

ЕЛАСТОЛІТИЧНІ ЕНЗИМИ МІКРООРГАНІЗМІВ

О. В. МАЦЕЛЮХ, Н. А. НІДЯЛКОВА, Л. Д. ВАРБАНЕЦЬ

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Еластолітичні ензими використовують у промисловості й медицині для гідролізу еластину — природного нерозчинного фібрилярного протеїну, що є складовою сполучної тканини більшості хребетних тварин. Описані в літературі еластолітичні ензими відрізняються між собою за каталітичними механізмами і субстратною специфічністю. В огляді узагальнено дані щодо здатності деградувати еластин ензимами, виділеними з різних груп мікроорганізмів — бактерій, актиноміцетів і мікроскопічних грибів. Розглянуто деякі фізико-хімічні властивості препаратів еластолітичних ензимів та їхню роль у патогенності *Pseudomonas aeruginosa*.

Ключові слова: еластолітичні ензими мікроорганізмів, еластаза, Іас-система міжклітинних взаємовідносин.

Інтерес до еластолітичних ензимів, що спостерігається в останні десятиліття, пояснюється передусім активною участю їх у розвитку різних захворювань запально-го генезу і високою клініко-діагностичною інформативністю визначення цих протеїназ при багатьох патологічних процесах. Еластази людини відіграють певну роль при емфіземі легенів, цистозному фіброзі, запаленнях та атеросклерозі. Відома особлива діагностична та прогностична цінність визначення еластаз у разі хронічного й гострого панкреатиту, сепсису, септичного шоку, коагулопатій та інших патологічних процесів в організмі [1–4]. Це значною мірою пояснюється високою каталітичною активністю еластаз і широким спектром протеїнів, які піддаються протеолізу і втрачають свої біологічні властивості під дією цих ензимів. Є підстави вважати, що еластази виходять на рівень нових маркерів, а інколи і «золотих стандартів» під час виявлення гострого або хронічного запалення різної етіології.

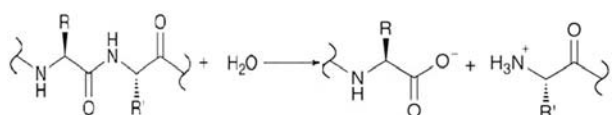
Еластолітичні ензими використовують у промисловості для гідролізу сировини, яка містить еластинові волокна [5]. Так, у м'ясопереробній промисловості протеази мікроорганізмів застосовують у процесах дозрівання м'яса. У рибній промисловості використання таких ензимів прискорює процеси засолювання та дозрівання оселедця, сприяє більш рівномірному розділенню солі по всій тушці. Традиційно за допомогою протеаз отримують протеїнові гідролізати, які використовують як поживні добавки.

Еластази, окремо або в комплексі з іншими протеїназами, використовують під час оброблення ран при опіках, для зменшення запальних процесів, набряків, гематом та ін. [6, 7].

Під назвою «еластолітичні ензими» об'єднано групу ендопептидаз, які належать до різних груп протеаз: серинових, цистеїнових і металопротеїназ [8, 9].

Еластази вищих тварин (КФ 3.4.21.36, 3.4.21.37) є сериновими протеазами, що виявляють специфічність до пептидних зв'язків, утворених карбоксильними групами аланіну, валіну, лейцину, ізолейцину, а також іншими залишками гідрофобних амінокислот у поліпептидних ланцюгах. Активний центр цих ензимів утворений класичною для серинових протеїназ тріадою із залишків серину, гістидину й аспарагінової кислоти, за участю якої здійснюється нуклеофільна атака на пептидні зв'язки протеїнів, що призводить до їх гідролітичного розщеплення (рис. 1). Еластази особливо активні стосовно нерозчинного протеїну еластину, що міститься у високих концентраціях в еластинових волокнах сполучних тканин, а також здатні гідролізувати колагени III, VI і VIII генетичних типів, протеоглікани, гістони, гемоглобін тощо.

Еластази було виявлено в панкреатичній залозі, у нейтрофілах, тромбоцитах і макрофагах, селезінці, стінці аорти, шкірі, нирках, а також у деяких мікроорганізмів та отруті гадюк. Найповніше вивченими є еластази з панкреатичної залози, поліморфноядерних лейкоцитів і макрофагів.



Поліпептидний ланцюг

Фрагменти поліпептидного ланцюга

R = Ala, Gly, Val.

Рис. 1. Схема гідролітичної дії еластази

Подібно до більшості протеїназ еластаза синтезується в панкреатичній залозі у формі неактивного зимогену (проензиму) і зазнає активаційного розщеплення трипсином у дванадцятипалій кишці. Панкреатична еластаза має оптимум дії при рН 8,5. Її молекулярна маса становить 28 кДа. Як у всіх серінозах протеаз, активність її пригнічується діїзопропілфторфосфатом. Окремі амінокислоти (аланін, валін, лейцин, ізолейцин) є її конкурентними інгібіторами. Протеїновий інгібітор трипсину із сої не впливає на еластазну активність [10]. Еластаза (рис. 2) характеризується високим рівнем гомології амінокислотної послідовності з трипсином та хімотрисином. Вона складається з одиночного поліпептидного (240 амінокислотних залишків) ланцюга, який відповідає одиночному ланцюгу трипсину, а також В- та С-ланцюгам хімотрисину. Панкреатична еластаза має подібний до зазначених ензимів каталітичний механізм, однак дещо відрізняється від них за субстратною специфічністю.

Еластолітичні ензими мікроорганізмів. На сьогодні в світовій літературі практично відсутні систематизовані дані щодо елас-

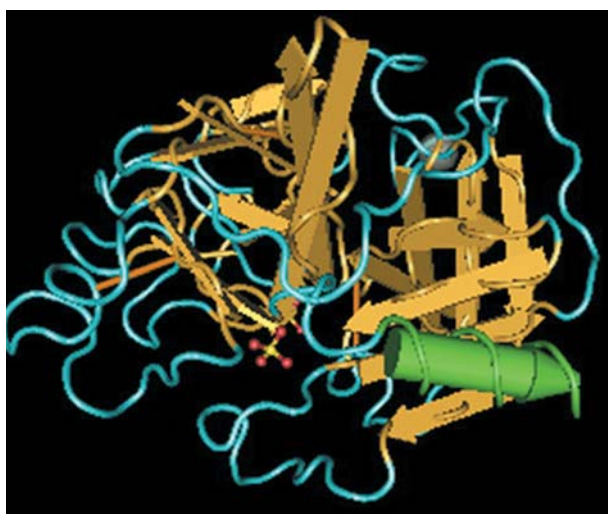


Рис. 2. Тривимірна структура панкреатичної еластази свині за роздільної здатності 1,65 А [48]

толітичних ензимів мікробного походження. В основному описано окремі продуценти, що належать до різних таксономічних груп мікроорганізмів, зокрема *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Aspergillus*, *Streptomyces* та деяких інших.

Відомо, що майже всі хронічні виразки колонізовані різними групами бактерій, серед яких виділяють стафілококи, ентерококи і *Pseudomonas aeruginosa*. Встановлено, що експресія ними великої кількості протеїназ індукує руйнування компонента комплементу С3, кініногенів, фібробластних протеїнів та протеогліканів *in vitro* [11, 12]. *P. aeruginosa*, грам-негативний опортуністичний патоген, секретує в навколишнє середовище ряд протеолітичних ензимів, які відіграють певну роль у патогенності цього мікроорганізму. Цю групу ензимів складають: щонайменше чотири ендопептидази, LasA-еластаза (стафілолізин), LasB-еластаза (псевдолізин), лужна протеїназа, а також лізинспецифічні ендопептидази, які розрізають пептидні зв'язки в пептидах і протеїнах, що містять залишки лізину [13, 14, 15]. Протеази (LasA-еластаза, LasB-еластаза та лужна протеїназа) відіграють основну роль під час гострої фази інфекції. Роль лужної протеази в інвазії *P. aeruginosa* невідома. LasA- і LasB-еластази мають досить широку субстратну специфічність і здатні гідролізувати не лише еластин, але й інші протеїни. Зокрема, LasA-протеаза виявляє високу стафілолітичну активність і здатна гідролізувати пептидоглікан клітинної стінки [16]. LasB-еластаза гідролізує фібрин і колаген, інактивує людські імуноглобуліни G і A, компоненти комплементу та лізоцим, присутній у дихальних шляхах. Таким чином, LasB-еластаза істотно перешкоджає дії механізмів захисту хазяїна. На відміну від цих ензимів, лужна протеаза не має еластазної активності.

Доведено необхідність еластази для виявлення вірулентних властивостей *P. aeruginosa* та для ініціації патогенетичного процесу [17]. Так, 120 штамів, які ізолювали у пацієнтів з циститним фіброзом і легеневою інфекцією, досліджували на присутність таких вірулентних факторів, як гемолізин, желатиназа і еластаза. Підтверджено здатність усіх досліджуваних штамів мікроорганізмів продукувати еластазу. Основним компонентом протеолітичного комплексу *P. aeruginosa* MN7 є саме еластаза. Ензим було очищено до гомогенного стану за допомогою фракціонування ацетоном, гель-фільтрації на Sephadex G-75 і ультрафільтрації на

10-кДа мембрані [18]. Молекулярна маса очищеного ензиму становила 34 кДа, оптимум температури — 60 °С, оптимум рН — 8,0. На відміну від еластази вищих тварин, цей ензим виявився металопротеазою, оскільки його активний центр містив іони Zn^{2+} й інактивувався у разі додавання хелатуючих агентів.

Еластази *P. aeruginosa* (КФ 3.4.24.16, 3.4.24.26) є цинкмісними металопротеазами (рис. 3). Встановлено, що четвертинна структура LasB-еластази *P. aeruginosa* аналогічна такій структурі термолізину *Bacillus thermoproteolyticus*, визначено також досить високу гомологію (28%) між первинними амінокислотними послідовностями [19]. LasA- і LasB-протеази синтезуються як препроензими з надзвичайно довгими N-кінцевими пропептидами. При цьому їхня еластолітична активність мінімальна або відсутня зовсім. Процесинг LasB-ензиму відбувається за рахунок автокаталітичного відщеплення пропептиду в периплазматичному просторі та формування перехідного неактивного комплексу пропептид-еластаза. Цей комплекс деградується іншими протеазами зовні клітини, вивільнюючи еластазу. Показано, що пропептид може відігравати певну роль в переносі ензиму через зовнішню мембрану. Процесинг LasA-ензиму є опосередкованим обмеженим протеолізом зовні клітини лізинспецифічною ендопептидазою і LasB-еластазою [20, 21].



Рис. 3. Тривимірний структура еластази *Pseudomonas aeruginosa* за роздільної здатності 1,5 А [19]

Раніше було показано [22], що внутрішньоклітинна протеаза *P. aeruginosa* гідролізує нуклеозиддифосфаткіназу з молекулярною масою 12–16 кДа. Ця форма асоційована з мембраною і формує комплекси зі специфічними протеїнами для синтезу гуанозин-5'-трифосфату, що бере участь в альгінатному синтезі. Цю протеазу було очищено за допомогою адсорбційної хроматографії. Методом SDS-PAGE визначено її молекулярну масу, що становить 33 кДа. Послідовності перших 10 амінокислотних залишків з N-кінця збігались на 100% із LasB-еластазою. Таким чином було доведено її роль в альгінатному синтезі.

Бактеріальні ізоляти із тканини аорти від чотирьох пацієнтів, які зазнали хірургічного втручання, мали еластазну активність *in vitro* лише в тому разі, якщо були сформовані бактеріями *P. aeruginosa* [23]. Активність еластолітичного ензиму в гомогенаті аортної тканини пацієнтів пригнічувалась лише інгібітором серинових протеаз — фенолметилсульфонілфторидом (ФМСФ). Цим було доведено, що еластаза, яку виявляють при аортній аневризмі, є зазвичай нейтрофільною сериновою протеазою хазяїна, а не ензимом, синтезованим інфекційними мікроорганізмами або металопротеїназою макрофагового походження, які зазвичай спостерігаються при атеросклеротичних аневризмах.

Пошук продуцентів еластази серед морських мікроорганізмів свідчить про перспективність їх використання для одержання ензимів. Відомо, що морські екосистеми — природне середовище для таких патогенів людини і тварин, як бактерії родів *Aeromonas* та *Vibrio*. Досліджували 34 морські штами *Vibrio alginolyticus*, які вирощували 18–24 год при 37 °С на середовищі з лужним пептоном і 1–3% NaCl. [24]. Показано, що бактерії мають колагеназну, еластазну і хондроїтиназну активність. Припускають, що ці ензими відповідають за прояв вірулентності досліджуваних штамів, які є причиною дерматологічних інфекцій людини.

З морського штаму *Bacillus pumilus* одержано термолабільний еластолітичний ензим з рН-оптимумом 8,0–9,0 і питомою активністю 119 Од/мг протеїну. На відміну від інших ензимів, виділених з морських мікроорганізмів, еластаза *B. pumilus* не інактивувалася повністю (а тільки на 25%) розчином NaCl [25].

Розроблено метод швидкої екстракції еластолітичного ензиму з клітин *Bacillus* sp. із застосуванням 23% поліетиленгліколю 2000, а також 11,7% солі KH_2PO_4 [26].

Проведено оптимізацію умов культивування *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410, що дало змогу встановити оптимальну швидкість перемішування культуральної рідини (220 об/хв), температуру культивування (25 °C), об'єм інокулюма (5%), об'єм середовища в 250 мл колбах Ерленмеєра (25 мл) та одержати еластолітичний ензим з активністю 495 Од/мл [27]. Вивчення впливу еластину і фактора росту на еластазну активність свідчить, що еластин не впливає на синтез ензиму, водночас фактор росту значною мірою підвищував продукування еластази і ріст клітин *B. licheniformis* ZJUEL31410. Показано також, що пшеничне та соєве борошно були найкращими джерелами вуглецю й азоту для продукування ензиму. Для визначення концентрації цих компонентів застосовували факторний експеримент, який показав, що початкова концентрація пшеничного і соєвого борошна, відповідно 3,4% і 9,4%, є оптимальною для продукування еластази [28]. Відомо, що стабільність ензимів, зокрема мікробних еластолітичних, значною мірою впливає на їхню активність і ефективність. Для підвищення толерантності еластази *B. licheniformis* ZJUEL31410 до кислотної реакції середовища вивчали вплив різних значень рН — від 2 до 6 — на продукування еластази [29]. Отримано S₄-мутант, чия еластаза найбільш толерантна до кислого середовища. З'ясовано, що значення рН 4 реакційного середовища не впливає негативно на еластазну активність. Результати SDS-PAGE свідчать про відмінність електрофоретичних профілей контрольного і мутантного штамів. Показано, що мутантний штам ZJUEL31410 був більш стабільним при рН 6 і підвищеній температурі порівняно з контрольним штамом. Це свідчить про те, що еластаза, яка продукується мутантним штамом, може мати певну цінність для практичного застосування.

Бактеріальний штам *Bacillus* XE22-4-1, виділений з лужного озера в Тибеті, синтезує зовнішньоклітинну еластолітичну протеазу за оптимального значення рН культурального середовища 10,0 [30]. Для збільшення еластазної активності в середовище додають 2% глюкози і 0,25% дріжджового екстракту, відповідно, як джерела вуглецю й азоту. Також синтез еластолітичного ензиму підвищувало додавання соєвого борошна. Результати досліджень виявили, що розчинений кисень є найбільш впливовим чинником у біосинтезі цього ензиму. Максимальну активність спостерігали через 48 год вирощування в поєднанні з поліпшеною аерацією та швидкістю перемішування.

Щування в поєднанні з поліпшеною аерацією та швидкістю перемішування.

З алкалофільної бактерії *Bacillus* sp. Ya-B виділено еластолітичний ензим, який належить до групи лужних серинових протеїназ. Його молекулярна маса становить 25 кДа, рН-оптимум гідролізу еластину й казеїну 11,75. Субстратну специфічність очищеного ензиму вивчали на різних синтетичних і природних субстратах [31]. Дослідження швидкості гідролізу *p*-нітрофенілових ефірів і *t*-бутоксикарбоніл-L-Phe-L-Arg(NO₂)-X-L-Phe-*p*-нітроаніліну (де X — L-Ala, Val, Leu, Ile або Gly) дозволило зробити висновок, що субсайти зв'язування S1 та S2 специфічні до L-аланіну і гліцину. Ензим з високою швидкістю гідролізує специфічні субстрати сукциніл-L-(Ala)₃-*p*-нітроанілід і сукциніл-L-Ala-L-Pro-L-Ala-*p*-нітроанілід. Вивчення кінетики гідролізу сукциніл-L-(Ala)₃-*p*-нітроаніліду та інгібіторний аналіз з карбобензокси-L-Phe-хлорометиліновим кетоном (ZPCK), Z-L-Ala-L-Phe-CK (ZAPCK) і Z-L-Ala-Gly-L-Phe-CK (ZAGPCK) показало, що ця еластаза має щонайменше чотири субсайти зв'язування із субстратом.

Проведено скринінг продуцентів протеолітичних ензимів (зокрема, еластази) серед 367 бактеріальних і дріжджових штамів [32]. Встановлено, що 25% бактеріальних штамів виявляли здатність гідролізувати еластин. Серед них відібрали два штами — *Bacillus* sp. і *B. circulans*, які за умов глибинного культивування виявляли максимально високий рівень синтезу еластази. Для розділення ензимних комплексів застосовували традиційну схему очищення, що поєднувала фракціонування сульфатом амонію, іономінну хроматографію і гель-фільтрацію. Отримано три еластолітичні протеази, які, крім еластину, були здатні гідролізувати й інші протеїнові субстрати (казеїн, фібрин, гемоглобін, желатину). Їхні молекулярні маси становили 28,7, 22,7 і 143 кДа [33]. Встановлено, що ензими еластази *Bacillus* sp. відрізняються за впливом групспецифічних реагентів на їхні каталітичні властивості. Дані вивчення впливу ФМСФ і хелатуючих агентів свідчили про можливу присутність серину або гістидину в активному центрі досліджуваних протеаз і про те, що для прояву ензиматичної активності їм необхідні іони металів. Тіолові реагенти *p*-ХМБ і дитіотреїтол також пригнічували активність цих протеаз, що, можливо, вказує на присутність залишків цистеїну поблизу активного центру.

Підтверджено здатність синтезувати протеолітичні ензими з еластолітичною

активністю і для представників стрептоміцетів. Таким ензимним препаратом є проназа, виділена з *Streptomyces griseus*. Назва «проназа» об'єднує цілу групу протеолітичних ензимів, які виділяють з культуральної рідини *S. griseus* К-1. Проназа містить щонайменше 10 протеаз: п'ять серинового типу, дві Zn^{2+} -ендопептидази, дві Zn^{2+} -лейцин амінопептидази і одну Zn^{2+} -карбоксіпептидазу [34]. Виявлено наявність еластази в культуральній рідині штаму *Streptomyces* sp. 82, причому її синтез можна підвищити в 7,5 раза, додаючи в середовище рибну муку [35]. Виділено й охарактеризовано три колагенолітичні ензими з протеолітичного комплексу *Streptomyces* sp. 1349, два з яких належать до метало-, а один — до серинових протеаз [36]. Всі три ензими мають схожу субстратну специфічність й активні стосовно як до фібрилярних, так і глобулярних протеїнів, зокрема вони з високою швидкістю гідролізували еластин.

Здатність продукувати еластолітичні ензими також встановлено для мікроскопічного гриба *Aspergillus fumigatus* [37]. Його еластаза бере участь у патогенному процесі. Здатність продукувати еластазу в 22 ізолятів від хворих зберігалась впродовж 10 днів інкубації при 37 °С на середовищі, яке містило еластин.

Показано кореляцію між синтезом еластази і розвитком інвазивного процесу для штамів *A. fumigatus*, *A. flavus* і *A. niger*, що спричиняють аспергильози [38].

Aspergillus flavus, виділений із зіпсованого зразка казеїну, продукував 1,6 Од зовнішньоклітинної протеази на 1г твердого субстрату протягом 10 днів інкубаційного періоду. Виробництво ензиму за глибинної ферментації (0,12 Од/мл) було меншим, ніж за твердофазної (0,99 Од/мл). Проведено оптимізацію умов культивування для максимального виходу ензиму [39].

Las-система міжклітинних взаємовідносин у *Pseudomonas aeruginosa*. Першою системою міжклітинних взаємодій у *P. aeruginosa* було описано експресію LasB-еластази, що отримала назву «las-система» [40]. Вона складається з двох компонентів: автоіндуктора (ліпофільна молекула N-ацилгомосеринлактону: 3-охо-C12-HSL), який синтезується екстрацелюлярно, і LasR-протеїну, що синтезується всередині клітини. За низької клітинної щільності автоіндуктор утворюється в незначній кількості, а потім шляхом дифузії виходить за межі клітинної мембрани та розчиняється в навколишньому середовищі. Зі збільшенням щільності

клітин внутрішньоклітинна концентрація автоіндуктора зростає доти, доки не дістане критичної маси, тоді автоіндуктор зв'язується зі специфічним R-протеїном. Комплекс LasR/3-охо-C12-HSL зв'язується зі специфічними ДНК-последовностями генів-мішеней, які регулюють експресію lasB-еластази, lasA-еластази, екзотоксину та лужної протеази. Результатом є 1 000-кратне збільшення експресії генів факторів вірулентності. Систему регуляції генів патогенності *P. aeruginosa* показано на рис. 4. Сама по собі сполучка 3-охо-C12-HSL є одним із факторів вірулентності *P. aeruginosa* і має самостійну імуномодулювальну активність — інгібує активність поліморфноядерних лейкоцитів, що є причиною неповноцінного опсонофагоцитозу, а також стимулює підвищене утворення інтерлейкіну-8 (IL-8) [41]. Крім las-системи у *P. aeruginosa* існує й друга сигнальна система — rh1, відповідальна за утворення рамноліпиду. Автоіндуктором тут є молекула N-бутирилгомосеринлактону (C4-HSL), а протеїном — Rh1R [42].

Комплекс Rh1R / C4-HSL запускає експресію генів рамноліпиду, рамнозілтрансферази, стаціонарного сигма-фактора (δ^S), який регулює роботу генів «стресу». Обидві системи високоспецифічні, але взаєморегулюються на транскрипційному й посттранскрипційному рівнях [43, 44].

P. aeruginosa формує в легенях хворого біоплівки. Товщина такої біоплівки становить декілька сотень мікрометрів. Мікроколонії в зрілій біоплівці розташовані в зовнішньоклітинному полісахаридному матриксі. Біоплівка неоднорідна за своєю структурою, концентрація кисню зменшується від периферії до середини. Припускають, що подібні градієнти буде виявлено для рН і поживних речовин. Ці градієнти забезпечують фізіологічну варіабельність серед індивідуальних клітин біоплівки, зокрема на глибині клітинного росту значно повільніше, ніж на периферії. Бактерії в такій зрілій біоплівці фенотипово стійкі до бактерицидних агентів. Таким чином, біоплівки спричиняють різні типи хронічних бактеріальних інфекцій. Формування біоплівки у *P. aeruginosa* перебуває під контролем реакцій кворум-сенсингу. Мутації гена *lasI* порушує дозрівання біоплівки, оскільки протеїн LasI не синтезує 3-оксо-C12-HSL і після стадії мікроколонії формування мікроплівки не відбувається. Роль C4-HSL у процесах формування залишається невідомою. Біоплівки, утворені мутантами по *LasI*-протеїну, чутливі до детергентів, тимчасом як нормальні біоплівки

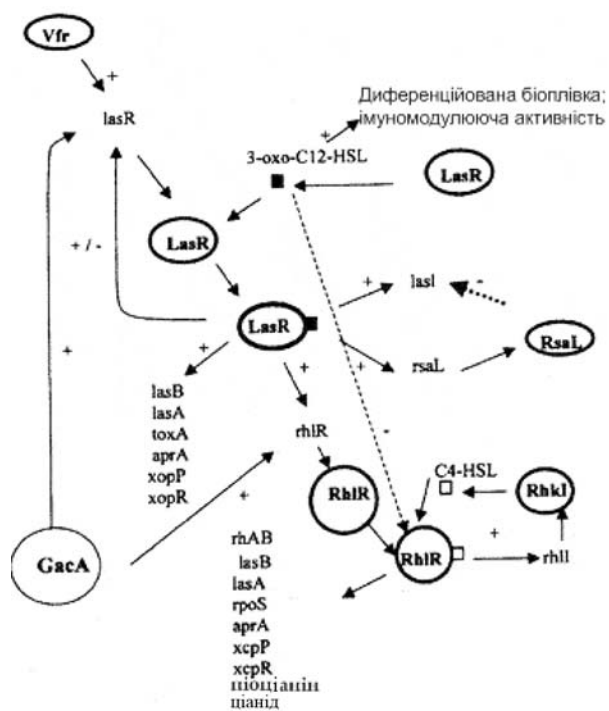


Рис. 4. Схематичне зображення регуляції генів патогенності *Pseudomonas aeruginosa*.

Система сигналів las, що передаються від «клітини до клітини», в ієрархічному каскаді контролюється за допомогою сигнальної системи протеїну rhl. Комплекс LasR/-3-охо-C12-HSL активує транскрипцію rhlR. 3-охо-12HSL блокує активацію RhlR шляхом C4-HSL. Сама las-система контролює позитивно — за допомогою Vfr і GacA, та негативно — за допомогою RsaL. 3-охо-C12-HSL необхідне для диференціації біоплівки й має імуномодельючу активність. Обидві сигнальні системи регулюють експресію різних генів (lasB — LasB-елаптаза; lasA — LasA-елаптаза; toxA — екзотоксин А; aprA — лужна протеаза; xcpP і xcpR — гени xcp-секреторного шляху; rhlAB — рамнозилтрансфераза, необхідна для продукування рамноліпиду; gpoS — сигма-фактор стаціонарної фази [43].

стійкі. Це дає підстави припустити, що терапія, спрямована на порушення регуляції механізму кворум-сенсингу в *P. aeruginosa*, може призвести до зупинки формування біоплівки, що підвищить чутливість цієї бактерії до антимікробних агентів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ефимов В. В., Воейкова Л. С., Блажко В. И. и др. Применение эпадола у больных хроническим обструктивным заболеванием легких // Укр. пульмонолог. журн. — 2006. — №1. — С. 23–26.
2. Катунян П. И., Щербакова И. В., Ключник Т. П. и др. Показатели активности сывороточной эластазы при лечении перфтораном

Патогенність *P. aeruginosa* зумовлена широким арсеналом факторів вірулентності. Одні з них асоційовані з клітиною (пілі, адгезини, ліпополісахариди), інші секретуються (протеази, рамноліпіди, екзоензим S, екзотоксин А, антибіотик піоціанін та інші) [45]. У новонароджених мишей, інфікованих не летальними інокулятами токсинпродукуючого штаму *P. aeruginosa*, визначали летальність від додаткових ін'єкцій протеази та еластази [46]. При введенні їх розчинів летальність значно зростала. Додаткове введення розчину альфа-2-макроглобуліну зумовлювало пригнічення протеолітичної активності, викликаючи значну затримку настання летальності порівняно з контролем. Дослідники дійшли висновку, що синтез протеази, еластази і токсину необхідні *P. aeruginosa* для виявлення повної вірулентності.

Людський IgA та мієломні протеїни двох підкласів — IgA1 і IgA2 чутливі до еластази, синтезованої *P. aeruginosa*. Детальний аналіз продуктів IgA мієломних протеїнів виявив повну деградацію ділянки Fab. На противагу цьому, як IgA1-, так і IgA2-протеїни були резистентними до лужної протеази *P. aeruginosa*. Чутливість людського IgA до еластази уможливило механізм уникнення потенційно захисної функції IgA у процесі синтезу цього ензиму [47].

Таким чином, аналіз наведених даних літератури свідчить про наявність еластолітичних ензимів серед мікроорганізмів, що належать до різних таксономічних груп. Вони виконують різні фізіологічні функції, зокрема можуть відігравати певну роль у патогенних властивостях мікробних ізолятів. Тому дослідження здатності гідролізувати еластин різними мікроорганізмами, розроблення методів виділення й очищення еластаз, а також дослідження їхніх фізико-хімічних і каталітичних властивостей є актуальними і мають великі перспективи теоретичного й практичного застосування у біотехнологічних процесах.

больных с травматическим повреждением спинного мозга // Биомед. журн. — 2004. — №5. — С. 109–110.

3. Кубышкин А. В., Фомочкина И. И. Эластолитическая активность бронхоальвеолярного лаважа при моделировании воспалительного процесса в легких // Укр. біохім. журн. — 2008. — Т. 80, №1. — С. 89–95.

4. Пат. RU 2229711 C2, 7 G01N33/48. Способ определения функции щитовидной железы при аутоиммунном тиреоидите / Щербанова Э. Г., Рустембекова С. А. — Опубл. 27.05.2004.
5. Rao M. B., Tanskale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1998. — V. 62, N3. — P. 597–635.
6. Буров А. А. Иммуобилизованная эластогепаза в комплексном лечении острых гнойно-некротических процессов мягких тканей у работников морского транспорта (клинико-эксперимент. исследование): Дис. ... канд. мед. наук: 14.00.32 / Одес. мед. ин-т им. Н. И. Пирогова. — Одесса, 1993. — 204 с.
7. Абаев Ю. К. Раневые повязки в хирургии // Мед. новости. — 2003. — №12. — С. 30–37.
8. Bieth J. G. Les elastases // J. Soc. Biol. — 2001. — V. 195, N2. — С. 143–150.
9. Hase C. C., Finkelstein A. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1993. — V. 57, N4. — P. 823–837.
10. Bode W., Meyer E., Powers J. C. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors // Biochemistry. — 1989. — V. 28. — P. 1951–1963.
11. Schmidtchen A., Holst E., Tapper H., Bjorck L. Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth // — 2003. — V. 34, N1. — P. 47–55.
12. Garcia D., Timenetsky J., Martinez M. et al. Proteases (caseinase and elastase), hemolysins, adhesion and susceptibility to antimicrobials of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates obtained from clinical specimens // Braz. J. Microbiol. — 2002. — V. 33, N2. — P. 157–162.
13. Morihara K. Pseudolysin and other pathogen endopeptidases of thermolysin family // Meth. Enzymol. — 1995. — V. 248. — P. 242–253.
14. Kessler E. β -lytic endopeptidases // Ibid. — 1995. — V. 248. — P. 740–756.
15. Elliott Jr. B., Cohen C. Isolation and characterization of a lysine-specific protease from *Pseudomonas aeruginosa* // J. Biol. Chem. — 1986. — V. 261, N24. — P. 11259–11265.
16. Kessler E., Safrin M., Olson J.C. et al. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease // Ibid. — 1993. — V. 268, N10. — P. 7503–7508.
17. Stehling E. G., Silveira W. D., Leite D. S. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections // Braz. J. Infect. Dis. — 2008. — V. 12, N1. — P. 86–88.
18. Jellouli K., Bayoudh A., Manni L. et al. Purification, biochemical and molecular characterization of a metalloprotease from *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on shrimp wastes // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 79, N6. — P. 989–999.
19. Thayer M. M., Flaherty K. M., McKay D. B. Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5- Å resolution // J. Biol. Chem. — 1992. — V. 266. — P. 2864–2871.
20. Galloway D. R. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments // Mol. Microbiol. — 1991. — V. 5, №10. — P. 2315–2321.
21. Kessler E., Safrin M., Gustin J. K., Ohma D. E. Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides // J. Biol. Chem. — 1998. — V. 273, N46. — P. 30225–30231.
22. Kamath S., Kapatral V., Chakrabarty A. M. Cellular function of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis // Mol. Microbiol. — 1998. — V. 30, N5. — P. 933–941.
23. Buckmaster M. J., Curci J. A., Murray P. R. et al. Source of elastin-degrading enzymes in mycotic aortic aneurysms: bacteria or host inflammatory response // Cardiovasc. Surg. — 1999. — V. 7, N1. — P. 16–26.
24. Lafisca A., Pereira C. S., Giaccone V., Rodrigues D. P. Enzymatic characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from bivalves harvested at Venice Lagoon (Italy) and Guanabara Bay (Brazil) // Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo. — 2008. — V. 50, N4. — P. 199–202.
25. Еляков Г. Б., Стоник В. А., Кузнецова Т. А., Михайлов В. В. Морская биохимия и биотехнология: достижения и перспективы // Вестн. РАН. — 1993. — Т. 63, № 9. — С. 797–802.
26. Ying X. U., Guo-Qing H. E. Effective extraction of elastase from *Bacillus* sp. fermentation broth using aqueous two-phase system // J. Zhejiang University-Sci. B. — 2005. — V. 6, N11. — P. 1087–1094.
27. Chen O., Ruan H., Zhang H. et al. Enhanced production of elastase by *Bacillus licheniformis* ZJU-EL31410: optimization of cultivation conditions using response surface methodology // Ibid. — 2007. — V. 8, N11. — P. 845–852.
28. He G. Q., Chen Q. H., Zhang L., Liu X. J. Influence of medium components on elastase production using crude sources by *Bacillus* sp. EL31410 // Ibid. — 2003. — V. 4, N2. — P. 142–151.

29. Chen O., Wang J. Acid shock of elastase-producing *Bacillus licheniformis* ZJUJEL31410 and its elastase characterization evaluation // J. Food Engen. — 2007. — V. 80, N2. — P. 490–496.
30. Xiao C., Lu J., Tian X. et al. Fermentation conditions for production of alkaline elastase by alkaliphilic *Bacillus* XE22-4-1 // Wei. Sheng. Wu. Xue Bao. — 2001. — V. 41, N5. — P. 611–616.
31. Tsai Y.C., Yamasaki M., Yamamoto-Suzuki Y., Tamura G. A new alkaline elastase of an alkalophilic bacillus // Biochem. Int. — 1983. — V. 7, N5. — P. 577–583.
32. Шубчинська А. С., Варбанець Л. Д., Назорна С. С., Сафронова Л. А. Скринінг мікроорганізмів — продуцентів протеаз // Мікробіол. журн. — 2008. — Т. 70, №1. — С. 3–9.
33. Левішко А. С., Мацелюх О. В., Варбанець Л. Д. Очистка та фізико-хімічні властивості про-теолітичного комплексу *Bacillus* sp. // Там само. — 2009. — Т. 71, №1. — С. 6–15.
34. Sweeney P.J., Walker J.M. Pronase (EC 3.4.24.4) // Meth. Mol. Biol. — 1993. — V. 16. — P. 271–276.
35. Georeva V., Vlahov S. Optimized growth medium for elastase synthesis by strain *Streptomyces* sp. 82 // World J. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — V. 17, N5. — P. 443–445.
36. Іванко О. В. Колагеназа і кератиназа стрептоміцетів : Автореф. ... дис. канд. біол. наук. — К., 2003. — 20 с.
37. Alvarez-Perez S., Garcia M. E., Bouza E. et al. Characterization of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* from patients: genotype, mating type and invasiveness // Med. Mycol. — 2008. — V. 16. — P. 1–8.
38. Alp S., Arikan S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus species* // J. Basic. Microbiol. — 2008. — V. 48, N5. — P. 331–337.
39. Mulimani V. H., Patil G. N. Production of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation // Ind. J. Exp. Biol. — 1999. — V. 37, N12. — P. 1248–1250.
40. Hoffmann N., Song Z., Estrup J. P. et al. Polymorphonuclear leucocytes are suppressed by quorum sensing in a CF. Mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection // J. Cyst. Fibros. — 2005. — V. 4, N46. — P. 170.
41. Gibson R. L., Burns J., Ramsey B. Pathophysiology and management of pulmonary infections in CF // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2003. — V. 167. — P. 918–951.
42. Zulianello L., Lacroix J. S., Meda P. Rhamnolipids: essential virulence factors for early invasion of primary human airway epithelia by *Pseudomonas* // J. Cyst. Fibros. — 2005. — V. 4, N47. — P. 173.
43. Delden C., Iglewski B. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections // Emerg. Infect. Dis. — 1998. — V. 4, N47. — P. 551–560.
44. Podbielski A., Kreikemeyer B. Cell density, dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci // Int. J. Infect. Dis. — 2004. — V. 8. — P. 81–95.
45. Braun P., de Groot A., Bitter W., Tommassen J. Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. — 1998. — V. 180, N13. — P. 3467–3469.
46. Holder I. A., Haidaris C. G. Experimental studies of the pathogenesis of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: extracellular protease and elastase as in vivo virulence factors // Can. J. Microbiol. — 1979. — V. 25, N5. — P. 593–599.
47. Heck L. W., Alarcon P. G., Kulhavy R. M. et al. Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas Aeruginosa* elastase // J. Immunol. — 1990. — V. 144, N6. — P. 2253–2257.
48. Meyer E., Cole G., Radhakrishnan R., Epp O. Structure of native porcine pancreatic elastase at 1.65 Å resolutions // Acta Crystallogr. B. — 1988. — V. 44, N1. — P. 26–38.

**ЭЛАСТОЛИТИЧЕСКИЕ ЭНЗИМЫ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

*Е. В. Мацелюх
Н. А. Нидялкова
Л. Д. Варбанец*

Институт микробиологии и вирусологии
НАН Украины, Киев

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Эластолитические энзимы используют в промышленности и медицине для гидролиза эластина — природного нерастворимого фибриллярного протеина, являющегося компонентом соединительной ткани большинства позвоночных животных. Описанные в литературе эластолитические энзимы отличаются между собой по субстратной специфичности и каталитическим механизмам. В работе обобщены данные, касающиеся способности расщеплять эластин энзимами, выделенными из разных групп микроорганизмов — бактерий, актиномицетов и микроскопических грибов. Рассмотрены некоторые физико-химические свойства препаратов эластолитических энзимов, а также их роль в патогенности *Pseudomonas aeruginosa*.

Ключевые слова: эластолитические энзимы микроорганизмов, эластаза, las-система межклеточных взаимоотношений.

MICROBIAL ELASTOLYTIC ENZYMES

*O. V. Matselyukh
N. A. Nidyalkova
L. D. Varbanets*

Institute of Microbiology and Virology
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Elastase is an enzyme out of the proteases class breaking down fiber that determines the mechanical properties of connective tissue. Elastases differ against each other according to their substrate specificity and catalytic properties. The information concerning ability to degrade elastin by enzymes extracted from various groups of microorganisms such as bacteria, actinomycetes and fungi are summarized in the article. The physical and chemical properties of elastase preparation have been examined. It has been considered the role of elastases in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity.

Key words: microbial elastolytic enzymes, elastase, las cell-to-cell signaling system.