

УДК 577.128

©Коллектив авторов

**ЛИЗОЦИМНАЯ АКТИВНОСТЬ СЕКРЕТА СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ
МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ ВИДОВ:
H. VERBANA, H. MEDICINALIS И *H. ORIENTALIS***

И.П. Баскова^{1*}, О.В. Харитонов², Л.Л. Завалова¹

¹Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва,
Воробьёвы горы, 1/12; факс: (095)939-4309; эл. почта: Salival@yandex.ru

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
119997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; факс: (095) 330-6538;
эл. почта: lz@ibch.ru

Показано, что секреты слюнных желез медицинских пиявок трех видов различаются по уровню их лизоцимной и пептидогликан-лизирующей активности. Использование синтетического флуорогенного субстрата (4-метилумбеллиферил тетра-N-ацетил-β-хитотетраоксида) позволило количественно оценить одну из пептидогликан-лизирующих активностей (гликозидазную) и представить её уровень в секретах всех трёх видов пиявок в сравнении с яичным лизоцимом. Предполагается, что лизоцимная активность секретов медицинской пиявки обусловлена не только пятью изоформами дестабилазы-лизоцима, но и другими ферментами, способными утилизировать используемые субстраты, в том числе лизоцимами других типов, отличными от i- (invertebrate) лизоцимов, к числу которых принадлежит дестабилаза-лизоцим.

Ключевые слова: секрет слюнных желез медицинской пиявки, лизоцимная активность, гликозидазная активность, субстрат 4-метилумбеллиферил-тетра-N-ацетил-β-хитотетраоксида, яичный лизоцим, дестабилаза-лизоцим.

ВВЕДЕНИЕ. Секрет слюнных желез (ССЖ) медицинской пиявки является гуморальным агентом гирудотерапии, широко используемого метода лечения многих заболеваний путем приставления пиявок [1]. Известно бактерицидное и антимикробное действие гирудотерапии [2-4]. Нашими работами показано, что эти свойства пиявочного секрета в значительной степени обусловлены содержащимся в нём бифункциональным ферментом дестабилазой-лизоцимом, который сочетает изопептидазную и лизоцимную функции [5]. Последняя определялась как пептидогликан-лизирующая (ПГЛ) активность, оцениваемая по разрушению клеточных стенок *M. lysodeikticus* [6, 7] и по расщеплению

* - адресат для переписки

гексамера N-ацетил-глюкозамина на ди- и тетрамер при тестировании методом масс-спектрометрии активности рекомбинантного белка, выделенного из экстракта клеток *Spodoptera frugiperda* [8]. Известно, что лизоцимы гидролизуют $\beta(1-4)$ -связь между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина в молекуле пептидогликана клеточной стенки бактерий. Но лизоцимная или ПГЛ активность, как механизм разрушения пептидогликанов клеточных стенок бактерий, может включать, помимо гликозидазной, также амидазную и пептидазную активности, направленные на гидролиз связи между N-ацетилмурамовой кислотой и L-аланином и пептидных связей между аминокислотами пептидного “хвоста”, присоединенного к остаткам ацетилмурамовой кислоты пептидогликана.. Это также приводит к разрушению клеточной стенки бактерий [9].

В настоящей работе мы попытались сравнить общую ПГЛ-активность и одну из её составляющих, гликозидазную, в ССЖ медицинской пиявки (МП) трёх видов: *Hirudo verbana*, *Hirudo medicinalis* и *Hirudo orientalis*, выбрав для определения ПГЛ-активности клеточные стенки *M. lysodeikticus*, а для определения гликозидазной активности - флуорогенный субстрат 4-метилумбеллиферил тетра-N-ацетил- β -хитотетраоксида ((GlcNAc)4-MeU), впервые описанный как субстрат лизоцима в 1980 году [10, 11]. В качестве контроля использовали лизоцим куриного яйца.

МЕТОДИКА.

Отбор секрет слюнных желёз (ССЖ) от МП трёх видов: *H. verbana*, *H. medicinalis* и *H. orientalis*, содержащихся на биофабрике “Гируд И.Н.” (г. Балаково) и голодавших не менее 4 месяцев, осуществляли описанным ранее методом [6]. Каждый анализируемый препарат ССЖ представлял пул ССЖ, полученный не менее чем от 20 особей каждого вида.

Пептидогликан-лизирующую активность определяли нефелометрически по просветлению суспензии клеточных стенок бактерии *M. lysodeikticus* (“ICN”, США) по ранее описанному нами методу [7].

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [12].

Гликозидазную активность определяли по методу [10], используя флуорогенный субстрат 4-метилумбеллиферил b-D-N,N',N'',N'''-тетра-N-ацетил- β -хитотетраоксида ((GlcNAc)4-MeU). К 0,05 мл раствора (GlcNAc)4-MeU в 20 мМ ацетатном буфере (pH 5,2) добавляли 0,1 мл ССЖ или яичного лизоцима. Реакцию проводили при 42°C и останавливали через 15, 30, 45 и 60 минут добавлением 1 мл глицинкарбонатного буфера, pH 10,4-11,5. Флуоресценцию измеряли на спектрометре Perkin Elmer LS 55 (Великобритания) при длинах волн, равных 365 нм (возбуждение) и 450 нм (испускание). Каждое измерение повторяли многократно. Количество отщепившегося 4-метилумбеллиферона (MeU) определяли по калибровочной кривой, полученной при измерении флуоресценции различных концентраций MeU в том же буфере. Ферментативную активность (A) рассчитывали по формуле:

$$A = F / c \cdot t \cdot v \cdot F_0 = [1 \text{ нМ (MeU)} / \text{мг (белка)} \cdot \text{ч}],$$

где F – зафиксированная флуоресценция; F_0 соответствует флуоресценции 1 нМ MeU; c – концентрация белка, мг/мл; t – время инкубации, ч; v – объём вносимого образца, мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Гликозидазная активность. Удельную гликозидазную активность рассчитывали по флуоресценции отщепившегося 4-метилумбеллиферона (MeU) за 1 ч инкубации в расчёте на 1 мг белка ССЖ или яичного лизоцима. Концентрация белка препаратов ССЖ и яичного лизоцима составляла 0,05 мг/мл. Значения флуоресценции и рассчитанной на их основе удельной гликозидазной активности (нг MeU/мг белка/1 ч) составляли соответственно: для ССЖ *H. verbana* – 0,36 и 1,54; для ССЖ *H. medicinalis* – 0,20 и 0,84; для ССЖ *H. orientalis* – 0,21 и 0,90; для яичного лизоцима - 0,47 и 1,97 (рис. 1).

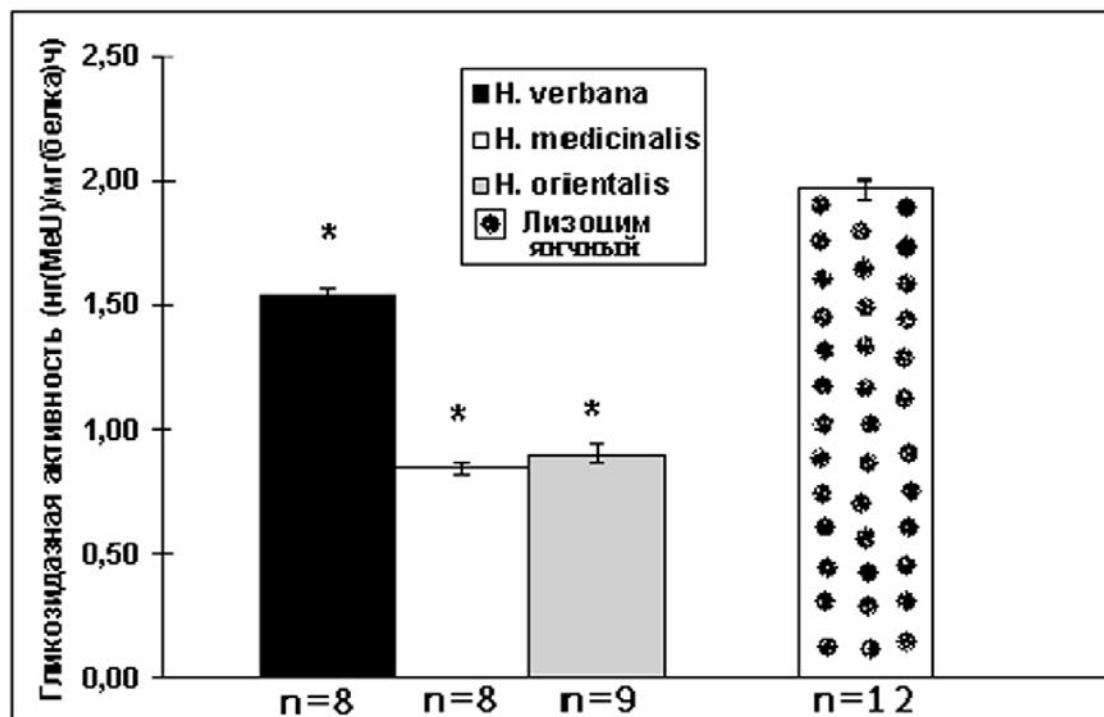


Рисунок 1.

Удельная гликозидазная активность ССЖ медицинских пиявок трех видов в сравнении с яичным лизоцимом (* $p < 0,001$, критерий Манна-Уитни).

Из представленных результатов видно, что гликозидазная активность секрета пиявки вида *H. verbana* почти в 2 раза превышает активность двух других видов МП. Гликозидазная лизоцимная активность секретов *H. medicinalis* и *H. orientalis* практически одинаковая. При этом активность яичного лизоцима более чем в 2 раза превышает активность ССЖ *H. medicinalis* и *H. orientalis* и достоверно превышает активность ССЖ *H. verbana*.

Пептидогликан-лизирующая (ПГЛ) активность. ПГЛ активность ССЖ различных видов МП определяли по степени разрушения клеточных стенок бактерии *Micrococcus lysodeikticus* (МЛ), оценивая уменьшение оптической плотности при 450 нм по сравнению с отрицательным контролем, где вместо ССЖ использовали физиологический раствор (рис. 2А). В качестве положительного контроля использовали яичный лизоцим в физиологическом растворе (рис. 2Б).

На основании результатов, представленных на рисунке 2, были построены гистограммы, иллюстрирующие удельную (в расчете на 1 мг суммарного белка) ПГЛ активность ССЖ трех видов МП в сравнении с удельной ПГЛ активностью яичного лизоцима (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что лизоцимная активность секретов трех видов МП приблизительно в 10 раз ниже активности препарата яичного лизоцима. Активности секретов изучаемых видов пиявок достоверно различаются между собой, причем в ССЖ *H. orientalis* она в 2-3 раза ниже, чем в ССЖ *H. verbana* и *H. medicinalis* (рис. 3).

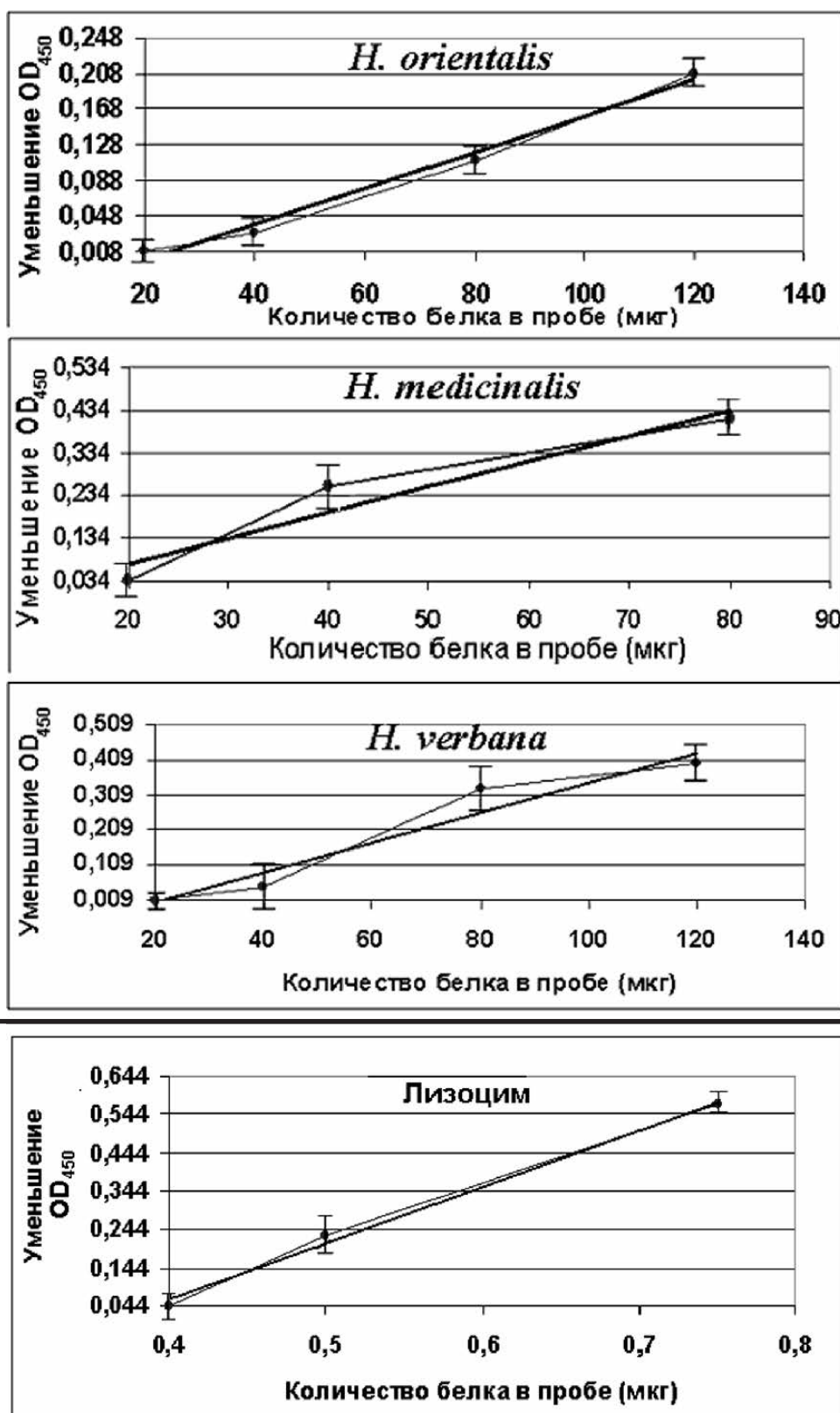


Рисунок 2.

Зависимости уменьшения OD₄₅₀ от концентрации суммарного белка в препаратах ССЖ трёх видов МП (А) и яичного лизоцима (Б) после 2-х часовой инкубации с суспензией клеточных стенок М1 при 25°C.

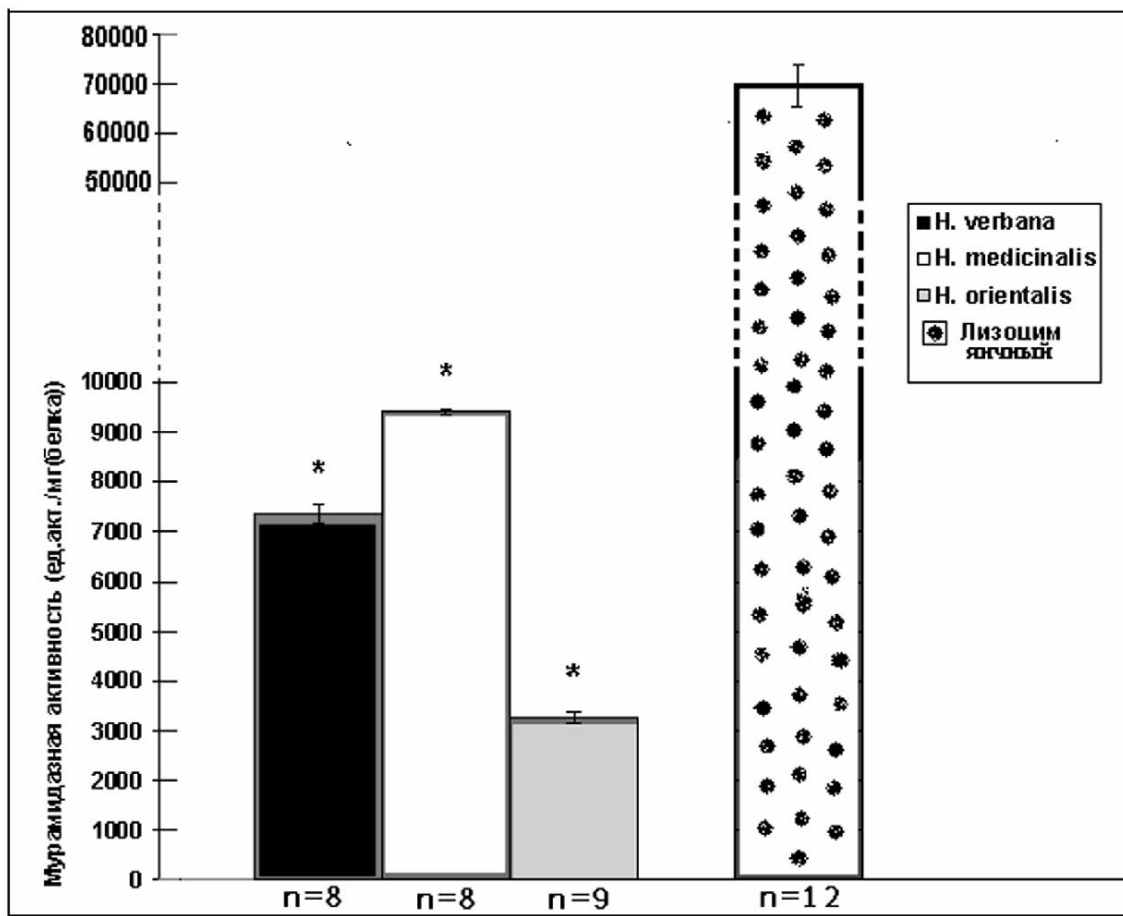


Рисунок 3.

Удельная ПГЛ активность ССЖ МП трех видов и яичного лизоцима. Субстрат - клеточные стенки *MI* (* $p < 0,001$, критерий Манна-Уитни).

ОБСУЖДЕНИЕ. В соответствии с классификацией пептидогликан-лизирующих ферментов, основанной на химическом механизме действия, их подразделяют на лизоцим-подобные мурамидазы ($\beta(1-4)$ -гликозидазы (КФ 3.2.1.17); N-ацетил-мурамоил-L-аланин-амидазы (КФ 3.5.1.28), пептидазы (КФ 3.4.17) и эстеразы (КФ 3.1.1.2)) [9]. На рисунке 4 представлено схематическое изображение пептидогликана с указанием точек действия перечисленных выше лизирующих ферментов [13] и изопептидаз. В настоящей работе использованы субстраты, позволяющие оценить либо общую пептидогликан-лизирующую активность ССЖ (с клеточными стенками *MI*), либо исключительно гликозидазную (с синтетическим субстратом (GlcNAc)4-MeU). Сравнение удельной гликозидазной активности ССЖ пиявок трёх видов показало, что она в 2 раза выше в секрете *H. verbona*, чем в секретах двух других видов пиявок. В то же время гликозидазная активность яичного лизоцима всего в 1,5-2 раза превышает такую активность пиявочных секретов.

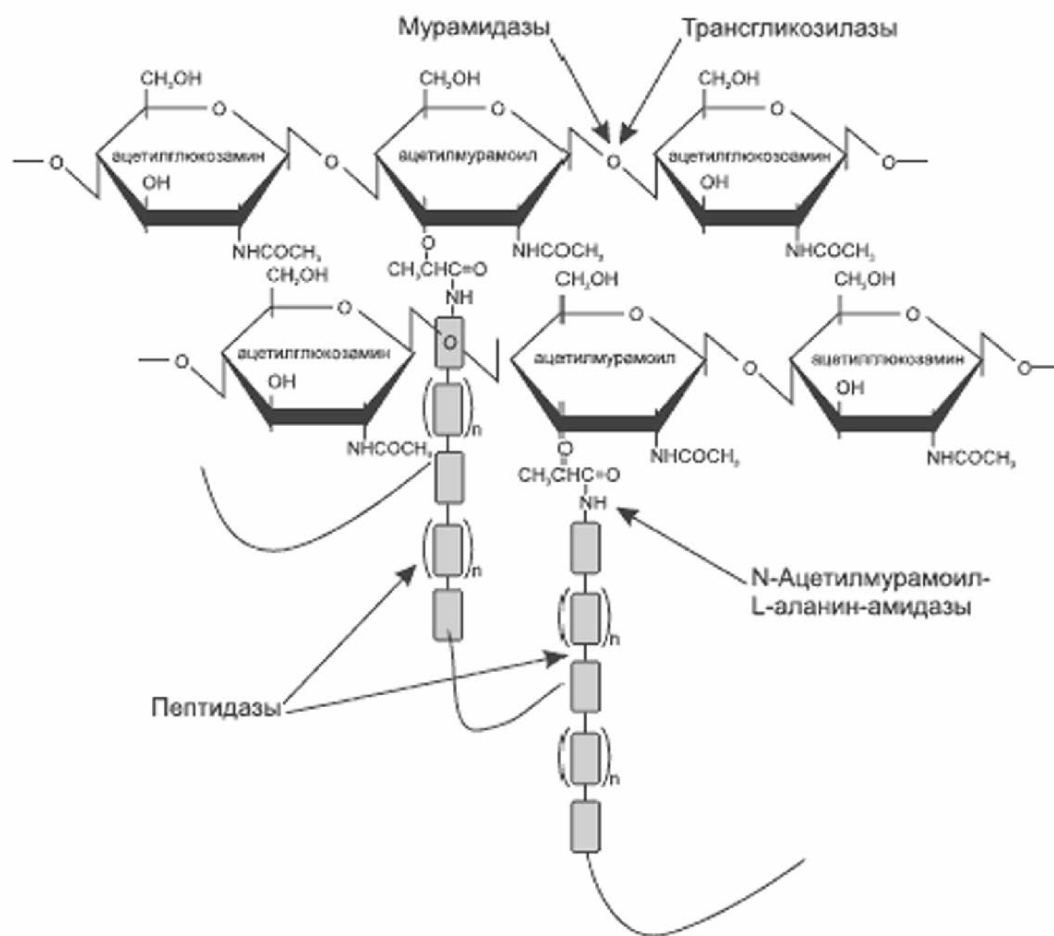


Рисунок 4.

Структура пептидогликана и литические ферменты, способные участвовать в ее деградации [13].

Если учесть, что на долю дестабилазы-лизоцима в составе ССЖ, содержащем более 100 белковых компонентов [14], приходится только незначительная часть белка, обусловленная пятью изоформами дестабилазы-лизоцима, [15, 16], то оказывается, что активность гликозидаз ССЖ значительно превышает таковую яичного лизоцима. Это также указывает на то, что в составе ССЖ, кроме дестабилазы-лизоцима, могут присутствовать другие ферменты, для которых (GlcNAc)4-MeU является субстратом.

Суммарная ПГЛ активность в большей степени выражена в ССЖ *H. medicinalis* и *H. verban*, в то время как в *H. orientalis* эта активность в 2-2,5 раза ниже. Исключительно высокое значение удельной активности яичного лизоцима относительно лизоцимной активности ССЖ коррелирует с незначительным (относительно тотального белка ССЖ) присутствием в его составе дестабилазы-лизоцима. Однако вряд ли сопоставление этих активностей позволит оценить истинное количество лизоцим-подобных ферментов в ССЖ, поскольку, например, известно, что удельная ПГЛ активность очищенного нативного фермента дестабилазы-лизоцима в 4 раза превышает удельную активность яичного лизоцима [7].

Таким образом, лизоцимная активность пиявочных секретов обусловлена не только дестабилазой-лизоцимом, но и другими ферментами, способными утилизировать используемые субстраты.

Несмотря на то, что ССЖ содержит соединения, обеспечивающие его полифункциональность [1, 17], в настоящее время мы не располагаем данными о наличии в составе пиявочных секретов других ферментов, способных утилизировать рассматриваемые субстраты. Остается только предполагать, что в составе ССЖ могут присутствовать не только лизоцимы типа i- (invertebrate), к которому относится дестабилаза-лизоцим [7], но и лизоцимы других типов. Такая возможность следует, например, из анализа генома эволюционно родственного медицинской пиявке организма клубничной нематоды *C. elegans*, в составе которого обнаружены гены лизоцимов с-, g- и i-типов [18].

Таким образом, лизоцимная активность является важным признаком, характеризующим секреты пиявок разных видов, что находится в соответствии с полученными нами ранее результатами о присутствии различных изоформ дестабилазы-лизоцима в секретах пиявок *H. verbana*, *H. medicinalis* и *H. orientalis* [16].

Работа выполнена при финансовой поддержке ИНТАС (грант 05-1000008-8147).

ЛИТЕРАТУРА

1. Баскова И.П., Исаханян Г.С. (2004) Гирудотерапия. Наука и практика. Монолит, М.
2. Блюменталь Н.Л. (1936) Вестник хирургии им. Грекова, **43**, 3-11.
3. Петров И.Р., Лапкина Н.В., Капица Л.М., Протасов Н.Н. (1936) Вестник хирургии им. Грекова, **43**, 163-178.
4. Шполянский Г.М. (1944) в: Сборник работ по военно-полевой и общей хирургии, посвященный XXX-летию научной деятельности А.В.Смирнова, Л., с. 162-164.
5. Баскова И.П., Завалова Л.Л. (2008) Биоорг. химия, **34**, 337-343.
6. Баскова И.П., Завалова Л.Л., Басанова А.В., Сасс А.В. (2001) Биохимия, **66**, 1690-1697.
7. Zavalova L., Baskova I., Lukyanov S., Sass A., Snezhkov E., Akopov S., Artamonova I., Archipova V., Nesmeyanov V., Kozlov D., Benevolensky S., Kiseleva V., Poverenny A., Sverdlov E. (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1478**, 69-77.
8. Завалова Л.Л., Баскова И.П., Барсова Е.В., Снежков Е.В., Акопов С.Б., Лопатин С.А. (2004) Биохимия, **69**, 952-958
9. Мирошников К.А., Чертков О.В., Назаров П.А., Месянжинов В.В. (2006) Успехи биол. химии, **46**, 65-98.
10. Yang Y., Hamaguchi K. (1980) J. Biochem., **87**, 1003-1014.
11. Yang Y., Hamaguchi K. (1980) J. Biochem., **88**, 829-836.
12. Bradford M. (1976) Analyt. Biochem., **72**, 248-254.
13. Stone K (2002) Science, **298**, 728-731.
14. Баскова И.П., Завалова Л.Л., Басанова А.В., Мошковский С.А., Згода В.Г. (2004) Биохимия, **69**, 945-951.
15. Zavalova L.L., Artamonova I.I., Berezhnoy S.N., Tagaev A.A., Baskova I.P., Andersen J., Roepstorff P. Egorov Ts.A. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun., **306**, 318-323
16. Баскова И.П., Кострюкова Е.С., Власова М.А., Харитоновна О.В., Левицкий С.А., Завалова Л.Л., Мошковский С.А., Лазарев В.Н. (2008) Биохимия, **73**, 388-394.
17. Баскова И.П., Фернер З., Балкина А.С., Козин С.А., Харитоновна О.В., Завидова Л.Л., Згода В.Г. (2008) Биомед. химия, **54**, 127-139.
18. Schulenburg H., Boehnisch C. (2008) BMC Evolutionary Biology, **8**, 114-133.

Поступила: 08. 12. 2009.

LYSOZYME ACTIVITY OF THE SALIVARY GLAND SECRETION OF THE MEDICINAL LEECH *H. VERBANA*, *H. MEDICINALIS* AND *H. ORIENTALIS*

I.P. Baskova¹, O.V. Kharitonova², L.L. Zavalova¹

¹Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Vorobyevy Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia; fax: (495)939-4309; e-mail: saliva1@yandex.ru

²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 119997 Russia; fax: (495)330-6538; e-mail: lz@ibch.ru

Salivary gland secretions of three species of the medicinal leech differ in the level of lysozyme peptidoglycan-lysing activity. Using the synthetic fluorogenic substrate, 4-methyl-umbelliferyl tetra N-acetyl- β -chitotetraosid, the glycosidase activity (as one of peptidoglycan-lysing activities) of salivary gland secretion of three species of the medicinal leech was quantitatively evaluated in comparison with egg lysozyme. It is supposed, that lysozyme activity of the leech secretions is determined not only by 5 isoforms of destabilase-lysozyme, but by some other enzymes which can utilize this substrate. These may be lysozymes other than i- (invertebrate) lysozymes (such as destabilase-lysozyme, or related enzymes).

Key words: medicinal leech salivary gland secretion, lysozyme activity, glycosidase activity, substrate 4-methylumbelliferyl-tetra-N-acetyl- β -chitotetraoxide, egg-lysozyme, destabilase-lysozyme.