

УДК 577.15

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОЛИЗА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ КОМПЛЕКСОМ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА МЕТОДОМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ**Т.И. Пономарева¹, Д.А. Слядовский¹, М.А. Тимченко¹, М.В. Молчанов², Е.А. Согорин¹**¹ Пуцинский научный центр биологических исследований РАН, Пуцзино, Россия² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцзино, Россия

Гиалуроновая кислота (ГК) является главным компонентом синовиальной жидкости и внеклеточного матрикса и участвует в процессах пролиферации, дифференциации и миграции клеток [1]. ГК также вовлечена в прогрессирование злокачественных опухолей. ГК – природный полимер, в водном окружении ГК имеет сложную вторичную и третичную структуру. Разработаны многочисленные подходы химической модификации ГК, что послужило появлению ряда форм препаратов, успешно используемых в медицине.

Цель работы – исследование способности комплекса ферментов из гомогената гепатопанкреаса камчатского краба, гидролизовать нативную ГК. Кинетика гидролиза была исследована методом ЯМР – спектроскопии.

В качестве субстрата использовалась ГК из гребня петуха (Sigma Aldrich). Гомогенат гепатопанкреаса камчатского краба (ГПК) выделяли и очищали согласно ранее разработанной нами методике [2]. Анализ кинетики гидролиза ГК под действием ГПК проводили методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения на ЯМР – спектрометре Bruker 600 AVANCE III (Bruker BioSpin, Германия). К раствору ГК, предварительно инкубированному в кислом фосфатном буфере pH 5.5 в присутствии 5 % D₂O при 37°C в течение часа, добавляли очищенный комплекс ГПК (соотношение ГК по массе к тотальному белку ГПК=20:1) и помещали в ЯМР-ампулу. Измерения проводили при 37°C, спектры регистрировались через определенные промежутки времени в течение 4 дней. Расщепление ГК фиксировали по изменению в сигналах протонов ацетильной группы N-ацетил-D-глюкозамина ГК. Протоны ацетильной группы ГК в свободном состоянии в спектре ЯМР дают симметричный узкий сигнал, тогда как протоны той же ацетильной группы ГК, но входящей в ассоциаты, дают широкий сигнал несимметричной формы и смещённый в сильное поле (вправо) по оси химического сдвига на 0,04 м.д. Расчёт концентрации ГК проводили относительно известной концентрации добавленного маркера TSP и для ГК, в пересчёте на её дисахарид глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Анализ полученных результатов показал, что максимальная скорость реакции достигается в первые часы инкубации. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что гомогенат гепатопанкреаса камчатского краба проявляет высокую гиалуронидазную активность. Впервые в данной работе мы продемонстрировали перспективы использования гепатопанкреаса камчатского краба для получения препарата ГД, что может послужить основой для создания новых терапевтических средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dicker, K.T., Gurski, L.A., Pradhan-Bhatt, S., Witt, R.L., Farach-Carson, M.C., Jia, X. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions, *Acta Biomater*, 2014 Apr; 10(4):1558–70, doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.019
2. Ponomareva, T., Sliadovskii, D., Timchenko, M., Molchanov, M., Timchenko, A., Sogorin, E. The effect of hepatopancreas homogenate of the Red king crab on HA-based filler. *PeerJ*. 2020 Feb 12; 8:e8579. doi: 10.7717/peerj.8579. eCollection 2020