

ЗНАЧЕННЯ КАТЕПСИНУ В ТА ЙОГО ІНГІБІТОРІВ В РЕГУЛЯЦІЇ ОБМІННИХ ПРОЦЕСІВ У КУРЧАТ-БРОЙЛЕРІВ ЗА ДІЇ РЕЧОВИН ГУМІНОВОЇ ПРИРОДИ

Л. М. Степченко

Дніпропетровський державний аграрний університет

Представлені результати щодо виділення з тканини печінки курчат-бройлерів цистеїнової протеїнази катепсину В, що бере участь в катаболічних процесах обміну білків, та його низькомолекулярного термостабільного інгібітору. Досліджений регуляторний вплив кормової біологічно активної добавки гумінового походження «Гідрогумат» на активність катепсину В та фізико-хімічні особливості його ендogenousного інгібітору. Встановлено, що за дії гумінових речовин в організмі курчат відбуваються зміни фермент-інгібіторних взаємодій в реалізації мультиферментних програм в поліфункціональних клітинах печінки, що забезпечує перехід гомеостазу на якісно новий рівень, який відповідає більш високій продуктивності тварин.

Ключові слова: КАТЕПСИН, ІНГІБІТОРИ, РЕГУЛЯЦІЯ, ОБМІННІ ПРОЦЕСИ

Одним із способів прискорення росту і розвитку молодняку птиці є додавання до його раціону комплексу гумінових речовин. Введення в організм птиці кормових біологічно активних добавок «Гумат натрію» і «Гідрогумат», що містять натрієві солі гумінових кислот, призводить до підвищення рівня обміну речовин, впливає на засвоєння компонентів корму та забезпечує збільшення виходу продукції [1, 2, 3].

Активация обмінних процесів пов'язана насамперед з посиленням процесів біосинтезу білків. Метаболізм білків представлений двома взаємодіючими частинами — анаболічною і катаболічною. Поряд з анаболізмом білків вагому роль відіграє їх катаболізм, оскільки продукти розщеплення білків є не тільки джерелом для пластичного і енергетичного обміну, а й як матеріал для регуляторних пептидів (цитомединів тощо). Інструментом внутрішньоклітинного і обмеженого протеолізу вважаються катепсини, що локалізовані в лізосомах, оскільки основною їх функцією є участь в катаболізмі білкових молекул в процесі оновлення. В клітинах організму тварин катепсини діють кооперативно, ведуча роль серед яких належить цистеїновим протеїназам, зокрема катепсину В [4, 5].

Регуляторами активності внутрішньоклітинних пептидгідролаз є їх ендogenousні інгібітори. На сьогодні суттєво розширені уявлення про їх властивості, будову, механізм дії. Інгібітори можуть впливати на активність пептидгідролаз, які, окрім деструкції білка, можуть брати участь в механізмі секреції білкових речовин, захисних реакцій організму, а також в процесі реалізації генетичної інформації [6, 7, 8]. Роль фермент-інгібіторних взаємодій в клітині при застосуванні кормових добавок гумінової природи, що мають поліфенольну хімічну структуру, вивчена недостатньо. У зв'язку з цим метою даної роботи є дослідження впливу кормової біологічно активної добавки «Гідрогумат» гумінового походження на процеси внутрішньоклітинного протеолізу в печінці курчат-бройлерів, зокрема активності катепсину В у тканині печінки та її субклітинних структурах, а також особливостей його взаємодії з власними інгібіторами.

Матеріали і методи

Експериментальна частина роботи була проведена на курчат-бройлерах в умовах птахокомбінату «Дніпровський» Нікопольського району Дніпропетровської області. Для проведення досліду було сформовано дві групи птиці — контрольну і дослідну — по 100 курчат у кожній за принципом аналогічних груп. Птиця контрольної і дослідної груп одержувала раціон, що був збалансований за основними елементами живлення, але курчатам-бройлерам дослідної групи до складу кормосуміші вводили кормову біологічно активну добавку «Гідрогумат» в оптимальній дозі [3] впродовж трьох тижнів, починаючи з 20 дня вирощування. По закінченню строку введення кормової добавки до раціону птиці у 6-ти курчат з кожної групи відбирали печінку, яку промивали від крові 0,25 М розчином сахарози, гомогенізували в 0,005 М трис-буфері з рН 7,2, що містив 0,2 % неіонний детергент Тритон Х-100, у співвідношенні 1:9. Обробку матеріалу здійснювали на холоді при температурі середовища 0–4 °С [9].

Субклітинне фракціонування гомогенату тканини печінки курчат-бройлерів контрольної та дослідної груп проводили за де Дювом [9]. При цьому були одержані наступні фракції: ядерна (1300g, 10 хв), важких (12000 g, 10 хв) та легких (20000 g, 20 хв) мітохондрій, мікросомно-розчинна. В 10 %-ому екстракті тканини та досліджуваних субклітинних фракціях печінки курчат після обробки неіонним детергентом Тритон Х-100 (0,2 %) визначали активність катепсину В з використанням в якості субстрату N, а-бензоїл-D, l-аргінін-4-нітроанілід-гідрохлориду (БАПНА). Питому активність ферменту в 1,0 мл інкубаційної суміші виражали в мікромолях 2-нітроаніліну, відщепленого за 60 хвилин інкубації при 37 °С на 1 мг білка [4]. Вміст білка в пробах визначали за методом Бредфорда [10].

Інгібітор з тканини печінки курчат-бройлерів виділяли та очищували в чотири етапи. Спочатку проводили фракціонування сульфатом амонію в два етапи (30 і 80 %) шляхом висалювання при 0–4 °С. Осад, що був одержаний після центрифугування (8000 об/хв., 30 хв), знесолювали і використовували в якості частково очищеного ферментного препарату катепсину В, який у подальшому використовували для визначення інгібіторної активності. Супернатант, що містив суміш низькомолекулярних білків, в тому числі інгібіторів, після знесолення за методом діалізу впродовж 48 годин при 0–4 °С проти 0,1 М Na-ацетатного буферу з рН 6,0, що містив 0,5 М натрію хлориду, підвергали гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-50, іонообмінної хроматографії на колонці ДЕАЕ з сефадексом А-50 та гель-хроматографії на колонці з сефадексом G-75.

Для оцінки інгібіторної активності проводили попередню інкубацію досліджуваних фракцій інгібітору з частково очищеним ферментним препаратом катепсину В при рН 6,0 і $t=37$ °С впродовж 15 хвилин, потім до інкубаційної суміші добавляли субстрат БАПНА і реєстрували остаточну активність ферменту. Молекулярну масу очищеного інгібітору визначали за методом гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-75. В якості стандартів використовували наступні препарати : альбумін з сироватки людини (68 кДа), трипсин (24 кДа), соєвий інгібітор трипсину (20,5 кДа), рибонуклеаза (12,7 кДа). Про відносний вміст білка судили за світлопоглинанням при $\lambda=280$ нм. Крім того, визначали термостабільність одержаного інгібітору за впливу денатуруючого фактору (100 °С, 15 хв).

Одержані результати досліджень опрацьовували біометрично з використанням t-критерію Ст'юдента.

Результати й обговорення

При визначенні питомої активності цистеїнового катепсину В в екстракті тканини печінки курчат-бройлерів встановили, що у птиці дослідної групи її значення перевищувало контрольний показник в 2,0 рази ($p<0,001$), а вміст білка при цьому підвищувався на 9,1 % ($p<0,05$) (табл.).

Активність катепсину В (мкг рНА/мг білка) і вміст білка (мг/мл) в екстракті та субклітинних фракціях тканини печінки курчат-бройлерів за дії Гідрогумату ($M \pm m$, $n=6$)

Показник		Група	
		контрольна	дослідна
Екстракт	білок	1,54±0,06	1,68±0,04*
	активність	0,37±0,06	0,75±0,04***
Ядерна фракція	білок	1,74±0,06	1,77±0,09
	активність	0,34±0,03	0,84±0,05***
Фракція важких мітохондрій	білок	1,51±0,08	1,83±0,14
	активність	0,36±0,07	0,74±0,16*
Фракція легких мітохондрій	білок	0,01±0,001	0,02±0,004*
	активність	0,35±0,04	0,78±0,20*
Мікросомно-розчинна фракція	білок	1,49±0,07	2,24±0,09***
	активність	0,36±0,06	0,81±0,08***

Примітка: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ порівняно з даними контрольної групи

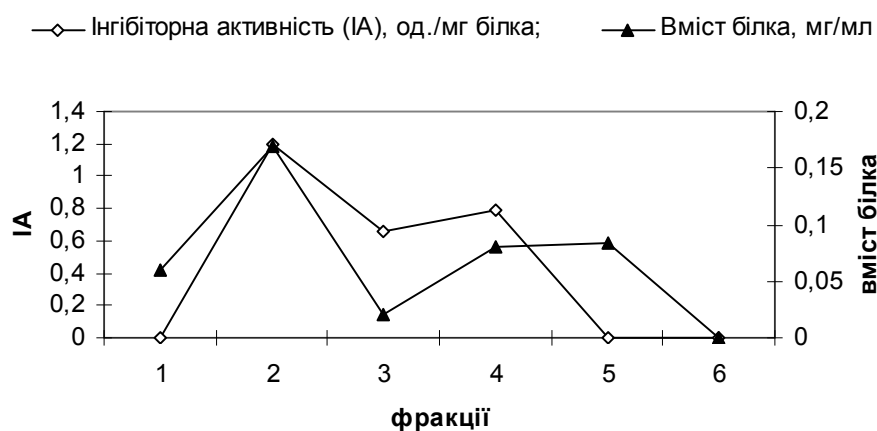
У тканині печінки курчат-бройлерів, які одержували Гідрогумат, спостерігали зміну активності і локалізації досліджуваного катепсину в різних субклітинних фракціях, а також вмісту білка. Так, в ядерній фракції тканини печінки курчат дослідної групи активність катепсину В була вища в 2,5 раза ($p < 0,001$) за контрольний показник, тоді як вміст білка в цій фракції не мав вірогідної різниці у порівнянні його у птиці контрольної та дослідної груп. У фракціях важких і легких мітохондрій печінки дослідної птиці активність катепсину В перевищувала контрольні значення відповідно в 2,0 ($p < 0,05$) і 2,2 раза ($p < 0,05$). Вміст білка в цьому випадку у фракції важких мітохондрій печінки зазнавав лише тенденційного підвищення, а у фракції легких мітохондрій підвищувався в 2 рази ($p < 0,05$). У мікросомно-розчинній фракції печінки дослідних курчат досліджувані показники були відповідно у 1,5 ($p < 0,001$) і 2,25 раза ($p < 0,001$) вищими у порівнянні з птицею контрольної групи. Тож, вірогідне підвищення вмісту білка і активності катепсину В у тритонових екстрактах тканини та в різних субклітинних фракціях печінки курчат-бройлерів, в раціон яких вводили кормову біологічно активну добавку «Гідрогумат», ймовірно пов'язане з тим, що печінка є центром метаболізації гумінових речовин [11]. При цьому спостерігається активація синтезу кислих гідролаз, а також можливе підвищення кількості як первинних, так і вторинних лізосом. Крім того, зазначений факт може свідчити про регулюючий вплив Гідрогумату на білковий обмін у швидкоростучої птиці та інтенсивний синтез катепсину В за рахунок регуляції його активності через систему цАМФ [11].

Причиною підвищення активності лізосомального катепсину В у тканині печінки курчат дослідної групи також може бути зміна фермент-інгібіторної взаємодії в клітинах. Лізосомні катепсини та їх інгібітори, як правило, просторово розділені в активній живій клітині, мають різну компартменталізацію. Але є дані про те, що інгібітори катепсину В та ще двох цистеїнових протеїназ, що локалізовані в лізосомах, присутні в клітинах організму кролика як в цитозолі, так і у внутрішньоклітинному просторі [12].

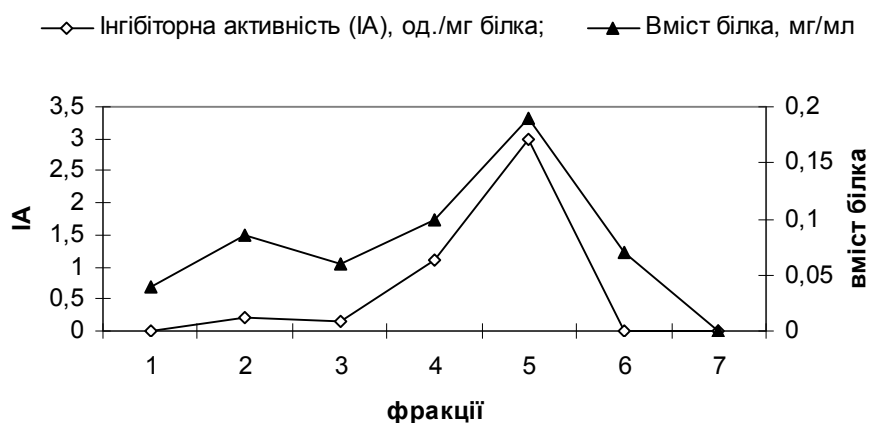
З метою підтвердження дії гумінових речовин на фермент-інгібіторну взаємодію одержували частково очищений ферментний препарат катепсину В та його інгібіторні фракції. Частково очищений ферментний препарат катепсину В отримували з осаду при центрифугуванні після другого етапу висолювання та розчинення в 0,5М NaCl, що містив 1,0 ммоль 2-меркаптоетанолу. При цьому супернатант, що містив суміш низькомолекулярних білків використовували як інгібіторну фракцію для виділення і часткової очистки інгібітору катепсину В. У ферментному препараті, що був одержаний з печінки курчат-бройлерів контрольної групи, вміст білка становив 330 мг/мл проти 400

мг/мл в дослідній пробі, водночас питома активність катепсину В відповідно складала 4,84 і 12,5 од./г білка. Вміст білка і залишкова активність катепсину В в інгібіторній фракції печінки курчат контрольної групи складала 3,3 мг/мл і 4,24 од./г білка відповідно, тоді як в досліді — 4,3 мг/мл і 11,4 од./г білка. Одержані результати свідчать про те, що в тканині печінки курчат-бройлерів дослідної групи активізувались процеси синтезу білка на тлі активації цистеїнових протеїназ. Можливо при цьому відбувається зміна ферментативних програм в поліфункціональних клітинах печінки за рахунок деградації раніше синтезованих ферментів та індукції нових, що є важливим ланцюгом в регуляції фізіологічних функцій, в яких суттєву роль відіграють протеїнази та їх інгібітори.

При гелі-фільтрації діалізату інгібіторної фракції печінки курчат-бройлерів контрольної та дослідної груп на колонці з сефадексом G-50 виявили різницю в об'ємах фракцій з інгібіторною активністю до частково очищеного ферментного препарату катепсину В (рис. 1).



А

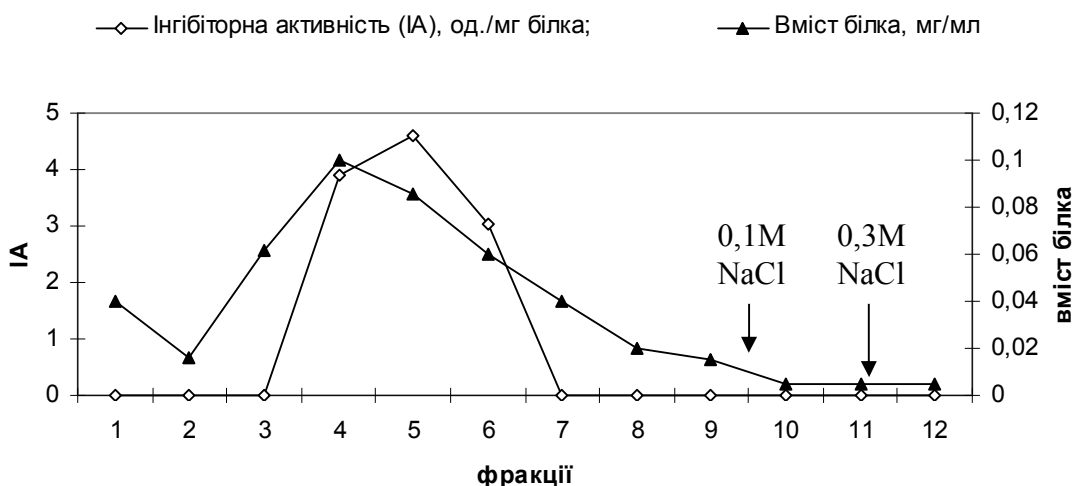


В

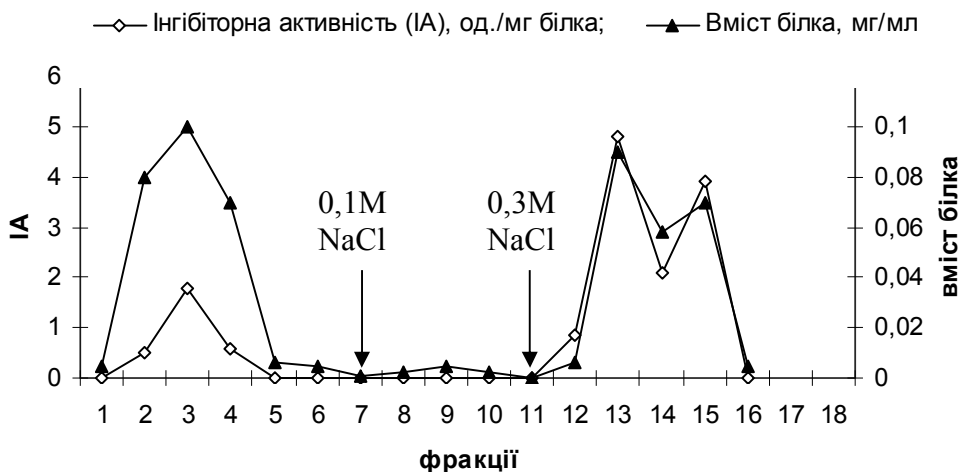
Рис. 1. Гелі-хроматографія на сефадексі G-50 відділюваної сульфатної фракції екстракту печінки курчат-бройлерів контрольної (А) та дослідної (В) груп

Так, з печінки курчат-бройлерів як контрольної, так і дослідної груп було виділено дві фракції, що володіли інгібіторною активністю щодо катепсину В. Водночас інгібіторна активність в першій фракції була вища в печінці курчат контрольної групи в порівнянні з дослідом, тоді як в другій фракції інгібіторна активність була значно вища в печінці курчат дослідної групи. З першою фракцією, що була одержана з печінки курчат-бройлерів

контрольної та дослідної груп, а також з другою фракцією, одержаної з печінки дослідних курчат, проводили подальшу очистку. Ендогенний інгібітор очищали за допомогою іонообмінної хроматографії на колонці з ДЕАЕ сефадексом А-50 (рис. 2). Білки, що не зв'язалися з іонообмінником, вимивались 0,1 М Na-фосфатним буфером (рН 6,0), яким була врівноважена колонка. Елюцію адсорбованого білка здійснювали ступеневим нанесенням буферних розчинів з різною йонною силою (0,1 М, 0,3М NaCl) для більш швидкої та ефективної очистки сорбованого інгібітору.



А



В

Рис. 2. Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ сефадексі А-50 першої інгібіторної фракції з печінки курчат-бройлерів контрольної (А) та дослідної (В) груп

Аналізуючи експериментальні дані, що представлені на рисунку 2, відмітили, що на цій стадії виділення і очистки ендогенного інгібітору з печінки контрольних курчат одержані фракції з інгібіторною активністю, що виходять разом з білком, який не зв'язався з іонообмінником. При нанесенні екстракту з печінки дослідних курчат також була виділена подібна фракція у незв'язаному білковому піку. Крім того, були виявлені ще дві фракції, що мали інгібіторну активність і співпадали з білковими профілями після застосування буферу з

0,3 М розчином NaCl. Цей факт може свідчити про наявність в тканині печінки птиці дослідної групи двох додаткових форм інгібітору, що можуть відрізнятися від основної форми ізоелектричними точками, так як концентрація розчину натрію хлориду, яка необхідна для елюції білків в значній мірі залежить від цього фактору.

При дослідженні другої фракції (рис. 3), одержаної з печінки курчат-бройлерів, яким до раціону вводили кормову біологічно активну добавку «Гідрогумат», де проявлялась основна інгібіторна активність, встановили, що білок виходить в незв'язаному об'ємі колонки з ДЕАЕ сефадексом А-50.

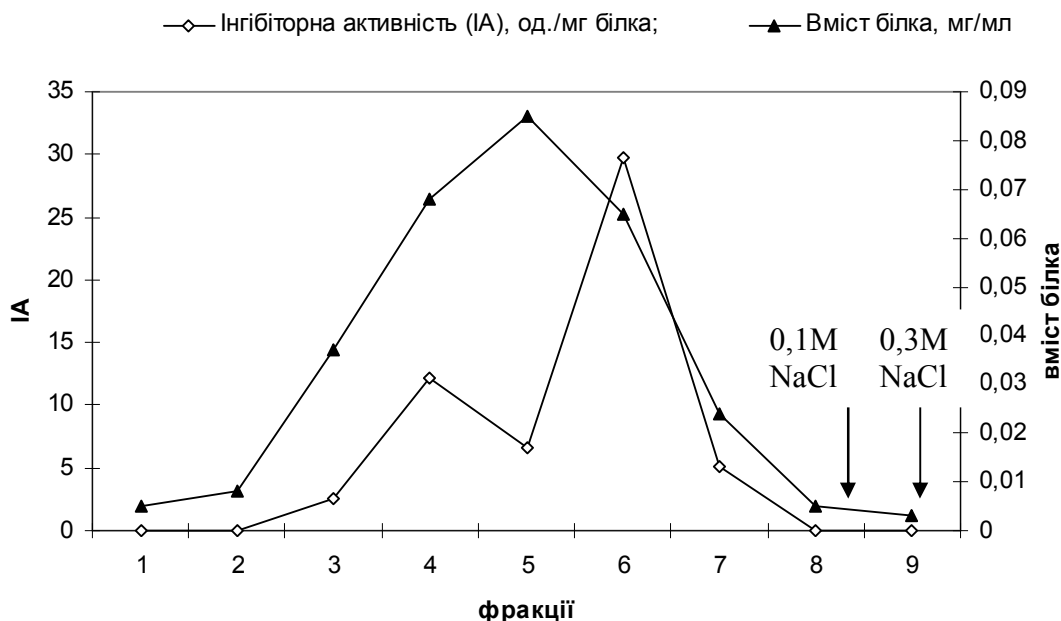


Рис. 3. Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ сефадексі А-50 другої інгібіторної фракції з печінки курчат-бройлерів дослідної групи

У цьому випадку одному білковому піку відповідають дві фракції інгібітору, активність якого майже в 10 разів вища за активність в першій фракції, одержаної з печінки курчат контрольної та дослідної груп. Цей факт свідчить про те, що гумінові сполуки сприяють підвищенню активності інгібітору до катепсину В з одночасною зміною його фізико-хімічних характеристик.

Молекулярні маси одержаного інгібітору катепсину В із незв'язаної з іонообмінником білкової фракції печінки курчат-бройлерів контрольної та дослідної груп виявилась достатньо близькими і відповідали 10 кДа. Одержані результати узгоджуються з наявною в літературі інформацією щодо молекулярних мас інгібіторів катепсину В, що були виділені з печінки щурів 11,5 кДа, селезінки людини 12,3 кДа, нирки людини 12 кДа та свині 11 кДа [12, 13]. Крім того, виділений інгібітор зберігав свою активність щодо цистеїнових протеїназ при преінкубації його впродовж 15 хв при 100 °С.

Отже, за впливу гумінових речовин в організмі курчат спостерігаються зміни фермент-інгібіторних взаємодій в реалізації мультиферментних програм в поліфункціональних клітинах печінки, яка є центром регуляції в проміжному обміні речовин. Перебудова регуляції процесів катаболізму в клітині за впливу гумінових речовин має складний і багатоступеневий характер, що визначається синтезом ферментів, міцністю зв'язків з внутрішньоклітинними структурами, а також фермент-інгібіторною взаємодією. Тож, гумінові сполуки ймовірно можуть активувати посттрансляційну модифікацію білків,

брати участь в активації реконструктивної функції лізосом. При цьому відбувається ієрархічно організовані і взаємопов'язані перебудови в інтенсивності білкового, а також поєднаних з ним обмінів за дії метаболітів-посередників, що можуть з'являтися в клітині в результаті впливу гумінових речовин або їх фрагментів на різні структури клітини, що, в свою чергу, відповідає якісно новому рівню гомеостазу, який відповідає збільшенню кількості отриманої продукції.

Висновки

1. Встановлений регуляторний вплив кормової біологічно активної добавки «Гідрогумат» на активність цистеїнової протеїнази катепсину В та фізико-хімічні особливості його інгібіторів в тканині печінки курчат-бройлерів.

2. За дії Гідрогумату в субклітинних фракціях тканини печінки курчат-бройлерів відбувається підвищення активності катепсину В та вмісту білка, що вказує на активізацію процесів синтезу білка на тлі активації цистеїнових протеїназ.

3. З тканини печінки курчат-бройлерів було виділено дві фракції з інгібіторною активністю до катепсину В. Встановлена дія Гідрогумату на величину активності інгібітору та його фізико-хімічні характеристики.

4. Виділений інгібітор був термостабільним і мав молекулярну масу в межах 10 кДа.

5. Гумінові речовини при задаванні їх в якості кормової добавки до раціону курчат-бройлерів зумовлюють в їх організмі зміни фермент-інгібіторних взаємодій в реалізації мультиферментних програм у поліфункціональних клітинах печінки, що забезпечує перехід гомеостазу на якісно новий рівень, який відповідає більш високій продуктивності тварин.

Перспективи подальших досліджень. Вивчення впливу кормової біологічно активної добавки гумінового походження «Гідрогумат» на активність інших ферментів.

L. M. Stepchenko

SIGNIFICANT OF CATHEPSIN B AND ITS INHIBITORS IN THE REGULATION OF METABOLIC PROCESSES IN BROILER UNDER THE INFLUENCE OF HUMIC SUBSTANCES OF NATURE

S u m m a r y

The results of the allocation of the liver tissue of broiler chicken cysteine proteinases cathepsin B, which participates in the catabolic processes of protein metabolism, and its low molecular thermostable inhibitor. Studied regulatory effect of biologically active food additives humic origin "Gidrogumat" on the activity of cathepsin B and physicochemical characteristics of its endogenous inhibitor in the liver tissue of broiler chickens. Found that the action of humic substances in the body of chickens there are changes of the enzyme-inhibitor interactions in the realization of multifunctional multienzyme programs in liver cells, which ensures homeostasis of transition to a qualitatively new level, which corresponds to the higher productivity of animals.

Dnipropetrovsk State Agrarian University

Л. М. Степченко

ЗНАЧЕНИЕ КАТЕПСИНА В И ЕГО ИНГИБИТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ВЕЩЕСТВ ГУМИНОВОЙ ПРИРОДЫ

А н н о т а ц и я

Представлены результаты о выделении с ткани печени цыплят-бройлеров цистеиновой протеиназы катепсина В, который принимает участие в катаболических процессах обмена белков, и его низкомолекулярного термостабильного ингибитора. Исследовано регуляторное влияние кормовой биологически активной добавки гуминового происхождения «Гидрогумат» на активность катепсина В и физико-химические особенности его эндогенного ингибитора в ткани печени цыплят-бройлеров. Установлено, что при действии гуминовых веществ в организме цыплят происходят изменения фермент-ингибиторных взаимодействий в реализации мультиферментных программ в полифункциональных клетках печени, что обеспечивает переход гомеостаза на качественно новый уровень, который соответствует более высокой продуктивности животных.

1. *Степченко Л. М.* Гумінові речовини як перспективні кормові добавки в птахівництві / Л. М. Степченко, Е. О. Лосева, М. В. Скорик, О. В. Гончарова // Птахівництво: Міжвід. темат. наук. зб. ІІ УААН. — Харків, 2006. — Вип. 58. — С. 308–311.
2. *Panina O.* Increase of productivity of farm animals with the help of oxidate, a peat humic preparation / O. Panina, T. Zilyakova // Moorthérapie 2000 Peat Therapy on it's Way into the next Millenium. — Bad Kissinger (Germany), 2000. — P. 233–244.
3. *Степченко Л. М.* Использование гидрогумата в качестве стимулятора роста цыплят-бройлеров : сб. науч. тр «Фармакологические и токсикологические аспекты применения лекарственных веществ в животноводстве» / Л. М. Степченко. — М. : Моск. вет. акад., 1992. — С. 11–12.
4. *Веремеенко К. Н.* Протеолиз в норме и патологии / К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. — К. : Здоров'я, 1988. — 198 с.
5. *Neurath H.* Proteolytic enzymes, past and future / H. Neurath // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1999. — N 96. — P. 10962–10963.
6. *Мосолов В. В.* Белковые ингибиторы как регуляторы процессов протеолиза / В. В. Мосолов. — М. : Наука, 1983. — 238 с.
7. *Turk B.* Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators / B. Turk, D. Turk, G. S. Salvesen // Curr. Pharm. Des. — 2002. — N 8. — P. 1623–1637.
8. *Rossi A.* Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome / A. Rossi, Q. Deveraux, B. Turk, A. Sali // Biol. Chem. — 2004. — N 385. — P. 363–372.
9. *Покровский А. А.* Лизосомы / А. А. Покровский, В. А. Тутельян. — М. : Наука, 1976. — 382 с.
10. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantification of microgramme quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
11. *Степченко Л. М.* Механізми формування біопродукції у быстрорастущей птиці под впливанням препаратів гуминової природи / Л. М. Степченко // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. — Дніпропетровськ, 2005. — № 2. — С. 237–241.
12. *Оглобина О. Г.* Кислотостабильные белки — ингибиторы протеиназ млекопитающих. Структура, свойства, биологическая роль / О. Г. Оглобина // Биохимия. — 1982. — Т. 47. — С. 1560–1587.
13. *Sumi H.* Inhibitors of acrosin and SH-proteasa in normal human urine / H. Sumi, M. Toki // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. — 1981. — Vol. 167, N 4. — P. 530–535.

Рецензент: доктор сільськогосподарських наук, член-кореспондент НААН України Ратич І. Б.