

значительные превышения оказались в водоемах Бешенковичского и Полоцкого районов. Самая высокая концентрация ионов натрия зафиксирована в водоеме Витебского района. В отношении магния максимальные превышения обнаружены в водоемах Витебского и Полоцкого районов. Катионы стронция обнаружены только в водоеме из Полоцкого района. Также там зафиксирована максимально высокая концентрация катионов кальция из всех исследуемых водоемов.

Таблица – Содержание катионов, мг/л в природных водоемах Витебской области

Концентрации катионов (мг/л)						
Район водоема	Аммоний (NH ₄ ⁺)	Калий (K ⁺)	Натрий (Na ⁺)	Магний (Mg ²⁺)	Стронций (Sr ²⁺)	Кальций (Ca ²⁺)
Ушачи	-	121.5	158.2	250.5	-	962.2
Шумилино	-	145	142.1	259.2	-	963.9
Бешенковичи	-	633.7	513.9	437.3	-	1408
Сенно	-	87.73	288.6	403.6	-	1480
Ольгово	-	242	495.9	133.5	-	534.7
Витьба	450.2	274.5	2015	714.1	-	2965
Дубровно	430.4	363.2	198.9	435.9	-	1625
Полоцк	103.5	608.7	645.2	686.2	35.12	6141
Контроль	5.467	10.1	30.39	43.3	-	322.4

Из таблицы видно, что превышения относительно контроля зафиксированы во всех исследуемых водоемах. Некоторые показатели отличаются в десятки раз.

Закключение. Исследуемые катионы в норме содержатся во всех водоемах. Однако в настоящее время они непрерывно поступают в водоемы в результате антропогенной деятельности. Также эти катионы в норме содержатся и в гемолимфе гидробионтов, в том числе пресноводных легочных моллюсков, поэтому их содержание в водоеме может быть определяющим фактором для жизнедеятельности последних. Пресноводные брюхоногие гидробионты (*L. stagnalis* и *P. corneus*) проявляют определенную устойчивость к загрязнению исследуемыми катионами, поэтому встречаются во всех исследованных водоемах. Наименее благоприятная экологическая обстановка выявлена в Полоцком водоеме, что связано с интенсивной антропогенной нагрузкой. Наименьшее содержание исследованных катионов содержится в воде из источника, являющегося гидрологическим памятником природы Россонского района, где отсутствует антропогенная нагрузка.

Список литературы

1. Никаноров, А.М. Системы мониторинга поверхностных вод / А.М. Никаноров, В.В. Циркунов. – СПб: Гидрометиздат, 1994. – 197 с.
2. Абакумов, В.А. Гидробиологический мониторинг пресноводных экосистем и пути его совершенствования / В.А. Абакумов, Л.М. Суцены // Экологические модификации и критерии экологического нормирования: труды международного симпозиума. – Москва, 1991. – С. 41–51.
3. Волощук, А.М. Руководство по капиллярному электрофорезу / под ред. А.М. Волощука – М.: Науч. совет РАН по хроматографии, 2005. – 111 с.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОТЕОЛИЗА И АНТИПРОТЕОЛИЗА У ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ

*Е.И. Кацнельсон, В.В. Долматова, А.А. Чиркин
Витебск, ВГУ имени П.М. Машерова*

Протеолиз – ферментативный гидролиз амидных связей в белках и пептидах, является важным и универсальным процессом клеток живых организмов. Протеолитические ферменты обеспечивают процессы трех видов пищеварения: внутриклеточного, мембранного и полостного. Различают 2 типа протеолиза: 1) тотальный приводит к полному расщеплению белковых молекул до отдельных аминокислот и 2) частичный, так называемый ограниченный протеолиз, при котором избирательно гидролизуются одна или несколько пептидных связей в молекуле белка. Протеолиз первого типа происходит в результате согласованного действия различных протеолитических ферментов, тогда как реакции ограниченного протеолиза катализируются

отдельными специфическими протеазами. Полный протеолиз осуществляется при внутриклеточном распаде белков под влиянием тканевых протеаз (часто называемых катепсинами). Он протекает во многих случаях внутри лизосом – клеточных органелл, содержащих набор гидролитических ферментов. Путем полного протеолиза происходит удаление из организма аномальных белков, образующихся в результате мутаций и ошибок биосинтеза. Полное расщепление белковых молекул наблюдается также при различных морфогенетических превращениях и адаптационных перестройках обмена. Под влиянием таких ферментов желудочно-кишечного тракта, как пепсин, трипсин, химотрипсин и ряда других пептидаз, происходит полный протеолиз белков пищи. Ограниченный протеолиз белковых молекул имеет первостепенное значение для регуляции обмена веществ в организме. Реакции ограниченного протеолиза участвуют в процессе образования и инактивации практически всех ферментов, гормонов и других биологически активных белков и пептидов и, следовательно, в контроле активности основных биорегуляторов. Характерной особенностью протеиназ является однонаправленность и необратимость их действия. Это особый тип регуляции, отличающийся от всех других типов биологического контроля в организме [1].

В организме существуют механизмы, контролирующие биологическую активность протеолитических ферментов. Активность протеиназ регулируется пространственной разобщенностью фермента и субстрата и синтезом большинства протеолитических ферментов в форме неактивных предшественников. Важнейшими факторами, регулирующими активность протеолитических ферментов, являются также их эндогенные ингибиторы. Последние в большом количестве присутствуют во всех тканях и биологических жидкостях организма. Конечный эффект действия протеолитической системы зависит от соотношения протеиназ и их ингибиторов. Одними из основных ингибиторов протеиназ являются α_1 -антипротеиназный ингибитор (АПИ) и α_2 -макроглобулин (α_2 -МГ). Эти ингибиторы составляют более 95 % общей ингибиторной емкости [2, 3].

Протеолитическая активность хорошо изучена у животных с замкнутой системой кровообращения. При отсутствии гистогематических барьеров возможна атака протеолитических ферментов на клетки, контактирующие с гемолимфой. В связи с этим, в качестве объектов исследования были выбраны легочные пресноводные моллюски: прудовик обыкновенный (*Lymnaea stagnalis* L.) и катушка роговая (*Planorbarius corneus* L.), являющиеся модельными организмами для изучения взаимодействий между гемолимфой и клетками.

В лабораторной практике для оценки протеолитической активности широко применяется БАПНА-амидазная реакция вследствие ее специфичности, хорошей воспроизводимости и наличия соответствующих ферментов у многих видов организмов. В этом случае используется хромогенный субстрат – N- α -бензоил-D,L-аргинин паранитроанилид (БАПНА), при ферментативном воздействии на который образуются бензоил-аргинин и паранитроанилид, окрашенный в желтый цвет [4].

Целью данной работы является отработка методик оценки протеолиза и антипротеолиза в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков: прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis* L.) и катушки роговой (*Planorbarius corneus* L.).

Материал и методы. Материалом исследования была гемолимфа половозрелых легочных пресноводных моллюсков. В работе использованы следующие реагенты: N- α -бензоил-D,L-аргинин паранитроанилид (БАПНА; 3 ммоль/л), раствор хлорида натрия (NaCl; 8,9 г/л), раствор хлористоводородной кислоты (HCl; 0,5 моль/л), трис-HCl буферный раствор (0,2 моль/л), трипсин (1,7 мкмоль/л), ингибитор трипсина (0,42 мкмоль/л). Определение активности трипсиноподобных протеиназ (ТпА) проводили по методу Erlander В. F., а определение активности ингибиторов протеиназ (α_1 -антипротеазного ингибитора – АПИ и α_2 -макроглобулина - α_2 -МГ) проводили по методу, предложенному Т.А. Хватовым и В.Б. Беловой [5,6]. Полученный цифровой материал подвергали статистической обработке методами параметрической статистики.

Результаты и их обсуждение. Гемолимфа моллюсков является более разбавленной биологической жидкостью по сравнению с плазмой крови животных. Поэтому в начале исследования была подобрана оптимальная продолжительность инкубации гемолимфы с субстратом протеолиза для получения достоверных результатов (табл. 1). Установлено, что при оценке протеолиза в гемолимфе отмечается высокая степень разброса полученных данных. Это не удивительно, так как гемолимфа этих видов улиток тесно контактирует с окружающей водной сре-

дой. Величины протеолитической активности гемолимфы изучаемых видов легочных пресноводных улиток оказались приемлемыми для анализа при 20-часовой инкубации. При 24-часовой инкубации гемолимфы отмечен эффект снижения активности протеолиза.

Таблица 1. Зависимость протеолитической активности в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков от времени инкубации

Время инкубации	ТпА прудовик обыкновенный, <i>ммоль/(л·с)</i>	ТпА катушка роговая <i>ммоль/(л·с)</i>
1 час	1,72±1,47	1,58±1,58
3 часа	4,40±2,50	15,87±11,37
4 часа	0,96±0,56	14,57±10,9
6 часов	0,86±0,45	3,60±1,99
14 часов	7,23±2,13	92,9±9,75 ¹
20 часов	14,00±1,36 ¹	247,4±24,8 ¹
24 часа	11,59±4,03 ¹	17,71±8,00

Примечание: ¹ – P < 0,05

Определение активности ингибиторов протеолиза дает более стабильные результаты, чем оценка протеолиза. Однако для выявления оптимальной активности ингибиторов требуется тщательный подбор кислотности среды инкубации. Зависимость активности ингибиторов протеолиза от pH в гемолимфе изучаемых легочных пресноводных моллюсков представлены в табл. 2.

Таблица 2. Зависимость активности ингибиторов протеиназ от pH буферного раствора

pH	Прудовик обыкновенный		Катушка роговая	
	АПИ, <i>з/л</i>	α_2 -МГ, <i>з/л</i>	АПИ, <i>з/л</i>	α_2 -МГ, <i>з/л</i>
3,0	0,97±0,61	22,80±8,70	3,06±1,59	20,14±9,80
3,6	2,45±0,95	4,48±0,95 ¹	5,81±0,79	5,21±1,88
3,8	9,84±0,16 ¹	9,92±0,11	9,82±0,17 ¹	8,65±1,02
6,1	0,36±0,08	5,99±0,02 ¹	0,22±0,11	6,10±0,08
7,2	0,75±0,41	5,84±0,09 ¹	0,19±0,14	5,83±0,09
8,0	1,04±0,37	5,44±0,21 ¹	0,59±0,27	5,98±0,43
9,0	0,47±0,05	5,89±0,03 ¹	0,31±0,11	5,85±0,08

Примечание: ¹ – P < 0,05

Из приведенных в таблице 2 данных следует, что максимальные активности АПИ выявлены в гемолимфе при pH 3,8, а – активности α_2 -МГ при pH 3,0 у обоих видов легочных пресноводных моллюсков. По всей видимости, это связано с различными изоформами протеиназ у этих двух видов моллюсков. Однако для исследования активности ингибиторов протеиназ у них при действии экзогенных химических факторов, вероятно, целесообразно использовать диапазон pH 6,1-8,0.

Заключение. Оптимальное время инкубации в термостате, как для гемолимфы прудовика обыкновенного, так и для гемолимфы катушки роговой, является 20 часов. Оптимальное значение pH для α_1 -антипротеиназного ингибитора (АПИ) может быть 3,8, а для α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) – 3,0.

Список литературы

1. Антонов, В.К. Химия протеолиза / В.К. Антонов. – М.: Наука, 1991. – 504 с. – С. 7–8.
2. Веремеенко, К.Н. Протеолиз в норме и при патологии / К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.И. Кизим. – Киев: Здоровья, 1988. – 200 с.
3. Иванова, С.В. Активность протеолитической системы и флуоресценция белков сыворотки крови и синовиальной жидкости при артритах (экспериментально-лабораторное исследование). Автореферат дис. ... степени канд. биол. наук: 14.03.10 / С.В. Иванова. – Витебск, 2013. – 21 с.
4. Кабанова, А.А. БАПНА-амидазная и эластазная активность ротовой жидкости пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области / А.А. Кабанова, А.И. Гончарова, С.А. Кабанова // *Стоматолог / Stomatologist*. – 2014 – № 2. – С. 7–10.
5. Хватов, В.Б. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека: метод. рекомендации / В.Б. Хватов, Т.А. Белова. – М., 1981. – 16 с.
6. Erlanger, D.F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / D.F. Erlanger, N. Kokowsky // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1961. – Vol. 95, № 2. – P. 271–278.