

3. Гринь, В.К. Применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в кардиологии и травматологии / В.К. Гринь // Журнал НАМН Украины. – 2011. – Т. 17, № 1. – С. 67–75.
4. Зарубина, И.В. Влияние острого гипокинетического стресса на функции печени / И.В. Зарубина, И.А. Юнусов, П.Д. Шабанов // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2013. – № 4. – С 61–65.
5. Зарубина, И.В. Разделение и прямое количественное определение адениннуклеотидов на силуфоле / И.В. Зарубина, Б.И. Криворучко // Украинский биохимический Журнал. – 1982. – №4. – С. 437 – 439.
6. Кирпатовский, В.И. Возможности клеточной терапии в восстановлении нарушенной функции органов мочеполовой системы / В.И. Кирпатовский // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2016. – № 1 (56). – С. 60 – 67.
7. Кузьменко, Е.В. Современные представления о проявлениях механизмов психоэмоционального стресса / Е.В. Кузьменко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Том 26 (65). – № 2. – С. 95 – 106.
8. Лук'янчук, В.Д. Фармакокорекція α -ліпоевою кислотою процесів енергозабезпечення у щурів із закритою черепно – мозковою травмою / В.Д. Лук'янчук, О.В. Шевчук // Ліки. – 2006. - № 1 – 2. – С. 57 – 64.
9. Семененко, О.М. Порівняльна оцінка терапевтичного ефекту розчинів НАЕС-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом в умовах опікової хвороби за динамікою показників біоенергетичних процесів у нирках / О.М.Семененко, О.О. Яковлева, С.І. Семененко // Клінічна та експериментальна патологія. – 2015. – Т. XIV. – №2 (52). – С. 180 – 184.

УДК 594.38:577.112

ИЗУЧЕНИЕ СИСТЕМЫ ПРОТЕОЛИЗ-АНТИПРОТЕОЛИЗ В ТКАНЯХ ЛЕГОЧНЫХ ПРЭСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

В.В.Долматова, А.С.Хомич, А.А.Чиркин

*Витебский государственный университет имени П.М. Машерова,
Витебск, Беларусь*

Резюме. При исследовании гемолимфы и гепатопанкреаса прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis* L) и катушки роговой (*Planorbarius corneus* L), отличающихся по типу транспорта кислорода, протеолитическая и антипротеолитическая активности были обнаружены как в гепатопанкреасе, так и в гемолимфе. Показано, что в гепатопанкреасе моллюсков с гемоцианиновым типом транспорта кислорода преобладает антипротеолиз, а с гемоглобиновым – протеолиз. Активация протеолиза в гепатопанкреасе, индуцированная внешним гамма-облучением (1,0 и 10,0 Гр), оказалась более выраженной у прудовиков по

сравнению с катушками. На основании динамики показателей системы протеолиз-антипротеолиз был сделан вывод, что катушки могут быть более резистентными организмами по сравнению с прудовиками к действию ионизирующего излучения.

STUDY OF THE SYSTEM OF PROTEOLYSIS-ANTI-PROTEOLYSIS IN TISSUES OF PREGNANT FRESHWATER MOLLUSCS WITH ACTION OF IONIZING RADIATION

V.V.Dolmatova, A.S.Khomich, A.A.Chirkin
Vitebsk State University named after P.M. Masherov,
Vitebsk, Belarus

Summary. In the study of hemolymph and hepatopancreas of the pond snail (*Lymnaea stagnalis* L) and the corn horn (*Planorbarius corneus* L), differing in type of oxygen transport, proteolytic and antiproteolytic activities were found in both the hepatopancreas and the hemolymph. It has been shown that antiproteolysis predominates in the hepatopancreas of mollusks with hemocyanin type of oxygen transport while proteolysis prevails in that of mollusks with hemoglobin type. The activation of proteolysis in the hepatopancreas, induced by external gamma-irradiation (1.0 and 10.0 Gy), was more pronounced in pond food than in coils. Based on the dynamics of the indices of the proteolysis-antiproteolysis system, it was concluded that, compared to the ponders, the coils may be more resistant organisms to the action of ionizing radiation.

Введение. Известны два основных типа протеолиза – АТФ-независимый и АТФ-зависимый. Новый подход для решения проблемы энергозависимости протеолиза может базироваться на исследовании протеолитических ферментов и антипротеолитических факторов в тканях и гемолимфе легочных пресноводных моллюсков – прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis* L) и катушки роговой (*Planorbarius corneus* L), отличающихся по типу транспорта кислорода [1]. Первый из них признан *модельным организмом* для исследования действия водорастворимых химических агентов в ЕЭС в 2010 году. Разработаны детальные требования к проведению строго контролируемых в Европейском союзе исследований в течение всей или части жизни моллюска (Series on Testing and Assessment. No. 121. Detailed review paper on molluscs life-cycle toxicity testing. JT03284405. Environment Directorate. Paris 2010). Представители таксона *Mollusca* имеют четыре типа кислородпереносящих металлопротеинов и тканевых протогемовых белков: тканевые протогемы, гемоглобин красных кровяных клеток, внеклеточные гемоглобины и гемоцианины [2]. У прудовиков транспорт кислорода осуществляет гемоцианин, а у катушек – гемоглобин. Существует прямая зависимость между активностью животного и концентрацией переносчиков кислорода во внутренней среде [3]. Гемоцианин менее активен по сравнению с гемоглобином: 1 г его связывает в 3-5 раз меньше кислорода – 0,25-0,4 см³. Но в

среднем количество кислорода, связанного с гемоцианином, вдвое больше, чем количество кислорода, физически растворенного в гемолимфе.

Целью работы явилось изучение активности протеолиза и антипротеолиза в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода, после воздействия гамма-излучением в дозах 1,0 и 10,0 Гр.

В настоящее время известно, что разные ткани организма моллюсков имеют некоторые отличия по радиочувствительности, в частности, показана достаточно высокая устойчивость системы размножения моллюсков к действию ионизирующего излучения [4,5]. Метаболические изменения в системе протеолиз-антипротеолиз при облучении легочных пресноводных моллюсков изучены недостаточно.

Материалы и методы исследований. Моллюски были отловлены летом 2016 года в водохранилище Дрозды. Это водохранилище входит в состав Вилейско-Минской водной системы и характеризуется стабильной экологической ситуацией [6]. Период адаптации к лабораторным условиям составил 5 суток. Моллюски были облучены в Объединенном институте энергетических и ядерных исследований «Сосны» НАНБ с лучевой нагрузкой в поглощенных дозах 1,0 и 10,0 Гр. Материалом для исследования были гемолимфа и гепатопанкреас, забранные через 72 часа после облучения у половозрелых легочных пресноводных моллюсков. В работе использованы N- α -бензоил-D,L-аргинин паранитроанилид (БАПНА; 3 ммоль/л), трипсин (1,7 мкмоль/л), ингибитор трипсина (0,42 мкмоль/л), сывороточный альбумин человека (30 г/л) фирмы Fluka. Определение активности трипсиноподобных протеиназ (ТпА) проводили по методу D.F. Erlanger, 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 [7,8]. Активность ТпА выражали в мкмоль/(г \times с), содержание АПИ и α 2-МГ – в г/л. Подсчитывали индекс «Суммарная ингибиторная активность», представляющий сумму АПИ и α 2-МГ. Полученный цифровой материал подвергался статистической обработке методами параметрической статистики.

Результаты исследования и их обсуждение. В таблице представлены полученные данные о влиянии гамма-облучения в дозах 1,0 и 10,0 Гр на некоторые показатели системы протеолиз-антипротеолиз в гепатопанкреасе и гемолимфе легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода.

Таблица 1 – Действие гамма-излучения на активность трипсиноподобных протеиназ (ТпА) в тканях легочных пресноводных моллюсков

Группа животных	Прудовики	Катушки
Гепатопанкреас		
Контроль	26,4±1,99	80,6±1,48
Облучение 1,0 Гр	56,3±2,38 ¹	125,4±4,61 ¹
Облучение 10,0 Гр	63,2±2,52 ^{1,2}	97,4±2,78 ^{1,2}
Гемолимфа		
Контроль	13,5±2,14	10,3±0,11
Облучение 1,0 Гр	13,8±1,47	13,3±0,07 ¹
Облучение 10,0 Гр	14,2±0,91	20,4±0,11 ^{1,2}

Примечание: ¹ – P<0,05 при сравнении с контролем; ² - P<0,05 при сравнении с группой «Облучение 1 Гр»

Из анализа данных таблицы 1 следует, что в гепатопанкреасе прудовиков ионизирующее излучение вызывает увеличение активности ТпА при увеличении поглощенной дозы гамма-излучения (в 2,1 раза при дозе 1,0 Гр и в 2,4 раза при дозе 10,0 Гр). В гепатопанкреасе катушек в контроле обнаружена в три раза более высокая активность ТпА, чем у аналогичной группы прудовиков. После гамма-облучения в дозе 1,0 Гр у катушек также повысилась активность ТпА в 1,6 раза, однако после облучения в дозе 10,0 Гр активность ТпА оказалась повышенной только в 1,21 раза. Гамма-облучение у прудовиков в обеих дозах не оказало влияния на активность ТпА в гемолимфе. Однако в гемолимфе катушек было выявлено повышение активности ТпА после гамма-облучения в дозе 1,0 Гр в 1,3 раза, а в дозе 10,0 Гр – почти в два раза.

В таблице 2 представлены данные об изменениях количества антитрипсиноподобных ингибиторов (АПИ) после действия гамма-облучения.

Таблица 2 – Действие гамма-излучения на содержание ингибиторов трипсиноподобных протеиназ (АПИ) в тканях легочных пресноводных моллюсков

Группа животных	Прудовики	Катушки
Гепатопанкреас		
Контроль	6,69±0,19	5,90±0,02
Облучение 1,0 Гр	6,44±0,14	5,81±0,04
Облучение 10,0 Гр	5,28±0,99	5,92±0,05
Гемолимфа		
Контроль	8,10±0,20	5,98±0,02
Облучение 1,0 Гр	6,29±0,39 ¹	5,86±0,03 ¹
Облучение 10,0 Гр	5,03±0,18 ¹	5,77±0,01 ¹

Примечание: см. табл. 1

Анализ данных таблицы 2 показал, что в гепатопанкреасе и гемолимфе контрольной группы прудовиков содержание АПИ выше, чем в контрольной

группе катушек. Гамма-облучение не оказало влияние на содержание АПИ в ткани гепатопанкреаса обоих видов моллюсков. В гемолимфе прудовиков гамма-излучение привело к дозозависимому снижению количества АПИ. Аналогичный эффект получен и при исследовании гемолимфы облученных катушек. Выявленное уменьшение количества АПИ в гемолимфе катушек незначительно по абсолютной величине, хотя и статистически достоверно из-за весьма малого разброса данных.

В таблице 3 представлены данные об изменениях количества $\alpha 2$ -макроглобулина после действия гамма-облучения.

Таблица 3 – Действие гамма-излучения на содержание $\alpha 2$ -макроглобулина ($\alpha 2$ -МГ) в тканях легочных пресноводных моллюсков

Группа животных	Прудовики	Катушки
Гепатопанкреас		
Контроль	10,5±0,28	5,96±0,13
Облучение 1,0 Гр	9,63±0,45	6,01±0,10
Облучение 10,0 Гр	8,21±0,12 ¹	6,10±0,04
Гемолимфа		
Контроль	7,20±1,01	6,89±0,05
Облучение 1,0 Гр	5,13±0,94	6,57±0,09 ¹
Облучение 10,0 Гр	4,89±0,61	5,95±0,09 ¹

Примечание: см. табл. 1

Из данных таблицы 3 видно, что содержание $\alpha 2$ -МГ в гепатопанкреасе катушек в 1,72 раза меньше, чем у прудовиков. Гамма-облучение в дозе 10,0 Гр вызвало уменьшение содержания $\alpha 2$ -МГ в гепатопанкреасе только прудовиков. Небольшое, но статистически достоверное уменьшение $\alpha 2$ -МГ после гамма-облучения выявлено в гемолимфе катушек. В гемолимфе прудовиков после гамма-облучения почти в полтора раза уменьшилось содержание $\alpha 2$ -МГ, но из-за большого разброса данных этот эффект не является статистически достоверным.

Заключение. Полученные результаты позволяют обозначить несколько важных особенностей системы протеолиз-антипротеолиз в тканях легочных пресноводных моллюсков. Во-первых, в гепатопанкреасе контрольных катушек существенно выше активность трипсиноподобных протеиназ по сравнению с прудовиками, но в гемолимфе активность этих ферментов одинаковая у обоих видов. Во-вторых, суммарная ингибиторная активность в гепатопанкреасе контрольных прудовиков существенно выше, чем у катушек, а в гемолимфе обоих видов величины этого показателя существенно не различаются. Поэтому можно предположить, что в гепатопанкреасе моллюсков с гемоцианиновым типом транспорта кислорода преобладает антипротеолиз, а с гемоглобиновым – протеолиз. В-третьих, активация протеолиза в гепатопанкреасе, индуцированная внешним гамма-облучением, оказалась более выраженной у прудовиков по сравнению с катушками. Следовательно, на основании динамики показателей системы протеолиз-антипротеолиз можно сделать

заклучение, что катушки могут быть более резистентными организмами по сравнению с прудовиками к действию ионизирующего излучения. Такое заключение соответствует ранее высказанному предположению о возникновении гемоцианинового типа переноса кислорода как приспособительного механизма моллюсков к условиям жизни при сниженной биодоступности кислорода [9].

Список литературы.

1. Чиркин, А.А. Биохимия филогенеза и онтогенеза / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, С.Б. Бокуть // Минск: Новое знание; М.:ИНФРА-М, 2012. 288 с.
2. Алякринская, И.О. Гемоглобины и гемоцианины беспозвоночных (Биохимические адаптации к условиям среды). М.: Наука, 1979. 153 с.
3. Стадниченко, А.П. Сравнительная характеристика белкового спектра гемолимфы некоторых видов группы *Lymnaea Lamarck* (Gastropoda) / А.П. Стадниченко // Вестн. зоол. 1974. №5. С. 33-37.
4. Голубев, А.П. Динамика радиоактивного загрязнения экосистем разнотипных водоемов белорусского сектора зоны отчуждения Чернобыльской АЭС / А.П. Голубев [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология (Россия). – 2007. – Т. 47, №3. – С. 322-332.
5. Голубев, А.П. Динамика процессов радиоадаптации в популяциях моллюсков из водоемов белорусского сектора зоны загрязнения Чернобыльской АЭС / А.П. Голубев // Экологический вестник. – 2012. - № 2(20). – С. 44-57.
6. Зарубов, А.И. Экологическое состояние водохранилищ Минского района / А.И. Зарубов, С.Г. Войтко // Вестник БГУ. – 2007. – Серия 2. – С. 131-135
7. Erlanger, D.F. Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / D.F. Erlanger, N. Kokowsky // Arch. Biomed. Biophys. 1961. Vol. 95, 2. P. 271-278.
8. Хватов, В.Б. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека: методические рекомендации / В.Б. Хватов, Т.А. Белова. - М., 1981. 16 с.
9. Чиркин А.А., Долматова В.В. Альтернативный сплайсинг и посттрансляционная модификация белков в увеличении разнообразия белков в клетке: для адаптации и эволюции // Биохимия и молекулярная биология. Сб. научных статей. Выпуск 1 Посттрансляционная модификация белков. - Минск: «Беларуская навука», 2017. – С. 48-59.