

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

Министерство образования Республики Беларусь
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.М. МАШЕРОВА»
(ВГУ ИМЕНИ П.М. МАШЕРОВА)

УДК [502.171+502.173]:004.93(476.5)(083.94)
Рег.№ 20230467

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе,
д.п.н., профессор

_____ Е.Я. Аршанский
" " _____ 2023 г.

О Т Ч Е Т О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ У
ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛЬНЫХ
ОРГАНИЗМОВ

(заключительный)

Грант аспирантов, докторантов и студентов
Министерства образования Республики Беларусь

Ответственный исполнитель,
аспирант

_____ П.Ю. Пинчук

Научный руководитель
д.б.н., профессор,
профессор кафедры химии

А.А. Чиркин

Витебск 2023

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель
д.б.н., профессор,
профессор кафедры химии

подпись, дата

А.А. Чиркин
(заключение)

Исполнитель,
аспирант

подпись, дата

П.Ю. Пинчук
(введение, раздел 1-3)

Нормоконтроль

подпись, дата

Т.В. Харкевич

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

РЕФЕРАТ

Отчет 37 с., 1 кн., 6 табл., 40 источников

HOMO SAPIENS, *BIOMPHALARIA GLABRATA*, *PLANORBARIUS CORNEUS*, *LYMNAEA STAGNALIS*, ПРОТЕОЛИЗ, АНТИПРОТЕОЛИЗ, БИОИНФОРМАТИКА, МОДЕЛЬНЫЕ ОРГАНИЗМЫ, ФЕРМЕНТЫ

Цель работы – обосновать возможность использования легочных пресноводных моллюсков в качестве модельных организмов для изучения активности протеолитических и некоторых лизосомальных ферментов.

Объект исследования – человек (*Homo sapiens*), роговая катушка (*Planorbarius corneus*), прудовик обыкновенный (*Lymnaea stagnalis*) и *Biomphalaria glabrata*.

Предмет исследования – гепатопанкреас и гемолимфа легочных пресноводных моллюсков: катушки роговой (*Planorbarius corneus*) и прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis*). Аминокислотные и нуклеотидные последовательности 35 лизосомальных ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков,

Методы исследования: описательно-аналитический, сравнительно-сопоставительный, биоинформатический, статистический, экспериментальный.

Элементы новизны: впервые сравниваются аминокислотные и нуклеотидные последовательности 35 лизосомальных ферментов легочных пресноводных моллюсков и человека. Определены пределы антипротеолитической активности крови человека и гемолимфы моллюсков, а также активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и кислой фосфатазы в тканях гепатопанкреаса. Произведён сравнительный анализ трипсиноподобной активности крови человека и гемолимфы прудовика обыкновенного и катушки роговой.

Теоретическая и практическая значимость: выявленные в ходе работы показатели активности трипсиноподобных протеиназ (ТпА), ингибиторов протеиназ, некоторых трансфераз (АлАТ и АсАТ) и кислой фосфатазы в тканях и гемолимфе легочных пресноводных моллюсков в зависимости от типа переносчика кислорода, в дальнейшем могут позволить рассматривать катушку роговую наравне с прудовиком обыкновенным как модельный организм для изучения системы протеолиза. Высокая степень гомологии лизосомальных ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков, позволяет рассматривать эти виды моллюсков как потенциальных модельных организмов для биофармацевтических исследований.

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

Использованные сокращения

АлАТ – аланинаминотрансфераза;

АсАТ – аспартатаминотрансфераза;

БАВ – биологически активные вещества;

АПИ – α_1 -антипротеолитический ингибитор (антипротеиназный ингибитор);

БАПНА – N- α -бензоил-D, L-аргинин паранитроанилид;

ИТ – ингибитор трипсина (соевый ингибитор);

ТХУ – трихлоруксусная кислота;

α_2 -МГ – α_2 -макроглобулин.

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	Ошибка! Закладка не определена.
1 Аналитический обзор литературы	Ошибка! Закладка не определена.
1.1 Общая характеристика легочных пресноводных моллюсков	Ошибка! Закладка не определена.
1.2 Эндогенные ингибиторы протеиназ	Ошибка! Закладка не определена.
1.3 Лизосомальные ферменты и их функции.....	Ошибка! Закладка не определена.
2 Материалы и методы исследования.....	Ошибка! Закладка не определена.
2.1 Материал исследования	Ошибка! Закладка не определена.
2.2 Методы биоинформатических исследований	Ошибка! Закладка не определена.
2.3 Методы экспериментальных исследований.....	Ошибка! Закладка не определена.
2.3.1 Определение активности трипсиноподобных протеиназ (ТпА)	Ошибка! Закладка не определена.
2.3.2 Определения содержания ингибиторов протеиназ	Ошибка! Закладка не определена.
2.3.3 Определение активности ферментов АсАТ и АлАТ в гемолимфе	Ошибка! Закладка не определена.
2.3.4 Определение активности кислой фосфатазы	Ошибка! Закладка не определена.
3 Результаты и их обсуждения	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Результаты биоинформатических исследований ...	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Результаты экспериментальных исследований	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение.....	Ошибка! Закладка не определена.
Список использованных источников.....	6

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Пинчук, П.Ю. Биоинформатический анализ семейства генов цистеиновых протеаз моллюска *Biomphalaria glabrata* / П.Ю. Пинчук // Наука – образованию, производству, экономике: материалы 75-й Региональной научно-практической конференции преподавателей, научных сотрудников и аспирантов, Витебск, 3 марта 2023 г. – Витебск : ВГУ имени П. М. Машерова, 2023. – С. 124–126.
2. Зоология беспозвоночных: учебник для университетов / В.А. Догель. – М. : Высшая школа, 1981. – С. 470–472.
3. Мещеряков, В. Н. Прудовик *Lymnaea stagnalis* L. / В. Н. Мещеряков // Объекты биологии развития. – М. : Наука, 1975. – С. 53–55.
4. Travis, J. Human plasma proteinase inhibitors / J. Travis, G.S. Salvesen // *Annu.Rev.Biochem.* – 1983. – Vol. 52. – P. 684–685.
5. Немова, Н.Н. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов / Н.Н. Немова, Л.А. Бондарева // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54 (1). – P. 42–45.
6. Милеева, П. Ю. Легочные пресноводные моллюски как модельные организмы для изучения обмена веществ / П. Ю. Милеева, К. В. Маковецкий // XII Машеровские чтения : материалы междунар. науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых, Витебск, 19 октября 2018 г. – Витебск : ВГУ имени П. М. Машерова, 2018. – С. 51–53.
7. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека : метод. рекомендации / В.Б. Хватов, Т.А. Белова. – М. : 1981. – 14–16 с.
8. Karihtala, P. Peroxiredoxins in breast carcinoma / P. Karihtala [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9 (9). – P. 24–25.
9. Furtmüller, PG. Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate / Furtmüller PG, Burner U, Obinger C. // *Biochemistry.* – 1998. Vol. 37 (51). – P. 27–30.
10. Baker, E. Human HPA endoglycosidase heparanase / E. Baker [et al.] // *Chromosome Res.* – 1999. – Vol. 7 (4). – P. 319–322.
11. Son, J. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway / J. Son [et al.] // *Nature.* – 2019. – Vol. 496. – P. 98–101.
12. Sohocki, M.M. Human glutamate pyruvate transaminase (GPT): localization to 8q24.3, cDNA and genomic sequences, and polymorphic sites / M.M. Sohocki [et al.] // *Genomics.* – 1997. – Vol. 40 (2). – P. 51–52.

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

13. Shen, H. Coupling between endocytosis and sphingosine kinase 1 recruitment / H. Shen [et al.] // Nat Cell Biol. – 2014. – Vol.16 (7). – P. 62–63.
14. Sumita, K. The Lipid Kinase PI5P4K β Is an Intracellular GTP Sensor for Metabolism and Tumorigenesis / K. Sumita [et al.] // Mol Cell. – 2016. – Vol. 61 (2). – P. 94–98.
15. Grace, M.E. Type 1 Gaucher disease: null and hypomorphic novel chitotriosidase mutations implications for diagnosis and therapeutic monitoring / M.E. Grace [et al.] // Hum. Mutat. – 2007. – Vol. 28 (9). – P. 73–74.
16. Martiniuk, F. Isolation of a cDNA for human acid alpha-glucosidase and detection of genetic heterogeneity for mRNA in three alpha – glucosidase – deficient patients / F. Martiniuk [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1986. – Vol. 83 (24). – P. 21–22.
17. Bidchol, A.M. Recurrent and novel GLB1 mutations in India / A.M. Bidchol [et al.] // Gene. – 2015. – Vol. 567 (2). – P. 80–82.
18. Gort, L. Molecular analysis in two beta-mannosidosis patients: description of a new adult case / L. Gort [et al.] // Mol. Genet. Metab. – 2006. – Vol. 89 (4). – P. 398–400.
19. Jones, M.H. Expression analysis, genomic structure, and mapping to 7q31 of the human spermadhesion molecule gene SPAM1 / M.H. Jones [et al.] // Genomics. – 1995. – Vol. 29 (3). – P. 796–800.
20. Gonzalez-del Rincon, M. de L. The L444P GBA mutation is associated with early – onset Parkinson's disease in Mexican Mestizos / M. de L. Gonzalez-del Rincon [et al.] // Clin. Genet. – 2013. – Vol. 84 (4). – P. 6–7.
21. Chen, Y.Q. Cloning and expression of cDNA encoding human galactocerebrosidase, the enzyme deficient in globoid cell leukodystrophy / Y.Q. Chen [et al.] // Hum Mol Genet. – 1993. – Vol. 2 (11). – P. 5–8.
22. Yasuda, M. Fabry disease: novel alpha-galactosidase A 3 – prime – terminal mutations result in multiple transcripts due to aberrant 3 – prime end formation / M. Yasuda [et al.] // J. Hum. Genet. – 2003. – Vol. 73 (1). – P. 71–74.
23. Kanzaki, T. Novel lysosomal glycoaminoacid storage disease with angiokeratoma corporis diffusum / T. Kanzaki [et al.] // Lancet. – 1989. – P. – 7–11.
24. Bunge, S. Mucopolysaccharidosis type IIIB (Sanfilippo B): identification of 18 novel alpha-N-acetylglucosaminidase gene mutations/ S. Bunge [et al.] // J Med Genet. – 1999. Vol. 36 (1). – P. 28–31.
25. Seo, H.C. Fucosidosis: four new mutations and a new polymorphism / H.C. Seo [et al.] // Hum. Mol. Genet. – 1993. – Vol. 2 (4). – P. 7–11.

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

26. Gutternigg, M. Mammalian cells contain a second nucleocytoplasmic hexosaminidase / M. Gutternigg [et al.] // *Biochem J.* – 2009. – Vol. 419 (1). – P. 83–90.
27. Maita, N. Human α -L-iduronidase uses its own N-glycan as a substrate-binding and catalytic module / N. Maita [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2013. – Vol. 110 (36). – P. 30–33.
28. Kleijer, W.J. Cathepsin A deficiency in galactosialidosis: studies of patients and carriers in 16 families / W.J. Kleijer [et al.] // *Pediat. Res.* – 1996. – Vol. 39 (6). – P. 70–72.
29. Cooke, G.S. Mapping of a novel susceptibility locus suggests a role for MC3R and CTSZ in human tuberculosis / G.S. Cooke [et al.] // *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* – 2009. – Vol. 178 (2). – P. 7–15.
30. Hughes, S.J. A novel amplicon at 8p22 – 23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma / S.J. Hughes [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 95 (21). – P. 410–413.
31. Felbor, U. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII / U. Felbor [et al.] // *EMBO J.* – 2000. – Vol. 19(6). – P. 187–189.
32. Liu, Z. Neuroprotective actions of PIKE-L by inhibition of SET proteolytic degradation by asparagine endopeptidase / Z. Liu [et al.] // *Molec. Cell.* – 2008. – Vol. 29 (6). – P. 77–79.
33. Velasco, G. Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in *Escherichia coli*, and expression analysis in human tissues / G. Velasco [et al.] // *J Biol Chem.* – 1994. – Vol. 269 (43). – P. 42.
34. Steinfeld, R. Cathepsin D deficiency is associated with a human neurodegenerative disorder / R. Steinfeld [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2006. – Vol. 78 (6). – P. 97–99.
35. Aslanidis, C. Genomic organization of the human lysosomal acid lipase gene (LIPA) / C. Aslanidis [et al.] // *Genomics.* – 1994. – Vol. 20 (2). – P. 29–31.
36. Lai, C.H. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics / C.H. Lai [et al.] // *Genome Res.* – 2000. – Vol. 10 (5). – P. 13–16.
37. Caciotti, A. Optimizing the molecular diagnosis of GALNS: novel methods to define and characterize Morquio-A syndrome-associated mutations / A. Caciotti [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2015. – Vol. 36 (3). – P. 68–70.
38. Tomanin, R. Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI) and molecular analysis: review and classification of published variants in the ARSB gene / R. Tomanin [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2018. – Vol. 39 (12). – P. 1788–1793.

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

39. Kosuga, M. Molecular diagnosis of 65 families with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) characterized by 16 novel mutations in the IDS gene: genetic, pathological, and structural studies on iduronate – 2 – sulfatase / M. Kosuga [et al.] // Molec. Genet. Metab. – 2016. – Vol. 118 (3). – P. 190–197.

40. Elcioglu, N.H. A novel loss of function mutation in the GNS gene causes Sanfilippo syndrome type D / N.H. Elcioglu [et al.] // Genet. Counsel. – 2009. – Vol. 20 (2). – P. 9–14.