

ДЕЙСТВИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА МОРИКРАЗЫ НА СОСТОЯНИЕ РУБЦОВОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Л.В.ЛЮТОВА, М.А.КАРАБАСОВА, Г.В.АНДРЕЕНКО, Г.Н.РУДЕНСКАЯ, В.А.ИСАЕВ,
А.Б.БРУСОВ

Московский государственный университет им.М.В.Ломоносова
117234, Воробьевы Горы, МГУ, Биологический факультет

Выделенный нами из гепатопанкреаса дальневосточного краба комплексный протеолитический препарат морикраза обладает высокой фибринолитической, АПАП (активность, подобная активатору плазмочена) активаторной и коллагенолитической активностями. Исходный препарат и его фракции были использованы для растворения рубцовой ткани в условиях *in vitro*. Показано, что максимальная используемая нами концентрация морикразы растворяла 10 мг рубца за 14-16 часов при температуре 37°C. Наиболее активной оказалась 3-я фракция, состоящая из коллагенолитической протеиназы РС и трипсина.

Минимальную активность в отношении лизиса ткани проявила 5 фракция, состоящая преимущественно из трипсина.

Полученные результаты дают основание для дальнейшего изучения морикразы и ее компонентов в условиях *in vivo* и *in vitro* с целью возможного практического применения.

Ключевые слова: протеазы, фибринолитическая активность, рубец, коллагенолитическая активность

ВВЕДЕНИЕ. Препарат морикраза, разработанный НПО "Тринита" совместно с химическим факультетом МГУ им.М.В.Ломоносова, получен из гепатопанкреаса дальневосточного краба *Paralithodes camtschatic* (РС) по оригинальной методике [1]. Он представляет собой комплекс эндопротеиназ и экзопептидаз [1-5]. Наряду с общей протеолитической активностью, он обладает высокой фибринолитической [4,6] и плазминоподобной активностями и способен активировать плазминоген [6]. При исследовании в условиях *in vitro* он способен растворять стабилизированный фибрин, активировать плазминоген, отщепляя от него пептид и превращая неактивный профермент в активный - плазмин, а также растворять образованные в пробирке сгустки человеческой и крысиной крови. Интересно, что скорость лизиса им сгустков человеческой крови значительно выше, чем растворение сгустков из крови крыс. Это связано, возможно, с разным уровнем ингибиторной активности в плазме человека и крысы. Введенный внутривенно белым крысам, препарат значительно повышал фибринолитический потенциал крови, не вызывая побочных эффектов и летальных исходов. Нанесенный на поверхность инфицированной раны, образовавшейся в следствие травмы на шее крысы, препарат способствовал быстрому ее заживлению. На модели венозного тромбоза в эксперименте *in vivo*, морикраза вызвала лизис тромбов у 90% крыс в течении 3-4 часов [6].

Кроме этих свойств морикраза обладает и высокой коллагенолитической активностью, выявленной методом вискозиметрии, в 2-3 раза превышающей

аналогичную активность известных отечественных коллагенолитических препаратов, например дигестазы, из гепатопанкреаса камчатского краба, полученного другим способом.

Целью настоящего исследования было изучение возможности растворения рубца, состоящего, в основном, из коллагена, в условиях *in vitro* комплексным препаратом морикразы и ее фракциями.

МЕТОДИКА. Субстратом для морикразы и ее фракций служили образцы тканей, взятые во время операции по иссечению рубцов лица, шеи и ушной раковины в НИИ Стоматологии. Сразу после взятия образцы помещали в ледяную баню, затем замораживали при $t - 40^{\circ}\text{C}$ и при этой температуре хранили до начала исследования. Перед началом эксперимента рубцы размораживали, брали навески по 10 мг и помещали в пробирки, содержащие разные концентрации (2 мг/мл, 1 мг/мл и 0,5 мг/мл) морикразы или равные объемы ее фракций. Затем пробирки помещали в суховоздушный термостат при 37°C и отмечали время растворения рубцовой ткани.

Препарат морикразы получали описанным ранее методом [1]. Фракционирование суммарного препарата проводили с помощью анионообменной хроматографии на аминосилохроме. Из морикразы (фракция 1) были получены фракция 2 (смесь протеиназ) и фракция 3 (коллагенолитическая протеиназа РС и трипсин РС). Фракцию 2 рехроматографировали на колонке с ДЭАЭ - сефадексом. Получили фракцию 4 (эластаза РС и карбоксипептидаза РС) и фракцию 5 (преимущественно трипсин РС).

Все фракции исследовали на способность фермента превращать плазминоген в плазмин, (АПАП), плазминоподобную и фибринолитическую активности. Результаты оценивали по времени лизиса сгустка зуглобулиновой фракции плазмы и зонам лизиса на фибриновых прогретых и непрогретых пластинах после нанесения на них раствора зуглобулинов [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Используемая максимальная концентрация морикразы соответствовала 700 мм^2 фибринолитической, 500 мм^2 АПАП и 90 мм^2 плазминоподобной активностям. При разведении в 2 и 4 раза снижение фибринолитической активности происходило, в основном, за счет АПАП (рис. 1). Навеска рубца, помещенная в раствор с максимальной концентрацией морикразы, растворилась за 14-16 часов, с минимальной - через 3 суток. В качестве контроля, вместо морикразы был использован физиологический раствор.

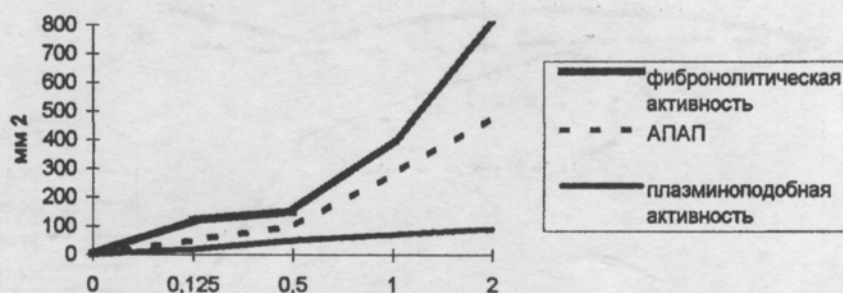


Рисунок 1

Изменение общей фибринолитической, АПАП и плазминоподобной активностей препарата морикразы в зависимости от его концентрации.

Во всех полученных фракциях морикразы были определены концентрации белка (табл.), фибринолитическая, АПАП и плазминоподобная активности (табл., рис.2). Наибольшей удельной активностью обладали фракции 4 и 5 (табл.). Изучение в динамике изменения веса образца рубца под действием каждой из фракций выявило, что

Таблица 1. Содержание белка и фибринолитическая активность фракции РС.

№ фракции	содержание белка (мг/мл)	фибринолитическая активность (мм ²)	удельная фибринолитическая активность (условн.ед./мг белка)
1	1,1	840	254,5
2	1,05	1400	444,4
3	1,5	2060	457,7
4	0,6	1380	766,6
5	0,2	1960	3266,6



Рисунок 2.

Фибринолитическая, плазминоподобная и активаторная активности в 1-5 фракциях морикразы.

наиболее активна - 3 фракция, а практически неактивна в отношении лизиса рубцовой ткани - пятая. Результаты показали, что фракция 3, обладающая удельной фибринолитической активностью 444,5 условн.ед./мг белка (содержание белка 1,5 мг/мл) оказалась более активной в отношении коллагенолиза, а 5 фракция с высокой удельной фибринолитической активностью 3266,6 и содержанием белка 0,2 мг/мл, практически не лизировала рубец (рис.3).

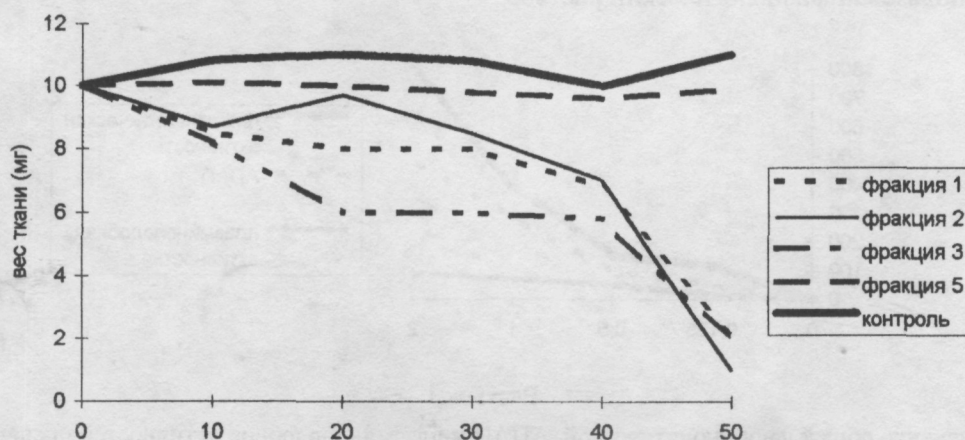


Рисунок 3.

Время растворения рубцовой ткани в растворах 1, 2, 3 и 5 фракциях морикразы.

Проведенное исследование отдельных фракций показало, что только 3 фракция содержит коллагенолитическую сериновую протеиназу РС (5), что по-видимому и

обеспечивает лизис рубца, содержащего плотную фиброзную соединительную ткань с коллагеновыми волокнами различной зрелости.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования отдельных фракций комплексного препарата морикразы в зависимости от целей его применения и дают основание для дальнейшего изучения морикразы и ее фракций в условиях как *in vitro*, так и *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Исаев В.А., Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Степанов В.М., Попова И.М., Диденко Ю.Г. (1991) Способ получения препарата коллагеназы патент 2008353 от 5 августа Бюлл.изобр.№4, 1994 г.
2. Климова О.А., Ведищева Ю.В., Стронгин А.Я. (1991) Докл.Акад.Наук СССР, 317 (2), 482-484.
3. Руденская Г.Н., Исаев В.А., Степанов В.М., Дунаевский Я.Е., Баратова Л.А., Калебина Т.С., Нурминская М.В. (1996), Биохимия, 61, 1119-1132.
4. Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е., Митькевич О.З. (1994) Биорг.химия, 20, (2), 190-195.
5. Sacharov I.Yu., Litvin F.E. (1990), Comp. Biochem. Physiol., V.B, 407-410.
6. Исаев В.А., Лютова Л.В., Карабасова М.А., Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Андреев Г.В. (1993) Тезисы докладов и сообщений III Симпозиума Химия протеолитических ферментов, Москва, 111.
7. Методы исследования фибринолитической системы крови, (ред. Г.В.Андреев) (1981), из-во МГУ, Москва

THE EFFECT OF PROTEOLYTIC PREPARATION MORICRASA ON CICATRICAL TISSUE *IN VITRO*

L.V.LYUTOVA, M.A.KARABASOVA, G.V.ANDREENKO, G.N.RUDENSKAYA,
V.A.ISAEV, A.B.BRUSOV

School of Biology, M.V.Lomonosov Moscow State University, Vorobjovi Gori,
Moscow, 117234

Proteolytical preparation moricrasa was isolated from hepatopancreas of *Paralithodes camtschatic*. Moricrasa and its fractions were used for lysis of cicatricial tissue under *in vitro* conditions. It was found that moricrasa in concentrations 0,5 mg/ml and 2 mg/ml lysed the cicatrix during 72 and 14-16 hours, respectively.

The fraction consisted of collagenolytic proteinase PC and trypsin relealed maximal activity of fraction of moricrasa was absent.

Key words: proteases, fibrinolysis, cicatrix, colagenolytic activity.