

УДК 594.38:577.112(476.5)

А. А. ЧИРКИН, В. В. ДОЛМАТОВА, Е. И. КАЦНЕЛЬСОН, Т. А. ТОЛКАЧЕВА

ИЗУЧЕНИЕ СИСТЕМЫ ПРОТЕОЛИЗ – АНТИПРОТЕОЛИЗ В ТКАНЯХ ЛЕГОЧНЫХ ПРЭСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭТИОНИНА

Витебский государственный университет им. П.М. Машерова, Витебск, Беларусь

При исследовании гемолимфы и гепатопанкреаса прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis* L.) и катушки роговой (*Planorbarius corneus* L.), отличающихся по типу транспорта кислорода, протеолитическая и антипротеолитическая активность обнаружена во всем исследуемом диапазоне значений рН. Наиболее высокие значения трипсиноподобной активности выявлены при значениях рН инкубационной среды в диапазоне 3,6–9,0, а количества α 1-антипротеазного ингибитора при рН 3,6–3,8 и α 2-макроглобулина при рН 3,0. В гепатопанкреасе выявлена высокая антипротеазная активность, направленная против кислых и слабокислых протеаз, вероятно, лизосомального происхождения. Сделано заключение о большей устойчивости системы протеолиз-антипротеолиз у катушек по сравнению с прудовиками. Высказано предположение, что легочных пресноводных моллюсков целесообразно использовать как модельные организмы не только в токсикологии, но и в программах биомедицинских исследований.

Ключевые слова: моллюски, этионин, протеолиз, антипротеолиз, модельный организм.

Введение. Известны два основных типа протеолиза – АТФ-независимый и АТФ-зависимый. Первый активируется в условиях голодания и не требует затраты энергии, второй функционирует постоянно и избирательно. В этих процессах участвуют, разные протеолитические ферменты. При некоторых типах повреждения клеток нарушается окислительное фосфорилирование, снижается синтез АТФ, растёт потребление кислорода, а также синхронно активируются гликолиз и протеолитические процессы. Хотя описанные механизмы известны более 20 лет, их исследование остается актуальным из-за высокой научно-практической важности решения проблемы функционирования системы протеолиз–антипротеолиз. Новый подход для решения этой проблемы 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 г. 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, 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. Содержание гемоцианина в расчете на медь составляет 1,63–3,02 г/л. Следует отметить, что прудовик является облигатным промежуточным хозяином около 30 видов трематод. При инфицировании редиями (*Echinoparyphium aconiatum*) содержание гемоцианина в тканях увеличивается в 1,2 раза. При слабом паразитарном поражении моллюсков такая реакция является выражением защитно-восстановительного, тогда как при тяжелой инвазии – патологического процесса [4]. Информации о гемоглобинах катушек в норме и патологии значительно меньше. Даже в суммарной таблице, приводимой в документе ЕЭС (Testing and

Assessment. No. 121) в графе с параметрами катушек на 30% больше прочерков по сравнению с графой, посвященной параметрам прудовиков. Следовательно, представляется важным дальнейшее сравнительное изучение биохимических параметров тканей прудовиков и катушек в рамках проблемы биомониторинга среды обитания.

Известно, что протеолитические ферменты подразделяются на две основные группы: пептидазы (КФ 3.4.11-15), катализирующие гидролиз пептидных связей с N- и C-конца пептидной цепи, и протеиназы (КФ 3.4.21-24), обеспечивающие гидролиз пептидных связей полипептидных цепей с образованием пептидов. По строению активного центра их делят на сериновые, тиоловые, карбоксильные и металлосодержащие. Все вместе они образуют комплекс протеаз, расщепляющих белки до пептидов и аминокислот при различных значениях pH: для кислых протеаз – pH 3,0; для слабокислых – pH 4,8–5,3; для нейтральных – pH 7,0 и для щелочных – pH 8,0–9,0.

Целью работы явилось изучение активности протеолиза и антипротеолиза в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода, после введения антимагнетолита метионина – этионина. При всех преимуществах исследования фармакодинамики биологически активных веществ у млекопитающих имеется существенный недостаток, связанный с наличием системы замкнутого кровообращения, вследствие чего вводимые гидрофильные молекулы должны преодолевать гемато-клеточные барьеры и зависеть от нейрогуморальных механизмов регуляции кровообращения. У моллюсков имеется незамкнутая система кровообращения, которая позволяет вводимым в гемолимфу веществам действовать непосредственно на клетки-мишени [5].

Материалы и методы. Материалом для исследования были гемолимфа и гепатопанкреас 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, 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 [6, 7] при значениях pH инкубационных сред 3,0, 3,6, 3,8, 6,1, 7,2, 8,0 и 9,0. Активность ТпА выражали в мкмоль/(г \times с), содержание АПИ и α_2 -МГ – в г/л. Содержание белков (мг/г) определяли по Лоури [8], ДНК и РНК (мг/г ткани) определяли по методу, предложенному G. Blobel и V.R. Potter, основанному на спектрофотометрическом определении ДНК при λ_{270} и λ_{290} нм и РНК при λ_{270} [9].

Препарат этионина вводили в ногу моллюска в концентрации 1 мг/г массы тела моллюсков. Исследования проводили через 3, 12, 24 и 48 часов. В качестве контроля вводили раствор натрия хлорида в концентрации 1 мг/г массы моллюсков. Полученный цифровой материал подвергали статистической обработке методами параметрической статистики.

Результаты и их обсуждение. При исследовании гемолимфы протеолитическая и антипротеолитическая активность обнаружена во всем исследуемом диапазоне значений pH. Это значит, что комплекс протеаз гемолимфы легочных пресноводных моллюсков включает кислые (pH 3), слабокислые (pH 3,6–3,8), нейтральные (pH 6,1–7,2) и щелочные (pH 8–9) протеазы (табл. 1).

Табл.1. Протеолитическая и антипротеолитическая активность (%) гемолимфы моллюсков в зависимости от pH инкубационной среды

Диапазон pH	Прудовики			Катушки		
	ТпА	АПИ	α_2 -МГ	ТпА	АПИ	α_2 -МГ
3,0	13,8	6,1	37,8	16,6	15,3	34,8
3,6–3,8	29,5	77,4	23,8	23,9	78,1	24,0
6,1–7,2	30,3	7,0	19,6	35,4	2,1	20,7
8,0–9,0	26,4	9,5	18,8	24,1	4,5	20,5

Наиболее высокие значения трипсиноподобной активности были выявлены при значениях pH инкубационной среды в диапазоне 3,6–9,0, количества АПИ при pH 3,6–3,8 и α_2 -МГ при pH 3,0. Данные о зависимости количества ингибиторов протеолиза гепатопанкреаса от величины pH инкубационной среды представлены в табл. 2.

Аналогичные результаты получены при исследовании гепатопанкреаса обоих видов моллюсков: количества АПИ оказалось наиболее высоким при pH 3,6–3,8 и α_2 -МГ при pH 3,0.

Таким образом, выявлена мощная антипротеазная активность, направленная против кислых и слабокислых протеаз, вероятно, лизосомального происхождения. Данные о влиянии этионина на

активность трипсиноподобных протеиназ в гепатопанкреасе и гемолимфе моллюсков представлены в табл. 3).

Табл. 2. Зависимость активности ингибиторов протеиназ (г/л) в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков от pH буферного раствора

pH	Прудовик обыкновенный		Катушка роговая	
	АПИ	α_2 -МГ	АПИ	α_2 -МГ
3,0	0,97±0,11	22,80±3,70 ²	3,06±0,59	20,1±3,80 ²
3,6	2,45±0,25 ¹	4,48±0,95 ¹	5,81±0,79 ¹	5,21±1,88 ¹
3,8	9,84±0,16 ¹	9,92±0,11 ¹	9,82±0,17 ¹	8,65±1,02 ¹
6,1	0,36±0,08 ¹	5,99±0,52 ^{1,2}	0,22±0,11 ¹	6,10±0,58 ¹
7,2	0,75±0,14	5,84±0,59 ^{1,2}	0,19±0,14 ¹	5,83±0,49 ¹
8,0	1,04±0,17	5,44±0,21 ^{1,2}	0,59±0,27 ¹	5,98±0,43 ¹
9,0	0,47±0,05 ¹	5,89±0,03 ^{1,2}	0,31±0,11 ¹	5,85±0,58 ¹

¹– $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ²– $p < 0,05$ по сравнению между одноименными группами прудовиков и катушек.

Табл. 3. Влияние этионина на протеолитическую активность гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков

Срок наблюдения	Трипсиноподобные протеиназы (ТпА)	
	Прудовики	Катушки
Гепатопанкреас, мкмоль/(г×с)		
Контроль	213 ± 31,5	159 ± 15,2
Через 3 часа	330 ± 24,5 ¹	242 ± 19,3 ^{1,2}
Через 12 часов	115 ± 19,7 ¹	252 ± 16,8 ^{1,2}
Через 24 часа	381 ± 29,6 ¹	226 ± 25,2 ^{1,2}
Через 48 часов	212 ± 27,4	180 ± 16,2
Гемолимфа, мкмоль/(мл×с)		
Контроль	37,1 ± 3,02	28,8 ± 3,77
Через 3 часа	21,0 ± 2,86 ¹	34,1 ± 6,73
Через 12 часов	20,0 ± 6,95 ¹	31,8 ± 7,12
Через 24 часа	18,3 ± 1,87 ¹	26,4 ± 4,85
Через 48 часов	17,2 ± 0,56 ¹	25,7 ± 5,81

¹– $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ²– $p < 0,05$ по сравнению между одноименными группами прудовиков и катушек.

Из анализа данных табл. 3 следует, что в гепатопанкреасе прудовиков активность ТпА изменялась волнообразно с двумя пиками активности через 3 и 24 часа после введения этионина. В гепатопанкреасе катушек этионин вызывал повышение их активности в интервале 3–24 часа. Значения активности ТпА гепатопанкреаса у катушек были достоверно ниже по сравнению с прудовиками через 3 и 24 часа после введения этионина. Эти данные позволяют сделать предположение, что система протеолиза клеток гепатопанкреаса у катушек оказалась более устойчивой к действию этионина по сравнению с прудовиками. Поскольку оценка трипсиноподобной активности проводилась при pH 8,0, было проведено исследование количества ингибиторов протеолиза после введения этионина также при pH 8 (табл. 4).

Табл. 4. Влияние этионина на антипротеолитическую активность гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков (pH 8,0)

Срок наблюдения	АПИ		α_2 -МГ	
	Прудовики	Катушки	Прудовики	Катушки
Гепатопанкреас, мг/г				
Контроль	1,04 ± 0,37	0,31 ± 0,08 ²	0,44 ± 0,21	6,61 ± 0,63
Через 3 часа	1,19 ± 0,03 ¹	1,61 ± 0,01 ^{1,2}	2,41 ± 0,15 ¹	2,24 ± 0,30 ¹
Через 12 часов	7,58 ± 1,04 ¹	6,44 ± 0,99 ¹	7,60 ± 0,79 ¹	7,83 ± 0,52
Через 24 часа	5,54 ± 0,61 ¹	4,51 ± 0,09 ¹	5,96 ± 0,68 ¹	5,86 ± 0,66
Через 48 часов	0,68 ± 0,21	2,32 ± 0,08 ¹	5,48 ± 0,31 ¹	5,77 ± 0,04
Гемолимфа, мг/мл				
Контроль	1,04 ± 0,37	0,59 ± 0,27	5,44 ± 0,31	5,98 ± 0,43
Через 3 часа	0,12 ± 0,01	0,27 ± 0,19	6,00 ± 0,09	5,65 ± 0,15
Через 12 часов	0,15 ± 0,01	0,29 ± 0,04 ^{1,2}	5,86 ± 0,02	6,03 ± 0,24
Через 24 часа	0,21 ± 0,09 ¹	0,29 ± 0,08	5,84 ± 0,03	5,77 ± 0,04

Через 48 часов	$0,29 \pm 0,02^1$	$0,42 \pm 0,15^2$	$6,19 \pm 0,08$	$6,20 \pm 0,67$
----------------	-------------------	-------------------	-----------------	-----------------

Примечание: ¹– $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ²– $p < 0,05$ по сравнению между одноименными группами прудовиков и катушек

Установлено, что в гепатопанкреасе обоих видов моллюсков содержание АПИ достоверно возрастало уже через 3 часа после введения этионина и достигало максимума через 12 часов (превышение исходного уровня в 7–20 раз). У прудовиков количество АПИ снижалось до контрольного уровня через 48 часов, а в гепатопанкреасе количество АПИ оставалось повышенным в 8 раз по сравнению с исходными данными. Количество α_2 -МГ в гепатопанкреасе катушек в 15 раз превышало уровень этого ингибитора протеолиза у прудовиков. После введения этионина количество α_2 -МГ в гепатопанкреасе прудовиков повышалось до уровня этого показателя в гепатопанкреасе катушек. У катушек уровень α_2 -МГ оставался на исходном уровне после кратковременного снижения его содержания через 3 часа после введения этионина. Таким образом, можно предположить, что основной реакцией на введение этионина является повышение концентрации ингибиторов протеолиза в гепатопанкреасе, если определение ведется при рН 8,0.

Данные о суммарной ингибиторной емкости (СИЕ) показали, что до введения этионина сумма АПИ и α_2 -МГ в гепатопанкреасе у прудовиков была в 4, 7 раза ниже, чем у катушек (рис. 1).

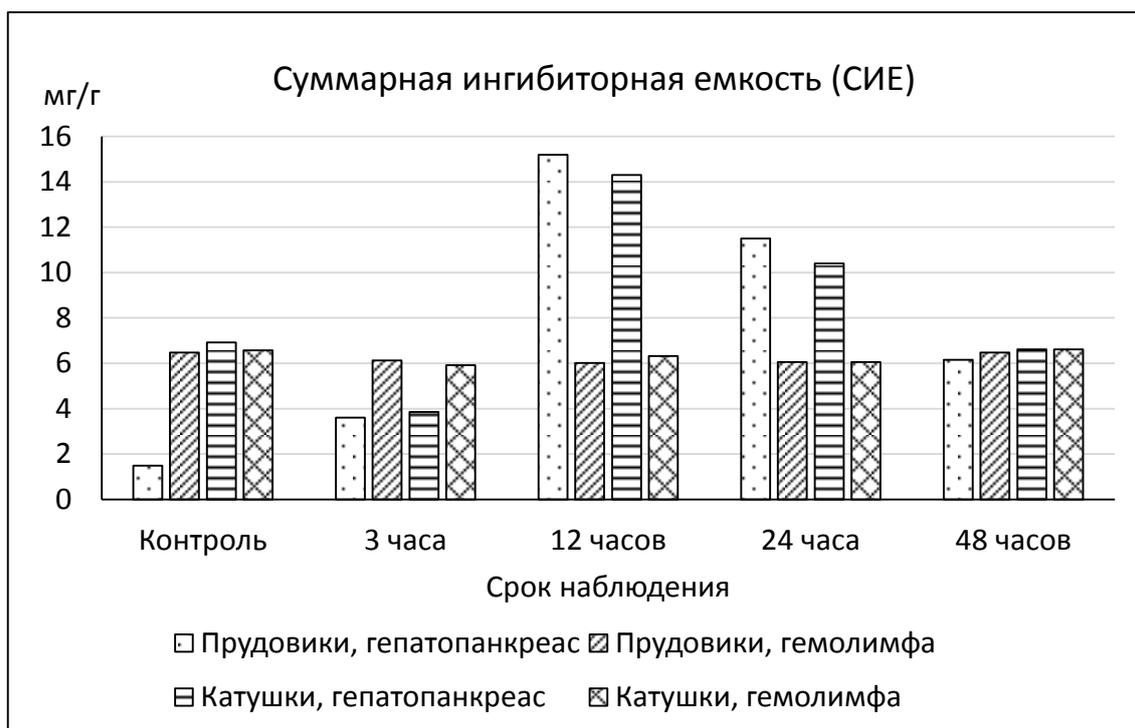


Рис. 1. Влияние этионина на суммарную ингибиторную емкость (СИЕ) гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков (рН 8,0)

После введения этионина показатель СИЕ изменялся однотипно, что доказывает наличие общего эффекта повышения антипротеолитической активности после введения этионина у прудовиков и катушек. Поскольку наибольшее повышение величины СИЕ было зарегистрировано через 12 часов у прудовиков в 10 раз, а у катушек только в 2 раза, можно полагать, что катушки могут быть более устойчивыми организмами к действию антиметаболита этионина. Это предположение подтверждается данными о более значительном снижении содержания АПИ в гемолимфе прудовиков по сравнению с катушками (табл. 5).

В табл. 5 представлены данные о влиянии этионина на содержание ингибиторов протеиназ, определенных при оптимальных значениях рН.

В результате поведенных исследований установлено, что содержание АПИ и α_2 -МГ в гепатопанкреасе у контрольных моллюсков находится на уровне, близком к максимальному их содержанию через 12 часов после введения этионина и определенному при рН 8,0. Пик содержания АПИ и α_2 -МГ, определенных при оптимуме рН в гепатопанкреасе, сдвигается у прудовиков на 48 часов после введения этионина. В гепатопанкреасе катушек через 3 часа после введения этионина снижено количество АПИ и α_2 -МГ, но в последующие сроки наблюдения эти показатели

соответствуют контрольным значениям. В гемолимфе обоих видов моллюсков отмечено одинаковое по величине снижение концентрации АПИ и α_2 -МГ во все сроки наблюдения.

Табл. 5. Влияние этионина на антипротеолитическую активность гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков пресноводных моллюсков

Сроки наблюдения	АПИ (рН 3,8)		α_2 -МГ (рН 3,0)	
	Прудовики	Катушки	Прудовики	Катушки
Гепатопанкреас, мг/г				
Контроль	9,59±0,92	10,7±1,32	17,2±1,16	25,6±2,59 ²
Через 3 часа	9,55±0,74	6,01±1,01 ^{1,2}	30,5±2,58 ¹	14,3±2,97 ^{1,2}
Через 12 часов	9,24±1,08	7,65±1,19	26,3±2,40 ¹	26,4±3,96
Через 24 часа	11,0±1,53	9,51±1,64	20,4±1,32	25,0±2,39
Через 48 часов	18,4±1,90 ¹	11,9±1,32 ²	52,4±4,09 ¹	33,4±4,93 ²
Гемолимфа, мг/мл				
Контроль	9,84±0,16	9,82±0,17	22,8±2,79	20,1±2,84
Через 3 часа	5,12±0,38 ¹	4,67±1,19 ¹	7,02±2,44 ¹	11,7±1,81 ¹
Через 12 часов	5,59±0,51 ¹	5,42±1,45 ¹	5,26±0,54 ¹	4,67±0,73 ¹
Через 24 часа	4,11±0,18 ¹	4,50±0,96 ¹	5,22±0,58 ¹	3,86±0,55 ¹
Через 48 часов	7,17±0,87 ¹	7,61±0,76 ¹	7,08±0,83 ¹	9,99±0,87 ¹

Данные о суммарной антипротеолитической активности гепатопанкреаса и гемолимфы моллюсков представлены на рис. 2.

Анализ содержания ингибиторов при оптимальных значениях рН показал, что в контрольных образцах гепатопанкреаса показатель СИЕ у прудовиков всего в 1,35 раза меньше, чем у катушек. Через 48 часов после введения этионина в гепатопанкреасе прудовиков уровень СИЕ превышает контрольные значения в 2,65 раза. У катушек через 3 часа после введения этионина величина СИЕ снизилась в панкреасе в 1,79 раза, затем значения суммарной ингибиторной емкости нормализовались. В гемолимфе величины СИЕ в гемолимфе обоих видов моллюсков были снижены через 3 часа – 24 часа после введения этионина. Признаки тенденции к нормализации этого показателя просматриваются через 48 часов, причем этот эффект выражен в большей степени у катушек.

На основании полученных данных о влиянии этионина на содержание ингибиторов протеолиза можно сделать заключение о большей устойчивости системы протеолиз–антипротеолиз у катушек по сравнению с прудовиками. Для подтверждения этого предположения исследовано содержание белков в гепатопанкреасе и гемолимфе, а также количество нуклеиновых кислот в гепатопанкреасе контрольных и подопытных моллюсков. Установлено, что в гепатопанкреасе и гемолимфе катушек содержание общего белка достоверно ниже, чем у прудовиков (табл. 6). После введения этионина в гепатопанкреасе у прудовиков было снижено содержание белков в течение всего периода наблюдения, а в гемолимфе выявлено более чем пятикратное снижение концентрации белка через 24 часа.

В гепатопанкреасе катушек снижение содержания белков было обнаружено только через 24 часа после введения этионина, а в гемолимфе содержание общего белка поддерживалось на постоянном контрольном уровне.

Кроме нарушений соотношения протеолиза и антипротеолиза причиной полученных изменений в содержании общего белка в гепатопанкреасе и гемолимфе могло явиться негативное влияние этионина на содержание нуклеиновых кислот в клетках. В табл. 7 приведены данные о содержании ДНК и РНК в гепатопанкреасе обоих видов моллюсков после введения этионина.

Оказалось, что у обоих обследуемых видов моллюсков содержание ДНК уменьшалось в гепатопанкреасе через 24 часа, а РНК – через 12 и 24 часа после введения этионина. Изучая динамику величин отношения РНК/ДНК (рис. 3), установлено, что в контроле, а также через 3, 12, 24 и 48 часов для гепатопанкреаса прудовиков и катушек получены следующие величины: 5,86–5,90, 5,79–6,20, 5,90–6,12, 6,64–6,73, 6,14–6,45, соответственно. Из этих данных может следовать предположение, что увеличение уровня РНК, обычно связанного с биосинтезом белка, в гепатопанкреасе катушек начинается с 3-х суток, а у прудовиков – только через 24 часа после введения этионина. Для объяснения полученных данных следует принимать во внимание, что этионин вызывает снижение содержания АТФ в цитозоле и митохондриях гепатоцитов млекопитающих, сопровождаемое активацией гликолиза, а также снижением величины отношения АТФ/АДФ и НАД⁺/НАДН в митохондриях. При введении этионина нарушается процесс инициации синтеза полипептидных цепей

у эукариотических клеток за счет подавления образования тройного комплекса eIF-2-ГТФ и Мет-тРНК (на 65–85%). Эти изменения совпадают с дезагрегацией полисом, а ингибирование инициации синтеза белка печени, индуцированного этионином, опосредуется фосфорилированием eIF-2 α .

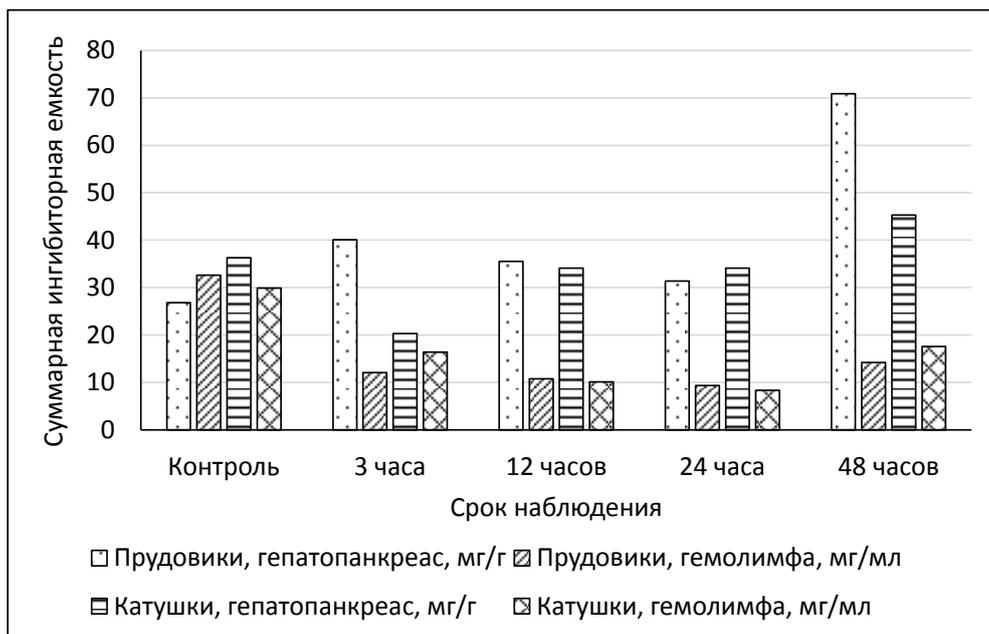


Рис. 2. Влияние этионина на СИЕ гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков (определение при оптимальном рН)

Табл. 6. Влияние этионина на содержание общего белка в гепатопанкреасе и гемолимфе легочных пресноводных моллюсков

Срок наблюдения	Содержание белка	
	Прудовики	Катюшки
Гепатопанкреас, мг/г		
Контроль	145 ± 5,1	118 ± 7,3 ²
Через 3 часа	111 ± 6,2 ¹	128 ± 6,0
Через 12 часов	72,0 ± 4,58 ¹	118 ± 5,1 ²
Через 24 часа	59,3 ± 5,76 ¹	73,4 ± 4,37 ^{1,2}
Через 48 часов	106 ± 5,2 ¹	129 ± 5,2 ²
Гемолимфа, мг/мл		
Контроль	2,99 ± 0,51	1,50 ± 0,51 ²
Через 3 часа	2,04 ± 0,41	2,72 ± 0,55
Через 12 часов	2,98 ± 0,39	2,12 ± 0,06
Через 24 часа	0,58 ± 0,31 ¹	1,96 ± 0,14
Через 48 часов	2,07 ± 0,18	1,35 ± 0,08

Табл. 7. Влияние этионина на содержание ДНК и РНК в гепатопанкреасе легочных пресноводных моллюсков

Срок наблюдения	Нуклеиновые кислоты	
	Прудовики	Катюшки
Содержание ДНК, мг/г		
Контроль	1,91 ± 0,104	1,95 ± 0,044
Через 3 часа	1,90 ± 0,181	1,79 ± 0,189
Через 12 часов	1,78 ± 0,204	1,70 ± 0,046
Через 24 часа	1,61 ± 0,079 ¹	1,62 ± 0,067 ¹
Через 48 часов	1,97 ± 0,147	1,86 ± 0,056
Содержание РНК, мг/г		
Контроль	11,2 ± 0,136	11,5 ± 0,156
Через 3 часа	11,0 ± 0,122	11,1 ± 0,181
Через 12 часов	10,5 ± 0,126 ¹	10,4 ± 0,120 ¹
Через 24 часа	10,7 ± 0,110 ¹	10,6 ± 0,127 ¹
Через 48 часов	12,1 ± 0,138	12,0 ± 0,135

После введения этионина уменьшаются резервы гликогена в печени. Этионин приводит к этилированию гуанина и пиримидинов, причем незначительные количества таких модифицированных азотистых оснований находят в молекулах тРНК. Этилирование тРНК снимается на 80%, если перед введением этионина экспериментальным животным вводят актиномицин D (15 мг/кг массы тела) или L-метионин (1,0 г /кг массы тела). Биологическим следствием избыточного этилирования молекул, вызванного введением этионина, является подавление запрограммированной гибели клеток способом аутофагии [10–17]. Следовательно, данные, полученные при введении этионина легочным пресноводным моллюскам не противоречат классическим представлениям о роли этилирования в подавлении биоэнергетики, биосинтеза белков и нарушений обмена веществ у высших эукариотических организмов.

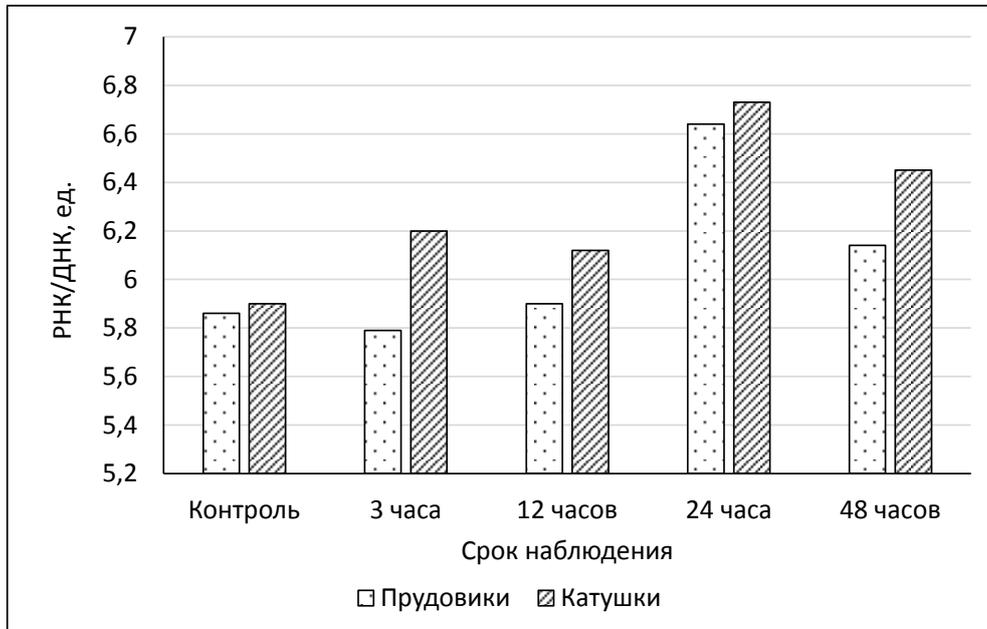


Рис. 3. Влияние этионина на величины отношения РНК/ДНК для клеток гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков

Итак, при исследовании гемолимфы протеолитическая и антипротеолитическая активности были обнаружены во всем исследуемом диапазоне значений рН. Наиболее высокие значения трипсиноподобной активности выявлены при значениях рН инкубационной среды в диапазоне 3,6–9,0, количества АПИ при рН 3,6–3,8 и α_2 -макроглобулина при рН 3,0. В гепатопанкреасе выявлена мощная антипротеазная активность, направленная против кислых и слабокислых протеаз, вероятно, лизосомального происхождения. Сделано заключение о большей устойчивости системы протеолиз–антипротеолиз у катушек по сравнению с прудовиками. Высказано предположение, что прудовик обыкновенный (*Lymnaea stagnalis* L) и катушка роговая (*Planorbis corneus* L), отличающиеся по типу транспорта кислорода, могут использоваться как модельные организмы не только в токсикологии, но и в программах биомедицинских исследований.

Литература:

- [1]. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Бокуть С.Б. Биохимия филогенеза и онтогенеза. 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. // Вестн. зоол. 1974. №5. С. 33–37.
- [4]. Стадниченко А.П. // Паразитология. 1999. Т. 33, № 2. С. 125–128.
- [5]. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Толкачева Т.А. и др. // Новости медико-биологических наук. 2016. Т. 14, №3. С. 28–32.
- [6]. Erlanger D.F., Kokowsky N. // Arch. Biomed. Biophys. 1961. Vol. 95, 2. P. 271–278.
- [7]. Хватов В.Б., Белова Т.А. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека: методические рекомендации. М., 1981. 16 с.
- [8]. Lowry O.H. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
- [9]. Blober G., Potter V.R. // Biochem. Biophys. Acta. 1968. Vol. 166. P. 48–54.
- [10]. Lavoigne A., Marchand J.C., Pinosa M., Matray F. 1983. Biochimie. Vol. 65, № 8–9. P. 471–476.

- [11]. *Lavoigne A., Marchand J.C., Pinosa M., Matray F.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. Vol. 1049, № 2. P. 158–170.
- [12]. *Ohshita T.* *Toxicology.* 2000. Vol. 147, № 1. P. 51–57.
- [13]. *Pegg A.E.* *Biochem. J.* 1972. Vol. 128, № 1. P. 59–68.
- [14]. *Tani H., Ogata K.* *Biochim. Biophys. Acta.* 1970. Vol. 215, № 2. P. 264–272.
- [15]. *Tani H., Ogata K., Itatsu T. J.* *Lipid Res.*, 1973. Vol. 14,1. P. 32–40.
- [16]. *Villa-Trevino S., Shull K.H., Farber E. J.* *Biol. Chem.* 1963. Vol. 238. 1757–1763.
- [17]. *Yoshizawa F., Watanabe E., Sugahara K., Natori Y.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. Vol. 298, 2. 235–239.

Поступила в редакцию: 28.04.2017 г.

A.A. CHIRKIN, V.V. DOLMATOVA, E.I. KATZNELSON, T.A. TOLKACHEVA

THE STUDY OF THE PROTEOLYSIS-ANTIPROTEOLYSIS SYSTEM IN THE TISSUES OF PULMONARY FRESHWATER MOLLUSKS WITH THE INTRODUCTION OF ETHIONINE

Vitebsk State University named after P.M. Masherova, Vitebsk, Belarus

Summary

In the study of hemolymph and hepatopancreas of two types of pulmonary freshwater mollusks *Lymnaea stagnalis* L and *Planorbarius corneus* L, differing in the type of oxygen transport, proteolytic and antiproteolytic activities were observed throughout the investigated range of pH values. The highest values of trypsin-like activity were detected at pH values of the incubation medium in the range of 3.6-9.0, and the amounts of the α 1-antiprotease inhibitor at pH 3.6-3.8 and α 2-macroglobulin at pH 3.0. In hepatopancreas, powerful antiprotease activity was detected, directed against acidic and slightly acidic proteases, probably of lysosomal origin. A conclusion is made about the greater stability of the proteolysis-antiproteolysis system in *Planorbarius corneus* L compared to *Lymnaea stagnalis* L. It is suggested that pulmonary freshwater mollusks can be used as model organisms not only in toxicology, but also in biomedical research programs.

Keywords: mollusks, etionine, proteolysis, antiproteolysis, model organism.