

Биологично активни компоненти в градинския охлюв и приложението им

Павлина Долашка

Bioactive compounds in the garden snails and their application: Hemolymph of molluscan snails is a complex mixture of biochemically and pharmacologically-active components such as peptides and proteins. Hemocyanin was isolated from the hemolymph of Bulgarian garden snails *Helix lucorum* and *Helix aspersa*. In contrast with other molluscan hemocyanins, three isoforms (β -HaH, α_N -HaH and α_D -HaH) with molecular mass about 450 kDa were isolated. The structure and oligosaccharide moieties of the molluscan Hcs *Rapana venosa* and *Helix lucorum* have been determined and recently received particular interest due to their immunostimulatory properties. These proteins have been widely used in cancer investigations and cancer therapy either as non-specific or active stimulators of the immune system.

Hemocyanins also have been found to show antiviral activity against the *in vitro* replication of human respiratory syncytial virus (hRSV) and influenza virus A/Aichi/2/68/H3N2 by the CPE-inhibition assay.

Antimicrobial peptides are gaining attention as antimicrobial alternatives to chemical food preservatives and commonly used antibiotics. Therefore, for the first time we have explored the isolation, identification and characterisation a novel antimicrobial peptides produced by the hemolymph of garden snail *H. lucorum*. Several peptides were identified from the hemolymph of *H. lucorum* and the mucus of *Helix aspersa* by ultrafiltration and reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Mass spectrometry showed the precise molecular weight of the peptides between 3000 and 9500 Da. The N-terminal sequences of the peptides identified by Edman degradation matched no peptides in the MASCOT search database, indicating novel proline-rich peptides. Several of the Pro-rich peptides also showed strong antimicrobial activities against different bacteria.

Key words: Bioactive compounds, hemocyanins, peptides, antitumor activity, antimicrobial activity.

ВЪВЕДЕНИЕ

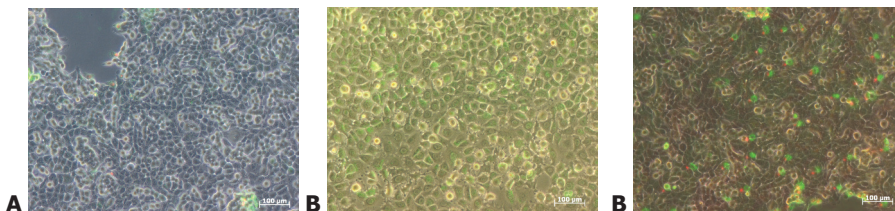
Нашите изследвания през последните 20 години бяха насочени към изолиране и характеризиране на активни вещества от различни природни източници. Охлювът се оказва безценен източник на редица биологично активни компоненти. Едни от тях са хемоцианини и пептиди от черноморската рапана *R. venosa* и градинския охлюв *H. Lucorum* (1-4). След анализиране на структурата и съвместа на тези вещества с различни съвременни методи и техники, е установена възможността за прилагането им в различни продукти.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Както слузта, така и хемолимфата на охлювите, представляват сложни смеси от биохимично- и фармакологично-активни съставки като пептиди, гликопептиди и протеини. От хемолимфата на български градински охлюви *H. lucorum* и *Helix aspersa* е изолиран хемоцианин, който изпълнява същата функция, като хемоглобина, а именно да пренася кислород до всички клетки от организма. В контраст с другите хемоцианини, три изоформи (β -HaH, α_N -HaH и α_D -HaH) с молекулна маса около 450 кДа бяха изолирани от хемоцианин от *H. lucorum* и *H. Aspersa* (3). Определени са структурата и олигозахаридният състав на хемоцианин от *H. lucorum*, които предизвикват особен интерес, поради имуностимулиращото му свойство (3,4). Тези протеини се използват за изследване и терапия на рак или като неспецифични или активни стимулатори на имунната система (5,6). Хемоцианините могат да бъдат носители на слабо имуногенни антигени, и са перспективни адюванти за вирусни и бактериални ваксини. Съвместно с болницата по урология в гр. Тюбинген, Германия е установена способността на изолираните хемоцианини *H. lucorum* и *H. aspersa* да бъдат използвани като нови анти-туморни и имунотерапевтични препарати.

Установихме значим ефект на получения хемоцианин от градински охлюв върху туморни клетки, взети от човешки пикучен мехур на пациенти. Човешки

туморни клетъчни линии HT1197, T-24 и Cal-29 бяха третирани с различни хемоцианини и анализирани след 24, 48 и 72 часа. На фигура 1 е показан ефектът на детоксирубицин (известен антитуморен препарат) и функционална единица от хемоцианин *H. lucorum* върху туморна клетъчна линия T-24 след 24 час инкубиране.



Фиг. 1. А) Туморна клетъчна линия T-24 – контрола; Б) 24 часа след третиране на туморни клетки T-24 с детоксирубицин (известен антитуморен препарат); В) 24 часа след третиране с 0,5 mg/ml ФЕ от хемоцианин *H. Lucorum*.

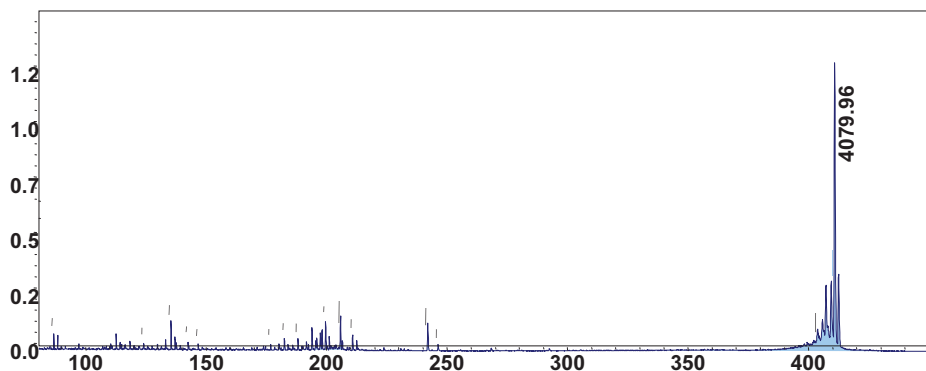
Двата хемоцианина показват антитуморна активност и срещу други туморни клетки, като миши модел на тумор на Graffi (7,8). Тъй като този тумор се намира на повърхността на тялото, то ще бъде разработен гел за директното третиране на тумора.

Също така хемоцианинът от градински охлюв показва висок ефект (89%), когато е приложен след инфекция с паразита *Trichinella spiralis*. Той унищожава нематодите в мускулите, като разрушава капсулите им, запазва мускулните влакна и помага на имунните клетки да разрушат ларвите на *Trichinella* (9).

Установено е, че хемоцианините притежават и антивирусен ефект. Ето защо изследвахме ефектът на хемоцианините върху следните вируси: а) с обвивка: грипен вирус А (Aichi/68/H3N2 и Weybridge/H7N7), вирус на Нюкясълската болест (щам Русев), респираторно-синцитиален вирус (щам Long), бовинен пестивирус (щам С1), вирус на Леса Семлики, вирус херпес симплекс 1 (щам DA), свински херпесен вирус на псевдобеса (щам А) и вирус вакция (щам НИЗПБ). Установихме, че хемоцианините показват антивирусна активност срещу *in vitro* репликацията на човешки респираторен синцитиален вирус (hRSV), грипен вирус A/Aichi/2/68/H3N2, Коксакивирус В1 (щам Connecticut), човешки аденовирус тип 2 и Херпес симплекс вирус (HSV-1). Тъй като 9 от 11 протеини, разположени на обвивката на вируса са добре изучени, то предложихме модел за свързване на въглехидратната верига на хемоцианина с аминокиселинни остатъци от полипептидната верига на тези протеини (10).

В хемолимфата и слюзта на градинския охлюв се съдържат и нискомолекулни съединения, като пептиди, гликопептиди, липиди, гликани и др. Антимикробните пептиди привличат вниманието и са представени като алтернативи на химическите консерванти за храни и на често използваните антибиотици. Ето защо, за първи път са изолирани, идентифицирани и характеризирани нови антимикробни пептиди от хемолимфата на градински охлюв *H. Lucorum* и слюзта на *H. aspersa*.

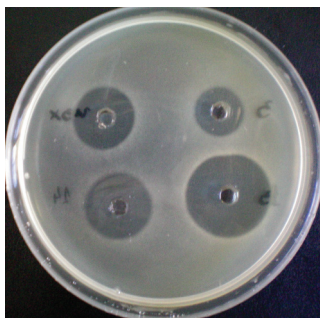
Тези пептиди бяха изолирани чрез ултрафилтрация и обратна фаза високоефективна течна хроматография (RP-HPLC). Чрез маспектрометричен анализ беше определена молекулна маса на пептиди между 3000 и 9500 Да (Фиг.2).



Фиг. 2. MS спектър на пептид от *H. lucorum* с маса 4079,96, измерена на MALDI-TOF

N-крайните аминокиселинни последователности (АКП) на изолираните пептиди бяха определени след Едманово разграждане. При сравняване със съответни пептиди в базата данни MASCOT, не бяха открити други пептиди със същата маса и N-крайните АКП. Установено беше, че от хемолимфата и слузта на охлювите са изолирани нови пептиди, богати пролин.

Някои от Pго-съдържащите пептиди също показаха антимикробна активност срещу различни бактерии, като: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*. Особено силно въздействие беше установено на екстакта от охлюви върху бактерията *E. coli*. Също така, два от изолираните пептиди и изходната слуз инхибират растежа на бактериалния щам *Propionibacterium acnes* PA266 (Фиг.3).



Фиг. 3. Тестване на ефекта на три пептида и изходната слуз срещу бактериалния щам *Propionibacterium acnes* PA266

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведените изследвания върху хемолимфата и слузта на градински охлюви *H. lucorum* и *H. aspersa* позволява да се направят следните изводи:

В хемолимфата и слузта се намират различни биологично активни вещества, които могат да бъдат използвани в козметичната, фармацевтичната и др. индустрии.

1. Пептиди с антибактериална активност, изолирани от слузта и хемолимфата на морски и градински охлюви са натурални антибиотици срещу различни бактерии.

2. Кислород-пренасящите гликопротеини, хемоцианините, притежават:

А) Антитуморна активност спрямо клетъчни линии на тумор на пикучния мехур, тумор на Графи и тумор на Герен;

Б) Хемоцианините са доказани имуностимулатори, като носители на хаптени и предизвикват продуциране на антитела.

В) Хемоцианините проявяват антивирусна активност спрямо човешки аденовирус тип 2 и Херпес симплекс вирус (HSV-1).

Г) Установена е антибактериална активност на хемоцианина, като 90% забавя развитието на *Trichinella spiralis*.

3. Съдържащите се протеини, ензими, пептиди, липиди и др. В слюзта на охлювите спомага за възстановява и подмладява кожата, а също и ускорява зарастването на белези и рани. Ето защо тя намира приложение в козметиката и фармацията. Екстрактът от слюзта на градинския охлюв притежава невероятни свойства да регенерира клетките.

ЛИТЕРАТУРА

[1] P. Dolashka-Angelova, M. Schick, S. Stoeva and W. Voelter. Isolation and partial characterization of the N-terminal functional unit of subunit RтH, from *Rapana thomasi* grosse hemocyanin. *Int. J. Biochem. & Cell Biology* 32, 529-538 (2000).

[2] L. De Smet, I. Dimitrov, G. Debyser, J. Van Beeumen, P. Dolashka-Angelova and B. Devreese. The cDNA sequence of three hemocyanin subunits from the garden snail *Helix lucorum*. *Gene* 10, 487(2):118-128 (2011).

[3] P. Dolashka, V. Moshtanska, V. Borisova, A. Dolashki, S. Stevanovic, T. Dimanov, W. Voelter. Antimicrobial proline-rich peptides from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa*. *Peptides*. 32(7):1477-83 (2011).

[4] L. Velkova, I. Dimitrov, H. Schwarz, S. Stevanovic, W. Voelter, B. Salvato and P. Dolashka-Angelova. Structure of hemocyanin from garden snail *Helix vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiology B*: 157, 1, 16-25 (2010).

[5] P. Dolashka-Angelova, T. Stefanova, E. Livanou, L. Velkova, P. Klimentzou, S. Stevanovic, H. Neychev, H. Schwarz, W. Voelter. Immunological potential of *Helix vulgaris* and *Rapana venosa* hemocyanins". *Immunological Investigations*, 37(8), 822-40 (2008).

[6] I. Iliev, R. Toshkova, P. Dolashka-Angelova, L. Yossifova, R. Hristova, J. Yaneva, Zacharieva, S. Haemocyanins from *Rapana venosa* and *Helix vulgaris* display an antitumour activity via specific activation of spleen lymphocytes, *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 61, 2, 203-210 (2008).

[7] R. Toshkova, L. Velkova, W. Voelter, P. Dolashka-Angelova. Protective effect of *Rapana venosa* hemocyanin (RvH) on survivability of hamsters with transplanted myeloid Graffi tumours. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des sciences* 59,(9) 977-982 (2007).

[8] P. Dolashka, L. Velkova, I. Iliev, A. Beck, A. Dolashki, L. Yossifova, R. Toshkova, W. Voelter, and S. Zacharieva. Antitumor Activity of Glycosylated Molluscan Hemocyanins via Guerin ascites tumor. *Immunol. Investigation* 40(2):130-49(2011).

[9] L. Yossifova, I. Iliev, S. Petkova, P. Dolashka-Angelova, L. Mihov and S. Zacharieva. Immunological research on the protective properties of a conjugate of total larval antigen with hemocyanin derived from *Helix vulgaris* against infection with *Trichinella spiralis*. *Biotech. Biotech. Equip.* 23(2), 597-600 (2009).

[10] P. Dolashka-Angelova, B. Lieb, L. Velkova, N. Heilen, K. Sandra, L. Nikolaeva-Glomb, A. Dolashki, A. Galabov, J.V. Beeumen, S. Stevanovic, W. Voelter, B. Devreese. Identification of glycosylated sites in *Rapana* hemocyanin by mass spectrometry and gene sequence, and their antiviral effect. *Bioconjug Chem.* 20(7):1315-22 (2009)

Получените изследвания са проведени по проект DFG_STE1819/5/1/2012 г. и проект СИП-02-44/29.12.2011 г. с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на конкурентоспособността на българската икономика” 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез Европейския фонд за регионално развитие.

За контакти:

Доц. д-р Павлина Долашка, Институт по органична химия с център по фитохимия, Българска академия на науките”, Управител на ООД „Био компоненти” тел.: 029606163, e-mail: pda54@abv.bg

Докладът е рецензиран.