

ГИАЛУРОНИДАЗЫ ДЕСЯТИНОГИХ РАКООБРАЗНЫХ: ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ

Т.И. Пономарёва, М.А. Тимченко, К.А. Бочарова, Е.А. Согорин

Пуцинский научный центр биологических исследований РАН, Пуцзино, Россия

Гиалуроновая кислота – высокомолекулярный отрицательно заряженный полимер, гликозаминогликан, состоящий из повторяющихся дисахаридных звеньев (D-глюкуроновая кислота и N-ацетил-D-глюкозамин) связанных между собой β-1,4 и β-1,3 гликозидными связями (Рис. 1). В зависимости от источника гиалуроновой кислоты дисахаридные звенья могут повторяться 2 000–25 000 раз (до 10⁶–10⁷ Да). Гиалуроновая кислота является главным компонентом синовиальной жидкости и внеклеточного матрикса, регулирует водный баланс, а также участвует в пролиферации, дифференциации и миграции клеток.

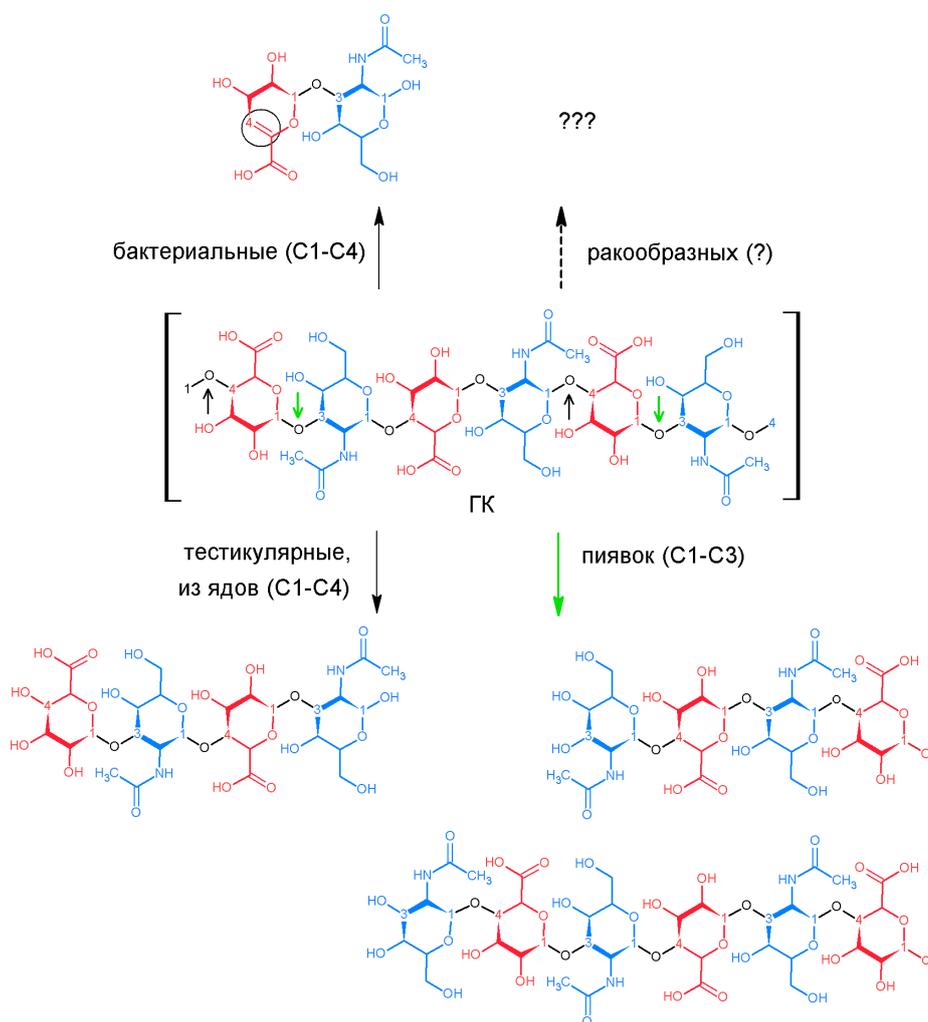


Рисунок 1: Структура гиалуроновой кислоты и основные продукты реакции её гидролиза гиалуронидазами из разных источников

Гиалуронидазы – группа ферментов, способных расщеплять гиалуроновую кислоту [1, 2]. Большинство из них способны также расщеплять хондроитин и (или) хондроитин сульфат. Гиалуронидазы человека и некоторых животных уже хорошо описаны как с точки зрения структурных особенностей, так и с точки зрения биохимических свойств (Рис. 1).

Препараты, где в качестве активного вещества используется фермент или группа ферментов, обладающих гиалуронидазной активностью, успешно применяют в медицине для лечения заболеваний, сопровождающихся воспалением и активным ростом соединительной ткани. Препараты гиалуронидаз улучшают трофику и проницаемость тканей, повышают эластичность рубцовой ткани, облегчают движение жидкости в межтканевом пространстве и др. Не менее популярна гиалуронидаза в косметологии. Часто ее используют для устранения негативных эффектов после инъекций гиалуроновой кислоты. В офтальмологии в течение многих лет гиалуронидаза комбинируется с местными анестетиками, оказывая синергетический эффект [3], и в настоящее время внедряется в хирургию, включая дерматохирургию. Также была показана перспектива использования гиалуронидазы в лечении легочного фиброза у модельных животных (мыши), а в частности, идиопатического фиброза [4]. Большинство препаратов гиалуронидаз имеют в своей основе гиалуронидазы из тканей семенников быка или барана. Относительно высокая концентрация этих ферментов в семенниках связана с участием этих ферментов в процессе оплодотворения. Коммерческие препараты гиалуронидаз включают гиалуронидазу из семенников КРС (например, «Лидаза», «Ронидаза», «Лонгидаза»), овечьих семенников (например, препарат «Vitraxe»), рекомбинантную человеческую гиалуронидазу, получаемую на основе генно-модифицированных клеток яичника китайского хомячка [5]. Однако существуют риски использования гиалуронидаз из тканей млекопитающих. Прионные белки животного, больного губчатой энцефалопатией, могут стать причиной развития болезни Крейтцфельда-Якоба у человека. Несмотря на то, что на данный момент не описано ни одного случая такого пути заражения через препараты гиалуронидазы, государственные регуляторы многих стран запрещают ввоз и продажу данных препаратов на своей территории. Альтернативным безопасным источником гиалуронидаз является пищеварительный орган ракообразных – гепатопанкреас, который зачастую является отходом переработки животных организмов морского промысла. На данный момент структура гиалуронидаз ракообразных мало изучена. В открытой базе данных последовательностей белков UniProt можно обнаружить несколько представителей, у которых описана аминокислотная последовательность гиалуронидаз: из отряда Десятиногих (Decapoda) это Белоногая креветка (*Litopenaeus vannamei*, UniProt A0A423SH46) и Оранжевый ильный краб (*Scylla olivacea*, два белка UniProt A0A0P4VWV1 и A0A0N7ZAX3), а также два представителя отряда Равноногих (Isopoda): мокриц *Armadillidium vulgare* (UniProt A0A444ST78) и *Armadillidium nasatum* (UniProt A0A5N5TJL6). Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал наличие непродолжительных участков гомологии, что свидетельствует о высокой неоднородности первичной структуры гиалуронидаз ракообразных (Рис. 2).

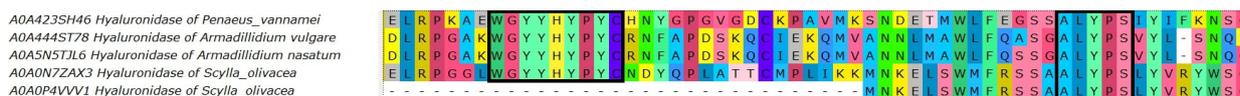


Рисунок 2: Результаты анализа аминокислотной последовательности гиалуронидаз некоторых представителей класса Высшие раки

Сведения о биохимических свойствах гиалуронидаз ракообразных немногочисленны. Гиалуронидаза лангуста *Nephrops norvegicus* также, как и бактериальные гиалуронидазы, не гидролизует хондроитина сульфат (А, В, С типы), в присутствии ЭДТА её активность растет (на 25 %), наличие 120 мМ NaCl в реакционной смеси и температура 45 °С, рН, как и для многих гиалуронидаз, равный 5,4 – оптимальные условия прохождения реакции [6]. По результатам нативной гель-фильтрации молекулярная масса гиалуронидазы равна 320 кДа. Хондроитина сульфат В и цистеин полностью ингибируют активность фермента. По результатам гель-фильтрации в нативных условиях гиалуронидаза Антарктического криля *Euphausia superba* имеет молекулярную массу 80 кДа, оптимальный рН – 5,3, оптимальную температуру – 37 °С [7]. Механизм реакции гидролиза гиалуроновой кислоты гиалуронидазами лангуста или криля до сих пор неизвестен.

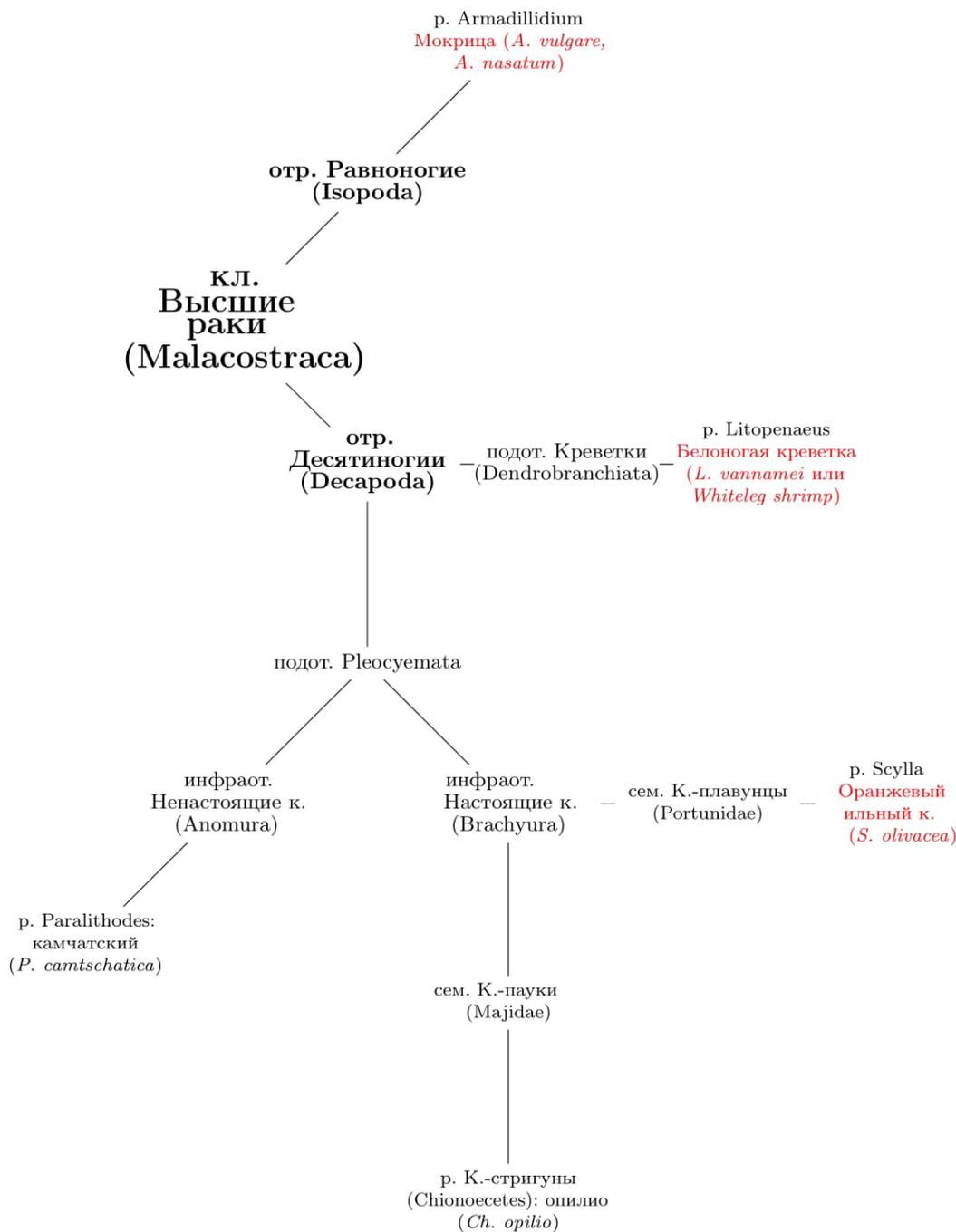


Рисунок 3: Филогения некоторых представителей класса Настоящих раков. Красным выделены виды, для которых известны первичные структуры гиалуронидаз. ("К." – сокращенное "крабы".)

В недавней нашей работе впервые исследована кинетика гидролиза нативной гиалуроновой кислоты и косметических филлеров гомогенатом гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* [8]. С помощью методов турбидиметрического анализа, атомно-силовой микроскопии и спектроскопии ядерно-магнитного резонанса была исследована кинетика гидролиза и структурная трансформация гиалуроновой кислоты под действием ферментов гомогената. Было показано, что полученный гомогенат имеет сравнимую с коммерчески доступными препаратами гиалуронидаз активность, что, в дальнейшем, позволит разработать на его основе ферментный препарат для использования его в медицине.

Промысловые виды крабов включают в себя представителей инфраотряда Ненастоящих (Anomura) и Настоящих крабов (Brachyura) подотряда Pleosuemata, в который входит коммерчески значимый объект – краб-стригун опилио (*Chionoecetes opilio*) (Рис. 3). В России каждый год вылавливается более 10 000 тонн камчатского краба [9]. Данные организации The Food and Agriculture Organization (FAO) указывают, что мировой объём вылова краба-стригуна составляет более 100 000 тонн [10]. Крабы этого подотряда имеют схожую по ферментативной активности пищеварительную систему. Гепатопанкреас крабов зачастую является отходом переработки, поэтому является доступным сырьем. Препараты гиалуронидаз ракообразных из гомогената гепатопанкреаса имеют большие шансы на коммерческий успех и смогут выйти на рынок с большими производственными возможностями. К настоящему времени разработаны технологии получения гиалуронидазы из ракообразных и отходов их переработки (ротоногие, креветки, омары и крабы) [11, 12]. Подобраны условия гомогенизации гепатопанкреаса креветок с максимальным выходом гиалуронидазной активности [13].

Масштабируемую технологию получения препарата необходимой чистоты с высокой гиалуронидазной активностью из гепатопанкреаса камчатского краба так же, как и изучение его эффективности на модельных животных, предстоит разработать и провести в ближайшем будущем. Этот препарат займет достойное место в арсенале лекарственных средств для лечения осложнений, возникающих после введения филлеров на основе гиалуроновой кислоты, а также позволит на его основе создать терапевтические агенты для лечения фиброза лёгких, возникающего в результате перенесенного COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Stern, R., Jedrzejewski, M.J. «Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action». *Chemical reviews* 106.3 (2006), 818–839.
- [2] Girish, K., Kemparaju, K. «The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview». *Life sciences* 80.21 (2007), 1921–1943.
- [3] Moharib, M.M., Mitra, S. «Alkalinized lidocaine and bupivacaine with hyaluronidase for sub-Tenon's ophthalmic block». *Regional anesthesia and pain medicine* 25.5 (2000), 514–517.
- [4] Silva Bitencourt, C. da, Gelfuso, G.M., Pereira, P.A.T., Assis, P.A. de, Tef'e-Silva, C., Ramos, S.G., Arantes, E.C., Faccioli, L.H. «Hyaluronidase-loaded PLGA microparticles as a new strategy for the treatment of pulmonary fibrosis». *Tissue Engineering Part A* 21.1–2 (2015), 246–256.
- [5] Yocum, R.C., Kennard, D., Heiner, L.S. «Assessment and implication of the allergic sensitivity to a single dose of recombinant human hyaluronidase injection: a double-blind, placebo-controlled clinical trial». *Journal of Infusion Nursing* 30.5 (2007), 293–299.
- [6] Krishnapillai, A.M., Taylor, K.A., Morris, A.E., Quantick, P.C. «Characterisation of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) hyaluronidase and comparison with sheep and bovine testicular hyaluronidase». *Food chemistry* 65.4 (1999), 515–521.
- [7] Karlstam, B., Ljunglöf, A. «Purification and partial characterization of a novel hyaluronic acid-degrading enzyme from Antarctic krill (*Euphausia superba*)». *Polar Biology* 11.7 (1991), 501–507 [8] 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* 8 (2020), e8579.
- [9] Food, T., (FAO), A.O. Fishery and Aquaculture Statistics: B-44. 2017. url: http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2017_USBcard/navigation/index_content_capture_e.htm (visited on 05/05/2020).
- [10] Food, T., (FAO), A.O. Fishery and Aquaculture Statistics: B-42. 2017. url: http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2017_USBcard/navigation/index_content_capture_e.htm (visited on 05/05/2020).
- [11] Олсен, Р. «Способ получения биологически активных компонентов». SU 1 838 406 A3. 1989.
- [12] Ashok, M.K. «Extraction and purification of hyaluronidase from crustacean waste». EP 0894090 A1. 1996.
- [13] Rosario, S., Nooralabettu, K. «Effective disruption method of shrimp hepatopancreatic tissues to release hyaluronidase». *International Journal of Scientific & Engineering Research* 9.3 (2018), 336–341.