

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ПЕЧЕНИ МОЛЛЮСКОВ *VIVIPARUS VIVIPARUS L.**

Аннотация. Данная работа посвящена изучению набора протеолитических ферментов моллюсков *Viviparus Viviparus L.* Исследовано воздействие специфических ингибиторов различных протеиназ (ФМСФ, ПХМБ, пепстатина и ЭДТА) на протеолитическую активность в печени моллюсков. Полученные данные указывают на различное представительство аспартильных, тиоловых, сериновых и металлопротеиназ в комплексе протеолитических ферментов изученного вида моллюсков.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, *Viviparus Viviparus L.*, ингибиторы, протеиназы.

В настоящее время уделяется значительное внимание биохимическому тестированию воздействия различных экотоксикантов на живые организмы. Ранее нами было установлено, что живородка речная представляет собой перспективный тест-объект изучения воздействия различных групп токсикантов (галогенорганических соединений, фенолов, хлорорганических соединений и др.) на ферментные системы гидробионтов, что может быть использовано для оценки уровня загрязнений водной среды [1; 3]. Мы продолжили исследование в этом направлении, и основной целью данной работы стало изучение структуры комплекса протеолитических ферментов живородки речной *Viviparus viviparus* методом ингибиторного анализа.

Материалы и методы исследования. Моллюсков собирали в экологически чистой зоне – Учинское водохранилище (Московская область, дер. Тишково) и проводили акклимацию их в аквариуме с постоянной аэрацией в течение 14 суток. Затем у моллюсков (группами по 5 особей) извлекали гепатопанкреас методом вивисекции, брали навески массой 1 г и экстрагировали белки 0,15 М раствором NaCl. Экстракты центрифугировали при 8000g при 4°C в течение 40 мин. и полученные супернатанты использовали для дальнейших исследований. Протеолитическую активность определяли по методу Куница, модифицированному для ферментов моллюсков [2]. Субстратом служил 1%-й раствор гемоглобина в дистиллированной воде. Для определения активности 0,3 мл белкового экстракта инкубировали с 0,05 мл раствора субстрата, 0,1 мл дистиллированной воды и 0,55 мл 0,05 М фосфатно-цитратного буфера (pH=3,2) в течение 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали 0,5 мл холодного 10%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы помещали на 20 мин. в холодильник для формирования осадка, который отделяли центрифугированием при 8000g в течение 15 мин. Измерение оптической плотности полученных супернатантов проводили на спектрофотометре при 750 нм против контроля, в который белковый экстракт вносили после раствора трихлоруксусной кислоты. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое вызывает увеличение оптической плотности на 1 единицу при 750нм в 1 час. Удельная активность рассчитывается в единицах активности на 1 мг белка, определяемого по методу Лоури.

Определение ингибиторной активности по Ансону [4] проводили по следующей схеме, составляя три серии эксперимента. Все серии состояли из опыта и контроля в трех повторностях. Первая серия включала в себя: 0,5 мл фосфатно-цитратного буфера (pH=3,2); 0,2 мл экстракта; 0,1 мл соответствующего ингибитора; 2 серия: 0,5 мл буфе-

* © Конин Д.Н.

ра с 0,2 мл экстракта и 0,1 мл дистиллированной воды; 3 серия: 0,5 мл буфера с 0,2 мл воды и 0,1 мл ингибитора. Инкубировали 15 минут при 25 °С, затем во 2 серию вносили 0,2 мл субстрата (в опыт) и далее инкубировали 45 мин при 37 °С. По окончании инкубации вносили необходимые компоненты, составляющие серии и не принимающие участия в инкубации, 2 серия - 0,2 мл субстрата (в контроль) и 0,1 мл ингибитора (в контроль), 3 серия - 0,1 мл ингибитора (в контроль). Затем во все пробы вносили 0,24 мл ТХУ с целью остановки реакции и помещали в холодильник (+4 °С) для формирования осадка. Осадок отделяли центрифугированием в течение 15 мин. при 8000g, затем осуществляли качественную реакцию (0,4 мл супернатанта с 0,8 мл 0,1М NaOH и 0,36 мл 1н реагента Фолина). Измерение оптической плотности полученных супернатантов проводили при длине волны 750нм против контроля, в который 0,2 мл белкового экстракта вносили после раствора трихлоруксусной кислоты.

Результаты и их обсуждение. В качестве ингибиторов протеиназ нами были использованы: пепстатин (на аспартильные протеазы), *n*-хлормеркурийбензоат (ПХМБ) (на тиоловые протеазы), фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) (на сериновые протеазы), этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) (на металлопротеазы). В результате проведенного эксперимента были получены данные, представленные в табл. 1.

Таблица 1

Влияние ингибиторов на активность протеолитических ферментов
в печени живородки речной

Пепстатин		ПХМБ	
Удельная активность	% к контролю	Удельная активность	% к контролю
0,572±0,141	46,95%	1,217±0,081	96,05%
ФМСФ		ЭДТА	
Удельная активность	% к контролю	Удельная активность	% к контролю
0,834±0,121	87,52%	0,323±0,104	67,88%

Из полученных данных следует, что пробы с пепстатином дают среднее значение активности по отношению к контролю на уровне 46,95%, ПХМБ – 96,05%, ФМСФ – 87,52%, ЭДТА – 67,88%, из чего можно сделать вывод, что степень ингибирования для различных подклассов составляет следующие значения: пепстатин – 53,5%, ПХМБ – 4% (что находится в пределах погрешности), ФМСФ – 12%, ЭДТА – 32,1%.

В соответствии с полученными данными можно предположить структуру исследуемого комплекса, представленную на рис. 1.

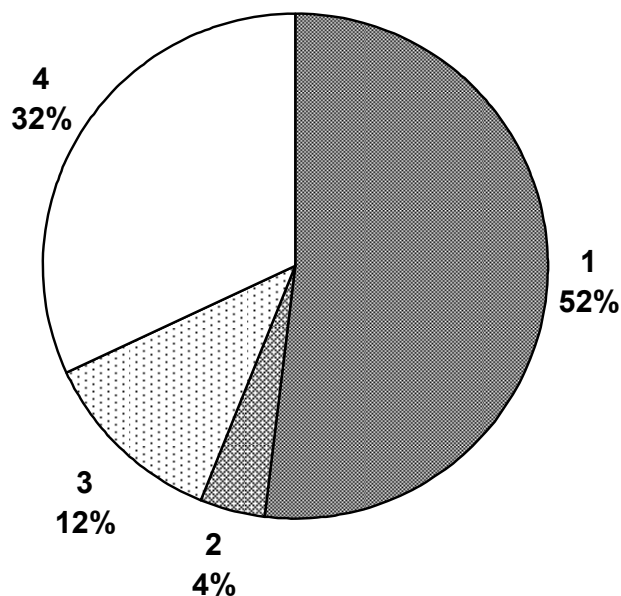


Рис. 1. Состав комплекса протеолитических ферментов живородки речной:

1. Аспартильные протеазы
2. Тиоловые протеазы
3. Сериновые протеазы
4. Металлопротеазы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Грушко Я.М. Вредные органические вещества в промышленных сточных водах. – Л. 1982. – 120 с.
2. Коничев А.С., Попов А.П., Цветков И.Л., Филков П.В. Ферменты как биохимические маркеры загрязнения воды // Приложение к вестнику МГОУ. Серия «Естественные науки: география, экология, экономика: актуальные проблемы науки и образования. – М.: Изд-во МГОУ, 2005. – С. 151-153.
3. Цветков И.Л., Коничев А.С. Экологическая биохимия гидробионтов. М.: МГОУ, 2006. – 105 с.
4. Ярыгин Д.В. Изучение комплекса протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов в гребне тутового шелкопряда // Автореф. дисс. канд. биол. наук. – М., 2000.

D. Konin

INHIBITORS INFLUENCE ON PROTEOLITIC ACTIVITY IN VIVIPARUS VIVIPARUS L. LIVER

Abstract. The work is covering the research of complex of proteolytic enzymes of mollusks *Viviparus Viviparus* L. The influence of specific inhibitors of different proteolytic enzymes (pepstatinum, p-CMB, FMSF, EDTA) on activity of mollusk's liver is studied. The data received is pointing on different presence of aspartat, tiol, serin, metal proteolytic enzymes, in the complex of proteolytic enzymes type of mollusks studied.

Key words: proteolytic enzymes, inhibitors, *Viviparus Viviparus* L.