

УДК 616.152.34.615.9

## ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНОВ И СОДЕРЖАНИЯ СРЕДНЕМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ В МЫШЦАХ МОРСКОГО ЕРША

Подунай Ю.А.<sup>1</sup>, Залевская И.Н.<sup>1</sup>, Руднева И.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, Украина,  
e-mail: grab-ua@yandex.ru

<sup>2</sup>Институт биологии южных морей НАН Украины, Севастополь, Украина

Приведены данные по содержанию некоторых биохимических маркеров в тканях разных возрастных групп морского ерша. Показана зависимость интенсивности окислительных процессов и активности протеолитических ферментов от возраста изучаемого объекта.

**Ключевые слова:** катепсин Д, среднемолекулярные олигопептиды, окислительная модификация белков, онтогенез, морской ерш.

### ВВЕДЕНИЕ

Течение различных патологических процессов и способность отвечать на стресс у животных в той или иной степени зависят от возрастных особенностей организма. Выяснение биохимических механизмов старения клетки является важным аспектом решения одной из фундаментальных проблем биологии. Разные периоды онтогенеза характеризуются различной степенью выраженности процессов окислительной модификации белков, содержания среднемолекулярных олигопептидов и активности протеолитических ферментов [1, 2].

Окислительная модификация белков – один из ранних индикаторов поражения тканей при свободнорадикальной патологии [3 – 5]. Окислительная модификация белков вызывается активными формами кислорода (АФК), которые образуются во всех аэробных клетках, при этом нарушение баланса в системе «окислительные – антиоксидантные процессы» может является причиной гибели клетки. Таким образом, пероксидация белков играет большую роль в процессе развития ряда патологических заболеваний и старения организма. [3, 6, 7].

Известно, что практически все метаболические реакции катализируются ферментами, поэтому регуляция метаболизма сводится к регуляции типа и интенсивности ферментативных функций. Протеиназы действуют на первом, ключевом этапе мобилизации белковых резервов клетки, поэтому велика их роль в механизмах биохимических адаптаций [2, 8]. Катепсин Д (К.Ф.3.4.4.23) является

одним из основных лизосомальных протеолитических ферментов клетки, изменение его активности может служить одним из показателей изменения биохимических процессов клетки при старении.

Считается, что основным токсическим субстратом, ответственным за возникновение стадии аутоагрессии эндотоксикоза, могут стать продукты клеточной дезорганизации, неполного распада и неферментного превращения белков крови и тканей. Они представлены в основном классом среднемолекулярных продуктов протеолиза и окислительных процессов или молекул средней массы (МСМ). Повышение уровня МСМ в крови обусловлено нарушением их элиминации из организма, усилением образования в тканях, либо сочетанием обоих механизмов. Среднемолекулярные олигопептиды (СМО), являясь продуктами распада белков, действуют как вторичные эндотоксины, вызывая расстройство различных физиологических процессов [9, 10].

На этом основании целью настоящей работы явилось изучение активности катепсина D, интенсивности процессов окислительной модификации белков и уровня содержания среднемолекулярных олигопептидов в мышцах морского ерша (*Scorpena porcus*), относящегося к разным возрастным группам.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили особи морского ерша (*Scorpena porcus*), возрастом от 2 до 7 лет, отловленные в прибрежной зоне Черного моря в акваториях г. Севастополя. Биохимические показатели определяли в гомогенатах скелетных мышц.

Принцип метода основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белка с 2,4 – динитрофенилгидразином (2,4 – ДНФГ) с образованием производных 2,4 – ДНФГ [11].

Осаждение мышечных белков осуществляли с помощью 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. К денатурированным белкам приливали равный объём 0,1М 2,4-ДНФГ, растворённого в 2М HCl. В контрольную пробу добавляли вместо 2,4-ДНФГ равный объём 2М HCl. Инкубацию осуществляли при комнатной температуре в течение 1ч. Затем пробы центрифугировали про 3000 об/мин в течение 15-20 мин. Осадок промывали три раза раствором этанол-этилацетат (1:1) для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, который не реагировал с карбонильными группами окисленных белков. Полученный осадок подсушивали с целью устранения оставшегося растворителя этанол-этилацетат и затем растворяли в 8М растворе мочевины. Мочевину приливали к осадку и выдерживали в кипящей бане в течение 5мин до полного растворения. Оптическую плотность регистрировали на спектрофотометре СФ-16 при длинах волн  $\lambda=346, 370, 430, 530\text{нм}$ .

Для оценки уровня среднемолекулярных олигопептидов к гомогенату мышечной ткани, разбавленному физиологическим раствором в отношении 1:10, добавляли 0,1 М фосфатный буфер (рН = 7,4). Общий объём пробы составлял 1,0 мл. После 15 минутной инкубации при 25°C белки осаждали 20% ТХУ и центрифугировали при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость отделяли и разбавляли физиологическим раствором в отношении 1:1. В надосадочной жидкости определяли среднемолекулярные кислоторастворимые пептиды в

ультрафиолетовой области спектров при длинах волн 254, 272, 280 нм против физиологического раствора [12]. Полученные результаты выражали в единицах оптической плотности (е.о.п.).

Активность катепсина D определяли модифицированным методом Дингла [13] в гомогенате мышечной ткани по гидролизу гемоглобина при pH 3,2. Инкубацию проводили при 37°C в течении 60 мин при встряхивании. Реакцию останавливали, добавляя 5%ТХУ, затем пробы центрифугировали в течении 15 мин. К 1 мл супернатанта добавляли 0,5 N NaOH для нейтрализации ТХУ и 0,5 мл реактива Фолина. Активность фермента выражали в условных единицах изменения оптической плотности при 750 нм.

Результаты статистически обрабатывались по Лакину (1989) [14] и с помощью компьютерной программы «ORIGIN 7.0». С целью выявления зависимости между исследуемыми параметрами рассчитывали коэффициент корреляции для каждой пары значений с помощью стандартной программы “EXCEL”, учитывая, что при коэффициентах корреляций  $0 < r < 0,3$  имеет место слабая связь,  $0,3 < r < 0,5$  – умеренная,  $0,5 < r < 0,7$  – значительная,  $0,7 < r < 0,9$  – сильная.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В мышечной ткани морского ерша были выявлены продукты окисления белков, которые прореагировали с 2,4-динитрофенилгидразоном. Основное количество образовавшихся динитрофенилгидразонов относится к альдегидо- и кетонпроизводным нейтрального характера. Уровень альдегидо-, а особенно кетонпроизводных основного характера значительно ниже (табл. 1).

**Таблица 1.**  
**Уровень окислительной модификации белков в мышцах морского ерша,**  
**е.о.п./г ткани ( $\bar{x} \pm s \bar{x}$ )**

Возраст объектов, годы	Длина волны, нм			
	346	370	430	530
2	2,40±0,08	3,91±0,09	1,50±0,06	0,09±0,007
3	2,73±0,08	9,01±0,12	2,02±0,06	0,54±0,020
4	4,77±0,06	6,13±0,10	3,77±0,08	1,13±0,041
5	5,98±0,07	8,40±0,13	4,75±0,08	1,45±0,032
6 - 7	7,58±0,11	10,58±0,15	4,89±0,09	0,87±0,007
Коэффициент корреляции, r	0,984	0,780	0,926	0,743

Как видно в таблице, обнаружено повышение уровня всех 2,4 – динитрофенилгидразонпроизводных у особей, относящихся к старшим возрастным группам. При всех длинах волн наблюдается положительная корреляция между уровнем образовавшихся продуктов окислительной модификации и возрастом особей ( $r=0,74 - 0,98$ ). Повышение интенсивности окислительной модификации

белков мышечной ткани исследуемых рыб фактически отображает общую направленность свободно-радикальных процессов в организме при старении.

Активность катепсина Д изменялась в зависимости от возраста особей морского ерша (рис. 1). Отмечено возрастание активности протеиназы у рыб возрастом от 2 до 4 лет ( $r=0,94$ ) и снижение показателя у старших возрастных групп рыб от 5 до 7 лет ( $r=-0,89$ ).

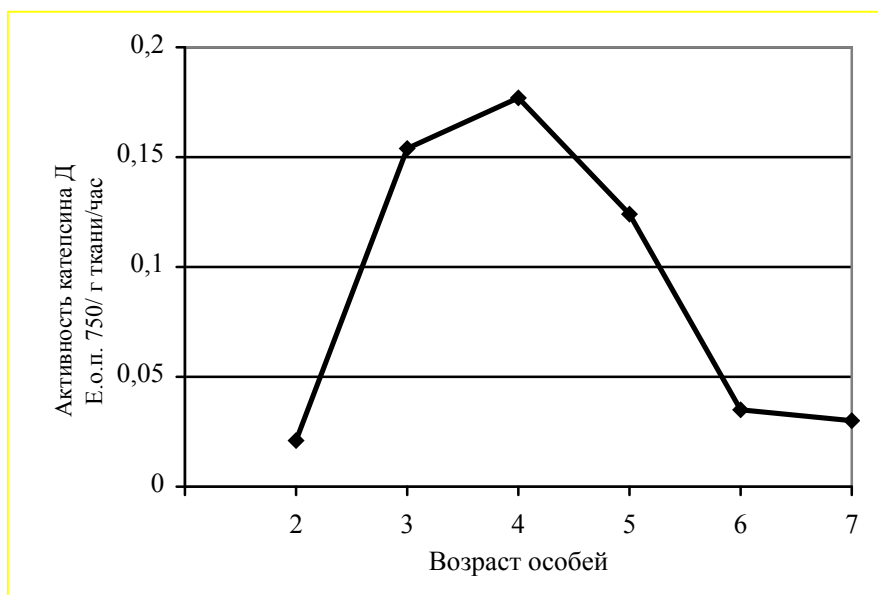


Рис. 1. Зависимость активности катепсина Д в мышцах морского ерша от возраста особей.

На основании полученных результатов можно заключить, что уменьшение активности изученного протеолитического фермента в клетках мышечной ткани у рыб с возрастом обусловлено в основном снижением защитных возможностей организма на более поздних стадиях онтогенеза.

Представители всех возрастных групп морского ерша характеризуются наличием в мышцах продуктов внутриклеточного протеолиза и фрагментации окисленных белков – среднемолекулярных олигопептидов (табл. 2).

Проведенный анализ показал повышение уровня молекул средней массы на более поздних стадиях онтогенеза ( $r = 0,83 - 0,97$ ). Увеличение уровня среднемолекулярных олигопептидов положительно коррелирует с интенсификацией процессов окислительной модификации белков и отрицательно с активностью катепсина Д, т.о. в данном случае основной вклад в образование СМО вносит именно фрагментация окисленных белков клетки. При окислении олигопептидов и белков гидроксильным радикалом и синглетным кислородом происходит фрагментация белков. Одновременно происходит разрушение триптофана. Триптофан и тирозин, входящие в состав тканевых белков могут подвергаться окислительным превращениям, которые сопровождаются модификацией аминокислотных остатков, образованием внутри- или межмолекулярных сшивок

между полипептидными цепями белков, снижением уровня триптофана и значительной продукцией битирозинфенола [5].

**Таблица 2.**  
**Уровень содержания среднемoleкулярных олигопептидов в мышечной ткани морского ерша, е.о.п./ г ткани ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )**

Возраст объектов, годы	Длина волны, нм		
	254	272	280
2	0,785±0,054	0,165±0,009	0,070±0,005
3	0,910±0,06	0,173±0,012	0,110±0,004
4	0,920±0,042	0,220±0,016	0,116±0,007
5	0,830±0,029	0,392±0,014	0,157±0,011
6 - 7	1,148±0,041	0,435±0,021	0,170±0,018
Коэффициент корреляции, r	0,830	0,943	0,978

Старение свойственно всем многоклеточным организмам. Оно характеризуется нарушением функциональных способностей организма. Это становится заметным в конце периода воспроизведения, который постепенно переходит в период старения. Последний имеет важную отличительную черту – в этом периоде невозможно воспроизведение. Кроме того уменьшается активность всех органов; ряд изменений, происходящих на молекулярном и клеточном уровнях приводит к нарушению функционирования организма в целом. Вероятнее всего, наблюдаемые изменения в активности ферментов внутриклеточного протеолиза, в процессе окислительной модификации белков и уровне содержания среднемoleкулярных олигопептидов в мышечной ткани морского ерша являются следствием модификации белкового метаболизма клеток как части развития биохимических механизмов старения организмов, выработанной и закрепленной в ходе эволюции.

В ходе старения происходит аккумуляция окисленных белков; в течение последней трети жизни происходит накопление карбонильных групп в белках. Также с возрастом происходит снижение активности протеолитических внутриклеточных ферментов, что может быть связано как с увеличением деградации белков, так и со снижением синтеза самого фермента.

Интенсификация процессов перекисного окисления белков и, как следствие, увеличение содержания среднемoleкулярных олигопептидов, являющихся маркерами эндогенной интоксикации, при одновременном снижении активности катепсина Д, могут характеризовать процессы старения у морских рыб.

### ВЫВОДЫ

1. В мышечной ткани морского ерша выявлены продукты окисления белков, интенсивность окислительных процессов положительно коррелирует с возрастом изучаемых особей.

2. Активность катепсина Д в мышцах скорпены возрастает к 4 годам и снижается у старших возрастных групп.
3. Повышение содержание среднемолекулярных пептидов отмечено на более поздних стадиях онтогенеза.
4. Показана зависимость интенсивности окислительных процессов и активности протеолитических ферментов от возраста изучаемого объекта, что может характеризовать процессы старения у рыб.

#### Список литературы

1. Синицкая Н. С. Роль пептидов в свободно-радикальном окислении и старении организма / Н. С. Синицкая, В. Х. Хавинсон // *Успехи совр. биологии.* – 2002. – Т. 122. – Вып. 6. – С. 557.
2. Немова Н.Н. Свойства и физиологическая роль внутриклеточных протеиназ в тканях рыб / Н.Н. Немова // *Усп. совр. биол.* – 1991. – Т. III. – Вып. 6. – С. 948-954.
3. Davis B. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins / B. Davis // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1964. – V. 121, № 11. – P. 404-407.
4. Зенков Н.К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З Ланкин., Е.Б. Меньщикова – М.: МАИК, 2001. – 343 с.
5. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) / Е. Е Дубинина., М. Г.Морозова, Н. В. Леонова [и др.] // *Вопр. мед. химии.* – 2000. – Т. 46, № 4. – С. 398-409.
6. Лушак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма / В.И. Лушак // *Биохимия.* – 2007. – Т. 72, № 8. – С. 995-1017.
7. Пат. 27484 UA, МПК G 01 N 33/18. Способ биологической оценки токсичности морской среды / Руднева И. И., Вахтина Т. Б., Скуратовская Е.Н., Залевская И.Н., Граб Ю.А. - № a200603935; заявл. 10.04.2006; опубл. 12.11.07, Бюл. № 18.
8. Effects of the dietary intoxication by mercury salts on cysteinic proteinase in rat tissues and detoxic role of absorbents / L.A.Bondareva, N.N.Nemova, E.I.Kaivarainen [et al.] // *Proceeding of 3<sup>rd</sup> Intern. Symposium “Trace Elements in Human: New Perspectives”*, Greece, Athens, 2001. – P. 98-105.
9. Бобров В.М. Молекулы средней массы - показатель интоксикации при гнойно-воспалительных заболеваниях ЛОР-органов / В.М. Бобров, С.А. Шишкин // *Вестник оториноларингологии.* – 1999. – №1. – С.33-34.
10. Карякина Е.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений / Е.В.Карякина, С.В. Белова // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2004. – №3. – С. 3-8.
11. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов [и др.] // *Вопр. мед. химии.* – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24.
12. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е.Е.Дубинина, С.В. Гавровская, Е.В. Кузьмич и др. // *Биохимия.* – 2002. –67, №3. – С. 413 – 421.
13. Дингл Дж. Методы исследования / Дингл Дж. – М.: Мир, 1980. – 344 с.
14. Лакин Р.Ф. Биометрия / Лакин Р.Ф. – М: Высшая школа, 1990. – 352 с.

**Подунай Ю.О. Вікова динаміка активності катепсинів і зміст середньомолекулярних пептидів в м'язах морського йоржа / Ю.О. Подунай, І.М. Залевська, І.І. Руднева // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2009. – Т. 22 (61). – № 4. – С. 128-134.**

В процесі онтогенезу стійкість гідробіонтів до дії стресових чинників істотно варіює. Кожен період онтогенезу характеризується різною інтенсивністю процесів окиснювальної модифікації білків, рівня накопичення середньомолекулярних пептидів в тканинах і активністю лізосомальних протеїназ клітини. Встановлено збільшення активності катепсина Д в м'язах особин морського йоржа (*Scorpena porcus*) у віці від 2 до 4 років і зменшення у рыб у віці від 5 до 7 років. Відмічено зростання

інтенсивності окислювальної модифікації білків і рівня змісту молекул середньої маси у старших вікових груп. Інтенсифікація процесів перекисного окислення білків і збільшення змісту середньомолекулярних пептидів при одночасному зниженні активності катепсина Д можуть характеризувати процеси старіння у морських риб.

**Ключові слова:** катепсин Д, середньомолекулярні пептиди, окиснювальна модифікація білків, онтогенез, морський йорж.

**Podynay U.A. Age dynamics of activity of cathepsin d and maintenances of low weight molecules in muscles of marine ruff / U.A. Podynay, I.N. Zalevskaja, I.I. Rydneva // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2009. – V.22 (61). – № 4. – P. 128-134.**

In the process of ontogenesis stability of fishes to the action of stress factors varies substantially. Every period of ontogenesis is characterized by different intensity of processes of oxidative modify of proteins, level of accumulation of low weight molecules in muscles and by activity of proteolytic enzymes of cells. Multiplying activity of cathepsin D the muscles of individuals of marine ruff (*Scorpena porcus*) in age from 2 to 4 years and diminishing for fishes in age from 5 to 7 years was showed. Reliable growth of intensity of oxidative modify of proteins and level of maintenance of low weight molecules is marked in the senior groups of ages. Intensification of processes of oxidation of albumens and multiplying maintenance of low weight molecules at a simultaneous decline activity of cathepsin D can characterize the processes of senescence for saltwater fishes.

**Keywords:** cathepsin D, low weight molecules, oxidative modify of proteins, ontogenesis, marine ruff.

*Поступила в редакцію 02.12.2009 г.*