

## **АМИНОКИСЛОТНЫЕ СПЕКТРЫ ГЕПАТОПАНКРЕАСА ЛЕГОЧНЫХ ПРЭСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕКОТОРЫХ АНТИМЕТАБОЛИТОВ**

*Чиркин Александр Александрович*  
д.б.н., профессор, профессор кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск  
[chir@tut.by](mailto:chir@tut.by)

*Балаева-Тихомирова Ольга Михайловна*  
к.б.н., доцент, заведующая кафедрой химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск  
[olgabal.tih@gmail.com](mailto:olgabal.tih@gmail.com)

*Вишневская Мария Викторовна*  
лаборант кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск  
[khim@ysu.by](mailto:khim@ysu.by)

*Дорошенко Евгений Михайлович*  
к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник НИЛ УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно  
[dgi03@mail.ru](mailto:dgi03@mail.ru)

*Целью исследования явилось изучение влияния антимиетаболитов этионина, стрептозотоцина, актиномицина D и пурамицина на спектры свободных аминокислот гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков - прудовика (*Lymnaea stagnalis* L.) и роговой катушки (*Planorbarius corneus* L.). Установлено, что четыре антимиетаболита вызвали одинаковый тип изменений спектров аминокислот гепатопанкреаса у прудовиков и роговых катушек: повышение концентрации семи и снижение концентрации десяти незаменимых аминокислот. Видовые различия изменений спектров аминокислот гепатопанкреаса включали меньшие изменения в связи с введением четырех антимиетаболитов: у прудовиков повышены концентрации двух незаменимых, а у роговых катушек - одной незаменимой аминокислоты, а также снижение концентрации в гепатопанкреасе прудовиков пяти незаменимых, а у роговых катушек – двух незаменимых аминокислот. Легочные пресноводные моллюски могут быть модельными организмами для оценки спектров свободных аминокислот тканей, вызванных введением биологически активных субстанций.*

**Ключевые слова:** *аминокислоты; легочные пресноводные моллюски; гепатопанкреас; антимиетаболиты; модельные организмы.*

## **AMINO ACID SPECTRA OF THE HEPATOPANKREAS OF PULMONARY FRESHWATER MOLLUSCS UNDER THE ACTION OF SOME ANTIMETABOLITES**

*Chirkin Alexandr Alexsandrovich*

*Dr.B.Sc, Professor, Professor of the Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk*  
[chir@tut.by](mailto:chir@tut.by)

*Balaeva-Tikhomirova Olga Michailovna*  
*C.B.Sc., Associate Professor, Head of the Department of Chemistry and Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk*  
[olgabal.tih@gmail.com](mailto:olgabal.tih@gmail.com)

*Vishnevskaya Mariya Victorovna*  
*laboratory assistant of the Department of Chemistry and Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk*  
[khim@vsu.by](mailto:khim@vsu.by)

*Doroshenko Eugeni Michailovich*  
*C.B.Sc., Associate Professor, Leading Researcher, NRL Grodno State Medical University, Grodno*  
[dgi03@mail.ru](mailto:dgi03@mail.ru)

*The aim of the study was to study the effect of the antimetabolites ethionine, streptozotocin, actinomycin D, and puromycin on the free amino acid spectra of the hepatopancreas of the lung freshwater mollusks - pond snail (*Lymnaea stagnalis* L.) and horn coil (*Planorbarius corneus* L.). It was found that four antimetabolites caused the same type of changes in the amino acid spectra of the hepatopancreas in pond snails and horn coils: an increase in the concentration of seven and a decrease in the concentration of ten essential amino acids. Species differences in the changes in the amino acid spectra of the hepatopancreas included smaller changes due to the introduction of four antimetabolites: the concentrations of two essential amino acids were increased in pond snails, and one essential amino acid in the horn coils, as well as a decrease in the concentration of five essential amino acids in the hepatopancreas of pond snails, and two essential amino acids in the horn coils. Pulmonary freshwater mollusks can be model organisms for assessing the spectra of free amino acids in tissues caused by the introduction of biologically active substances.*

**Keywords:** *amino acids; lung freshwater molluscs; hepatopancreas; antimetabolites; model organisms*

Проблема выбора модельных организмов для биохимических, молекулярно-биологических, биофармацевтических и биомедицинских целей становится все более острой из-за принятия многими странами регламентирующих документов, требующих снижения количества подопытных млекопитающих по этическим соображениям и введения мероприятий, уменьшающих страдания животных, введенных в эксперименты. Альтернативой млекопитающим животным могут быть простые организмы, например, легочные пресноводные моллюски прудовики (*Lymnaea stagnalis* L.) и роговые катушки (*Planorbarius corneus* L.), широко распространенные в поверхностных водах

Беларуси. Они используются в различных областях биологии и экологии в качестве модельных и контрольных организмов. Поэтому проводятся исследования по оценке молекулярно-структурной гомологии важнейших белков между различными модельными организмами и человеком. В последние годы показан средний уровень гомологии протеолитических ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков [1,2]. Целью исследования явилось изучение влияния антиметаболитов этионина, стрептозотоцина, актиномицина D и пурамицина на спектры свободных аминокислот гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков - прудовика (*Lymnaea stagnalis* L.) и роговой катушки (*Planorbarius corneus* L.).

#### **Материал и методы исследования.**

В эксперименте на первом поколении лабораторной культуры легочных пресноводных моллюсков было исследовано действие четырех субстанций антиметаболитного действия на спектры свободных аминокислот гепатопанкреаса: этионин – антиметаболит метионина (введение в ногу в дозе 1 мг/г массы моллюска), стрептозотин – ингибитор инсулиноцитов (введение в ногу в дозе 65 мкг/г массы моллюска), актиномицин D – ингибитор ДНК-зависимой РНК-полимеразы (введение в ногу в концентрации 1мкг/мл на 1 г массы животного) и пурамицин – ингибитор элонгации полипептидной цепи (введение в ногу в концентрации 20 мкг/мл на 1 г массы моллюска) [3]. Содержание свободных аминокислот гепатопанкреаса изучали через 3, 12, 24 и 48 часов после введения антиметаболитов. Навески гепатопанкреаса гомогенизировали в соотношении 1:10 (по объёму) в среде, содержащей 0,2 М раствор хлорной кислоты, 40 мг/л ЭДТА, 40 мг/л Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, а также 0,2 мМ nVal (внутренний стандарт). Определение свободных аминокислот и их дериватов проводили в полученном экстракте методом обращенно-фазной хроматографии с предколоночной дериватизацией о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой и детектированием по флуоресценции (338/445 нм). В работе использовали сорбент Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> с размером частиц 3,5 мкм, размеры колонки 2,1×150 мм, с предколонкой 2,1×12,5 мм, заполненной таким же сорбентом с размером частиц 5 мкм. При всех определениях использовался прибор ВЭЖХ Agilent 1200. Прием данных и обработка хроматограмм проводились с помощью программы Agilent Open Lab CDSC.01.05 с ручной коррекцией базовой линии, в режиме расчета по внутреннему стандарту с использованием одноуровневой калибровки [4].

Полученный цифровой материал обработан методами параметрической вариационной статистики.

#### **Полученные результаты и обсуждение.**

Этионин является антиметаболитом и антагонистом метионина. Его введение вызывало повышение концентрации Asp, Glu, Arg, Met, Phe, Ile во все сроки наблюдения в гепатопанкреасе у обоих видов легочных пресноводных

моллюсков. В этот перечень вошли три незаменимых гидрофобных незаряженных аминокислоты – метионин, фенилаланин и изолейцин. В гепатопанкреасе прудовиков были повышены концентрации His, bAla, GABA, Trp, Leu, а у роговых катушек – Glu, Thr. Кроме того у прудовиков были снижены концентрации Gln, Ala, Val, тогда как у роговых катушек Ser, GABA, Tyr, Trp.

Стрептозотоцин представляет собой соединение глюкозамин - нитрозомочевина. Стрептозотоцин подобно глюкозе транспортируется в клетку с помощью транспортного белка глюкозы GLUT2, но не распознается другими переносчиками глюкозы. Это объясняет его относительную токсичность для инсулиноцитов, поскольку эти клетки имеют высокие уровни GLUT2. Независимо от вида легочных пресноводных моллюсков введение стрептозотоцина во все сроки наблюдения привело к повышению концентрации в гепатопанкреасе двух важных для метаболизма аминокислот: Asp и незаменимой аминокислоты Met. Одновременно было обнаружено снижение концентрации восьми аминокислот в гепатопанкреасе: Ser, His, Gly, Arg, Thr, Ile, Leu, Lis (последние четыре аминокислоты относятся к незаменимым). Видовые особенности спектров аминокислот гепатопанкреаса заключались в повышении концентрации Gln и bAla у прудовиков и Ala у роговых катушек, а также снижение концентрации трех незаменимых аминокислот Trp, Phe, Val и важной для азотистого и энергетического обменов заменимой аминокислоты Glu у прудовиков; у роговых катушек были понижены во всем периоде наблюдения концентрации GABA и Tyr.

Актиномицин D ингибирует ДНК-зависимый синтез РНК - важнейший этап синтеза белков – транскрипцию. У обоих видов легочных пресноводных моллюсков введение актиномицина D вызвало во все сроки наблюдения повышение концентрации в гепатопанкреасе двух незаменимых (Phe, Ile) и четырех заменимых аминокислот (Ser, His, Gly, GABA), а также снижение концентрации трех незаменимых аминокислот (Val, Met, Leu). Видовые различия включали повышение концентрации Gln, Arg, bAla и снижение концентрации Glu и Ala в гепатопанкреасе прудовиков. У роговых катушек введение актиномицина D вызвало повышение содержания Trp и снижение концентрации Lys, Asp, Tyr.

Пурамицин является ингибитором синтеза белков на уровне трансляции. Введение пурамицина вызвало у обоих видов легочных пресноводных моллюсков в гепатопанкреасе повышение содержания Trp, Asp и снижение концентрации Val, Ile, Lys, His, GABA. Видовые различия действия пурамицина на спектры свободных аминокислот гепатопанкреаса проявились в повышении концентрации Tyr и снижении концентрации bAla у прудовиков, но в повышении концентрации Gly, Arg, bAla, Ala, GABA и снижении концентрации Ser в гепатопанкреасе роговых катушек.

Таким образом, четыре антиметаболита вызвали одинаковый тип изменений спектров аминокислот гепатопанкреаса у двух видов легочных пресноводных моллюсков: повышение концентрации 16 аминокислот, из которых 7 незаменимые, в том числе аспарагиновая кислота (этионин, стрептозотоцин и пурамицин), глицин (этионин, актиномицин D), метионин (этионин, стрептозотоцин), фенилаланин (этионин, актиномицин D), изолейцин (этионин, актиномицин D). Четыре антиметаболита вызвали также снижение концентрации 16 аминокислот, включая 10 незаменимых, в том числе валин (актиномицин D, пурамицин), изолейцин (стрептозотоцин, пурамицин), лейцин (стрептозотоцин, актиномицин D), лизин (стрептозотоцин, пурамицин) и гистидин (стрептозотоцин, пурамицин). Можно предположить, что общие изменения концентраций аминокислот гепатопанкреаса для обоих видов легочных пресноводных моллюсков могут служить объективным критерием антиметаболического действия каждой из четырех испытанных субстанций. Следует обратить внимание, что более половины аминокислот при этом относятся к незаменимым.

Видовые различия изменений спектров аминокислот гепатопанкреаса включали меньшие изменения в связи с введением четырех антиметаболитов: у прудовиков повышены концентрации 11 аминокислот, включая две незаменимых, а у роговых катушек – 6 аминокислот, в том числе одна незаменимая; снижение концентрации аминокислот в гепатопанкреасе прудовиков включало 13 аминокислот, включая пять незаменимых, а у роговых катушек – 10 аминокислот, в том числе две незаменимых. Эти данные могут использоваться для объяснения особенностей метаболических изменений в гепатопанкреасе моллюсков в связи с особенностями транспорта кислорода: у прудовиков медь-содержащим гемоцианином, а у роговых катушек железосодержащим гемоглобином.

#### **Заключение.**

Четыре антиметаболита вызвали одинаковый тип изменений спектров аминокислот гепатопанкреаса у двух видов легочных пресноводных моллюсков: повышение концентрации 7 и снижение концентрации 10 незаменимых аминокислот. Видовые различия изменений спектров аминокислот гепатопанкреаса включали меньшие изменения в связи с введением четырех антиметаболитов: у прудовиков повышены концентрации 2 незаменимых, а у роговых катушек – 1 незаменимой аминокислоты, а также снижение концентрации в гепатопанкреасе прудовиков 5 незаменимых, а у роговых катушек – 2 незаменимых аминокислот. Таким образом, легочные пресноводные моллюски могут служить модельными организмами для оценки действия биологически активных субстанций антиметаболического действия на спектры свободных аминокислот гепатопанкреаса и, вероятно, окажутся полезными для доклинических биофармацевтических испытаний.

### **Список литературы**

1. А.А. Чиркин, Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции / А.А. Чиркин [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хім. навук. – 2021. – Т. 57, №. 2. – С. 206-221.
2. А.А. Чиркин, Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов: монография / А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова. – Чебоксары: Издательский дом «Среда», 2022. – 124 с.
3. Клеточный цикл. Проблемы регуляции. Под. ред. О.И. Епифановой. – М.: Наука, 1973. – 193 с.
4. Е.М. Дорошенко, Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлениями хронической сердечной недостаточности / Е.М. Дорошенко, В.А. Снежицкий, В.В. Лелевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017. – Т. 15, № 5. – С. 551-556.