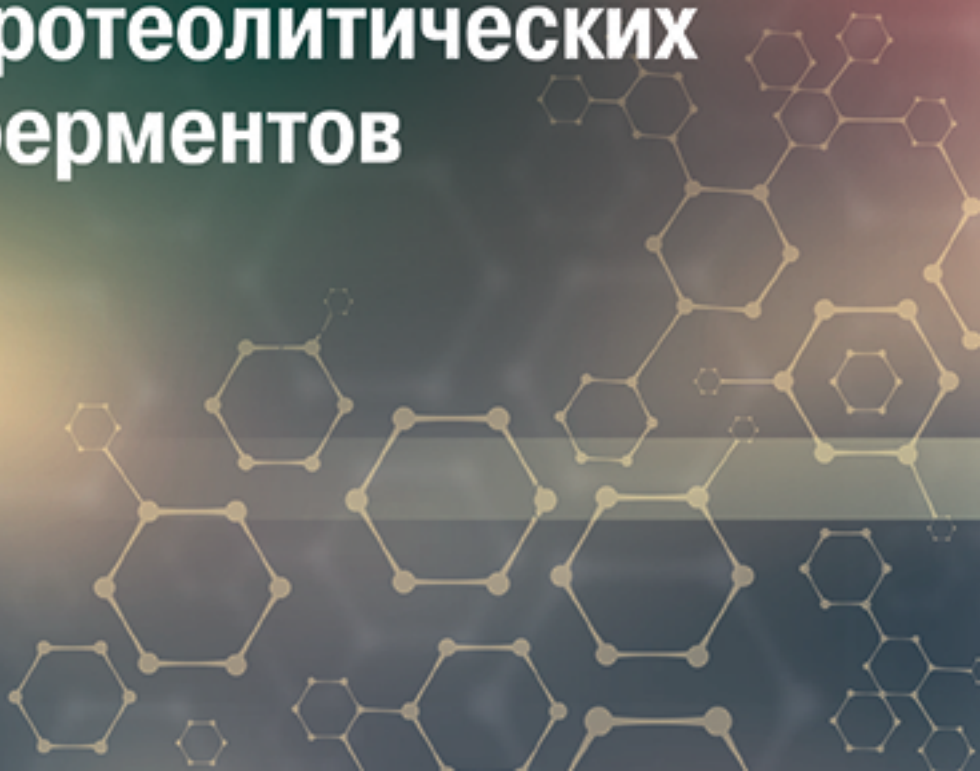


А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова

Молекулярно- структурная гомология протеолитических ферментов



**А. А. Чиркин,
О. М. Балаева-Тихомирова**

**МОЛЕКУЛЯРНО-СТРУКТУРНАЯ
ГОМОЛОГИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ
ФЕРМЕНТОВ**

Монография

Чебоксары
Издательский дом «Среда»
2022

УДК 577
ББК 28.072
Ч-65

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в любой форме и любыми средствами без письменного разрешения владельца авторских прав. Авторы, редактор и издатели приложили все усилия, чтобы обеспечить точность приведенных в данной книге антропометрических и лабораторных данных. Однако эти сведения могут изменяться.

Рецензенты:

д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской биологии
и общей генетики УО «Витебский государственный
медицинский университет»
Бекиш Владислав Янович;

д-р биол. наук, доцент, профессор кафедры зоологии и ботаники
УО «Витебский государственный
университета имени П.М. Машерова»
Жерносеков Дмитрий Данилович

Чиркин А. А.

Ч-65 Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов : монография / А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова. – Чебоксары: Издательский дом «Среда», 2022. – 124 с.

ISBN 978-5-907561-04-5

В последнее десятилетие проявилась тенденция к увеличению количества исследований в рамках биоинформатики с использованием международных баз данных. В этой монографии использовано сочетание методов сравнительного биоинформатического анализа третичных структур 74 протеолитических ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков с количественными биохимическими исследованиями ферментов системы протеолиз-антипротеолиз при моделировании некоторых патологических процессов человека у моллюсков.

Книга предназначена для студентов и научных работников-биохимиков, биологов и биотехнологов, а также может быть полезной для преподавателей медико-биологических специальностей и учителей средних учебных заведений.

ISBN 978-5-907561-04-5
DOI 10.31483/a-10363

© Чиркин А. А., Балаева-
Тихомирова О. М., 2022
© ИД «Среда», оформление, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	4
Предисловие.....	6
Глава 1. Внутриклеточный сигналинг и протеолиз	8
Глава 2. Практическое значение протеолиза и роль модельных организмов	27
Глава 3. Сравнительная характеристика легочных пресноводных моллюсков <i>Lymnaea stagnalis</i> , <i>Planorbarius corneus</i> , <i>Biomphalaria glabrata</i>	55
Глава 4. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции ...	72
Глава 5. Биохимические исследования гепатопанкреаса и гемолимфы моллюсков при моделировании патологических процессов.....	87
Заключение	118
Список публикаций авторов.....	121

Список сокращений

ADAM-протеазы – мембранные пептидазы семейства адамализинов,

Аβ – бета-амилоид,

α2-МГ - α2-макроглобулин,

АПИ – альфа1-антипротеазный ингибитор,

АПФ – Angiotensin-converting enzyme, ангиотензинпревращающий фермент,

АТФ – аденозинтрифосфат,

АТФаза – аденозинтрифосфатаза,

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

ГГТ – гамма-глутамилтрансфераза,

ММП – матриксные металлопротеиназы,

ММ – множественная меланома,

НАДФН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид,

ОХС – общий холестерол,

p21, p27, p53 и др. – белки-регуляторы,

pO₂ – парциальное давление кислорода,

pCO₂ – парциальное давление углекислого газа

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды,

цПротеасомы – циркулирующие в крови протеасомы,

ТЕР – тиоэфирсодержащий белок,

ТГ – триглицериды, триацилглицеролы,

ТпА – трипсиноподобные протеиназы,

ХС ЛПВП – холестерол липопротеинов высокой плотности,

Шеддазы - внутримембранные пептидазы,

ЭКДШ – экстракт куколок дубового шелкопряда.

AAS –аминокислотные последовательности,

CBP – CREB-связывающий белок,

CREB – транскрипционный фактор,

CDK – циклинзависимые киназы,

DUB – деубиквитинирующий фермент,

E1s – убиквитин-активирующие ферменты,

E2s –убиквитин-конъюгирующие ферменты,

E3s – убиквитин-лигазы,

FREP – фибриногеноподобные белки, молекулы иммунного распознавания

iCLiPs – внутримембранные протеазы,

LCR – locus control region,

последовательности,

MGUS – моноклональная гаммапатия неизвестного генеза

NK-клетки – естественные киллеры,

NS – нуклеотидные последовательности,

RIP – регулируемый внутриклеточный протеолиз,

SCF - многокомпонентный E3 убиквитин-лигазный комплекс

SUMO – Small ubiquitin-like modifier, убиквитин-подобные модификаторы,

SUMO – Small ubiquitin-like modifier, убиквитин-подобные модификаторы.

Предисловие

Протеолитические ферменты – ферменты из класса гидролаз, которые расщепляют пептидную связь между аминокислотами в белках. В настоящее время согласно международной базе MEROPS 12.0 пептидазы и протеиназы (протеазы) подразделяются на семь семейств на основе природы каталитических центров: аспарагиновые – тип А, цистеиновые – тип С, сериновые – тип S, металло- тип М, треониновые – тип Т, глутаминовые тип G, аспарагин-пептид-лиазы. К семейству U относят неизвестные и плохо изученные протеиназы. В монографии рассмотрены три типа протеолиза 1) внутримембранный протеолиз, 2) внутриклеточный протеолиз и 3) АТФ-зависимый убиквитин-протеасомный путь разрушения белков.

Наряду с общепризнанными эффектами протеолиза в разрушении пищевых, токсичных, состарившихся белков, а также функционированием ограниченного протеолиза, протеолиз необходим для системы внутриклеточного сигналинга, регулирующего три важнейших клеточных процесса: экспрессию генов, клеточное деление и запрограммированную гибель (например, апоптоз). Координаторами этих процессов являются регуляторные белки. Отсюда следует, что отмена управляющего действия сигнального пути во многом зависит от протеолитического разрушения регуляторных белков и этот этап системы сигналинга также должен регулироваться. В монографии продемонстрировано многообразие протеолитических ферментов, которые служат для достижения биологических целей более чем в 10 блоках жизненно важных процессов. Поэтому изменения системы протеолиза лежат в основе множества патологических состояний.

Разработка биологических и медицинских аспектов протеолиза требует использования модельных организмов. В настоящее время сокращается использование млекопитающих (мыши, крысы, кролики и др.) для экспериментальных целей по этическим и финансовым соображениям. Широко распространенный в водоемах моллюск *Lymnaea stagnalis* был признан модельным организмом для исследования воздействия водорастворимых химических агентов в Европейском союзе в 2010 году. Переносчиком кислорода у этого моллюска является медьсодержащий гемоцианин и в настоящее время доступен черновой вариант генома. Кроме того, широко распространены два других близкородственных вида легочных пресноводных моллюсков *Planorbis corneus* и *Biomphalaria glabrata*, у которых переносчиком кислорода является железосодержащий гемоглобин, а для последнего моллюска доступен аннотированный геном.

С помощью биоинформатических подходов было установлено время дивергенции легочных пресноводных моллюсков (182 миллиона лет тому назад), а также высказана гипотеза о предшественнике гемоцианина – тирозиназе.

В монографии представлены данные об исследовании молекулярно-структурной гомологии 75 протеолитических ферментов у распространенных в водоемах Республики Беларусь легочных пресноводных моллюсков *Lymnaea stagnalis* (прудовики) и *Planorbatus corneus* (катушки), отличающихся по типу транспорта кислорода. Высказано предположение, что эти виды моллюсков, введенные в аква-культуру, могут служить источником протеолитических ферментов для потенциальной заместительной терапии, заменив при этом, например, камчатского краба или высокоорганизованных млекопитающих. Кроме того, прудовики и катушки были использованы для воспроизведения нарушений белкового обмена после введения антиметаболита метионина – этионина, нарушений углеводного обмена после введения стрептозотоцина и действия ионизирующего излучения. Эти данные позволяют рекомендовать данные виды легочных пресноводных моллюсков для доклинических испытаний субстанций, планируемых для использования в фармацевтике, косметике и пищевой промышленности.

Авторы выражают благодарность заведующему кафедрой общей химии Белорусского государственного медицинского университета доценту В.В. Хрусталеву за консультативную поддержку биоинформатических исследований, а также магистрантам и аспирантам кафедры химии и естественнонаучного образования Витебского государственного университета имени П.М. Машерова В.В. Долматовой, Е.И. Кацнельсон, И.О. Семенову за техническую помощь в выполнении исследований. .

ГЛАВА 1. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ СИГНАЛИНГ И ПРОТЕОЛИЗ

Около 5% генома многоклеточных организмов участвует в кодировании ферментов протеолиза. Ранее протеазы считали молекулярными единицами удаления «мусора», которые просто деградировали отработанные белки для поддержания общего гомеостаза. Однако подробные исследования протеазной функции за последние несколько десятилетий продемонстрировали, что эти ферменты намного сложнее, потому что они играют ключевые роли в 1) экспрессии генов, 2) пролиферации клеток и 3) апоптозе.

Протеолитические ферменты – ферменты из класса гидролаз, которые расщепляют пептидную связь между аминокислотами в белках. В настоящее время согласно международной базе MEROPS 12.0 (<https://www.ebi.ac.uk/merops/whatsnew.shtml>) пептидазы и протеиназы (протеазы) подразделяются на семь семейств на основе природы каталитических центров: аспарагиновые – тип А (впервые описаны в 1993 г.), цистеиновые – тип С (1993 г.), сериновые – тип S (1993 г.), металло- тип М (1993 г.), треониновые – тип Т (1997 г.), глутаминовые тип G (2004 г.), аспарагин-пептид-лиазы (2010 г.). К аспарагиновым протеазам относят катепсины D, E, ренин, пепсин, пресенилины и др.; к цистеиновым протеазам – каспазы, катепсины, кальпаины, амидофосфорибозилтрансфераза и др.; к сериновым – панкреатические ферменты, эластаза, нуклеопорин, лактоферрин, калликреины, олигопептидазы и др.; к металлопептидазам – амино- и карбоксипептидазы, АДАМ и др.; к металлопротеиназам относят цинк-зависимые ферменты межклеточного матрикса (коллагеназы, желатиназы, стромелизины); к треониновым – протеасомные ферменты; к глутаминовым – кислые нечувствительные к пепстатину протеазы – эколизины; к аспарагин-пептид-лиазам – белки оболочек вирусов, аутотранспортные белки, интеин-содержащие белки. К семейству U относят неизвестные и плохо изученные протеиназы [1].

В авторитетном журнале Федерации Европейских Биохимических Обществ в 2016 году была опубликована статья, содержащая рисунок «Human protease landscape» рисунок 1 [2].

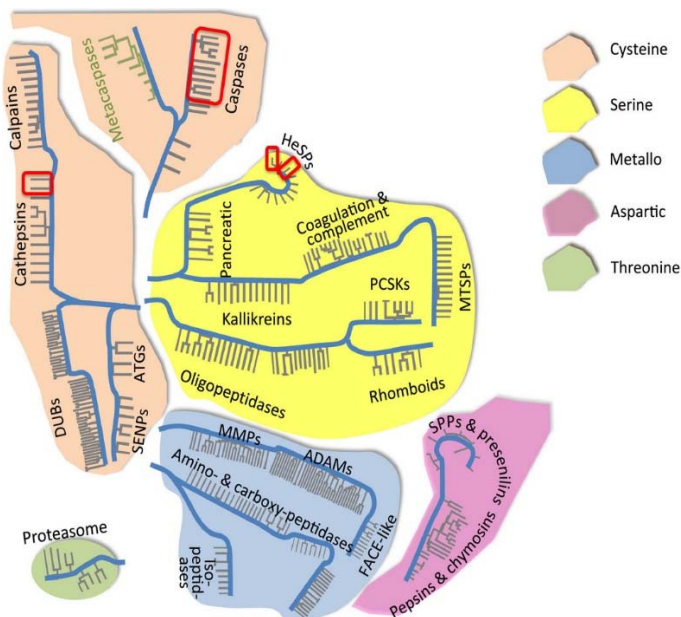


Рис. 1. Протеазы человека

Наличие семи семейств пептидаз связано с тем, что пептидная связь образуется между аминокислотами четырех групп по полярности боковых цепей (радикалов): гидрофобные незаряженные, гидрофильные незаряженные, отрицательно заряженные и положительно заряженные. Для ферментативного гидролиза этих связей требуются дополнительные условия, например, по величине pH, требуемой для оптимального гидролиза. Поэтому в пищеварительном тракте человека имеются пищеварительные полости желудка с pH 5-1 (для реннина у вскармливаемых молоком, а также гастриксина и пепсина у взрослых), в 12-перстной кишке слабощелочная реакция создает условия для гидролиза белков трипсином, химотрипсином, эластазой, коллагеназой, карбоксипептидазами, а в тонком кишечнике требуется нейтральное значение pH для действия аминопептидазы, три- и дипептидаз.

Белки регулируют процессы, происходящие внутри клеток, используя пять основных механизмов:

- взаимодействие с молекулами ДНК (факторы транскрипции);
- с использованием фосфорилирования (протеинкиназы) или дефосфорилирования (протенинфосфатазы) регулируемых белков;

- путем взаимодействия с молекулами рибосомы или РНК (факторы регуляции трансляции);
- воздействие на процесс удаления интрона (факторы регуляции сплайсинга);
- влияние на скорость деградации других белков (убиквитин-протеасомный путь).

В данном разделе будет обсуждена роль протеолиза в регуляции метаболизма и жизнедеятельности клетки, в том числе 1) внутримембранный протеолиз, 2) внутриклеточный протеолиз и 3) АТФ-зависимый убиквитин-протеасомный путь разрушения белков.

Внутримембранный протеолиз.

На рисунке 2 показана общая схема внутримембранного протеолиза. Следует учитывать, что мембраны представляют собой фосфолипидные бислои, в которых снаружи располагаются гидрофильные «головки» или функциональные группы молекул (например, 3-ОН группа свободного холестерина), а внутри – гидрофобная зона жирнокислотных остатков фосфолипидов и циклопентанпергидрофенантроновых структур стероидов. В гидрофобной области мембраны ферменты практически не работают.

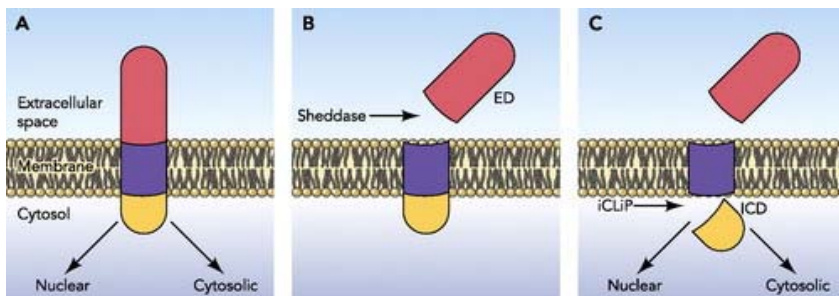
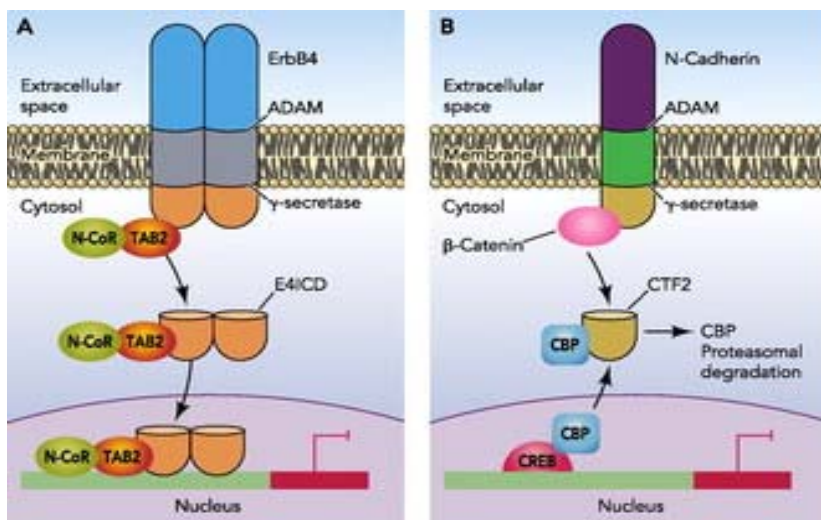


Рис. 2. Схема регулируемого внутримембранного протеолиза (RIP) [3; 4]

На рисунке представлены три последовательных этапа внутримембранного протеолиза интегральных «прошивающих» мембрану белков. А: интегральные мембранные белки передают сигналы через липидный бислой и регулируют как ядерные, так и цитозольные эффекторы. В: в случаях RIP внеклеточный домен отделяется ферментами шеддазами и освобожденный эктодомен (ED) может расщепляться или выполнять другие функции. Напомним,

что доменом называют анатомически и функционально обособленную часть белковой молекулы. С: после удаления эктодомена оставшийся сегмент трансмембранного белка становится доступным субстратом для внутримембранного протеолитического расщепления iCLiP. Действие iCLiP приводит к высвобождению внутриклеточного домена (ICD) в цитоплазму для регуляции ядерных и цитоплазматических процессов. iCLiPs – это внутримембранные протеазы, которые 1) участвуют в сигнальных путях (например, Notch), 2) обладают протеасомоподобной активностью, 3) удаляют белки, «засоряющие» мембраны [5]. На рисунке 3 показаны два варианта внутримембранного протеолиза, обеспечивающих разные сигнальные эффекты освобожденных белковых доменов.



А: прямая регуляция экспрессии генов ядра. Ферменты ADAM-17 и γ -секретаза отщепляют эндодомен E4ICD, который переносится в ядро и выступает как транскрипционный фактор.

В: цитозольная функция и вторичные ядерные эффекты. Регулируемый внутримембранный протеолиз N-кадгерина ADAM-17 и γ -секретазой приводит к высвобождению эндодомена CTF2, который 1) вызывает цитоплазматическую транслокацию и протеасомную деградацию транскрипционного фактора CBP, 2) таким образом, подавляя CREB-опосредованную транскрипцию в ядре [4; 6].

Рис. 3. Внутримембранный протеолиз в регуляции ядерных и цитозольных функций

Для реализации внутримембранного протеолиза широко используются ADAM-протеазы (рисунок 4). ADAM-протеазы (аббревиатура A Disintegrin and Metalloproteinase, «десинтегрин и металлопротеиназа» (КФ 3.4.24.46) представляет собой семейство белковых пептидаз, также известных как семейство адамализинов. Такие ферменты классифицируются как шеддазы, поскольку они расщепляют внеклеточный фрагмент мембранных белков (в результате скольжения по поверхности клетки). Например, ADAM17 расщепляет внеклеточную область фактора некроза опухоли, что приводит к активации последнего.

Данный рисунок полезен при ознакомлении с доменной организацией трансмембранных белков, активацией профермента путем удаления N-концевого домена и механизма отщепления эктодомена методом скольжения по внешней поверхности плазматической мембраны эукариотической клетки.

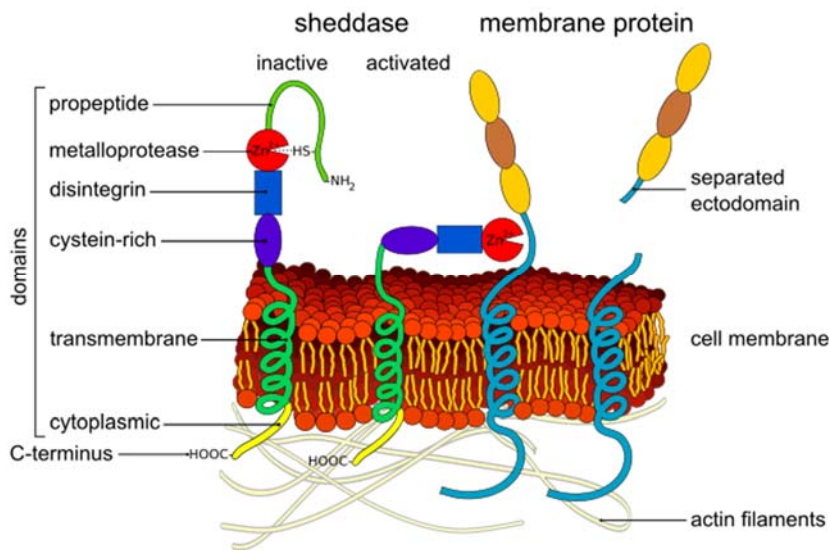


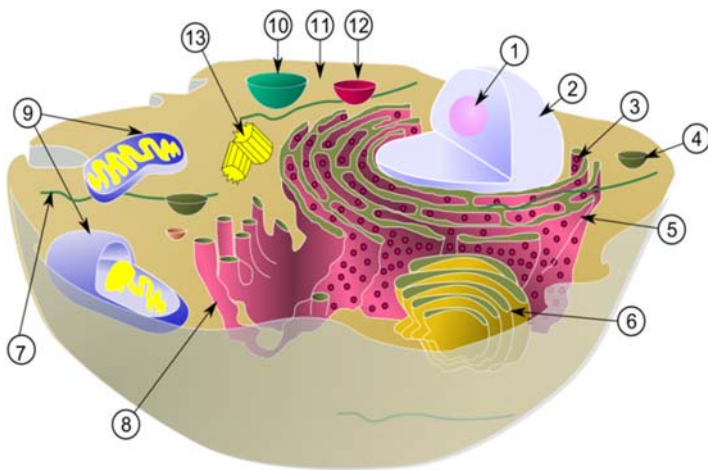
Рис. 4. ADAM-протеазы (Wikipedia)

В настоящее время выделяют эпигенетические регуляторы – соединения, которые контролируют работоспособность генов, не внося в них изменения, а лишь позволяя или препятствуя таким ферментам, как РНК-полимераза, осуществлять процесс тран-

скрипции. При транскрипции на основе ДНК синтезируются молекулы информационной РНК. Последние переносят информацию, содержащуюся изначально в генах, в рибосомы, где происходит образование белков. Обнаружено, что салициловая кислота и ее производное – дифлунизал – подавляют два белка, которые контролируют активность генов в клетках всего организма. Белок р300 и CREB-связывающий белок (СВР) являются эпигенетическими регуляторами, поддерживающими оптимальное количество других белков, вызывающих воспалительные реакции или участвующих в делении клеток. Салициловая кислота, блокируя р300 и СВР, предотвращает вызванное воспалением повреждение клеток с помощью протеолитических ферментов. Внутри клеток функционируют независимые и зависимые от АТФ протеолитические системы [7; 8].

Внутриклеточный протеолиз. Лизосомы.

На рисунке 5 схематично представлены 13 типов органелл животной клетки.



- 1) ядрышко, 2) ядро, 3) рибосома, 4) везикула, 5) ШЭР, 6) аппарат Гольджи, 7) цитоскелет, 8) ГЭР, 9) митохондрии, 10) вакуоль, 11) цитоплазма, 12) лизосома, 13) центриоль, центросома (Wikipedia)

Рис. 5. Органеллы животной клетки

Двенадцатую позицию в списке одномембранных и двумембранных органелл занимают лизосомы. Лизосома – окружённый мембраной клеточный органоид, в полости которого поддерживается кислая среда (рН 4,5-5,0) и находится около 60 растворимых гидролитических ферментов. Это одномембранный органоид, который образуется путем «почкования» аппарата Гольджи и пузырьков (эндосом), в которые попадают вещества при эндоцитозе. В образовании аутолизосом (аутофагосом) принимают участие мембраны эндоплазматического ретикулума, например, при аутофагии состарившихся митохондрий. Все белки лизосом синтезируются рибосомами на внешней стороне мембран эндоплазматического ретикулума и затем проходят через его полость и через аппарат Гольджи. Лизосомы есть во всех клетках млекопитающих, за исключением эритроцитов. У растений к лизосомам по способу образования, а отчасти и по функциям близки, вакуоли. Лизосома отвечает за внутриклеточное переваривание макромолекул, в том числе при аутофагии; лизосома способна к секреции своего содержимого в процессе лизосомного экзоцитоза; лизосома участвует в некоторых внутриклеточных сигнальных путях, связанных с метаболизмом и ростом клетки.

На рисунке 6 показаны основные типы клеточной смерти и некоторые сигнальные пути, запускающие их. Всего в настоящее время рассматривается более 20 типов запрограммированной гибели клеток.

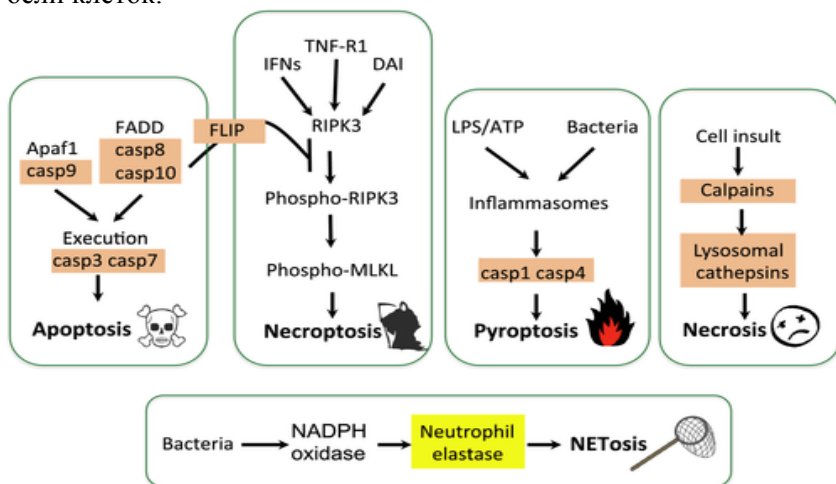


Рис. 6. Сигнальные пути и клеточная смерть [2]

Примечание: Нетоз (англ. NETosis) – это процесс программируемой клеточной гибели, сопровождающийся выбросом нейтрофилом внеклеточной нейтрофильной ловушки (NET - Neutrophil Extracellular Trap). Сходные с нейтрофильными ловушками структуры найдены также и при исследовании эозинофилов (ЕЕТ), тучных клеток (мастоцитов - МСЕТ), макрофагов, эноцитов насекомых, гетерофилов птиц, клеток корневого чехлика растений. Поэтому введен более общий термин - этоз (от Extracellular Trap, ETosis) для обозначения любого типа клеточной гибели, в результате которого образуется внеклеточная ДНК-содержащая сеть с адсорбированными белками. Было выяснено, что все эти структуры входят в систему врожденного антимикробного иммунитета.

Практически запрограммированные типы клеточной гибели (например, апоптоз, аутофагия и некоторые другие), а также процессы некроза и аутолиза тканей запускаются нерегулируемыми протеолитическими ферментами. К ферментам нерегулируемого протеолиза относят:

- Каспазы (*caspase; cysteine-dependent aspartate specific protease*) – семейство цистеиновых протеаз, расщепляющих белки исключительно после аспартата. Каспазы играют важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспалительных процессах.

- Гранзимы (*granzymes*, лат. *gran(um)* – зерно, крупинка и греч. *zyme* – закваска, дрожжи) – семейство сериновых протеаз, экспрессирующихся исключительно в цитотоксических Т-лимфоцитах и клетках натуральных киллерах, которые являются компонентами иммунной системы, защищающей высшие организмы от вирусной инфекции и клеточной трансформации. Гранзимы составляют около 90% массы цитолитических гранул специализированных «секреторных» лизосом этих клеток.

- Катепсины – в основном внутриклеточные протеазы. Большинство катепсинов проявляют активность внутри лизосом, разрушая захваченные клеткой молекулы. По строению активного участка катепсины разделяют на цистеиновые, сериновые и аспаргатные протеазы.

- Кальпаин/кальпастатиновая протеолитическая система регулирует широкий спектр клеточных процессов. Она представлена во всех тканях млекопитающих основными формами Ca^{2+} -зависимых цистеиновых протеиназ – μ - и m -кальпаинами (КФ 3.4.22.52 и 3.4.22.53, соответственно) и их ингибитором – кальпастатином. Эта высокочувствительная и эффективная система из трех основных

компонентов (протеиназ, ингибитора и активатора – Ca^{2+}) связана внутренней взаимной регуляцией. Дисбаланс этой системы связан чаще всего с повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+} , что и приводит к нерегулируемой деградации внутриклеточных структур, а также усилению кальпаинзависимых путей клеточной гибели. Информация об активности этих внутриклеточных протеолитических ферментов при различных типах клеточной смерти представлена в таблице 1.

Таблица 1

Пептидазы при различных типах клеточной смерти [2]

Протеазы	Апоптоз	Пироптоз	Некроптоз	Некроз	Нетоз	Неопределенный
Каспазы 3,6,7,8,9, 10	+++	-	(Каспаза-8)	-	-	-
Каспазы 1,4,5	-	+++	-	-	-	-
Гранзим А	-	-	-	-	-	++
Гранзим В	+++	+	-	-	-	-
Катепсин С (DPPI)	+++	-	-	-	+	-
Катепсин В	+	+	-	++	-	++
Катепсин D	+	-	-	++	-	+
Эластаза нейтрофилов	-	-	-	-	+	-
Кальпаин 1,2	+	-	-	++	-	+

Сигнальные пути и регулируемый убиквитин-протеасомный путь деградации белков.

Сигнальный путь – последовательность молекул, посредством которых информация от клеточного рецептора передается внутри клетки. Сигнал передается от молекулы к молекуле в строго определенном порядке, что и позволяет говорить о сигнальном пути. Передача сигнала внутри клетки представляет собой цепочку последовательных биохимических реакций, катализируемых ферментами, некоторые из которых активируются вторичными посредниками. Такие процессы обычно бывают быстрыми: их длительность порядка миллисекунд (в случае ионных каналов), минут (в случае активации протеинкиназ и липид-опосредованных киназ) или часов (в случае экспрессии генов). Пути передачи сигналов или сигнальные пути часто организуются как сигнальные каскады: количество молекул белка и других веществ, участвующих в передаче сигнала, увеличивается на каждом последующем этапе, когда он удаляется от исходного рецептора. В самом общем виде система внутриклеточного сигналинга регулирует 3 важнейших клеточных процесса: экспрессию генов, клеточное деление и запрограммированную гибель (например, апоптоз). Регуляторами этих процессов являются регуляторные белки. Отсюда следует, что отмена управляющего действия сигнального пути во многом зависит от протеолитического разрушения регуляторных белков и этот этап системы сигналинга должен также регулироваться. Например, известны регуляторные белки клеточного цикла:

- Положительные регуляторы: циклины, циклинзависимые киназы, транскрипционные факторы семейства E2F.

- Отрицательные регуляторы: 1) семейство *cip/kip*, включающее гены белков p21, p27 и p57, которые останавливают клеточный цикл в фазе G1, связывая и инактивируя комплексы циклин-CDK. Белок p21 активируется «хранителем генома» белком p53 (что бывает при повреждениях ДНК), а белок p27 активируется трансформирующим фактором роста β (TGF β), известным ингибитором роста клеток. 2) Семейство INK4a/ARF включает p16INK4a, который связывается с CDK4 и останавливает цикл клеток в фазе G1 и p14ARF, что предотвращает деградацию p53.

Далее рассмотрим убиквитин-зависимый регулируемый путь протеолиза, тесно связанный с гидролизом АТФ. Деградация, обу-

словленная убиквитином, представляет собой процесс, который состоит из стадий, включающих убиквитин-активирующие ферменты (E1s), убиквитин-конъюгирующие ферменты (E2s) и убиквитин-лигазы (E3s). Известно, что один E1 активирует механизмы конъюгации убиквитина и существует большое количество конъюгирующих ферментов E2 и лигаз E3. Протеины, помеченные убиквитином, впоследствии распознаются протеасомой для расщепления и фрагментации. Ферментативная природа множества E3s и их специфическое распознавание субстрата предопределяют их как цели терапии, например, опухолевых заболеваний. Сигналы протеолитической деградации более сложные и разнообразные, так как с их помощью не только маркируются белки, удаляемые с помощью протеолиза, но и определяется время удаления и скорость их протеолитического расщепления [9].

На рисунке 7 представлена ленточная модель убиквитина.

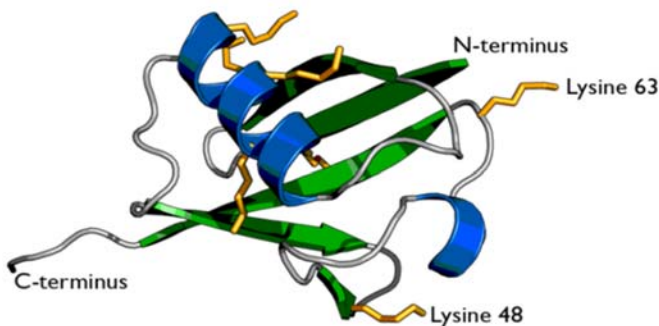


Рис. 7. Убиквитин (Wikipedia)

Убиквитин (от англ. ubiquitous – «вездесущий») – небольшой (8,5 кДа) консервативный белок эукариот, состоящий из 76 аминокислотных остатков. Он участвует в регуляции процессов внутриклеточной деградации белков (в протеасомах). Убиквитин имеет семь остатков лизина и N-конец, которые могут служить точками присоединения последующих молекул убиквитина: это остатки лизина в положениях K6, K11, K27, K29, K33, K48 и K63. *Моноубиквитинирование* – это присоединение одной молекулы убиквитина к белку-субстрату. *Полиубиквитинирование* – это образование полиубиквитиновых цепочек на единственном остатке лизина белка-

субстрата. После присоединения самого первого остатка убиквитина к белку-субстрату следующие молекулы убиквитина могут присоединяться к первой; в результате образуется полиубиквитиновая цепочка. Эти цепочки формируются посредством образования изопептидной связи между карбоксильной группой С-концевого остатка глицина одной молекулы убиквитина и аминогруппой другой молекулы убиквитина, уже связанной с белком-субстратом.

Обобщенная схема мечения белков для регулируемого протеолиза представлена на рисунке 8.

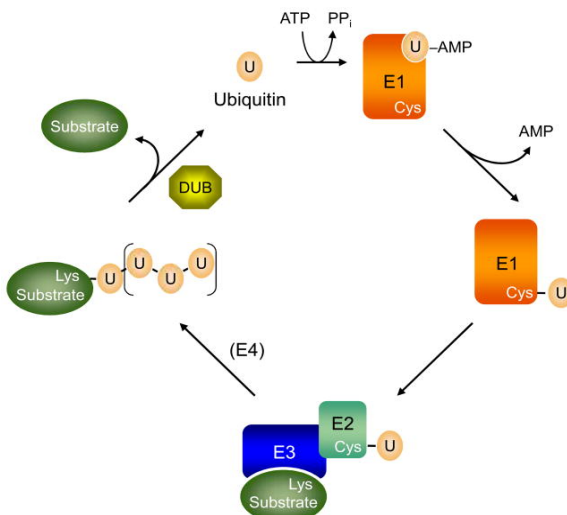


Рис. 8. Убиквитинирование белков как субстратов протеолиза [10]

Убиквитин-активирующий фермент (E1) связывает убиквитин, гидролизует АТФ и образует тиозфирную связь между АМФ и убиквитином с последующим переносом молекулы убиквитина на один из своих остатков цистеина (Cys). Молекула активированного убиквитина далее соединяется с одним из ферментов семейства убиквитин-конъюгирующих ферментов (E2) и часто вслед за этим с убиквитин-лигазой (E3). Процесс конъюгации убиквитина с субстратом может катализироваться как самим E2, так и E2 совместно с E3. От меченого субстрата или его продуктов распада убиквитин может отделяться с помощью деубиквитинирующего фермента (DUB) для повторного использования.

На рисунке 9 представлен SCF комплекс, который представляет собой многокомпонентный E3 убиквитин-лигазный комплекс, катализирующий убиквитинирование белков, предназначенных для протеасомной деградации.

Комплекс SCF играет важную роль в управлении клеточным циклом, связывая механизмы сигналинга и управляемого протеолиза. SCF управляет переходами между фазами G1/S и G2/M. Кроме того SCF-Skp2 убиквитинирует и деградирует белки p27 и p21, а также G1-/S-специфичный циклин E. SCF способствует также протеолизу в раннем митозе Emi1, ингибитора APC/C-Cdh1 и Wee1, ингибитора Cdr1, предотвращая вступление клетки в митоз при наличии серьезных нарушений в материнских хромосомах.

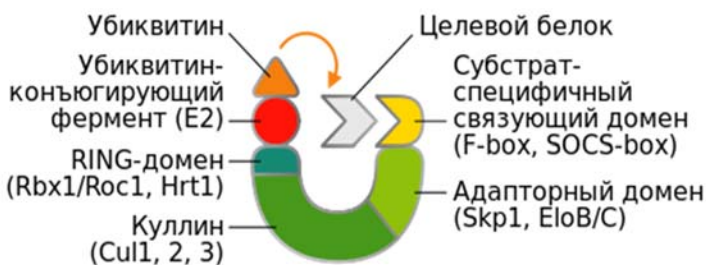


Рис. 9. SCF комплекс (Wikipedia)

Все вышеперечисленные процессы необходимы для управляемого протеолиза меченого белка в протеасомах. Активная 26S протеасома состоит из коровой 20S-протеасомы и двух регуляторных частиц 19S (PA700) или 11S, которые присоединяются к торцам коровой частицы. S – константа седimentации частицы при ультрацентрифугировании. Единицей константы седimentации является Сведберг. Отношение скорости седimentации к центробежному ускорению (константа седimentации) – важная молекулярно-кинетическая характеристика системы. Она зависит от массы и формы частиц фазы или молекулярной массы макромолекул. С помощью константы седimentации получают как усреднённую характеристику дисперсности, так и кривые распределения частиц по размерам или массам (для полимеров – молекулярно-массовое распределение).

Коровая часть состоит из 28 субъединиц, организованных в четыре семичленных кольца, уложенных друг на друга в виде стопки.

20S-протеасома состоит из двух копий семи разных α -субъединиц и двух копий семи разных β -субъединиц. В протеасомах млекопитающих каталитически активными являются только β 1-, β 2- и β 5-субъединицы, обладающими *пептидил-глутамил-гидролизующей, трипсиноподобной и химотрипсиноподобной активностями*, соответственно.

Регуляторная 19S-частица состоит из 19 отдельных белковых молекул, которые образуют 9-субъединичное основание, непосредственно взаимодействующее с α -кольцом 20S-коровой частицы, и 10-субъединичную «крышечку». *Шесть из девяти белков основания являются АТФазами*. Расщепление АТФ необходимо для денатурации белка (иначе он не проникнет в коровую полость), а также для сопряжения разных этапов деградации белка. 19S-частица обеспечивает открывание «ворот» в 20S, которые препятствуют входу субстратов внутрь протеасомы (рисунок 10).

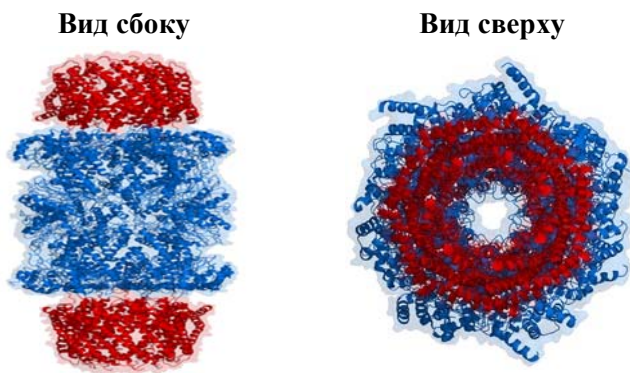


Рис. 10. 26S протеасома [10]

Итак, 26S протеасома является большим многосубъединичным протеазным комплексом, который 1) разлагает субстрат на небольшие пептиды и 2) рециркулирует метку убиквитина. 20S-протеасома или коровая часть (средняя часть на рисунке), несет протеолитические сайты во внутренней полости. Регуляторная частица 19S (крышечки сверху и основание снизу коровой части), содержит комплекс из различных полипептидов, включая полдюжины различных АТФаз, нескольких субъединиц, связывающихся с полиубиквитином, и деубиквитинирующих ферментов (DUB), которые расщепляют цепь убиквитина из субстрата для его повторного использования.

Общая схема АТФ-зависимого убиквитин-протеасомного пути деградации белков представлена на рисунке 11.

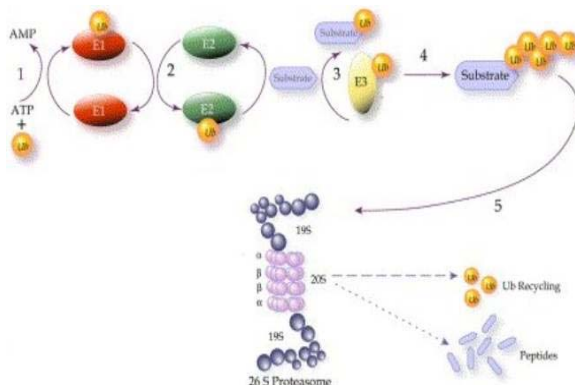


Рис. 11. Регулируемый АТФ-зависимый убиквитин-протеасомный путь распада белков [11]

Основные этапы процесса: 1) АТФ-зависимая активация убиквитина; 2-3) присоединение молекулы убиквитина к субстрату-белку (моноубиквитинирование); 4) полиубиквитинирование; 5) перенос меченого убиквитином субстрата-белка в каталитическую полость коровой части протеасомы; 6) освобождение убиквитина для повторного использования и выделение пептидов – продуктов протеолитического распада субстрата-белка.

Клеточные процессы, которые зависят от конъюгации убиквитина по остаткам лизина 48 и 63 белков-субстратов представлены на рисунке 12. Из анализа этого рисунка следует, что протеолиз белков, отвечающих за различные внутриклеточные процессы, требует разного мечения убиквитином. Для протеасомной деградации белков модификации гистонов, эндоцитоза, внутримембранного транспорта белков, репаративного синтеза ДНК и регуляции транскрипции требуется моноубиквитинирование белков-субстратов. Для протеасомной деградации многих белковых субстратов и регуляторов транскрипционных факторов требуется формирование цепей убиквитина по остаткам лизина-48. Полиубиквитинирование по остаткам лизина-63 необходимо для протеолиза белков трансдукции сигналов, эндоцитоза, перемещения белков в мембранах и восстановления повреждений ДНК мутационного характера.

В последние годы вошел в обиход термин «убиквитиновый код», поскольку существует высокая вероятность мечения белков-субстратов убиквитином по остаткам лизина в 6, 11, 27, 29 и 33 положениях, а также формирование разветвленных полиубиквитиновых цепей.

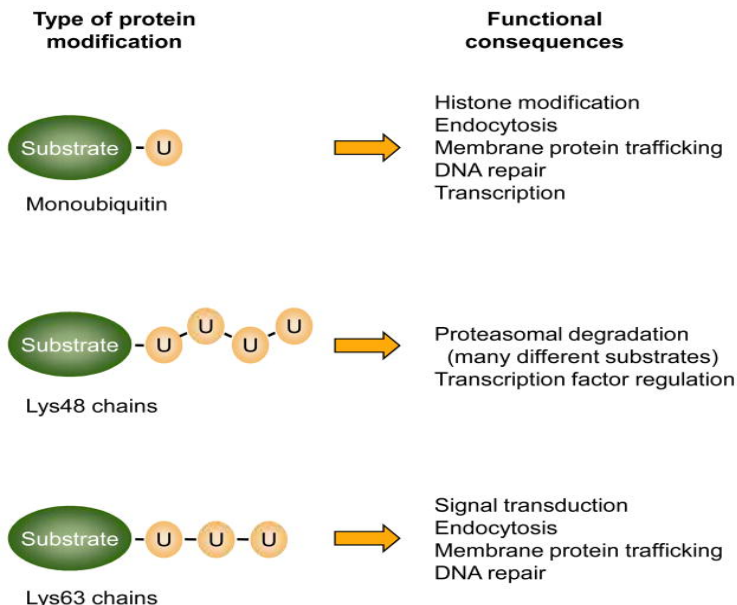


Рис. 12. Кодирование убиквитином белков, имеющих значение для регуляции важных внутриклеточных процессов [10]

Теоретическое значение регулируемого протеолиза для сигналинга можно видеть на примере контроля клеточного цикла. Прогрессирование клеточного цикла контролируется упорядоченным действием циклинзависимых киназ (CDK), активированных конкретными циклинами, которые разграничивают фазы клеточного цикла. *Митотические циклины, которые сохраняются в клетке всего на несколько минут, имеют один из самых коротких периодов жизни всех внутриклеточных белков.* После того, как комплекс CDK-циклин выполнил свою функцию, связанный с ним циклин будет полиубиквитинирован и разрушен протеасомой, что и обеспечивает направленность клеточного цикла. В частности, вы-

ход из митоза требует протеасом-зависимой диссоциации регуляторного компонента циклина В из комплекса фактора промотора митоза.

Контрольная точка клеточного цикла G1/S фаза включает протеасомную деградацию циклина А, убиквитинизации которого способствует ассоциация, создающая анафазу (APC), E3-убиквитинлигазы. APC и белковый комплекс *Skp1/Cul1/F-box* (комплекс SCF) являются двумя ключевыми регуляторами деградации циклинов в контрольных точках клеточного цикла. SCF регулируется APC посредством убиквитинирования адаптивного белка Skp2, который предотвращает активацию SCF до перехода G1-S.

Отдельные компоненты частицы 19S протеасомы также играют свои регулирующие роли. Так, онкобелок *ганкирин* является одним из компонентов 19S частицы, который также жестко связывает циклин-зависимую киназу CDK4 и распознает убиквитинированный белок p53 через его сродство к ubiquitin ligase MDM2. *Ганкирин подавляет апоптоз и он сверхэкспрессирован в некоторых типах опухолевых клеток*, таких как гепатоцеллюлярная карцинома


Существует связь между функционированием протеасомы и хранителем генома белком p53. Активатор протеасом PA28 γ (регулятор 11S) усиливает протеасомную деградацию белка p53 через содействие его взаимодействию с MDM2. Этот механизм ингибирует апоптоз после повреждения ДНК, ограничивая накопление p53 (отрицательный регулятор) и демонстрирует участие PA28 γ в апоптозе и пролиферации клеток.

Таким образом, можно констатировать, что для нормальной пролиферации клеток необходима неповрежденная «здоровая» ДНК, которая может преодолеть три главных контрольных рубежа (G1-S, G2-M и ранний митоз). При наличии высокого уровня мутаций, перемещение клетки по клеточному циклу останавливается для репарации ДНК. Если этого не происходит, клетка уничтожается по механизмам апоптоза. В то же время «бессмертные» опухолевые клетки научились обходить контрольные точки клеточного цикла и ускользать от апоптотического разрушения.

Другой важный для теоретической биологии вывод можно сделать о том, что наряду с 1) нуклеотидным генетическим кодом включения аминокислот в полипептидные цепи, 2) углеводным кодом гликопротеинов для взаимодействия антигенов с антителами, рецепторов с лигандами и др. существует 3) убиквитиновый

код для целенаправленного мечения подлежащих уничтожению белков.

Авторы считают логичным и необходимым для развития идеи взаимосвязей сигналинга и протеолиза посоветовать молодым исследователям использовать даже в простейших работах международные базы данных. Назовем две из них.

1. Proteolysis MAP (PMAP) представляет собой интегрированный веб-ресурс, ориентированный на протеазы. Логотип этой базы данных: 

PMAP – предназначен для помощи исследователям протеаз в обсуждении роли протеолитических сетей в метаболических путях. Публикация: “PMAP”: databases for analyzing proteolytic events and pathways”. Nucleic Acids Research. 37: D611–D618. Базу можно найти по адресу, представленному в Wikipedia: doi: 10.1093/nar/gkn683. PMC2686432. PMID 18842634.

2. MEROPS является онлайн-базой данных для пептидаз (также известных как протеазы, протеиназы и протеолитические ферменты) и их ингибиторов [2]. Схема классификации пептидаз была опубликована Rawlings и Barrett в 1993 году [3], а для ингибиторов белка - Rawlings et al. в 2004 году [4]. Самая последняя версия, MEROPS 12.0, была выпущена в сентябре 2017 года [5]. Ссылки 1-5 в Википедии, свободная энциклопедия.

Команда MEROPS - Нейл Д. Ролингс и Алан Дж. Барретт в Европейском институте биоинформатики EMBL, Cambridge CB10 1SD, Великобритания (merops@ebi.ac.uk). Авторы MEROPS пишут: «Многие исследователи считают полезным включить данные из MEROPS в свои публикации, и это то, для чего мы здесь, но, пожалуйста, *процитируйте соответствующую публикацию, а также URL-адрес*. Это Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A. & Finn, R.D. (2018). The MEROPS database включает ферменты, их субстраты и их ингибиторы на 2017 в сравнении с пептидазами в the PANTHER database. Nucleic Acids Res. 46, D624-D632. Мы с удовольствием и благодарностью выполняем эту просьбу.

Список использованной литературы к главе 1

1. Kohei, Oda. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases / O. Kohei // J. Biochemistry. – 2012. – Vol. 151(1). – P. 13–25. Doi:10.1093/JB/mvr129.
2. Salvesen, G.S. Protease signaling in animal and plant-regulated cell death / G.S. Salvesen, A. Hemhel, N.S. Coll // FEBS J. – 2016. – Vol. 283 (14). – P. 2577–2598. Doi:10.1111/febs.13616. PMCID: PMC5606204. PMID:266481190.
3. McCarthy, A.J. Regulated intramembrane proteolysis: emergent role in cell signalling pathways / A.J. McCarthy, C. Coleman-Vaughan, J.V. McCarthy // Biochem Soc Trans. – 2017. – Vol. 45 (6). – P. 1185–1202. Doi: 10.1042/BST20170002.
4. Lai, M. Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions / M.Lai, M.Caplan // Physiology (Bethesda). – 2011. – Vol.26(1). – P. 34–44. Doi: 10.1152/physiol.00028.2010.
5. Fluhrer, R. Intramembrane cleaving proteases (I-CLiPs) as guardians of shuttling proteins / R. Fluhrer // Cell Cycle. – 2014. – Vol. 13 (5). – P. 695. Doi: 10.4161/cc.28089, PMCID: PMC3979903, PMID: 24526118
6. Deuss M. Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17 / M. Deuss, K Reiss., D.Hartmann // Cuel. Alzheimer Res. journal. – 2008. – Vol. 5. – №2. – P. 187–201. PMID 18393804
7. Немова, Н.Н. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов / Н.Н. Немова, Л.А. Бондарева // Биомемедицинская химия. – 2008. – том. 54, в. 1. – С. 42–57.
8. Сорокин, А.В. Протеасомная система дегградации и процессинга белков // А.В. Сорокин, Е.Р. Ким, Л.П. Овчинников // Успехи молекулярной биологии. – 2009. – Т. 49. – С. 3–76.
9. Цимоха, А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах / А.С. Цимоха // Цитология. – 2010. – Т. 52. №4. – С. 277–300.
10. Hochstrasser, M. Origin and function of ubiquitin-like proteins / M. Hochstrasser // Nature. – 2009. – Vol. 458 (7237). – P. 422–429. Doi: 10.1038/nature07958. PMID: 19325621; PMCID: PMC2819001.
11. Burger, A.M. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications / A.M. Burger, A.K. Seth // Eur. J. Cancer. – 2004. – Vol. 40(15). – P. 2217–2229. Doi: 10.1016/j.ejca.2004.07.006.

ГЛАВА 2. ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРОТЕОЛИЗА И РОЛЬ МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

2.1. Практическое значение протеолиза.

Многообразие протеолитических ферментов служит для достижения более десятка биологических целей: 1) посттрансляционный процессинг (например, препроальбумин → проальбумин → альбумин); 2) удаление иницирующего метионина, что определяет период полужизни белка (правило N-конца); 3) удаление сигнального пептида после целевого транспорта белка через мембрану; 4) Расщепление белков-предшественников для формирования специфичных молекул (биорегуляторов, каскад свертывания крови, система комплемента); 5) внеклеточное (пищеварение) и внутриклеточное расщепление белков (лизосомы – аутофагия неселективный путь, при наличии пептидной последовательностью KFERQ селективный путь; протеасомы – убиквитинирование и АТФ-зависимый протеолиз); 6) «сотовая» регуляция путем активации или дезактивации ферментов метаболических и сигнальных путей, факторов транскрипции и рецепторов; 7) управление клеточным циклом через протеолиз циклинов убиквитин-опосредованным протеолитическим путем; 8) каспазы – протеолитические ферменты апоптоза; 9) аутопротеолитическое образование доменов фактора фон Виллебранда типа D, домена FtpC *Neisseria meningitidis*, разрыва связи Gly-Ser в подмножестве доменов белка спермы и др.; 10) самопереваривание тканей при панкреатите, активация лизосом при сахарном диабете, ревматоидном артрите, развитие болезни Альцгеймера и др.; 11) протеазы могут регулироваться антипротеазами или ингибиторами протеаз, и дисбаланс между протеазами и антипротеазами может приводить к заболеваниям, например, к разрушению тканей легких при эмфиземе.

Такое разнообразие протеолитических ферментов обеспечивает их участие в судьбе, локализации и активности многих белков, управлении белок-белковыми взаимодействиями, создании новых биоактивных молекул, внесении вклада в обработку клеточной информации посредством генерирования, преобразовывания, усиления или отмены молекулярных сигналов. Как прямой результат этих множественных действий, протеиназы влияют на репликацию и транскрипцию ДНК, пролиферацию и дифференцировку клеток, морфогенез и ремоделирование тканей, тепловой шок, ангиогенез,

нейрогенез, овуляцию, оплодотворение, заживление ран, мобилизацию стволовых клеток, гемостаз, свертывание крови, воспаление, иммунитет, аутофагию, старение, некроз, апоптоз и многие другие процессы [1–3].

Поэтому изменения в протеолитических системах лежат в основе множества патологических состояний. Например, в патогенезе синдрома Папийона-Лефевра важную роль играет катепсин С, лимфомы Ходжкина – катепсины В, Н, L, S, дерматитов и заболеваний кишечника – металлопротеаза 17, повреждений кожи – эпиплизин (ММР 28), рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза – ММР 1, лимфоаденопатии – DDP IV (сериновая протеаза), псориаза и ревматоидного артрита – арг-, ала-, лей-амино-пептидазы и DDP IV, псориаза и себореи – каспаза 14, аллергического контактного дерматита – триптаза.

Внутрикожный и подкожный пути введения терапевтических белков и вакцин могут снижать их биодоступность за счет протеолитических ферментов кожи, подкожной клетчатки, лимфатических путей и лимфатических тканей [4]. Это особенно важно для успешности вакцинации населения в условиях пандемии COVID-19 [5; 6]. В связи с пандемией особый интерес представляют также малоизученные природные резервуары коронавирусов в водной среде и сточных водах, а также их связь с водной биотой, включая легочных пресноводных моллюсков [7]. При этом важна связь протеолиза и регуляции вирулентности патогенов [8].

В настоящее время ферментативная терапия – очень перспективное направление лечения состояний, вызванных фиброзными и рубцовыми процессами и связанных с чрезмерным накоплением коллагена. При недостаточности матриксных металлопротеиназ используют коллагеназы из *Clostridium histolyticum* и из поджелудочной железы краба *Paralithodes camtschatica* из семейства *Lithodidae*. Целесообразен поиск более доступных и близких к человеческим протеиназам протеолитических ферментов животных [9]. Используя флуоресцентные молекулярные маяки ближнего инфракрасного диапазона и методы инверсии, удалось получить трехмерные изображения протеазы *in vivo* (метод молекулярной томографии протеолитической активности) [10].

Показательно исследование циркулирующих протеасом (ц-Протеасомы) в онкологии. Wada et al. (1993) были первыми, кто обнаружили ц-Протеасомы в человеческой сыворотке крови у пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями. Jakob et al. (2007) были первопроходцами в изучении прогностического значения уровня ц-Протеасом у больных раком. Они обнаружили, что средний уровень ц-Протеасом был значительно повышен у пациентов с недавно диагностированной активной множественной миеломой (ММ) по сравнению с «тлеющей» ММ, моноклональной гаммапатией неясного генеза (MGUS) и здоровыми донорами.

Интересно, что у пациентов с полным или частичным ответом на лечение, был снижен уровень ц-Протеасом по сравнению с таковым до начала лечения. Если нет ответа на лечение, нет и значительного снижения ц-Протеасом. Было также отмечено, что у пациентов с уровнем ц-Протеасом выше 380 нг/мл была ниже общая выживаемость, чем у пациентов с нормальной концентрацией ц-Протеасомы после лечения (рис. 13).

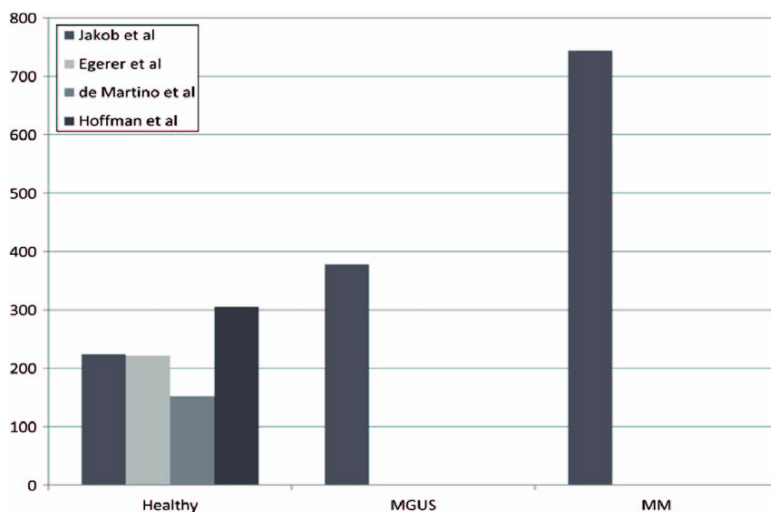


Рис. 13. Уровни ц-Протеасом у здоровых людей по сравнению с больными моноклональной гаммапатией неизвестного генеза (MGUS) и множественной миеломой (ММ) (Elisabet E. Manasanch et al., 2014) [11]

Разработка биологических и медицинских аспектов протеолиза требует использования модельных организмов. По классическим представлениям Г. Карпа [12] существуют шесть основных модельных организмов: *Escherichia coli* (для прокариот), *Saccharomyces cerevisiae* (для эукариот), *Arabidopsis thaliana* (для растений), *Caenorhabditis elegans* (клеточный цикл, нейробиология), *Drosophila melanogaster* (генетика), *Mus musculus* (человек). При доклинических испытаниях и отработке лечебных технологий обычно используются млекопитающие (крысы, кролики, собаки, свиньи, обезьяны). Однако из-за этических причин и дороговизны их применение сокращается. В то же время эксперименты на клеточных культурах не решают многие проблемы межклеточного взаимодействия в тканях организма, требуют специального оборудования, реагентов и специалистов-морфологов. Поэтому внимание исследователей привлекают простейшие многоклеточные эукариотические организмы, в которых представлены основные типы клеток, межклеточных взаимодействий, метаболизма и регуляторных систем. Широко распространенные легочные пресноводные моллюски были кандидатами тест-организмов для нейробиологии и экотоксикологии [13]. Во второй половине XX века лауреаты Нобелевской премии А. Ходжкин, Э. Хаксли и Э. Кандел, признали, что легочные пресноводные моллюски могут служить моделями для понимания основных нейробиологических процессов [14; 15]. К настоящему времени у них идентифицировано около 100 нейропептидов [16], определены механизмы памяти, в том числе определена роль микро-РНК (Lym-miR-137) [17; 18], исследованы механизмы проявлений паркинсонизма [19] и др.

В Республике Беларусь такие исследования осуществляются под руководством проф. А.В. Сидорова [20]. Широко распространенный в водоемах моллюск *Lymnaea stagnalis* был признан модельным организмом для исследования воздействия водорастворимых химических агентов в Европейском союзе в 2010 году [21]. Разработаны детальные требования к проведению строго контролируемых экотоксикологических исследований в течение всей или части жизни моллюска [22–25]. Инициаторами многочисленных исследований по этому направлению в Республике Беларусь являются д.б.н. А.П. Голубев и проф. С.Е. Дромашко [26–28].

Обширные геномные, транскриптомные, протеомные и метаболомные данные, полученные для легочных пресноводных моллюсков доступны в международных базах данных. Не аннотированный черновой геном *Lymnaea stagnalis* уже доступен в базе данных NCBI, и в настоящее время предпринимаются усилия по созданию аннотированного генома. Это позволит моделировать процессы хиральности, репродукции, иммунитета, взаимодействия паразит-хозяин, острых и хронических адаптивных реакций и проявлений ряда заболеваний человека [13]. На легочных пресноводных моллюсках применен метод редактирования генома CRISPR / Cas9, удостоенный Нобелевской премии в 2020 году [29; 30]. Это открывает новые возможности для использования легочных пресноводных моллюсков как модельных организмов различных патологических процессов, а также на доклинических этапах исследования фармакодинамики биологически активных веществ.

Авторами монографии накоплен определенный опыт по использованию продуктов гистолиза клеток и протеолиза белков для использования в качестве антиоксидантных веществ, биостимуляторов, корректоров нарушений метаболизма [31–36].

2.2 Общие сведения о легочных пресноводных моллюсках.

Классификация легочных пресноводных моллюсков, обитающих в водоемах Республики Беларусь представлена на рисунке 14.

***Lymnaea stagnalis* [31; 32]**

В конце декабря 2020 года была опубликована статья, в которой приведены последние данные о легочном пресноводном моллюске *Lymnaea stagnalis*, которые представлены далее [1]. Этот моллюск относительно недавно стал привлекательным модельным организмом для изучения молекулярных механизмов в областях биологии развития и трансляционной медицины, таких как обучение / память и нейродегенеративные заболевания. Преимущество этого моллюска заключается в том, что он является гермафродитом, и может как скрещиваться, так и спариваться самостоятельно, что значительно облегчает генетические исследования. Основной темой исследования до недавнего времени являлся хироморфогенез, поскольку хиральность очевидна в скручивании оболочки.

Обыкновенный прудовик	Роговая катушка
	
Классификация	Классификация
Царство – животные	Царство – животные
Тип – моллюски	Тип – моллюски
Класс – брюхоногие	Класс – брюхоногие
Отряд – легочные моллюски	Отряд – легочные моллюски
Подотряд – сидячеглазые	Подотряд – сидячеглазые
Семейство – прудовики	Семейство – катушки
Род – <i>Lymnaea</i>	Род – <i>Planorbarius</i>
Вид – Обыкновенный прудовик	Вид – Роговая катушка
<i>Lymnaea stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Planorbarius corneus</i> (Linnaeus, 1758)

Рис. 14. Классификация легочных пресноводных моллюсков-обитающих в водоемах Республики Беларусь

Lymnaea stagnalis – пресноводная улитка, широко известная как большая прудовая улитка. Она принадлежит к типу Mollusca, классу Gastropoda и семейству Lymnaeidae и широко распространена в пресноводных водоемах на больших территориях Европы, Северной Америки и Азии, за исключением самого южного региона. *L. stagnalis* предпочитает жить в водах с медленным течением или в стоячих водоемах и занимает мелководные края пруда с густой растительностью, где обычно питается водорослями или гниющими растениями. Иногда моллюск становится плотоядным и охотится на тритонов и мелких рыб или своих сверстников-улиток. Это легочная форма, и поэтому, помимо обычного дыхания / выдоха кислорода из воды, она дышит легкими, часто поднимаясь на

поверхность, чтобы вдохнуть воздух. Эта черта позволяет адаптироваться к среде с низким содержанием кислорода. Хотя половозрелые *L. stagnalis* являются гермафродитами, они предпочитают перекрестное оплодотворение, как это часто бывает у пресноводных легочных. Они могут выполнять в спаривании как женские, так и мужские роли. Улитки откладывают яйца на сорняки и другие объекты водоема большими массами около 2–6 см, в которых содержится 50–120 яиц. Каждое яйцо темно-желтого цвета имеет диаметр около 100 мкм и находится в капсуле овальной формы. Длина раковины взрослых улиток составляет 3–5 и 2–3 см соответственно. Их размер зависит от объема воды, при этом более крупные особи встречаются в больших прудах. Тела улиток желтовато-серые. Раковины взрослых особей желто-коричневые, в то время как у неполовозрелых / молодых улиток раковины более полупрозрачные.

Штаммы *L. stagnalis* хранятся во многих лабораториях по всему миру для различных биологических исследований. В лаборатории моллюски содержатся в резервуарах с циркуляцией воды при световом цикле 16 часов света / 8 часов темноты при температуре 20–22 °C. Их кормят кормом для рыб и салатом в молодом возрасте и в основном салатом после того, как они вырастут. Размеры выращиваемых в лаборатории улиток и их яичная масса (и, следовательно, количество яичных капсул в каждой яичной массе) намного меньше, чем в дикой природе. *L. stagnalis* живет не менее 1 года, а иногда и дольше, от 2 до 5 лет. Продолжительность жизни в лаборатории обычно составляет 6–12 месяцев.

Lymnaea stagnalis – идеальная мишень для ответа на различные фундаментальные биологические вопросы. Например, для *L. stagnalis* определение хиральности по материнскому локусу единственного гена было показано экспериментально, а позже доказано редактированием генома. Вращение микромеров по часовой стрелке (CW) и против часовой стрелки (ACW) на третьем этапе дробления (от четырех- до восьмиклеточной стадии) для правого и левостороннего эмбрионов, соответственно, было самым ранним наблюдаемым признаком хиральности. Относительное расположение четырех микромеров и четырех макромеров на 8-клеточной стадии является определяющим для определения хиральности. Во время решающего третьего дробления отношения зеркальной симметрии между доминирующими правыми и рецессивными левыми

эмбрионами нарушаются, поскольку SD (спиральная деформация) и SI (наклон веретена) наблюдаются только для правых эмбрионов. Хиральность определяется геном *lsdial* уже на стадии оплодотворенных клеток и прочно устанавливается на стадии восьми клеток через контакты микромеры-макромеры.

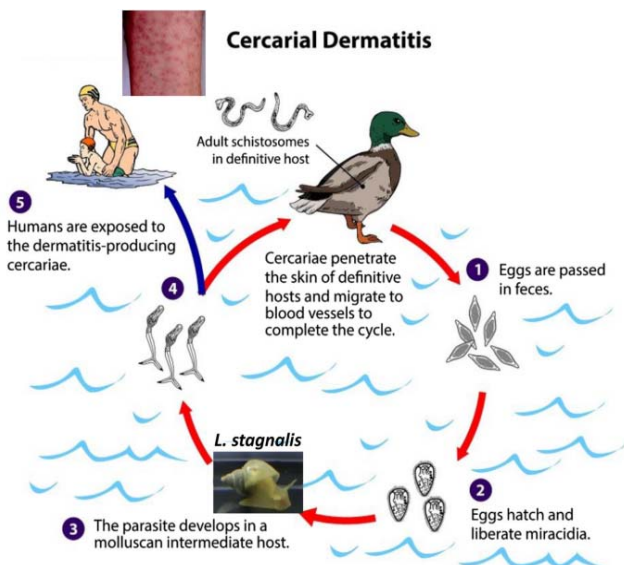
Раковины моллюсков отличаются широким разнообразием морфологии, размеров и орнаментов. Раковины состоят из карбоната кальция и являются типичными примерами биоминералов. В области развития раковины *L. stagnalis* также служит модельным животным. Совсем недавно соответствующие асимметрично экспрессируемые матричные белки раковины моллюсков (SMPs) были обнаружены с использованием протеомных и транскриптомных наборов данных в левой и правой сторонах ткани мантии.

Относительно простая центральная нервная система (ЦНС) *L. stagnalis* с ее большими и идентифицируемыми нейронами облегчила ее принятие в качестве основной модели в исследованиях нейрофизиологии и психологии для изучения обучения и памяти. Нейроны доступны для подробных электрофизиологических, биофизических, биохимических и молекулярных исследований. В отличие от *D. melanogaster* и *C. elegans*, которые являются наиболее распространенными и лучше всего охарактеризованными моделями беспозвоночных, *L. stagnalis* имеет относительно долгую продолжительность жизни, что позволяет изучать возрастные модификации, связанные с генетическими, молекулярными и клеточными механизмами, и которые обычно требуют времени для проявления эффектов. Используя классические эксперименты по кондиционированию с пищевым вознаграждением, были исследованы перекрестные помехи между метаболизмом нейронов и формированием и поддержанием долговременной памяти, а также то, как эти механизмы изменяются во время старения. Например, инсулин и IGF-1, передача сигналов NO-cGMP и CREB модулируют аспекты пластичности в ЦНС *L. stagnalis* и улучшают способность к обучению в старшем возрасте. Поэтому считают, что *L. stagnalis* может служить ценной моделью на животных для изучения клеточных механизмов, лежащих в основе регенерации нейронов. Кроме того, *L. stagnalis* представляет собой привлекательную платформу для исследования нейродегенеративных заболеваний человека, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона. Было обнаружено, что не-

которые гены, имеющие отношение к старению и нейродегенеративным / другим заболеваниям, эволюционно консервативны у *L. stagnalis*. Так наблюдалась прямая связь между введением β -амилоида (А β) и потерей консолидированной LTM (долговременной памяти) у моллюска, как и у человека. У моллюска есть еще одно большое преимущество для нейробиологических исследований, а именно отсутствие гематоэнцефалического барьера. Следовательно, например, в исследованиях деменции нет необходимости наносить А β непосредственно на ткань мозга. Таким образом, концентрацию А β можно поддерживать на низком уровне и хорошо контролировать для каждого отдельного животного. Потеря памяти, вызванная А β , и электрофизиологические изменения могут быть изучены в отсутствие гибели нейронов в определенной сети, лежащей в основе ассоциативной памяти.

L. stagnalis может служить мощным инструментом для изучения возрастных заболеваний нервной системы путем выявления новых молекулярных мишеней для разработки инновационных терапевтических стратегий и путем скрининга большого количества соединений на предмет активности лекарств.

L. stagnalis служит промежуточным хозяином для более чем ста видов трематод, включая птичью шистосому *Trichobilharzia szidati*, возбудителя церкариального дерматита у людей. Более серьезным заболеванием является шистосомоз человека, вызываемый несколькими различными паразитами, включая *Schistosoma mansoni*, для которых пресноводная улитка *Biomphalaria* (*B.*) *glabrata* является специфическим промежуточным хозяином. Шистосомоз продолжает влиять на здоровье 220 миллионов человек во всем мире. Всемирная организация здравоохранения относит шистосомоз к категории «забытых тропических болезней». В течение нескольких десятилетий были предприняты значительные усилия, чтобы понять иммунологические реакции *B. glabrata* на различные микроорганизмы. Как следствие, было задокументировано большое количество иммунных и чувствительных к стрессу генов и генных продуктов, но большинство из них нуждаются в функциональной верификации. *B. Glabrata*, *L. stagnalis* и *Planorbarius corneus* филогенетически тесно связаны, поэтому представляет интерес исследования биохимических и генетических процессов у этих видов моллюсков параллельно.



Адаптировано и изменено с <https://www.cdc.gov/parasites/swimmersitch/biology.html>

Рис. 15. Жизненный цикл паразита птичьей шистосомы *Trichobilharzia szidati*, который включает *L. stagnalis* в качестве промежуточного хозяина. Церкариальный дерматит у людей вызывается паразитом

Lymnaea stagnalis является популярным модельным организмом для исследований в экотоксикологии и биоиндикатором водных загрязнителей. Исследования токсичности *L. stagnalis* начали появляться в конце 1970-х годов, однако именно в конце 1990-х появилось большое количество токсикологических исследований (чувствительность к металлам, например алюминию, ртути, кадмию и особенно к свинцу). Моллюск *L. stagnalis* был принят в качестве стандартного тест-организма для экотоксикологических исследований в соответствии с рекомендациями ОЭСР по тестам на воспроизводство (OECD, 2016).

В последние годы *L. stagnalis* стал популярным объектом для эмбриологических исследований. Микроинъекция жидкости ранним зародышам моллюска не проста, но возможна. Яйца предварительно обрабатывают дитиотреитолом (ДТТ) в течение короткого периода времени перед микроинъекцией, чтобы ослабить прочную

желточную мембрану яйца. Яйца переносятся в каплю буфера для инъекций на предметном столике. Микропипетку заполняют соответствующими реагентами, такими как мРНК, в воде, свободной от нуклеаз, и быстро впрыскивают в эмбрионы с помощью инжектора. После инъекции эмбрионы переносятся в стеклянные капиллярные пробирки и культивируются до тех пор, пока они не превратятся в молодых улиток. Молодь переводят в небольшие аквариумы и выращивают взрослые особи. Затем проводят гибридизацию *in situ* (WISH) – это распространенный метод, используемый для визуализации местоположения экспрессируемых РНК в эмбрионах. Далее проводят иммуноокрашивание и вестерн-блоттинг для визуализации архитектуры веретена с использованием конъюгированных с флуорофором антител против β -тубулина. Экспрессия мРНК, синтезированная *in vitro*, важна для понимания молекулярных механизмов во время развития. Недавно было показано, что экспрессия синтезированных *in vitro* мРНК в *L. stagnalis* возможна путем микроинъекции мРНК флуоресцентных белков, *mCherry*, *DsRed-Express* и усиленного зеленого флуоресцентного белка в яйца до первой стадии полярного тельца. Флуоресценция была обнаружена в течение нескольких часов после инъекции. Редактирование генома CRISPR / Cas9 позволяет проводить более целенаправленный анализ функции генов. Этот метод был применен к множеству организмов, включая немодельных животных, однако мозаицизм является серьезным препятствием, когда метод используется на эмбрионах. Трансгенных улиток еще не получено, хотя для моллюсков разработано несколько методов, но они еще не используются для функциональных анализов. Возможность создания линии улиток knock-in с использованием метода CRISPR была показана для морской улитки, где была достигнута временная трансгенная экспрессия. Это может быть будущим направлением, которое позволит получить живую визуализацию целевых генных продуктов.

В настоящее время создана MolluscDB, база данных GenomeHubs для Mollusca, и запущен проект STAGIG по секвенированию генома для *L. stagnalis*. Была опубликована ранняя (черновая) версия генома, и публикация аннотированных данных о последовательностях с нетерпением ожидается. Существует веб-сайт Консорциума по секвенированию *Lymnaea stagnalis* (<http://www.lymnaea.org/members.html>).

Planorbarius corneus [33; 34]

Моллюски *Planorbarius corneus* относительно крупный вид дышащих воздухом пресноводных улиток, водного легочного брюхоногого моллюска из семейства *Planorbidae*, у которых все раковины закручены в левую спираль. Полное название *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758). Доступ через: Всемирный регистр морских видов по адресу <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=819958> на 2014-11-06. Все виды семейства *Planorbidae* имеют левозакрученную раковину. *Planorbarius corneus* – это самый крупный европейский вид улиток, размер раковины которых в зрелом виде обычно составляет 35 мм. Раковина по спирали имеет от 3 до 4,5 округлых оборотов с глубокими швами, причем последний оборот преобладает. Верхняя сторона слабо вдавлена, а нижняя – глубоко вдавлена (с нижней стороны приплюснута, а с верхней стороны шпиль утоплен). Киля нет. Раковина светло-желтоватая с коричневым, красноватым или зеленоватым оттенками, радиально и спирально слабо исчерченная.

Planorbarius corneus распространялся из Западной Европы через Центральную Европу, затем на Кавказ, на север в Сибирь и на юг до Ближнего Востока. В Западной Европе он был зарегистрирован в Бельгии, Франции и на Британских островах. Он не встречается в Испании, но был зарегистрирован на некоторых испанских и португальских атлантических островах, включая Мадейру, Азорские острова, Канарские острова. Этот вид также встречается в Западной Азии, он был зарегистрирован в Казахстане, Иране, западных регионах России, Турции, Туркменистане и Узбекистане.

Этот легочной пресноводный моллюск обитает в неподвижной или медленно текущей воде, где хорошо растет множество различных видов прудовых водорослей и где в воде много растворенного кальция. Этот вид улиток является промежуточным хозяином для нескольких видов паразитов: первый промежуточный хозяин для *Prosthogonimus ovatus* и *Apatemon gracilis*; первый и второй промежуточный хозяин для *Hypoderaeum conoideum*; промежуточный хозяин для *Syngamus trachea*; промежуточный хозяин для *Typhloiscoli*.

Размножение происходит весной и осенью при температуре воды выше 15°C, яйца (диаметром 1,2–1,7 мм) откладываются в преимущественно удлинённые капсулы шириной 8–15 мм, каждая из них содержит 12–40 яиц, закрепленных на водных растениях; за-

родыши красноватые с прозрачной раковиной. Молодь вылупляется через 14–16 дней, продолжительность жизни до 3 лет. Возможно самооплодотворение, одно выпущенное животное может создать стабильную популяцию, но вылупится только 5% молоди из самооплодотворенных яиц.

Эндогенная система защиты брюхоногих моллюсков способна различать «свое» и «чужое» как на клеточном уровне, так и гуморальными компонентами гемолимфы. Вместе со свободно циркулирующими гемоцитами другие защитные клетки обнаруживаются в различных тканях и органах. *P. corneus* обладает двумя циркулирующими гемоцитами - SH и RH. SH обладают фагоцитарными свойствами, прилипают к стеклу, продуцируют агглютинины, связывают конкавалин А и содержат мураминовою кислоту. RH обладают нефагоцитарными свойствами, не прилипают к стеклу, образуют розетки с красными кровяными клетками овец, стимулируются для пролиферации с помощью фитогемагглютинина и представляют собой многочисленные типичные маркеры Т-лимфоцитов позвоночных. RH также способны лизировать предварительно маркированные клетки-мишени K562 хромом-51 (^{51}Cr) в классическом краткосрочном эксперименте по естественной цитотоксичности, и эта функция модулируется человеческим рекомбинантным интерлейкином-2. Кроме того, SH и RH играют роль в распознавании чужеродной ткани, SH способны инкапсулировать и фагоцитировать посторонний материал, а RH с их NK (естественным киллером) могут действовать как позвоночные цитотоксические Т-лимфоциты или NK-клетки. Таким образом, можно сделать вывод, что RH имеет характеристики, напоминающие позвоночные Т-лимфоциты, тогда как SH относится к категории макрофагов. В отношении гуморального компонента были описаны различные факторы, такие как лизосомальные ферменты, лизины и агглютинины или лектины. В *P. corneus* был выделен природный гликопротеиновый агглютинин. Обнаружены взаимосвязи между иммунной и нейроэндокринной системами. Кортикотропин (АКТГ) и β -эндорфин-иммунореактивные молекулы были обнаружены в сыворотке и SH, и эти молекулы, по-видимому, играют физиологическую роль в процессе фагоцитоза и в реакции стресса.

***Biomphalaria glabrata* [35–38]**

Biomphalaria glabrata – это разновидность дышащих воздухом пресноводных улиток из семейства *Planorbidae*. *Biomphalaria*

glabrata является промежуточным хозяином для трематоды *Schistosoma mansoni*, которая является одной из основных шистосом, инфицирующих людей. Паразит *Schistosoma mansoni* вызывает заболевание у более 84 миллионов людей, проживающих на Карибские островах, в Южной Америке. Раковина *Biomphalaria glabrata* планиспиральная, то есть, свернута в плоскости, как веревка, а шпиль раковины утоплен. Раковина животных из естественных местообитаний обычно оливкового (оливково-серого) цвета. Ширина раковины взрослых улиток составляет 6–10 мм. Взрослая раковина состоит из арагонита, а иногда также содержится менее 1,5% ватерита, особенно у края раковины. Длина генома оценивается примерно в 929,10 млн пар оснований (миллионы пар оснований; $0,95 \pm 0,01$ пг), что является небольшим размером генома среди брюхоногих моллюсков. Секвенирование всего генома было одобрено в качестве приоритета Национальным институтом исследования генома человека в августе 2004 года. Полный геном секвенировали в 2017 г. Хромосомы у этой улитки маленькие, а гаплоидное число хромосом – 18. Полная последовательность генома из митохондрий этого вида доступна с 2004 года: последовательность митохондриального генома состоит из 13670 нуклеотидов. Предок *Biomphalaria glabrata* колонизировал Африку и превратился во все африканские виды *Biomphalaria*.

Biomphalaria glabrata населяет небольшие ручьи, пруды и болота. Эти улитки могут выжить в течение нескольких месяцев в течение нескольких месяцев, если они удалены из их пресноводной среды обитания или когда среда высыхает. *Biomphalaria glabrata* также может выжить до 16 часов в анаэробной воде с использованием молочнокислого брожения. Как и другие виды, эта улитка «светочувствительна» и может быть повреждена при искусственном освещении. *Biomphalaria glabrata* питается бактериальными пленками, водорослями, диатомовыми водорослями и гниющими макрофитами. В неволе их можно кормить кормом для рыб и салатом.

Улитки *Biomphalaria glabrata* откладывают яйца с довольно высокой скоростью (около 1 в день). Одна улитка может отложить 14000 яиц за всю свою жизнь. Аморфный карбонат кальция появляется у 54–60-часовых эмбрионов. Кальцификация (образование арагонита) зародышевой оболочки начинается в промежутке времени между 60-часовым и 72-часовым эмбрионами. Вес оболочки 72-часового эмбриона составляет 0,64 мкг. Вес эмбриональной

оболочки 5-дневного (120 часового) эмбриона за очень короткое время до вылупления составляет 30,3 мкг, а ширина - 500 мкм. Молодь улиток вылупляется из яиц в возрасте 5–6 дней. Вес панциря молодки составляет 2,04 мг через четыре недели после вылупления. За один год в лаборатории может быть до семи поколений. Время генерации (время, необходимое улитке от развития яйца до откладки собственного яйца) составляет 4–6 недель. Продолжительность жизни в естественных условиях составляет 15–18 месяцев. Продолжительность жизни в лабораторных условиях может достигать 18–24 месяцев, но обычно составляет 9–12 месяцев. *Biomphalaria glabrata* является одновременным гермафродитом, но возможно и самооплодотворение. Слизь этого вида улиток содержит видоспецифичные сигналы, которые позволяют отдельным улиткам идентифицировать других улиток того же вида, но видоспецифичные компоненты слизи распадаются в течение 10–30 минут.

Biomphalaria glabrata является основным промежуточным хозяином *Schistosoma mansoni* в Америке и переносчиком шистосомоза. У моллюсков отсутствует адаптивная иммунная система, как у позвоночных, и вместо этого они используют различные врожденные механизмы, включающие клеточно-опосредованные и гуморальные реакции (неклеточные факторы в плазме / сыворотке или гемолимфе), которые взаимодействуют для распознавания и устранения вторжения патогенов или паразитов. Однако разнообразное семейство белков, связанных с фибриногеном (FREP), содержащих иммуноглобулин-подобные домены, было обнаружено в *Biomphalaria glabrata* и может играть роль в защите улиток. Циркулирующие гемоциты (макрофагоподобные защитные клетки) в гемолимфе улитки, как известно, агрегируют в ответ на травму, фагоцитируют мелкие частицы (бактерии и грибы) и инкапсулируют более крупные, такие как паразиты. Окончательное уничтожение происходит за счет механизмов цитотоксичности, опосредованных гемоцитами, с участием неокислительных и окислительных путей, включая лизосомальные ферменты и реактивные промежуточные соединения кислорода / азота. Определенные аллели цитозольной Zn-зависимой супероксиддисмутазы меди были связаны с резистентностью.

Интересно, что фенотип паразита (инфекционный или неинфицированный) выражается как функция генотипа конкретного хозяина, в который он входит. Точно так же фенотип хозяина (воспри-

имчивый против невосприимчивого) выражается как функция генотипа паразита, который он несет (Theron et al., 2014). Молекулярные механизмы, лежащие в основе высокого уровня иммунной специфичности, наблюдаемой в этих взаимодействиях, основаны на образовании комплексов между определенным набором высокополиморфных молекул: молекулами иммунного распознавания, называемыми FREP, и тиюэфирсодержащим белком (TEP) из *B. glabrata* и паразита; гликозилированные молекулы муцина, названные полиморфными муцинами *Schistosoma mansoni* SmPoMucs. Взаимодействия между этими гликозилированными полиморфными антигенами паразитов вызывают распознавание, запускают специфический иммунитет и определяют статус полиморфизма совместимости каждой конкретной ассоциации улитка / паразит.

Особенности обмена веществ легочных пресноводных моллюсков.

Все живые организмы разными способами реагируют на изменения окружающей среды. Появление адаптаций обеспечивается активацией генетического аппарата, изменением метаболизма клетки, а также изменением функционирования всех основных систем организма. Любые сильные воздействия окружающей среды вызывают стандартную стресс-реакцию. При кратковременном воздействии стрессов умеренной интенсивности происходит усиление функционирования органов и мобилизация организма. При интенсивной или длительной стресс-реакции в клетках происходит активация процесса свободно-радикального окисления, внутриклеточная кальциевая перегрузка, угнетение энергопродукции, снижение синтеза белка и денатурация белковых структур [9].

В настоящее время возросла необходимость оценки влияния различных факторов окружающей среды на жизнеспособность организма. К основным маркерам для оценки состояния организма относят показатели углеводного, азотного и липидного обменов [10; 11].

Особенности азотного обмена. Азотный обмен представляет собой совокупность химических превращений, реакций синтеза и распада азотистых соединений в организме; составная часть обмена веществ и энергии. Он включает белковый обмен (совокупность химических превращений в организме белков и продуктов их метаболизма), обмен пептидов, аминокислот, нуклеиновых кислот,

нуклеотидов, азотистых оснований, аминсахаров, азотсодержащих липидов, витаминов, гормонов и других соединений, содержащих азот [12].

Активность азотного обмена определяют по содержанию общего белка, ДНК, РНК, мочевой кислоты и мочевины. Общий белок определяет физико-химические свойства гемолимфы. Количественное соотношение их в гемолимфе в норме относительно постоянно и отражает состояние исследуемого организма [13].

Белковые вещества лежат в основе важнейших процессов жизнедеятельности. Процессы обмена веществ (пищеварение, дыхание, выделение и др.) обеспечиваются деятельностью ферментов, являющихся по своей природе белками. К белкам относятся и сократительные структуры, лежащие в основе движения, а также токсины, антигены и антитела, многие гормоны и другие биологически важные вещества [14].

Биосинтез белков протекает во всех клетках живых организмов и обеспечивает обновление белков организма, процессы обмена веществ и их регуляцию, а также рост и дифференцировку органов и тканей. Белки синтезируются в тканях из свободных аминокислот при участии нуклеиновых кислот [15]. Процесс биосинтеза белков протекает с потреблением энергии, которая запасается в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ).

Одними из наиболее распространенных источников азота в организме являются аминокислоты. Они значимы как в синтезе белка, так и в синтезе пуриновых и пиримидиновых оснований, входящих в состав дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот (ДНК и РНК). Биосинтез пуриновых нуклеотидов, начинающийся с рибозил-5-фосфата, проходит через многочисленные стадии и завершается образованием инозиновой кислоты. При этом требуется участие глутамина в качестве источника азота в третьем и девятом положениях, глицина – в седьмом положении и углерода – в четвертом и пятом положениях. Аспарагиновая кислотата – источник азота в первом положении. Атомы углерода (второй и восьмой) доставляет формильное производное тетрагидрофолиевой кислоты, и, наконец, углерод на шестом месте кольца пурина берется из бикарбоната. При последующем образовании адениловой кислоты используется аспарагиновая кислота, азот которой обеспечивает аминогруппу, стоящую при шестом углеродном

атоме пуринового кольца. При синтезе гуаниловой кислоты аминогруппа при втором углеродном атоме берется из глутамина [16].

Синтез пиримидинов начинается с образования богатого энергией соединения – карбамилфосфата из аммиака, бикарбоната, АТФ как источника энергии и, наконец, N-ацетилглутаминовой кислоты в качестве активатора. Карбамильная группа карбамилфосфата ферментативно переносится на аспарагиновую кислоту. Через образовавшуюся карбамиласпарагиновую кислоту, дигидрооротовую и оротовую кислоты образуется оротидиловая кислота, переходящая в уридилловую кислоту и уридинтрифосфат (УТФ). Путем аминирования УТФ образуется цитидинтрифосфат (ЦТФ), последняя реакция представляет собой регулируемый процесс по закону обратной связи: ЦТФ тормозит образование карбамиласпарагиновой кислоты, а АТФ снимает это торможение. Таким образом, образование пиримидиновых нуклеотидов, входящих в состав нуклеиновых кислот, регулируется соотношением содержания ЦТФ и АТФ [17].

В синтезе нуклеиновых кислот участвуют нуклеотиды. Синтез ДНК осуществляется ферментами – ДНК-полимеразами, для которых субстратами служат дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Образование дезоксирибонуклеотидов происходит в результате сложного процесса восстановления рибонуклеотидов при действии нечувствительного к нагреванию белка – тиоредоксина. Восстановленная форма тиоредоксина образуется под действием редуктазы (фермента флавопротешговой природы), коферментом которого служит восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН) [18].

Избыточный азот выводится из организма в виде мочевины и мочевой кислоты. Мочевая кислота образуется при расщеплении пуриновых нуклеотидов. Содержание мочевой кислоты оказывает влияние на состояние здоровья исследуемого организма. Сдвиги содержания данного продукта обмена в гемолимфе как в сторону повышения, так и в сторону понижения, зависят от двух процессов: образования кислоты в гепатопанкреасе и времени выведения ее, которое могут изменяться вследствие различных неблагоприятных внешних воздействиях факторов окружающей среды. Мочевина является конечным продуктом метаболизма и образуется при участии ферментов орнотинового цикла. Данный цикл представляет собой последовательность ферментативных реакций, в результате

которых происходит ассимиляция NH_3 (в виде NH_4^+) и синтез мочевины, которая выводится из организма. Мочевина является одним из конечных продуктов распада белков и образуется в гепатопанкреасе [19].

Синтез ДНК сопровождается освобождением молекул пирофосфата в количестве, соответствующем числу молекул нуклеозидтрифосфатов, вступивших в реакцию. ДНК и вновь синтезированный полинуклеотид образуют вместе двуспиральную ДНК. Образовавшаяся восстановленная форма тиоредоксина участвует в образовании дезоксинуклеозиддифосфатов (дНДФ) путем переноса редуцирующих эквивалентов на акцептирующие их нуклеозиддифосфаты (НДФ). Вновь образованная ДНК и служившая шаблоном ДНК могут на своих концах соединиться под влиянием фермента ДНК-лигазы и образовать циклическую структуру ДНК [20].

Синтез специфических для организма белков контролируется молекулами ДНК, входящих в состав хроматина клеточных ядер. На одном из тяжей ДНК по закону комплементарности происходит синтез информационных, или матричных РНК (мРНК). К фиксированным на рибосомах мРНК подходят транспортные рибонуклеиновые кислоты, несущие на себе предварительно активированные аминокислоты, которые в синтезируемом белке должны быть соединены пептидной связью, чем обуславливается специфическая первичная структура белков с определенным порядком следующих друг за другом аминокислот. Выпадение или нарушение какого-либо звена в сложном процессе биосинтеза фермента, осуществляющего определенную реакцию в обмене веществ, может привести к тяжелым патологическим нарушениям [21].

Катаболизм ДНК и РНК также является одним из звеньев азотистого обмена. Под действием гидролаз нуклеиновые кислоты образуют олигонуклеотиды и мононуклеотиды. Под влиянием диэстераз, специфических нуклеотидаз, фосфорилаз, фосфатаз и нуклеозидаз происходит распад нуклеотидов с образованием свободных пуриновых и пиримидиновых оснований, дальнейшее превращение которых идет по разным путям [22].

Регуляция биосинтеза белков – сложная система, которая позволяет клетке быстро и четко реагировать на изменения в окружающей клетку среде путем прекращения или индукции синтеза различных белков, часто обладающих ферментативной активностью [23].

Процесс биосинтеза белков и его регуляция требуют чрезвычайной четкости, точности и слаженности работы всех компонентов системы. Небольшие нарушения этой точности приводят к нарушению первичной структуры белков и тяжелым патологическим последствиям. Генетические нарушения, например, замена или потеря одного нуклеотида в структурном гене, приводят к синтезу измененного белка, лишенного биологической активности [24].

Особенности углеводного обмена. Основными показателями углеводного обмена является концентрация глюкозы и гликогена. Изменение содержания глюкозы в крови зависит от мощности и продолжительности воздействия на организм. Кратковременные воздействия максимальной интенсивности могут вызывать повышение содержания глюкозы в крови за счет усиленной мобилизации гликогена печени. Длительное воздействие неблагоприятных факторов приводит к снижению содержания глюкозы в крови [25].

Повышенное содержание глюкозы в крови свидетельствует об интенсивном распаде гликогена печени либо относительно малом использовании глюкозы тканями, а пониженное ее содержание – об исчерпании запасов гликогена печени либо интенсивном использовании глюкозы тканями организма [26]. По изменению содержания глюкозы в крови судят о скорости аэробного окисления ее в тканях организма при интенсивности мобилизации гликогена печени. [27; 28].

Особенности липидного обмена. При исследовании липидного обмена основными показателями является содержание общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности, триглицеридов. Холестерол является вторичным одноатомным циклическим спиртом. Он поступает в организм с пищей, но большая часть его образуется эндогенно (синтезируется в печени) [29]. Холестерол является компонентом клеточных мембран, предшественником стероидных гормонов и желчных кислот. Уровни холестерина и триглицеридов в крови и гемолимфе являются наиболее важными показателями состояния липидного обмена. Они являются маркерами при диагностике нарушений липидного обмена [30]. Триглицериды – сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот. Триглицериды поступают в организм с пищей (экзогенные) и синтезируются в организме (эндогенные). Последние образуются в печени из углеводов. Триглицериды являются главной формой накопления жирных кислот в организме и основным источником энергии.

Липопротеины высокой плотности осуществляют транспорт холестерина от клеток периферических органов в печень, где он переводится в желчные кислоты и выводится из организма. Низкий уровень липопротеинов высокой плотности свидетельствует о проблемах в липидном обмене [31].

Влияние биотических и абиотических факторов на метаболизм легочных пресноводных моллюсков.

Влияние солей тяжелых металлов.

Повышенная концентрация Pb^{2+} , Cd^{2+} (10 и 50 мг/л) в воде сопровождается не только биокумуляцией этих ионов в теле моллюсков, но и значительными изменениями минерального, липидного, белкового обменов, а также активности ферментов. Процентное содержание белка в организме моллюсков снижается под воздействием свинца, остается стабильным при воздействии кадмия и повышается при их совместном действии. Удельный вес общего азота колеблется под воздействием этих поллютантов незначительно в сторону возрастания. Уровень содержания формально титруемого азота повышается в зависимости от вида поллютанта – кадмия или свинца или при их совместном воздействии. Наблюдается снижение этого показателя в различных пределах при действии свинца через 30 суток от начала опыта и едва заметное повышение – при действии того же металла при больших концентрациях. Удельный вес жиров незначительно снижается в зависимости от продолжительности опыта [32].

Влияние гипертермии разной продолжительности.

В условиях антропогенно индуцированной температурной нагрузки происходит нарушение метаболизма в тканях пресноводных легочных моллюсков.

При повышении температуры окружающей среды от 1 часа до 16 часов выявлено, что содержание мочевины в гемолимфе прудовиков после теплового воздействия достоверно увеличивается на 21% через 4 часа и продолжает расти до 48% по сравнению с контролем через 16 часов. Содержание мочевой кислоты в гемолимфе незначительно увеличивается при действии теплового стресса в течение 8 часов. При более длительном действии этот показатель статистически значимо увеличивается на 8–25% по сравнению с

контрольной группой. Концентрация глюкозы достоверно уменьшается от 16% спустя 4 часа теплового воздействия до 54% спустя 16 часов по сравнению с контрольными прудовиками.

Содержание мочевины в гемолимфе катушек увеличивается до 22% по сравнению с контролем при максимальной продолжительности теплового воздействия. Концентрация мочевой кислоты в гемолимфе катушек статистически значимо увеличивается от 11% (1 час теплового воздействия) до 36% (16 часов теплового воздействия). Концентрация глюкозы в гемолимфе катушек достоверно снижается от 31% (четырёхчасовая гипертермия) до 52% (шестнадцатичасовая гипертермия) по сравнению с контролем [33].

Влияние гипоксии на содержание дыхательного пигмента гемоцианина, лактата и некоторых ионов.

В условиях экспериментальной гипоксии происходит повышение содержания гемоцианина с $62,31 \pm 10,95$ мг/мл до $113,15,95 \pm 21,84$ мг/мл, что свидетельствует об активации физиологических реакций стресс-адаптации и об интенсификации транспорта кислорода в стрессовых условиях.

Не отмечены изменения содержания лактата в мантийной жидкости относительно контрольных величин – $0,115 \pm 0,02$ ммоль/г, это указывает на то, что данный тип стрессового воздействия не приводит к увеличению доли анаэробных процессов в клетке и существенных перестроек в метаболизме гастропод, затрагивающих биохимические и молекулярные механизмы стресс-адаптации не происходит.

Концентрация ионов Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} остается неизменной в течение всего эксперимента, а концентрация ионов Ca^{2+} повышается спустя 3 часа в условиях гипоксии до $35,07 \pm 6,52$ ммоль/г.

В экспериментальных условиях выживаемость большого прудовика при температуре, близкой к 20°C , не превышает 44–50 ч, что указывает на ограниченность физиолого-биохимических механизмов адаптации большого прудовика к дефициту растворенного кислорода в воде. Поэтому в теплый период года атмосферное дыхание у данного вида является преобладающим. В зимний период, при температурах, близких к 0°C , потребности в кислороде у большого прудовика, как пойкилотермного организма, резко снижаются, что позволяет ему существовать исключительно за счет растворенного в воде кислорода [34].

Влияние условий среды обитания на антиоксидантную систему.

Сильные воздействия окружающей среды вызывают стандартную стресс-реакцию. При кратковременном действии стрессов умеренной интенсивности происходит усиление функционирования органов и мобилизация организма. При интенсивной или длительной стресс-реакции в клетках происходит активация процесса свободно-радикального окисления, внутриклеточной кальциевой перегрузки, угнетение энергопродукции, снижение синтеза белка и денатурация белковых структур. Одним из возможных компонентов быстрой реакции на стресс является активация перекисного окисления липидов (ПОЛ). Известно, что в нормальных условиях жизнедеятельности клетки постоянно присутствует определенный уровень перекисного окисления липидов, индуцированный образованием активных форм кислорода. Перекисное окисление липидов в клетке поддерживается на постоянном уровне благодаря многоуровневой антиоксидантной системе защиты.

Повышенная температура окружающей среды вызывает активацию перекисного окисления липидов в гепатопанкреасе легочных моллюсков независимо от механизма транспорта кислорода. Изменение активности каталазы при сочетании гипертермии и солей тяжелых металлов наиболее выражено в гепатопанкреасе *L. stagnalis*. Сочетанное воздействие гипертермии и сульфата меди (II) в концентрации 0,1 мг/л и 1 мг/л вызывает резкое снижение уровня мочевины в гемолимфе *P. corneus* [35].

Установлено, что изменение ионного состава незамедлительно сказывается на скорости протекания ферментативных реакций, что приводит к установлению нового, относительно стабильного функционального уровня [36]. Глутатионпероксидаза играет основную роль в инаktivации внутриклеточной перекиси водорода, используя в качестве доноров водорода восстановленный глутатион.

Установлено, что длительное (7 суток) закисление аквариумной воды приводит к падению активности глутатионпероксидазы (в 1,4 раза) по сравнению с контрольными условиями. При этом также отмечается почти 2-кратное снижение уровня восстановленного глутатиона в ткани печени. Антиокислительная система защиты является ведущим образованием в процессе детоксикации и биотрансформации ксенобиотиков, а, следовательно, ее состояние может коррелировать с наличием загрязнителей в окружающей среде. В некоторых случаях наиболее чувствительным к действию

ксенобиотиков оказываются глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза, что приводит к выраженному (до 80%) снижению уровня восстановленного глутатиона [37].

Нарушения кислотно-основного равновесия пресных вод можно рассматривать в качестве фактора, оказывающего существенное влияние на показатели системы антиокислительной защиты моллюсков, выражающееся в развитии окислительного стресса. При этом создаются условия для потенцирования действия различных органических и неорганических загрязнителей по отношению к водным гидробионтам.

Влияние сезона года на углеводный обмен.

Содержание общего сахара и глюкозы в гемолимфе моллюсков подвержено сезонной изменчивости. Наиболее высокие значения этих показателей характерны для весны – периода интенсивного функционирования гонад. В период усиленного гаметогенеза происходит мобилизация резервных источников энергии, что находит отражение в повышении уровня гликемии в гемолимфе моллюсков. В течение лета концентрация углеводов в гемолимфе поддерживается на прежнем уровне или же несколько падает. С момента прекращения размножения до впадения в анабиотическое состояние наблюдается снижение концентрации общего сахара и глюкозы в гемолимфе, обусловленное понижением интенсивности метаболизма.

Список использованной литературы к главе 2

1. Чиркин, А.А. Внутриклеточный сигналинг и протеолиз / А.А. Чиркин // Біялогія і хімія. – 2019. – № 4(76). – С. 6–17.
2. Веремеенко, К.Н. Протеолиз в норме и при патологии / К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.И. Кизим. – Киев: Здоров'я, 1988. – 200 с.
3. Косинец, А.Н. Протеиназы и их ингибиторы в гнойной хирургии и онкологии / А.Н. Косинец, Л.Н. Кирпиченок. – Витебск: ВГМУ, 2003. – 409 с.
4. Proteolysis and oxidation of therapeutic proteins after intradermal or subcutaneous administration / N. Varkhede [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2020. Vol. 109, no. 1. P. 191-205. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019/08/005>.
5. Robson, B. Computers and viral diseases. Preliminary bioinformatics studies on the design of a synthetic vaccine and a preventative peptidomimetic antagonist against the SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) coronavirus / B. Robson // Comput. Biol. Med. – 2020. – Vol. 119. – P. 103670. <https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2020.103670>.
6. Robson, B. COVID-19 Coronavirus spike protein analysis for synthetic vaccines, a peptidomimetic antagonist, and therapeutic drugs, and analysis of a proposed achilles' heel conserved region to minimize probability of escape mutations and drug resistance / B. Robson // Comput. Biol. Med. – 2020. – Vol. 121. – P. 103749. <https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2020.103749>.
7. Wartecki, A. On the coronaviruses and their associations with the aquatic environment and wastewater / A. Wartecki, P. Rzymiski // Water. – 2020. – Vol. 12. – №6. – P. 1598. <https://doi.org/10.3390/w12061598>.
8. Proteolysis of virulence regulator ToxR is associated with entry of *Vibrio cholerae* into a Dormant State / S. Almagro-Moreno [et al.] // PLoS Genet. – 2015. – Vol. 11. – №4. – P. 1005145. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005145>.
9. Collagenolytic enzymes and their applications in biomedicine / A.B. Shekhter [et al.] // Current Medicinal Chemistry. – 2019. – Vol. 26(3). – P. 487–505. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171006124236>.
10. Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo / V. Ntziachristos [et al.] // Nat. Med. – 2002. – Vol. 8. – P. 757–761. <https://doi.org/10.1038/nm729>.

11. Шашова, Е.Е. Внутриклеточный и циркулирующий пулы протеасом: значение при злокачественных новообразованиях различных локализаций / Е.Е. Шашова, Е.С. Колегова, И.В. Кондакова, А.А. Завьялов // Сибирский Онкологический Журнал. – 2015. – №6. – С. 76–82.

12. Karp's cell and molecular biology: concepts and experiments / G. Karp, J. Iwasa, W. Marchall, 8th. Ed. – Danvers: Wiley, 2015. – 829 p. ISBN978111888644.

13. The natural history of model organisms. The unlimited potential of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis* / I. Fodor [et al.] // eLife 2020. – Vol. 9. – P. 56962. <https://doi.org/10.7554/eLife.56962>.

14. Hodgkin, A.L. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve / A.L. Hodgkin, A.F. Huxley // J. Physiol. – 1952. – Vol. 117(4). – P. 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>.

15. Kupfermann, I. Neuronal controls of a behavioral response mediated by the abdominal ganglion of *Aplysia* / L. Kupfermann, E.R. Kandel // Science. – 1969. – Vol. 164 (3881). – P. 847–850. <https://doi.org/10.1126/science.164.3881.847>.

16. Benjamin, P.R. Peptidergic systems in the pond snail *Lymnaea*: From genes to hormones and behavior / P.R. Benjamin, I. Kemenes // In: Saleuddin S., Lange A. B., Orchard I. (Eds). Advances in Invertebrate (Neuro) Endocrinology. – New York: Apple Academic Press, 2020. – P. 213–254. <https://doi.org/10.1201/9781003029854-7>.

17. Korneev, S.A. CREB2-targeting microRNA is required for long-term memory after single-trial learning / S.A. Korneev [et al.] // Sci. Rep. – 2018. – Vol. 8. – №1. – P. 3950. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22278-w>.

18. Rivi, V. *Lymnaea stagnalis* as model for translational neuroscience research: From pond to bench / V. Rivi [et al.] // Neurosci. Biobehav. Rev. – 2020. – Vol. 108. – P. 602–616. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.020>.

19. Maasz, G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models / G. Maasz [et al.] // Disease Models and Mechanisms – 2017. – Vol. 10. – № 2. – P.127–139. <https://doi.org/10.1242/dmm.027185>.

20. Сидоров, А.В. Нейромодуляторное действие пероксида водорода на центральные нейроны пищевой сети моллюска *Lymnaea stagnalis* // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 2017. – Т. 53. – №6. – С. 437–443.

21. Detailed review paper on mollusks-cycle toxicity testing. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on testing and assessment. - Paris: Environment directorate organization for economic co-operation and development. – 2010. – №121. –182 p.

22. Amorim, J. *Lymnaea stagnalis* as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies / J. Amorim [et al.] *Sci. Total Environ.* – 2019. – Vol. 669. – P. 11–28. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.035>.

23. Atli, G. Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*) during acute copper exposure / G. Atli, M. Grosell // *Aquat. Toxicol.* – 2016. – Vol. 17. – P. 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.007>.

24. Baudrot, V. New Insights to compare and choose TKTD models for survival based on an Interlaboratory study for *Lymnaea stagnalis* exposed to Cd / V Baudrot [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2018. – Vol. 52. – №3. – P. 1582–1590. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05464>.

25. Cremazy, A. Chronic toxicity of binary mixtures of six metals (Ag, Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn) to the great pond snail *Lymnaea stagnalis* / A. Cremazy K.V., Brix, C.M. Wood // *Environ. Sci. Technol.* – 2018. – Vol. 52. – №10. – P. 5979–5988. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06554>.

26. Голубев, А.П. Динамика процессов радиоадаптации в популяциях моллюсков из водоемов Белорусского сектора зоны загрязнения ЧАЭС / А.П. Голубев // *Экологический вестник.* – 2012. – №2 (20). – С. 44–57.

27. Khomich, A.S. Assessment of the joint effect of thermal stress, pollution, and parasitic infestation on the activity of antioxidative enzymes in pulmonate mollusk *Lymnaea stagnalis* // *Sibirskii Ekologicheskii Zhurnal.* – 2017. – №2. – P. 184–192.

28. Дромашко, С.Е. Влияние тяжёлых металлов на большого прудовика *Lymnaea stagnalis* L. / С.Е. Дромашко, С.Н. Шевцова, А.С. Бабенко. – Минск: Беларуская навука. – 2018. – 172 с.

29. Perry, K.J. CRISPR/Cas9-mediated genome modification in the mollusc, *Crepidula fornicata* / K.J. Perry, J.Q. Henry // *Genesis.* – 2015. – Vol. 53. №2. – P. 237–244. <https://doi.org/10.1002/dvg.22843>.

30. Abe, M. The development of CRISPR for a mollusc establishes the formin *Lsdia1* as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling / M. Abe, R. Kuroda // Development. – 2019. – Vol. 146. – №9. – P. dev175976. <https://doi.org/10.1242/dev.175976>.

31. Kuroda, R., Abe, M. The pond snail *Lymnaea stagnalis* / R. Kuroda, M. Abe // EvoDevo. – 2020, Vol. 11. – №24. – P. 13227 <https://doi.org/10.1186/s13227-020-00169-4>.

32. Mollusca Base eds. (2021). Mollusca Base. *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758). Accessed through: Neubauer, T.A.; Harzhauser, M.; Kroh, A.; Georgopoulou, E.; Mandic, O. (2014) Freshwater Gastropods of the European Neogene database (FreshGEN) at: <http://www.marinespecies.org/freshgen/>

33. *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758) in Döring M (2021). English Wikipedia – Species Pages. Wikimedia Foundation. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/c3kkgh> accessed via GBIF.org on 2021-11-08

34. Ottaviani, E. Immunorecognition in the gastropod molluscs with particular reference to the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) / E. Ottaviani // Bolletino di zoologia. – 1992. – Vol. 59, Iss. 2. <http://doi.org/10.1080/11250009209386661>.

35. https://en.wikipedia.org/wiki/Biomphalaria_glabrata

36. Lockyer, A. E. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant- and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strains exposed to *Schistosoma mansoni* / A. E. Lockyer [et al.] // BMC Genomics. 2008. – Vol. 9 (1). – P. 634. doi:10.1186/1471-2164-9-634. PMC 2631019. PMID 19114004.

37. Pointier, J. P. Biological invasions: The case of planorbid snails / J. P. Pointier, P. David, P. Jarne // Journ. Helminthology. – 2005. – Vol. 79 (3). – P. 249–256. doi:10.1079/JOH2005292. PMID 16153319. S2CID 11158571.

38. Crompton, D. W. (1999). How much human helminthiasis is there in the world? / D. W. Crompton // Journ. Parasitology. – 1999. – Vol. 85 (3). – P. 397–403. doi:10.2307/3285768. JSTOR 3285768. PMID 10386428. Archived from the original (PDF) on 23 February 2010.

ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ *Lymnaea stagnalis*, *Planorbarius corneus*, *Biomphalaria glabrata*

3.1. Сравнение некоторых биохимических процессов у человека и моллюсков.

В этом разделе монографии рассмотрены идеи и положения документа: «Detailed review paper on mollusks-cycle toxicity testing. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on testing and assessment. – Paris: Environment directorate organization for economic co-operation and development, 2010. – №121. – 182 p.».

Имеются убедительные доказательства того, что как оловоорганические соединения, так и эстрогены в концентрациях нг/дм³ могут влиять на нормальное воспроизводство у некоторых видов моллюсков. Эти эффекты обычно связаны с дисбалансом стероидных гормонов. Кроме того показано влияние агонистов и антагонистов андрогеновых рецепторов на половое развитие и размножение у ряда моллюсков. Некоторые полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) могут вызывать задержку гаметогенеза из-за повреждения метаболизма стероидов. Практически нет сомнений в том, что эндокринные нарушения возникают у некоторых моллюсков, и это может повредить репродуктивную функцию и даже вызвать сокращение популяций этих животных.

Пока нет оснований полагать, что исключительно экзогенные стероиды изменяют рост, развитие и размножение моллюсков в экспериментах, а эндогенные стероиды не оказывают никакого эффекта. Однако полный биосинтез стероидов и схемы связывания их с рецепторами не описаны пока ни для одного вида моллюсков, а ткани, участвующие в стероидогенезе, выявляют нечасто, хотя метаболизм стероидов у моллюсков очень похож на этапы биосинтеза стероидов у млекопитающих (рисунок 16). Основной пробел в современных знаниях заключается не столько в понимании биосинтеза стероидов у многих моллюсков, бесспорно похожее на их биосинтез у позвоночных, сколько в точных путях эндокринного контроля *in vivo*.

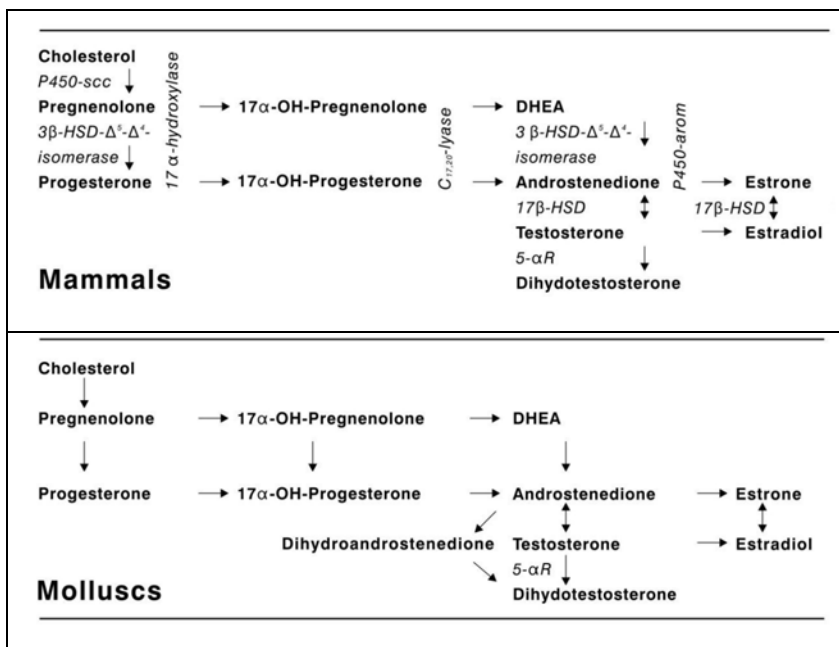


Рис. 16. Сходство стероидогенных путей у млекопитающих и моллюсков (модифицировано по Джанеру и Порте, 2007 г.)

Решающим фактором является то, что, хотя многие моллюски имеют стероидные рецепторы, которые очень похожи на таковые у позвоночных, они не кажутся способными опосредовать действие стероидных гормонов. Здесь не место для подробного рассмотрения этого вопроса, но Джанер и Порт (2007) предположили, что гидрофобные стероидные гормоны могут действовать через рецепторы клеточной поверхности у моллюсков в сочетании с стероид-связывающими белками в гемолимфе, т.е. они могут действовать через пути передачи сигнала, аналогичные тем, которые реализуются с участием гидрофильных пептидных гормонов.

Итак, первый основной вывод, позволяющий приступить к сравнительным биохимическим и морфологическим исследованиям у объектов, далеко отстоящих друг от друга в эволюционном плане, заключается в том, что фиксируемое сходство структур и процессов не всегда свидетельствует о сходстве конечных результатов у

них. Но структурно-биохимическое сходство может использоваться для заместительной терапии и моделирования биотехнологических процессов.

Когда и как можно использовать простейшие организмы для достижения современных биомедицинских целей? В рассматриваемом документе приводятся алгоритмы токсикологических опытов на легочных пресноводных моллюсках (рисунок 17). Из этого рисунка следуют три основных варианта исследований, проводимых с легочными пресноводными моллюсками: F0-, F1- и F2-генерации (тестирование части жизни, тестирование на протяжении одного жизненного цикла и дважды генерационный тест). Такие тесты широко применяются при использовании лабораторных аква-культур моллюсков. При проведении подобных исследований требуется сохранение условий культивирования моллюсков в соответствии с протоколами.

Третья проблема заключается в том, какие биохимические и структурные параметры могут рассматриваться как биомаркеры. Обычно учитывают конечные точки, такие как плодовитость, успешность оплодотворения, эмбриональный и постэмбриональный рост, пол, развитие тканей и органов и др.

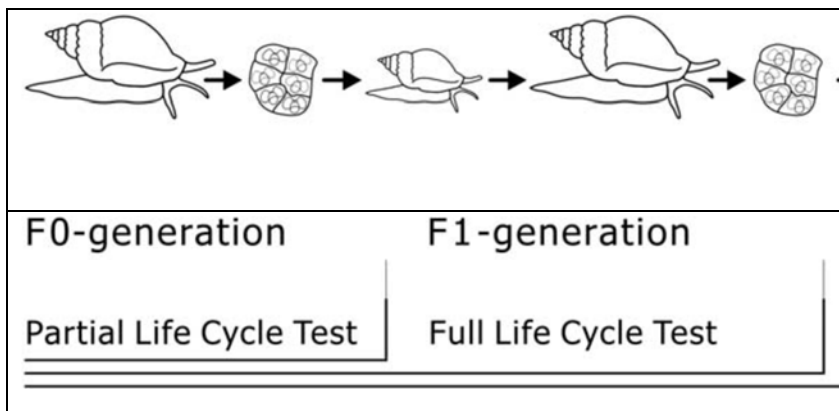


Рис. 17. Блок-схема испытаний жизненного цикла моллюсков

Наиболее широко используемый метод оценки долгосрочной токсичности веществ на моллюсков – это испытание взрослых особей.

Целью данной монографии является оценка молекулярно-структурной гомологии протеолитических ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков, а также попытка моделирования нарушений механизмов протеолиза у моллюсков с помощью субстанций, производящих такой же эффект у млекопитающих.

Альтернативный сплайсинг и посттрансляционные модификации увеличивают разнообразие белков в клетке.

Экспрессия генов – это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт – РНК или белок. Экспрессия генов может регулироваться на всех стадиях процесса: во время транскрипции, во время трансляции и на стадии посттрансляционных модификаций белков. Контроль экспрессии генов осуществляется на следующих уровнях:

- на уровне транскрипции (контролируется время и характер транскрипции гена);
- на уровне процессинга первичного транскрипта, включая явление альтернативного сплайсинга;
- при отборе зрелых мРНК для их транспорта в цитоплазму, учитывая механизмы направленного транспорта через ядерные поры;
- на уровне деградации – избирательная дестабилизация определенных типов мРНК в цитоплазме;
- на уровне трансляции – отбор в цитоплазме мРНК для трансляции на рибосомах, в том числе для синтеза изоформ белков;
- на этапе пострибосомальной модификации белков;
- на уровне активности белка – селективная активация, инактивация или компартментация молекул белка после их синтеза.

В регуляции транскрипции участвуют регуляторные элементы – cis-действующие факторы (промоторы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, LCR (locus control region)) и транс-действующие факторы (главные и специфичные транскрипционные факторы). Эти факторы обеспечивают базальную экспрессию генов, регуляцию онтогенеза, ответ на внеклеточные сигналы, ответ на изменения окружающей среды, контроль клеточного цикла и др. Регуляция экспрессии генов позволяет клеткам контролировать собственную

структуру и функцию и является основой дифференцировки клеток, морфогенеза и адаптации. Экспрессия генов является субстратом для эволюционных изменений, так как контроль за временем, местом и количественными характеристиками экспрессии одного гена может иметь влияние на функции других генов в целом организме.

Альтернативный сплайсинг – вариант сплайсинга мРНК, при котором в процессе экспрессии одного и того же гена на основе его первичного транскрипта (пре-мРНК) образуется несколько отличающихся по структуре зрелых мРНК. Такие зрелые мРНК являются результатом как выборочного включения в зрелую мРНК экзонов первичного транскрипта, так и сохранения в ней некоторых интронов [2]. Известны несколько основных моделей альтернативного сплайсинга [3]. Наиболее распространённой моделью, встречающейся примерно в 40% случаев в клетках млекопитающих, является пропуск экзона или кассетный экзон. В данном случае экзон может быть включен в состав зрелой мРНК или вырезан. Сложной моделью являются взаимоисключающие экзоны, когда из двух экзонов в зрелую мРНК переходит только один. В 18% событий альтернативного сплайсинга у млекопитающих встречается модель альтернативного акцепторного сайта – используется альтернативный 3'-конец интрона (акцепторный сайт), так что меняется 5'-конец нижестоящего экзона, а в 8% случаев альтернативного сплайсинга функционирует модель альтернативного донорного сайта – здесь используется альтернативный 5'-конец интрона (донорный сайт), так что меняется 3'-конец вышестоящего экзона. Кроме того возможна модель удержания интрона, основанная на том, что последовательность может быть вырезана как интрон или оставлена в зрелой мРНК. Последний вариант отличается от пропуска экзона, поскольку сохраняемая последовательность не окружена интронами. Если оставленный интрон попадает в кодирующую область, то он должен кодировать аминокислотную последовательность с такой же рамкой считывания, как и соседние экзоны. Если же он будет содержать стоп-кодон или иметь другую рамку считывания, нежели окружающие экзоны, то произойдёт сдвиг рамки считывания, и белок будет нефункциональным. Такой тип альтернативного сплайсинга встречается в 3% случаев у млекопитающих. Известны

также два способа получения нескольких белков по программе одного гена, основанные на использовании соответственно множественных промоторов и множественных сайтов полиаденилирования. Использование множественных промоторов относится скорее к регуляции транскрипции, чем к альтернативному сплайсингу. Начиная транскрипцию с разных точек, можно получить транскрипты с различающимися 5'-концевыми экзонами. С другой стороны, использование множественных сайтов полиаденилирования приводит к образованию разных 3'-концов у созревающих транскриптов. Оба этих механизма в сочетании с пятью вышеизложенными моделями сплайсинга обеспечивают разнообразие мРНК, считываемых с одного и того же гена [4].

В результате трансляции зрелых мРНК, полученных в процессах альтернативного сплайсинга, формируются полипептидные цепи с разными аминокислотными последовательностями. Следовательно, при альтернативном сплайсинге один транскрипт обеспечивает синтез нескольких белков. Широкое распространение такого сплайсинга у эукариот приводит к значительному увеличению разнообразия белков, закодированных в их геномах. Например, клетки человека синтезируют не менее чем 105 различных белков, в то время как число кодирующих их генов составляет 25 тысяч (при этом среди всех генов человека, которые содержат интроны, более 75 % выступают как матрицы для синтеза пре-мРНК, подвергаемых далее альтернативному сплайсингу). Геном нематоды *C. elegans*, состоящей примерно из 1000 клеток, по количеству существенно не отличается от генома человека, однако альтернативному сплайсингу подвергаются пре-мРНК только 15 % генов. Таким образом, альтернативный сплайсинг позволяет увеличить разнообразие белковых продуктов генов, сохраняя при этом относительно небольшое количество различных генов в геноме и не создавая избыточных копий генов [2; 5].

Посттрансляционная модификация – это ковалентная химическая модификация полипептидной цепи, синтезированной в результате трансляции зрелой мРНК. Для многих белков посттрансляционная модификация оказывается завершающим этапом процесса экспрессии генов. К настоящему времени описано более двухсот вариантов посттрансляционной модификации белков.

Считают, что модификациям подвергается подавляющее большинство белков и даже один и тот же белок может подвергаться нескольким различным модификациям. Модификации происходят в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. Здесь ферменты гликозилирования присоединяют к белкам сложные цепи остатков сахаров, образуя гликопротеины. Единственный известный случай гликозилирования в цитозоле клеток млекопитающих – это добавление к белкам N-ацетилглюкозамина. Однако большинство других ковалентных модификаций протекает в первую очередь именно в цитозоле. Некоторые из них стабильны и необходимы для активности белка, например, ковалентное присоединение коферментов (биотина, липоевой кислоты или пиридоксальфосфата). Присоединение жирной кислоты к белку направляет его к определенным мембранам, обращенным в цитозоль. К фосфатидилинозитолам наружной поверхности плазматической мембраны клетки прикрепляются многочисленные белки. Связь белков с фосфоинозитидгликанами осуществляется через концевой этанолламин. Определенные ковалентные модификации, происходящие в цитозоле, обратимы и служат для регуляции активности многих белков. Многие клеточные процессы регулируются путем обратимого фосфорилирования-дефосфорилирования белков. Посттрансляционные модификации включают в себя фосфорилирование факторов транскрипции протеинкиназами, гликозилирование остатков Asn в последовательностях Asn-X-[Ser-Thr], N-концевое ацилирование, циклизацию N-концевого остатка Glu с образованием пироглутаминовой кислоты, C-концевое амидирование последовательностей освобождающихся пептидов, гидроксилирование остатков Lys и Pro, метилирование различных остатков аминокислот. Итак, выделяют следующие основные типы посттрансляционной модификации полипептидной цепи:

- расщепление пептидной связи (удаление N-концевого остатка метионина, ограниченный протеолиз);
- присоединение химических групп (N-ацилирование, C-амидирование, N-миристоилирование, присоединение гликозилфосфатидилинозитола и др.);

- модификации боковых цепей аминокислот (гликозилирование, гидроксилирование, ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, йодирование, окисление и др.);
- присоединение гидрофобных групп для локализации в мембране (пренилирование путем присоединения изопреноидов, S-пальмитирование);
- присоединение белков и пептидов (убиквитинирование, сумоилирование).

Посттрансляционные модификации оказывают различные эффекты на белки: регулируют продолжительность их существования в клетке, ферментативную активность, взаимодействия с другими белками. В ряде случаев посттрансляционные модификации являются обязательным этапом созревания белка, в противном случае он оказывается функционально неактивным. Например, при созревании инсулина и некоторых других гормонов необходим ограниченный протеолиз полипептидной цепи, а при созревании белков плазматической мембраны – гликозилирование. Установлено, что гликозилирование является одной из наиболее часто встречающихся модификаций: считается, что около половины белков человека гликозилировано, а 1–2% генов человека кодируют белки, связанные с гликозилированием. Процессы метилирования и этилирования гистонов определяют функциональную активность ДНК за счет переходов в системе конденсированный хроматин \rightleftharpoons эухроматин. К редким модификациям относят тирозинирование/детирозинирование и полиглицилирование тубулина [6-8]. Для изучения посттрансляционной модификации применяют методы масс-спектрометрии и истерн-блоттинг.

Наряду с альтернативным сплайсингом посттрансляционные модификации увеличивают разнообразие белков в клетке, обеспечивая функционирование различных механизмов адаптации [6; 9].

Целью этого раздела главы был поиск иллюстрации целесообразности наличия разнообразия белков для эволюции и адаптации многоклеточных организмов. Объектами исследования явились два вида легочных пресноводных моллюсков, обитающих в одних и тех же водоемах: прудовик обыкновенный (*Lymnaea stagnalis* L.) и катушка роговая (*Planorbarius corneus* L.), отличающихся по типу транспорта кислорода [10].

Представители таксона *Mollusca* имеют четыре типа кислород-переносящих металлопротеинов и тканевых протогемовых белков: тканевые протогемы, гемоглобин красных кровяных клеток, внеклеточные гемоглобины и гемоцианины [11]. У прудовиков транспорт кислорода осуществляет медьсодержащий гемоцианин, а у катушек – железосодержащий гемоглобин. Существует прямая зависимость между активностью животного и концентрацией переносчиков кислорода во внутренней среде [12].

Различия между двумя белками выражаются как их дивергенция, т. е. процент различающихся аминокислотных остатков. При сравнительном изучении определенного белка у нескольких видов его дивергенция для каждой пары сравниваемых видов пропорциональна времени, прошедшему с момента их разделения. Тем самым получают эволюционные часы, измеряющие, по всей видимости, равномерное накопление мутаций в процессе эволюции данного белка. Скорость дивергенции может быть измерена как процент различий, накопившихся за миллион лет, или обратной величины – единицы эволюционного времени (ЕЭВ), соответствующей времени (в миллионах лет), необходимому для осуществления дивергенции на 1%.

В анализе использованы нуклеотидные последовательности гена гистона H4, являющегося белком с небольшой молекулярной массой, состав которого обогащён положительно заряженными аминокислотами лизином и аргинином. Последовательность аминокислот в гистонах является консервативной и незначительно различается в организмах различных таксонов. Для определения времени дивергенции была использована база данных www.timetree.org, режим поиска NODE TIME (поиск времени дивергенции для двух видов). Для построения дендрограммы были сравнены нуклеотидные последовательности для гистона H4 более шестидесяти организмов различных таксономических групп из базы данных www.ncbi.nlm.nih.gov (представители классов Млекопитающие, Птицы, Пресмыкающие, Земноводные, Насекомые, Брюхоногие, Высшие раки, Коралловые полипы, Невооруженные мермертины, Ланцетники и Сипункулиды). Время дивергенции определяли между видами, принадлежащими к двум семействам – *Radix auricularia* (семейство прудовики *Lymnaeidae*) и *Biomphalaria*

glabrata (семейство катушки *Planorbidae*). Также использовали представители моллюсков *Nenia tridens*, *Praxispira subserulata*, *Alopiа bielzii*, *Leucostigma candidescens*, *Cochlodina orthostoma*. Время дивергенции определяли между *Biomphalaria glabrata* и *Nenia tridens*, *Praxispira subserulata*, *Alopiа bielzii*, *Leucostigma candidescens*, *Cochlodina orthostoma*; между *Planorbis corneus* и *Nenia tridens*, *Praxispira subserulata*, *Alopiа bielzii*, *Leucostigma candidescens*, *Cochlodina orthostoma*; между *Radix auricularia* и *Nenia tridens*, *Praxispira subserulata*, *Alopiа bielzii*, *Leucostigma candidescens*, *Cochlodina orthostoma*; между *Leucostigma candidescens* и *Radix auricularia*, *Biomphalaria glabrata*.

Для построения дендрограммы применили программу MEGA 5.2, в которую вносили 64 нуклеотидные последовательности гистона H4 организмов различных таксономических групп. Дендрограмму строили с помощью метода Neighbor-Joining, модели – Tamura-Nei. В основание ветвей было положено время дивергенции легочных пресноводных моллюсков (*Planorbis corneus* и *Lymnaea stagnalis*). Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода Kimura 2-parameter в единицах количества базовых замен на сайт. Дендрограмма представлена на рисунке 18. Точкой отмечено место дивергенции прудовика обыкновенного и катушки роговой.

Во всех случаях время дивергенции составило 182 млн. лет. Исходя из этого можно считать, что время дивергенции между прудовиком обыкновенным и катушкой роговой также равно 182 млн. лет. Данное время относится к тоарскому веку (эре, ярусу). Тоарский ярус (182,7 – 174,1 млн. лет назад) – верхний ярус нижнего отдела юрской системы. Около 183 млн. лет назад на Земле случилось тоарское климатическое событие – в результате извержений вулканов в атмосферу попало много углекислого газа, среднегодовая температура Земли выросла на 5 градусов, увеличилось количество осадков и смытых в океан минеральных веществ. Потребляющие растворенный в воде кислород водоросли и бактерии начали бурно размножаться, что привело к формированию чёрных сланцев – образующихся в бескислородных условиях осадочных пород, богатых органикой [14]. В результате возник длительный период

относительной кислородной недостаточности для живых организмов, в том числе для легочных моллюсков. Можно предположить, что у *Lymnaea stagnalis* возникли некоторые преимущества в транспорте кислорода по сравнению с *Planorbis corneus*.

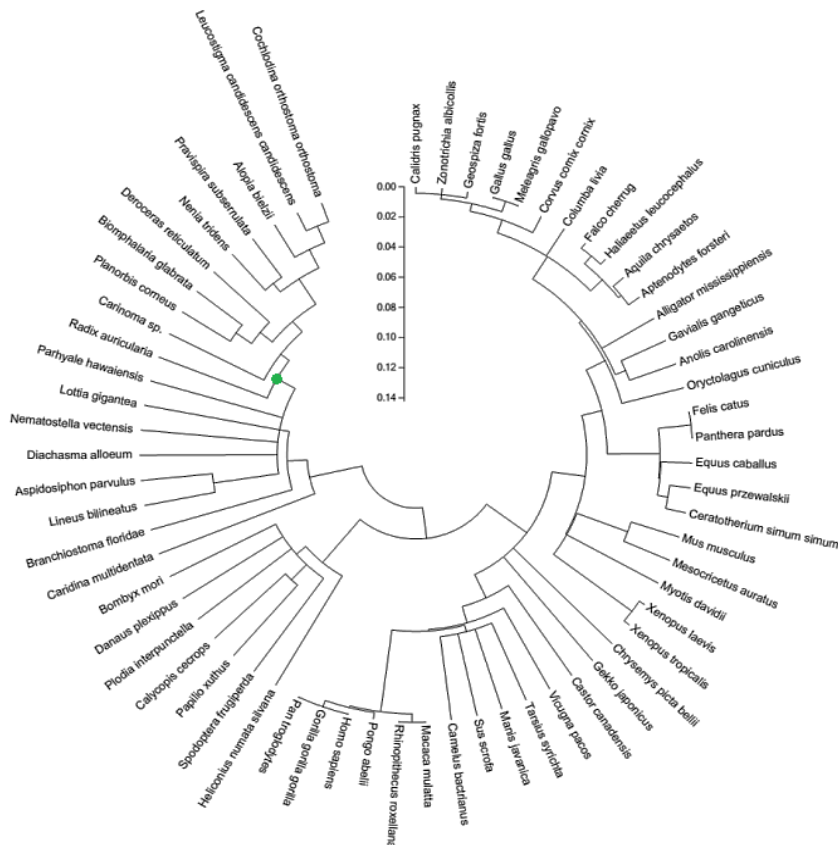


Рис. 18. Дендрограмма для различных таксономических групп организмов, основанная на времени дивергенции между прудовиком обыкновенным и катушкой роговой, построенная при использовании нуклеотидных последовательностей гистона H4

Ряд исследователей придерживаются того мнения, что гемоцианин моллюсков прошёл через 3 дупликации гена, в результате чего субъединица гемоцианина моллюсков стала содержать 8 активных

центров. Субъединица гемоцианина включает 7 или 8 функциональных элементов. Каждый функциональный элемент подразделяется на 2 домена. Домен α содержит 4 альфа-спирали и активный центр, домен β – состоящий из 7 бета-листов, формирующих антипараллельный бета-баррель. Строение активного центра: он содержит два близко расположенных друг к другу катиона меди, которые обратимо связывают молекулу кислорода в комплекс. Каждый катион меди координирован тремя имидазольными группами (гистидиновыми остатками), при оксигенации молекула кислорода оказывается зажатой между этими катионами. Пептидная цепь образует петли, то приближаясь к активному центру, то удаляясь от него. Самая большая петля (разделяющая гистидиновые остатки His204 и His324) состоит из 119 аминокислотных остатков. В неокисленной форме катионы меди находятся в степени окисления +1, отстоят друг от друга на расстояние 4,6 Å, химическое связывание между ними отсутствует. Конфигурация N-Cu-N близка к треугольной, расстояния Cu-N находятся в пределах 1,9-2,1 Å. При оксигенации ионы меди приобретают степень окисления +2. Катионы меди сближаются друг с другом и расстояние Cu-Cu составляет 3,6 Å, а расстояния Cu-O – 1,8-1,9 Å. В результате сближения ионов меди углы N-Cu-N приближаются к тетраэдрическим. Кроме того, связи Cu-N становятся неравными по длине: в окружении каждого иона две связи имеют длину 1,9-2,0 Å, а третья связь удлиняется до 2,3 Å. Субъединица гемоцианина представляет собой комплекс меди и белка. В отличие от гемоглобина, атомы металла связаны непосредственно с аминокислотой, а не с простетической группой.

Гемоцианин, как и гемоглобин, проявляет кооперативность, то есть при присоединении молекулы кислорода одной субъединицей увеличивает сродство к кислороду соседних субъединиц. Кооперативность гемоцианина моллюсков сравнительно невелика (коэффициент Хилла составляет около 2). В отличие от гемоглобина, входящего в состав эритроцитов, молекулы гемоцианина растворены в гемолимфе. Благодаря этому мономеры гемоцианина могут объединяться в очень большие комплексы, что позволяет лучше проявляться его кооперативным свойствам и в целом лучше переносить кислород. Это особенно важно для организмов, живущих в условиях с малым содержанием кислорода. Гемоцианин может связываться не только с кислородом, но и с угарным газом, образуя карбоксигемоцианин. При этом также обнаруживается кооперативный эффект.

Существует предположение, что гемоцианин произошел от тирозиназ. Для всех тирозиназ характерно одинаковое строение активного центра. Он представляет собой два катиона меди, каждый из которых ориентирован с помощью трёх гистидиновых остатков. Активный центр этого фермента очень похож на активный центр гемоцианина как по структуре, так и по свойствам. Активный центр тирозиназы способен захватывать одну молекулу кислорода, которая затем используется для окисления субстрата. На сервере www.weblogo.berkeley.edu/logo.cgi сформирован логотип мотива из 63 аминокислотных последовательностей гемоцианина моллюсков. На этом же сервере был сформирован логотип мотива из 180 аминокислотных последовательностей тирозиназ организмов.

При выравнивании последовательностей гемоцианинов и тирозиназ был обнаружен мотив (H - - - - - W H R), который присутствует в гемоцианинах и тирозиназах. H (His) соответствует 6 аминокислоте на логотипах гемоцианинов и тирозиназ, W H R (Trp, His, Arg) – 14, 15 и 16 соответственно. При построении логотипов нами были использованы только части аминокислотных последовательностей (21 аминокислота) (рисунки 19 и 20).

Наличие этого общего мотива свидетельствует в пользу предположения о происхождении гемоцианинов из тирозиназ, когда в окружающей среде снизилось количество биодоступного кислорода. При хронической гипоксии концентрация гемоцианина в гемолимфе значительно растёт, компенсируя нехватку кислорода в воде. На профиль связывания кислорода значительно влияет величина pH. Рост температуры на 10 градусов может уменьшать pH на 0,3, что влияет на кооперативные свойства гемоцианина к условиям среды.

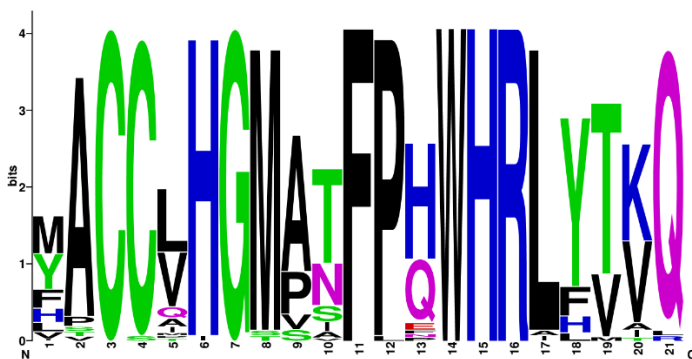


Рис. 19. Логотип гемоцианинов

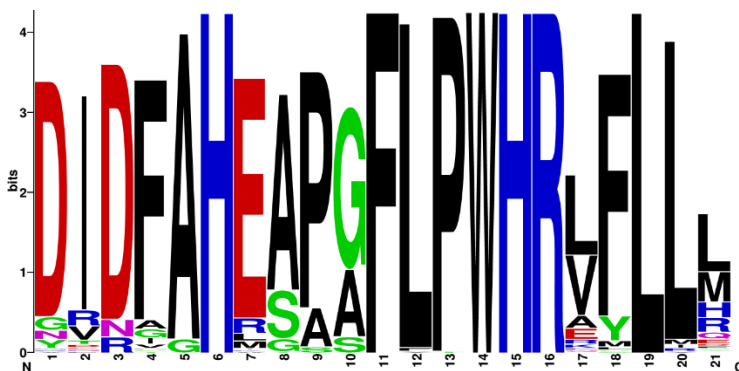


Рис. 20. Логотип тирозиназ

При исследовании гемолимфы и гепатопанкреаса прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis* L.) и катушки роговой (*Planorbarius corneus* L.) протеолитическая и антипротеолитическая активности были обнаружены во всем исследуемом диапазоне значений pH 3,0-9,0. Наиболее высокие значения трипсиноподобной активности были выявлены при значениях pH инкубационной среды в диапазоне 3,6-9,0, а количества α 1-антипротеазного ингибитора при pH 3,6-3,8 и α 2-макроглобулина при pH 3,0. В гепатопанкреасе выявлена мощная антипротеазная активность, направленная против кислых и слабокислых протеаз, вероятно, лизосомального происхождения.

Достаточно привлекательной кажется идея исследования системы протеолиза-антипротеолиза в тканях легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по типу транспорта кислорода, поскольку известны два основных типа протеолиза – АТФ-независимый и АТФ-зависимый. Первый активируется в условиях голодания и не требует затраты энергии, а второй функционирует постоянно и избирательно. В этих процессах участвуют, вероятно, разные протеолитические ферменты. Регистрация протеолитической и антипротеолитической активности в широком диапазоне pH может свидетельствовать о наличии изоформ белков, отвечающих за протеолиз и антипротеолиз. И, наконец, представляет существенный интерес исследование действия субстанций типа этионина, способных оказывать влияние на биосинтез белка и его посттрансляционную судьбу. Для этого необходимо найти общие мишени

для действия антиметаболита на протеолитические ферменты человека и модельного организма.

Для этой цели был произведен сравнительный анализ *Biomphalaria glabrata* и *Planorbarius corneus*, поскольку они относятся к одному семейству брюхоногих моллюсков (*Planorbidae*) из отряда лёгочных моллюсков (*Pulmonata*). На сайте www.ncbi.nlm.nih.gov в разделе «Nucleotide» была найдена аминокислотная последовательность белка трипсина *Biomphalaria glabrata* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/908461094/>), которая при парном выравнивании с аминокислотной последовательностью белка трипсина человека (PDB ID 1H4W) давала наибольший процент сходства (26,67%). Для проведения молекулярного докинга (соответствия) необходимо наличие 3D структуры белка. При отсутствии такой структуры её можно смоделировать на сервере www.swissmodel.expasy.org. Нами было проведено моделирование по образцу (User Template Mode) с использованием в качестве шаблона структуры белка трипсина человека (PDB ID 1H4W). Две структуры белка трипсина (*Homo sapiens* и *Biomphalaria glabrata*) были загружены на сервер молекулярного докинга www.dockingserver.com. В качестве лиганда в докинге был использован этионин ((L)-Ethionine). При сравнении результатов 2-х докингов между собой было выяснено, что 6 аминокислот у *Homo sapiens* и у *Biomphalaria glabrata* связываются с этионином. Аминокислоты для *Homo sapiens*: Asp 189, Ser 190, Gln 192, Ser 195, Val 213, Cys 220. Аминокислоты для *Biomphalaria glabrata*: Asp 224, Ser 225, Gln 227, Ser 230, Val 248, Cys 254.

Эти данные позволили провести исследования, которые показали, что после введения этионина в дозе 1 мг/мл в гепатопанкреасе прудовиков активность трипсиноподобных протеиназ изменялась волнообразно с двумя пиками активности через 3 и 24 часа после введения этионина. В гепатопанкреасе катушек этионин вызывал повышение активности трипсиноподобных протеиназ в интервале 3-24 часа. Но значения активности трипсиноподобных протеиназ 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 катушек оказалась более устойчивой к действию этионина по сравнению с прудовиками.

Итак, исследование видового разнообразия белков может быть инструментом для понимания как эволюции многоклеточных эукариотических организмов, так и их адаптации к изменяющимся условиям среды обитания. Накопление материалов о межвидовом разнообразии белков, являющимся следствием альтернативного сплайсинга и пострибосомальной трансформации белков может быть эффективным путем для обоснования и использования достаточно простых, удобных в содержании и недорогих модельных организмов.

Список использованной литературы к главе 3

1. Дымшиц Г.М., Саблина О.В. «Разорванные» гены и сплайсинг // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18. – №1. – С. 71–80.
2. Black, D.L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing / D.L. Black // Annual Review of Biochemistry. – 2003. – Vol. 72. – P. 291–336.
3. Matlin, A.J. Understanding alternative splicing: towards a cellular code / A.J. Matlin, F. Clark, C.W. Smith // Nature Reviews. Molecular Cell Biology. – 2005. – Vol. 6. – №1. – P. 386–398.
4. Blencowe, B.J. Alternative splicing: new insights from global analysis / B.J. Blencowe // Cell. – 2006. – Vol. 126. – №1. – P. 37–47.
5. Jensen, O.N. Interpreting the protein language using proteomics / O. N. Jensen // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2006. – Vol. 7. – P. 391–403.
6. Walsh, G. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins / G. Walsh, R. Jefferis // Nat Biotechnol. – 2006. – Vol. 24. – P. 1241–1252.
7. Rosenbaum, J. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last / J. Rosenbaum // Curr. Biol. – 2000. – Vol. 10. – P. 801–803.
8. Jensen, L.J. Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features / L.J. Jensen [et al.] // Mol. Biol. – 2002. – Vol. 319. – P. 1257–1265.
9. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Бокуть С.Б. Биохимия филогенеза и онтогенеза. Минск: Новое знание; М.: ИНФРА-М. – 2012. – 288 с.
10. Алякринская И.О. Гемоглобины и гемоцианины беспозвоночных (Биохимические адаптации к условиям среды). – М.: Наука, 1979. – 153 с.

11. Стадниченко, А.П. Сравнительная характеристика белкового спектра гемолимфы некоторых видов группы *Lymnaea* Lamarck (Gastropoda) / А.П. Стадниченко // Вестн. зоол. – 1974. – №5. – С. 33–37.

12. Чиркин, А.А. Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у легочных пресноводных моллюсков / А.А. Чиркин [и др.] // Новости медико-биологических наук. – 2016. – Т. 14. – №3. – С. 28–32.

13. <http://www.nature.com/ngeo/journal/v10/n2/full/ngeo2871.html>

14. Decker, H. Minireview: Recent progress in hemocyanin research / H. Decker [et al.] // Integrative and Comparative Biology. – 2007. – Vol. 47. №4. – P. 631–644.

15. Magnus, K. Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences / K. Magnus [et al.] // Proteins. – 1994. – Vol. 19. – P. 302–309.

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-СТРУКТУРНАЯ ГОМОЛОГИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМА ПРОТЕОЛИЗА И ЕГО РЕГУЛЯЦИИ

Считают, что протеолитические ферменты являются весьма консервативными и эта система регуляции сформировалась на уровне первичных клеток. Эволюционным источником многих пептидаз высших эукариот являются пептидазы прокариот. В процессе эволюции совершенствовались эндосомно-лизосомальная система и действующие в цитоплазме и ядре клетки убиквитин- и АТФ-зависимая (протеасомная), а также кальций-зависимая (кальпаиновая) системы. Целью этого раздела монографии был сравнительный анализ некоторых протеолитических ферментов у моллюсков и человека. В большинстве сообщений, описывающих практическое использование этих видов пресноводных моллюсков указывается на их участие в пищевых цепях экосистем, их роль как промежуточных переносчиков возбудителей некоторых заболеваний, использование в качестве модельных организмов для изучения физиологических процессов (размножение, нервная регуляция, клеточный метаболизм, генетика и др.). Однако нам не удалось найти систематизированных исследований, в которых бы обсуждался вопрос о применении пресноводных легочных моллюсков для получения ферментов, в частности, ферментов протеолиза. Раньше считали, что протеазы разрушают отработанные белки для поддержания общего гомеостаза. Однако последние исследования продемонстрировали, что эти ферменты намного сложнее, поскольку играют ключевые роли в качестве сигнальных молекул и регуляторов важных клеточных процессов, таких как экспрессия генов, деление и гибель клеток. Учитывая, что структуры протеолитических ферментов консервативны, была сформулирована задача оценки гомологии белков системы протеолиз-антипротеолиз у человека и легочных пресноводных моллюсков.

Материал и методы исследования. В качестве сравниваемых животных и возможных источников получения протеолитических ферментов избраны широко распространенные в водоемах Европы легочные пресноводные моллюски – прудовик обыкновенный (*Lymnaea stagnalis*), также катушка роговая (*Planorbis corneus*). Ближайшим родственником последней является хорошо изученная

Biomphalaria glabrata, в частности известен ее полный аннотированный геном [1; 2]. Учитывая это, был проведен сравнительный анализ гомологии протеолитических ферментов человека (*Homo sapiens*) и *Biomphalaria glabrata*.

Поиск и отбор нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки человека, осуществлялся на сервере <https://www.ensembl.org>; поиск гомологичных последовательностей для моллюсков осуществлялся на сервере <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> при помощи ресурса BLAST; описание белков для человека было взято с ресурса <https://www.uniprot.org>; парное выравнивание и сравнение последовательностей человека и моллюсков выполнено в программе MEGA 5.2.; построение 3D-структур ферментов для моллюсков осуществлялось на сервере <https://swissmodel.expasy.org> по шаблону 3D-структуры ферментов человека, найденных в банке данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот <http://www.rcsb.org>. В работе использован следующий алгоритм: поиск нуклеотидной последовательности → построение аминокислотных последовательностей сравниваемых белков → их парное выравнивание и оценка степени гомологии первичных структур NS (нуклеотидные последовательности) AAS (аминокислотные последовательности) → оценка третичных структур по архитектуре молекул и их доменной организации [3]. Исследование мотивов и строения активных центров ферментов не входило в задачи данной работы.

В работе проведен анализ 75 белков (в скобках курсивом обозначены гены):

- семи ферментов нерегулируемого протеолиза в том числе: **КФ 3.4.11.** – Aminopeptidase B (*RNPEP*); Leucyl aminopeptidases (*LAP*); **КФ 3.4.21.** – Prolyl oligopeptidase (*PREP*); ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (*CLPP*); Furin или PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme – «фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот») (*FURIN*); **КФ 3.4.23.** – Signal Peptide Peptidase (*SPP*); **КФ 3.4.24.** – Thimet oligopeptidases (*THOP1*);

- шести ферментов регулируемого протеолиза (убиквитин-протеасомного пути) в том числе: **КФ 2.3.2.** – Ubiquitin conjugating factor E4 B-like (*TcasGA2*); Ubiquitin conjugating factor E2 W-like (*UBE2W*); Ubiquitin conjugation factor E2 E1 (*UBE2E1*); E3 ubiquitin ligase (WD40 domain) (*RFWD2*); Ubiquitin-like modifier-activating

enzyme 5 (*UBA5*); **КФ 3.4.19.** – Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5 (*UCHL5*);

• *девяти белков убиквитин-подобных модификаторов и убиквитина*: SUMO2 и SUMO3 (Small ubiquitin-like modifier); NEDD8 (Neuronal-precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8); ISG15 (IFN-stimulated gene 15); GABARAP (Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein); FAT10 (F-adjacent transcript-10); UFM1 (Ubiquitin-fold modifier-1); URM1 (Ubiquitin-related modifier-1); Ub (ubiquitin);

• *20 внеклеточных ферментов в том числе*: **КФ 3.4.15.1** – Angiotensin-converting enzyme (*ACE*); **КФ 3.4.17.** – Angiotensin-converting enzyme 2 (*ACE2*); Carboxypeptidase B2 (*CPB2*); **КФ 3.4.11.** – Chymotrypsinogen B (*CTRB1*); Chymotrypsinogen B2 (*CTRB2*); Chymotrypsin-C (*CTRC*); Chymotrypsin-like elastase family member 2A (*CELA2A*); Kallikrein-1 (*KLK1*); Plasma kallikrein (*KLKB1*); Plasminogen (*PLG*); Prothrombin (*F2*); **КФ 3.4.23.** – Pepsin A-3 (*PGA3*); Pepsin A-4 (*PGA4*); Pepsin A-5 (*PGA5*); Renin (*REN*); Gastricsin (Pepsinogen C) (*PGC*); **КФ 3.4.24.** – Matrix metalloproteinase-9 (*MMP9*); Matrix metalloproteinase-17 (*MMP17*); Matrix metalloproteinase-21 (*MMP21*); Matrix metalloproteinase-24 (*MMP24*);

• *33 внутриклеточных ферментов в том числе*: **КФ 3.4.11.** – Glutamyl aminopeptidase (*ENPEP*); Cytosol aminopeptidase (*LAP3*); Methionine aminopeptidase 1 (*METAP1*); Methionine aminopeptidase 1 mitochondrial (*METAP1D*); Methionine aminopeptidase 2 (*METAP2*); Aspartyl aminopeptidase (*DNPEP*); Aminopeptidase Q (LVRN); Aminopeptidase B (*RNPEP*); Aminopeptidase N (*ANPEP*); Aminopeptidase O (*AOPEP*); **КФ 3.4.17.** – Carboxypeptidase A1 (*CPA1*); Carboxypeptidase A2 (*CPA2*); Carboxypeptidase A4 (*CPA4*); Carboxypeptidase A6 (*CPA6*); Carboxypeptidase B1 (*CPB1*); Carboxypeptidase D (*CPD*); **КФ 3.4.21.** – Granzyme-B (*GZMB*); Hepsin (*HPN*); Rhomboid-related protein 1 (*RHBDL1*), Rhomboid-related protein 2 (*RHBDL2*); **КФ 3.4.22.** – Caspase 1 (*CASP1*); Caspase 3 (*CASP3*); Caspase 7 (*CASP 7*); Caspase 8 (*CASP 8*); Calpain 1 (*CAPN1*); Calpain 2 (*CAPN2*); **КФ 3.4.23.** – Cathepsin D (*CTSD*); Cathepsin E (*CTSE*); Presenilin-1 (*PSENI*); Presenilin-2 (*PSEN2*); Signal Peptide Peptidase (*SPP*); **КФ 3.4.24.** – Neprilysin 2 (*NEP2*); Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 (*ADAM17*).


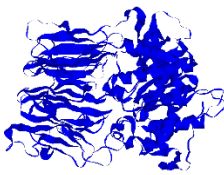
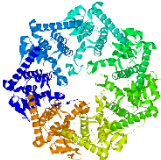
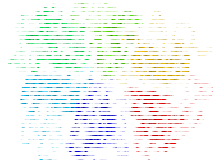
Для сравнения были взяты два фермента пуринового обмена, важного для синтеза нуклеотидов: Amidophosphoribosyl-transferase

(phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase) (КФ 2.4.2.14) (*PPAT*) и Adenylosuccinate lyase (adenylosuccinase) (4.3.2.2) (*ADSL*). Гомология изученных белков по NS- и AAS-последовательностям находилась в пределах 26,4-95 %, поэтому условно диапазон 20-40 % был принят как низкий уровень гомологии, 41-70 % – средний уровень гомологии и более 70 % – высокий уровень гомологии.

Результаты и их обсуждение. В работе использован успешный тип предсказания структур, известный как гомологическое моделирование, который опирается на существующую «шаблонную» структуру, сходную по аминокислотной последовательности с моделируемым белком. В таблицах 1 и 2 приведены примеры третичных структур сравниваемых белков *Homo sapiens* и *Biomphalaria glabrata*. Третичные структуры определяют функции белков. Анализ гомологии третичных структур был ограничен наличием сходных черт в архитектуре ферментов и их доменного строения. Анализ поиска сходных мотивов полипептидных цепей и структур активных центров ферментов не входил в задачу данного исследования.

Таблица 2

3D-структуры ферментов нерегулируемого протеолиза человека и моллюска (в конце таблицы для сравнения приведены два фермента обмена нуклеотидов). Гомология 64-69%

Фермент	3D-структура фермента человека	3D-структура фермента моллюска
Prolyl oligopep-tidase Видны два сходных домена – α -спиральный, β -структурный		
ATP-depen-dent Clp protease proteolytic subunit Видны 6 сходных мономеров		


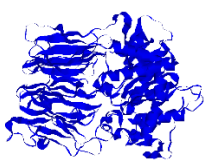
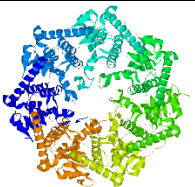
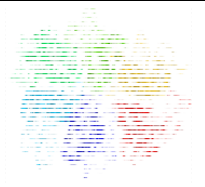



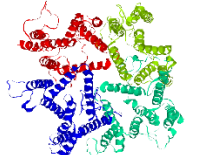
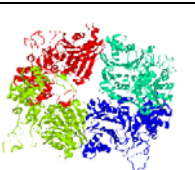
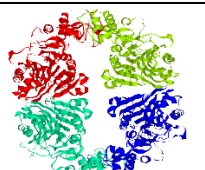
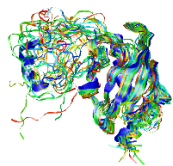
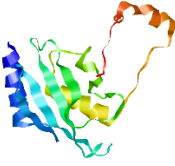
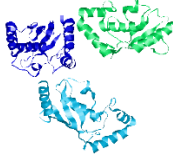

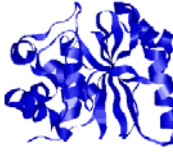
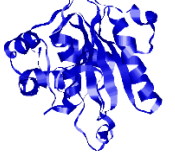
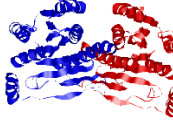



Фермент	3D-структура фермента человека	3D-структура фермента моллюска
Prolyl oligopeptidase Видны два сходных домена – α -спиральный, β -структурный		
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit Видны 6 сходных мономеров		
Furin Видны два сходных домена – α -спиральный, β -структурный		
Signal peptide peptidase Видны 4 мономера с α -спиральной структурой		
Amido-phospho-ribosyl-transferase Видна сходная олимерная структура		

Таблица 3

3D-структуры ферментов и фрагментов ферментов
убиквитин-протеасомного пути протеолиза человека
и моллюска. Гомология 69-76%

Фермент	3D-структура фермента человека	3D-структура фермента моллюска
Ubiquitin conjugation factor E2 W-like У моллюска аналогичный фрагмент левого домена		
Ubiquitin conjugation factor E2 E1 Аналогичная структура олигомерного белка		
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5 Аналогичный каталитический домен		
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5 У моллюска близкая цепь левому мономеру		
E3 ubiquitin ligase (WD40 domain) Фрагмент фермента у моллюска имеет признаки сходства с ферментом человека		

При анализе данных таблиц 2 и 3 следует учитывать, что 3D-структуры белков, как правило, являются более консервативными, чем белковые последовательности, поэтому сходство структур может указывать на сходство и функций белков. Следовательно, полученные материалы позволяют положительно решить вопрос об

использовании тканей легочных пресноводных моллюсков для моделирования патологических процессов человека, связанных с нарушениями системы протеолиза. Кроме того, из тканей моллюсков могут быть выделены протеолитические ферменты, которые затем могут найти применение в фармакодинамических исследованиях регуляторов протеолиза.

При сравнительном анализе ферментов нерегулируемого протеолиза человека и *Biomphalaria glabrata* установлено, что цитозольная сериновая пептидаза Prolyl oligopeptidase, расщепляющая пептидную связь С-концевого пролина, имеет гомологию по NS – 66%, по AAS – 62%; ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit – сериновая протеаза, содержащая каталитическую триаду Asp-His-Ser, гомологична по NS – 68%, по AAS – 67%; Furin – сериновая протеаза клеток животных, расположенная в аппарате Гольджи, гомологична по NS – 69%, по AAS – 68%, Signal Peptide Peptidase – внутримембранная аспартил-протеаза гомологична по NS – 67%, по AAS – 68%; Amino-peptidase B – катализирует отщепление от пептидов N-концевых α -аминокислотных остатков, а также гидролиз α -амидов аминокислот и ее гомология по NS – 66%, по AAS – 50%; Leucyl aminopeptidases (cytosol aminopeptidase) – фермент, преимущественно катализирующий гидролиз лейциновых остатков на N-конце пептидов и белков, гомологичен по NS – 66%, по AAS – 55% и, наконец, Thimet oligopeptidases – семейство металлопептидаз, участвующих в деградации пептидов – брадикинина, нейротензина, ангиотензина I и пептида A β , имеют гомологию по NS – 66 %, по AAS – 63%.

Сравнительный анализ ферментов регулируемого протеолиза показал, что Ubiquitin conjugating factor E4 B-like – опосредующий сборку полиубиквитиновых цепей на субстратах, убиквитинированных другой убиквитинлигазой E3 гомологичен по NS – 72%, по AAS – 49%; Ubiquitin conjugation factor E2 W-like, принимающий убиквитин из комплекса E1 и катализирующий его ковалентное присоединение к другим белкам, гомологичен по NS – 75%, по AAS – 74%. Ubiquitin conjugation factor E2 E1 – принимает убиквитин из комплекса E1 и катализирует его ковалентное присоединение к другим белкам гомологичен по NS – 75%, по AAS – 88%; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5 – деубиквитинирующий фермент, связанный с регуляторной субъединицей 19S протеасомы 26S гомологичен по NS – 72%, по AAS – 67%; Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5 – специфически катализирует первую

стадию присоединения модификаторов UFM1 и SUMO2 и имеет гомологию по NS – 76%, по AAS – 59% и E3 ubiquitin ligase – распознает белковый субстрат и способствует или непосредственно катализирует перенос убиквитина от E2 к белковому субстрату – гомология по NS – 69%, по AAS – 51%.

Для сравнения приведены данные о двух ферментах пуринового обмена: Amidophosphoribosyl-transferase – фермент, катализирующий превращение 5-фосфорибозил-1-пирофосфата в 5-фосфорибозил-1-амин имеет гомология по NS – 68%, по AAS – 67%, Adenylosuccinate lyase (adenylosuccinase) – фермент, катализирующий превращение аденилсукцината в AMP и фумарат гомологичен по NS – 64%, по AAS – 60 %.

Известно, что убиквитин-подобные модификаторы SUMO (Small ubiquitin-like modifier) вовлечены в регуляцию ряда клеточных процессов: ядерный транспорт, репликацию и репарацию ДНК, транскрипцию, апоптоз, стабилизацию белков. У позвоночных обнаружено 4 гомологичных гена – *SUMO1*, *SUMO2*, *SUMO3*, *SUMO4*. Подобно убиквитинированию, присоединение SUMO к субстрату – сумоилирование (sumoylation) – происходит через образование изопептидной связи между С-концевым остатком Gly в молекуле SUMO и ε-аминогруппой остатка Lys в молекуле субстрата – гомология по AAS для SUMO2 – 33% и для SUMO3 – 35%; последовательностей *SUMO1* и *SUMO4* у моллюска не обнаружено. Белок NEDD 8 (Neuronal-precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8) подавляет экспрессию набора генов в предшественниках нервных клеток во время развития мозга; его гомология по AAS составляет 92%. Белок ISG15 (IFN-stimulated gene 15) вовлечен в регуляцию иммунного ответа, клеточный рост и дифференцировку; он гомологичен по AAS на 33%. Белок GABARAP у млекопитающих вовлечен в регуляцию аутофагии при нейродегенеративных, нервно-мышечных и онкозаболеваниях, бактериальных и вирусных инфекциях характеризуется гомологией по NS – 78%, по AAS – 95%. Фактор FAT10 (F-adjacent transcript-10) – белок, который кодируется геном главного комплекса гистосовместимости и индуцируется TNFα и γ-интерфероном и состоит из 2-х убиквитин-подобных доменов, один из которых может напрямую связываться с 26S протеасомой и опосредовать убиквитин-независимую деградацию белков; его гомология по AAS составляет 32%. Модификатор UFM1 (Ubiquitin-fold

modifier-1) с пока не установленной биологической функцией гомологичен по NS – 83%, по AAS – 89%. Белок URM1 (Ubiquitin-related modifier-1) – ковалентно конъюгируется через изопептидную связь с остатками лизина целевых белков и его гомология по AAS равна 64 %. Для моллюска *Lymnaea stagnalis* была найдена только одна аминокислотная последовательность, которая при парном выравнивании давала процент сходства с несколькими модификаторами – NEDD8 (56%), ISG15 (33%), FAT10 (31%).

Убиквитин (Ubiquitin) представляет собой небольшой (8,6 кДа) регуляторный белок, обнаруженный в большинстве тканей эукариотических организмов. В геноме человека четыре гена кодируют убиквитин: UBB, UBC, UBA52 и RPS27A. При сравнительном анализе этих четырех генов были получены следующие данные для *Biomphalaria glabrata*: UBB – гомология по NS – 81%, по AAS – 99%; UBC – гомология по NS – 79%, по AAS – 100%; UBA52 – гомология по NS – 79 %, по AAS – 94%; RPS27A – гомология по нуклеотидной последовательности – 81%, по аминокислотной – 93%. Для *Lymnaea stagnalis* были получены несколько иные данные: UBB – гомология по NS – 82%, по AAS – 100%; UBC – гомология по NS – 84%, по AAS – 100%; UBA52 – гомология по NS – 82%, по AAS – 100%; RPS27A – гомология по NS – 80%, по AAS – 93%. Полученные данные характеризуют высокую степень консерватизма убиквитина.

К внеклеточным протеолитическим ферментам можно отнести ферменты внутриполостного протеолиза (пепсин, трипсин, химотрипсин и др.), кровеносного русла (протеазы системы свертывания крови, фибринолиза, калликреин-кининовой, ренин-ангиотензиновой систем, протеолитические ферменты комплемента и др.), а также в экстраклеточного пространства и внешней поверхности клеточной мембраны.

При сравнительном анализе внеклеточных протеолитических ферментов человека и *Biomphalaria glabrata* установлено, что Pepsin (пепсин) и его изоформы A-3 – A-5, отличающиеся по оптимуму pH, имеют гомологию по AAS около 43%. Renin (ренин) – компонент ренин-ангиотензиновой системы, регулирующей кровяное давление, протеолитический фермент и Gastricsin (пепсиноген C) – протеиназа аспарагинового типа действия гомологичны по AAS на 40,8%. Chymotrypsin-C (химотрипсин) регулирует активацию и деградацию трипсиногенов и прокарбоксипептидаз, Chymotrypsin-like elastase family member 2A – подсемейство сериновых протеаз, которые гидролизуют многие белки в дополнение к

эластину, Chymotrypsinogen B – сериновый тип эндопептидазной активности имеют гомологию AAS на уровне 34,5%. Kallikrein-1 расщепляет связи Met-Lys и Arg-Ser в кининогене с высвобождением Lys-брадикинина, имеет гомологию AAS – 26,4%; Plasma kallikrein расщепляет связи Lys-Arg и Arg-Ser и активирует в ответной реакции фактор XII свертывания крови, участвует в высвобождении брадикинина из кининогена и превращения проренина в ренин – характеризуются низким уровнем гомологии по AAS в 29,5%. Angiotensin-converting enzyme (ангиотензинпревращающий фермент – АПФ) – циркулирующий во внеклеточном пространстве фермент (экзопептидаза), катализирующий расщепление декапептида ангиотензина I до октапептида ангиотензина II характеризуется гомологией по NS – 66,8% и по AAS – 46,3%; Angiotensin-converting enzyme 2 (ангиотензинпревращающий фермент 2 – АПФ2) – мембранная цинк-содержащая экзопептидаза, также катализирующая превращение ангиотензина I в ангиотензина II; секретуемая форма, образуется за счёт протеолитического расщепления протеазой ADAM17. АПФ2 человека является рецептором и точкой входа в клетку некоторых коронавирусов и характеризуется гомологией по AAS в 40,3%. Prothrombin (протромбин) синтезируется в печени и при повреждении сосудов превращается в активный фермент тромбин, который путем гидролиза пептидных связей после Arg и Lys превращает фибриноген в фибрин. Протромбин имеет гомологию по AAS 33,3%. Plasminogen (плазминоген) - циркулирующий профермент, из которого образуется плазмин (фибринолиз) и ангиостатин (ингибирование роста сосудов) гомологичен по AAS на 38,4%. Matrix metalloproteinases (матриксные металлопротеиназы – MMP) – семейство внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать различные типы белков внеклеточного матрикса и характеризуются низким уровнем гомологии по AAS: MMP-9 28,3%, MMP-17 39,1%, MMP-21 40,8%, MMP-24 36,9%. В то же время металлопротеиназы MMP-21 (играет особую роль в генерации лево-правой асимметрии во время эмбриогенеза и может действовать как негативный регулятор сигнального пути NOTCH) и MMP-24 (опосредует расщепление N-кадгерина и действует как регулятор нейроиммунных взаимодействий и покоя нервных стволовых клеток) характеризуются высокой степенью гомологии – 71,7% и 76,4%, соответственно. Carboxypeptidase B2 (карбоксипептидаза B2) отщепляет С-концевые остатки аргинина или лизина от биологически активных пептидов типа кининов или

анафилатоксинов в кровотоке и подавляет фибринолиз, удаляя С-концевые остатки лизина из фибрина после частичного разрушения плазмином, имеет гомологию ААС в 36,0%.

К внутриклеточным протеолитическим ферментам можно отнести ферменты внутримембранного, цитоплазматического и лизосомального протеолиза. Исследована гомология семи ферментов мембранного типа протеолиза человека и *Biomphalaria glabrata*. Пресенилины – семейство трансмембранных белков, составляющих часть протеазного комплекса γ -секретазы. Presenilin-1 и Presenilin-2 гомологичны по NS – 68,3% и 66,6%, соответственно, а по ААС – 54,4% и 55,3%, соответственно. Интересно, что близкий уровень гомологии обнаружен при сравнении этих ферментов у человека и моллюска *Lymnaea stagnalis*: по NS – 67,4% и 68,5%, соответственно, по ААС – 54,2 и 66,1%, соответственно. Средним уровнем гомологии отличается Signal Peptide Peptidase (пептидаза сигнальных пептидов) по NS – 67,1% и по ААС – 68,1%.

Пограничными между низким и средним уровнями гомологии характеризуются сериновая протеаза Hepsin (гепсин), Rhomboid-related protein 1 и Rhomboid-related protein 2 по ААС – 37,3%, 43,0% и 37,0%, соответственно. Фермент Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 (АДАМ17) отвечает за протеолитическое высвобождение ряда белков клеточной поверхности, включая ACE2 и действует как активатор пути Notch, гомологичен по NS – 68,4% и по ААС – 35,3%. Цистеиновые протеазы каскада каспаз, участвующих в апоптозе – Caspase 1, Caspase 3, Caspase 7, Caspase 8 оказались гомологичными по ААС на 28,6%, 50,4%, 30,1% и 40,0%, соответственно.

В качестве эффекторов апоптоза рассматриваются кальпаины (Calpain 1, Calpain 2) – представители семейства цитозольных Ca^{2+} -активируемых цистеиновых протеаз с гомологией по ААС – 45,0%. Granzyme-B (гранзим В) представляет собой сериновую протеазу, наиболее часто обнаруживаемую в гранулах естественных клеток-киллеров (НК-клетки) и цитотоксических Т-клеток. Он секретируется этими клетками вместе с порообразующим белком перфорином, опосредуя апоптоз в клетках-мишенях. Гомология гранзима В по ААС низкая и составляет 27,3%. Лизосомальные ферменты катепсины (Cathepsin D и Cathepsin E) характеризуются средним уровнем гомологии по ААС 51,2% и 45,2%, соответственно. Neprilysin (неприлизин) – Zn^{2+} -зависимая металлопротеиназа, которая инактивирует несколько пептидных гормонов,

включая глюкагон, энкефалины, вещество Р, нейротензин, окситоцин и брадикинин, гомологична по ААС – 40,4%. Комплекс аминокислот, включающий глутамиламинопептидазу, цитозольную Zn^{2+} -зависимую аминокислотпептидазу, метионин-аминокислотпептидазы 1, 2, аспартат-аминокислотпептидазу, аминокислотпептидазы Q, B, N, O гомологичны по NS в диапазоне 65,4 - 72,4%, а по ААС в диапазоне 31,2–71,1%. Карбоксипептидазы (A1, A2, A4, A6, B1, B2, D) гомологичны по ААС в диапазоне 35,5-70,8%.

Средние данные оценки гомологии первичных структур протеолитических ферментов *Homo sapiens* и моллюска *Biomphalaria glabrata* представлены в таблице.

Таблица 4

Оценка гомологии первичных структур
протеолитических ферментов человека *Homo sapiens*
и моллюска *Biomphalaria glabrata*

Исследованные белки	Количество	Нуклеотидные последовательности (NS)		Аминокислотные последовательности (AAS)	
		Покрывание, %	Гомология, %	Покрывание, %	Гомология, %
Ферменты нерегулируемого протеолиза	7	32,5 (16-61)	66,8 (66-68) Средний уровень	90,0 (79-99)	61,9 (50-68) Средний уровень
Ферменты регулируемого протеолиза	6	17,0 (4-31)	73,1 (69-76) Высокий уровень	85,8 (65-99)	64,7 (49-88) Средний уровень
Убиквитин-подобные модификаторы	9	23,5 (21-26)	80,5 (78-83) Высокий уровень	83,3 (47-100)	66,6 (32-95) Средний уровень
Внеклеточные ферменты	20	8,3 (2-34)	71,6 (67-76) Высокий уровень	88,8 (33-98)	37,2 (26-46) Низкий уровень
Внутриклеточные ферменты	33	24,8 (3-61)	67,8 (65-72) Средний уровень	77,7 (44-98)	45,2 (27-71) Средний уровень

Примечание: приведены средние величины, в скобках показан диапазон показателей

Из анализа данных таблицы 4 следует, что наиболее консервативными по кодирующим нуклеотидным последовательностям являются убиквитин-подобные модификаторы, ферменты регулируемого протеолиза и внеклеточные ферменты, а по аминокислотным последовательностям – убиквитин-подобные модификаторы, ферменты регулируемого и нерегулируемого протеолиза. Однако по мере расширения исследований по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям приведенные данные могут уточняться.

Следует отметить, что при парном выравнивании нуклеотидных последовательностей ферментов нерегулируемого протеолиза человека и моллюска *Biomphalaria glabrata* было обнаружено, что показатели Active site, Binding site и Metal binding для 7 ферментов были полностью гомологичны у человека и моллюска (Prolyl oligopeptidase, Thimet oligopeptidases, ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, Leucyl aminopeptidases, Signal Peptide Peptidase, Adenylosuccinate lyase, Aminopeptidase B), а 2 фермента – гомологичны частично (*Amidophosphoribosyltransferase* и *Furin*). При парном выравнивании нуклеотидных последовательностей ферментов регулируемого протеолиза человека и моллюска *Biomphalaria glabrata* было обнаружено, что показатели Active site, Binding site and Metal binding для 4 ферментов были полностью гомологичны у человека и моллюска (SUMO, NEDD8, FAT10, ISG15), для 3 ферментов активные сайты и сайты связывания не описаны (UFM1, URM1, GABARAP). Парное выравнивание нуклеотидных последовательностей кодирующих генов убиквитина человека и моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *Lymnaea stagnalis* продемонстрировало, что показатели Active site, Binding site and Metal binding полностью гомологичны в 4 нуклеотидных последовательностях, как *Biomphalaria glabrata*, так и *Lymnaea stagnalis*. Ранее было показано, что 6 аминокислот трипсина у *Homo sapiens* и у *Biomphalaria glabrata* связываются с этионином в близких локусах молекул фермента: у *Homo sapiens* – Asp 189, Ser 190, Gln 192, Ser 195, Val 213, Cys 220, а у *Biomphalaria glabrata* – Asp 224, Ser 225, Gln 227, Ser 230, Val 248, Cys 254. Но гомология молекул трипсина человека и моллюска составила всего 26,6% [36].

Приведенные материалы о гомологии ферментов и регуляторных белков протеолиза у человека и легочных пресноводных моллюсков доказывают возможность использования последних в каче-

стве модельных организмов для моделирования нарушений протеолитических процессов и доклинического испытания регулирующих протеолиз субстанций, а также получения из аквакультур этих гидробионтов ферментативных и регуляторных белков протеолиза. Кроме того легочные пресноводные моллюски могут быть организмами для воспроизведения и экспериментального лечения запрограммированной гибели клеток, а также заболеваний обмена веществ, опорно-двигательного аппарата и канцерогенеза с лабораторным контролем в виде биомаркеров протеолиза [37–40].

Заключение. Гомология ферментов по нуклеотидным последовательностям у человека и легочных пресноводных моллюсков при анализе не регулируемого протеолиза составляет 66-68%; регулируемого протеолиза – 69-76 %; убиквитин-подобных модификаторов – 78-83%; внеклеточных ферментов – 67-76% и внутриклеточных ферментов – 65-72%. Эволюционный консерватизм протеолитических ферментов, наличие незамкнутого кровообращения, позволяющего доставлять изучаемые субстанции из гемолимфы непосредственно к клеткам-мишеням позволяют использовать этих животных в качестве дешевых и удобных в содержании тест-организмов. Практическое значение достаточно высокой степени гомологии протеолитических ферментов у людей и легочных пресноводных моллюсков обосновывает целесообразность формирования аквакультуры моллюсков, для получения из их тканей белковых ферментативных препаратов протеолитического действия в рамках задач биофармацевтики, косметики и пищевой промышленности.

Список использованной литературы к главе 4

1. Chirkin, A.A. Proteolysis-antiproteolysis system and possible mechanism of the divergence of *Lymnaea stagnalis* and *Planorbis* *corneus* / A.A. Chirkin, V.V. Dolmatova, O.M. Balaeva-Tichomirowa // The 3rd International symposium on EuroAsian Biodiversity, 05-08 July, 2017, Minsk-Belarus: BSU, IPBB. – P. 236.
2. Chirkin, A.A. Comparative analysis of proteolytic enzymes of human and pulmonary freshwater molluscs / A.A. Chirkin, V.V. Dolmatova // Agr. bio. div. Impr. Nut., Health Life Qual. – 2018. – P. 234–242. <https://doi.org/10.15414/agrobiodiversity.2018.2585-8246.234-242>.

3. Чиркин, А.А. Биоинформатический анализ внутриклеточных протеолитических ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков / А.А. Чиркин, В.В. Долматова // Новости медико-биологических наук. – 2018. – Т. 18. – №4. – С.11–16.

4. Чиркин, А.А. Изучение системы протеолиз-антипротеолиз в тканях легочных пресноводных моллюсков при введении этионина / А.А. Чиркин [и др.] // Новости медико-биологических наук. – 2017. – Т. 15. – №2. – С. 38–45.

5. Семенов, И.О. Биоинформатическое исследование сигнальных путей апоптоза у человека и легочных пресноводных моллюсков / И.О. Семенов, А.А. Чиркин / Физико-химическая биология как основа современной медицины: тез. докл. Республ. конф. с междунар. участием, посвященной 80-летию со дня рождения Т. С. Морозкиной (Минск, 29 мая 2020 г.) / под ред. А. Д. Тагановича, В. В. Хрусталёва, Т. А. Хрусталёвой. – Минск: БГМУ, 2020. – С. 164–165.

6. Чиркин, А.А. Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у легочных пресноводных моллюсков / А.А. Чиркин [и др.] // Новости медико-биологических наук, 2016. – Т. 14. – №3. – С. 28–32.

7. Ковтун, Н.Е. Остеоиндуктивные свойства перламутра и его компонентов / Н.Е. Ковтун, А.А. Сеид-Гусейнов, А.Д. Повшенко // Современные проблемы биохимии / под ред. А.П. Солодкова и А.А. Чиркина. – Витебск: ВГУ, 2010. – С. 358–383.

8. Aguilera, F. Neoplasia in mollusks: what does it tell us about cancer in humans? – A Review. / F.Aguilera // J. Genet. Disord. – 2017. – Vol. 1, no.1:07. – P. 1–10. Available from: <http://www.immedpub.com/journal-genetic-disorders>.

ГЛАВА 5. БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕПАТОПАНКРЕАСА И ГЕМОЛИМФЫ МОЛЛЮСКОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Перед моделированием патологических процессов был проведен сравнительный анализ биохимических показателей тканей легочных пресноводных моллюсков, плазмы крови человека и печени крыс линии Вистар. В плазме крови и гемолимфе определяли содержание общего белка, глюкозы, общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицеридов (ТГ), мочевой кислоты и активность гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) с помощью наборов НТПК «Анализ Х» (Беларусь). В тканях печени крысы и гепатопанкреаса моллюсков определяли содержание белка (Lowry et al., 1951), ДНК, РНК (Blober and Potter, 1968; Данченко, 2013) и гликогена (Krisman, 1962; Данченко и Чиркин, 2010). Средняя величина каждого показателя определялась в 8–10 повторностях, и сравнительный анализ производился методом параметрической статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

В таблице 5 представлены биохимические показатели плазмы крови человека и гемолимфы моллюсков, а также ткани печени крысы и гепатопанкреаса моллюсков.

Установлено, что большинство биохимических показателей в плазме крови человека выше по сравнению с гемолимфой прудовиков и роговых катушек, вероятно, из-за незамкнутого кровообращения: общий белок в 4,99 и 2,05 раза, мочевая кислота в 9,90 и 3,38 раза, глюкоза в 9,24 и 4,34 раза, общий холестерол в 10,6 и 15,7 раза, холестерол липопротеинов высокой плотности в 20,3 и 12,2 раза, триглицериды в 4,20 и 6,39 раза, соответственно.

Таблица 5

Сравнение биохимических показателей плазмы крови
и печени млекопитающих с аналогичными показателями
гемолимфы и гепатопанкреаса моллюсков

Показатель	Млекопитающие	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Planorbarius corneus</i>
	Исследуемая жидкость		
	Плазма (<i>Homo sapiens</i>)	Гемолимфа	
Общий белок, г/л	74,4±2,35	14,9±0,24**	36,3±1,62***
Мочевая к-та, ммоль/л	301±12,6	30,4±0,76**	89,1±2,00***
Глюкоза, ммоль/л	4,99±0,37	0,54±0,04**	1,15±0,08***
ОХС, ммоль/л	5,19±0,52	0,49±0,01**	0,33±0,01***
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,22±0,12	0,06±0,01**	0,11±0,01***
ТГ, ммоль/л	1,47±0,14	0,35±0,01**	0,23±0,01***
ГГТ, Ед/л	40,1±4,25	187±9,42**	178±7,70**
Исследуемая ткань	Печень (<i>Rattus</i>)	Гепатопанкреас	
Общий белок, мг/г	225±9,82	203±4,30	205±7,50
ДНК, мг/г	3,12±0,42	2,44±0,08	2,73±0,29
РНК, мг/г	8,53±0,82	7,46±0,28	6,79±0,58
Гликоген, мг/г	42,5±3,10	27,0±0,36**	21,1±0,11***

Примечание: * – $P < 0,05$ при сравнении показателей *Planorbarius corneus* с *Lymnaea stagnalis*; ** – $P < 0,05$ при сравнении показателей *Homo sapiens* и *Rattus* с *Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus*

Только один показатель – активность гамма-глутамилтрансферазы оказалась существенно выше в гемолимфе прудовиков и роговых катушек в 4,66 и 4,62 раза, по сравнению с активностью этого фермента в плазме крови человека. Вероятно, это результат большего контакта мембран паренхиматозных клеток с гемолимфой, омывающей эти клетки при отсутствии сосудистых стенок.

Содержание белков, ДНК, РНК, гликогена в гепатопанкреасе легочных пресноводных моллюсков достаточно близко к уровню этих биополимеров в печени крысы. Результаты этих исследований позволили предположить, что ткани легочных пресноводных моллюсков могут служить исходным материалом для получения белков, в том числе ферментов, как это реализуется в промышленном масштабе при использовании тканей ряда морских гидробионтов.

5.1. Изучение системы протеолиз-антипротеолиз в тканях легочных пресноводных моллюсков при введении этионина.

Известны два основных типа протеолиза – АТФ-независимый и АТФ-зависимый. Первый активируется в условиях голодания и не требует затраты энергии, а второй функционирует постоянно и избирательно. В этих процессах участвуют разные протеолитические ферменты. При некоторых типах повреждения клеток нарушается окислительное фосфорилирование, снижается синтез АТФ, растет 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].

Как указано ранее, 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, а 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 гемоци-

анином, вдвое больше, чем количество кислорода, физически растворенного в гемолимфе. Содержание гемоцианина в расчете на медь составляет 1,63-3,02 г/л. В предварительных исследованиях нами установлено, в гемолимфе прудовиков и катушек, содержащихся в лабораторных условиях, выявлены достаточно близкие величины рН 7,370 (7,344-7,401) ед. и 7,362 (7,304-7,417) ед., соответственно. Величины рСО₂ у прудовиков и катушек характеризуются большим разбросом данных 39,2 (14,7-51,3) мм рт.ст. и 29,3 (25,5-34,0) мм рт. ст., соответственно. Значения рО₂ у прудовиков 53 (21-172) мм рт. ст. и 66 (16-158) мм рт.ст., соответственно. Для достоверной оценки способности гемоцианина и гемоглобина переносить газы в гемолимфе и поддерживать кислотно-основное равновесие требуются дополнительные исследования.

Следует отметить, что прудовик является облигатным промежуточным хозяином около 100 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. №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. Все вместе они образуют комплекс протеаз, расщепляющих белки до пептидов и аминокислот при различных значениях рН: для кислых протеаз – рН 3,0; для слабокислых протеаз – рН 4,8-5,3; для нейтральных протеаз – рН 7,0 и для щелочных протеаз – рН 8,0-9,0.

Целью этого этапа работы явилось изучение активности протеолиза и антипротеолиза в гемолимфе легочных пресноводных мол-

люсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода, после введения антиметаболита 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].

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, а 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] а содержание ДНК и РНК (мг/г ткани) определяли по методу, предложенному Blober и Potter, основанному на спектрофотометрическом определении ДНК при λ 270 и 290 нм и РНК при λ 270 [9].

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

При исследовании гемолимфы протеолитическая и антипротеолитическая активности были обнаружены во всем исследуемом диапазоне значений pH. Это значит, что комплекс протеаз гемолимфы легочных пресноводных моллюсков включает кислые (pH 3), слабокислые (pH 3,6-3,80), нейтральные (pH 6,1-7,2) и щелочные (pH 8-9) протеазы (таблица 6).

Наиболее высокие значения трипсиноподобной активности были выявлены при значениях рН инкубационной среды в диапазоне 3,6-9,0, а количества $\alpha 1$ -антипротеазного ингибитора при рН 3,6-3,8 и $\alpha 2$ -макроглобулина при рН 3,0.

Данные о зависимости количества ингибиторов протеолиза гепатопанкреаса от величины рН инкубационной среды представлены в таблица 7.

Таблица 6

Распределение протеолитической и антипротеолитической активности гемолимфы (%) в зависимости от рН инкубационной среды

Диапазон рН	Прудовики			Катушки		
	ТпА	АПИ	$\alpha 2$ -МГ	ТпА	АПИ	$\alpha 2$ -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

Таблица 7

Зависимость активности ингибиторов протеиназ в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков от рН буферного раствора (г/дм³)

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

Аналогичные результаты были получены при исследовании гепатопанкреаса обоих видов моллюсков: количества $\alpha 1$ -антипротеазного ингибитора оказалось наиболее высоким при рН 3,6-3,8 и $\alpha 2$ -макроглобулина при рН 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. 8).

Таблица 8

Влияние этионина на протеолитическую активность
гепатопанкреаса и гемолимфы легочных
пресноводных моллюсков

Срок наблюдения	Трипсиноподобные протеиназы (ТнА)	
	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/(см ³ ·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

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

Из анализа данных табл. 8 следует, что в гепатопанкреасе прудовиков активность трипсиноподобных протеиназ изменялась волнообразно с двумя пиками активности через 3 и 24 часа после введения этионина. В гепатопанкреасе катушек этионин вызывал повышение активности трипсиноподобных протеиназ в интервале 3–24 часа. Но значения активности трипсиноподобных протеиназ 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 катушек оказалась более устойчивой к действию этионина по сравнению с прудовиками.

Поскольку оценка трипсिनоподобной активности производилась при pH 8,0, вначале было проведено исследование количества ингибиторов протеолиза после введения этионина также при pH 8 (табл. 9).

Таблица 9

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

Срок наблюдения	Антипротеазный ингибитор (АПИ)		α 2-Макроглобулин (α 2-МГ)	
	Прудовики	Катушки	Прудовики	Катушки
Гепатопанкреас, мг/г				
Контроль	$1,04 \pm 0,37$	$0,31 \pm 0,08^2$	$0,44 \pm 0,21$	$6,61 \pm 0,63^2$
Через 3 часа	$1,19 \pm 0,03^1$	$1,61 \pm 0,01^{1,2}$	$2,41 \pm 0,15^1$	$2,24 \pm 0,30^1$
Через 12 часов	$7,58 \pm 1,04^1$	$6,44 \pm 0,99^1$	$7,60 \pm 0,79^1$	$7,83 \pm 0,52$
Через 24 часа	$5,54 \pm 0,61^1$	$4,51 \pm 0,09^1$	$5,96 \pm 0,68^1$	$5,86 \pm 0,66$
Через 48 часов	$0,68 \pm 0,21$	$2,32 \pm 0,08^1$	$5,48 \pm 0,31^1$	$5,77 \pm 0,04$
Гемолимфа, мг/см ³				
Контроль	$1,04 \pm 0,37$	$0,59 \pm 0,27$	$5,44 \pm 0,31$	$5,98 \pm 0,43$
Через 3 часа	$0,12 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,19$	$6,00 \pm 0,09$	$5,65 \pm 0,15$
Через 12 часов	$0,15 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,04^{1,2}$	$5,86 \pm 0,02$	$6,03 \pm 0,24$
Через 24 часа	$0,21 \pm 0,09^1$	$0,29 \pm 0,08$	$5,84 \pm 0,03$	$5,77 \pm 0,04$
Через 48 часов	$0,29 \pm 0,02^1$	$0,42 \pm 0,15^2$	$6,19 \pm 0,08$	$6,20 \pm 0,67$

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 было 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 $\alpha 2$ -макроглобулина в гепатопанкреасе катушек в 15 раз превышало уровень этого ингибитора протеолиза у прудовиков. После введения этионина количество $\alpha 2$ -макроглобулина в гепатопанкреасе прудовиков повышалось до уровня этого показателя в гепатопанкреасе катушек. У катушек уровень $\alpha 2$ -макроглобулина 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 pH 8,0. Данные о суммарной ингибиторной емкости (рис. 21) показали, что до введения этионина сумма АПИ и $\alpha 2$ -МГ в гепатопанкреасе у прудовиков была в 4, 7 раза ниже, чем у катушек.

После введения этионина показатель СИЕ изменялся одно-типно, что доказывает наличие общего эффекта повышения анти-протеолитической 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 вышеприведенными данными о более значительном снижении содержания АПИ в гемолимфе прудовиков по сравнению с катушками.

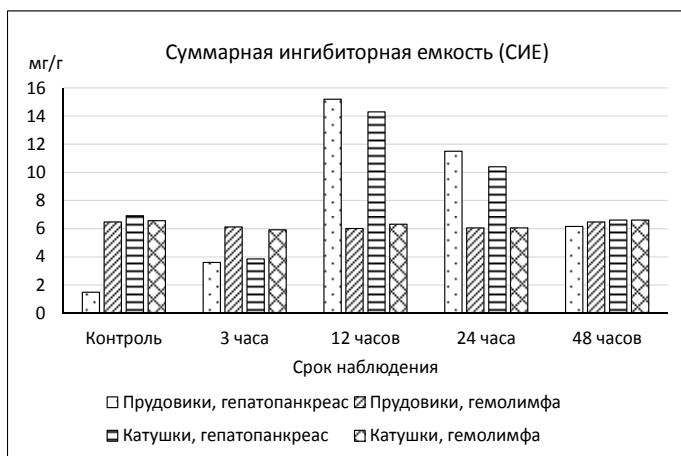


Рис. 21. Влияние этионина на суммарную ингибиторную емкость (СИЕ) гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков (pH 8,0)

В табл. 10 представлены данные о влиянии этионина на содержание ингибиторов протеиназ, определенных при оптимальных значениях pH.

В результате поведенных исследований установлено, что содержание АПИ и $\alpha 2$ -МГ в гепатопанкреасе у контрольных моллюсков находится на уровне, близком к максимальному их содержанию через 12 часов после введения этионина и определенному при pH 8,0. Пик содержания АПИ и $\alpha 2$ -МГ, определенных при оптимуме pH в гепатопанкреасе, сдвигается у прудовиков на 48 часов после введения этионина. В гепатопанкреасе катушек через 3 часа после введения этионина снижено количество АПИ и $\alpha 2$ -МГ, но в последующие сроки наблюдения эти показатели соответствуют контрольным значениям. В гемолимфе обоих видов моллюсков отмечено одинаковое по величине снижение концентрации АПИ и $\alpha 2$ -МГ во все сроки наблюдения.

Таблица 10

Влияние этионина на антипротеолитическую активность гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков пресноводных моллюсков (pH 3,8 при определении АПИ и pH 3,0 при определении $\alpha 2$ -МГ)

Сроки наблюдения	АПИ (pH 3,8)		$\alpha 2$ -МГ (pH 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/см ³				
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

Окончание таблицы 10

Через 24 часа	$4,11 \pm 0,18^1$	$4,50 \pm 0,96^1$	$5,22 \pm 0,58^1$	$3,86 \pm 0,55^1$
Через 48 часов	$7,17 \pm 0,87^1$	$7,61 \pm 0,76^1$	$7,08 \pm 0,83^1$	$9,99 \pm 0,87^1$

Данные о суммарной антипротеолитической активности гепатопанкреаса и гемолимфы моллюсков представлены на рисунке 22.

Анализ содержания ингибиторов при оптимальных значениях pH показал, что в контрольных образцах гепатопанкреаса показатель суммарной ингибиторной емкости 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, но 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.

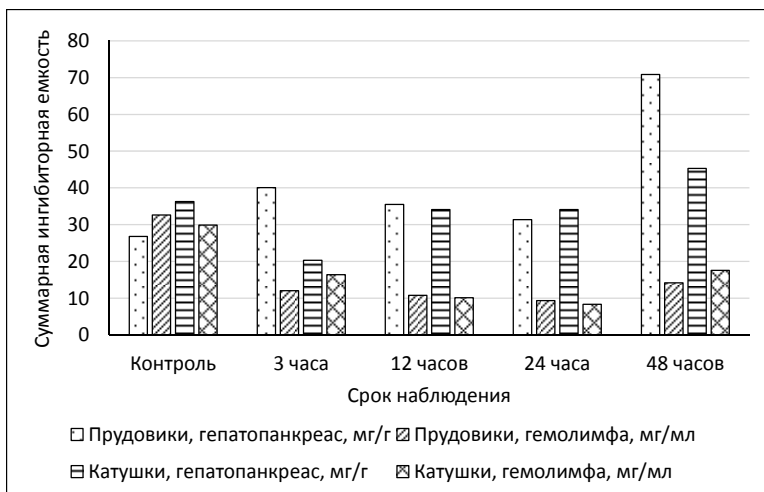


Рис. 22. Влияние этионина на суммарную ингибиторную емкость (СИЕ) гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков (определение при оптимуме pH)

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 были исследованы содержание белков в гепатопанкреасе и гемолимфе, а также количества нуклеиновых кислот в гепатопанкреасе контрольных и подопытных моллюсков. Установлено, что в гепатопанкреасе и гемолимфе катушек содержание общего белка достоверно ниже, чем у прудовиков (таблица 11). После введения этионина в гепатопанкреасе прудовиков было снижено содержание белков во всем периоде наблюдения, а в гемолимфе было 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.

Таблица 11
Влияние этионина на содержание общего белка в гепатопанкреасе и гемолимфе легочных пресноводных моллюсков

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

Кроме нарушений соотношений протеолиза и антипротеолиза причиной полученных изменений содержания общего белка гепатопанкреаса и гемолимфы могло явиться негативное влияние этионина на содержание нуклеиновых кислот в клетках. В табл. 12 приведены данные о содержании ДНК и РНК в гепатопанкреасе обоих видов моллюсков после введения этионина.

Таблица 12

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

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

Оказалось, что у обоих обследуемых видов моллюсков содержание ДНК уменьшается в гепатопанкреасе через 24 часа, а РНК – через 12 и 24 часа после введения этионина. Изучая динамику величин отношения РНК/ДНК (рисунок 23), установлено, что в контроле, а также через 3, 12, 24 и 48 часов для гепатопанкреаса прудовиков и катушек получены 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 рост 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 Met-тРНК (на 65-85%). Эти изменения совпадают с дезагрегацией полисом, а ингибирование инициации синтеза белка печени, индуцированного этионином, опосредуется фосфорилированием eIF-2 α . 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.

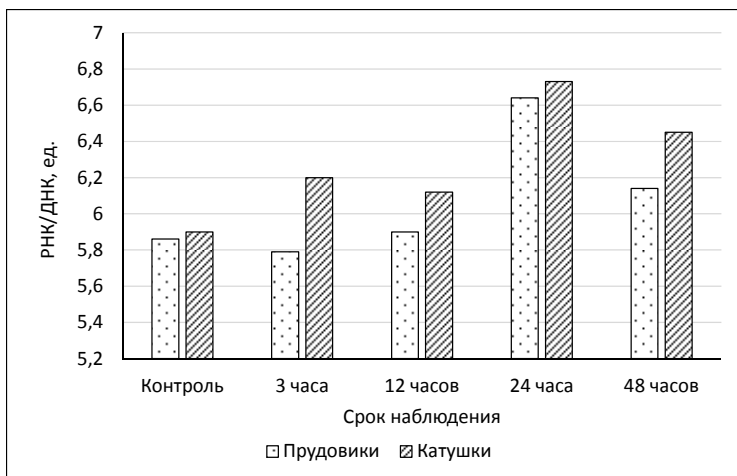


Рис. 23. Влияние этионина на величины отношения РНК/ДНК для клеток гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков

Итак, при исследовании гемолимфы протеолитическая и антипротеолитическая активности были обнаружены во всем исследуемом диапазоне значений pH. Наиболее высокие значения трипсиноподобной активности были выявлены при значениях pH инкубационной среды в диапазоне 3,6-9,0, а количества α 1-антипротеазного ингибитора при pH 3,6-3,8 и α 2-макроглобулина при pH 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 (*Planorbarius corneus* L), отличающиеся по типу транспорта кислорода, могут использоваться как модельные организмы не только в токсикологии, но и в программах биомедицинских исследований.

5.2. Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у легочных пресноводных моллюсков.

Метаболический синдром и сахарный диабет постепенно выходят на первый план как основные причины заболеваемости смертности населения. В патогенезе этих состояний видное место занимают нарушения биосинтеза инсулина и инсулинорезистентность тканей. Для моделирования этих процессов чаще всего применяют экзогенные вещества, нарушающие функционирование инсулинпродуцирующих клеток или состояние инсулиновых рецепторов плазматических мембран клеток-мишеней. Считают, что наиболее адекватной моделью является введение животным стрептозоточина — препарата, получаемого из бактерий *Streptomyces achromogenes*. После однократного введения стрептозоточина наблюдают две фазы гипергликемии: первая в интервале 1–4 ч. связана с уменьшением концентрации инсулина в плазме, а вторая (финальная, устойчивая) развивается через 24–36 ч. и характеризуется лабораторными признаками, характерными для диабета. Основной причиной повреждения инсулиноцитов стрептозоточином является алкилирование биологических макромолекул, включая ДНК. Этот процесс сопряжен с нарушением энергетического обмена, уменьшением тканевых резервов НАД⁺ и АТФ, дисфункцией

митохондриальных ферментов и митохондриального генома. Другой причиной цитотоксического действия стрептозотоцина может быть избыточное образование оксида азота за счет повышенной экспрессии NO-синтазы. Следствием этого является повреждение инсулиноцитов за счет развития окислительного стресса с участием свободных нитрозных радикалов-пероксинитритов, а также супероксидного анион-радикала, гидроксильного радикала и продукта катаболизма адениловых нуклеотидов – мочевой кислоты. Гибель инсулиноцитов после введения стрептозотоцина происходит за счет сочетания некротических изменений с активацией апоптоза [4–6].

При всех преимуществах моделирования сахарного диабета у млекопитающих имеется существенный недостаток, связанный с наличием системы замкнутого кровообращения, вследствие чего вводимые гидрофильные молекулы стрептозотоцина должны преодолевать гемато-клеточные барьеры и зависеть от нейрогуморальных механизмов регуляции кровообращения. В идеальном варианте модельная система должна включать клетки-продуценты инсулина, клетки-мишени для инсулина и биологическую жидкость, связывающую оба типа клеток. В эту трехкомпонентную систему следует вводить стрептозотин и в ней определять инсулин-зависимые метаболиты. Такая модель была создана путем введения моллюскам прудовика и катушки стрептозотоцина. Это привело через 24 ч к повышению уровня гексоз в гемолимфе и развитию диабетоподобного состояния. Через 3 суток уровень гексоз в гемолимфе снижался [3; 9].

Целью работы явилось исследование действия экзогенных веществ, способных повышать или снижать содержание глюкозы в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков. В качестве вещества, повышающего уровень глюкозы гемолимфы избран стрептозотин, а снижающего уровень глюкозы – экстракт куколок дубового шелкопряда (ЭКДШ). Ранее было показано, что препарат ЭКДШ препятствовал развитию инсулинорезистентности в эксперименте за счет антиоксидантного эффекта [1; 7].

Эксперименты поставлены на 144 особях легочных пресноводных моллюсков – прудовиках (*Lymnaea stagnalis*) и катушках (*Planorbarius corneus*), разделенных на 18 групп по 8 моллюсков в каждой. У моллюсков незамкнутая кровеносная система, поэтому

гемолимфа омывает клетки тканей. Транспорт кислорода у прудовиков осуществляет медьсодержащий пигмент гемоцианин, а у катушек железосодержащий гемоглобин. Считают, что организмы с гемоцианином более чувствительны к избытку углекислого газа [8]. Стрептозотоцин готовили на 1М цитратном буфере и вводили в ногу животного с помощью инсулинового шприца в количестве 65 мкг/г тела животного; ЭКДШ вводили аналогично в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела. Контрольная группа моллюсков не подвергались никаким воздействиям, а моллюскам групп соответствующего контроля вводили вместо стрептозотоцина буферный раствор. Для исследования использовали гемолимфу, которую отбирали при раздражении ноги иглой и гомогенат ткани гепатопанкреаса моллюсков, приготовленный на холоду в 0,025М трис-HCl буфере (pH 7,4). Количество глюкозы оценивали в гемолимфе глюкозооксидазным методом с помощью наборов фирмы «Диакон Диасис» в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию гликогена гепатопанкреаса определяли по методу [10], малонового диальдегида (ТБК-реактивных субстанций, ТБКРС) по методу [11] и концентрацию восстановленного глутатиона – по методу [12]. Активность каталазы в гомогенате гепатопанкреаса определяли по М.А. Королуку [2]. Весь цифровой материал вводился для хранения и обработки в таблицы Microsoft Excel и Statistica. Для проверки нормальности распределения данных использовался критерий Колмогорова-Смирнова. После проверки на правильность распределения цифровой материал обрабатывался методами параметрической статистики с использованием критерия t Стьюдента.

В таблице 13 представлены данные о влиянии стрептозотоцина и ЭКДШ на содержание глюкозы в гемолимфе улиток.

Таблица 13

Влияние стрептозотоцина и экстракта куколок
дубового шелкопряда на содержание глюкозы (ммоль/дм³)
в гемолимфе моллюсков

Показатель	Глюкоза, прудовики	Глюкоза, катушки
Контроль	0,34±0,033	0,26±0,042
Буфер 1-е сут.	0,37±0,071	0,22±0,041
Стрептозотоцин 1-е сут.	0,69±0,049 ^{1,2}	0,42±0,039 ^{1,2}

Окончание таблицы 13

ЭКДШ 1-е сут.	0,33±0,036 ³	0,33±0,040
ЭКДШ + стрептозотонин 1-е сут.	0,30±0,037 ³	0,21±0,062 ³
Буфер 2-е сут.	0,32±0,031	0,26±0,095
Стрептозотонин 2-е сут.	0,50±0,049 ^{1,2}	0,29±0,035
ЭКДШ 2-е сут.	0,19±0,020 ^{1,3}	0,14±0,031 ³
ЭКДШ + стрептозотонин 2-е сут.	0,21±0,019 ^{1,3}	0,19±0,066

Примечание: ¹ - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, ² - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем, ³ - $p < 0,05$ по сравнению с группой «стрептозотонин»

Из приведенных данных следует, что в гемолимфе прудовиков и катушек до эксперимента, а также после введения буферного раствора содержалось одинаковое количество глюкозы. Через 24 ч. после введения стрептозотонина найдено повышение содержания глюкозы в гемолимфе моллюсков, причем у прудовиков это повышение было выражено сильнее, чем у катушек ($P < 0,01$). Спустя 48 ч. у прудовиков сохранялось повышенное содержание глюкозы в гемолимфе, а у катушек – нормализовалось. Следовательно, у прудовиков стрептозотонин вызывал более выраженное «гипергликемическое» действие по сравнению с катушками. Через 24 ч. препарат ЭКДШ препятствовал повышению уровня глюкозы, вызванному стрептозотонином, а через двое суток обеспечивал снижение содержания глюкозы в гемолимфе прудовиков. У катушек изменения носили аналогичный характер, но были менее выражены. Таким образом, прудовики с гемоцианином оказались более чувствительными к действию стрептозотонина по сравнению с катушками, обладающими другим переносчиком кислорода (гемоглобин).

В связи с этими результатами представляло интерес исследование содержания гликогена в гепатопанкреасе улиток (таблица 14). Оказалось, что содержание гликогена в гепатопанкреасе у интактных улиток, а также после введения буферного раствора было одинаковым. Введение стрептозотонина через 24 ч и 48 ч вызвало уменьшение содержания гликогена в гепатопанкреасе прудовиков и катушек в 3–4 раза. Эти изменения оказались синхронными с повышением содержания глюкозы в гемолимфе. Можно полагать, что

этот эффект подтверждает тот факт, что стрептозотоцин блокирует гликогеногенез, управляемый в нормальных условиях инсулином.

Таблица 14

Влияние стрептозотоцина и экстракта куколок дубового шелкопряда на содержание гликогена (мг/г) в гепатопанкреасе моллюсков

Показатель	Гликоген, прудовики	Гликоген, катушки
Контроль	20,1±3,76	18,5±4,50
Буфер 1-е сут.	17,1±1,72	21,4±2,08
Стрептозотоцин 1-е сут.	6,9±0,88 ^{1,2}	4,50±0,39 ^{1,2}
ЭКДШ 1-е сут.	17,0±0,56 ³	16,9±4,48 ³
ЭКДШ + стрептозотоцин 1-е сут.	16,7±0,64 ³	22,2±4,21 ³
Буфер 2-е сут.	17,3±1,22	19,2±0,53
Стрептозотоцин 2-е сут	5,2±0,21 ^{1,2}	5,30±0,29 ^{1,2}
ЭКДШ 2-е сут.	19,6±0,28 ³	27,1±4,36 ³
ЭКДШ + стрептозотоцин 2-е сут.	20,7±0,35 ³	30,6±5,38 ³

Примечание: см. табл. 13.

Препарат ЭКДШ у обоих видов улиток сохранял содержание гликогена в гепатопанкреасе на протяжении двух суток после введения стрептозотоцина. В предшествующих экспериментах на крысах был выявлен положительный эффект экстракта куколок дубового шелкопряда на показатели метаболизма при развитии инсулинорезистентности, вызванной высокожировой диетой: уменьшилась гипергликемия, концентрация инсулина, кортикостерона в сыворотке крови, индекс Нота, увеличилось содержание гликогена в печени, нормализовалась активность фосфорилазы гликогена, фосфоглюкомутазы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы, рибозо-5-фосфатметаболизирующих ферментов, транскетолазы, обнаружена тенденция к нормализации активности фосфофруктокиназы, альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата, гексокиназы и глюкокиназы. Наиболее выраженный эффект отмечался при использовании экстракта в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела [1]. По всей видимости эти положительные эффекты ЭКДШ проявились и в экспериментах по применению стрептозотоцина у легочных пресноводных улиток.

В то же время ранее было показано, что гемолимфа куколок дубового шелкопряда формируется в процессе запрограммированной гибели клеток и в периоде диапаузы накапливает антиоксидантный потенциал за счет разрушения макромолекул (увеличение количества мочевой кислоты, свободных аминокислот). Эндогенная антиоксидантная система гемолимфы содержит витамины С, А, Е, мочевую кислоту, аминокислоты, глутатион, биофлавоноиды, которые распределены в составе трех групп веществ (макромолекулы, пептиды-аминокислоты и низкомолекулярные биорегуляторы). Антиоксидантная активность гемолимфы при действии адгезии, хемотаксического фактора fMet-Leu-Phe и латекса на нейтрофильные лейкоциты проявляется в разведениях $1:10^4$ – $1:10^5$. Гемолимфа и ее фракции не оказывают цитотоксического действия на нормальные фибробласты кожи и их рост усиливается лизин- и аргининсодержащими фракциями [7]. Поэтому были проведены исследования, которые позволили ориентировочно оценить роль окислительного стресса в формировании гипергликемических эффектов стрептозотоцина в экспериментах на легочных пресноводных улитках (таблица 15).

Таблица 15

Влияние стрептозотоцина и экстракта куколок дубового шелкопряда на содержание ТБКРС (мкмоль/г), активность каталазы (мкмоль/г/мин) и восстановленного глутатиона (мкмоль/г) в гепатопанкреасе моллюсков

Показатель	ТБКРС	Каталаза	SH-глутатион
Прудовики			
Контроль	12,1±1,15	13,6±1,72	0,048±0,003
Буфер 1-е сут.	10,1±3,13	14,6±2,73	0,058±0,005
Стрептозотоцин 1-е сут.	31,3±1,73 ^{1,2}	32,1±1,59 ^{1,2}	0,066±0,002 ¹
ЭКДШ 1-е сут.	11,8±0,89 ³	13,2±1,23 ³	0,045±0,004 ³
ЭКДШ + стрептозотоцин 1-е сут.	12,3±0,67 ³	13,9±1,54 ³	0,042±0,003 ³
Буфер 2-е сут.	12,9±2,64	15,0±1,24	0,046±0,006
Стрептозотоцин 2-е сут.	38,4±3,31 ^{1,2}	30,3±3,82 ^{1,2}	0,049±0,004
ЭКДШ 2-е сут.	14,5±0,66 ³	15,8±3,46 ³	0,050±0,005
ЭКДШ + стрептозотоцин 2-е сут.	13,5±0,61 ³	14,7±2,01 ³	0,048±0,007

Примечание: см. табл. 12.

Показатель	ТБКРС	Каталаза	SH-глутатион
Катушки			
Контроль	11,2±0,91	17,6±1,65	0,069±0,003
Буфер 1-е сут.	9,9±0,56	18,1±1,13	0,070±0,003
Стрептозотоцин 1-е сут.	19,2±0,81 ^{1,2}	25,0±1,85 ^{1,2}	0,052±0,003 ¹
ЭКДШ 1-е сут.	9,4±0,77 ³	19,5±2,66 ³	0,068±0,005
ЭКДШ + стрепто- зотоцин 1-е сут.	11,1±1,49 ³	16,4±3,32 ³	0,060±0,002
Буфер 2-е сут.	11,4±2,75	17,3±2,09	0,064±0,005
Стрептозотоцин 2-е сут.	47,5±2,62 ^{1,2}	26,2±1,22 ^{1,2}	0,041±0,002 ^{1,2}
ЭКДШ 2-е сут.	10,0±1,99 ³	15,6±1,72 ³	0,068±0,005 ³
ЭКДШ + стрепто- зотоцин 2-е сут.	21,6±1,71 ^{1,2,3}	15,1±3,56 ³	0,056±0,002 ^{1,3}

Установлено, что стрептозотоцин увеличивал примерно вдвое содержание в гепатопанкреасе ТБКРС (ориентировочно малонового диальдегида – важного показателя свободнорадикальных процессов) и активность антиоксидантного фермента каталазы. Препарат ЭКДШ препятствовал таким изменениям, вероятно, за счет компонентов антиоксидантной системы экстракта. Вклад восстановленного глутатиона в ингибирование окислительного стресса не так очевиден. Можно лишь отметить положительные изменения в содержании восстановленного глутатиона через 24 часа после введения стрептозотоцина у прудовиков и через 48 часов – у катушек. Однако следует отметить, что стрептозотоцин у прудовиков вызывал повышение содержания восстановленного глутатиона через 24 ч., а у катушек – снижение содержания восстановленного глутатиона уже через 48 часов. Возможно, это связано с различными механизмами транспорта кислорода у этих двух видов улиток.

Проведенные исследования показали, что стрептозотоциновая модель сахарного диабета 1 типа у легочных пресноводных улиток является доступной и дешевой. В относительно простой системе незамкнутого кровообращения достигается прямой эффект взаимодействия компонентов гемолимфы с клетками тканей. Используя

эту модель, удалось испытать антидиабетогенное действие экстракта куколок дубового шелкопряда по двум направлениям: 1) защита обмена углеводов; 2) антиоксидантное действие.

5.3. Действие ионизирующего излучения на ферментативную активность тканей легочных пресноводных моллюсков.

Известны два основных типа протеолиза – АТФ-независимый и АТФ-зависимый. Новый подход для решения проблемы энергозависимости протеолиза 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 году. Разработаны детальные требования к проведению строго контролируемых в Европейском союзе исследований в течение всей или части жизни моллюска (Series on Testing and Assessment. № 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, а 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.

Целью работы явилось изучение активности протеолиза и антипротеолиза в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода, после воздействия гамма-излучением в дозах 1,0 и 10,0 Гр.

В настоящее время известно, что разные ткани организма моллюсков имеют некоторые отличия по радиочувствительности, в частности, показана достаточно высокая устойчивость системы

размножения моллюсков к действию ионизирующего излучения [4; 5]. Метаболические изменения в системе протеолиз-антипротеолиз при облучении легочных пресноводных моллюсков изучены недостаточно.

Моллюски были отловлены летом 2016 года в водохранилище Дрозды. Это водохранилище входит в состав Вилейско-Минской водной системы и характеризуется стабильной экологической ситуацией [6]. Период адаптации к лабораторным условиям составил 5 суток. Моллюски были облучены в Объединенном институте энергетических и ядерных исследований «Сосны» НАНБ с лучевой нагрузкой в поглощенных дозах 1 Гр и 10 Гр (далее – в дозах 1 Гр и 10 Гр). Материалом для исследования были гемолимфа и гепатопанкреас, забранные через 72 часа после облучения у 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) фирмы Fluka. Определение активности трипсиноподобных протеиназ (ТпА) проводили по методу D.F. Erlanger, а 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 [7,8]. Активность ТпА выражали в мкмоль/(г \times с), содержание АПИ и α 2-МГ – в г/л. Подсчитывали индекс «Суммарная ингибиторная емкость (СИЕ)», представляющий сумму АПИ и α 2-МГ. Определение активности аспаратаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), α -амилазы, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глутатионпероксидазы (ГП) проводили с помощью стандартных биохимических реакций с использованием наборов реагентов НТПК «Анализ X». В гемолимфе активности АсАТ, АлАТ, ЛДГ, α -амилазы выражали в Е/л, а ГП в мкмоль/мин/мл; в гепатопанкреасе активности АсАТ, АлАТ, ЛДГ, α -амилазы выражали в мкмоль/мин/г. Полученный цифровой материал подвергался статистической обработке методами параметрической статистики. В таблице 16 представлены полученные данные о влиянии гамма-облучения в дозах 1 Гр и 10 Гр на активность некоторых ферментов в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков, отличающихся по механизмам транспорта кислорода.

Таблица 16

Действие гамма-излучения на активность некоторых ферментов в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков

Показатель	Контроль	Облучение, 1 Гр	Облучение, 10 Гр
<i>Lymnaea stagnalis</i>			
АсАТ	39,5±7,09	53,5±7,92	60,9±6,19 ¹
АлАТ	19,5±7,58	25,0±2,09	40,5±6,34 ¹
ГП	1,90±0,37	0,77±0,11 ¹	0,75±0,10 ¹
ТпА	13,5±2,14	13,8±1,47	14,2±0,91
АПИ	8,10±0,20	6,29±0,39 ¹	5,03±0,18 ¹
альфа2-МГ	7,20±1,01	5,13±0,94	4,89±0,61
<i>Planorbarius corneus</i>			
АсАТ	30,6±5,73	24,2±0,46	29,1±4,95 ²
АлАТ	28,7±6,88	22,6±0,52 ²	24,3±5,81
ГП	0,63±0,10	1,22±0,18 ¹	0,82±0,10
ТпА	10,3±0,11	13,3±0,07 ¹	20,4±0,11 ^{1,2}
АПИ	5,98±0,02 ²	5,86±0,03 ¹	5,77±0,01 ^{1,2}
альфа2-МГ	6,89±0,05	6,57±0,09 ¹	5,95±0,09 ¹

Примечание: ¹ – $P < 0,05$ при сравнении с контролем; ² – $P < 0,05$ при сравнении двух видов моллюсков

Из анализа данных таблицы 16 следует, что гамма-облучение в дозе 10 Гр привело к повышению активности аминотрансфераз в гемолимфе прудовиков, что может быть связано с нарушением проницаемости мембран клеток гепатопанкреаса и мышц. У катушек активность аминотрансфераз не изменялась после гамма-облучения. Активность глутатионпероксидазы у прудовиков оказалась сниженной на 59% после гамма-облучения в дозе 1 Гр и сохранялась на этом уровне после гамма-облучения в дозе 10 Гр; у катушек активность этого фермента повышалась после гамма-облучения в дозе 1 Гр в 1,94 раза, но после гамма-облучения в дозе 10 Гр активность глутатионпероксидазы сохранялась на исходном уровне. Гамма-облучение у прудовиков в обеих дозах не оказало влияния на активность трипсиноподобных протеиназ в гемолимфе. Однако в гемолимфе катушек было выявлено повышение активности ТпА после гамма-облучения в дозе 1,0 Гр в 1,3 раза, а в дозе 10,0 Гр –

почти в два раза. В гемолимфе контрольной группы прудовиков содержание $\alpha 1$ -антипротеазного ингибитора выше, чем в контрольной группе катушек. В гемолимфе прудовиков гамма-излучение привело к дозозависимому снижению количества АПИ. Аналогичный эффект получен и при исследовании гемолимфы облученных катушек. Выявленное уменьшение количества АПИ в гемолимфе катушек незначительно по абсолютной величине, хотя и статистически достоверно из-за весьма малого разброса данных. Небольшое, но статистически достоверное уменьшение $\alpha 2$ -макроглобулина после гамма-облучения выявлено в гемолимфе катушек. В гемолимфе прудовиков после гамма-облучения почти в полтора раза уменьшилось содержание $\alpha 2$ -МГ, но из-за большого разброса данных этот эффект не является статистически достоверным.

Таким образом, у катушек контрольной группы в гемолимфе только количество $\alpha 1$ -антипротеазного ингибитора ниже, чем у аналогичной группы прудовиков. Однако после гамма-облучения были выявлены существенные различия в реактивности ферментативных систем сравниваемых видов моллюсков. У прудовиков гамма-облучение привело к повышению проницаемости клеточных мембран (повышение активности АсАТ и АлАТ в гемолимфе), нарушению ферментативной антиоксидантной системы (снижение активности глутатионпероксидазы в гемолимфе) и уменьшению антипротеолитической активности (снижение количества $\alpha 1$ -антипротеазного ингибитора в гемолимфе). У катушек выявлено дозозависимое повышение активности трипсиноподобных протеаз на фоне относительно небольшого, но статистически значимого снижения содержания компонентов антипротеолитической активности в гемолимфе.

В таблице 17 представлены полученные данные о влиянии гамма-облучения в дозах 1 Гр и 10 Гр на активность некоторых ферментов в гепатопанкреасе двух видов легочных пресноводных моллюсков.

Таблица 17

Действие гамма-излучения на активность некоторых ферментов
в гепатопанкреасе легочных пресноводных моллюсков

Показатель	Контроль	Облучение, 1 Гр	Облучение, 10 Гр
<i>Lymnaea stagnalis</i>			
АсАТ	5,78±0,43	3,20±0,75 ¹	3,86±0,69 ¹
АлАТ	2,87±0,51	1,20±0,25 ¹	0,76±0,14 ¹
ЛДГ	0,85±0,26	0,73±0,21	0,73±0,21
Амилаза	3,94±0,36	6,19±0,38 ^{1,2}	4,96±0,32 ^{1,2}
ТпА	26,4±1,99	56,3±2,38 ^{1,2}	63,2±2,52 ^{1,2}
АПИ	6,69±0,19	6,44±0,14	5,28±0,99
альфа2-МГ	10,5±0,28	9,63±0,45	8,21±0,12 ¹
<i>Planorbarius corneus</i>			
АсАТ	2,92±0,25 ²	2,69±0,36	3,71±0,12 ¹
АлАТ	1,69±0,27	2,10±0,37	4,52±1,09 ^{1,2}
ЛДГ	3,23±0,36 ²	4,12±0,06 ^{1,2}	4,31±0,02 ^{1,2}
Амилаза	1,60±0,18 ²	2,08±0,09 ^{1,2}	1,21±0,14 ²
ТпА	80,6±1,48 ²	125±4,61 ^{1,2}	97,4±2,78 ^{1,2}
АПИ	5,90±0,22 ²	5,81±0,04 ²	5,92±0,05
альфа2-МГ	5,96±0,13 ²	6,01±0,10 ²	6,10±0,04 ²

Примечание: ¹ – $P < 0,05$ при сравнении с контролем; ² – $P < 0,05$ при сравнении двух видов моллюсков.

В отличие от гемолимфы, ферментативные показатели гепатопанкреаса существенно отличались в контрольных группах изучаемых моллюсков: по сравнению с прудовиками у катушек были меньше величины активности АсАТ в два раза, АлАТ в 1,7 раза, амилазы в 2,5 раза, α 2-МГ в 1,76 раза и выше уровни активности ЛДГ в 3,8 раза, ТпА в 3,05 раза. В гепатопанкреасе прудовиков ионизирующее излучение вызвало в дозах 1 Гр и 10 Гр уменьшение активности АсАТ в 1,88 и 1,5 раза, а также снижение активности АлАТ в 2,39 и 3,8 раза, соответственно. Гамма-облучение в тех же дозах привело к повышению активности амилазы в 1,57 и 1,26 раза и увеличению активности трипсиноподобных протеиназ в 2,13 и 2,39 раза, соответственно. В гепатопанкреасе катушек гамма-облучение в дозе 10 Гр привело к повышению активности АсАТ в

1,27 раза и АлАТ – в 2,67 раза. После гамма-облучения в дозе 1,0 Гр у катушек повысилась активность ЛДГ в 1,28 раза и ТпА в 1,6 раза, однако после облучения в дозе 10,0 Гр активность ЛДГ увеличилась в 1,33 раза, а - ТпА оказалась повышенной только в 1,21 раза. Активность амилазы умеренно повысилась в 1,3 раза только после облучения в дозе 1 Гр. Гамма-облучение не оказало влияние на содержание АПИ в ткани гепатопанкреаса обоих видов моллюсков. Гамма-облучение в дозе 10,0 Гр вызвало уменьшение содержания α 2-МГ в гепатопанкреасе только прудовиков.

Для оценки реактивности ферментов гепатопанкреаса на действие ионизирующего излучения были проанализированы коэффициенты: АсАТ/АлАТ – соотношение степени повреждения гепатоцитов и миоцитов, ТпА/ЛДГ – зависимость протеолиза от анаэробного гликолиза и ТпА/Амилаза – соотношение активностей распада белков и гомополисахаридов, а также величины суммарной ингибиторной емкости (таблица 18).

Приведенные в таблице 18 данные показывают, что при увеличении поглощенной дозы гамма-излучения с большей вероятностью протекают следующие процессы: 1) более интенсивно происходит повреждение миоцитов у прудовиков и гепатоцитов – у катушек; 2) у прудовиков нарастает интенсивность протеолиза при относительной стабильности гликолиза, а у катушек синхронно повышается интенсивность протеолиза и анаэробного гликолиза; 3) у прудовиков распад белков в большей степени преобладает над распадом гомополисахаридов по сравнению с катушками.

Таблица 18

Действие гамма-излучения на соотношения активностей некоторых ферментов и величины суммарной ингибиторной емкости в гепатопанкреасе легочных пресноводных моллюсков

Показатель	Контроль	Облучение, 1 Гр	Облучение, 10 Гр
<i>Lymnaea stagnalis</i>			
АсАТ/АлАТ	2,01	2,07	5,08
ТпА/ЛДГ	30,7	77,1	86,6
ТпА/амилаза	6,70	9,09	12,7
СИЕ	15,3	11,4	9,83
<i>Planorbarius corneus</i>			
АсАТ/АлАТ	1,73	1,28	0,82

Окончание таблицы 18

ТпА/ЛДГ	24,9	30,4	22,5
ТпА/амилаза	50,3	60,3	80,5
СИЕ	12,9	12,4	11,7

Полученные результаты также позволяют обозначить несколько важных особенностей системы протеолиз-антипротеолиз в тканях легочных пресноводных моллюсков. Во-первых, в гепатопанкреасе контрольных катушек существенно выше активность трипсиноподобных протеиназ по сравнению с прудовиками, но в гемолимфе активность этих ферментов одинаковая у обоих видов. Во-вторых, суммарная ингибиторная емкость в гепатопанкреасе контрольных прудовиков существенно выше, чем у катушек, а в гемолимфе обоих видов величины этого показателя существенно не различаются. Поэтому можно считать, что в гепатопанкреасе моллюсков с гемоцианиновым типом транспорта кислорода преобладает антипротеолиз, а с гемоглобиновым – протеолиз. В-третьих, активация протеолиза в гепатопанкреасе, индуцированная внешним гамма-облучением, оказалась более выраженной у прудовиков по сравнению с катушками.

В результате проведенных исследований установлены однотипные и отличающиеся эффекты ионизирующего излучения на ферментативные показатели тканей легочных пресноводных моллюсков с разными типами транспорта кислорода. В гемолимфе обоих видов моллюсков гамма-излучение вызывало снижение содержания $\alpha 1$ -антипротеазного ингибитора (в большей степени у прудовиков). Характер изменений остальных ферментативных показателей был различным, причем наиболее значимым явилось снижение активности глутатионпероксидазы у прудовиков и повышение активности трипсиноподобных протеиназ у катушек. В гепатопанкреасе сравниваемых видов моллюсков ионизирующее излучение вызывало повышение активности трипсиноподобных протеиназ. К наиболее важным отличиям в реактивности ферментативных систем гепатопанкреаса на действие гамма-излучения явились снижение активности аминотрансфераз на фоне повышения активности амилазы у прудовиков и повышение активности лактатдегидрогеназы у катушек. На основании анализа изученных ферментативных показателей можно сделать предположение, что катушки

являются более резистентными организмами по сравнению с прудовиками к действию ионизирующего излучения. Такое заключение соответствует ранее высказанному предположению о возникновении гемоцианинового типа переноса кислорода как приспособительного механизма моллюсков к условиям жизни при сниженной биодоступности кислорода [9].

Список использованной литературы к главе 5

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. Сравнительная характеристика белкового спектра гемолимфы некоторых видов группы *Lymnaea Lamarck* (*Gastropoda*) // Вестн. зоол. – 1974. – №5. – С. 33–37.
4. Стадниченко А.П. Влияние трематодной инвазии на содержание гемоцианина в гемолимфе прудовика (*Gastropoda* : *Pulmonata* : *Lymnaeidae*) // Паразитология. – 1999. – Т. 33. №2. – С. 125–128.
5. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Толкачева Т.А. и др. Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у легочных пресноводных моллюсков // Новости медико-биологических наук. – 2016. – Т. 14. №3. – С. 28–32.
6. Erlanger D.F., Kokowsky N. Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // 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. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. №1. – P. 265–275.
9. Blobel G., Potter V.R. Distribution of radioactivity between the acid-soluble pool and pools of RNA in the nuclear, nonsedimentable and ribosome fractions of rat liver after a single injection of labeled orotic acid // Biochem. Biophys. Acta. – 1968. – Vol. 166. – P. 48–54.

10. The influence of ethionine on the phosphorylation state of adenine nucleotides in isolated hepatocytes. / A. Lavoinnie, J. Marchand, M. Pinosa, F. Matray // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1990. – Vol. 1049. – №2. – P. 158–170.

11. Ohshita T. Suppression of autophagy by ethionine administration in male rat liver in vivo // *Toxicology.* – 2000. – Vol. 147. №1. – P. 51–57.

12. Pegg A.E. Studies of the ethylation of rat liver transfer ribonucleic acid after administration of L-ethionine // *Biochem. J.* – 1972. – Vol. 128. №1. – P. 59–68.

13. Tani H., Ogata K. Decrease of the hepatic ATP content and gluconeogenesis in ethionine-treated rats // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1970. – Vol. 215. №2. – P. 264–272.

14. Tani H., Ogata K., Itatsu T. Effect of ethionine on carbohydrate and lipid metabolism // *J. Lipid Res.* – 1973. – Vol. 14. – №1. – P. 32–40.

15. Villa-Trevino S., Shull K.H., Farber E. The role of adenosine triphosphate deficiency in ethionine-induced inhibition of protein synthesis // *J. Biol. Chem.* – 1963. – Vol. 238. – P. 1757–1763.

16. Yoshizawa F., Watanabe E., Sugahara K., Natori Y. Translational initiation regulators are hypophosphorylated in rat liver during ethionine-mediated ATP depletion // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 298. № 2. – 235–239.

17. Балаева-Тихомирова О.М. Гормонально-метаболические взаимосвязи при развитии синдрома инсулинорезистентности. – Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2013 – 176 с.

18. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // *Лаб. дело.* – 1988. – №1. – С. 16–19.

19. Кузнецова Л.А. Стрептозотоциновая модель сахарного диабета у моллюска *Anodonta cygnea* / Л.А. Кузнецова [и др.] // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* – 2007. – Т. 43. №6. – С. 460–467.

20. Можейко Л.А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета / Л.А. Можейко // *Журнал ГрГМУ.* – 2013. – №4. – С. 5–10.

21. Можейко Л.А. Механизмы воздействия аллоксана и стрептозотоцина на В-клетки поджелудочной железы при моделировании сахарного диабета у экспериментальных животных / Л.А. Можейко // *Новости медико-биологических наук.* – 2014. – Т. 10. №3. – С. 128–133.

22. Пальчикова, Н.А. Гормонально-биохимические особенности аллоксановой и стрептозотоциновой моделей экспериментального диабета / Н.А. Пальчикова и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2013. – Т. 33. №6. – С. 18–24.

23. Толкачева Т.А. Гистолиз: теория и практика: монография / Т.А. Толкачева. – Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2015. – 136 с.

24. Шпаков А.О. Динамика изменений функционального состояния гормончувствительной аденилатциклазной системы в тканях брюхоногих моллюсков в стрептозотоциновой модели диабета / А.О. Шпаков [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 146. № 10. – С. 404–408.

25. Krisman C.R. A method for the colometric estimation of glyco- gen with iodine // Anal. Biochem. – 1962. – Vol. 4. – P. 17–23.

26. Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara // Analit. Biochem. – 1978. – Vol. 86. – P. 271–278.

27. Yilmaz, O. Metod reduced (GSH) and oxidized (GSSH) glutathione concentration in animal tissue / O.Yilmaz [et al.] // J. Animal Vet. Adv. – 2009. – Vol. 8. – P. 343–347.

28. Голубев А.П. Динамика радиоактивного загрязнения экосистем разнотипных водоемов белорусского сектора зоны отчуждения Чернобыльской АЭС / А.П. Голубев // Радиационная биология. Радиоэкология (Россия). – 2007. – Т. 47. №3. – С. 322–332.

29. Голубев А.П. Динамика процессов радиоадаптации в популяциях моллюсков из водоемов белорусского сектора зоны загрязнения Чернобыльской АЭС / А.П. Голубев // Экологический вестник. – 2012. – №2 (20). – С. 44 – 57.

30. Зарубов А.И., Войтко С.Г. // Вестник БГУ. – 2007. – Серия 2. – С. 131–135.

31. Erlanger D.F., Kokowsky N. Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biomed. Biophys. – 1961. – Vol. 95. №2. – P. 271–278.

32. Чиркин А.А., Долматова В.В. Посттрансляционная модификация белков / А.А.Чиркин, В.В. Долматова // Биохимия и молекулярная биология. Сб. научных статей. Вып. 1. – Минск: Беларуская навука, 2017. – С. 48–59.

Заключение

При биоинформатическом исследовании 75 протеолитических ферментов установлено, что наиболее консервативными по кодирующим нуклеотидным последовательностям являются убиквитин-подобные модификаторы, ферменты регулируемого протеолиза и внеклеточные ферменты, а по аминокислотным последовательностям – убиквитин-подобные модификаторы, ферменты регулируемого и нерегулируемого протеолиза. Однако по мере расширения исследований по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям приведенные данные могут уточняться.

Гомология ферментов по нуклеотидным последовательностям у человека и легочных пресноводных моллюсков при анализе регулируемого протеолиза составляет 66–68%; регулируемого протеолиза – 69–76 %; убиквитин-подобных модификаторов – 78–83%; внеклеточных ферментов – 67–76% и внутриклеточных ферментов – 65–72%. Эволюционный консерватизм протеолитических ферментов, наличие незамкнутого кровообращения, позволяющего доставлять изучаемые субстанции из гемолимфы непосредственно к клеткам-мишеням позволяют использовать этих животных в качестве дешевых и удобных в содержании тест-организмов. Практическое значение достаточно высокой степени гомологии протеолитических ферментов у людей и легочных пресноводных моллюсков обосновывает целесообразность формирования аквакультуры моллюсков, для получения из их тканей белковых ферментативных препаратов протеолитического действия в рамках задач биофармацевтики, косметики и пищевой промышленности.

При исследовании гемолимфы и гепатопанкреаса прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis* L) и катушки роговой (*Planorbarius corneus* L), отличающихся по типу транспорта кислорода, протеолитическая и антипротеолитическая активности были обнаружены во всем исследуемом диапазоне значений pH. Наиболее высокие значения трипсиноподобной активности были выявлены при значениях pH инкубационной среды в диапазоне 3,6–9,0, а количества $\alpha 1$ -антипротеазного ингибитора при pH 3,6–3,8 и $\alpha 2$ -макроглобулина при pH 3,0. В гепатопанкреасе выявлена мощная антипротеазная активность, направленная против кислых и слабокислых протеаз, вероятно, лизосомального происхождения. Сде-

лано заключение о большей устойчивости системы протеолиз-антипротеолиз у катушек по сравнению с прудовиками. Высказано предположение, что легочные пресноводные моллюски могут использоваться как модельные организмы не только в токсикологии, но и в программах биомедицинских исследований.

В гепатопанкреасе обоих видов моллюсков содержание антипротеазного ингибитора достоверно возрастало уже через 3 часа после введения этионина и достигало максимума через 12 часов (превышение исходного уровня было в 7–20 раз). У прудовиков количество этого ингибитора снижалось до контрольного уровня через 48 часов, а в гепатопанкреасе его количество оставалось повышенным в 8 раз по сравнению с исходными данными. Количество $\alpha 2$ -макроглобулина в гепатопанкреасе катушек в 15 раз превышало уровень этого ингибитора протеолиза у прудовиков. После введения этионина количество $\alpha 2$ -макроглобулина в гепатопанкреасе прудовиков повышалось до уровня этого показателя в гепатопанкреасе катушек. У катушек уровень $\alpha 2$ -макроглобулина 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 pH 8,0. Исследования системы протеолиза-антипротеолиза при оптимумах pH, показали, что видовые особенности транспорта кислорода сопряжены с ее изменениями после введения этионина.

Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у легочных пресноводных моллюсков (*Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus*) производилось путем введения стрептозотоцина. Установлено, что после введения стрептозотоцина повышается содержание глюкозы в гемолимфе моллюсков и уменьшается содержание гликогена в тканях гепатопанкреаса. Эти изменения связаны с накоплением малонового диальдегида и активацией каталазы. Экстракт гемолимфы куколок дубового шелкопряда способен препятствовать изменениям биохимических показателей, вызванных введением стрептозотоцина. Проведенные исследования показали, что стрептозотоциновая модель сахарного диабета 1 типа у легочных пресноводных улиток является доступной и дешевой. В относительно простой системе незамкнутого кровообращения достигается прямой эффект взаимодействия компонентов гемолимфы с

клетками тканей. Используя эту модель, удалось испытать антидиабетогенное действие экстракта куколок дубового шелкопряда по двум направлениям: 1) защита обмена углеводов; 2) антиоксидантное действие.

В монографии представлены данные об активности некоторых ферментов гемолимфы и гепатопанкреаса *Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus*, отличающихся по типу транспорта кислорода, после воздействия гамма-излучения в поглощенных дозах 1 и 10 Гр. У *Lymnaea stagnalis* гамма-облучение привело к повышению проницаемости клеточных мембран (увеличение активности АсАТ и АлАТ в гемолимфе), нарушению ферментативной антиоксидантной системы (снижение активности глутатионпероксидазы в гемолимфе) и уменьшению антипротеолитической активности (снижение количества $\alpha 1$ -антипротеазного ингибитора в гемолимфе). У *Planorbarius corneus* выявлено дозозависимое повышение активности трипсиноподобных протеиназ на фоне относительно небольшого, но статистически значимого снижения содержания компонентов антипротеолитической активности в гемолимфе. Показано, что в гепатопанкреасе моллюсков с гемоцианиновым типом транспорта кислорода преобладает антипротеолиз, а с гемоглобиновым – протеолиз. Активация протеолиза в гепатопанкреасе, индуцированная внешним гамма-облучением (1 и 10 Гр), оказалась более выраженной у *Lymnaea stagnalis* по сравнению с *Planorbarius corneus*. На основании полученных данных сделан вывод, что *Planorbarius corneus* могут быть причислены к модельным организмам в связи большей резистентностью по сравнению с *Lymnaea stagnalis* к действию ионизирующего излучения.

Приведенные материалы о гомологии ферментов и регуляторных белков протеолиза у человека и легочных пресноводных моллюсков доказывают возможность использования последних в качестве модельных организмов для моделирования нарушений протеолитических процессов и доклинического испытания регулирующих протеолиз субстанций, а также получения из аквакультур этих гидробионтов ферментативных и регуляторных белков протеолиза. Кроме того легочные пресноводные моллюски могут быть организмами для воспроизведения и экспериментального лечения запрограммированной гибели клеток, а также заболеваний обмена веществ, опорно-двигательного аппарата и канцерогенеза с лабораторным контролем в виде биомаркеров протеолиза.

**Список публикаций авторов
Материалы монографии представлены
в следующих публикациях авторов:**

1. Чиркин А.А. Внутриклеточный сигналинг и протеолиз // Біялогія і хімія. – 2019. – №4 (76). – С. 6–17.
2. Чиркин А.А., Долматова В.В. Внутриклеточный сигналинг и протеолиз: эволюционные и онкологические аспекты // Биохимия и молекулярная биология. Выпуск 2. Границы биологических наук. Сигналинг и метаболизм. Сб. материалов конф., 8–9 ноября 2018. – Гродно: «ИВЦ Минфина», 2018. – С. 162–167.
3. Чиркин А.А., Долматова В.В. Альтернативный сплайсинг и посттрансляционная модификация белков в увеличении разнообразия белков в клетке: для адаптации и эволюции // Биохимия и молекулярная биология. Сб. научных статей. Вып. 1 Посттрансляционная модификация белков. – Минск: Беларуская навука, 2017. – С. 48–59.
4. Чиркин, А.А. Продукты распада макромолекул как регуляторы окислительного стресса // Фундаментальные и прикладные проблемы стресса. Матер. III Междунар. научно-практич. конф., Витебск, 16–17 апреля 2013. – Витебск: ВГУ, 2013. – С. 39–41.
5. Чиркин, А.А. Биологическая активность продуктов гистололиза / А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, Т.А. Толкачева // Saarbruecken: Lambert Academic Publishing GmbH, 2012. – 155 p.
6. Чиркин, А.А. Гемолимфа куколок дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.M.) как биофармацевтическое сырье для антиоксидантных и цитомодулирующих препаратов / А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова, Т.А. Толкачева, Д.И. Паршенок // Экспериментальная и клиническая фармакология. Матер. Междунар. научно-практ. конф. 29–30 сентября 2011 г. – Гродно: ГрГМУ, 2011. – С. 246–250.
7. Chirkin, A.A. Biological effects of C200 Oak Silkworm Pupae's hydrophilic components / A.A Chirkin [et al.] // Homoeopathic Lincs. Internat. Journ. Classical Homoeopathy. – 2011. – Vol. 24. №3/11. – P. 195–197.
8. Чиркин, А.А. От классического гепатотропного вещества - урсодезоксихолевой кислоты – до нового гепатопротекторного препарата природного происхождения / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, В.У. Буко, О.М. Балаева-Тихомирова // Актуальные вопросы гепатологии. Матер. 9 Междунар. Симпозиума гепатологов Беларуси. Брест, 29–30 сентября 2011, Гродно: ГрГМУ, 2011. – С. 182–183.

9. Чиркин, А.А. Реакции изолированных клеток на действие гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [et al.] // Ученые записки УО «ВГУ им. П.М.Машерова». – 2009. – Т. 8. – С. 278–298.

10. Чиркин А.А., Демидаш М.В., Смолякова М.А. Использование легочных пресноводных моллюсков в биомониторинге и биомоделировании // Біялогія і хімія. – 2020. – №1 (79). – С. 44–50.

11. Чиркин А.А., Долматова В.В. Внутриклеточный сигналинг и протеолиз: эволюционные и онкологические аспекты // Биохимия и молекулярная биология. Вып. 2. Границы биологических наук. Сигналинг и метаболизм. Сб. материалов конф., 8–9 ноября 2018. – Гродно: «ИВЦ Минфина», 2018. – С. 162–167.

12. Чиркин А.А., Долматова В.В. Альтернативный сплайсинг и посттрансляционная модификация белков в увеличении разнообразия белков в клетке: для адаптации и эволюции // Биохимия и молекулярная биология. Сб. научных статей. Вып. 1 Посттрансляционная модификация белков. – Минск: Беларуская навука, 2017. – С. 48–59.

13. Chirkin A.A., Dolmatova V.V., Balaeva-Tichomirova O.M. Proteolysis-antiproteolysis system and possible mechanism of the divergence of *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus* // The 3rd International symposium on EuroAsian Biodiversity. 05–08 July, 2017, Minsk-Belarus: BSU, IPBB. – P. 236.

14. Балаева-Тихомирова, О.М. Оценка гомологии белков системы протеолиза человека и легочных пресноводных моллюсков / О.М. Балаева-Тихомирова, В.В. Долматова, И.О. Семенов, А.А. Чиркин // Сб. статей Междунар. научно-практ. конф. 5–6 октября 2021 г. Гродно: Биологически активные вещества природного происхождения в регуляции процессов жизнедеятельности. – Минск: ИВЦ «Минфина». – С. 121–126.

15. Чиркин, А.А., Балаева-Тихомирова О.М., Долматова В.В., Семенов И.О. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции / А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова, В.В. Долматова, И.О. Семенов // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57. №2. – С. 206–217. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-206-217>

16. Чиркин, А.А. Биоинформатика для школьника на примере сравнительного анализа внутриклеточных протеолитических ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков / А.А. Чиркин, В.В. Долматова // Біялогія і хімія. – 2019. – №5 (77). – С. 18–24.

17. Чиркин, А.А. Внутриклеточный сигналинг и протеолиз // Біялогія і хімія. – 2019. – №4 (76). – С. 6–17.

18. Чиркин, А.А. Биоинформатический анализ внутриклеточных протеолитических ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков / А.А. Чиркин, В.В. Долматова // *Новости медико-биологических наук*. – 2018. – Т. 18. №4. – С.11–16.

19. Chirkin, A.A. Comparative analysis of proteolytic enzymes of human and pulmonary freshwater molluscs / A.A. Chirkin A.A., V.V. Dolmatova // *Agr. bio. div. Impr. Nut., Health Life Qual.* – 2018. – 234–242. <https://doi.org/10.15414/agrobiodiversity.2018.2585-8246.234-242>

20. Чиркин А.А., Долматова В.В., Кацнельсон Е.И., Толкачева Т.А. Изучение системы протеолиз-антипротеолиз в тканях легочных пресноводных моллюсков при введении этионина // *Новости медико-биологических наук*, 2017. – Т. 15. №2. – С. 38–45.

21. Долматова В.В., Кацнельсон Е.И., Чиркин А.А. Состояние протеолиза и антипротеолиза у легочных пресноводных моллюсков при введении этионина // XX11 (69) Региональная научно-практическая конф. преподавателей, научных сотр. и аспирантов «Наука – образованию, производству, экономике». – 2017. – Т. 1. – С. 61–63.

22. Кацнельсон Е.И., Долматова В.В., Чиркин А.А. Методические подходы для изучения протеолиза и антипротеолиза у легочных пресноводных моллюсков // XX11 (69) Региональная научно-практическая конф. преподавателей, научных сотр. и аспирантов «Наука – образованию, производству, экономике». – 2017. – Т. 1. – С. 69–72.

23. Долматова В.В., Обуховская И.Н., Чиркин А.А. Характеристика системы протеолиз-антипротеолиз при моделировании стрептозотоциновой гипергликемии // «Наука – образованию, производству, экономике»: материалы 23 (70) Региональной науч.-практ. конф. преподавателей, науч. сотр. и аспирантов. – Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2018. – Т. 1. – С. 59–61.

24. Чиркин А.А., Данченко Е.О., Толкачева Т.А., Балаева-Тихомирова О.М., Стугарева С.С. Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у легочных пресноводных моллюсков // *Новости медико-биологических наук*, 2016. – Т. 14. №3. – С. 28–32.

25. Долматова В.И., Якименко А.В., Хомич А.С., Чиркин А.А. Действие ионизирующего излучения на ферментативную активность тканей легочных пресноводных моллюсков // *Новости медико-биологических наук*, 2018. – Т. 17. №2. – С. 35–39.

26. Долматова В.В., Хомич А.С., Чиркин А.А. Изучение системы протеолиз-антипротеолиз в тканях легочных пресноводных моллюсков при действии ионизирующего излучения // *Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии*. Г. Гродно, 17–18 мая 2018 г. Сб. научн. статей под ред. проф. И.Н. Семенени и д.б.н., проф., член-корр. НАНБ А.Г. Мойсеенка. – Минск, 2018. – С. 133–138.

Научное издание

Чиркин Александр Александрович
Балаева-Тихомирова Ольга Михайловна

**МОЛЕКУЛЯРНО-СТРУКТУРНАЯ
ГОМОЛОГИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ**

Монография

Чебоксары, 2022 г.

Компьютерная верстка *М.Ю. Фомин*
Дизайн обложки *Н.В. Фирсова*

Подписано в печать 28.01.2022 г.
Дата выхода издания в свет 01.02.2022 г.
Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Гарнитура Times. Усл. печ. л. 7,2075. Заказ К-942. Тираж 500 экз.

Издательский дом «Среда»
428005, Чебоксары, Гражданская, 75, офис 12
+7 (8352) 655-731
info@phsreda.com
<https://phsreda.com>

Отпечатано в Студии печати «Максимум»
428005, Чебоксары, Гражданская, 75
+7 (8352) 655-047
info@maksimum21.ru
www.maksimum21.ru