



УДК 577.152.342.2.02

**БРАХИУРИНЫ – СЕРИНОВЫЕ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИЕ
ФЕРМЕНТЫ КРАБОВ**

© 2003 г. Г. Н. Руденская

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119899, Москва,
ГСП-3, В-234, Воробьевы горы, МГУ*

Поступила в редакцию 21.09.2001 г. Принята к печати 25.03.2002 г.

Рассмотрены свойства нового подсемейства химотрипсиноподобных протеиназ – брахиуринов. Эти протеолитические ферменты, обнаруженные у различных видов ракообразных, проявляют смешанную субстратную специфичность и заметную коллагенолитическую активность. Подробно описываются ферментативные и физико-химические свойства брахиуринов I и их первичные и просторанственные структуры. Отдельная глава посвящена препаратам коллагеназ из гепатопанкреаса камчатского краба, их действию на поврежденные кожные покровы и применению в медицине.

Ключевые слова: брахиурины; коллагенолитические ферменты крабов, свойства, применение в медицине.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

1. Энзиматические свойства брахиуринов
 2. Структура брахиуринов
 3. Применение коллагенолитических ферментов крабов в медицинских целях
- Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Коллагены представляют собой группу родственных белков, обладающих очень высокой прочностью. Они составляют основу волокнистой структуры кожи, костей, сухожилий, хряща, кровеносных сосудов и зубов. Основная макроструктурная единица коллагена – тропоколлаген, состоящий из трех спирально скрученных тяжей, каждый из которых включает 1000 аминокислотных остатков, в основном представленных глицином, пролином, гидроксипролином, лизином. Цепи тропоколлагена образуются с помощью водородных связей, а также поперечных ковалентных сшивок за счет ϵ -NH₂-групп лизина. На первом этапе происходит превращение ϵ -аминогрупп лизина в альдегидные под действием лизилоксидазы. Далее два альдегида вступают в реакцию альдольно-кетоновой конденсации. Альдольная двойная связь может превращаться в результате взаимодействия с боковой цепью гистидина в гистидин-альдольную связь, альдегидная группа которой способна давать шиффово основание с боковой

цепью другой аминокислоты, например, гидроксизина [1]. В результате возможно ковалентное связывание четырех боковых цепей аминокислотных остатков из разных молекул, составляющих тропоколлаген, друг с другом, поэтому коллаген проявляет высокую степень устойчивости к действию протеолитических ферментов. Однако среди последних известны, так называемые “коллагеназы”, которые способны разрушать нативный коллаген при низких температурах. При температурах выше 25°C тропоколлаген начинает терять спирализованную структуру и превращается в желатин – белок, гидролизующийся большим количеством эндопептидаз. Поэтому все эксперименты по определению истинной коллагенолитической активности проводятся при 20–30°C (в зависимости от источника коллагена).

В настоящее время известны два типа коллагеназ. Коллагеназы первого типа синтезируются некоторыми микроорганизмами. Так, *Clostridium histolyticum* (бактерия, вызывающая газовую гангрену) продуцирует коллагеназу, расщепляющую полипептидную цепь коллагена более чем в 200 участках. Фермент гидролизует связь –Хаа–Gly–Pro–Yaa–. Эта коллагеназа, разрушающая соединительно-тканые барьеры организмамишени, способствует проникновению в него высокопатогенного клостридия. Второй тип – это тканевые металлоколлагеназы, которые обнаруживаются у земноводных и млекопитающих в растущих или подвергающихся метаморфозу тканях, в том числе и при метастазировании опухолей. Например, коллагеназа головастика расщепляет тропоколлаген, как бы делая срез через все три цепи в единственном месте – перед глицином-750

Сокращение: pNA – *n*-нитроанилид.

Эл. почта: laboratoriahps@hotmail.com; факс: (095) 939-31-81; тел.: (095) 939-55-41.

Таблица 1. Свойства коллагенолитических сериновых протеиназ беспозвоночных

Протеиназа	Источник	pH оптимум	Температурный оптимум, °С	pI	M, кДа	K _m , mM	k _{cat} , с ⁻¹
Протеиназа PC [15]	Камчатский краб	7.5	47–55	3.0	29	0.8*	67*
Протеиназа 28 кДа [48]	Краб стригун	7.5	37	<3.0	28		
Протеиназа 36 кДа [48]	То же	7.5	37	<3.0	36		
Протеиназа С [14]	Камчатский краб	7.5–9.0	55	2.5	24	1.1	14
Протеиназа II 25 кДа [48]	То же	7.5	37	–	25	0.2	
Коллагеназа I [6]	Манящий краб	8.0–8.5	–	3.0	22.6	1.1	1.09
Химотрипсин Pm1 [19]	Креветка	7.6	–	3.2	27–28	0.8	27
Химотрипсин Pm2 [19]	То же	7.6	–	3.0	25–26	0.21	41
Химотрипсин С [28]	Свинья	7.8	–	4.1	23.8	17.0	46

Субстрат для всех протеиназ (кроме протеиназы PC) – этиловый эфир бензонлтирозина (BTEE); * субстрат Glp-Phe-Ala-pNA.

последовательности из 1000 а.о. Два фрагмента, составляющие соответственно 1/4 и 3/4 исходной цепи, при температуре тела спонтанно разворачиваются и становятся доступными действию других протеолитических ферментов [1, 2].

Особое положение занимают коллагенолитические протеиназы крабов, раков и креветок (отряд десятиногие (Decapoda), класс ракообразные (Crustacea), тип членистоногие (Arthropoda)). Коллагеназы являются пищеварительными ферментами этих беспозвоночных и их изучение интересно в эволюционном аспекте. В настоящее время коллагеназы крабов (Decapoda) выделяют в особую подгруппу химотрипсиноподобных сериновых протеиназ по классификации NC-IUBMB – КФ 3.4.21.32; по новой классификации MEROPS – клан SA, семейство S1, ID: S01.122 [3]. Общее название коллагенолитических протеиназ крабов – брахиурины. Этот термин был рекомендован NC-IUBMB в 1992 г. для особого типа сериновых эндопептидаз, которые были найдены у крабов и родственных им организмов из отряда Decapoda. Наименование производное от брахиура – филогенетической подгруппы “истинных” крабов, общего источника этих ферментов. Однако теперь стало ясно, что брахиурины – это очень неоднородная группа ферментов, которая нуждается в дальнейшей классификации. В настоящее время выделяются три типа сериновых протеиназ крабов – брахиурины Ia с широкой специфичностью, сходной со специфичностью химотрипсина, трипсина, эластазы и коллагенолитической активностью; Ib – с широкой специфичностью, но с пониженной активностью по субстратам трипсина, и брахиурины II – трипсиноподобные протеиназы.

Брахиурины были впервые открыты в 60-х годах прошлого столетия [4, 5]. Семейство включает коллагеназу I из манящего краба *Uca pugnator* [6], трипсин рака [7], трипсин креветки [8]. Кроме того, другие сериновые протеиназы этого семей-

ства были изолированы из криля [9], крабов [10–15], рака [16], креветки [17–21] и омара [22]. Сравнительный структурно-функциональный анализ показывает, что эти ферменты близкородственны, но отличаются от сериновых протеиназ позвоночных и микроорганизмов [23–25]. Биологическая роль брахиуринов заключается в первичном переваривании пищи. Эти ферменты секретируются гепатопанкреасом – органом, совмещающим функции печени и поджелудочной железы в пищеварительном тракте Decapoda. Уникальная способность гидролизовать коллаген характерна для многих вышеупомянутых протеиназ, что отражает особенности питания организмов отряда Decapoda. Например, манящий краб *U. pugnator* занимает экологическую нишу мусорщика, подбирая останки морских организмов в зоне отлива на западном побережье США [26, 27]. Диета краба включает кожу и мышечную ткань рыб, моллюсков и червей. Эти источники содержат большие количества коллагена. Таким образом, можно предположить, что пищеварительные ферменты крабов приспособлены к деградации коллагена – белка, необычайно устойчивого к действию классических протеиназ [2].

В настоящем обзоре мы ограничимся рассмотрением свойств брахиуринов Ia и Ib типов, яркими представителями которых являются коллагеназа I из гепатопанкреаса манящего краба *U. pugnator* [6] и коллагенолитическая сериновая протеиназа PC из королевского камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* [15].

1. ЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БРАХИУРИНОВ

В табл. 1 представлены основные энзиматические и молекулярные свойства брахиуринов I (для сравнения приведены соответствующие данные для химотрипсина С свиньи). Оптимумы pH фер-

Таблица 2. Субстратная специфичность коллагенолитической протеиназы РС камчатского краба [15]

Номер субстрата	Субстрат	Содержание DMF в буфере, %	Относительная активность, %
(1)	Glp-Phe-Ala-pNA	2	100
(2)	Glp-Phe-Leu-pNA	2	4.5
(3)	Glp-Phe-pNA	20	0
(4)	Boc-Ala-pNA	20	0
(5)	Bz-Arg-pNA	8	2.5
(6)	H-Leu-Ala-Ala-pNA	2	0
(7)	Glp-Ala-Ala-Leu-pNA	2	23.4
(8)	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	20	2.2
(9)	Z-Ala-Ala-Phe-pNA	20	4.4
(10)	Z-Ala-Ala-Glu-pNA	2	6.2
(11)	Z-Ala-Ala-Ala-pNA	20	0
(12)	Z-Ala-Ala-Pro-pNA	20	0
(13)	Z-Gly-Ala-Phe-pNA	20	11.5
(14)	Z-Gly-Ala-Leu-pNA	20	5.6
(15)	D-Ala-Ala-Arg-pNA	2	48.2
(16)	D-Val-Leu-Lys-pNA	2	34.4
(17)	D-Ala-Ala-Phe-Arg-pNA	2	154.8
(18)	Boc-Phe-Pro-Gln-Ile-pNA	20	0

ментов находятся в слабощелочной области. Температурные оптимумы лежат в пределах 37–55°C. Изоэлектрические точки имеют аномально низкие для сериновых протеиназ значения и сопоставимы с изоэлектрическими точками пепсинов млекопитающих. В то же время наибольшая стабильность у брахиуринов наблюдается при pH 4.5–8.5 в присутствии ионов кальция, а при pH < 3.5 ферменты полностью теряют активность [6, 15]. Молекулярные массы коллагенолитических сериновых протеиназ беспозвоночных близки и находятся в пределах 25–36 кДа (табл. 1).

Коллагенолитические протеиназы крабов обладают широкой специфичностью по отношению к пептидным субстратам. Как видно из табл. 2, наилучшими из исследованных субстратов протеиназы РС оказались 2–4-членные пептиды, не требующие для растворения большого количества органических растворителей. Увеличение концентрации диметилформамида в 10 раз на порядок снижает активность фермента по отношению к субстратам (7), (8) с близкой структурой, поэтому правомерно сравнение результатов гидролиза только при одинаковых концентрациях этого растворителя. Данные для субстратов (1), (7), (16) и (17) свидетельствуют о том, что наиболее предпочтительными в положении P1 субстрата оказались остатки Ala, Leu, Lys и Arg. В то же время замена Leu в субстратах (8) и (14) на Phe с образованием Z-Ala-Ala-Phe-pNA (9) и Z-Gly-Ala-Phe-pNA (13)

приводит к увеличению скорости гидролиза вдвое. Z-Ala-Ala-Ala-pNA ((11) – субстрат эластазы), Z-Ala-Ala-Pro-pNA (12), Boc-Phe-Pro-Gln-Ile-pNA (18) и H-Leu-Ala-Ala-pNA (6) не гидролизуются вовсе, впрочем, связывание последнего субстрата может быть затруднено из-за наличия заряженной N-концевой аминокислоты. Короткие субстраты (3), (4), (5) – производные аминокислот, специфичные для химотрипсина, эластазы и трипсина, по-видимому, слишком малы для протеиназы РС; скорость расщепления протяженных субстратов гораздо выше.

Похожие закономерности отмечаются и для коллагеназы I *U. pugilator* (рис. 1). Фермент проявляет выраженную специфичность к Arg и Lys в положении P1 и обладает меньшим сродством к гидрофобным остаткам; связи, образованные остатками D-Ala, Pro, Asp, Glu не расщепляются вовсе [25]. Эта протеиназа также предпочитает 3–4-членные субстраты (k_{cat} при гидролизе Bz-Arg-pNA в 150 раз ниже, чем при гидролизе Bz-Val-Gly-Arg-pNA [6]).

В окисленной цепи инсулина (рис. 2) брахиурины Ia и Ib гидролизуют связи, обычно отвечающие специфичности химотрипсинов, однако вместе с тем расщепляется связь Arg22–Gly23, характерная для трипсинов. Протеиназа РС камчатского краба интенсивно расщепляет белковые субстраты – азоказеин и фибрин [15].

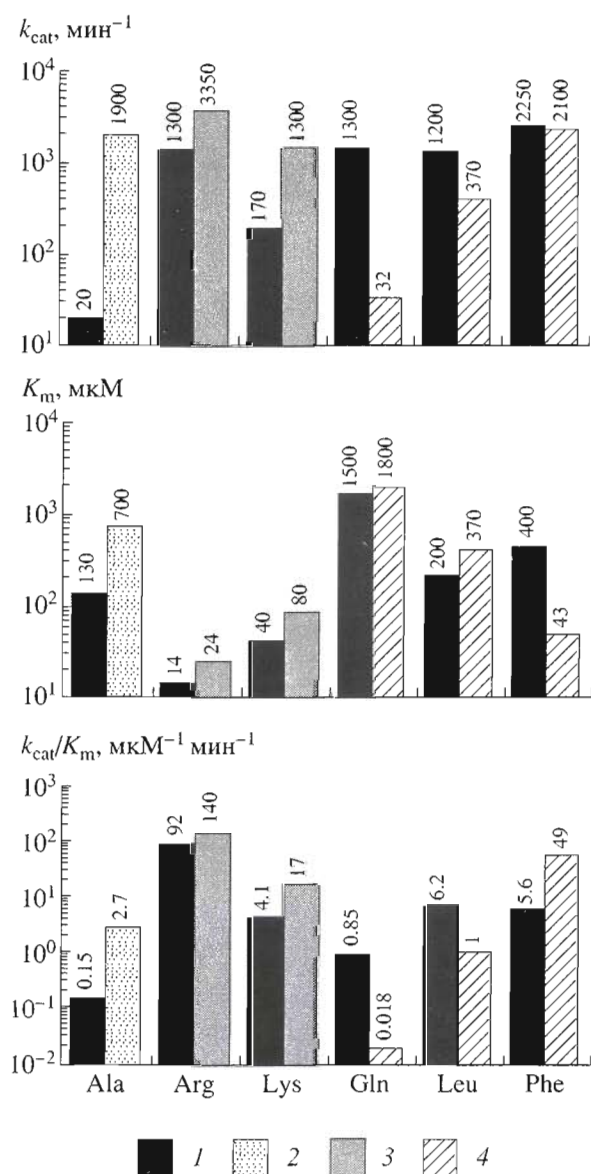


Рис. 1. Кинетические константы гидролиза Suc(Voc)-Ala-Ala-Pro-Xaa-pNA, где Xaa – Ala, Arg, Lys, Gln, Leu, Phe, коллагеназой I манящего краба (1), эластазой свиньи (2), трипсином крысы (3) и бычьим химотрипсином (4) (по данным работы [25]).

связям глицина сразу в 200 сайтах, не разделяется на быструю и медленную стадии. Вязкость раствора в присутствии кластридиопептидазы снижается до 20% за 10 мин [15]. Электрофоретическое изучение продуктов гидролиза коллагена протеиназой PC (рис. 3б) показало, что при этом исчезают γ -компонент и оба β -компонента нативного коллагена – тримеры и димеры α -цепей соответственно. При этом происходит значительное возрастание количества свободных α -цепей и появляются высокомолекулярные продукты гидролиза α -цепей. Под действием кластридиопептидазы одновременно уменьшается количество α -цепей, а также β - и γ -компонентов.

Начальное расщепление коллагена брахиуринами Ia и Ib на фрагменты в соотношении 3/4 : 1/4 сходно с действием коллагеназ позвоночных [2, 29]. Такой тип расщепления демонстрируют “истинные” коллагеназы, в отличие от неспецифической деградации коллагена некоторыми бактериальными субтилиноподобными протеиназами [30, 31]. Далее коллагеназа I краба *U. pugilator* гидролизует фрагменты коллагена I типа в шести сайтах (по два Gln-Arg, Arg-Gly, Leu-Xaa) (рис. 4) [32]. Гидролиз этих же фрагментов металлоколлагеназами локализован между остатками 775 и 776 (Gly-Ile или Gly-Leu) коллагена. Сходство 3/4 : 1/4-расщепления коллагена сериновыми протеиназами и металлопротеиназами указывает на конвергентную эволюцию функции. 3/4 : 1/4 район коллагена может обладать необычными структурными свойствами, которые делают его привлекательной целью для коллагеназ [2]. Следует заметить, что в то время как активность брахиуринов типа I по отношению к синтетическим пептидным субстратам широка, гидролиз коллагена ими очень специфичен. Это показывает, что вторичные взаимодействия с макромолекулярными субстратами, узнаваемые ферментом, играют для брахиуринов главную роль.

Брахиурины типа I устойчивы к большинству ингибиторов сериновых протеиназ (табл. 3). Протеиназа PC камчатского краба [15] и коллагеназа I манящего краба [10, 33] полностью ингибируются диизопротилфторфосфатом, что позволило отнести их к сериновым протеиназам. Фенилметилсульфонилфторид гораздо менее эффективен как ингибитор. Не существенны для активности ферментов такие известные ингибиторы трипсина и химотрипсина, как TLCK, TPCK. Грант с сотр. [10] показали, что ингибирование ими коллагеназы I манящего краба обратимо в присутствии субстрата, т.е. в процессе определения активности происходит вытеснение ингибитора субстратом. В то же время трипсиноподобные ферменты беспозвоночных отряда Decapoda (брахиурины II) теряют активность под действием TLCK [9, 19, 20, 34, 35].

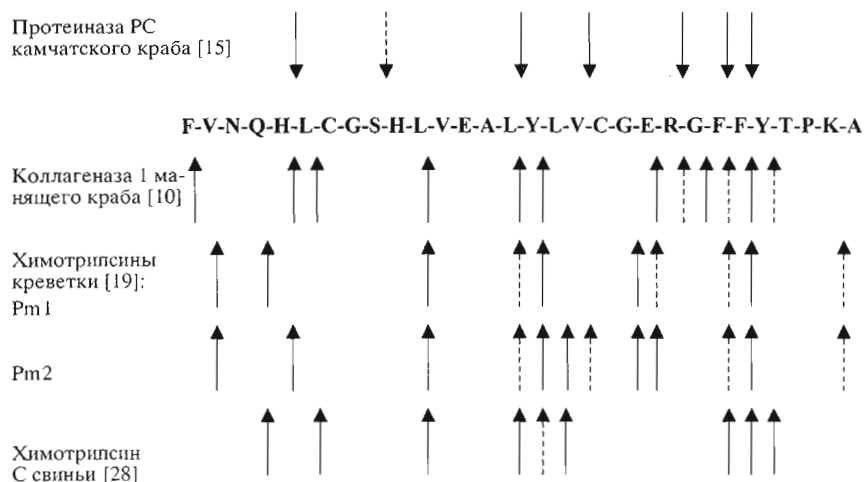


Рис. 2. Гидролиз окисленной В-цепи инсулина протеиназой РС камчатского краба и другими протеиназами членистоногих. Стрелками показаны сайты расщепления.

2. СТРУКТУРА БРАХИУРИНОВ

N-Концевые последовательности брахиуринов типа I (рис. 5) характерны для сериновых протеиназ семейства химотрипсина. Полное совпадение первых четырех аминокислотных остатков указывает на то, что протеиназы образуются, подобно химотрипсину и трипсину, путем активации зимогена. В настоящее время известны полные последовательности аминокислот для семи брахиуринов: коллагеназы I манящего краба *U. pugilator* [36, 37], трипсинов рака [16] и креветки [21], химотрипсинов Pm1 и Pm2 креветок [38] и трип-

сина креветки [21], а также коллагенолитической протеиназы и трипсина камчатского краба (GenBank AF461035, AF461036). Отнесение брахиуринов к определенному типу можно теперь сделать на основании сходства их аминокислотных последовательностей. Брахиурины Ia и Ib очень похожи между собой (73–93% идентичных остатков). В то же время коллагеназа манящего краба только на 35% идентична бычьему трипсину, на 38% – бычьему химотрипсину и на 32% – эластазе свиной. В соответствующих позициях коллагеназы I были найдены остатки Ser, His, Asp, формирующие, как известно, активный центр химотрипси-

Таблица 3. Взаимодействие коллагенолитической сериновой протеиназы РС и трипсина РС с ингибиторами [15, 49] (время реакции – 2 ч)

Ингибитор*	Коллагеназа		Трипсин	
	[In], мМ	остаточная активность, %	[In], мМ	остаточная активность, %
DFP	0.5	0	0.5	0
PMSF	0.5	30	0.5	3
TPCK	2.0	80	не опр.	не опр.
TLCK	2.0	100	0.4	0
Бензамидин	2.0	100	0.4	55
SIT	10	83	0.2	0
BBI	10	90	0.2	0
БИ из картофеля	10	90	0.8	0
БИ из морской анемоны	10	56	0.2	64
Овомукоид	10	68	0.2	44

* DFP – динизопропилфторфосфат, PMSF – фенолметилсульфонилфторид, TPCK – хлорметилкетон тозилфенилаланина, TLCK – хлорметилкетон тозиллизина. БИ – белковые ингибиторы: SIT – соевый ингибитор трипсина, BBI – ингибитор Баумана–Бирк из сои.

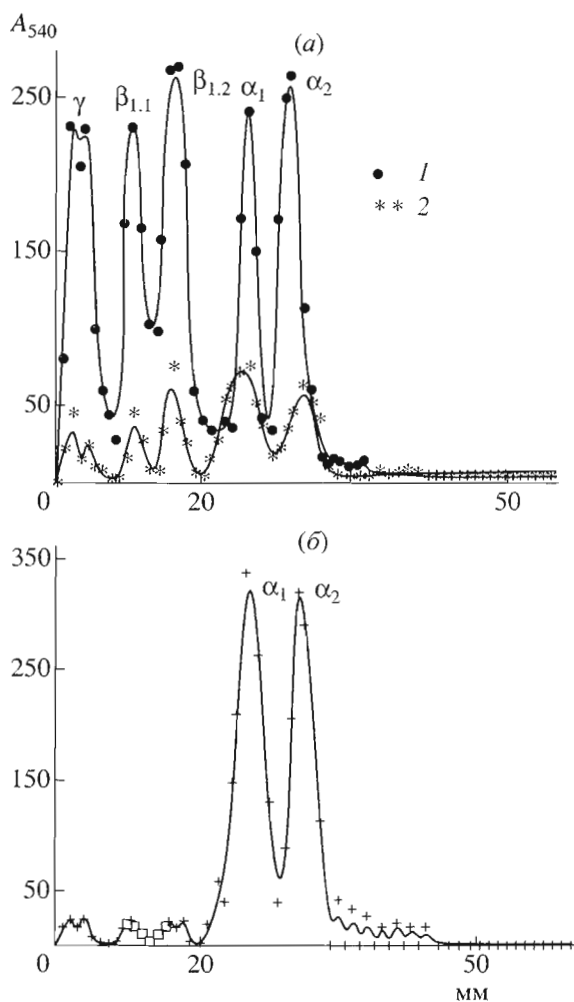


Рис. 3. Электрофореграмма в SDS-ПААГ продуктов 5-минутного гидролиза коллагена клостридиопептидазой (а, кривая 2) и 30-минутного гидролиза протеиназой РС (б). Электрофореграмма (а, 1) – контрольный образец коллагена; обозначены пики, соответствующие тримерам γ , димерам β - и α -цепей коллагена по данным работы [15]. а – контрольный образец коллагена (1), коллаген после действия клостридиопептидазы (2), б – коллаген после действия протеиназы РС камчатского краба.

на. Последовательности, включающие эти остатки, консервативны [37]. То же можно сказать и о коллагеназе камчатского краба, аминокислотная последовательность которой оказалась на 74% идентична последовательности коллагеназы манящего краба и только на 33% – химотрипсину быка. В то же время, если сравнивать брахиурины типов I и II, то степень идентичности первичной структуры этих ферментов не превышает 35%.

Способность коллагеназы I манящего краба активно гидролизовать субстраты как химотрипсина, так и трипсина, можно объяснить особенностями строения субстратсвязывающего центра этого фермента. У него в зоне S1, в отличие от

химотрипсина, вместо остатка Ser189 находится Gly, а вместо Gly226 – Asp [37]. Таким образом, коллагеназа I может эффективно связывать субстраты с положительно заряженным остатком S1 наряду с субстратами, которые содержат в положении P1 гидрофобный остаток.

В настоящее время получена кристаллическая структура коллагеназы I манящего краба в комплексе с ингибитором экотинном с разрешением 2.5 Å [37, 39]. Экотин ингибирует широкий диапазон протеиназ, в том числе трипсин, химотрипсин и эластазу, образуя тетрамерный комплекс в мольном соотношении экотин–протеиназа, 2 : 2. По третичной структуре коллагеназа I манящего краба очень подобна трипсину крысы и других позвоночных [38, 39].

Специфичность коллагеназы I к пептидным субстратам и коллагену заметно зависит от модификации определенных участков поверхности пептеля в активном центре молекулы. Эти изменения важны и для первичного участка S1 и для вторичных участков S7–S4 субстратсвязывающего центра фермента. Отрицательный заряд карбоксильной группы Asp226 локализован в основании впадины и хорошо доступен для взаимодействия с положительным зарядом боковых цепей субстратов. И в коллагеназе I, и в трипсине аминокислота в положении 226 находится прямо против аминокислоты в положении 189. Впадина у коллагеназы I не такая глубокая, как у трипсина, и находится ближе к каталитическим остаткам. Открытый “вход”, образованный аминокислотами 214–220, принимает отличную от трипсина форму “растянутого рта”, благодаря отсутствию двух аминокислотных остатков, локализованных в молекуле трипсина после консервативного остатка Gly216. Такая форма впадины создает дополнительный объем и формирует центр связывания P1 для гидрофобных остатков.

Это наблюдение хорошо согласуется с результатами, полученными сайт-направленным мутагенезом для рекомбинантной коллагеназы I манящего краба. Удаление отрицательного заряда из положения 226 (замена Asp226Gly) драматически уменьшает, а последующее введение заряда в положение 189 (Gly189Asp) восстанавливает специфичность к основным остаткам (увеличение k_{cat}/K_m в 10–100 раз). В то же время при такой двойной замене наблюдается только слабое (в 5 раз) увеличение специфичности по отношению к гидрофобным остаткам [38]. Скорости гидролиза белков и олигопептидов коллагеназой I манящего краба сходны с таковыми, приведенными для ферментов позвоночных, но активность фермента по отношению к низкомолекулярным субстратам значительно ниже [25].

Рентгеноструктурный анализ комплекса коллагеназы I с экотинном отчетливо показывает

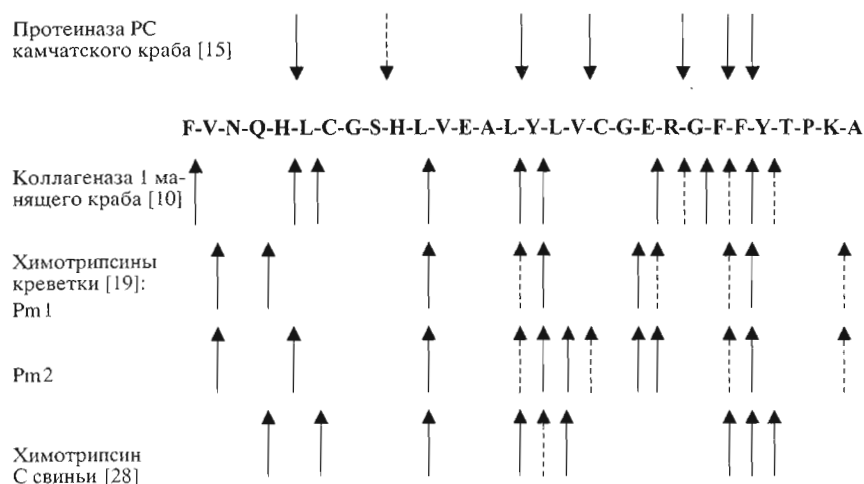


Рис. 2. Гидролиз окисленной В-цепи инсулина протеиназой РС камчатского краба и другими протеиназами членистоногих. Стрелками показаны сайты расщепления.

2. СТРУКТУРА БРАХИУРИНОВ

N-Концевые последовательности брахиуринов типа I (рис. 5) характерны для сериновых протеиназ семейства химотрипсина. Полное совпадение первых четырех аминокислотных остатков указывает на то, что протеиназы образуются, подобно химотрипсину и трипсину, путем активации зимогена. В настоящее время известны полные последовательности аминокислот для семи брахиуринов: коллагеназы 1 манящего краба *U. pugilator* [36, 37], трипсинов рака [16] и креветки [21], химотрипсинов Pm1 и Pm2 креветок [38] и трип-

сина креветки [21], а также коллагенолитической протеиназы и трипсина камчатского краба (GenBank AF461035, AF461036). Отнесение брахиуринов к определенному типу можно теперь сделать на основании сходства их аминокислотных последовательностей. Брахиурины Ia и Ib очень похожи между собой (73–93% идентичных остатков). В то же время коллагеназа манящего краба только на 35% идентична бычьему трипсину, на 38% – бычьему химотрипсину и на 32% – эластазе свиной. В соответствующих позициях коллагеназы 1 были найдены остатки Ser, His, Asp, формирующие, как известно, активный центр химотрипси-

Таблица 3. Взаимодействие коллагенолитической сериновой протеиназы РС и трипсина РС с ингибиторами [15, 49] (время реакции – 2 ч)

Ингибитор*	Коллагеназа		Трипсин	
	[In], mM	остаточная активность, %	[In], mM	остаточная активность, %
DFP	0.5	0	0.5	0
PMSF	0.5	30	0.5	3
TPCK	2.0	80	не опр.	не опр.
TLCK	2.0	100	0.4	0
Бензамидин	2.0	100	0.4	55
SIT	10	83	0.2	0
BBI	10	90	0.2	0
БИ из картофеля	10	90	0.8	0
БИ из морской анемоны	10	56	0.2	64
Овомукоид	10	68	0.2	44

* DFP – диизопропилфторфосфат, PMSF – фенолметилсульфонилфторид, TPCK – хлорметилкетон тозилфенилаланина, TLCK – хлорметилкетон тозиллизина. БИ – белковые ингибиторы: SIT – соевый ингибитор трипсина, BBI – ингибитор Баумана–Бирк из сои.

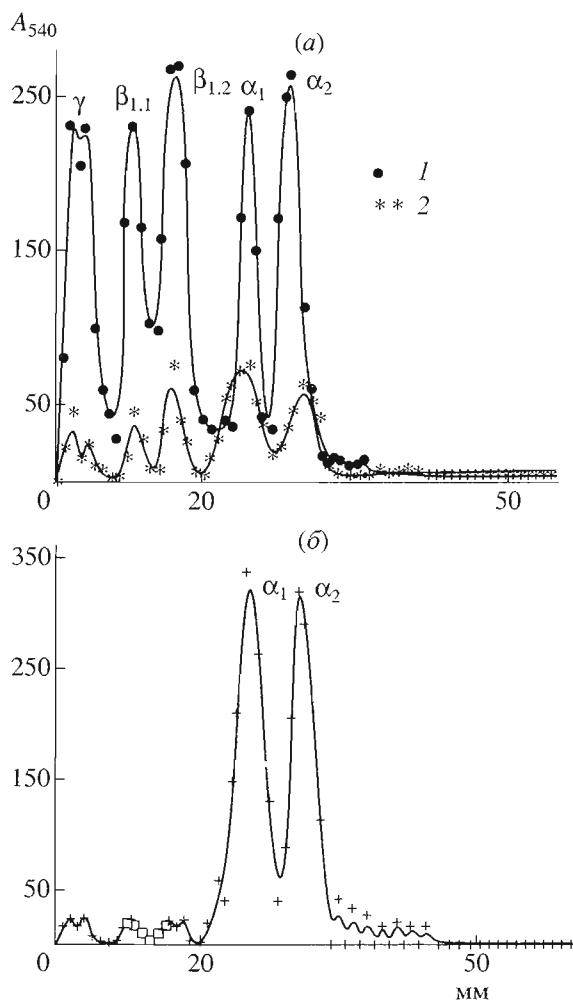


Рис. 3. Электрофореграмма в SDS-ПААГ продуктов 5-минутного гидролиза коллагена клостридиопептидазой (а, кривая 2) и 30-минутного гидролиза протеиназой РС (б). Электрофореграмма (а, 1) – контрольный образец коллагена; обозначены пики, соответствующие тримерам γ , димерам β - и α -цепей коллагена по данным работы [15]. а – контрольный образец коллагена (1), коллаген после действия клостридиопептидазы (2), б – коллаген после действия протеиназы РС камчатского краба.

на. Последовательности, включающие эти остатки, консервативны [37]. То же можно сказать и о коллагеназе камчатского краба, аминокислотная последовательность которой оказалась на 74% идентична последовательности коллагеназы манящего краба и только на 33% – химотрипсину быка. В то же время, если сравнивать брахиурины типов I и II, то степень идентичности первичной структуры этих ферментов не превышает 35%.

Способность коллагеназы I манящего краба активно гидролизовать субстраты как химотрипсина, так и трипсина, можно объяснить особенностями строения субстратсвязывающего центра этого фермента. У него в зоне S1, в отличие от

химотрипсина, вместо остатка Ser189 находится Gly, а вместо Gly226 – Asp [37]. Таким образом, коллагеназа I может эффективно связывать субстраты с положительно заряженным остатком S1 наряду с субстратами, которые содержат в положении P1 гидрофобный остаток.

В настоящее время получена кристаллическая структура коллагеназы I манящего краба в комплексе с ингибитором экотинном с разрешением 2.5 Å [37, 39]. Экотин ингибирует широкий диапазон протеиназ, в том числе трипсин, химотрипсин и эластазу, образуя тетрамерный комплекс в мольном соотношении экотин–протеиназа, 2 : 2. По третичной структуре коллагеназа I манящего краба очень подобна трипсину крысы и других позвоночных [38, 39].

Специфичность коллагеназы I к пептидным субстратам и коллагену заметно зависит от модификации определенных участков поверхности петли в активном центре молекулы. Эти изменения важны и для первичного участка S1 и для вторичных участков S7–S4 субстратсвязывающего центра фермента. Отрицательный заряд карбоксильной группы Asp226 локализован в основании впадины и хорошо доступен для взаимодействия с положительным зарядом боковых цепей субстратов. И в коллагеназе I, и в трипсине аминокислота в положении 226 находится прямо против аминокислоты в положении 189. Впадина у коллагеназы I не такая глубокая, как у трипсина, и находится ближе к каталитическим остаткам. Открытый “вход”, образованный аминокислотами 214–220, принимает отличную от трипсина форму “растянутого рта”, благодаря отсутствию двух аминокислотных остатков, локализованных в молекуле трипсина после консервативного остатка Gly216. Такая форма впадины создает дополнительный объем и формирует центр связывания P1 для гидрофобных остатков.

Это наблюдение хорошо согласуется с результатами, полученными сайт-направленным мутагенезом для рекомбинантной коллагеназы I манящего краба. Удаление отрицательного заряда из положения 226 (замена Asp226Gly) драматически уменьшает, а последующее введение заряда в положение 189 (Gly189Asp) восстанавливает специфичность к основным остаткам (увеличение k_{cat}/K_m в 10–100 раз). В то же время при такой двойной замене наблюдается только слабое (в 5 раз) увеличение специфичности по отношению к гидрофобным остаткам [38]. Скорости гидролиза белков и олигопептидов коллагеназой I манящего краба сходны с таковыми, приведенными для ферментов позвоночных, но активность фермента по отношению к низкомолекулярным субстратам значительно ниже [25].

Рентгеноструктурный анализ комплекса коллагеназы I с экотинном отчетливо показывает

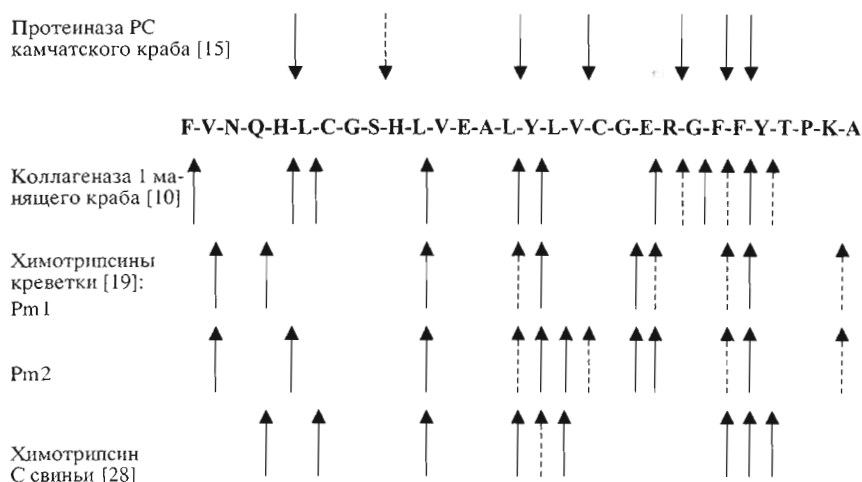


Рис. 2. Гидролиз окисленной В-цепи инсулина протеиназой РС камчатского краба и другими протеиназами членистоногих. Стрелками показаны сайты расщепления.

2. СТРУКТУРА БРАХИУРИНОВ

N-Концевые последовательности брахиуринов типа I (рис. 5) характерны для сериновых протеиназ семейства химотрипсина. Полное совпадение первых четырех аминокислотных остатков указывает на то, что протеиназы образуются, подобно химотрипсину и трипсину, путем активации зимогена. В настоящее время известны полные последовательности аминокислот для семи брахиуринов: коллагеназы I манящего краба *U. pugilator* [36, 37], трипсинов рака [16] и креветки [21], химотрипсинов Pm1 и Pm2 креветок [38] и трип-

сина креветки [21], а также коллагенолитической протеиназы и трипсина камчатского краба (GenBank AF461035, AF461036). Отнесение брахиуринов к определенному типу можно теперь сделать на основании сходства их аминокислотных последовательностей. Брахиурины Ia и Ib очень похожи между собой (73–93% идентичных остатков). В то же время коллагеназа манящего краба только на 35% идентична бычьему трипсину, на 38% – бычьему химотрипсину и на 32% – эластазе свины. В соответствующих позициях коллагеназы I были найдены остатки Ser, His, Asp, формирующие, как известно, активный центр химотрипси-

Таблица 3. Взаимодействие коллагенолитической сериновой протеиназы РС и трипсина РС с ингибиторами [15, 49] (время реакции – 2 ч)

Ингибитор*	Коллагеназа		Трипсин	
	[In], mM	остаточная активность, %	[In], mM	остаточная активность, %
DFP	0.5	0	0.5	0
PMSF	0.5	30	0.5	3
TPCK	2.0	80	не опр.	не опр.
TLCK	2.0	100	0.4	0
Бензамидин	2.0	100	0.4	55
SIT	10	83	0.2	0
ВВИ	10	90	0.2	0
БИ из картофеля	10	90	0.8	0
БИ из морской анемоны	10	56	0.2	64
Овомукоид	10	68	0.2	44

* DFP – диизопропилфторфосфат, PMSF – фенолметилсульфонилфторид, TPCK – хлорметилкетон тозилфенилаланина, TLCK – хлорметилкетон тозиллизина. БИ – белковые ингибиторы: SIT – соевый ингибитор трипсина, ВВИ – ингибитор Баумана–Бирк из сои.

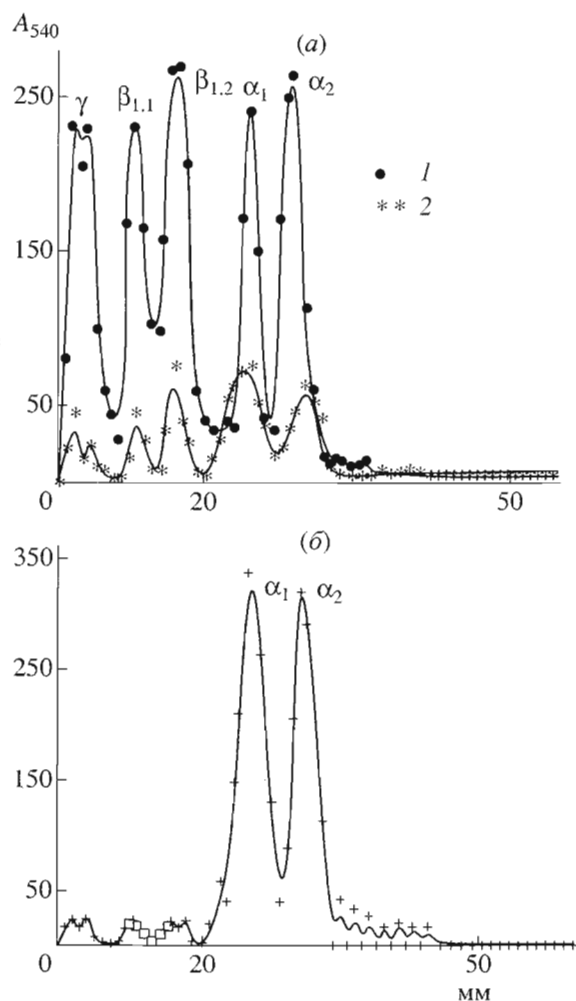


Рис. 3. Электрофореграмма в SDS-ПААГ продуктов 5-минутного гидролиза коллагена клостридиопептидазой (а, кривая 2) и 30-минутного гидролиза протеиназой РС (б). Электрофореграмма (а, 1) – контрольный образец коллагена; обозначены пики, соответствующие тримерам γ , димерам β - и α -цепей коллагена по данным работы [15]. а – контрольный образец коллагена (1), коллаген после действия клостридиопептидазы (2), б – коллаген после действия протеиназы РС камчатского краба.

на. Последовательности, включающие эти остатки, консервативны [37]. То же можно сказать и о коллагеназе камчатского краба, аминокислотная последовательность которой оказалась на 74% идентична последовательности коллагеназы манящего краба и только на 33% – химотрипсину быка. В то же время, если сравнивать брахиурины типов I и II, то степень идентичности первичной структуры этих ферментов не превышает 35%.

Способность коллагеназы I манящего краба активно гидролизовать субстраты как химотрипсина, так и трипсина, можно объяснить особенностями строения субстратсвязывающего центра этого фермента. У него в зоне S1, в отличие от

химотрипсина, вместо остатка Ser189 находится Gly, а вместо Gly226 – Asp [37]. Таким образом, коллагеназа I может эффективно связывать субстраты с положительно заряженным остатком S1 наряду с субстратами, которые содержат в положении P1 гидрофобный остаток.

В настоящее время получена кристаллическая структура коллагеназы I манящего краба в комплексе с ингибитором экотинном с разрешением 2.5 Å [37, 39]. Экотин ингибирует широкий диапазон протеиназ, в том числе трипсин, химотрипсин и эластазу, образуя тетрамерный комплекс в мольном соотношении экотин–протеиназа, 2 : 2. По третичной структуре коллагеназа I манящего краба очень подобна трипсину крысы и других позвоночных [38, 39].

Специфичность коллагеназы I к пептидным субстратам и коллагену заметно зависит от модификации определенных участков поверхности петель в активном центре молекулы. Эти изменения важны и для первичного участка S1 и для вторичных участков S7–S4 субстратсвязывающего центра фермента. Отрицательный заряд карбоксильной группы Asp226 локализован в основании впадины и хорошо доступен для взаимодействия с положительным зарядом боковых цепей субстратов. И в коллагеназе I, и в трипсине аминокислота в положении 226 находится прямо против аминокислоты в положении 189. Впадина у коллагеназы I не такая глубокая, как у трипсина, и находится ближе к каталитическим остаткам. Открытый “вход”, образованный аминокислотами 214–220, принимает отличную от трипсина форму “растянутого рта”, благодаря отсутствию двух аминокислотных остатков, локализованных в молекуле трипсина после консервативного остатка Gly216. Такая форма впадины создает дополнительный объем и формирует центр связывания P1 для гидрофобных остатков.

Это наблюдение хорошо согласуется с результатами, полученными сайт-направленным мутагенезом для рекомбинантной коллагеназы I манящего краба. Удаление отрицательного заряда из положения 226 (замена Asp226Gly) драматически уменьшает, а последующее введение заряда в положение 189 (Gly189Asp) восстанавливает специфичность к основным остаткам (увеличение k_{cat}/K_m в 10–100 раз). В то же время при такой двойной замене наблюдается только слабое (в 5 раз) увеличение специфичности по отношению к гидрофобным остаткам [38]. Скорости гидролиза белков и олигопептидов коллагеназой I манящего краба сходны с таковыми, приведенными для ферментов позвоночных, но активность фермента по отношению к низкомолекулярным субстратам значительно ниже [25].

Рентгеноструктурный анализ комплекса коллагеназы I с экотинном отчетливо показывает

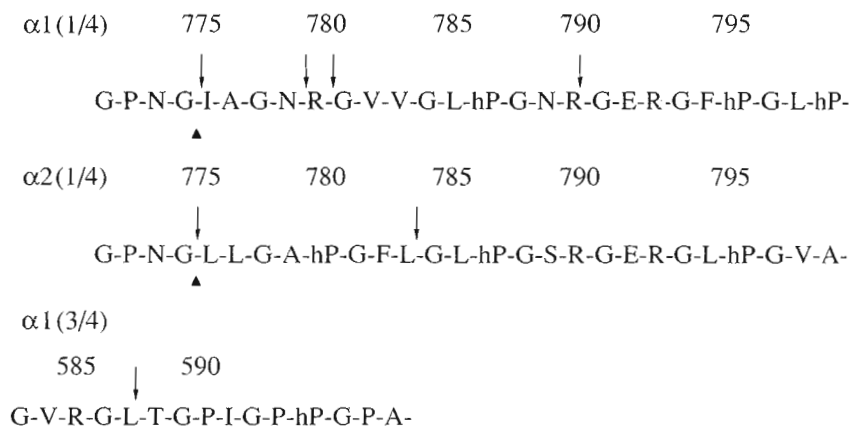


Рис. 4. Гидролиз (1/4)- и (3/4)-фрагментов бычьего коллагена $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -цепей коллагеназой I манящего краба [25]; стрелками показаны сайты расщепления. Треугольником показан сайт расщепления металлоколлагеназами. hP – гидроксипролин.

роль вторичных взаимодействий в функционировании фермента. Для связывания экотина в коллагеназе I задействовано 11 аминокислотных остатков от P7 до P4'. Для такого же комплекса трипсина с экотином показано участие в связывании только P3–P2'-остатков фермента [39]. Ряд особенностей взаимодействий главных цепей коллагеназы и ингибиторной петли экотина свидетельствует, что субстратсвязывающий центр фермента оптимально приспособлен к высокому содержанию глицина и пролина в коллагене. Коллагеназа I манящего краба приспособлена к стерическим взаимодействиям со спиралью коллагена через хорошо обозначенный проход со стороны уходящей группы активного центра. Подобные впадины не были обнаружены у других сериновых протеиназ [25, 38, 39].

3. ПРИМЕНЕНИЕ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ КРАБОВ В МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЯХ

Способность коллагеназ разрушать коллаген используется в медицине для лечения ожогов, гнойно трофических язв, послеоперационных рубцов, остеохондрозов и др. В настоящее время известно довольно много ферментных препаратов с коллагенолитическим действием, однако далеко не все они применяются в медицине. Наиболее изучены и применяются для практических целей коллагеназы и комплексные ферментные препараты, полученные из представителей семейства Decapoda.

Препарат РНМ-101 [40, 41], содержащий протеиназы крыла, был использован для лечения язв и эрозий, образовавшихся в результате ожога 4 н. щелочью роговицы кроликов. Через 28 сут лечения в 45% случаев наблюдали восстановление эпителия (без препарата – в 33% случаях), еще че-

рез 7 сут лечения препаратом язвы роговицы уменьшились в размере. Авторы делают вывод о целесообразности применения препарата из крыла при лечении дефектов склеры глаза. Это один из немногих примеров применения коллагеназ членистоногих за рубежом.

В России активно разрабатывались суммарные препараты протеиназ из гепатопанкреаса промысловых видов крабов [42–46]. Интерес к этому объекту связан с утилизацией отходов краболовства. Кроме того, немаловажным преимуществом по сравнению с коллагеназой из *C. histolyticum* бактерии – возбудителя газовой гангрены, является относительная безвредность препаратов коллагеназ из краба для человека. Препараты, полученные разными способами из гепатопанкреаса, значительно различаются по степени чистоты и активности, а также по ферментному составу.

Первые работы по выделению гомогенных протеиназ из камчатского краба и краба стригуна

- I V G G Q D A T P – (1)
- I V G G Q E A T P – (2)
- I V G G Q E A T P – (3)
- I V G G Q E A S P – (4)
- I V G G V E A T P – (5)
- I V G G V E A T P – (6)
- I V G G T D A V L – (7)

Рис. 5. N-Концевые последовательности протеиназ членистоногих: коллагеназы I манящего краба *U. pu-gilator* [36, 37] (1), протеиназы PC камчатского краба *P. camtschaticus* [15] (2), протеиназы 25 кДа камчатского краба [48] (3), протеиназы 28 кДа краба стригуна [48] (4), химотрипсина Pm1 креветки *Penaeus van-namei* [38] (5), химотрипсина Pm2 креветки *P. van-namei* [38] (6), трипсина рака *Astacus fluviatilis* [16] (7).

Таблица 4. Показатели свертывающей и фибринолитической систем крови у интактных крыс после наружного применения мази Морикрол (смазывание участков кожи у 10 животных)

Показатели		До применения мази	Через 20 сут после применения мази	
		$M \pm m$	$M \pm m$	P
Свертывание	Фибриноген, мг/дл	467.1 ± 30.4	489.4 ± 25.9	>0.5
	Время рекальцификации, с	58.3 ± 3.0	105.7 ± 4.3	<0.01
	Тромбоэластограмма:			
	r	2.2 ± 0.2	5.3 ± 1.0	<0.01
	k	3.2 ± 0.2	8.6 ± 2.2	<0.02
	Ma	3.6 ± 1.5	3.5 ± 1.4	>0.5
Фибринолиз	Время лизиса сгустков эуглобулинов, мин	67.1 ± 13.3	82.3 ± 11.9	>0.5
	Фибринолитическая активность на стандартных фибриновых пластинках, мм ²	124.8 ± 18.3	106.5 ± 13.1	>0.5
	Активатор плазминогена, мм ²	110 ± 11.1	79.6 ± 9.2	>0.1
	Плазмин, мм ²	14.9 ± 3.9	26.9 ± 5.3	>0.1
	Антиактиватор, %	93.9 ± 3.09	94.9 ± 1.8	>0.5

были опубликованы О.А. Климовой [11, 12] и И.Ю. Сахаровым [13, 14, 47]. Допущенные в работах [11, 12] неточности в указании исходного сырья были исправлены в работе [48], и эта поправка учтена в настоящем обзоре. Позднее Г.Н. Руденской и соавт. были выделены и подробно охарактеризованы индивидуальные протеолитические ферменты гепатопанкреаса камчатского краба: коллагенолитическая сериновая протеиназа [15], трипсин [49], металлопротеиназа [50], карбоксипептидаза [51] и аминопептидаза [52]. Основным отличием этих ферментов от аналогичных панкреатических ферментов высших млекопитающих являются аномально низкие изоэлектрические точки и смешанная субстратная специфичность.

На основе вышеуказанных ферментных препаратов создано большое количество лечебных форм в виде порошков, мазей и иммобилизованных на перевязочных материалах ферментов для лечения гнойных ран, язв, рубцов [53–57]. Т.В. Саввиной и соавт. [58] были изучены некротолитическая и фибринолитическая активности *in vitro* шести препаратов протеиназ, применяемых в хирургии для очищения гнойных ран. Сравнение биологической активности с лечебным воздействием ферментов на модель гнойной раны у крыс, показало, что наиболее эффективными являются коллагеназа краба – препарат коллаза, лизоамидаза и химопсин, менее эффективными – протеаза С, террилитин и карипазим. Авторам предложили оригинальное объяснение механизма очищения ран коллагенолитической протеиназой.

Эксперименты *in vitro* показали, что суммарные препараты, а также очищенные эндопептидазы краба обладают заметным тромболитичес-

ким действием [50, 58–60]. Был изучен процесс проникновения коллагеназы краба в кровоток через грануляции асептической и гнойной ран у крыс и распределение этого фермента по органам. Использование меченой коллагеназы [61] показало, что в результате нанесения на раны по 250 мкл раствора коллагеназы с концентрацией 3 мг/мл фермент попадает в кровоток, и его концентрация достигает максимального значения через 6 ч после введения. В дальнейшем содержание фермента постепенно снижается и через сутки в крови обнаруживается около 10% его максимальной активности. Уже через 10 мин после введения ферменты краба обнаруживаются в крови, печени и почках. Однако через сутки в печени и почках остаются лишь следы указанных протеиназ. Таким образом, после проникновения в кровоток сериновые протеиназы краба относительно быстро инактивируются ингибиторами сыворотки крови и выводятся из организма.

При применении коллагеназы с более низкой концентрацией ферментов в виде мази (например, Морикрол – препарат, содержащий 0.25–2% белка), влияние на показатели крови менее выражено [60]. Как следует из табл. 4, при смазывании Морикролом гнойных ран концентрация фибриногена остается в пределах нормы; время свертывания крови (время рекальцификации) удлинняется вдвое; время тромбопластино- и тромбинообразования (r) и образования фибриновых нитей (k) увеличивается в 2.5 раза; показатель Ma, отражающий содержание фибриногена в плазме, не меняется, что согласуется с неизменным уровнем плазминогена, определенным прямым методом. Изменение фибринолиза выражено слабо, хотя намечается тенденция к гипофибринолизу, что

может быть вызвано антикоагуляционным действием Морикрола. Это находит отражение в удлинении времени лизиса сгустка и снижении активности активатора плазминогена. В то же время не происходит высвобождения дополнительных количеств свободных ингибиторов (антиактиватор). Все эти данные свидетельствуют о некотором гипокоагуляционном эффекте, вызываемом протеиназами краба, что в случае ожогов является благоприятным фактором, способствующим активации плазмينا (табл. 4), гидролизующего фибрин, образовавшийся в капиллярах на поверхности раны.

Одним из основных критериев для применения препарата в медицине является отсутствие токсичности и вредных побочных эффектов. При испытании мази Морикрол аллергического действия не было выявлено. Наиболее подробно возможные токсические эффекты были изучены при применении мази Коллаза [62]. Коллаза с оптимальным содержанием белка 0.2 мг/г оказывала заживляющее действие на инфицированные раны и не влияла на содержание белка, глюкозы, холестерина, аланинаминотрансферазы, аспартаминотрансферазы в сыворотке крови при однократном нанесении Коллазы на раневую поверхность кожи крыс. Аппликация Коллазы не изменяла двигательной активности и поведенческих реакций крыс, не влияла на прирост массы тела и показатели температуры, а также не изменяла макроскопическую картину внутренних органов. Длительное применение мази не влияло на физиологические показатели животных. Исследование сыворотки крови крыс в динамике после лечения в течение 3–14 сут свидетельствовало об отсутствии всасывания белка через раневую поверхность и образования антител к нему. Эти данные не противоречат приведенным выше данным И.Ю. Сахарова [61], который наблюдал всасывание ферментов препарата коллагеназы через 10 мин после введения и практически полное удаление их через 1 сут.

Таким образом, разработанная в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии “Вектор” мазь Коллаза с содержанием активного белка 0.2 мг/г нетоксична и оказывает некролитическое и ранозаживляющее действие на инфицированные раны, сравнимое с действием мази Ируксол, содержащей клостридиопептидазу. Мазь с более высоким содержанием фермента (0.8 мг/г) замедляла заживление раны; авторы считают, что это следствие травмирования ран и торможения регенеративных процессов Коллазой.

Б.А. Парамоновым [63] была исследована токсичность высокоочищенного комплекса протеиназ камчатского краба, входящего в состав препаратов Ферменкол и др. Анализ биохимических показателей сыворотки крови не выявил досто-

верных различий между опытными и контрольными группами, что свидетельствует об отсутствии существенного влияния протеолитического комплекса на белковый, углеводный и липидный обмен. Установлено также отсутствие острой токсичности при кожном и внутрибрюшинном введении мышам и крысам раствора препарата в течение длительного времени.

Таким образом, первой стадией, на которой успешно применяются препараты протеолитического и коллагенолитического действия, при заживлении ран является лизис некротических тканей, который происходит на 2–7-е сут после начала лечения. На этой стадии нет особых различий между протеолитическими препаратами из разных источников. Однако важно, чтобы препараты не содержали токсических примесей и были активны. Следующая стадия заключается собственно в процессе заживления раны, восстановлении новых клеток тканей и кожи. При высокой концентрации коллагеназы в препарате процессы восстановления могут замедлиться за счет гидролиза ферментом здоровых тканей, поэтому необходимо либо прекращать лечение, либо пользоваться препаратами, содержащими папаин, трипсин, химотрипсин, которые не разрушают здоровые ткани. В работах [64–66] обнаружено, что коллагеназы способны оказывать ингибирующее действие на новообразованную грануляционную ткань, в связи с чем рекомендовано снижение дозировки ферментов по мере очищения ран. В случае Морикрола [56], для лечения ран мазь должна содержать не более 0.5% ферментного препарата на г, а для лечения рубцов целесообразно применять более высокие концентрации [57]. При соблюдении этих условий наличие коллагеназы придает большие преимущества по сравнению с препаратами только протеолитического действия.

В настоящее время коллагенолитические препараты на основе протеиназ гепатопанкреаса камчатского краба применяются в виде растворов, мазей и перевязочных материалов с иммобилизованными ферментами. Показано, что при применении растворов очищение ран от некротических тканей происходит быстрее, чем при применении мази [58, 64]. Эффект, по-видимому, обусловлен более быстрым проникновением ферментов в рану и созданием благоприятной для гидролиза протеиназами среды. В ряде случаев, например, при лечении ожогов глаз, необходимо одновременно с растворами ферментов анестезин для обезболивания. В то же время в обычной практике лечения глубоких ран удобнее иметь дело с дренирующими сорбентами. В частности, предложено [66] использовать раствор коллагеназы совместно с гелевином в качестве носителя, что значительно увеличивает лечебную активность фермента.

При лечении неглубоких ран с ограниченной поверхностью лучше использовать мазевые формы. Мазь практически не вызывает таких болевых ощущений, как растворы, более экономна. В случае Коллазы в качестве мазевой основы использовали гель полиэтиленоксида – нетоксичного, инертного по отношению к восстановительному процессу вещества. Другой подход – применять в качестве мазевой основы вещество с ранозаживляющими свойствами. Для этого в мази Морикрол используются жиры эйканол или эйглисол [67, 68], содержащие комплекс полиненасыщенных жирных кислот, которые могут встраиваться в клеточную стенку вместо арахидоновой кислоты и способствовать заживлению. Кроме того, там же содержатся витамины А и D, благоприятно влияющие на состояние кожи. Есть мнение, нуждающееся в проверке, что полиненасыщенные жирные кислоты способны взаимодействовать с токсичными радикалами, образующимися при ожоговой болезни. Очень хороший эффект был отмечен при использовании Морикрола для приживления трансплантатов у детей. В ряде экспериментов Морикрол кроме ранозаживляющего оказывал также бактерицидное действие (природа этого эффекта пока неизвестна).

Перспективным является применение иммобилизованных на перевязочных материалах коллагеназ. Имеются разработки по иммобилизации коллагеназы краба на диальдегидцеллюлозе и активированном поликапронамиде различной степени модификации [68]. В Институте хирургии РАМН применяли губчатое покрытие на коллагеновой основе в комплексе с коллагеназой при лечении лучевых поражений мягких тканей [70]. В НИИ лазерной медицины МЗ (Россия) исследованы протеолитические ферменты, обладающие коллагенолитической активностью (коллитин, протеаза-С, коллагеназа краба), в структуре пленок из поливинилового спирта. Проведена экспериментальная оценка лечения ожоговых ран у животных с помощью пленочных материалов; установлено, что нативные ферменты уступают по эффективности иммобилизованным [71].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из вышеизложенного следует, что изучение брахиуринов имеет большое значение для понимания эволюции сериновых протеиназ, их структуры и функции. Сравнительный структурно-функциональный анализ показывает, что эти ферменты беспозвоночных тесно родственны между собой, но заметно отличаются от аналогов, найденных у позвоночных и микроорганизмов. Следует отметить, что в последние годы были подробно изучены химотрипсиноподобные протеиназы, синтезирующиеся в клетках системы гемопоэза (тучные клетки, лимфоциты, лейкоциты) млеко-

питающих, которые образуют особую группу внутри семейства химотрипсина – граспазы (гранулоствязанные протеиназы). Один из типов граспаз – дуозимы, так же как и сериновые коллагенолитические протеиназы крабов, обладают двойной трипсино- и химотрипсиноподобной активностью. Типичным представителем этого типа ферментов является дуоденаза слизистой оболочки кишечника быка [72, 73]. Таким образом, коллагенолитические ферменты крабов являются интересными объектами изучения в научном плане и перспективны для использования в медицинских целях.

Работа поддержана грантом РФФИ № 02-04-48699.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Спрайер Л.* Биохимия. Белки соединительной ткани. М.: Мир, 1984. Т. 1. С. 179–197.
2. *Bornstein P., Traub W.* The Chemistry and Biology of Collagen. The Proteins. Edn. N.Y.: Acad. Press, 1979. P. 411–632.
3. *Barret A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F.* // Handbook of Proteolytic Enzymes. N.Y.: Acad. Press, 1998.
4. *DeVillev E.J., Buschlen K.* // Comp. Biochem. Physiol. 1967. V. 21. P. 541–546.
5. *Eisen A.Z., Jeffrey J.J.* // Biochim. Biophys. Acta. 1969. V. 191. P. 517–526.
6. *Eisen A.Z., Henderson K.O., Jeffrey J.J., Bradshaw R.A.* // Biochemistry. 1973. V. 12. P. 1814–1822.
7. *Zwilling R., Pfeleiderer G., Sonneborn H., Kraft V., Stucky I.* // Comp. Biochem. Physiol. 1969. V. 28. P. 1275–1287.
8. *Gates R.J., Travis J.* // Biochemistry. 1969. V. 8. P. 4483–4489.
9. *Turkiewicz M., Galas E., Kalinowska H.* // Comp. Biochem. Physiol. 1991. V. 99B. P. 359–371.
10. *Grant G.A., Sacchettini J.C., Welgus H.G.* // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 2228–2233.
11. *Klimova O.A., Borukhov S.I., Solovyeva N.I., Balaevskaia T.O., Strongin A.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990. V. 166. P. 1411–1420.
12. *Климова О.А., Ведищева И., Стронгин А.Я.* // Докл. АН СССР. 1991. Т. 317. С. 482–484.
13. *Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е., Артюков А.А., Кофанова Н.Н.* // Биохимия. 1988. Т. 53. С. 1844–1849.
14. *Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е., Артюков А.А.* // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 40–45.
15. *Руденская Г.Н., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е., Баратова Л.А., Калебина Т.С., Нурминская М.В.* // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 1119–1132.
16. *Titani K., Sasagawa T., Woodbury R.G., Ericsson L.H., Dorsam H., Kraemer M., Neurath H., Zwilling R.* // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 1459–1465.
17. *Lu P.J., Liu H.C., Tsai I.H.* // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1990. V. 371. P. 851–859.
18. *Tsai I.H., Chuang K.I., Chuang J.L.* // Comp. Biochem. Physiol. 1986. V. 85B. P. 235–239.

19. Tsai I.H., Lu P.Y., Chuang J.L. // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1080. P. 59–67.
20. van Wormhoudt A., Le Chevalier P., Sellos D. // Comp. Biochem. Physiol. 1992. V. 103B.
21. Klein B., Le M.G., Sellos D., van Wormhoudt A. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 1996. V. 28. P. 551–563.
22. Johnston D., Hermans J.M., Yellowlees D. // Arch. Biochem. Biophys. 1995. V. 324. P. 35–40.
23. Zwillig R., Neurath H., Ericsson L.H., Enfield D.L. // FEBS Lett. 1975. V. 60. P. 247–249.
24. Zwillig R., Neurath H. // Methods Enzymol. 1981. V. 80. P. 633–664.
25. Tsu C.A., Perona J.J., Schellenberger V., Turck C.W., Craik C.S. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 19565–19572.
26. Miller D.C. // Zoologica. 1961. V. 46. P. 89–101.
27. Warner G. The Biology of Crabs. London: Paul Elek, 1977.
28. Folk J.E., Cole P.W. // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. P. 193–197.
29. Birkedal-Hansen H., Moore W., Bodden M., Windsor L., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler J. Matrix Metalloproteinases: A Review. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1993. V. 4. P. 1197–1250.
30. Chen Y.L., Lu P.J., Tsai I.H. // Comp. Biochem. Physiol. 1991. V. 100B. P. 763–768.
31. Welgus H.G., Grant G.A., Jeffrey J.J., Eisen A.Z. // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 5183–5189.
32. Grant G.A., Eisen A.Z. // Biochemistry. 1980. V. 19. P. 6089–6095.
33. Grant G.A., Eisen A.Z., Bradshaw R.A. // Methods Enzymol. 1981. V. 80. P. 722–734.
34. Grant G.A., Henderson K.O., Eisen A.Z., Bradshaw R.A. // Biochemistry. 1980. V. 19. P. 4653–4659.
35. Sellos D., van Wormhoudt A. // FEBS Lett. 1992. V. 309. P. 219–224.
36. Tsu C.A., Craik C.S. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 11563–11570.
37. Tsu C.A., Perona J.J., Fletterick R.J., Craik C.S. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 5393–5402.
38. Perona J.J., Craik C.S. // Protein Sci. 1995. V. 4. P. 337–360.
39. Perona J.J., Tsu C.A., Craik C.S., Fletterick R.J. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 5381–5392.
40. Alexander M.E., Dresden M.H. // Comp. Biochem. Physiol. 1980. V. 67B. P. 505–509.
41. Sangwan V.S., Akpek E.K., Voo I., Zhao T., Pinar V., Yang J., Christen W., Baltasar S., Wild R., Foster C.S. // Cornea. 1999. V. 18. P. 707–711.
42. Елякова Л.А., Козловская Э.П. Способ получения комплекса протеолитических ферментов. А. с. № 546648 // Б.И. 1977.
43. Артюков А.А., Сахаров И.Ю. Метод получения коллагеназы. Пат. СССР № 4806987. 1995.
44. Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е., Артюков А.А., Кофанова Н.И. Способ получения коллагеназы. А. с. № 1526226 // Б.И. 1989.
45. Сахаров И.Ю., Артюков А.А., Березин В.И. Способ получения коллагеназы. Пат. № 1699350. 1991.
46. Исаев В.А., Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Степанов В.М., Попова И.М., Диденко Ю.Г. Способ получения препарата коллагеназы. А. с. № 2008353 // Б.И. 1994.
47. Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е., Митькевич О.З. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 120–195.
48. Климова О.А., Чеботарев В.Ю. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1999. Т. 128. С. 308–313.
49. Руденская Г.Н., Исаев В.А., Калелина Т.С., Степанов В.М., Мальцев К.В., Швеи С.В., Лукьянова Н.А., Кислицын Ю.А., Мирошников А.И. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 112–118.
50. Rudenskaya G.N., Isaev V.A., Shmoilov A.M., Karabasova M.A., Shvets S.V., Miroshnikov A.I., Brusov A.B. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2000. V. 88. P. 175–183.
51. Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 249–255.
52. Руденская Г.Н., Шмойлов А.М., Исаев В.А., Ксенофонтов А.В., Швеи С.В. // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 23–30.
53. Козловская Э.П., Артюхов А.А., Козловский А.С., Вожжова Е.И., Кофанова Н.Н., Еляков Г.Б. Ранозаживляющее средство Коллагеназа КК широкого спектра действия. Пат. № 95122189/14. 1995.
54. Сахаров И.Ю., Ягунов Н.А., Гуревич В.А., Литвин Ф.Е., Бобылев Г.Ф. Способ лечения гнойных ран. А. с. № 1617705. 1990.
55. Сахаров И.Ю., Глянцев С.П., Адамян А.А., Добыш С.В., Кочергина Л.Д., Литвин Ф.Е., Артюков А.А., Кузнецова В.А. Средство для удаления некротических тканей. Пат. № 5002616. 1992.
56. Исаев В.А., Карабасова М.А., Лютова Л.В., Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Степанов В.М. Способ лечения трофических язв. А. с. № 2057534. 1996.
57. Исаев В.А., Руденская Г.Н., Брусов А.В., Лютова Л.В., Карабасова М.А., Баднина Е.И., Андреев Г.В. Способ лечения рубцово-измененной ткани. Пат. № 98101769/14. 2000.
58. Саввина Т.В., Глянцев С.П., Заец Т.Л. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1996. Т. 121. С. 716–720.
59. Сандахчиев Л.С., Зиновьев В.В., Царева А.А. и др. // Вопр. вирусол. 1994. Т. 39. С. 284–286.
60. Руденская Г.Н., Лютова Л.В., Карабасова М.А., Андреев Г.В., Исаев В.А., Брусов А.В., Баднина Е.И., Резникова А.Е., Агеева Л.В. // Вестн. МГУ. 2000. Т. 41. С. 414–416.
61. Сахаров И.Ю., Глянцев С.П., Литвин Ф.Е., Гордеев В.Ф. // Вопр. мед. химии. 1994. Т. 40 (3). С. 18–20.
62. Сандахчиев Л.С., Ставский Е.А., Зиновьев В.В., Назаров В.П., Ренау И.В., Сатрихина Т.Н., Каткова Л.Р., Криницин Л.А., Колесникова Л.В., Таранов О.С., Омизов В.В., Овечкина Л.Г., Маркович Н.А., Малыгин Э.Г., Даниленко Е.Д., Воевода Т.В., Федосеева Л.К., Сизова Л.Ю., Масычева В.И. // Вестн. РАМН. 1998. Т. 4. С. 50–55.
63. Парамонов Б.А., Климова О.А., Чеботарев В.Ю. // Бюлл. эксп. биол. мед. 2000. Т. 129. С. 556–559.
64. Адамян А.А., Глянцев С.П., Сахаров И.Ю., Саввина Т.В. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1992. Т. 114. С. 660–663.

65. Сахаров И.Ю., Шехонин Б.В. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1993. Т. 116. С. 267–270.
66. Sakharov I.Yu., Glyanzev S.P., Litvin F.E., Savvina T.V. // Arch. Dermatol. Res. 1993. V. 285. P. 1–4.
67. Лютова Л.В., Карабасова М.А., Андреев Г.В., Исаев В.А., Руденская Г.Н. // Вопр. мед. химии. 1998. Т. 44. С. 292–295.
68. Ашмарин И.П., Исаев В.А., Самсонов М.А. Физиологические аспекты применения эйконола и других содержащих ПНЖК-3 продуктов при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // Метод. рекомендации МГУ, биологический факультет, 1999. С. 21.
69. Дадашев А.И., Юданова Т.Н., Сахаров И.Ю. Матер. I Междунар. конф. “Соврем. подходы к разраб. эффектив. перевязоч. средств и полимер. имплантатов” 25–26 нояб. 1992. С. 111–112.
70. Мадай Д.Ю., Шамолина И.И., Замыслова Т.И., Чуфаровская Т.И., Балин В.Н., Косачев И.Д. Матер. I Междунар. конф. “Соврем. подходы к разраб. эффектив. перевязоч. средств и полимер. имплантатов”. 25–26 нояб. 1992. С. 113–114.
71. Кантемирова Б.Ф., Истранов Л.П., Шехтер А.Б., Абоянц Р.К., Истранова Е.В., Милованова З.П., Панкратова С.В. Матер. I Междунар. конф. “Соврем. подходы к разраб. эффектив. перевязоч. средств и полимер. имплантатов”. 25–26 нояб. 1992. С. 117–118.
72. Антонов В.К., Воротынцева Т.И., Замолодчикова Т.С. // Докл. АН. 1991. Т. 324. С. 1318–1322.
73. Zamolodchikova T.S., Vorotyntseva T.I., Antonov V.K. // Eur. J. Biochem. 1995. V. 227. P. 866–872.

Brachyurins, Serine Collagenolytic Enzymes from Crabs

G. N. Rudenskaya

Phone: +7 (095) 939-5541; fax: +7 (095) 939-3181; e-mail: laboratoriahps@hotmail.com
Chemical Faculty, Moscow State University, Vorob'evy gory, GSP Moscow, 119899 Russia

The properties of brachyurins, proteolytic enzymes belonging to a new subfamily of chymotrypsin-like proteases, are considered. These enzymes, found in various species of crustacean, exhibit mixed substrate specificity and a marked collagenolytic activity. The enzymatic and physicochemical properties of brachyurins I and their primary and spatial structures are discussed in detail. A separate chapter is devoted to the preparations of collagenases from the hepatopancreas of king crab: their action on the damaged skin and use in medicine. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: brachyurins, collagenolytic enzymes from crabs, medicinal use, properties