. На підставі аналізу

(табл. 1) можна додати висновок про присутність в кожному окремому органі специфічного набору протеолітичних ензимів з різною субстратною специфічністю. Існування тканинспецифічних комплектів протеїназ сприяє більш ефективному перетравленню їжі, а також, враховуючи багатофункціональність цих ензимів, зв'язане з регуляторними і захисними особливостями окремих органів. Це стосується не тільки рапани, яка має дуже складну будову м'якого тіла, але й простіше побудованої мідії. Наприклад, частка амідазної активності від загальної у м'якому тілі мідії майже в два рази більше, ніж у гепатопанкреасі (табл. 1), тобто трипсиноподібні ензими мідії переважають в інших органах (шлунку зі кристалічною стеблинкою, кишечнику, зокрема).

Висновки

В тканинах трьох видів молюсків — *Rapana venosa*, *Mytilus galloprovincialis* та *Donax trunculus* — виявлено протеолітичну активність до різних субстратів: казеїну, желатину, колагену, фібрину та БАПНА. Специфічна активність до колагену неочищених екстрактів з досліджуваних молюсків була такою ж, або значно вище, ніж у серратіопептидази, застосованою в якості референсної. Максимальна колагенолітична активність спостерігалась в екстрактах з слинних залоз рапани та гепатопанкреасу мідій. Значна фібринолітична активність присутня в слинних залозах рапани та у гепатопанкреасі рапани і мідії. Це дозволяє рекомендувати рапану і мідію як перспективне джерело отримання препаратів, важливих з медичної точки зору.

Отримані дані дають можливість припустити, що існують органноспецифічні набори протеолітичних ензимів з різною субстратною специфічністю. Желатиназні зимограми показали різноманітність протеїназ, серед яких значну кількість займають матриксні металопротеїнази, що становлять інтерес з наукової та практичної точок зору.

Список використаної літератури

1. Петрова И.С., Винцюнайте М.Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения. *Прикл. биохим. и микробиол.* 1996. Т. 2, № 1. С. 322—327.
2. Романовська І.І., Рижак О.А., Декіна С.С. та ін. Нові полімерні матеріали комплексної протеолітичної дії. *Нові функціональні речовини і матеріали хімічного виробництва*. Київ : Академперіодика, 2021. С. 188—198. doi.org/10.15407/akademperiodyka.444.188
3. Antalis T.M., Shea-Donohue T., Vogel S.N. et al. Mechanisms of disease: protease functions in intestinal mucosal pathobiology. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol Hepatol.* 2007. Vol. 4, N 7. P. 393—402. doi:10.1038/ncpgasthep0846
4. Barzkar N., Khan Z., Jahromi S.T. et al. Critical review on marine serine protease and its inhibitors: A new wave of drugs? *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. Vol. 170. P. 674—687. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.134.
5. Beard H., Barniol-Xicota M., Yang J., Verhelst S.H.L. Discovery of cellular roles of intramembrane proteases. *ACS Chemical Biology.* 2019. Vol. 14, I. 11. P. 2372—2388. doi.org/10.1021/acscchembio.9b00404

6. Bi Y., Liu X., Si C. et al. Transplanted adult human hepatic stem/progenitor cells prevent histogenesis of advanced hepatic fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride. *Am. J. Transl. Res.* 2019. Vol. 11, I.4. P. 2350-2358.
7. Cowan R.W., Mak I.W.Y., Colterjohn N. et al. Collagenase expression and activity in the stromal cells from giant cell tumour of bone. *Bone*. Vol. 44, N 5. P. 865—871. doi:10.1016/j.bone.2009.01.393
8. Craik C.S., Page M.J., Madison E.L. Proteases as therapeutics. *Biochem J.* 2011. Vol. 435, N 1. P. 1—16. doi: 10.1042/BJ20100965
9. Cunhaneves A., Harnedy-Rothwell P.A., Fitzgerald R.J. In vitro angiotensin-converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory, and antioxidant activity of blue mussel (*Mytilus edulis*) byssus collagen hydrolysates. *European Food Research and Technology*. 2022. Vol. 248. P. 1721—1732.
10. Del Bigio M.R., Seyoum G. Effect of matrix metalloproteinase inhibitors on rat embryo development in vitro. *Cells Tissues Organs*. 1999. Vol. 165, N 2. P. 67—73. doi:10.1159/000016676
11. Detry B., Erpicum C., Paupert J. et al. Matrix metalloproteinase-2 governs lymphatic vessel formation as an interstitial collagenase. *Blood*. 2012. Vol. 119, N 21. P. 5048—5056. doi:10.1182/blood-2011-12-400267
12. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1961. Vol. 95. P. 271—278. doi:10.1016/0003-9861(61)90145-x
13. Fortelny N., Cox J.H., Kappelhoff R. et al. Network analyses reveal pervasive functional regulation between proteases in the human protease Web. *PLOS Biology*. 2014. Vol. 12, N 5. e1001869. doi.org/10.1371/journal.pbio.1001869
14. Fukumoto Y. Genetically Determined resistance to collagenase action augments interstitial collagen accumulation in atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2004. Vol. 110, N 14. P. 1953—1959. doi:10.1161/01.cir.0000143174.418
15. Ghosh S., Sarkar T., Pati S. et al. Novel bioactive compounds from marine sources as a tool for functional food development *Front. Mar. Sci.* 2022. Sec. 9. 832957. doi.org/10.3389/fmars.2022.832957
16. Gimza B.D., Larias M.I., Budny B.G., Shaw L.N. Mapping the global network of extracellular protease regulation in *Staphylococcus aureus*. *ASM Journals*. 2019. Vol. 4, N 5. e00676-19. doi.org/10.1128/mSphere.00676-19
17. Guo L., Hussain A.A., Limb G.A., Marshall J. Age-dependent variation in the metalloproteinase activity of isolated Bruch's membrane and choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999. Vol. 40. P. 2676—2682.
18. Haard N.F., Simpson B.K. Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. *Fisheries Processing*. 1994. P. 132—154. doi:10.1007/978-1-4615-5303-8_6
19. Hao Z., Liu M., Counsell C. et al. Fibrinogen depleting agents for acute ischaemic stroke. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012. N 3. CD000091. doi:10.1002/14651858.CD000091.pub2
20. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 1972. Vol. 48, N 1. P. 422—427.
21. Hussain A.A., Lee Y., Marshall J. High molecular-weight gelatinase species of human Bruch's membrane: compositional analyses and age-related changes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010. Vol. 51, N 5. P. 2363—2371. doi:10.1167/iovs.09-4259
22. Inada M., Wang Y., Byrne M.H. et al. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *PNAS*. 2004. Vol. 101, N 49. P. 17192—17197. doi:10.1073/pnas.040778810
23. Kirti Rani. Immunomodulatory effects of proteolytic enzymes: meteoric brief review. *Adv Tissue Eng Regen Med Open Access*. 2020. Vol. 6, N 2. P. 44—45.

24. Klasen H.J. A review on the nonoperative removal of necrotic tissue from burn wounds. *Burns*. 2000. Vol. 26, N 3. P. 207—222. doi:10.1016/S0305-4179(99)00117-5
25. Klomkloao S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. *Songklanakarín J. Sci. Technol.* 2008. Vol. 30, N 1. P. 37—46.
26. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. Vol. 227, N 5259. P. 680—685.
27. Laronha H., Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells*. 2020. Vol. 9, N 5. 1076. doi:10.3390/cells9051076
28. Löffek S., Schilling O., Franzke C-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur. Respiratory J.* 2011. Vol. 38. P. 191—208. doi:10.1183/09031936.00146510
29. López-Otín C., Bond J.S. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem*. 2008. Vol. 283, N 45. P. 30433—30437. doi: 10.1074/jbc.R800035200
30. Macedo M.W.F.S., Cunha N.B., Carneiro J.A. et al. Marine Organisms as a rich source of biologically active peptides. *Front. Mar. 2021 Sci. Sec.* 8. 667764. doi: 10.3389/fmars.2021.667764
31. Mandl I. Collagenase. *Science*. 1970. Vol. 169, N 3951. P. 1234—1238. doi: 10.1126/science.169.3951.1
32. Marchant D.J., Bellac C., Moraes T.J. et al. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. *Nature Med.* 2014. Vol. 20. P. 493—502
33. Mecikoglu M., Saygi B., Yildirim Y. et al. The effect of proteolytic enzyme serratiopeptidase in the treatment of experimental implant-related infection. *J. of Bone and Joint Surgery. American*. 2006. Vol. 88, N 6. P. 1208—1214. doi:10.2106/JBJS.E.00007
34. Mótýán J.A., Tóth F., Tózsér J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*. 2013. Vol. 3, N 4. P. 923—942. doi:10.3390/biom3040923
35. Nakatani T., Partridge N. C. Bone proteinases *Principles of Bone Biology*. 2020. Chapter 16. P. 379—399. doi.org/10.1016/B978-0-12-814841-9.00016-6
36. Paschkowsky S., Hsiao J.M., Young J., Munter L.M. The discovery of proteases and intramembrane proteolysis. *Biochem Cell Biol*. 2019. Vol. 97, N 3. P. 265—269. doi 10.1139/bcb-2018-0186
37. Pham C.H., Collier Z.J., Fang M. et al. The role of collagenase ointment in acute burns: a systematic review and meta-analysis. *J. of Wound Care*. 2019. Vol. 28, N 2. P. 9—15. doi:10.12968/jowc.2019.28.sup2.s9
38. Raksha N., Halenova T., Vovk T. et al. Biologically active peptides derived from the Antarctic hydrobionts. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2021. Vol. 11, N 08. P. 126—133. doi: 10.7324/JAPS.2021.110817
39. Reponen P., Leivo I., Sahlberg C., Apte S.S. et al. 92-kDa type IV collagenase and TIMP-3, but not 72-kDa type IV collagenase or TIMP-1 or TIMP-2, are highly expressed during mouse embryo implantation. *Developmental dynamics*. 1995. Vol. 202, N 4. P. 388—396. doi:10.1002/aja.1002020408
40. Ricci S., D'Esposito V., Oriente F. et al. Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 0(0). 2015. doi:10.1515/cclm-2015-0668
41. Rodríguez F., Morán L., González G. et al. Collagen extraction from mussel byssus: a new marine collagen source with physicochemical properties of industrial interest. *Journal of Food Science and Technology*. 2017. Vol. 54, N 5. P. 1228—1238. doi:10.1007/s13197-017-2566-z
42. Ryu Hong-Yeoul., Su D., Wilson-Eisele N.R. et al. The Ulp2 SUMO protease promotes transcription elongation through regulation of histone sumoylation. *EMBO Journal*. 2019. Vol. 38, N 16. P. 1—19. e102003. doi.org/10.15252/embj.2019102003 I.
43. Sinko J., Rajchard J., Balounova Z., Fikotova L. Biologically active substances from water invertebrates: a review. *Veterinarni Medicina*. 2012. Vol. 57, N 4. P. 177—184.

44. Stollow M.A., Bauzon D.D., Li I. et al. Identification and characterization of a novel collagenase in *Xenopus laevis*: Possible roles during frog development. *Molecular Biology of the Cell*. 1996. Vol. 7. P. 1471—1483,

45. Toptikov V.A., Totsky V.N., Aliksieieva T.G., Kovtun O.A. Hydrolytic enzymes expressivity in different parts of the *Rapana* digestive system. *Ukr. Biochem. J.* 2016. Vol. 88, N 3. P. 5—17. doi:10.15407/ubj88.03.005

46. Walsh P.N., Ahmad S.S. Proteases in blood clotting. *Essays in Biochemistry*. 2002. Vol. 38. P. 95—111. doi:10.1042/bse0380095

47. Wardlaw J.M., Murray V., Berge E. et al. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2012. Vol. 379, N 9834. P. 2364—2372. doi:10.1016/S0140-6736(12)60738-7

Надійшла 05.06.2023

V.A. *Toptikov*, PhD (Biol.), Senior Researcher,
A.V. Bogatsky Physical-Chemical Institute NAS of Ukraine,
Lustdorfskaya Doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine
e-mail: v.a.toptikov@gmail.com
ORCID 0000-0002-7881-6726

I.I. *Romanovska*, Dr. Sci. (Biol.), Professor,
A.V. Bogatsky Physical-Chemical Institute NAS of Ukraine,
Lustdorfskaya Doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine
e-mail: romairina@gmail.com
ORCID 0000-0002-3326-987X

O.O. *Kovtun*, PhD (Biol.), Assistant Professor,
Odesa I.I. Mechnikov National University,
Dvorianska Str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
e-mail: hydrobiostation@gmail.com
ORCID 0000-0001-8820-5606

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF ENZYMES IN THE ORGANS OF THE BLACK SEA MOLLUSKS

The proteolytic activity of various substrates in the organs of Black Sea molluscs was studied: venous rapana (*Rapana venosa*, Valenciennes, 1846), mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) and *Donax trunculus*, Linnaeus, 1758. Significant collagenolytic activity and a certain level of fibrinolytic activity were found in the salivary glands of rapana and hepatopancreas of mussels. The organ specificity of sets of proteolytic enzymes with different substrate specificity was established. Molecular masses of gelatinases were calculated by electrophoresis. Gelatinase zymograms showed a variety of proteinases, among which matrix metalloproteinases occupy a significant number. The results allow recommending rapana and mussel as a promising source of drugs with collagen and fibrinolytic activity, which are important from a medical point of view.

Keywords: *Rapana venosa*, *Mytilus galloprovincialis*, *Donax trunculus*, proteinase, collagenase and fibrinolytic activity.