

individuals of *Crocus heuffelianus* growing in the 10th quarter of the Chemerivtsi environmental scientific-research department was performed. The general characteristic of the dynamics of vegetative cover on the investigated territory is represented basing on the conducted geobotanical descriptions of phytocenoses with the participation of *Crocus heuffelianus* Herb. *Crocus heuffelianus* grows within 10 quarters in the forest crops *Quercus robur* L. (twenty-five years old), plantations of *Pinus sylvestris* L. (forty years old) and in the area with the group of QUERCO-FAGETEA BR.-BL. ET VLIAGER 1937, Fagetalia sylvaticae Pawl. 1928, Carpinion betuli Issler 1931 em. Mayer 1937 where eighty-year-old *Carpinus betulus* L., *Quercus robur* L. predominate. The analysis of measurements was carried out in the studied population of the species: plant height together with inflorescence; length and width of leaves. According to the results of our study, it has been found out that the height of plants in the population ranged from 7.6 cm to 14 cm. On average, this figure was 10.3 ± 2.0 cm. The size of the leaves of the predominant number of individuals in the population was characterized by the following anatomical and morphological parameters: width – 0.2-0.7 cm, length – 4.9-10.7 cm. It is shown that the vast majority of individuals of the species have one flower. *Crocus heuffelianus* has some variability of morphological features in the studied population. This indicates a significant potential for the species to grow in different environmental conditions, which can not be realized under conditions of increased anthropogenic pressure. The unique plain localities of this Montana-Alpine species on the territory of the Podilski Tovtry National Nature Park have a high zoological and scientific significance and require systematic, long-term monitoring.

Key words: Heifel saffron, morphometry, Podilsky Tovtry National Nature Park.

УДК 577.122.8

DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.38–43

Н. Ракша, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Т. Масвська, канд. техн. наук
ГС "Український інноваційний кластер рибної індустрії", Київ, Україна

ОДЕРЖАННЯ ПЕПТИДІВ З ГІДРОБІОНТІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ

Стрімке зростання попиту на препарати на основі пептидів актуалізує пошук нових природних та економічно обґрунтованих джерел сировини. Широке розмаїття біологічно активних сполук, зокрема і пептидної природи, що притаманне морським гідробіонтам, дозволяє розглядати їх як перспективний сировинний ресурс. Водночас використання морських об'єктів як джерела для одержання цільових молекул потребує певної оптимізації наявних методологічних підходів щодо їхнього виділення та забезпечення належного ступеня очищення. У роботі розв'язується задача оптимізації методу одержання пептидів із гідробіонтів Антарктичного регіону на прикладі гідробіонта *Nacellascopcinna*. Запропонований триетапний підхід дозволяє виділяти фракції пептидів різної молекулярної маси. Перший етап включає осадження високомолекулярного білкового матеріалу спочатку хлорною кислотою, а потім 80%-м етиловим спиртом. У результаті одержано фракцію пептидних молекул із молекулярною масою до 6,5 кДа, що містила незначну кількість високомолекулярних білкових домішок. Подальше доочищення одержаної фракції проводили шляхом ультрафільтрації з використанням мембран із розміром пор 10 кДа. Контроль білково-пептидного складу проб на всіх етапах одержання проводили методом диск-електрофорезу за денатуруючих умов у пластинах 18%-го поліакриламідного гелю. Проведений аналіз із використанням 2Д-електрофорезу виявив, що ізоелектричні точки більшості пептидів містяться у діапазоні рН від 8,0 до 10,0. Лише незначна кількість пептидів гідробіонта мала ізоелектричні точки при рН 4,0 та 5,0. Заключний етап включає фракціонування проби методом хроматографії, що поділяє за розмірами. У результаті хроматографічного розділення отримано чотири піки, що відповідають фракціям із пептидами, молекулярна маса яких становить близько 2,3 кДа (1-й пік), 1,9 кДа (2-й пік), 1,4 кДа (3-й пік) та 0,7 кДа (4-й пік).

Ключові слова: гідробіонти, пептидна фракція, метод одержання.

Вступ. Нині одним із перспективних підходів щодо профілактики, а в деяких випадках і терапії багатьох захворювань, є використання препаратів на основі пептидів. Відповідно до існуючих уявлень, пептиди як безпосередньо, так і опосередковано здатні впливати на перебіг біохімічних реакцій [1]. До безумовних переваг пептидних препаратів належить їхня фізіологічність: їхнє застосування не чинить навантаження на імунну систему; не призводить до розвитку анафілактичних реакцій та інших побічних ефектів; пептидні препарати добре засвоюються за різних способів введення; характеризуються значним терапевтичним потенціалом і виявляють виражений ефект за використання у порівняно невеликих дозах. Сукупність експериментальних даних щодо широкого спектра біологічної активності пептидів, виражені терапевтичні ефекти та клінічно підтверджена безпечність пептидних препаратів навіть за умов їх довготривалого застосування обґрунтовує доцільність пошуку нових джерел пептидів із бажаними активностями для створення оригінальних фармакологічних субстанцій.

Новітні наукові дослідження свідчать про значний потенціал морських гідробіонтів як цінного джерела нутрицевтиків і сполук із різноманітними біологічними активностями. Особливості умов існування гідробіонтів обумовлюють той факт, що деякі їхні метаболіти є структурно унікальними та/або виявляють активність, вищу ніж у наземних аналогів. Аналіз сучасної наукової літератури свідчить, що гідробіонти містять функціонально активні речовини різної хімічної будови, що виявляють широкий спектр біологічних активностей [2, 3, 4]. На основі деяких

із цих речовин створено лікувально-профілактичні засоби, спрямовані на підтримання гомеостазу за умов патологічно зміненого метаболізму [5]. Морські гідробіонти можуть бути перспективною сировинною базою для одержання білкових і пептидних молекул, що зумовлено не лише значною кількістю промислових відходів, що залишаються на кінцевих етапах переробки сировини, а й тим фактом, що ця сировина зазвичай збагачена на білки. Відомо, що до складу морських гідробіонтів, зокрема безхребетних, входять білки, які за своїм амінокислотним складом не поступаються білкам наземних тварин. Окрім того, з морських гідробіонтів було виділено пептиди, що виявляють цікаві біологічні активності, зокрема антибактеріальну, антикоагулянтну, протипухлинну, імуномодулюючу тощо [6, 7, 8]. Припускають, що саме за рахунок наявності у тканинах значної кількості компонентів пептидної природи гідролізати деяких гідробіонтів виявляють комплексну біологічну активність і здійснюють позитивний ефект на розвиток системних захворювань, обумовлених метаболічними порушеннями [9, 10]. Отже, світові дослідження у цій області свідчать про значний потенціал гідробіонтів як джерела сировини для створення оригінальних фармакологічних субстанцій і лікарських засобів. Окрім того, зниження споживчих ризиків, пов'язаних із можливою контамінацією продукції інфекційними агентами, характерними для сировини тваринного походження, та відсутність у зв'язку із цим додаткових стадій очищення слугують додатковим аргументом на користь пошуку біологічно активних речовин саме серед метаболітів морських гідробіонтів.

Враховуючи викладене, метою роботи було оптимізувати метод одержання з тканин гідробіонта Антарктичного регіону *Nacellaconcinna* фракції пептидних молекул.

Матеріали і методи. У представленому дослідженні як вихідний матеріал використано заморожену масу гідробіонта Антарктичного регіону південно-антарктичне блюдце (*Nacellaconcinna*), надану Національним антарктичним науковим центром. Зразки були зібрані біля острова Галіндез (географічні координати – 65°15' південної широти, 64°15' західної довготи) архіпелагу Аргентинських островів. Солоність води біля острова складала 28,4-32,2 ‰, температура 1,1–0,8 °С. Відбір матеріалу здійснено в межах XVII, XVIII Українських антарктичних експедицій у березні 2012 – квітні 2013 та березні 2013 – квітні 2014 рр., відповідно.

Заморожену масу м'яких тканин гідробіонта зважували та перетирали до порошкоподібного стану, додаючи рідкий нітроген. Після чого гомогенізували, використовуючи екстрагуючий розчин – 50 мл 0,05 М трис-НСІ буфер (рН 7,4), що містить 0,13 М NaCl, 1 мМ ЕДТА, 0,25 % сахарозу та 0,5 % тритон X-100. Екстрагуючий розчин додавали з розрахунку 5 мл розчину на кожні 10 грам матеріалу. Пробу залишали на 15 хв при +4 °С, після чого центрифугували при 10000 г упродовж 40 хв. Одержану надосадову рідину використовували для одержання пептидів. Фракцію пептидів отримували відповідно до методу [11]. Усі операції здійснювали на льоду. Для одержання фракції пептидів до проби додавали 1,2 М HClO₄ у співвідношенні 1:1 і залишали на 30 хв при +4 °С, після чого центрифугували 15 хв при 1500 г. Надосадову рідину нейтралізували 5 н КОН до рН 7,0, залишали на 15 хв та центрифугували повторно. До одержаної на цьому етапі надосадової рідини додавали етиловий спирт (60 %, 80 % та 96 %) й ізопропиловий спирт (80 %) у співвідношенні 1:5, проби витримували 15 хв та знову центрифугували 15 хв при 1500 г. Отриману надосадову рідину ліофілізували, попередньо розвівши проби дистильованою водою до кінцевої концентрації спирту 20 %.

Електрофоретичний аналіз пептидів проводили методом диск-електрофорезу у пластинах 18 % поліакриламідного гелю за присутності додецилсульфату натрію [10]. Електрофорез здійснювали в камері для вертикального препаративного диск-електрофорезу ("BioRad", США) у пластинах товщиною 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого гелю та 36 мА для розділяючого гелю. Гелі фарбували барвником кумасі діамантовий синій (G-250) відповідно до стандартного протоколу. Двовимірний електрофорез проводили відповідно до методу [13], використовуючи стрипи ПААГ (7 см) з градієнтом рН 3,0–10,0. Спочатку стрипи піддавали регідрації у буфері (8 М сечовина, 0,02 М дитіотриетол, 1 % CHAPS, 1 % суміш амфолітів) за присутності досліджуваної фракції пептидів (1 мг пептидів на 1 мл буферу) упродовж 12 годин при температурі +20 °С. На наступний день проводили ізоелектрофокусування, після чого стрипи послідовно урівноважували у буфері (0,375 М трис-НСІ, рН 8,8, що містить 6 М сечовину, 2 % додецилсульфат натрію, 20 % гліцерол), у який на першому етапі додавали 0,130 М дитіотриетол, а на другому – 0,135 М йодацетамід. Далі стрипи піддавали аналізу методом електрофорезу у 18 % ПААГ згідно з протоколом, процитованим вище.

Фракціонування суміші пептидів проводили методом хроматографії, що поділяє за розмірами, використовуючи колонку з Sephadex G-15. Ліофілізовану пептидну фракцію розчиняли у 50 мМ трис-НСІ буферу (рН 7,4), що містить 0,13 М NaCl з розрахунку 5 мг ліофілізату на 2 мл буферу. Пробу залишали на 15 хв на шейкері з невели-

кою амплітудою, після чого наносили на колонку, попередньо урівноважену буфером. Швидкість нанесення проби становила 30 мл/год.

Результати досліджень та обговорення. Враховуючи стрімко зростаючий попит на пептидні препарати, пошук нових природних та економічно обґрунтованих джерел сировини набуває особливої актуальності. Важливим етапом технологічного процесу одержання будь-яких цільових молекул є оптимізація методологічних підходів щодо їх виділення та забезпечення належного ступеня очистки з урахуванням особливостей джерела сировини. Відповідно до літературних даних, біологічна активність притаманна переважно низькомолекулярним пептидам. Так, молекулярна маса більшості антимікробних пептидів становить близько 5 кДа [14], а пептиди з вираженою антиоксидантною активністю характеризуються молекулярною масою від 0,5 до 1,5 кДа [15]. Тому метою представленої роботи було оптимізувати метод одержання з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону фракції пептидів з молекулярною масою до 5 кДа.

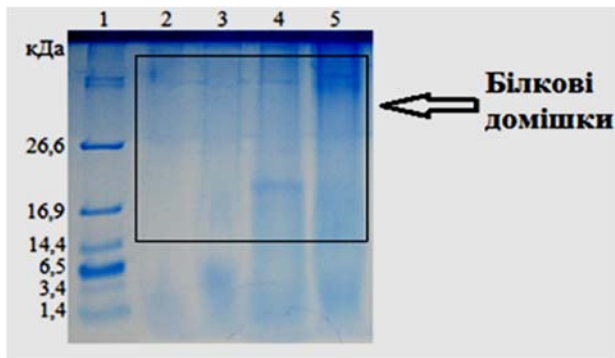
Можна виокремити декілька концептуально протилежних методологічних підходів щодо одержання з вихідної білкової сировини пептидів та низькомолекулярних білкових фрагментів. Це, зокрема, хімічний (кислотний, лужний) чи ферментативний гідроліз, який дозволяє максимально використовувати сировину й отримувати цільові молекули різної молекулярної маси, різного складу, а відтак, і з різною біологічною активністю. Інший підхід полягає в екстрагуванні з тканин пептидів, що наявні у даному організмі за умов фізіологічної норми чи утворюються/утворилися у відповідь на розвиток чи прогресування патологічних станів. Як прямий технологічний процес цей підхід є менш економічно вигідним, оскільки білкова компонента при цьому відкидається. Метод проте дозволяє одержувати пептиди, притаманні лише даному об'єкту.

Оскільки нашим завданням було отримати пептиди, що присутні у тканинах указанного гідробіонта, важливо було підібрати умови, за яких відбувається максимальна екстракція сумарної пептидної фракції. Один із методів виділення з тканин пептидів базується на поетапному осадженні високомолекулярного білкового матеріалу спочатку хлорною кислотою, а потім етиловим спиртом [11], за таких умов кінцева проба міститиме лише олігопептиди та пептиди. Цей метод є швидким, відносно простим у виконанні, але потребує використання значних об'ємів 96 % етилового спирту. Спочатку нами визначено концентрацію спирту, за якої відбувається достатнє осадження білків і при цьому зберігається максимальна концентрація пептидних молекул. Одержання фракції пептидів проводили відповідно до згаданої методики, але на етапі додавання до проб спирту було використано етиловий спирт у концентраціях 60 %, 80 %, 96 % й ізопропиловий спирт у концентрації 80 %.

Отримані фракції аналізували методом диск-електрофорезу за денатуруючих умов у пластинах 18 % поліакриламідного гелю. Результати проведеного аналізу зображено на рис. 1. Як видно з наведених даних, застосування ізопропилового спирту виявилось найменш ефективним, оскільки за його використання сумарна пептидна фракція була найменшою, а проба містила багато білкових домішок, розміщених у всій площині треку (трек 5). Нами не виявлено суттєвої різниці при використанні 96 % чи 80 % етилового спирту – в обох випадках у треках (трек 2 і 3, відповідно) реєструвалася зона, що відповідає пептидам із молекулярною масою до 6,5 кДа, і незначна кількість білків із молекулярною масою вище 20 кДа.

Враховуючи відсутність суттєвої різниці під час застосування 96 % і 80 % етилового спирту, а також коштов-

ність етилового спирту як основного реактиву у цьому методі, економічно доцільним є використовувати для виділення сумарної пептидної фракції 80 % етиловий спирт.



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

Рис. 1. Електрофореграма фракцій пептидів, одержаних із тканин *Nacellaconcinna* із використанням спирту різної концентрації: 1 – маркери молекулярних мас; 2 – 96 % етиловий спирт; 3 – 80 % етиловий спирт; 4 – 60 % етиловий спирт; 5 – 80 % ізопропиловий спирт

Як бачимо, застосування цього методу не дозволило отримати "чисту" фракцію пептидних молекул про що свідчить наявність в треках білкових смуг. Подальшу доочистку одержаної фракції пептидів проводили шляхом ультрафільтрації з використанням мембран з розміром пор

10 кДа. Контроль білково-пептидного складу проби проводили методом електрофорезу у ПААГ. Відсутність на електрофореграмі смуг (рис. 2), що відповідають білкам з молекулярною масою вище 10кДа доводить ефективність обраного нами підходу доочищення пептидної фракції.

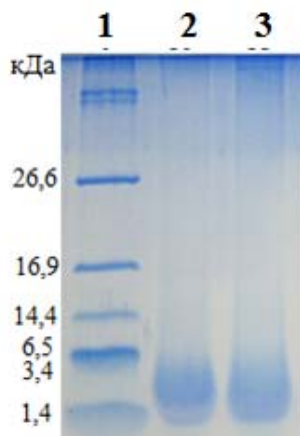


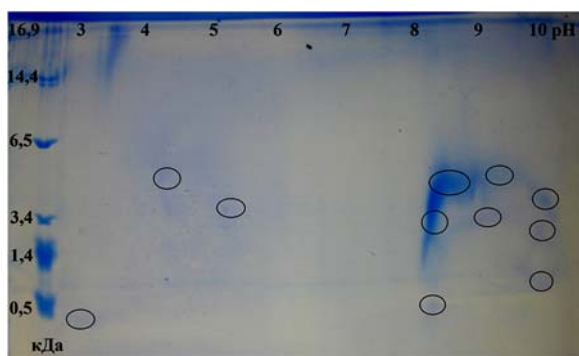
Рис. 2. Електрофореграма фракції пептидів, одержаної після етапу ультрафільтрації: 1 – маркери молекулярних мас; 2, 3 – пептидні фракції

Таким чином, у результаті поєднання двох методичних підходів, що включали модифіковану нами методику В. Николайчик із співавторами (1991) та ультрафільтрацію, з тканин гідробіонта Антарктичного регіону було одержано фракцію пептидів із молекулярною масою до 6,5 кДа, яка не містила високомолекулярних домішок.

Для детальнішої характеристики пептидних молекул було використано метод двовимірного електрофорезу. Цей метод включає два етапи – ізоелектрофокусування у стріпах із градієнтом Н від 3,0 до 10,0 та подальший електрофоретичний поділ у поліакриламідному гелі, що дозволяє розділяти молекули не лише за їхніми молекулярними масами, а й відповідно до ізоеле-

лектричних точок. Застосування двовимірного електрофорезу в умовах нашого дослідження є особливо доцільним з огляду на той факт, що за попередніми результатами (рис. 2) фракція пептидів не розділялась на окремі смуги відповідно до молекулярної маси пептидів, а ідентифікувалась як загальна пляма в зоні нижче 6,5 кДа. Незважаючи на схожу молекулярну масу, пептиди можуть мати різні ізоелектричні точки, тому аналіз у двох напрямках може надати додаткову інформацію щодо особливостей будови пептидів із тканин гідробіонта Антарктичного регіону.

На рис. 3 зображено 2Д-електрофореграму розділення фракції пептидів, виділеної з тканин гідробіонта *Nacellaconcinna*.



pH							
3	4	5	6	7	8	9	10
0,5 кДа	5,0 кДа	3,5 кДа	-	-	0,5 кДа; 3,4 кДа; 5,0 кДа	3,4 кДа; 5,5 кДа	0,7 кДа; 3,0 кДа; 4,0 кДа

Рис. 3. 2Д-електрофореграма фракції пептидів, одержаної з тканин гідробіонта *Nacella concinna*

Як бачимо, ізоелектричні точки пептидівмістяться переважно в діапазоні лужних значень рН. Найбільшу кількість пептидів ідентифіковано в зоні, що відповідає значенню рН 8,0; молекулярна маса пептидів, що мають ізоелектричну точку при рН 8,0 становила близько 5 кДа, 3,4 кДа та 0,5 кДа. Пептиди з ізоелектричною точкою при рН 10,0 мали молекулярну масу близько 4 кДа, 3 кДа та 0,7 кДа. Лише незначна кількість пептидів гідробіонта мала ізоелектричні точки при рН 4,0 та 5,0.

Присутність у загальному екстракті гідробіонта *Nacella concinna* пептидів з ізоелектричними точками в області лужних значень рН указує на той факт, що домінантна частина пептидів представлена катіонними пептидами. Це може бути обумовлено як нижчим вмістом у молекулах пептидів залишків негативно заряджених амінокислот (аспарагінової, глутамінової кислоти), так і/або наявністю значної кількості залишків позитивно заряджених амінокислот, зокрема, лізину та аргініну. Відповідно до даних [16, 17], присутність у молекулі пептидів позитивно заряджених амінокислот є структурною характеристикою, типовою для пептидів з антибактеріальною активністю. Саме за рахунок позитивно заряджених амінокислотних залишків такі пептиди можуть зв'язуватися з негативно зарядженими ліпосахаридами зовнішньої мембранами грамнегативних бактерій і реалізувати антимікробну активність.

Таким чином, проведений аналіз з використанням методів електрофорезу виявив, що загальна пептидна фракція включає пептиди різної молекулярної маси (6, 5, 4, 3, 1,5 кДа) з ізоелектричними точками у лужній області рН (8,0–10,0).

Дослідження властивостей пептидів із метою пошуку молекул, які виявляють певні біологічні ефекти, доцільно проводити на окремих пептидах, а не на загальній пептидній фракції. Тому надалі пептидну фракцію, одержану з тканин гідробіонта Антарктичного регіону, розділено на окремі складові методом хроматографії, що поділяє за розмірами. Застосування хроматографії, що поділяє за розмірами, у цьому конкретному випадку, окрім поділу вихідного зразка на окремі фракції, дозволяє позбавитися від можливих небілкових домішок, наявних у пробі. Обраний нами метод В. Николаичик і співавторів (1991), як перший етап виділення пептидів, використовується переважно для одержання фракції молекул середніх мас, яка окрім олігопептидів і пептидів містить молекули небілкової природи.

У результаті хроматографічного розділення отримано чотири піки, що відповідають фракціям із пептидами, молекулярна маса яких становить близько 2,3 кДа (1-й пік), 1,9 кДа (2-й пік), 1,4 кДа (3-й пік) та 0,7 кДа (4-й пік).

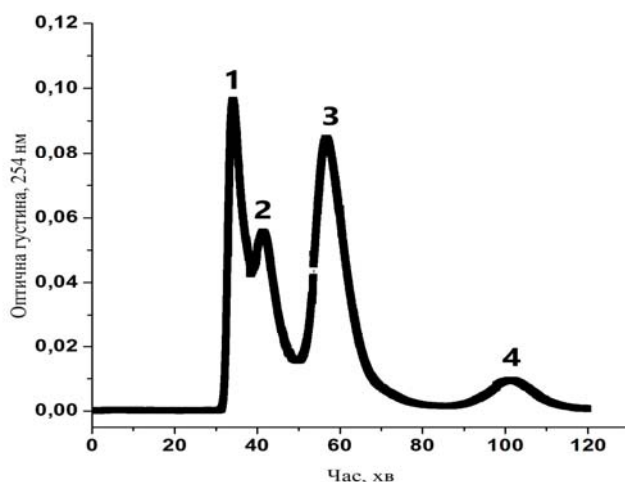


Рис. 4. Хроматограма поділу фракції пептидів методом хроматографії, що поділяє за розмірами: 1...4 – номери піків, що відповідають одержаним фракціям

Таким чином, у результаті поєднання декількох методичних підходів оптимізовано метод одержання фракції природних пептидів, який включав етап відділення білкових молекул шляхом поетапного осадження хлорною кис-

лотою й етиловим спиртом, подальше доочищення одержаної проби методом ультрафільтрації та фракціонування на колонці з Sephadex G-15. Застосування запропонованого методу на прикладі гідробіонта *Nacella concinna* дозволило виділити з тканин гідробіонта чотири фракції,

що містили пептиди різної молекулярної маси. Проведений аналіз із використанням 2Д-електрофорезу виявив, що ізоелектричні точки більшості пептидів містяться у діапазоні рН від 8,0 до 10,0.

Список використаної літератури

1. Synthetic Peptides as Therapeutic Agents: Lessons Learned From Evolutionary Ancient Peptides and Their Transit Across Blood-Brain Barriers // D. A. Lovejoy, D. W. Hogg, T. L. Dodsworth et al. // Front Endocrinol (Lausanne). – 2019. – 10. – 730.
2. Cheng S. Extraction of polysaccharides from Mytilusedulis and their antioxidant activity in vitro / S. Cheng, X. Yu, Y. Zhang // Shipin Gongye Keji. – 2010. – Vol. 31. – P. 132–134.
3. Lordan S. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases / S. Lordan, R. P. Ross, C. Stanton // Mar. Drugs. – 2011. – Vol. 9. – P. 1056–1100, doi: 10.3390/md9061056.
4. Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells / P. Ganesan, K. Noda, Y. Manabe et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – 1810. – P. 497–503, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.02.008.
5. Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action / A. Mayer, A. Rodriguez, O. Tagliatalata-Scafati, N. Fusetani // Mar. Drugs. – 2013. – 11. – P. 2510–2573, doi: 10.3390/md11072510.
6. Se-Kwon Kima. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review / Kima Se-Kwon, Wijesekara Isuru // J Functional Foods. – 2010. – Vol. 2. – P. 1–9.
7. Bougateg N. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (Sardinellaaurita) by-products proteins / N. Bougateg, L. Manni Nedjar-Arroume // Food Chemistry. – 2010. – Vol. 118. – 3. – P. 559–565.
8. Su Y. Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (Pelteobagrusfulvidraco) / Y. Su // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. – 2011. – Vol. 158. – 2. – P. 149–154.
9. Purification and identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from shark meat hydrolysate / H. Wu, H.-L. He, X.-L. Chen et al. // Process Biochemistry. – 2008. – Vol. 43. – 4. – P. 457–461.
10. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation / N. Rajapakse, W.-K. Jung, E. Mendis et al. // Life Sciences. – 2005. – Vol. 76. – 22. – P. 2607–2619.
11. Nikolajchik V. Sposob opredeleniya srednih molekul / V. Nikolajchik, V. Moin, V. Kirkovskij // Laboratornoedelo. – 1991. – 10. – P. 13–18.
12. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227(1). – P. 680–685.
13. 2-D Electrophoresis Principles and Methods Amersham Biosciences UK Limited Amersham Place Little Chalfont. – 2004. – 168.
14. Expression and purification of moricin CM4 and human beta-defensins 4 in Escherichia coli using a new technology / Y. Shen, H. X. Ai, R. Song et al. // Microbiol Res. – 2010. – Vol. 165(8). – P. 713–718, doi: 10.1016/j.micres.2010.01.002. Epub 2010 Jan 20.
15. Purification and characterization of a natural antioxidant peptide from fertilized eggs / X. Duan, D. Ocen, F. F. Wu et al. // Food Res. – 2014. – 56. – P. 18–24.
16. Scott M. G. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system / M. G. Scott, R. E. Hancock // Crit Rev Immunol. – 2000. – 20. – P. 407–431.
17. Hilpert K. Short linear cationic antimicrobial peptides: screening, optimizing, and prediction / K. Hilpert, C. D. Fjell, A. Cherkasov // Methods Mol Biol. – 2008. – 494. – P. 127–159.

Н. Ракша, канд. биол. наук, О. Савчук, д-р биол. наук
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
 Т. Маевская, канд. техн. наук
 ОО "Украинский инновационный кластер рыбной индустрии", Киев, Украина

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕПТИДОВ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ АНТАРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА

*Стремительный рост спроса на пептидные препараты актуализирует поиск новых природных и экономически обоснованных источников сырья. Широкое разнообразие биологически активных соединений, в том числе и пептидной природы, присущее морским гидробионтам, позволяет рассматривать их как перспективный сырьевой ресурс. Вместе с тем, использование морских объектов в качестве источника для получения целевых молекул требует определенной оптимизации существующих методологических подходов их выделения и обеспечения надлежащей степени очистки. В работе решается задача оптимизации метода получения пептидов из гидробионтов Антарктического региона на примере гидробионта *Nacellaloscipinna*. Предложенный трехэтапный подход позволяет выделять фракции пептидов различной молекулярной массы. Первый этап включал осаждение высокомолекулярного белкового материала сначала хлорной кислотой, а затем 80%-м этиловым спиртом. В результате была получена фракция пептидных молекул с молекулярной массой до 6,5 кДа, которая содержала небольшое количество высокомолекулярных белковых примесей. Дальнейшую доочистку полученной фракции проводили путем ультрафильтрации с использованием мембран с размером пор 10 кДа. Контроль белково-пептидного состава пробы на всех этапах получения проводили методом диск-электрофореза в денатурирующих условиях в пластинах 18%-го полиакриламидного геля. Проведенный анализ с использованием 2Д-электрофореза показал, что изоэлектрические точки большинства пептидов находятся в диапазоне рН от 8,0 до 10,0. Лишь незначительная часть пептидов имела изоэлектрические точки при 4,0 и 5,0 рН. Заключительный этап получения пептидной фракции включал фракционирование пробы методом гель-хроматографии. В результате хроматографического разделения было получено четыре пика, соответствующие фракциям с пептидами, молекулярная масса которых составляет около 2,3 кДа (1-й пик), 1,9 кДа (2-й пик), 1,4 кДа (3-й пик) и 0,7 кДа (4-й пик).*

Ключевые слова: гидробионты, пептидная фракция, метод получения.

References (Scopus)

1. Lovejoy D.A., Hogg D.W., Dodsworth T.L., Jurado F.R., Read C.C., D'Aquila A.L., Barsyte-Lovejoy D. Synthetic Peptides as Therapeutic Agents: Lessons Learned From Evolutionary Ancient Peptides and Their Transit Across Blood-Brain Barriers // Front Endocrinol (Lausanne). 2019; 10: 730.
2. Cheng S., Yu X., Zhang Y. Extraction of polysaccharides from Mytilusedulis and their antioxidant activity in vitro. ShipinGongyeKeji. 2010; 31:132–134.
3. Lordan S., Ross R.P., Stanton C. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. Mar. Drugs. 2011;9:1056–1100. doi: 10.3390/md9061056.
4. Ganesan P., Noda K., Manabe Y., Ohkubo T., Tanaka Y., Maoka T., et al. Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. Biochim. Biophys. Acta. 2011;1810:497–503. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.02.008.
5. Mayer A., Rodriguez A., Tagliatalata-Scafati O., Fusetani N. Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. Mar. Drugs. 2013;11:2510–2573; doi:10.3390/md11072510.
6. Se-KwonKima, IsuruWijesekaraa. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. J Functional Foods. 2010;2:1–9.
7. Bougateg N. Nedjar-Arroume L. Manni. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (Sardinellaaurita) by-products proteins. Food Chemistry. 2010;118(3):559–565.
8. Su Y. Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (Pelteobagrusfulvidraco). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2011;158(2):149–154.
9. Wu H., He H.-L., Chen X.-L., Sun C.-Y., Zhang Y.-Z., Zhou B.-C. Purification and identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from shark meat hydrolysate. Process Biochemistry. 2008;43(4):457–461.
10. Rajapakse N., Jung W.-K., Mendis E., Moon S.-H., Kim S.-K. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. Life Sciences. 2005;76(22):2607–2619.
11. Nikolajchik V., Moin V., Kirkovskij, V. Sposob opredeleniya srednih molekul. Laboratornoe delo. 1991;10:13–18.
12. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(1):680–685.
13. 2-D Electrophoresis Principles and Methods Amersham Biosciences UK Limited Amersham Place Little Chalfont. 2004;168.
14. Shen Y, Ai HX, Song R, Liang ZN, Li JF, Zhang SQ. Expression and purification of moricin CM4 and human beta-defensins 4 in Escherichia coli using a new technology. Microbiol Res. 2010;165(8):713–8. doi: 10.1016/j.micres.2010.01.002. Epub 2010 Jan 20.
15. Duan X., Ocen D., Wu F.F., Li M., Yang N., Xu J., Chen H.Y., Huang L.Q., Jin Z.Y., Xu X.M. Purification and characterization of a natural antioxidant peptide from fertilized eggs. Food Res. 2014;56:18–24.
16. Scott M.G., Hancock R.E. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. Crit Rev Immunol. 2000;20:407–431.
17. Hilpert K., Fjell C.D., Cherkasov A. Short linear cationic antimicrobial peptides: screening, optimizing, and prediction. Methods Mol Biol. 2008;494:127–159.

Надійшла до редколегії 05.01.2021
 Отримано виправлений варіант 02.01.2021
 Підписано до друку 02.01.2021

Received in the editorial 05.01.2021
 Received a revised version on 02.01.2021
 Signed in the press on 02.01.2021

N. Raksha, PhD, O. Savchuk, Dr Hab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
T. Maievska, PhD
NGO "Ukraine's fishing industry cluster of innovations", Kyiv, Ukraine

OBTAINING PEPTIDES FROM AQUATIC ORGANISMS OF THE ANTARCTIC REGION

*The rapid growth in demand for peptide drugs is actualizing the search for new natural and economically viable sources of raw materials. The wide variety of biologically active compounds, including peptide nature, inherent in marine aquatic organisms allows us to consider their promising raw material resource. However, the use of marine objects as a source for the production of target molecules requires some optimization of existing methodological approaches to their isolation and ensure the appropriate degree of purification. The problem of optimization of the method of obtaining peptides from hydrobionts of the Antarctic region on the example of the hydrobiont *Nacellaconcinna* is solved in the work. The proposed three-step approach allows to isolate fractions of peptides of different molecular weight. The first step involved the precipitation of high molecular weight protein material first with perchloric acid and then with 80% ethyl alcohol. The result was a fraction of peptide molecules with a molecular weight of up to 6.5 kDa, which contained a small amount of high molecular weight protein impurities. Further purification of the obtained fraction was performed by ultrafiltration using membranes with a pore size of 10 kDa. Control of the protein-peptide composition of the sample at all stages of production was performed by disk electrophoresis under denaturing conditions in plates of 18% polyacrylamide gel. Analysis using 2D electrophoresis found that the isoelectric points of most peptides are in the pH range from 8.0 to 10.0. Only a small proportion of the peptides had isoelectric points at 4.0 and 5.0 pH. The final step of obtaining the peptide fraction involved fractionation of the sample by gel chromatography. As a result of chromatographic separation, four peaks were obtained, corresponding to the fractions with peptides, the molecular weight of which is about 2.3 kDa (1 peak), 1.9 kDa (2 peak), 1.4 kDa (3 peak) and 0.7 kDa (4 peak).*

Keywords: hydrobionts, peptide fraction, production method.

УДК: 612.17+577.1

DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.43–47

Р. Федічкіна, асп., Ю. Коркач, канд. біол. наук, І. Охай, асп.,
Ю. Гошовська, канд. біол. наук, В. Сагач, д-р мед. наук.
Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

ВПЛИВ МОДУЛЮВАННЯ СИНТЕЗУ СІРКОВОДНЮ ТА ГЛУТАТІОНУ НА ОКИСНО-НІТРОЗАТИВНИЙ МЕТАБОЛІЗМ МІОКАРДА В УМОВАХ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

Підтримання окисно-відновного балансу є необхідною умовою для забезпечення нормального метаболізму клітин серця. Ішемічно-реперфузійні порушення функції серця супроводжуються вибухоподібним утворенням АФК, пошкодженням мембран клітини, порушенням функцій білків, розвитком м'язової контрактури тощо. Відомо про кардіопротекторний вплив сірководню (H_2S), який синтезується з L-цистеїну. Крім того, L-цистеїн є однією з трьох амінокислот, що утворюють антиоксидант глутатіон (GSH). Зважаючи на це, метою нашої роботи було дослідити вплив модуляції синтезу GSH та H_2S на окисно-нітрозативний метаболізм тканин серця в умовах ішемії-реперфузії. Пропаргілгліцин (PAG) та бутіонінсульфоксимін (BSO) (інгібітори синтезу H_2S та глутатіону відповідно), а також L-цистеїн вводили щуром внутрішньочеревинно. Використовуючи метод реперфузії коронарних судин серця за Лангендорфом, моделювали ішемію-реперфузію. У тканинах серця до та після ішемії, визначали швидкість генерації АФК, вміст продуктів ПОЛ, активність NO-синтаз. Дослідження показали, що ефектом комбінації PAG+L-цистеїн є попередження утворення АФК, збільшення пулів низькомолекулярних нітрозотіолів, збереження активності конститутивної NO та пригнічення активності індукційної NO-синтази як у доішемійний період, так і в період реперфузії. Позитивний ефект на кардіодинаміку виражався в повному відновленні функції серця в реперфузійний період. Премедикація BSO у групі PAG+L-цистеїн значно знижувала ефективність комбінації та погіршувала відновлення функції серця під час реперфузії. Генерація O_2^- та OH збільшувалась, активність iNO-синтази зростала в 3.5 рази порівняно з групою з введенням комбінації PAG+L-цистеїн. Введення комбінації PAG+L-цистеїн в умовах моделювання ішемії-реперфузії пригнічує утворення АФК і зберігає активність sNOS, забезпечуючи таким чином стабільну продукцію NO. Попереднє введення інгібітора синтезу глутатіону BSO повністю відміняло антиоксидантний ефект введення PAG+L-цистеїну за рахунок зниження біодоступності глутатіону.

Ключові слова: серце, активні форми кисню, ішемія-реперфузія, глутатіон, сірководень.

Вступ. Серцево-судинні захворювання, що десятиліттями не поступаються чільними місцями у причинах смертності людей, часто мають у своїй основі пошкодження мембран клітин активними формами кисню (АФК). Особливо чітко ці процеси спостерігаються при ішемічно-реперфузійному порушенні функції серця. Припинення кровопостачання призводить до нестачі кисню у тканинах. Метаболізм клітин переходить з аеробного на анаеробний гліколіз, унаслідок чого накопичується лактат і знижується внутрішньоклітинний рН [7], викликаючи збільшення концентрації натрію [1]. У свою чергу, перевантаження натрієм запускає Na^+ - Ca^{2+} обмінник у зворотний бік, що є причиною збільшення концентрації кальцію у клітині [13]. Відновлення кровотоку та надходження кисню в ішемізовану тканину призводить до вибухоподібного утворення АФК, зокрема супероксиданіон радикала та пероксиду водню [3], які вступають у взаємодію з молекулами сірководню (H_2S) й оксиду азоту (NO), утворюючи їх високоактивні радикали, що є надпотужними пошкоджуючими агентами [9]. Усі ці процеси спричиняють пошкодження білків і ліпідів клітини,

відкриття мітохондріальних пор транзиторної провідності (MPTP), порушення функції мітохондрій, пошкодження ДНК, м'язової контрактури тощо [4, 7].

Відомо, що кардіопротекторний вплив проявляє сірководень, який є третьою сигнальною молекулою з родини газоподібних вторинних посередників [17]. Попередником його синтезу є амінокислота L-цистеїн, що також входить до складу вагомий для антиоксидантного захисту молекули – глутатіону, який важливий у антиоксидантному захисті за рахунок своєї дії як скавенджера вільних радикалів і кофактора ряду антиоксидантних ферментів [11]. Тому від внутрішньоклітинних рівнів глутатіону, виснаження або підвищення його пулів, значно залежить окисно-відновна регуляція клітин [6].

Раніше нами показано, що попереднє введення пропаргілгліцину (PAG), інгібітора цитоплазматичного ферменту синтезу сірководню цистатіон- γ -ліази (CSE), та попередника синтезу сірководню та глутатіону – амінокислоти L-цистеїну мало виражений кардіопротекторний вплив в умовах ішемії-реперфузії ізольованого серця щура та діабету [5, 15]. Тому метою нашої роботи було