

ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ПРОТЕОЛИЗ-АНТИПРОТЕОЛИЗ НА МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКАХ

Чиркин Александр Александрович
д.б.н., профессор, профессор кафедры химии и естественнонаучного
образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск
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

Долматова Виктория Викторовна
младший научный сотрудник кафедры химии и естественнонаучного
образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск
vika.dolmatova19@yandex.by

Вишневская Мария Викторовна
лаборант кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М.
Машерова, г. Витебск
khim@vsu.by

Целью исследования явилось установление возможности использования легочных пресноводных моллюсков - прудовика (*Lymnaea stagnalis* L.) и роговая катушка (*Planorbis cornutus* L.) для изучения фармакодинамики этионина, стрептозотоцина, актиномицина D и пуромицина на активность трипсиноподобных протеиназ, антипротеазного ингибитора и α 2-макроглобулина в гемолимфе и гепатопанкреасе. Установлено, что на все использованные в работе субстанции-антиметаболиты у легочных пресноводных моллюсков была выявлена однотипная реакция ферментов системы протеолиза-антипротеолиза – повышение активности трипсиноподобных протеаз и снижение активности антипротеазного ингибитора и α 2-макроглобулина. Легочные пресноводные моллюски могут быть модельными организмами для оценки катаболических процессов, вызванных введением биологически активных субстанций, оказывающих повреждающее действие на биохимические процессы обмена глюкозы и процессы биосинтеза белков.

Ключевые слова: протеолиз; антипротеолиз; антиметаболиты; модельные организмы.

PHARMACODYNAMIC STUDIES OF THE PROTEOLIS-ANTIPROTEOLIS SYSTEM IN MODEL ANIMALS OF PULMONARY FRESHWATER MOLLUSCS

Chirkin Aleksander Aleksandrovich

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

Balaeva-Tikhomirova Olga Michailovna

C.B.Sc., Associate Professor, Head of the Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk
olgabal.tih@gmail.com

Dolmatova Victoria Victorovna

Junior Researcher, Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk
vika.dolmatova19@yandex.by

Vishnevskaya Mariya Victorovna

Laboratory assistant of the Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk
khim@vsu.by

*The aim of the study was to establish the possibility of using pulmonary freshwater mollusks - pond snail (*Lymnaea stagnalis* L.) and horn coil (*Planorbarius corneus* L.) to study the pharmacodynamics of ethionine, streptozotocin, actinomycin D and puromycin on the activity of trypsin-like proteinases, antiprotease inhibitor and α 2-macroglobulin in hemolymph and hepatopancreas. It was found that all antimetabolite substances used in the work in lung freshwater molluscs showed the same type of reaction of enzymes of the proteolysis-antiproteolysis system - an increase in the activity of trypsin-like proteases and a decrease in the activity of the antiprotease inhibitor and α 2-macroglobulin. Pulmonary freshwater mollusks can be model organisms for evaluating catabolic processes caused by the introduction of biologically active substances that have a damaging effect on the biochemical processes of glucose metabolism and protein biosynthesis.*

Keywords: *proteolysis; antiproteolysis; antimetabolites; model organisms.*

Легочные пресноводные моллюски прудовики (*Lymnaea stagnalis* L.) и роговые катушки (*Planorbarius corneus* L.) используются в различных областях биологии и медицины в качестве модельных организмов. В последние годы показан средний уровень гомологии протеолитических ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков [1,2]. Целью настоящего исследования явилось установление возможности использования этих модельных организмов для изучения фармакодинамики некоторых биологически активных субстанций на ферменты системы протеолиза-антипротеолиза.

Материал и методы исследования.

Фармакодинамическое исследование проведено на первом поколении лабораторной культуры легочных пресноводных моллюсков. В работе использованы четыре биологически активных субстанции: этионин –

антиметаболит метионина (введение в ногу в дозе 1 мг/г массы моллюска), стрептозотозин – 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). Активность ферментов системы протеолиза-антипротеолиза изучали через 3, 12, 24 и 48 часов. Определение протеолитической активности в гемолимфе и ткани гепатопанкреаса проводили с использованием в качестве субстрата стабильного в растворе низкомолекулярного хромогенного соединения БАПНА (N- α -бензоил-D,L-аргинин-паранитроанилид) и выражали в ммоль/(л \times с). Определение активности трипсиноподобных протеиназ (ТпА) и антипротеолитической активности (антипротеазный ингибитор – АПИ и α 2-макроглобулин – α 2-МГ) проводили с помощью ранее описанных методов [2]. В предварительных опытах было установлено оптимальное время инкубирования ферментативных реакций – 20 часов. В гемолимфе интактных легочных пресноводных моллюсков активность трипсиноподобных протеиназ находилась в пределах 10,3-13,5 ммоль/(л \times с), а в ткани гепатопанкреаса – 26,4-80,6 ммоль/(кг \times с). Для исследования антипротеолитической активности были выявлены оптимальные величины pH инкубационной среды, которые составили для АПИ pH 3,8, а для α 2-МГ pH 3,0. Величины активности антипротеолитической активности ферментов у легочных пресноводных моллюсков были в гемолимфе АПИ 6,0-8,2 г/л, α 2-МГ 7,3-10,2 г/л, а в гепатопанкреасе – АПИ – 5,9-6,4 г/л, α 2-МГ – 5,96-10,3 г/л [2].

Полученные результаты и обсуждение.

Этионин является антиметаболитом и антагонистом метионина. Он предотвращает включение аминокислот в белки и препятствует использованию клетками аденозинтрифосфата (АТФ). Из-за этих фармакологических эффектов этионин очень токсичен и является сильнодействующим канцерогеном [3]. После введения этионина через 3 часа активность протеолиза в гемолимфе прудовика повышалась в гемолимфе в 1,6 раза, а в гемолимфе катушки роговой – в 3,4 раза по сравнению с контролем. Затем следовало ее снижение к 48 часам в 1,3 раза у прудовиков и в 2,1 раза у роговых катушек. В гепатопанкреасе прудовиков активность трипсиноподобных протеиназ изменялась волнообразно с двумя пиками активности через 3 часа в 12,5 раза и через 24 часа в 14,4 раза. В гепатопанкреасе роговых катушек этионин вызывал повышение активности трипсиноподобных протеиназ в интервале 3-24 часа в 3 раза по сравнению с контролем. В гемолимфе прудовиков было обнаружено снижение активности ингибиторов протеолиза в интервале 3-48 часов после введения этионина с максимальным снижением значений АПИ в 1,9 раза через 24 часа и α 2-МГ в 1,37 раза через 12 часов. В гепатопанкреасе прудовиков активность ингибиторов

протеиназ после снижения повышалась с максимальными значениями через 48 часов после введения этионина (активность АПИ в 2,7 раза, а α 2-МГ – в 5 раз). Аналогичные изменения величин ингибиторов протеиназ были выявлены после введения этионина в гемолимфе и гепатопанкреасе роговых катушек. Таким образом, выявлены следующие общие тренды в динамике активности трипсиноподобных протеиназ в гемолимфе и гепатопанкреасе после введения этионина: 1) активность трипсиноподобных протеиназ преимущественно повышается в гемолимфе и гепатопанкреасе в интервале 3-24 часа с тенденцией к нормализации через 48 часов; 2) антипротеолитическая активность в гемолимфе снижается в интервале 3-24 часа с тенденцией к нормализации через 48 часов; 3) антипротеолитическая активность в гепатопанкреасе обоих видов моллюсков закономерно возрастает к 48 часам после введения этионина.

Стрептозотоцин представляет собой соединение глюкозамин - нитрозомочевина. Как и другие алкилирующие агенты из класса нитрозомочевины, он токсичен для клеток, вызывая повреждение ДНК, хотя другие механизмы также могут вносить свой вклад. Повреждение ДНК вызывает активацию PARP (поли АДФ-рибоза полимеразы), что, вероятно, более важно для индукции диабета, чем само повреждение ДНК. Стрептозотоцин подобно глюкозе транспортируется в клетку с помощью транспортного белка глюкозы GLUT2, но не распознается другими переносчиками глюкозы. Это объясняет его относительную токсичность для бета-клеток, поскольку эти клетки имеют относительно высокие уровни GLUT2 [4]. После однократного введения стрептозотоцина наблюдались две фазы гипергликемии: первая в интервале 1-4 часа, вероятно, связана с уменьшением концентрации инсулина в плазме, а вторая (финальная, устойчивая) развивалась через 24-36 часов с лабораторными признаками диабета. В гемолимфе легочных пресноводных моллюсков протеолитическая активность после введения стрептозотоцина через 24 и 48 была достоверно выше контрольного уровня. При этом у прудовиков активность ферментов протеолиза увеличивалась в 1,5 раза на вторые сутки, а у роговых катушек активность ферментов протеолиза возрастала в 6 раз через 24 часа и в 7 раз через двое суток. В гепатопанкреасе введение стрептозотоцина привело к повышению трипсиноподобной активности у прудовиков в 4,7 раза, а у роговых катушек в 1,7 раза через 24 часа. Затем последовало уменьшение величин трипсиноподобной активности через 48 часов в 5,5 и 1,7 раза, соответственно. В гемолимфе обоих видов легочных пресноводных моллюсков после введения стрептозотоцина через 1 и 2 суток активность антипротеолитических ферментов снижалась, а в гепатопанкреасе повышалась.

Актиномицин D ингибирует клеточную пролиферацию путём образования стабильного комплекса с ДНК и нарушения ДНК-зависимого синтеза РНК (транскрипции). Ранее считалось, что актиномицин интеркалирует в ДНК по стэкинговому типу. Это верно лишь при избытке субстанции. При малых

концентрациях (мкМ) антибиотик связывается с расплетенными участками, к которым имеет в 100 раз большее сродство, чем к двойной спирали [5]. После однократного введения актиномицина D активность трипсиноподобных протеиназ в гемолимфе прудовика повышалась дважды в 1,3 раза через 12 и 48 часов. В гемолимфе роговых катушек активность этих ферментов была повышена во все сроки наблюдения с максимумом в 4,8 раза через 48 часов. В гепатопанкреасе как прудовиков, так и роговых катушек наблюдалось повышение активности трипсиноподобных протеиназ с максимальными значениями через 48 часов, превышающими контроль в 5,6 раза у прудовиков и в 2,5 раза у роговых катушек. Антипротеолитическая активность закономерно снижалась на протяжении всего двухсуточного периода наблюдения у обоих видов легочных пресноводных моллюсков в 1,3-1,6 раза. Оценивая тренды изменений ферментов протеолиза и антипротеолиза у прудовиков и роговых катушек после введения актиномицина D, следует отметить отсутствие признаков нормализации активности протеолитических ферментов протеолиза и антипротеолиза через 48 часов наблюдения.

Пуромицин – антибиотик пуринового ряда, продуцируемый бактериями *Streptomyces alboniger*. Является ингибитором синтеза белков на уровне трансляции. По химическому строению пуромицин сходен с аминоксил-тРНК. Он взаимодействует с А-центром пептидил-тРНК с образованием пептидил-пуромицина. Последний не несет на себе триплета антикодона и таким образом тормозит элонгацию растущей пептидной цепи, вызывая преждевременную терминацию синтеза белка. Пуромицин оказывает одинаково эффективное ингибирующее действие на синтез белков как у прокариота, так и у эукариота [6]. После однократного введения пуромицина в гемолимфе прудовиков через 3 часа найдено снижение трипсиноподобной активности в 3,7 раза с последующим повышением, но не достигающим контрольных величин через 48 часов. У роговых катушек трипсиноподобная активность гемолимфы на протяжении первых суток наблюдения превышала контрольные значения в 1,5 раза. В гепатопанкреасе прудовиков наблюдалось повышение активности трипсиноподобных протеиназ на протяжении 48 часов (в 1,9 раза выше контрольных значений). В гепатопанкреасе роговых катушек также отмечено повышение трипсиноподобных протеиназ (в 1,6 раза выше контрольных значений). Активность антипротеолитических ферментов в гемолимфе у прудовиков снижалась через 3 часа после введения пуромицина в 1,4 раза и затем постепенно повышалась к 48 часам наблюдения, но не достигала контрольных значений. Активность этих ферментов в гепатопанкреасе прудовиков снижалась в интервале 3-12 часов и затем сохранялась на пониженном уровне до 48 часов наблюдения. В гепатопанкреасе роговых катушек введение пуромицина вызвало снижение активности АПИ через 3 часа с последующим повышением активности к 48 часам наблюдения; активность $\alpha 2$ -МГ постепенно снижалась во

все периоды наблюдения до минимального значения по сравнению с контролем в 1,3 раза через 48 часов.

Заключение.

Таким образом, легочные пресноводные моллюски оказались удобными модельными организмами для оценки катаболических процессов, вызванных введением биологически активных субстанций, оказывающих повреждающее действие на биохимические процессы обмена глюкозы и процессы биосинтеза белков. Установлено, что на все использованные в работе субстанции-антиметаболиты у легочных пресноводных моллюсков была выявлена однотипная реакция ферментов системы протеолиза-антипротеолиза – повышение активности трипсиноподобных протеаз и снижение активности антипротеазного ингибитора и $\alpha 2$ -макроглобулина. Некоторые количественные различия в степени изменения активности протеолитических и антипротеолитических ферментов между двумя видами моллюсков, возможно, связаны с различиями у них механизмов транспорта кислорода в гемолимфе – у прудовиков медь содержащим гемоцианином, а у роговых катушек – железо содержащим гемоглобином. Эти отличия могут быть использованы при анализе протеасомного АТФ-зависимого пути деградации белков в клетках живых организмов. Легочные пресноводные моллюски по этическим соображениям, стоимости, удобству содержания, возможности доставки субстанции прямо к клеткам-мишеням из-за отсутствия сосудистых стенок превосходят модельные организмы млекопитающих. Эти организмы имеют тканевые аналоги большинства органов млекопитающих, что позволяет моделировать различные патологические процессы.

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 хімі. 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. N. Shivapurkar, Hypomethylation of DNA in ethionine-fed rats / N.N. Shivapurkar, J. W. Mary, A. Lionel // Carcinogenesis. – 1984. – Vol. 5 (8). – P. 989–992.
4. T. Szkudelski, The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas / T. Szkudelski // Physiol. Res. – 2001. – Vol. 50 (6). – P. 537–546.
5. H.M. Sobell, (August 1985). Actinomycin and DNA transcription / H.M. Sobell // Proc. Nat. Acad. Sci. USAmerica. – 1985. – Vol. 82 (16). – P. 5328–5331.
6. S. Pestka, Inhibitors of ribosome functions / S.Pestka // Annu. Rev. Microbiol. – 1971. - Vol. 25. – P. 487–562.