

От научните разработки на биологично активни компоненти към внедряване в производството

Павлина Долашка

Scientific development of biologically active components to the introduction into production:

Many compounds are involved in the defense against infectious organisms. One of them, superoxide dismutases Cu/Zn-SOD is a very stable homodimeric metalloenzyme found in the yeast *Kluyveromyces marxianus* NBIMCC 1984 and in fungi *Humicola lutea* 103 and *A. niger* 26. Different peptides/proteins from the hemolymph and mucus of molluscs and arthropods were also found to exhibit a broad-spectrum of microbial activity against bacteria and yeast. Isolated bioactive compounds are very well analysed and included in several commercial products.

Key words: Arthropods; Hemocyanins; Molluscs; Peptides; Superoxide dismutas.

ВЪВЕДЕНИЕ

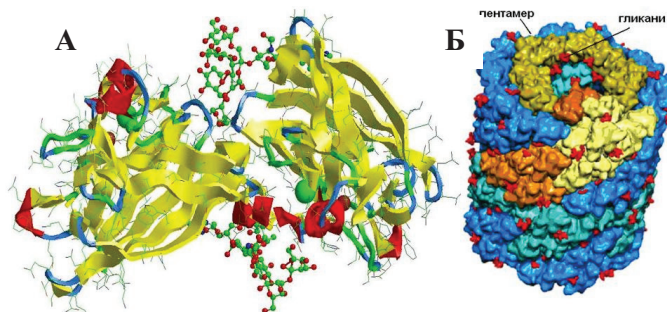
В световен мащаб расте заплахата от повишаване на резистентността на хората към различни бактериални инфекции. Поради прекалената и често пъти неправилната употреба на антибиотици и други лекарствени препарати, микроорганизмите са развили устойчивост към тях. Антибиотиците прогресивно губят ефекта си и стават все по-безполезни дори в обикновени битки с бактериите, гъбичките, вирусите и паразитите. Така например лечението на стафилококовите инфекции се превърна в истинско предизвикателство за клиницистите поради непрекъснато нарастващата резистентност към повечето налични антибиотици. Резистентност вече имат голяма част от най-разпространените инфекции като *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* и различни видове стафилококи и стрептококи, които причиняват пневмония, възпаления на пикочните пътища, на кръвта и др.

Резистентността на повечето предлагани продукти на пазара води до заличаване на напредъка на съвременната медицина и може да превърне лечението и на най-тривиалните инфекции в голям проблем.

Тъй като пазарът се нуждае от нови активни продукти, то това налага необходимостта от търсене на нови източници и на технологии за разработка на продукти с антивирусен, антитуморен и антибактериален ефект. Ето защо, съвместно с български и чуждестранни учени и фирми, чрез прилагане на съвременни методи и техники ние разработихме нови технологии и продукти за пазара, като хранителни добавки и козметични продукти.

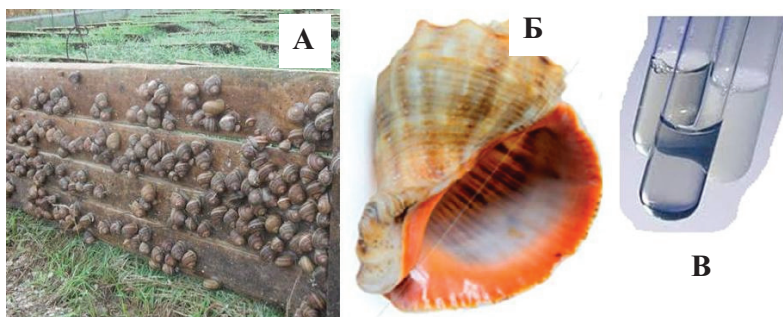
ИЗЛОЖЕНИЕ

Тъй като пазарът се нуждае от нови продукти, то това налага необходимостта от търсене на нови източници и разработване на нови технологии. В резултат на дългогодишните научни изследвания, от натурални източници ние разработихме нови иновативни продукти, като супероксид дисмутази (СОД), пептиди и хемоцианини от молюски и артроподи, както и изграждащите ги изоформи. Както е показано на фигура 1А,Б, СОД и хемоцианините се различават съществено, като сходството им е в участието на един меден йон в активния център и функцията им да свързват молекула кислород [1].



Фиг. 1. А) Cu/Zn-СОД изолирана от дрожди *Kluyveromyces yeast BIMCC*;
Б) Хемоцианин от градински охлюви *Helix aspersa* Maxima.

Cu/Zn-СОД бяха изолирани от гъбичен щам *Humicola lutea* и от дрожди *Kluyveromyces yeast BIMCC*, и чрез масспектрометричен анализ бяха определени аминокиселинните им последователности, които показват високо сходство.



Фиг. 2. Природни източници, богати на биологично активни вещества: А) градински охлюви *Helix aspersa* Maxima; черноморска рапана *Rapana venosa*; чист хемоцианин.

Други богати източници на различни активни вещества са хемолимфата и екстракти от слюзта, изолирани от молюски и артроподи. За да може да бъдат използвани тези протеини в лекарствени препарати, структурата и функцията им бяха изследвани чрез различни методи и техники. Богат източник на активни продукти се оказва градинският охлюв *Helix aspersa* Maxima, отглеждан във ферми в България (Фигуре 2А,Б,В) [2,3].

Хемоцианинът е гликопротеин, разтворен в хемолимфата на охлювите и осъществява пренос на кислород до всички клетки. Той притежава сложна структура, изградена от различни изоформи, ето защо ние разработили редица технологии за получаването им като препарати с висока чистота. Определената генна секвенция на огромните молекули на хемоцианините от *H. lucorum* и *H. aspersa* Maxima дава важна информация за обясняване на свойствата на хемоцианините. Огромната молекула е изградена от 150 различни протеини с маса около 50 кДа и всички те проявяват специфична активност. Отделните протеини са свързани с въглехидратни вериги, които изпълняват важна функция. Те свързват тези протеини и участват в изграждане на третичната структура на хемоцианините. Също така въглехидратни вериги допринасят за потискане на развитието на бактериални и туморни клетки.

След задълбочен анализ на изолираните чисти биологично активни вещества, поведени в сътрудничество с водещи европейски научни колективи, бяха установени редица терапевтични свойства на тези компоненти.

Доказан е потенциалният терапевтичен ефект на ензима Cu/Zn-СОД от гъбичен щам *Humicola lutea* 103 срещу вирус A/Aichi (H3N2). Също така беше установено, че след третиране с този ензим на трансплантиран тумор на Графи в хамстери, се забавя туморният растеж, особено в ранните стадии на туморната прогресия и Cu/Zn-СОД от *H. lutea* 103 може да бъде включена в лекарствени препарати [4].

Прилагането на морски и сухоземни охлюви за лечение на различни заболявания е известно от много години. Ето защо, ние изследвахме активността на различни биологично-активни компоненти, изолирани от морски охлюв *Rapana venosa* и градински охлюви *H. lucorum* и *H. aspersa maxima*. След тестване на всички хемоцианини и изоформите им срещу различни видове вируси, с обвивка и без обвивка, установихме, че една от функционалните единици показва антивирусна активност срещу развитието на респираторен *Herpes simplex* вирус. Въз основа на получените резултати за структурата на този протеин, изказахме предположение за механизма на инхибиране, което най-вероятно е свързано с взаимодействието на въглехидратните вериги и протеините от обвивката на вируса. Този хемоцианин е включен в препарат за третиране на Herpes вирус [5,6].

Известен е препарат, приготвен от хемоцианин от калифорнийската мида, който се прилага при лечение на тумор на пикочния мехур. Ето защо в сътрудничество с наши колеги от болницата по урология в гр. Тюбинген, Германия беше изследван ефектът на изолорнати хемоцианини срещу различни туморни клетъчни линии. Проведените тестове доказаха значим ефект на хемоцианин от черноморски охлюв *R. venosa*, при третиране на трансплантиран тумор на Графи в хамстери. Също така, хемоцианинът от градинския охлюв *H. aspersa*, отглеждан при екологично чисти условия в български ферми, потиска развитието на туморни клетки CAL 29 и T24, изолирани от пациенти с тумор на пикочния мехур [7]. Чрез протеомен анализ бяха установени протеините, чиято експресия се повлиява след третиране с хемоцианина. Проведените изследвания показаха кои хемоцианини са потенциални терапевтични компоненти, които забавят туморния растеж, особено в ранните стадии на туморната прогресия и могат да бъдат включени в лекарствени препарати.

Това свойство на хемоцианините може да бъде обяснено с имуностимулация ефект на тези гликопротеини, които имат огромни полипептидни вериги, а също така могат да се използват и като носители на хаптени, като и участие на сложните въглехидратни структури, които също оказват допълнителен инхибиращ ефект [8].

В хемолимфата на молюски и артроподи се съдържа около 90% хемоцианин, но и пептиди с доказана антибактериална активност. От хемолимфата на охлювите бяха изолирани пептиди и гликопептиди, и след установяване на структурата им чрез различни методи и техники, беше определена специфичната им антибактериалната активност спрямо бактериите: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* и др. [9]. Установихме, че субединиците на хемоцианин от артропод от *Cancer pagurus* показват по-силно изразен инхибиращ ефект върху бактериалните щамове, в сравнение с функционални единици на хемоцианини от молюски.

Както хемолимфата, така и слюзта на охлюва се оказва богата на активни вещества. Ето защо, въз основа на проведените анализи, бяха разработени редица опитни образци и технологии за влагането им в продукти чрез различни фирми. Всички тези екстракти са охарактеризирани чрез определяне на АК състав, наличие на ниско и високомолекулни протеини, физико-химични характеристики и др..

След прилагането на различни технологии, от слюзта на охлювите бяха изолирани активни компоненти, като протеини, ензими и пептиди с висока хомоложност с колагена и хемоцианина. Предимството на тези пептиди е, че те могат да проникнат

през мембраната на клетката и да участват или катализират протичането на редица реакции. Така получените и характеризирани екстракти са включени в редица разработени продукти.

След като тези екстракти доказват регенериращ ефект, то те предизвикват интерес в козметичната индустрия. Благодарение на високата си проникваща способност и мощния си регенеративен потенциал, секретът от охлюви представлява популярна съставка на различни козметични продукти. Ето защо бяха разработени екстракти от слузта на охлювите с траен козметичен ефект, които могат да се включат в кремове, балсами и други продукти.

Също така, беше доказан антибактериален и регенериращ ефект на екстракти от слузта на градински охлюв *H. aspersa*, които са включени в продукти, подходящи за възстановяване на увредена тъкан, лигавиците, за третиране на бактериални инфекции на кожата и лигавиците, за храносмилателния тракт и за стимулиране на имунната система.

Доказаният антибактериален и регенериращ ефект на някои екстракти срещу бактериалния щам *Helicobacter pylori* показва, че те са подходящи за възстановяване на увредена тъкан, лигавиците, за храносмилателния тракт и за стимулиране на имунната система (Фиг. 3). Този екстракт е включен в препарат, който е ефективен при проблеми на храносмилателната система при колит, гастрит и др.



Фиг. 3. Антибактериален тест на изолираните пептиди от слузта на градински охлюв *H. aspersa* срещу бактерията *Helicobacter pylori*

Комбинация от други екстракти от слузта на градински охлюв *H. aspersa*, със силно изразен регенериращ ефект, също така представлява голям интерес на научните ни изследвания. Те са включени в разработен гел «Мукофикс» за различни видове рани, и е доказал качествата си при третиране на пациенти с хирургични рани и язви с различен произход (Фиг. 4).

Нашите научни изследвания продължават върху установяване на ефекта и механизма на действие на тези продукти.



Фиг. 4. Третиране с регенериращ гел «Мукофикс» на рана на крайник, причинена от венозна недостатъчност.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изолрирането и характеризирането на активни биологични вещества от природни източници, и влагането им в продукти е бъдещето на медицината. Градинските и морските охлюви са богати източници на активни компоненти с антивирусен, антиуморен, антибактериален и регенериращ ефект, поради което са включени в доказали се продукти, предложени на пазара.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Долашка-Ангелова П., Л. Велкова, А. Долашки, И. Димитров, В. Мощанска. Медсъдържащи гликопротеини-хемоцианини. Ревю, Списание на БАН, 2010,4, 34-41.
- [2] Долашка П. Биологично активни компоненти в градинския охлюв и приложението им. Научни трудове на Русенския университет, 2012, 51 (9.2), 74-78.
- [3] Dolashka P., P. Kabadjova-Christova. The Garden Snail – A Rich Source of Active Components. Наука 2/2012, том XXII, 29-31.
- [4] Toshkova R., E. Ivanova, M. Angelova, P. Dolashka and V. Voelter. Effect of fungal Cu/Zn superoxide dismutase on the cell-mediated immune response in tumor Graffi bearing hamsters. Z. Naturf. C, 2003, 58(1-2), 128-134.
- [5] Dolashka P., N. Nesterova, S. Zagorodnya, A. Dolashki, G. Baranova, A. Golovan and W. Voelter. Antiviral activity of hemocyanin *Rapana venosa* and its isoforms against Epstein-Barr virus. Global J. of Pharmac., 20148, (2): 206-212.
- [6] Dolashka P., W. Voelter. Antiviral activity of hemocyanins. Invert. Survival J. 2013, 10, 120-127.
- [7] Antonova O., P. Dolashka, D. Toncheva, H.-G. Rammensee, S. Stevanovic. *In vitro* Antiproliferative Effect of *Helix aspersa* Hemocyanin on Multiple Malignant Cell Lines. Z.für Naturf. C, 2014, 69c, 1 – 10.
- [8] Dolashka P., 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. Immun. Invest, 2011, 40 (2), 130-149.
- [9] Dolashka P., 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, 2011, 32 (7), 1477-1483.

За контакти:

Проф. д-р Павлина Долашка, Институт по органична химия, БАН, тел.: 0887193423, e-mail: pda54@abv.bg

Докладът е лицензиран



РУСЕНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „АНГЕЛ КЪНЧЕВ”
UNIVERSITY OF RUSE „ANGEL KANCHEV”

ДИПЛОМА

Програмният комитет на
Научната конференция RU&SU'14
награждава с КРИСТАЛЕН ПРИЗ
“THE BEST PAPER”

Проф. д-р ПАВЛИНА ДОЛАШКА
автор на доклада

“От научните разработки на биологично активни
компоненти към внедряване в производството”

DIPLOMA

The Programme Committee of
the Scientific Conference RU&SU'14
Awards the Crystal Prize "THE BEST PAPER"
to Prof. PhD PAVLINA DOLASHKA
author of the paper

“Scientific development of biologically active
components to the introduction into production”

РЕКТОР
RECTOR

проф. д.т.н. Христо Белоев
Prof. DSc Hristo Beloev, DHC

01.11.2014