

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

"ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет физико-математических и
естественных наук

Кафедра "Общая биология и
биохимия"

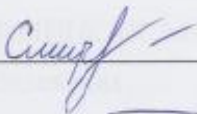
Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль Биохимия

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНА D В ЛИЧИНКАХ
ПЧЕЛИНЫХ МАТОК»**

Студент  Смирнов Денис Дмитриевич

Руководитель  Соловьев В. Б.

Нормоконтролёр  Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 12.06.17 № 19)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой хорошо (протокол заседания ГЭК от 19.06.17 № 6)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ ПЧЕЛ.....	6
1.1 Регуляторные пептиды.....	6
1.2 Обмен регуляторных пептидов.....	10
1.3 Продукты пчеловодства.....	13
1.3.1 Пчелиный расплод.....	13
1.3.2 Маточное молочко.....	16
ГЛАВА 2. ФЕРМЕНТЫ ОБМЕНА РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ.....	18
2.1 Внутриклеточные протеолитические ферменты и их роль в обмене регуляторных пептидов.....	18
2.2 Кислые протеазы.....	20
2.3 Катепсин D.....	22
2.4 Активность кислых протеаз в личинках трутней.....	24
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ КИСЛЫХ ПРОТЕАЗ В ЛИЧИНКАХ МАТОК ПЧЕЛ.....	34
3.1 Материалы исследования.....	34
3.2 Субклеточное фракционирование.....	34
3.3 Метод определения активности кислых протеаз.....	35
3.4 Метод определения белка.....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	37
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	39

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время большое количество продуктов жизнедеятельности насекомых используется в качестве лечебных продуктов. Влияние производных таких продуктов пчеловодства как маточное молочко, перга, мёд определяется мягкостью, большой степенью безопасности, высокой терапевтической активностью. А низкая стоимость делает их использование более высоким в отношении препаратов полученных иными способами.

Среди биологически активных продуктов пчеловодства ледующее место занимает маточное молочко. В его состав входит ряд важнейших компонентов: белков, липидов, аминокислот, витаминов, ферментов, макро- и микроэлементов. Маточное молочко с таким сбалансированным составом полезных веществ оказывает на организм тонизирующее, иммуностимулирующее действие, активирует обменные процессы, реконструирует деятельность желез внутренней секреции, содействует повышению стойкости организма к инфекциям, успешно применяется при множестве заболеваний сердечнососудистой системы, желудочно-кишечного тракта.

Вместе с тем у маточного молочка хорошо выражены антиоксидантные свойства. Оно снижает перекисное окисление липидов и этим оказывает гиполитическое действие, приводящее к нормализации липидного спектра крови, что уменьшает риск развития атеросклероза, гипертонической болезни, инфаркта миокарда и инсульта. Маточное молочко расширяет мелкие кровеносные сосуды и этим нормализует микроциркуляцию крови в тканях органов, прежде всего в миокарде.

Для понимания эволюционного развития организмов чрезвычайно важно исследование молекулярных механизмов регуляции метаболизма на конкретных этапах онтогенеза. Обмен веществ на протяжении всего жизненного цикла любого организма претерпевает существенные изменения.

Особенно интенсивно эти процессы протекают у насекомых при смене фаз развития.

Известно, что масса пчелиной личинки за несколько суток увеличивается в тысячу раз, что позволяет говорить о высокой интенсивности обмена веществ.

Скорость и направленность метаболических процессов, как известно, определяются ферментативными реакциями., среди которых особо можно выделить ферменты белкового катаболизма. (О роли кратко, как поставщиков аминокислот для синтеза белка) При этом изучение динамики активности протеолитических ферментов в онтогенезе может дать существенную информацию о процессах клеточной дифференцировки и морфогенеза, сопровождающих развитие личинок. Ряд авторов отмечают, что изучение ферментов насекомых в онтогенезе имеет фрагментарный характер.

В процессе онтогенетического развития организма важные функции выполняют протеолитические ферменты, действию которых подвержены все без исключения структурные белки, ферменты, многочисленные по спектру физиологического действия пептиды. В результате действия протеолитических ферментов в клетке, с одной стороны - разрушаются «отработанные» белки, а с другой стороны - высвобождаются белки, пептиды с новыми физико-химическими и биологическими свойствами, что, естественно, сказывается на всем комплексе обменных процессов. Другими словами, протеолитические ферменты осуществляют контроль над метаболизмом в клетке на протяжении всего периода существования живого организма.

Большинство исследователей относят катепсин D к ферментам лизосомальной локализации, принимающих участие в реакциях неспецифического протеолиза. Также по литературным данным известно, что катепсину D и другим кислым протеазам отводится лидирующая роль в метаболизме запасных белков на стадии эмбриогенеза насекомых.

Цель нашего исследования - обзор данных по изучению активности катепсина D в личинках трутневого расплода с разработкой дальнейшей методики исследования данного фермента в личинках маток пчел.

Личинки маток пчел представляют собой достаточно дорогой и редкий биологически активный материал, поэтому перед тем как приступить к работе над ним необходимо апробировать стратегию исследования на более доступном и приближенным по свойствам материале - трутневом расплоде.

Результаты позволят выяснить роль исследуемых ферментов в росте и развитии личинок пчелиного расплода. Так же полученные данные дадут представление о значении трипсинподобных ферментов и кислых протеаз в метаболизме личинок пчел на разных этапах онтогенеза.

Бакалаврская работа написана на 46 листах, содержит 8 рисунков, 1 таблица и список литературы на русском и английском языках из 73 источников.

ГЛАВА 1. Регуляторные пептиды пчел

1.1 Регуляторные пептиды

Регуляторные пептиды - это вид соединения, который по своей структуре относят к высокомолекулярным веществам. Данные соединения имеют вид соответствующих аминокислотных остатков, собранных в единую цепь пептидной связи. Важно различать и понимать классификацию молекул: соединения, включающие в себя от двадцати и более остатков, мы будем называть олигопептидами; соединения, состоящие из не менее двадцати и не более ста - полипептидами. Если соединение включает более ста аминокислотных остатков, то оно считается белком. Чаще всего большую часть регуляторных пептидов относят к полипептидным соединениям. [3, 11, 24].

Классификация включает химическую структуру, физиологические функции и происхождение молекул регуляторных пептидов. Главное затруднение группировки полипептидов происходит из-за их многофункциональности, вследствие чего не представляется возможным выделить одну или даже несколько основных функций у каждого полипептида. Известны также большие различия в физиологической активности регуляторных пептидов, схожих по химическому строению и, наоборот, присутствуют схожие по функциям, разные по своей химической структуре. Так как регуляторные пептиды локализованы и существуют почти во всех типах тканей и органов, то при их дальнейшей классификации мы будем учитывать локацию преимущественного появления [2, 24].

Так, благодаря приведенным выше признакам выделено более 20 семейств. Наибольшая осведомленность относится к таким явлениям как: гипоталамические либерины и статины - тиролиберин (ТРГ), кортиколиберин (КРГ), лютропин (ЛГ), люлиберин, соматолиберин, соматостатин (ССТ), меланостатин (МИФ) в частности, а также опиоидные пептиды, к которым мы

отнесем производные проопиомеланокортина - бета-эндорфин (бета-энд), гамма-эндорфин (гамма-энд), альфа-эндорфин (альфа-энд) и мет-энкефалин (мет-энк и производные продинорфина - динорфины (дин), лей-энкефалин (лей-энк), здесь важно упомянуть о производных проэнкефалина А - адренорфин, лей-энк, мет-энк, казоморфины, дерморфины, подгруппы FMRFa и YGGFMRFa; меланотропины - адrenокортикотропный гормон (АКТГ) и его фрагменты, альфа, бета-, гамма-меланотропины (альфа-МСГ, бета-МСГ, гамма-МСГ); вазопрессины и окситоцины; так называемые панкреатические пептиды - нейропептид У, пептид УУ, пептид РР; глюкагон-секретины - вазоактивный интестинальный пептид (ВИП), пептид гистидин-изолейцин, секретин; холецистокинины, гастрины; тахикинины - вещество Р, особенно вещество К, нейромедин К, кассинин и, конечно, нейротензины - нейротензин, нейромедин Н, ксенопсин; бомбезины - бомбезин, нейромедины В и С; кинины - брадикинины, каллидин; ангиотензины I, II и III; атриопептиды; кальцитонины - кальцитонин, кальцитонин-ген-родственный пептид [11].

Важно помнить, что регуляторные соединения активно воздействуют практически на все физиологические свойства человеческого организма. В свою очередь монофункциональные регуляторные пептиды науке пока не известны. Некоторые функционал обслуживается несколькими регуляторными пептидами единомоментно, но все же, обязательно имеет место качественное своеобразие действия каждого из описываемых пептидов. Интересен следующий факт: ряды регуляторных пептидов на прямую зависят от механизмах обучения и человеческого интеллекта, памяти [39]. Мы в первую очередь будем говорить о фрагментах АКТГ (АКТГ4-7 АКТГ4-10) и вазопрессина, которые являются катализаторами процесса обучаемости, а также активизируют внимания и процесс перехода из кратковременной памяти в долговременную. Более того ученые приходят к выводу о том, что холецистокинин-8 становится мощным препаратом подавления естественных инстинктов потребления пищи у голодных животных. Воссоздать подобный медикаментозный отказ от еды позволяют следующие средства: ТРГ, ССТ,

КРГ, бомбезин, нейротензин и другие, а нейропептид в частности Y особенно участвует в увеличении проявления данных функций [24]. На процесс добывания корма активное давление оказывают и некоторые опиоиды. К эндогенным импульсам восприятия боли (эндогенным опиатам) относятся опиоидные пептиды (бета-энд, дин, лей-энк, дерморфин и др.), а также нейротензин, симатостатин, холецистокинин-8 и некоторые другие неопиоидные пептиды. Учеными давно доказано, что при участии некоторых видов пептидов, у человека может начать формироваться стресс и психическая неустойчивость. Описанные выше соединения участвуют также в контролируемой работе сердечно-сосудистой системы. Уже давно обнаружено, что ангиотензин II и вазопрессин влияют на повышение артериального давления. В свою очередь сильным сосудорасширяющими, гипотензивными и диуретическими (в т.ч. натрий-уретическими) признаками наделены немногие атриопептиды, АКТГ и др. На сегодняшний день выявлено, что регуляторные пептиды участвуют в регулировании системы специфического и неспецифического иммунитета (тафцин, иммунопоэтины, тимозины, кортиколиберин, вещество P, нейротензин). Также предполагается задействование ряда соединений пептидов в появлении опухолей [26, 38].

Наряду с прямым действием на множественные функции человеческого организма регуляторные пептиды влияют на прямой вывод тех или других регуляторных пептидов и биорегуляторов на некоторые метаболические процессы.

Таким образом, ученые вывели гипотезу о существовании функционального (непрерывного) континуума системы биорегуляторов. Данная система способна обеспечить, по-видимому, возникновение сложных регуляторных цепей и каскадов [2, 26, 54].

Все большее ученые заинтересованы скоростью реакции организма на введение регуляторных пептидов и их взаимодействие. Активное применение получили те пептиды, которые известны нам, в первую очередь, как гормоны -АКТГ, инсулин, соматотропный гормон, вазопрессин и окситоцин. Не смотря

на всё выше сказанное, использование пептидов в медицине сталкивается с некоторыми трудностями, прежде всего из-за их практически мгновенного расщепления протеазами желудочно-кишечного тракта, крови, цереброспинальной жидкости и других биологических сред организма, а также по причине проявления длительных побочных эффектов и отсутствия сильной зависимости эффекта от предложенной дозировки.

На данный момент огромные успехи достигнуты при использовании вазопрессина и окситоцина. Так, вазопрессин часто используется как стимулятор для улучшения функций памяти и всё, что с ней связано: запоминание и преодоление некоторых амнезий. Более того, он значительно снижает эмоциональное напряжение и улучшает самочувствие. В особенности положительные результаты достигнуты при применении дезглицинамидного аналога вазопрессина и дезамино-Д-аргининвазопрессина, поскольку у них снижен гормональный эффект. Однако, несмотря на весьма заметное структурное сходство молекул вазопрессина и окситоцина, последний гормон оказывает негативное влияние на функции памяти: вызывает эффекты амнезии, но благоприятно воздействует на лечение депрессий, истерических и психопатоподобных реакций с вегетативно-сосудистыми нарушениями [3, 24, 26]. Как противопаркинсоническое и антидепрессивное средство в медицинских целях используют тиролиберин. Единоразовое внутривенное введение препарата поднимает настроение, снимает чувство страха, устраняет причины появления маниакального состояния. Уже сейчас проводятся исследования по воздействию тиролиберина на сон человека и при алкоголизме. Вместе с тем употребление тиролиберина ограничивается из-за проявления его эффектов на эндокринную систему, а именно - высвобождение таких гормонов, как тиротропин и пролактин.

Особый интерес имеют материалы клинических испытаний по изучению антипсихотического, гипотензивного, противоязвенного и противоболевого влияния эндорфинов и аналогов энкефалинов. Так, при лечении разной по степени форм шизофрении полезен дез-тирозил-гамма-

эндорфин, а при язвенной болезни и гипертонии врачи рекомендуют разные аналоги энкефалинов.

Значительное внимание уделяется именно изучению иммуностимуляторов - тафцина и его фрагментов, а также ряда пептидов шишковидного тела: тимопоэтинов, тимозинов. При условии рассмотрения тафцина и его аналогов как стимуляторов преимущественно неспецифического иммунитета, вторую группу этих регуляторных пептидов относят к стимулирующим специфического иммунитета. Большой интерес представляют исследования о противострессорной активности тафцина, пептида дельта сна и вещества Р.

На сегодняшний день биологами уже изучено диуретическое и натрийуретическое действие атриопептида. При его введении диурез и натрийурез усиливаются в десятки раз и может быть сравним с эффектом фурасемида - диуретика непептидной природы. Вместе с тем действие последнего достигается при увеличении дозировки сотни раз больше, чем при введении пептида, и сопровождается усилением калийуреза в отличие от преимущественного натрийуреза, вызываемого атриопептидом [3, 4, 26].

1.2 Обмен регуляторных пептидов

Отметим, что уровень нейропептидов зависит от соотношения скорости их синтеза и деградации.

Нейропептиды образуются в организме сначала в виде высокомолекулярных неактивных предшественников (препропептидов) [21]. В составе последних могут находиться аминокислоты, а также последовательность как одного, так и нескольких нейропептидов. В пример можно привести много белков, в своей структуре которых содержатся последовательности нейропептидов. Во-первых, это предшественник гонадотропин-рилизинг-фактора; проопиомеланокортин, препроэнкефалин А, продинорфин (препроэнкефалин В) и другие [5, 30]. Более того, обратим

внимание на то, что в состав предшественника гонадотропин-рилизинг-фактора входит гонадолиберин-ассоциированный пептид.

У всех препропептидов на N-конце находится сигнальная последовательность из 15-20 остатков гидрофобных аминокислот. Нейропептиды, которые входят в состав предшественника ограничены с обоих концов (фланкированы) парами остатков основных аминокислот - аргинина и лизина [5, 7, 28, 27, 31].

Сигнал, появляющийся на конце цепи, взаимодействует с рецепторами эндоплазматического ретикулума, поэтому данная последовательность способствует переносу предшественника нейропептида в просвет ретикулума. Далее в цистернах, где образуется эндоплазматический ретикулум, под действием сигнальной пептидазы происходит отщепление сигнальной последовательности, а также N-гликозилирование и формирование третичной структуры, препятствующей обратному выходу белка в цитоплазму. В свою очередь посттрансляционная модификация, которая включает гликозилирование, амидирование, ацетилирование или сульфирование, устраняет нарушение процессинга и образование нетипичных для реакции пептидов [5, 12, 34, 48].

Предшественники нейропептидов образуют синтез на рибосомах в гранулах эндоплазматического ретикулума. Как было сказано выше, у препропептидов отсутствует функциональная активность, поэтому для поддержания активной стадии, они попадают под воздействие посттрансляционного процессинга, одним из основных особенностей которого является ограниченный протеолиз [7, 13, 11, 19, 74].

Процесс, в который вступают биологически активные пептиды, осуществляется при передвижении молекул пропептидов по гранулам эндоплазматического ретикулума, а также, по комплексу Гольджи и в секреторных везикулах [59]. Секреторные везикулы включают в себя одинаково полный набор ферментов, необходимых для того, чтобы процесс, описанный выше мог реализоваться, в частности для поддержания и

специальных систем рН внутри везикул [21].

Процесс, при котором нейропептиды внутри секреторных везикул включают в себя эндо- и экзопротеолитические реакции. Эндопротеолиз протекает при активном действии трипсиноподобных протеиназ (проопиомеланокортин-превращающего фермента [71], продинорфин-превращающего фермента [53,59], тиоловой прогормонконвертазы [44, 45], субтилизиновых эндопептидаз фурина, PC1, PC2, PC3 и PC4). В результате данной реакции мы видим, как происходит расщепление пропептидов по парам остатков основных аминокислот [21].

Далее, продукт, образовавшийся после реакции эндопептидаз, подвергается экзопротеолизу с участием аминопептидазо-В или карбоксипептидазо-В-подобных веществ. В результате мы видим расщипление "лишних" N- или C- концевых остатков основных аминокислот.

Устоявшейся факт, что в различных тканях всего из одного белкового предшественника могут образовываться различные нейропептиды [5, 20, 30, 43]. Так из проопиомеланокортина в аденогипофизе образуются преимущественно АКТГ, бета-липотропин и бета-эндорфин. В промежутке гипофиза они участвуют в дальнейшем расщеплении с образованием альфа-меланоцитстимулирующего гормона и фрагментов бета-эндорфина. Структура ткани, по-видимому, может быть связана с различным набором веществ в разных местах этой ткани или благодаря различным способам регуляции их активности. Поэтому нам кажется интересным изучение ферментов процессинга с похожей (но не идентичной) субстратной специфичностью. Подобные исследования помогут не только объяснить вопросы, связанные с функционированием предложенных энзимов, но и для понимания механизмов образования различных нейропептидов из одних и тех же предшественников в разных тканях.

Таким образом, участие карбоксипептидазо-В-подобных ферментов, то есть отщепляющих остатков основных аминокислот (аргинина и лизина) с карбоксильного конца пептидов в конечной стадии процессинга биологически

активных пептидов, представляет особый интерес [37].

1.3 Продукты пчеловодства

1.3.1 Пчелиный расплод

Что мы будем понимать под пчелиным расплодом? Это объединение всех стадий развития пчелы воедино: от личинки до трутней, учитывая при этом разновидность насекомого.

Трутни развиваются из неоплодотворенных яиц. Из оплодотворенных же клеток в результате определенного питания могут появляться и матки и пчелы-работчие, под определяющим признаком мы будем считать не только качество прикорма, но и его объемы. Младших личинок трудовые пчелы кормят маточным молочком - синтезом глоточных и верхнечелюстных желез, находящихся в челюсти. Работники и трутневые личинки подобное питание получают только первые трое суток индивидуальной стадии. Во второй период к концу последнего дня жизни данные личинки начинают употреблять кашу из секрета пыльцы и мёда. Важно, если личинка съест совсем немного мёда и перги, то из неё никогда не разовьется полноценная матка [1, 10].

Основная часть аминокислот трутневого расплода протекает в свободном виде и в составе транспортных олигопептидов [15].

Интересно, что в трутневом расплоде содержатся липидов в 1,5 - 2 раза больше видов, чем в расплоде трудовых пчел. Так, в результате испытаний выявлено, что стерольные компоненты, относящиеся к холестеринному ряду не выявлены, однако полно показаны их противоположности. Мы говорим о небольшом количестве растительных стерол: кампостерина, β -ситостерола, Σ -стерина, гидроксиситостерола. Содержание витамина А составляет 119МЕ/100 г, бета-каротина 0,21 мг/100 г, а содержание витамина Е не обнаружено [1, 41]. По имеющимся академическим данным расплод богат на микроэлементы.

Важно знать: трутневый расплод, как и маточное молочко повышает уровень метаболизма в период активной мышечной деятельности насекомых, благодаря чему повышается их трудоспособность. В то же время в результате исследований отмечают ярко выраженную гонадотропную активность адсорбированного гомогената трутневых личинок по сравнению с применением эквивалентных доз маточного молочка при введении самцам крыс с кастрацией одного яйца. Это объясняет, что данный эффект будет богат по отношению содержащихся в нем (5-10 раз) стероидных гормонов в расплоде [23].

Доподлинно известно, что народная медицина Китая, Японии и других восточных стран трутневый расплод применяет при стимуляции развивающегося организма детей, а также для лечения заболеваний органов желудочно-кишечного тракта и при психических расстройствах [22, 23]. Данный продукт активно используется фармацевтическими и косметическими кампаниями для производства специализированных продуктов.

После ряда исследований учёные доказали, что личинки и куколки пчел наделены активным веществом, замедляющим рост и возникновение развития раковых клеток.

В общей сложности трутневый расплод можно расценивать как ценный пищевой продукт, обладающий полезными свойствами и способствующий лечению ряда проблем в диетологии, апитерапии, косметологии и фармакологии.

1.3.2 Маточное молочко

В чем важность использования маточного молочка? Маточное молочко - синтез гипофарингальных желез пчел-кормилиц, необходимый для первоначального (до трех суток) вскармливания личинок всех стаз, облигатного питания личинок матки и ее питания в период размножения. Генетический код матки и рабочих пчел идентичен (диплоидные гетерозиготы по половому гену), что подтверждается пчеловодами на практике.

Питание при помощи маточного молочка личинкам старше трех дней не только ускорит развитие плода в сторону матки, но и изменит темпы эволюции и роста. Первая стадия матки и после закрытия маточного отдела во время сотворения кокона продолжает кормиться молочком, спрятанным на дно маточника. Начальную стадию сменяет стадия появления кокона, после полноценной куколки. У матки на стадии кокона, как и у трудовой пчелы, происходит распад всех половых органов, за исключением прогрессивного развития женских половых органов (в среднем образуется до 150 трубочек в каждом яичнике) [1,10].

Рост потомства, основанный на высокопитательным секреторным вскармливанием - настоящий скачок в эволюции, характерный для высокоразвитых существ, например млекопитающих. Более того помимо вскармливания потомства веществами, необходимыми для пластического и энергетического обмена, важно обеспечить данное потомство и последующие поколения факторами иммунитета. Благодаря особенностям социальной иерархии семьи медоносной пчелы стало возможным секретирование корма высшего сорта [1].

Структура маточного молочка, снабжающего личинки всех стаз в первые сутки, разнится с молочком, потребляемым старшими личинками, однако заготовить его заранее невозможно. Во-первых, состав маточного молочка напрямую зависит от влияния расовых и индивидуальных генетических отличий пчелиных семей, во-вторых, от погодно-климатических

условий.

Поговорим о медико-биологической активности.

В результате опыта в пробирке учеными было выявлено противомикробное действие маточного молочка [23].

Так при введении больших доз маточного молочка через брюшную полость не возымело видимого эффекта токсикации в опытах на мелких животных [22, 41]. Однако в другом случае, когда в течение десяти дней маточное молоко вводилось под кожу в 0,5-1,0 г/кг массы в опытах на мышах и крысах вело к тому, что животные отказывались от еду, становились вялыми. Также были выявлены приступы аллергии и появление контактного дерматита. Несмотря на все преимущества, процесс воздействия маточного молочка на организм мало изучен и, вероятно, основан на липотропном эффекте - возможности ненасыщенных жирных кислот встраиваться в биологические мембраны, менять их свойства, активность мембраносвязанных белков, разобщать окисление и фосфорилирование. Однако, на сегодняшний день накоплен огромный материал, добытый опытным путем, по влиянию маточного молочка на организм человека [9, 23]. Отметим, что маточное молочко наделено антиоксидантными свойствами. Оно уменьшает перекисное окисление липидов и этим оказывает гиполитическое действие, которое приводит к нормализации липидного спектра крови, в свою очередь предотвращает риск развития атеросклероза, гипертонической болезни, инфаркта миокарда и инсульта. Более того, маточное молочко способствует расширению мелких кровеносных сосудов и этим нормализует микроциркуляцию крови в тканях органов, прежде всего в сердечной мышце. Она улучшает процессы метаболизма в миокарде и других тканях также за счет анаболического эффекта. Также маточное молочко - это хороший адаптоген, повышающий устойчивость к физическим и психическим нагрузкам. Данный продукт оптимизирует работу системы гипоталамус - гипофиз - надпочечники, обладает регенерирующим, антимикробным и иммуномоделирующим действием [10].

Маточное молочко - это активный биологический стимулятор, нормализующий обменные процессы в организме, усиливающий ферментативную активность, улучшающий трофику тканей, регулирующий клеточное питание, сосудистый тонус, гормональную деятельность, ускоряющий нормальное развитие организма, способствующий снятию ангиоспазма, регулирующий функцию расстроенной нервной системы, снижающий уровень холестерина и триглицеридов крови, и наконец корректирующий баланс электролитов и катехоламинов в тканях стенок сосудов. Данный субстрат богат биологически активными элементами, необходимыми для нормальной работы эндокринной системы, относится к иммунорегуляторным модуляторам, стимулирует кроветворение, активизирует защитные функции организма, повышает его выносливость, ускоряет выведение токсинов, в том числе тяжелых металлов, обладает противорадиационными свойствами [10, 25].

Таким образом, маточное молочко является продуктом, который определяется различием развития особей медоносной пчелы. Более того, содержащиеся в нем около 400 веществ, могут быть использованы и используются в медицине для нормализации многих функций организма, что объясняет его высокую диетическую, лечебную и профилактическую ценность, и свидетельствует о важности последующего изучения его биологических свойств и возможностей применения в клинических целях.

В настоящее время состав пчелиного расплода и маточного молочка исследован недостаточно полно. Более глубокое изучение состава и свойств позволит использовать производные этих продуктов для повышения физической активности людей пожилого и старческого возраста, больных в реабилитационный период, а так же в спортивной медицине во время интенсивного тренировочного процесса.

ГЛАВА 2. Ферменты обмена регуляторных пептидов

2.1 Внутриклеточные протеолитические ферменты и их роль в обмене регуляторных пептидов

Внутриклеточные протеолитические ферменты - неповторимые для каждого типа клеток группы биологических катализаторов, в совокупности обеспечивающие обмен белка, важнейшего для живого организма процесса.

Такой протез, как протеолиз включен во все реакции, связанные с превращением белка с момента его образования до полного гидролиза [17, 32, 35]. Все без исключения белковые соединения находятся под контролем пептидгидролаз, что ставит в зависимость клеточный метаболизм и организм в целом от состояния протеолитических ферментов, и на основании чего ферменты протеолиза можно представить как глобальные регуляторы метаболизма[17].

Протеолитические катализаторы являются наиболее изученными биологическими ферментами. Для многих из них открыты не только первичные структуры, но и дальнейшая организация молекул в пространстве, топография их активных центров и каталитические процессы [2, 64].

Протеолитические катализаторы (пептидгидролазы) - обширная группа биологических ферментов, в соответствии с принятой классификацией исследователи отнесли к 3 классу и объединили их в один 4 подкласс (К.Ф. 3.4.). Все без исключения ферменты ускоряют реакции гидролиза пептидных (амидных) связей в молекулах белков и пептидов. Классификация пептидгидролазов базируется по нескольким признакам: по специфичности работы, по структуре активного центра молекулы фермента и по особенностям действия на белки (эндо - и экзопептидазы). В настоящее время внутриклеточные катализаторы делятся на две группы в соответствии с локализацией в клетке и их функциями. К первому ряду относятся

пептидгидролазы лизосом, а ко второму - катализаторы внелизосомальной локализации [2, 17,64].

Гидролиз белка в клетке может протекать следующими способами - лизосомальным и нелизосомальным, однако, вклад в развитие разрушения белка этих путей не равноценен. Различия определяются прежде всего по признакам внутриклеточной организации систем пептидгидролаз лизосом и нелизосомальной локализации [2, 17,64].

В конечной реакции гидролиза белка в лизосомах образуются в первую очередь свободные аминокислоты. Если быть точными, протеолитические ферменты лизосомального аппарата производят полноценно замкнутый гидролиз белка, появившегося внутри лизосомы [49].

Что же касается протеолитических ферментов нелизосомальной локализации, то по современным литературным данным известно, что они принимают участие в образовании физиологически активных форм белков. И этот путь является важнейшим при образовании физиологически активных форм биомолекул пептидной природы [17].

Характерными чертами регуляторного действия протеолитических ферментов является быстрота осуществления и высокая экономичность. Долгое время функции протеолитических ферментов связывали исключительно с их ролью в деструктивных, катаболических процессах. Однако роль протеиназ не ограничивается процессами деструкции[35]. Все больший интерес привлекают к себе регуляторные функции этих ферментов, которые, несомненно, связаны с образованием регуляторных пептидов в процессе ограниченного протеолиза. На данном этапе нам кажется, что объективным термином стала бы «протеолитическая модификация», поскольку термин «ограниченный протеолиз» указывает лишь на то, что совершен акт гидролиза ограниченного числа пептидных связей, и не говорит о том, что этот акт проходит, как образование новой формы белка (пептида), наделенного особым функционалом [17].

Протеолиз - один из универсальных процессов живой природы, - играет важную роль в поддержании стационарных концентраций белков в живой клетке и зачастую (в силу своей необратимости) является прерогативой выживания организмов. Наибольшая интенсивность протеолиза отмечается в активно растущих или пролиферирующих клетках желез и других органов, характеризующихся повышенным белковым синтезом [2, 27].

Клеточный протеолитический аппарат должен быть высокоселективным и жестко регулируемым, так как усиленная деструкция жизненно необходимых белков или замедленная деградация короткоживущих регуляторных белков могут существенно изменить клеточные функции. Эти процессы требуют наличия в клетке достаточно тонких и надежных механизмов контроля, обеспечивающих максимальную эффективность и в то же время высокую избирательность внутриклеточного протеолиза [27].

У живых организмов на ранних стадиях эволюционного развития появились протеолитические ферменты. Для катализа одной и той же реакции природа создала множество различных биокатализаторов. Причина такого разнообразия протеолитических ферментов, очевидно, связана с различиями в специфичности, а также с тем, что, ферменты функционируют в разных значениях pH, температуры, состава среды, в разных клеточных структурах [2, 27].

2.2 Кислые протеазы

Основную группу кислых протеаз составляют катепсины. Катепсины - это особые катализаторы, состоящие из лизоса, главный принцип работы которых осуществляется за счет участия в соединительных реакциях неспецифического протеолиза, приводящих к распаду целой белковой молекулы до аминокислоты. Поэтому неспецифический протеолиз играет особую роль в контроле белкового обмена, благодаря которому белки организма постоянно обновляются.

Катепсин В (КФ 3.4.22.1) в первый раз был замечен в селезёнке быка как фермент, гидролизующий альфа, N-бензоил-аргининамид в присутствии цистеина.

Данный материал снижает скорость химических реакций с хлоридом ртути, ПХМБ, антипаином, N-этилмалеимидом, лейпептином, химостатином, E-64 (специфический ингибитор) [12]. Тканевые замедлители цистеиновых протеиназ цистатины снижают скорость катепсина В в меньшей степени, чем катепсины Н и L.

В пробирке протеаза в основном гидролизует связи по С-концу пары ключевых аминокислотных остатков в регуляторных пептидах, распад которых неизбежен в результате созревания проопиоидных пептидов. Кроме того, катепсин В имеет дипептидилкарбоксипептидазную активность, например, по отношению к ангиотензину, превращая его в ангиотензин II [12]. АПФ - классическая дипептидилкарбоксипептидаза, как оказалось, проявляет эндопептидазную активность [16]. Возможно, эти две пептидгидролазы функционируют внутри разных компартментов клетки и дополняют друг друга в процессах, связанных с образованием и инактивацией нейропептидов [12].

Следовательно, катепсин В является исключительным протеолитическим ферментом, вовлеченным в механизмы развития, роста, ремоделирования и ангиогенеза, в постсинтетическую модификацию предшественников пептидных гормонов и нейромедиаторов, а также в различные патологические механизмы.

Катепсин D - единственная лизосомальная протеиназа, в настоящее время выделенная и очищенная из различных источников [8]. Эта аспартильная протеиназа имеет способность отражает функцию клетки к распаду белка и несет значимую роль в механизме внутриклеточного протеолиза.

Катепсин D реализуется в виде множественных форм с рI от 5,8 до 7,2. Наивысшая активность при рН 2,8-4,0. Снижается же она благодаря 3-

фенилпируватом, пепстатином.

Катепсин D - эндопептидаза, синтезирующая пептидные связи, которые образовались из остатков гидрофобных аминокислот, один из которых - ароматический. Важнейшим элементом является гемоглобин. Данный ускоритель реакции разрушет много природных субстратов: вещество P, соматостатин, пролактин, бета-липотропин и бета-эндорфин.

2.3 Катепсин D

Аспартильные протеиназы играют исключительно важную роль в самых различных физиологических процессах, таких как пищеварение, процессинг гормонов и регуляторных пептидов, утилизации белков [46]. Предполагается также участие катепсина D в реакциях ограниченного протеолиза [61].

Согласно базе данных MEROPS, созданной Ролингсом и Барреттом, аспартильные протеиназы сгруппированы в 16 различных семейств на основе их аминокислотных последовательностей. В свою очередь, AP собраны в шесть различных кланов, основанных на их эволюционных отношениях и третичной структуре [66]. MEROPS содержит полный список всех последовательностей, имеющих отношение к семейству AP. Большинство APs имеют максимум активности в кислом pH (3–4), а изоэлектрические точки находятся в диапазоне pH 3–4.5. Их молекулярные массы находятся в диапазоне 30-45 кДа [42].

Эукариотические аспартильные протеиназы объединяет их главная особенность, они содержат триаду Asp-Thr-Gly вокруг двух аспарагиновых кислот в активном центре (D32 и D215) [52]. Хотя эта характерная черта объединяет, аспартильные протеиназы разнообразны по многим параметрам, включая форму активного центра и клеточную локализацию. Эти особенности указывают на их разные физиологические функции [47], включая внеклеточный гидролиз белков в кислом pH, переваривание внутриклеточных белков и активацию проферментов.

Класс аспартильных протеиназ включает семейства эволюционно родственных ферментов - семейство пепсина, к которому относятся не только все пепсины и химозины животных, но и значительно более сложный в структурном отношении катепсин D.

После пепсина катепсин D - вторая наиболее изученная аспарагиновая протеиназа. Физиологические функции катепсин D включают внутриклеточный гидролиз белка [63], активация некоторых проферментов [60], регулирование апоптоза [55], и гидролиз пищевых белков у беспозвоночных [42]. Катепсин D, как известно, функционирует в кислотном диапазоне pH [68]. Его структура может содержать маннозный олигосахарид, связанный в так называемые N-месте полипептидной цепи.

Для перехода в активную форму должны произойти некоторые посттрансляционные модификации, сначала в ЭПС удаляются сигнальные последовательности ~20 аминокислот, в результате образуется зимоген. Затем 44 аминокислоты пропептида формируют из зимогена форму промежуточного звена, далее он будет обработан в так называемом регионе обработки и затем преобразован в активную двухцепочечную протеиназу [67].

В катепсине D последовательности аминокислот вокруг активного центра и положение остатков цистеина высоко консервативны [52]. Две петли окружают активный центр и они, вероятно, отвечают за узнавание субстрата. Одна из них, петля полипролина содержит три последовательных пролина, другая петля, "створка Y75" (Tyr75 от нумерации свиного пепсина) гибкая и частично перекрывает активный центр [63]. У млекопитающих, активный cathepsin D- это димерный белок [73], составленной из легкой полипептидной цепи (14 кДа) и тяжелой (на 31 кДа), которая может быть отделена денатурацией SDS в присутствие восстанавливающего агента [52].

Катепсин D является внутрилизосомальной протеиназой, проявляющей активность исключительно при кислых значениях pH и преимущественно расщепляющей пептидные связи в белке близи гидрофобных аминокислотных остатков [40]. Катепсин D (КФ 3.4.23.5) был впервые описан в 1940 г. Ансоном. В настоящее время фермент выделен из разных источников [40]. Для получения высокоочищенных препаратов катепсина D применяется аффинная хроматография на гемоглобин - сефарозе, пепстатин - сефарозе и т.д. [69, 70].

2.4 Активность кислых протеаз в личинках трутней

Для определения активности кислых протеаз в личинках трутней мной были изучены данные полученные на нашей кафедре.

Для проведения опытов по изучению активности катепсина D в инкубационную среду, содержащую 120 мкл 100 мМ натрий-ацетатного буфера (pH=4,5) добавляли 40 мкл 10% экстракта трутневых личинок, 40 мкл 8% гемоглобина, перемешивали и на 40 минут помещали в водяной термостат на инкубацию при температуре 37°C. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 5% раствора ТХУ. Пробы центрифугировали 20 минут при 4000 об/мин и отбирали 100 мкл супернатанта на проведение цветной реакции.

Количество продуктов гидролиза гемоглобина определяли по методу Лоури [62]. Из полученных величин оптических плотностей опытных проб вычитали величины оптических плотностей соответствующих контрольных проб, которые отличались от опытных проб тем, что ТХУ в них вносили перед добавлением субстрата.

При определении трипсинподобной активности реакцию начинали прибавлением 0,5 мл БАПНА к инкубационной среде, содержащей 300 мкл 0,05 М фосфатного буфера (pH=10) и 250 мкл экстракта, после 30 минут инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением 350 мкл 1 н. HCl. В контрольные пробы кислота вносилась перед субстратом. Количество

образовавшегося п-нитроанилина определяли спектрофотометрически при длине волны 383 нм.

За единицу активности ферментов принимали такое их количество, которое катализирует высвобождение 1 мкмоль продукта реакции (п-нитроанилина для трипсиноподобного фермента и тирозина для катепсина D) за 1 мин на 1 мг белка. Количество выделившегося п-нитроанилина и тирозина определяли по калибровочной кривой.

Из литературных данных известно, что рН оптимум данных ферментов у насекомых отличается от аналогичных ферментов у позвоночных животных [50, 51]. Ввиду этого предварительно нами был проведен кинетический анализ: подбор оптимума рН действия ферментов, концентрации субстрата, времени инкубации, а также ингибиторный анализ с применением специфических ингибиторов протеаз: пепстатин для катепсина D, ингибитор Кунитца для трипсиноподобного фермента. Концентрация ингибиторов составляла 0,001 М. Для оценки влияния ингибиторов, вычисляли долю (% от контроля) остаточной активности ферментов в присутствии данного эффектора.

Для подбора оптимального значения рН действия ферментов, активность катепсина D определяли в диапазоне рН 3,0-5,0, активность трипсиноподобного фермента в диапазоне рН 7,0-10,0.

Стремительное развитие личинок трутневого расплода сопровождается высокой интенсификацией процессов метаболизма, ключевыми регуляторами которых являются протеолитические ферменты.

Основной ролью протеолитических ферментов лизосом в клетке является разрушение «отработанного» белка. Второй путь превращения белка в клетке - это нелизосомальный, где протеолиз, в котором участвует большой набор индивидуальных пептидгидролаз, часто является источником образования активных форм белков, ферментов, а также пептидов, наделенных регуляторными функциями.

Руководствуясь этим, на следующем этапе работы мы предприняли попытку изучить активность таких протеолитических ферментов как катепсин D и трипсиноподобный фермент. Эти ферменты относительно хорошо изучены по многим параметрам у других насекомых, но сведения в литературе о данных ферментах в личинках трутневого расплода весьма скудны. (гришина,генгин)

Большинство исследователей относят катепсин D к ферментам лизосомальной локализации, принимающих участие в реакциях неспецифического протеолиза [58, 59, 31, 33]. Также по литературным данным известно, что катепсину D и другим кислым протеазам отводится лидирующая роль в метаболизме запасных белков на стадии эмбриогенеза насекомых, а также ключевая роль в процессах метаморфоза насекомых [50, 52, 55, 61]. Что же касается трипсиноподобных ферментов, то большинство исследователей его роль сводят лишь к пищеварительной функции [15, 57, 32, 36], но в литературе встречаются данные об участии данной группы ферментов в генезе регуляторных пептидов у высших животных[17].

Также из литературных данных известно, что рН оптимум катепсина D и трипсиноподобного фермента у насекомых отличается от аналогичных ферментов в тканях позвоночных животных [17]. В связи с этим, нами был проведен кинетический анализ: подбор оптимума рН действия, концентрации субстрата, времени инкубации, а также ингибиторный анализ. На рисунке 1 представлены результаты определения оптимума рН работы исследуемых протеолитических ферментов в личинках трутневого расплода разного возраста.

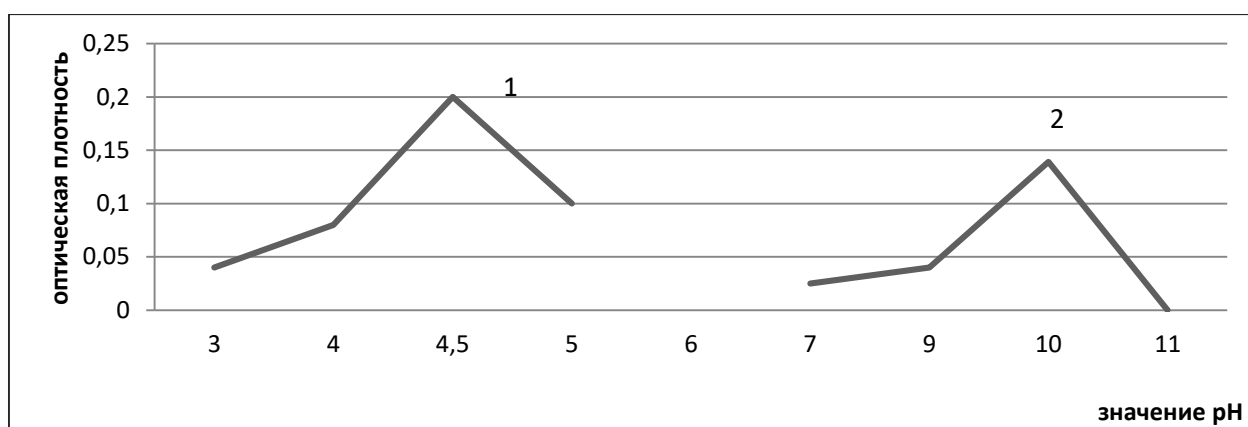


Рис.1. Зависимость активности протеолитических ферментов личинок трутневого расплода от pH инкубационной среды (1- катепсин D, 2- трипсиноподобные протеиназы).

Для определения pH оптимума действия катепсина D измерение протеолитической активности вели в диапазоне pH от 3,0 до 6,0 с интервалом точек pH 0,5. Полученные результаты показали, что оптимум pH действия катепсина D равен 4,5 и практически на единицу сдвинут в щелочную область в отличие от такового фермента тканей и органов позвоночных животных, где pH оптимум данного фермента 3,8 [56].

Для определения pH оптимума действия трипсиноподобных ферментов измерение протеолитической активности вели в диапазоне pH от 7,0 до 11,0. Полученные результаты показали, что оптимум pH действия трипсиноподобного фермента, также сдвинут в щелочную область pH. Подобный феномен установлен для этого фермента ранее у других насекомых [35].

Для определения подклассовой принадлежности протеолитических ферментов использовали ингибиторный анализ с применением специфических ингибиторов протеиназ (рисунок 2 и 3).

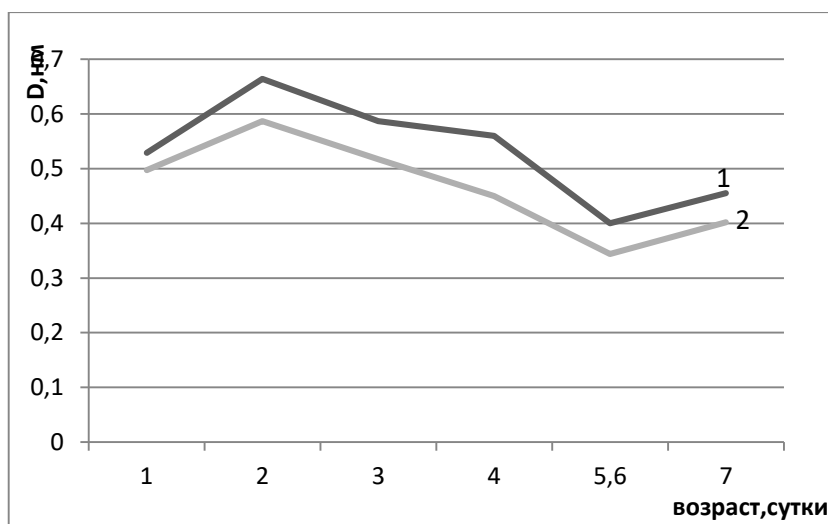


Рис. 2. Активность трипсиноподобных ферментов без ингибитора (1) и с применением специфического ингибитора (2). Ось ординат-возраст личинки, сутки; ось абсцисс- оптическая плотность, нм.

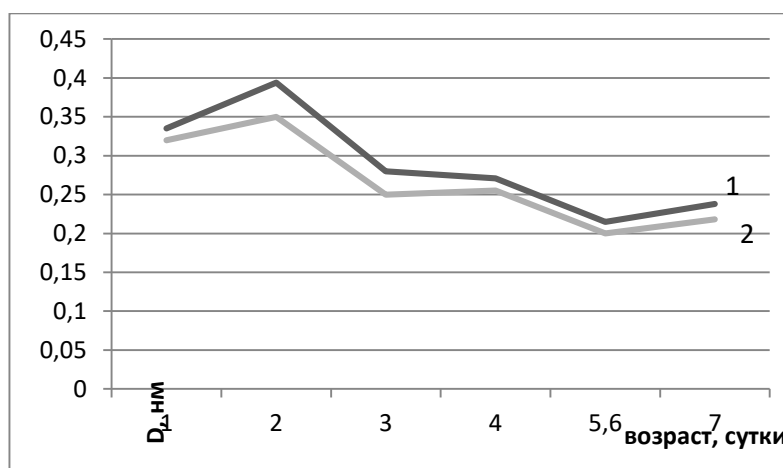


Рис. 3. Активность катепсина D без ингибитора (1) и с применением специфического ингибитора (2). Ось ординат-возраст личинки, сутки; ось абсцисс- оптическая плотность, нм.

Было установлено, что специфические ингибиторы (пепстатин для катепсина D и ингибитор Кунитца для трипсиноподобного фермента) незначительно ингибируют активность исследуемых ферментов - не более чем на 7-10 %. Подобные данные были получены рядом исследователей на других насекомых [35]. Динамика активности протеолитических ферментов на разных этапах развития трутневых личинок представлена на рисунке 4 и 5.

Из рисунка 5 видно, что активность катепсина D наименьшая и практически одинакова в личинках 1 и 2-х суточного возраста. Далее, на 3-е сутки, активность фермента резко увеличивается в 2 раза и затем снижается на 4-е, 5 и 6-7 сутки, но остается еще выше активности, обнаруживаемой у 1-суточных личинок. По всей видимости, резкое увеличение активности катепсина D на 3-и сутки связано с началом активизации процесса гидролиза эндогенных запасных белков с целью обеспечения строительным материалом для синтеза новых белков. Активация катепсина D при тех или иных перестройках в организме разных животных отмечена в ряде работ других авторов [35].

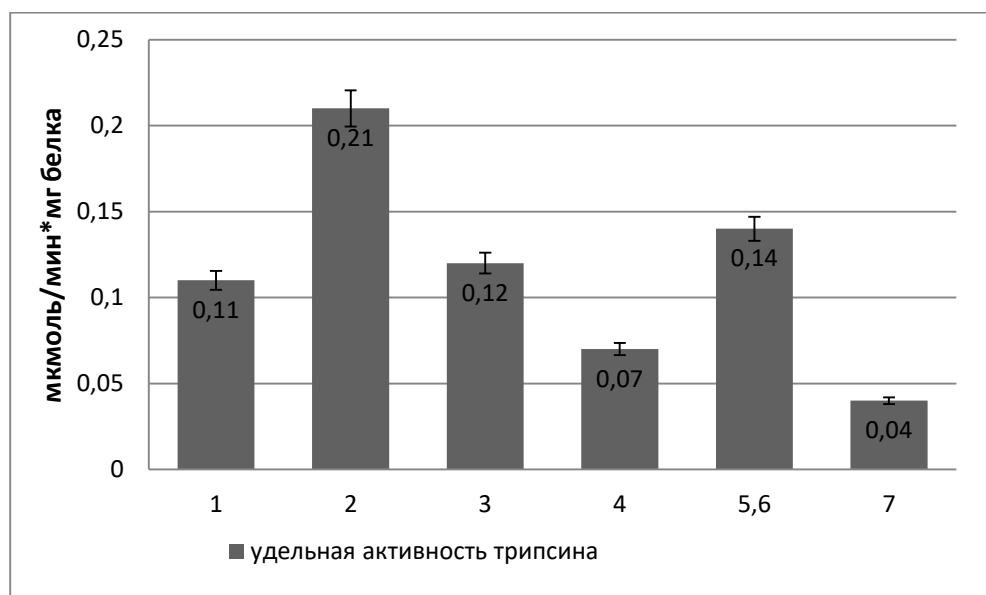


Рис. 4. Удельная активность трипсиноподобных ферментов ($M \pm t$, $n=6$). Ось ординат - возраст личинки, сутки; ось абсцисс - удельная активность, $\mu\text{моль/мин} \cdot \text{мг белка}$.



Рис. 5. Удельная активность катепсина D. ($M \pm m$, $n=6$). Ось ординат - возраст личинки, сутки; ось абсцисс - удельная активность, $\mu\text{моль/мин}\cdot\text{мг белка}$.

Что касается активности трипсиноподобного фермента (рисунок 4), то здесь обнаружена более сложная картина изменения его активности в онтогенезе личинок трутневого расплода, а именно, обнаружена фазность в изменении активности. Так, наивысшая активность фермента характерна для 2-х суточных личинок (первая фаза повышения активности фермента), где она выше в 2 раза активности 1-суточных, на 3 и 4-е сутки наблюдается постепенное, но существенное снижение активности до 60% от активности, тестируемой на 1-е сутки. Далее на 8-е сутки наблюдается вновь повышение активности фермента (вторая фаза повышения) и резкое снижение на 6,7-е сутки, где активность самая низкая из всех возрастов личинок и составляет 40% от активности односуточных личинок.

Видно, что динамика изменения активности трипсиноподобного фермента в личинках ранней стадии развития частично повторяет картину изменения активности катепсина D и практически с равной амплитудой. Однако, наибольшую активность трипсиноподобный

фермент проявляет на 2 сутки, а катепсин D позже, то есть, на 3- и сутки. Тем не менее, в определенной степени, и тот и другой фермент на ранних сроках развития личинки могут выполнять одинаковые функции в освобождении аминокислот для синтеза новых белков за счет гидролиза эндогенных белков.

Существенная активация трипсиноподобного фермента на 2-е сутки несомненно связана с его специфическими функциями, например, с закладкой органов и систем- процессов характерных для 2- суточных личинок. Хорошо известно, что трипсиноподобные ферменты являются одними из ведущих ферментов генеза регуляторных пептидов [11] и возрастание активности трипсиноподобного фермента на 2-е и 4 сутки может сопровождаться образованием тех пептидов, которые участвуют в закладке и развитии органов имаго.

Анализируя данные по динамике активности исследуемых протеолитических ферментов в онтогенезе личинок трутней, можно отметить, что в отдельных случаях уровень активности катепсина D и трипсиноподобных ферментов коррелирует с содержанием белка и интенсивностью его обмена на соответствующих этапах онтогенеза (Рисунок 6 и 7. Таблица 1). Данное обстоятельство может свидетельствовать в пользу предположения об участии этих ферментов в процессах протеолитической модификации внутриклеточных белков на ранних стадиях развития личинки.



Рис. 6. Удельная активность трипсина ($\mu\text{моль}/\text{мин} \cdot \text{мг белка}$) и содержание белка ($\text{мг}/\text{г ткани}$) в личинках трутневого расплода на разных стадиях развития ($M \pm m$, $n=6$).

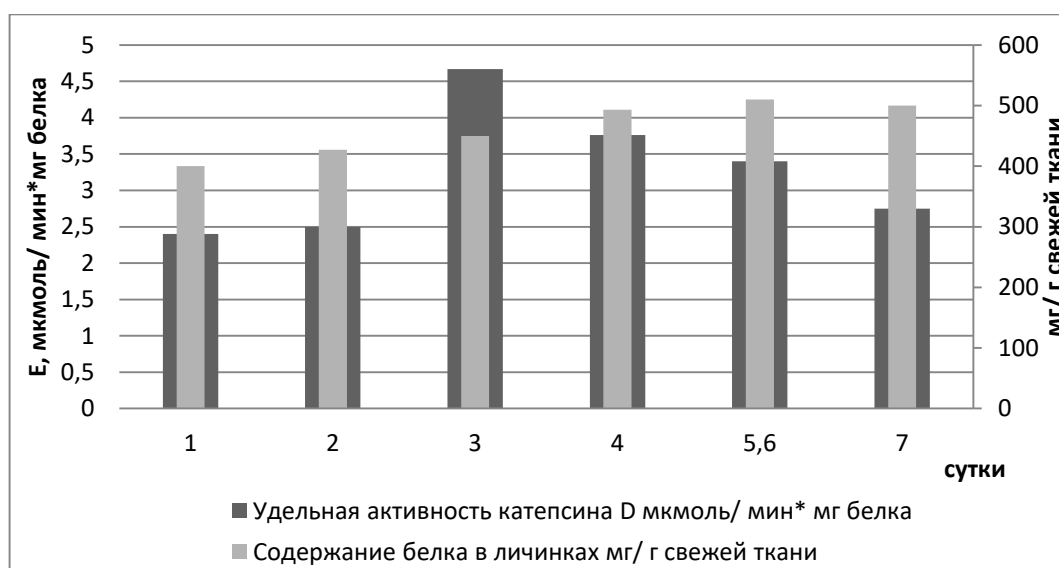


Рис. 7. Удельная активность катепсина D ($\mu\text{моль}/\text{мин} \cdot \text{мг белка}$) и содержание белка ($\text{мг}/\text{г ткани}$) в личинках трутневого расплода на разных стадиях развития ($M \pm m$, $n=6$).

Распределение активности трипсиноподобных ферментов в целом коррелирует с распределением пептидов по стадиям развития личинки (Рисунок 5. Таблица 1), что служит одним из доказательств участия этих ферментов в процессинге пептидов.

Вместе с тем эти ферменты являются гидролазами и потому они в той или иной мере обеспечивают разрушение определенной части пептидов до свободных аминокислот, внося свой вклад в гомеостаз белков, пептидов, аминокислот [19].

Таблица 1.

Удельная активность протеолитических ферментов в онтогенезе личинок трутней.

	Возраст личинок и сутки	1сут.	2сут.	3сут.	4сут.	5-6 сут.	7сут.
Белок	мг/мл	397±0,0 1	427±0,0 14	451±0,0 2	490±0,00 6	500±0,0 05	510±0,01
Удельная активность катепсина D	мкмоль / мин*мг	2,4±0,03	2,5±0,05	4,67±0,1	3,76±0,05	3,4±0,07	2,75±0,05
Удельная активность трипсиногенферментов	мкмоль / мин*мг	0,11± 0,006	0,21± 0,008	0,12± 0,006	0,07± 0,008	0,14± 0,005	0,04± 0,003

ГЛАВА 3. Разработка методов исследования активности кислых протеаз в личинках маток пчел

3.1 Материалы исследования

В качестве материала исследования предлагается использовать личинки пчёл. Были отобраны личинки двух возрастов: 3-4 и 6-7 дневные. Возраст личинок определялся по онтогенетическим признакам.

3.2 Субклеточное фракционирование

Различные ферменты локализуются в различных субклеточных структурах, поэтому для характеристики фермента и понимания его функции необходимо знать, в каких именно структурах этот фермент локализован. Одним из методов субклеточного фракционирования является дифференциальное ультрацентрифугирование. Этот метод основан на том, что различные субклеточные частицы имеют различные размеры и вес, и следовательно, различную скорость осаждения под действием силы тяжести. Используя различные режимы центрифугирования можно получить фракции субклеточных структур с различной массой.

В нашем исследовании, с помощью данного метода, были выделены митохондриально-лизосомальная и растворимая фракции. Для этого готовился 20% гомогенат из личинок трутней (в качестве среды для гомогонезации при этом являлся 0,32 М раствор сахарозы, содержащий 100 мМ натрий-ацетатный буфер). Полученный гомогенат центрифугировали по (Рисунок 8).

Затем в каждой из фракций было определено активность кислых протеаз. Так же активность этих ферментов была определена в гомогенате приготовленном на 20 мМ натрий-ацетатном буфере pH 5,6.

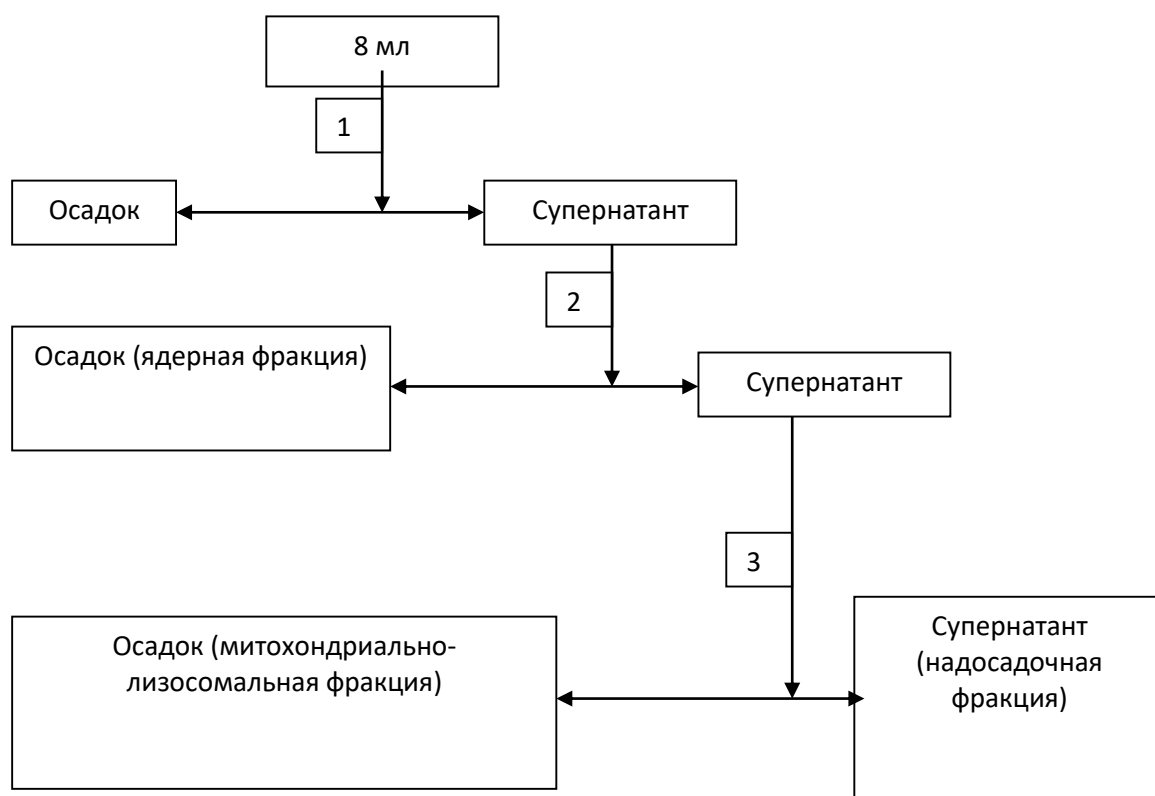


Рис. 8. Центрифугирование гомогената.

- 1- центрифугирование 5 минут при 1000 g.
- 2- центрифугирование 20 минут при 6000 g.
- 3- центрифугирование 40 минут при 12000 g.

3.3 Метод определения активности кислых протеаз

Для определения активности кислых протеаз препарат фермента (20 мкл) смешивали с 60 мкл 100 мМ натрий-ацетатного буфера (pH 3,3) и преинкубировали 8 мин при 37°C. Реакцию начинали прибавлением в опытные пробы 20 мкл 8% раствора гемоглобина, полученного из крови быка. Через 60 мин реакцию останавливали прибавлением 100 мкл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. В контрольные пробы добавляли 20 мкл 8% раствора гемоглобина. Пробы центрифугировали 20 мин при 4000 об/ мин. Отбирали 100 мкл надосадочной жидкости и определяли количество образовавшегося тирозина методом Лоури [72]. Пробы колориметрировали на

КФК-3 при $\lambda=750$ нм. Активность фермента определяли как разность в оптической плотности контрольной и опытной проб. Активность фермента выражали в нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

3.4 Метод определения белка

В каждой пробе, где исследовались ферменты обмена регуляторных пептидов, определялось общее содержание белка для дальнейшего пересчёта активности. Белок определялся методом Лоури [72].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа была посвящена разработке методов исследования активности кислых протеаз в личинках маток пчел, изучению регуляторных пептидов и протеолитических ферментов, участвующих в их обмене белка в личинках пчелиного расплода на разных стадиях развития.

Приступая к выполнению работы, мы основывались на представлении о ключевой роли протеолиза в развитии насекомых с одной стороны и весьма слабой степени изученности, как регуляторных пептидов насекомых, так и ферментов их обмена с другой.

За последнее время в литературе накоплена лишь незначительная информация о пептидах насекомых, в основном, исследователи концентрируют свое внимание на антимикробных пептидах, обходя стороной вопрос регуляторных пептидов. Также весьма скудны данные о протеолитических ферментах, участвующих в генезе и деградации регуляторных пептидов на конкретном этапе онтогенеза насекомых.

Объектом нашего исследования не случайно была выбрана личинка пчелы. Скорость метаболических процессов в течение семи дней ее развития не имеет аналогов в живой природе: личинка пчелы за максимально короткий период увеличивает свою массу в 1500 раз, что говорит о высоких темпах анаболических процессов, которые, несомненно, находятся под контролем протеолитических ферментов и регуляторных пептидов.

Используя современные методы определения концентрации пептидов и белков, мы установили динамику их изменения в процессе развития личинки. Судя по полученной картине распределения белков и пептидов в онтогенезе личинок, можно сказать, что наиболее высокая интенсивность процессов клеточной дифференцировки и морфогенеза происходит на вторые сутки развития личинки.

Изучение динамики регуляторных пептидов и протеолитических ферментов в онтогенезе личинок пчелиного расплода раскрывает

эволюционные механизмы становления регуляторного континуума насекомых, а также позволяет использовать личинки с максимальным содержанием регуляторных пептидов для создания препаратов, обладающих ноотропным и нейростимулирующим эффектом.

В ходе выполнения ВКР были сделаны следующие выводы:

1. Разработаны методы исследования активности кислых протеаз в личинках маток пчел.
2. Выявлено, что в личинках пчел содержится достаточное количество регуляторных пептидов и протеолитических ферментов, участвующих в их обмене белка в личинках пчелиного расплода на разных стадиях развития.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеницер, М.Л. Продукты пчеловодства как биоиндикатор радиоактивного загрязнения окружающей среды. / М.Л. Алексеницер Л.И. Боднарчук В.П. Кубайчук. // Апитерапия сегодня: Тез. докл. V науч.–практ. конф. по апитерапии, г.Сочи. – Рыбное, 2007. – С. 196–197.
2. Антонов, В.К. Химия протеолиза / В.К. Антонов. – М.: Наука 1991. – 158 с.
3. Ашмарин, И.П. Нейрохимия / И.П. Ашмарин, П.В. Стукалова. – М.: Институт биомедицинской химии РАМН, – 1996. – С. 243–250.
4. Ашмарин, И.П. Гликопролины как самостоятельные регуляторы и стабилизаторы других пептидов. / И.П. Ашмарин. // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2002. – №. 1. – С. 24–27.
5. Ашмарин, И.П. “Нейрохимия” / И.П. Ашмарин, Е.П. Каразеева. // Нейропептиды. – М.: Издательство института биомедицинской химии РАМН, 1996.– С.296–333.
6. Ашмарин, И.П. Регуляторные пептиды / И.П. Ашмарин. Обухова М.Р. БМЭ. – 1988. – Т. 29. – 312 с.
7. Бабичев, В.Н. Нейропептиды мозга и их нейроэндокринные эффекты / В.Н. Бабичев, С.Ф. Миронов. Пробл. эндокринол. – 1981. – № 3. – С. 78–85.
8. Бантишева, Л.Г. Продукты пчеловодства и наше здоровье / Л.Г. Бантишева. – Москва, 1992. – 448с.
9. Бердышев, Г.Д. Продукты пчеловодства в биологии и медицине / Г.Д. Бердышев. // Деп. в ВИНТИ 01.08.91. №3328–139–Пермь: Перм. Госмедин–т.
10. Билаш, Г.Д. Научно-исследовательский институт пчеловодства и апитерапия / Г.Д. Билаш, Н.И. Кривцов. // Апитерапия сегодня: Тез. докл. V науч.практ. конф. по апитерапии. – Рыбное, 1997. – С. 7–14.

11. Валуева, Т. А. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений / Т. А. Валуева, В. В. Мосолов. // Успехи биологической химии. – 2002. – Т. 42. – С. 129–193.
12. Вернигора, А.Н. Карбоксипептидаза Н мозга животных в норме и при действии стресс-факторов: Дисс. канд.биол.наук. – Днепропетровск, 1991. – 156 с.
13. Вернигора, А.Н. Механизмы регуляции активности и биологическая роль карбоксипептидазы Н - фермента процессинга нейропептидов / А.Н. Вернигора, М.Т. Генгин // Биохимия. – 1995. – Т. 60 – № 12. – С. 1491–1497.
14. Генгин, М. Т. Особенности структурно-функциональной организации и физико-химические свойства нелизосомальных пептидгидролаз мозга животных. Дисс.доктор.биол.наук. – Пенза, 2002. – С. 13–15.
15. Генгин, М.Т. Биопрепарат ноотропного и анксиолитического характера действия / М.Т. Генгин, А.А. Моисеева. // Открытые инновации, вклад молодежи в развитие региона: сб. Материалов регионального молодежного форума. – 2013. – Т. 2. – С. 78–80.
16. Генгин, М.Т. Влияние эмоционально-болевого стресса на активность КПН – фермента процессинга регуляторных нейропептидов головного мозга крысы / М.Т. Генгин, А.Н. Вернигора, Н.Н. Никишин // Физиол. Журн. – 1994. – Т.80, №3. – С. 23–27.
17. Гомазков, О. А. Функциональная биохимия регуляторных пептидов. / О. А. Гомазков. – М.: Наука, 1993. – 473с.
18. Гомазков, О.А. Мозг и нейропептиды / О.А. Гомазков. Справочно-информационное издание. – Москва, 1997. – 156 с.
19. Гомазков, О.А. Физиологически активные пептиды / О.А. Гомазков.– М.: Изд-во Инст. Биомед. Химии РАМН, 1995. – 143 с.
20. Гомазков, О.А. Функциональная биохимия регуляторных пептидов / О.А. Гомазков. – М.: Наука, 1993. –160 с.

21. Гомазков, О.А. Регуляция биосинтеза энкефалинов: биохимические и физиологические аспекты / О.А. Гомазков, О.О. Григорьянц. // Успехи совр. биол. – 1989. – № 1(4). – С. 109–124.
22. Григоренко, Г.А. Апитерапия рассеянного склероза / Г.А. Григоренко. // Апитерапия сегодня: Тез. докл. V науч. – практ. конф. – Рыбное, 1997. – 148–149.
23. Дмитриева, Н.В. Использование маточного молочка при перинатальной энцефалопатии у новорожденных детей / Н.В. Дмитриева, Е.П. Гузюкина, А.В. Дмитриев, Д.Г. Узбекова. // Апитерапия сегодня: Тез. докл. V науч. – практ. конф. – Рыбное, 1997. – С. 135–136.
24. Ерошенко, Т. М. Каскадные эффекты регуляторных пептидов / Т. М. Ерошенко, С. А. Титов, Л. Л. Лукьянова. // Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных. – 1991. – Т. 46. – С. 1-24.
25. Киселева, В.А. Биохимическая характеристика действия некоторых пищевых добавок, содержащих маточное молочко и другие биологически активные продукты пчеловодства / В.А. Киселева. Автореф. дисс. – Рязань, 1998. – 22 с.
26. Клуша, В.Е. Пептиды – регуляторы функций мозга. / В.Е. Клуша. – Рига, 1984. – 254 с.
27. Лазарян, Д. С. Сравнительное изучение аминокислотного состава пчел / Д. С. Лазарян // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т 36, №12. – С.42–44.
28. Лазарян, Д. С. Электрофоретическое изучение белкового состава расплода пчел и маточного молочка / Д.С. Лазарян, А.В. Щекунов, Е.М. Сотникова // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. –Т. 37, №1.
29. Лакин, Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. – М.: «Высшая школа», 1990. – 352 с.
30. Марри, Р. Биохимия человека: В 2-х томах. Пер. с англ. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. – М.: Мир, 1993. – С. 234-250.

31. Мишуковская, Г. С. Физиологические аспекты применения биостимуляторов для регуляции процессов развития организма пчелы медоносной в онтогенезе / Г. С. Мишуковская Автореф. дисс.докт.биол.н. – Москва, 2008. – 245с.
32. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб / Н. Н. Немова. – Петрозаводск: КНЦ РАН, 1996. – 104 с.
33. Немова, Н.Н. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов. / Н.Н. Немова, Л.А. Бондарева. // Биомедицинская химия. – 2008. – Т 54, вып. 1. – С. 42-57.
34. Регуляторные пептиды и биогенные амины: радиобиологические и онкорadiологические аспекты. – Обнинск: НИИМР, 1992. – 136 с.
35. Самотруева, М.А. Экспериментальные модели поведения / М.А. Самотруева, Д.Л. Теплый, И.Н. Тюренков. // Журнал функциональных и прикладных исследований. – 2009. – №2(27). – С 157–230.
36. Соловьев, В. Б. Лабораторный практикум «Физико- химические методы исследований»: учебно-методическое пособие для студентов 3 курса специальности «Биохимия» / В. Б Соловьев, М. Т. Генгин. – Пенза, 2012. – 72 с.
37. Стручков, В.И. Протеолитические ферменты в гнойной хирургии. / В.И Стручков. – Москва, 1970. – С.24–56.
38. Трофимова С. В. Регуляторное действие пептидов сетчатки / С. В. Трофимова. – СПб.: Фирма Коста, 2004. – 143 с.
39. Физиологическое и клиническое значение регуляторных пептидов. Пущино: Науч. центр биол. исслед., 1990.
40. Филиппович, Ю. Б. Ферменты насекомых. Биологическая химия (Итоги науки и техники). Ю. Б. Филиппович Н. И. Минин. – Т. 9. – М.: ВИНТИ, 1976. – 218 с.
41. Ягунов, П.Р. Апитерапия хронического простатита / П.Р Ягунов., М.Р. Хисматуллин Апитерапия сегодня: Тез. докл. VI науч.практ. конф. по апитерапии, Рыбное. – Рязань, 1998. –148 с.

42. Ярыгин, Д. В. Изучение комплекса протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов в грене тутового шелкопряда. / Д. В. Ярыгин. Дисс.канд.биол.наук. Москва, 2000. – С. 46–65.
43. Arden, S.D. The posttranslational processing of chromogranin a in the pancreatic islet - involvement of the eukaryote subtilisin Pc2 / S.D. Arden, N.G. Rutherford, P.C. Guest, W.J. Curry, E.M. Bailyes, C.F. Johnston, J.C. Hutton // *Biochem. J.* – 1994. – Vol. 298, № 3. – P. 521–528.
44. Azaryan, A.V. Distinct properties of prohormone thiol protease (Ptp) compared to cathepsin B, cathepsin L, and cathepsin H - evidence for Ptp as a novel cysteine protease / A.V. Azaryan., V.Y.H. Hook // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – Vol.314, № 1. – P. 171–177.
45. Azaryan, A.V. Unique cleavage specificity of prohormone thiol protease related to proenkephalin processing / A.V. Azaryan, V.Y.H. Hook // *FEBS Lett.* – 1994. – Vol. 341, № 2-3. – P. 197–202.
46. Bullet, P. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation / P. Bullet, R. Stocklin // *Protein Pept Lett.* – 2005. – Vol. 12. – P. 3-11.
47. Bullet, P. Antimicrobial peptides in insects; structure and function / P. Bullet, C. Hetru, J.L. Dimarcq, D. Hoffmann // *Dev. Comp. Immunol.* – 1999. – Vol. 23. – P. 329-344.
48. Chesselet, M.F. Carboxypeptidase H-like immunoreactivity in the striatum of cats and monkeys / M.F. Chesselet., V.Y. Hook // *Regul. Pept.* – 1988. – Vol. 20, № 2. – P. 151-159.
49. Chmielewski, M. Immunity of the honey bee (*Apis mellifera* L.) In parasitic infestations. / M. Chmielewski, K. Buczek, M. Pliszczyński // *Ann. Univ. M. Curie – Skłodowska.* – 2007. – Vol.62 – P. 115-119.
50. Cho, W.L. Purification and characterization of a lysosomal aspartic protease with cathepsin D activity from the mosquito. / W.L. Cho, T.S. Dhadda, A.S. Raikhel // *Insect Biochem.* – 1991. – Vol.21. – P. 165-176.

51. Coelho, J.R. Heat transfer and body temperature in honey bee (Hymenoptera:Apidae) drones and workers, Environ. / J.R. Coelho // Entomol. – 1991. – Vol. 20. – P 1627-1635.
52. Delage-Darchen, B. The enzymatic equipments of the various salivary and midgut glands of *Apis mellifica* workers and some african and american worker stingless bees / B. Delage-Darchen, J.R. de Conconi, I.C. // Aguilar Apidologie. – 1982– Vol. 13. – P. 265-273.
53. Devi, L. Tissue distribution of a dynorphin-processing endopeptidase / L.Devi // Endocrinology. – 1993. – Vol. 132, № 3. – P. 1139-1144.
54. Ed Menyhart, J. Endogenous regulatory peptides / Ed J. Menyhart. – Budapest, 1989. – P.89.
55. Fehlbauer, P., Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. / P. Bulet, L.Michaut, M.Lagueux, W.F.Broekaert, C.Hetru, J.A. Hoffmann, P. Fehlbauer. // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol. 269. – P. 3159-3163.
56. Free, J.B., Williams I. H. (1975) Factors determining the rearing and rejection of drones by the honeybee colony. / J.B. Free, I. H. Williams. Anim. Behav. – 1975. – Vol. 23. – P. 650-675.
57. Fricker, L.D. Carboxypeptidase E / L.D Fricker // Ann. Rev. Physiol. – 1988. – Vol. 50. – P. 309–321.
58. Fricker, L.D. Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenall chromaffin granules / L.D.Fricker, S.H. Snyder // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – Vol. 79. – P. 3886–3890.
59. Gainer, H. The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: the secretory vesicle hypothesis / H. Gainer, J.T. Russel, Y.P. Loh // Neuroendocrinology. – 1985. – Vol. 40, №1. – P. 171–184.
60. Gmeinbauer, R., Crailsheim K. Glucose utilization during flight of honeybee (*Apis mellifera*) workers, drones and queens. / Gmeinbauer, R., Crailsheim K J. Insect Physiol. – 1993. – Vol.39. – P. 959-967.

61. Gordon, M.W. Protein synthesis by isolated rat brain mitochondria and synaptosomes / M.W. Gordon, G.B. Deanin // *J. Biol. Chem.* – 1968. – Vol. 243. – P. 4222–4226.
62. Grzywnowicz, K., Ciołek A., Tabor A., Jaszek M., 2009. Profiles of body–surface proteolytic system of honey bee queens, workers and drones: Ontogenetic and seasonal changes in proteases and their natural inhibitors. *Apidologie* – №40(1). – P. 4-19.
63. Gui, Z.Z., Lee, K.S., Kim, B.Y. Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect metamorphosis. *BMC Dev. Biol.* – 2006. – Vol. 6, № 49.
64. Homma, K, Natori S: Identification of substrate proteins for cathepsin L that are selectively hydrolyzed during the differentiation of imaginal disc of *Sarcophaga peregrina*. *Eur J Biochem.* – 1996. – P. 443–447.
65. Hook, V.Y.H. Identification of zymogen and mature forms of human carboxypeptidase H. A processing enzyme for the synthesis of peptide hormones / V.Y.H. Hook, H.U. Affolter // *FEBS Lett.* – 1988. – Vol. 238, № 2. – P. 338–342.
66. Houseman, JG, Downe AER. Cathepsin D-like activity in the posterior midgut of Hemipteran insects. *Comp Biochem Phys B.* – 1983. – Vol. 75. – P. 509-512.
67. Huang, I.S. Cathepsin D isoenzymes from porcine spleens large scale purification and polypeptide arrangements / I.S. Huang, E. Tappel // *J. Biol. Chem.* – 1971. – Vol. 254. – P. 1405-1417.
68. Khan, A.R., Khazanovich–Bernstein, N., Bergmann, E.M., James, M.N.G. Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 1968-1975.
69. Lemos, FJ, Terra WR. Properties and intracellular distribution of a cathepsin D–like proteinase active at the acid region of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochem.* – 1991. – Vol. 21. – P. 457-465.
70. Li, XC, Luo GH, Han ZJ, Fang JC . Molecular cloning and analysis of aspartic protease (AP) gene in Ty3/gypsy retrotransposon in different geographical

populations of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) in China. *Acta Entomol Sinica*. – 2014. – Vol. 57. – P. 530-537.

71. Loh, Y.P. Pro-opiomelanocortin and pro-vasopressin converting enzyme in pituitary secretory vesicles / Y.P. Loh, N.P. Birch, M.G. Castro // *Biochimie*. – 1988. – Vol. 70, № 1. – P. 11-16.

72. Lowry, O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrought, A.G. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265-275.

73. Michelette, Concentration of hemolymph proteins during postembryonic worker development of Africanized honey bees in Brazil and Carniolans in Europe / E. Michelette, W. Engels // *Apidologie*. – 1995. – Vol. 26. – P. 101-108.

74. Supattapone, S. Purification and characterization of a membrane-bound enkephalin-forming carboxypeptidase, «enkephalin convertase» / S. Supattapone, L.D. Fricker, S.H. Snyder // *Neurochem.* – 1984. – Vol. 42, № 4. – P. 1017–1023.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.03.01 Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
 Г.А. Карпова
« 2 » 11 2017 г.

Задание

По ВКР студента: Смирнова Дениса Дмитриевича

Тема работы: «Активность катепсина D в личинках пчелиных маток»

Утверждена приказом по Университету от « 6 » декабря 201 6 г. № 1191/пк

Срок сдачи студентом законченной работы « 28 » мая 201 7 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Анализ литературы по теме исследования, написание введения и главы 1. Обзор литературы	Ноябрь 2016-апрель 2017	Выполнено
2	Подбор и теоритическое изучение предполагаемых методик исследования.	Февраль 2017	Выполнено
3	Отработка методов исследования.	Февраль-Март 2017	Выполнено
4	Статистическая обработка результатов.	Март-Апрель 2017	Выполнено
5	Написание глав 2,3 «Материалы исследования»;	Апрель-май 2017	Выполнено

Дата выдачи задания « 2 » 11 2016 г.

Руководитель С.В. / Соловьев В.Б.
(подпись)

Задание принял к исполнению Смирнов
(подпись)