

УДК 577.152.34:591.04:595.773.4

І. Л. Рижко, асп.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра генетики та молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна
E-mail: kira_ril@mail.ru

ВПЛИВ *IN VITRO* ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ ТРИПСИНОПОДІБНОГО ФЕРМЕНТУ ЛИЧИНОК *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Досліджували вплив іонів важких металів на частково очищену методами висолювання та іонообмінної хроматографії трипсиноподібну пептидгідролазу личинок дрозофіли. Показано, що на всіх етапах виділення фермент зберігає чутливість до іонів Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Cd^{2+} за гідролізу специфічного субстрату бензоїларгінін-п-нітроаніліду. Встановлено, що низькі концентрації солей важких металів на окремих етапах очищення пептидгідролази викликають активуючий ефект, тоді як високі (0,2 мМ та 0,4 мМ) сильно пригнічують анілідазну активність досліджуваного ферменту.

Ключові слова: важкі метали, пептидгідролаза, дрозофіла.

Протеолітичні ферменти або пептидгідролази відіграють винятково важливу роль в обміні речовин усіх живих організмів. Протеолітичні ферменти завжди привертали до себе увагу дослідників, що обумовлено не тільки використанням їх як робочого інструменту у білковій хімії, але й у зв'язку з тим, що будучи доступними в очищеному стані у порівняно великих кількостях, дані ферменти самі є зручним об'єктом для різних досліджень, у тому числі для дослідження механізмів регуляції ферментативної активності. Ферменти комах, зокрема протеолітичні, недостатньо вивчені [1, 2].

Мінеральні речовини життєво необхідні для нормальної діяльності будь-якого живого організму. Іони металів часто служать компонентами каталітично активних центрів життєво важливих ферментів або є активаторами цих ферментів. У той же час у визначених концентраціях метали можуть відігравати роль інгібіторів ферментної активності. Інгібування якого-небудь ферменту, що приймає участь у важливому метаболічному процесі, може призупинити весь процес і спричинити глибоку, а іноді і летальну дію на весь організм. Вивчення дії токсичних речовин *in vitro* з метою з'ясувати, чи не є ці речовини інгібіторами ферментів, виявляється корисним при розробці методів захисту від отруйних речовин. Однак навіть якщо можна пов'язати дію токсичної речовини з її впливом на визначений фермент, не завжди легко з'ясувати, як саме виникають ті або інші фізіологічні зміни [3–6].

У попередніх публікаціях ми показали вплив солей металів на окремі фізіолого-біохімічні показники *Drosophila melanogaster*. В пред-

ставленій роботі нас цікавив токсичний вплив окремих солей важких металів на активність частково очищеної трипсиноподібної пептидгідролази личинок плодової мушки. Цей фермент є головним у процесах травлення дрозозфіли, тому вивчали саме його. Трипсиноподібність ензиму доводиться його реакцією зі специфічним субстратом БАПНА, який використовували для визначення наявності ферменту у розчинах білків та впливу солей металів.

Метою представленої роботи було визначення впливу іонів важких металів *in vitro* на функціональну активність трипсиноподібної пептидгідролази личинок *Drosophila melanogaster*. У зв'язку з цим вирішували наступні завдання: 1) виділяли фермент з екстрактів личинок; 2) з'ясовували особливості дії іонів двовалентних металів (Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Cd^{2+}) на досліджуваний протеолітичний фермент на різних ступенях його очищення.

Матеріали і методи дослідження

Джерелом досліджуваної пептидгідролази слугували личинки третього віку (72–75 години розвитку) *Drosophila melanogaster* Meigen дикого типу, що розвивалися в стаціонарних умовах при температурі 25 °С на стандартному живильному середовищі [7]. Для одержання синхронізованого матеріалу по 50 самок і самців імаго витримували протягом 4 годин на свіжому живильному середовищі, а після кладки яєць переводили на інший корм.

Виділення ферменту здійснювали за методом, розробленим О. М. Андрієвським [8], з деякими модифікаціями. Для одержання пептидгідролази личинок дрозозфіли відмивали від кормової маси водопровідною водою за допомогою дрібнопористого металевого сита і кілька разів обполіскували дистиллятом. Очищених від корму личинок висувували на фільтрувальному папері при кімнатній температурі і зважували. Після цього матеріал поміщали в сталеву склянку гомогенізатора і заливали 10-кратною (маса/обсяг) кількістю охолодженого до -15 °С концентрованого ацетону. Знежирення личинок досягали, гомогенізуючи їх в ацетоні з допомогою ножового мікророздрібнювача при 14 000 об./хв протягом 2 хвилин на холоді. Отриманий гомогенат центрифугували при 12 000 g протягом 15 хв при 4 °С. Білкові осади декантуванням відокремлювали від ацетонової витяжки і висувували близько 15 хвилин у ліофілізаторі при температурі 18 °С.

З ацетонового осаду фермент екстрагували 0,1 М гліцин- NaOH буфером рН 9,0 шляхом ресуспендирування осаду у буфері протягом 2 хв у співвідношенні 1:10. При цьому масу ацетонового осаду приймали за вихідну масу личинок. Гомогенат центрифугували при 12 000 g 15 хвилин при 4 °С. Велику частину отриманого супернатанту використовували для висолювання білків, що знаходяться в ньому, і зокрема, трипсиноподібної пептидгідролази.

Висолювання різних білкових компонентів з лужного екстракту провадили шляхом збільшення концентрації сульфату амонію від 0,5 М до 5 М з інтервалом 0,5 М. Наважки сірчанокислого амонію додавали невеликими порціями до екстракту протягом 15 хв при те-

мпературі 20 °С за безперервного перемішування розчину. Білки, що випадають в осад при різних молярних концентраціях солі в розчині, видаляли з екстракту центрифугуванням при 12 000 g протягом 10 хв на холоді. Отримані осад окремо розчиняли в 1 мл 0,1 М гліцин-NaOH буферу рН 9,0. До розчинів висолених білків додавали по 5 мкл толуолу; депротеїнований екстракт, що являв собою насичений розчин сульфату амонію, відкидали.

Наступним етапом виділення й очищення пептидгідролази був іонообмінний хроматографічний поділ однієї з висолених фракцій, що виявляла високий вміст ферменту, на колонці (100 x 28 мм) зі сферичною ДЕАЕ-целюлозою ("Reanal", Угорщина), урівноваженою 0,01 М тріс-ацетатним буфером (рН 7,5). Ферментний розчин вносили в колонку в об'ємі 1 мл. Білки елюювали розчинами хлористого калію у ступінчасто зростаючих концентраціях (від 0,01 М до 1,0 М). Фракції об'ємом по 3 мл збирали і спектрофотометриували при 280 нм з метою визначення вмісту білка і побудови елютограми. Елюати, що виявляли пептидгідролазну активність, поєднували і піддавали аналізу.

В усіх білкових фракціях після висолювання та іонообмінної хроматографії, як і у вихідному екстракті, визначали концентрацію білка по методу Лоурі і співавт. [9], а також протеолітичну активність з використанням у якості субстрату БАПНА (бензоїларгінін-п-нітроанлід), який застосовували у вигляді 1 мМ водного розчину. Метод визначення анілідазної активності пептидгідролази [10, 11, 12] заснований на спектрофотометричній реєстрації (382,5 нм) п-нітроаніліну, що утворюється в результаті реакції розщеплення субстрату трипсиноподібною пептидгідролазою. Питому активність (ПА) ферменту виражали в міліюдиницях (мО) у розрахунку на 1 мг білка досліджуваного розчину. За одну міліюдиницю приймали кількість ферменту, що розщеплює 1 мкмоль субстрату за 1 хвилину інкубації при 37 °С.

Хлориди Со, Сu, Zn і Cd ("х. ч.") перед використанням розчиняли в 0,1 М гліцин-NaOH буфері рН 9,0 і додавали в інкубаційні середовища до концентрацій 0,04, 0,08, 0,2 і 0,4 мМ. До контрольних проб замість розчинів солей металів додавали буфер у еквівалентній кількості.

Вихідні дані обробляли статистично [13], використовуючи комп'ютерну програму "Excel".

Результати досліджень та їх обговорення

В ході очищення пептидгідролази після висолювання білкових компонентів нами були виявлені осад з різним вмістом ферменту. При цьому в усіх отриманих білкових фракціях визначали концентрацію білка та активність ферменту у порівнянні з вихідним екстрактом (табл. 1).

Серед усіх висолів найбільш високі питомі активності пептидгідролази отримали за молярності сірчанокислого амонію 2,5, 3,0 та 3,5 М.

Наступним етапом виділення пептидгідролази була іонообмінна хроматографія одного з фермент-вміщуючих висолів (2,5 М). В процесі розподілу багатокомпонентної суміші протеїнів 2,5 М висолу отри-

мали фракцію досліджуваного ферменту (рис. 1), яка була використана для вивчення дії іонів важких металів на властивості виділеного ферменту.

Таблиця 1

Вміст білка та пептидгідролазна активність у різних фракціях, отриманих за висолювання пептидгідролази личинок

Досліджувана фракція, умови висолювання, М (NH ₄) ₂ SO ₄	[Р], мг/мл	ВА, мО/мл	ПА, мО/мг	Коефіцієнт очищення
Вихідний екстракт	4,34 ± 0,01	67,0 ± 0,1	15,40 ± 0,50	–
0,5	5,09 ± 0,06	15,0 ± 1,4	2,90 ± 0,09	0,2
1,0	4,51 ± 0,02	0	0	0
1,5	4,38 ± 0,06	11,0 ± 0,4	2,50 ± 0,01	0,2
2,0	3,38 ± 0,01	110,0 ± 1,4	32,50 ± 1,41	2,1
2,5	2,56 ± 0,11	168,0 ± 0,4	65,60 ± 0,57	4,3
3,0	8,22 ± 0,06	858,0 ± 3,5	104,40 ± 0,14	6,8
3,5	4,51 ± 0,21	175,0 ± 1,3	38,80 ± 0,28	2,5
4,0	2,62 ± 0,36	19,4 ± 0,3	7,40 ± 0,05	0,5
4,5	1,18 ± 0,13	2,2 ± 0,3	1,90 ± 0,11	0,1
5,0	0,56 ± 0,06	0	0	0

Примітка: [Р] — вміст білка в 1 мл розчину; ВА — відносна активність ферменту; ПА — питома активність ферменту.

Активність пептидгідролази в нормальних умовах, а також її зміну за впливу солей металів вивчали на етапі вихідного екстракту, основних фракцій висолювання (починаючи з 2 М висолу і закінчуючи 3,5 М) та на рівні отриманого частково очищеного ферменту. Необхідно відзначити, що тенденція зміни пептидгідролазної активності при використанні визначених солей важких металів зберігалася для всіх досліджуваних фермент-вміщуючих розчинів, тому нами детально представлені дані, отримані лише з очищеним ферментом. Якщо за низьких концентрацій солей деяких важких металів іноді спостерігалася підвищення протеолітичної активності, то збільшення вмісту солі у середовищі майже завжди інгібувало активність ферменту. Достовірне підвищення активності трипсиноподібної пептидгідролази личинок 0,08 та 0,2 мМ концентраціями солі спостерігалася лише при дослідженні фракції 2,5 М висолу при додаванні солей цинку і кадмію.

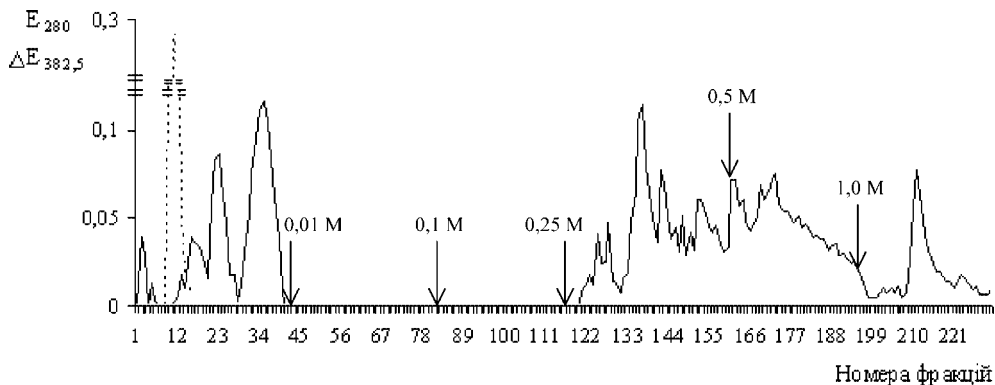


Рис. 1. Елютограма іонообмінної хроматографії на колонці зі сферичною ДЕАЕ-целюлозою фракції трипсиноподібної пептидгідролази, що висолюється 2,5 М сірчанокислим амонієм: Вертикальними стрілками зазначені моменти зміни градієнту концентрації KCl. — — — — відносний вміст білка (оптична щільність (E) при 280 нм, умовні одиниці), — — — — БАПНА-азна активність (оптична щільність (ΔE)при 382,5 нм, умовні одиниці)

Як видно з таблиці 2, проведені виміри пептидгідролазної активності виявили наступні закономірності: мінімальна концентрація CoCl_2 (0,04 мМ) практично не впливала на ферментативну активність; з підвищенням концентрації кобальту відзначалося поступове зниження активності; при концентрації 0,4 мМ активність ферменту була нижче контрольної приблизно в 2 рази.

Більш негативний вплив на досліджувану пептидгідролазу виявили іони міді. Навіть за невисоких концентрацій CuCl_2 відзначалося незначне інгібування ферментативної активності; з підвищенням вмісту цієї солі збільшувалося пригнічення гідролізу БАПНА. При 0,2 мМ концентрації солі в інкубаційному середовищі активність була нижча контрольної в 2 рази, тоді як при 0,4 мМ хлориду міді відзначалося майже повне інгібування.

Для хлориду Zn відзначені наступні особливості впливу на активність ферменту: незважаючи на те, що в порівнянні з контролем активність пептидгідролази була дещо нижчою, концентрація 0,08 мМ виявила значний активуючий ефект у порівнянні з концентрацією 0,04 мМ. Концентрація 0,4 мМ майже на 90 % інгібувала фермент. Це вказує на те, що за певних концентрацій іони Zn^{2+} можуть сприяти ферментативному розчепленню синтетичного субстрату

БАПНА. В той же час суттєве підвищення концентрації хлориду цинку викликає інгібуючий ефект на досліджувану пептидгідролазу.

За наявності мінімальної концентрації хлориду кадмію ферментативна активність знижувалася приблизно на 25 % у порівнянні з контролем.

Концентрація 0,08 мМ солі кадмію виявляла більш сильний вплив, ніж концентрація 0,2 мМ; підвищення вмісту CdCl_2 до 0,4 мМ пригнічувало активність пептидгідролази на 40 %. Такі зміни в прояві активності ферменту за умов дії іонів кадмію очевидно пов'язані

Вплив іонів важких металів на активність пептидгідролази личинок на етапах її виділення

Варіанти	Вихідний екстракт	Концентрація сірчанокислоного амонію				Хроматографічна фракція	
		2,0 М	2,5 М	3,0 М	3,5 М		
Контроль	15,4 ± 0,5	32,5 ± 1,4	65,6 ± 0,6	104,4 ± 0,1	38,8 ± 0,3	115,9 ± 1,4	
CoCl ₂ , мМ	0,04	18,8 ± 4,4*	29,3 ± 1,8*	69,1 ± 0,4*	114,9 ± 1,7*	39,4 ± 2,4	103,4 ± 0,1*
	0,08	16,1 ± 2,5	24,9 ± 0,7*	72,1 ± 0,1*	114,6 ± 0,4*	36,5 ± 0,3*	96,6 ± 2,0*
	0,2	13,7 ± 1,5*	17,9 ± 0,1*	59,9 ± 2,0*	104,0 ± 1,7	33,9 ± 1,1*	93,2 ± 0,7*
	0,4	6,8 ± 0,7*	13,9 ± 4,9*	36,7 ± 0,4*	82,1 ± 3,5*	18,8 ± 4,0*	55,7 ± 0,6*
CuCl ₂ , мМ	0,04	17,1 ± 4,0*	25,7 ± 0,4*	77,5 ± 3,1*	112,8 ± 0,3*	33,4 ± 0,1*	84,1 ± 0,3*
	0,08	15,4 ± 2,4	24,9 ± 0,3*	80,7 ± 0,7*	108,2 ± 1,1	31,3 ± 0,7*	81,8 ± 0,4*
	0,2	5,5 ± 5,6*	3,6 ± 0,1*	44,9 ± 0,1*	89,6 ± 2,0*	11,2 ± 0,3*	55,7 ± 0,1*
	0,4	0	0	33,2 ± 0,1*	2,4 ± 0,3*	0	5,7 ± 1,3*
ZnCl ₂ , мМ	0,04	10,1 ± 1,1*	22,5 ± 0,7*	99,6 ± 1,8*	106,4 ± 2,7	34,0 ± 0,7*	73,7 ± 0,6*
	0,08	11,1 ± 0,8*	22,8 ± 0,1*	113,3 ± 1,0*	99,4 ± 0,1	32,5 ± 2,1*	100,0 ± 2,4*
	0,2	3,6 ± 1,7*	8,6 ± 0,6*	68,4 ± 0,4	72,9 ± 1,0*	11,4 ± 0,1*	53,4 ± 2,1*
	0,4	0,1 ± 0,2*	3,6 ± 0,4*	54,7 ± 0,3*	27,3 ± 0,1*	5,5 ± 1,1*	13,6 ± 0,1*
CdCl ₂ , мМ	0,04	8,3 ± 1,3*	17,9 ± 1,3*	76,2 ± 0,1*	100,7 ± 2,0	29,3 ± 1,3*	87,5 ± 2,3*
	0,08	7,8 ± 1,2*	16,4 ± 0,1*	76,2 ± 0,3*	107,2 ± 0,1	24,4 ± 1,0*	72,7 ± 0,6*
	0,2	7,3 ± 3,2*	15,8 ± 0,1*	142,6 ± 0,6*	92,7 ± 0,6*	25,1 ± 0,1*	82,9 ± 0,3*
	0,4	4,3 ± 2,4*	14,2 ± 1,1*	62,5 ± 0,9	81,2 ± 0,4*	14,2 ± 0,1*	61,4 ± 0,3*

Примітка: дані відображають питому активність пептидгідролази. * — відмінності значень дослідних варіантів у порівнянні з відповідним контрольним варіантом достовірні при $p < 0,05$.

з впливом його на конформаційний стан пептидгідролази, з одного боку, та з безпосередньою модифікацією активного центру ферменту — з іншого.

Оскільки у всіх випадках нами були застосовані виключно хлориди важких металів, можна вважати доведеним диференційний вплив саме іонів Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Cd^{2+} , а не іонів хлору, на прояв *in vitro* БАПНА-азної активності трипсиноподібної пептидгідролази личинок дрозофіли, що в цілому корелює з ефектами дії цих іонів на протеолітичну систему травлення на рівні живого організму [14].

Висновки

1. Іони важких металів (Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Cd^{2+}) спричиняють як активуючий, так і інгібуючий вплив на трипсиноподібну пептидгідролазу личинок дрозофіли на певних етапах її виділення та очищення.

2. Найбільший інгібуючий вплив на БАПНА-азну активність ферменту справляють іони міді при концентрації CuCl_2 0,4 мМ.

3. Достовірне підвищення протеолітичної активності спостерігається лише при використанні ферменту, отриманого висолюванням 2,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, за умови додавання солей цинку і кадмію в концентраціях 0,08 та 0,2 мМ відповідно.

Література

1. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты. — М.: Наука, 1971. — 414 с.
2. Ермолаев М. В., Ильичева Л. П. Биологическая химия. — М.: Медицина, 1989. — 320 с.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — Москва: Мир, 1966. — 816 с.
4. Бигалиев А. Б. Генетический эффект солей тяжёлых металлов как загрязнителей окружающей среды // Успехи современной генетики. — 1982. — Вып. 10. — С. 104–114.
5. Мельникова Н. М., Деркач Е. А. Вікові особливості кумуляції кадмію в органах токсикованих щурів і зміни показників кислотно-лужного стану крові за різних умов антиоксидантного захисту організму // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 6. — С. 95–99.
6. Колодзейская М. В., Пилявская А. С. Пептидазы. — К.: Наукова думка, 1982. — 176 с.
7. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
8. Андриевский А. М. Метод получения частично очищенной щелочной пептидгидролазы из личинок *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 4. — С. 54–59.
9. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — V. 193, N 1. — P. 265–275.
10. Erlanger B., Kokovsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. and Biophys. — 1961. — V. 95, N 2. — P. 271–278.
11. Андриевский А. М., Катаненко С. В., Тоцкий В. Н. Онтогенетические особенности пептидгидролазной активности экстрактов тканей *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. — 1982. — Т. 54, N 5. — С. 519–524.
12. Лизосомы. Методы исследования / Под ред. Д. Дингла. — М.: Мир, 1980. — 342 с.
13. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Вышэйшая школа, 1973. — 320 с.
14. Андриевський О. М., Рижко І. Л., Радіонов О. О. Вплив іонів металів на рівень протеолітичної активності травної системи дрозофіли в онтогенезі // Вісник ОНУ — Біологія, 2002. — Т. 7. — Вип. 1. — С. 15–21.

І. Л. Рыжко

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина
E-mail: kira_ril@mail.ru

**ВЛИЯНИЕ IN VITRO ИОНОВ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА
АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНОПОДОБНОГО ФЕРМЕНТА ЛИЧИНОК
DROSOPHILA MELANOGASTER**

Резюме

Исследовали влияние ионов тяжёлых металлов на частично очищенную методами высаливания и ионообменной хроматографии трипсиноподобную пептидгидролазу личинок дрозофилы. Показано, что на всех этапах выделения фермент сохраняет чувствительность к ионам Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Cd^{2+} при гидролизе специфического субстрата бензоиларгинин-*p*-нитроанилида. Установлено, что низкие концентрации солей тяжёлых металлов на отдельных этапах очистки пептидгидролазы вызывают активирующий эффект, тогда как высокие (0,2 мМ и 0,4 мМ) сильно угнетают анилидазную активность изучаемого фермента.

Ключевые слова: тяжёлые металлы, пептидгидролаза, дрозофила.

I. L. Ryzhko

Odessa National I. I. Mechnikov University,
Department of Genetics and Molecular Biology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine
E-mail: kira_ril@mail.ru

**THE HEAVY METALS IONS INFLUENCE IN VITRO ON
DROSOPHILA MELANOGASTER LARVAE TRYPSINLIKES ENZYME
ACTIVITY**

Summary

The influence of the heavy metals ions on partly refined by methods of salting-out and ion-exchange chromatography trypsinlike peptide hydrolyse of drosophila larvae has been researched. It is shown that on all the stages of separation the enzyme saves sensitivity to Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Cd^{2+} ions at specific benzoyl arginine-*p*-nitroanilide substance hydrolysis. It is established that low concentrations of the heavy metals salts on the separate stage of peptide hydrolyses purification causes the activating effect whereas high (0,2 mM and 0,4 mM) — vastly oppress the anilide activity of the studied enzyme.

Keywords: heavy metals, peptide hydrolyse, drosophila.