

ВПЛИВ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ ТРИПСИНОПОДІБНОЇ ГІДРОЛАЗИ ІЗ *Drosophila melanogaster*

І. Л. РИЖКО, Н. В. МОТРУК, С. А. ПЕТРОВ

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, Україна;
e-mail: kira_ril@mail.ru

Досліджували вплив солей важких металів на частково очищену методами висолювання, гель-хроматографії та електрофорезу трипсиноподібну пептидгідролазу личинок дрозофіли. Вплив металів на активність ензимів не завжди обумовлений їх прямою взаємодією з каталітичним центром. Встановлено, що найбільшим інгібуючим ефектом характеризується хлорид кадмію, а найменшим – хлорид цинку. Оскільки у всіх випадках було використано виключно хлориди металів, можна вважати доведеним диференційований вплив саме іонів металів, а не іонів хлору на прояв *in vitro* амідазної активності трипсиноподібної пептидгідролази личинок дрозофіли, що в цілому узгоджується з ефектами дії цих іонів на протеолітичну систему травлення на рівні живого організму.

Ключові слова: важкі метали, пептидгідролаза, дрозофіла.

Регулювання активності ензимів комах різними ефекторами вивчено недостатньо [1, 2], незважаючи на те, що відомо багато біологічних процесів, в яких ензими з протеолітичною активністю відіграють суттєву роль. Це процеси метаморфозу, обмежений протеоліз поліпротеїнів й інших протеїнів, активація прогормонів і проензимів, апоптоз, знешкодження протеїнів-токсинів тощо [3, 4]. У літературі є окремі відомості про функціонування ензимів дегідрогеназ циклу трикарбонових кислот [5], дихального ланцюга [6] та окремих питань, що стосуються механізмів біосинтезу протеїну в безхребетних.

Інгібіторна дія солей важких металів вивчена відносно ензимів, передусім хребетних, і, зокрема, ссавців [7, 8]. Що ж стосується комах, то ці об'єкти в плані дії вказаних токсикантів практично не вивчено. Дотепер виявлено далеко не всі аспекти взаємодії металів з ензимами та іншими компонентами клітин. Відомо, що іони металів залежно від їхньої природи і концентрації можуть або активувати, або інгібувати процеси протеолізу, що зрештою вирішальним чином може впливати на метаболізм в цілому і, відповідно, на процеси росту і розвитку. Водночас необхідно враховувати, що окремі метали є одним із найважливіших факторів забруднення навколишнього середовища. Виявлення основ-

них механізмів дії підвищених концентрацій важких металів на обмін речовин, зокрема на функцію протеолітичних ензимів, – важливий напрям дослідження впливу навколишнього середовища на організм.

Тому метою нашої роботи було вивчення дії хлоридів важких металів – кобальту, міді, цинку та кадмію – на активність трипсиноподібних ензимів, які відіграють значну роль у розвитку і життєдіяльності, а також є одними з головних ензимів у процесах травлення дрозофіли.

Матеріали і методи

Джерелом досліджуваної пептидгідролази (3.4.21.4) слугували личинки третього віку дрозофіли дикого типу *Drosophila melanogaster* Meigen, які розвивалися в стаціонарних умовах при температурі + 25 °С на стандартному живильному середовищі [9].

Виділення ензиму проводили відповідно до методу, розробленого О. М. Андрієвським [10, 11], з деякими модифікаціями. Очищених від корму личинок висувували і зважували. Знежирення тканин личинок досягали, гомогенізуючи їх в ацетоні ножовим мікроподрібнювачем при 14 000 об./хв на холоді. Одержаний гомогенат центрифугували за допомогою препаративної центрифуги марки «HSC type 310» при 10 000 g. Протеїнові осадки відокремлювали деканту-

ванням від ацетонової витяжки і висушували в ліофілізаторі. З ацетонових осадів ензимно активні протеїни екстрагували 0,1 М гліцин-NaOH буфером (рН 9,0) ресуспендуванням осаду в буфері у співвідношенні 1 : 10. Одержану суспензію центрифугували при 10 000 g. Висолювання різних протеїнових компонентів із лужного екстракту проводили шляхом збільшення концентрації сульфату амонію від 0,5 до 5,0 М з інтервалом 0,5 М. Протеїни, що випадають в осад за різних молярних концентрацій солі в розчині, видаляли з екстракту центрифугуванням при 12 000 g протягом 10 хв на холоді. Одержані осад окремо розчиняли в 1 мл 0,1 М гліцин-NaOH буфера (рН 9,0). Фракцію, що містить значну кількість протеїну, піддавали груповому розділенню на колонці із сефадексом G-100. Знесолення проводили в системі 0,01 М трис-ацетатного буфера (рН 7,05) при кімнатній температурі. В елюйованих фракціях визначали вміст протеїну, а також амідазну активність. Наступним етапом було іонообмінне хроматографічне розділення фракції з найвищими показниками протеолітичної активності на колонці із сферичною ДЕАЕ-целюлозою, врівноваженою 0,01 М трис-ацетатним буфером (рН 7,5). Протеїни елюювали розчинами хлориду калію з різними концентраціями (від 0,01 до 1,0 М). Фракції об'ємом по 3 мл збирали і спектрофотометрували при 280 нм з метою визначення вмісту протеїну і побудови елютограми. Елюати, що виявляли пептидгідролазну активність, поєднували і піддавали аналізу.

В усіх протеїнових фракціях після висолювання та іонообмінної хроматографії, а також і у вихідному екстракті визначали амідазну активність і концентрацію протеїну (за методом Лоурі [12]). Амідазну активність встановлювали за допомогою гідролізу 1,0 мМ хромогенного субстрату N, α -бензоїл-L-аргінін-p-нітроаніліду (Рсахім, Угорщина) в 0,1 М гліцин-NaOH буфері (рН 9,0) з максимумом поглинання при 382,5 нм [13]. Під «відносною активністю» розуміли активність по відношенню до маси тканини, з якої отримували ензим. Розраховували за формулою:

$$BA = \frac{\Delta A \cdot 1000 \cdot n \cdot V}{v \cdot t \cdot k},$$

де BA – відносна активність; ΔA – різниця величини абсорбції дослідної та контрольної проб; 1000 – коефіцієнт перерахунку одиниць

в міліодиниці; n – ступінь розведення ензимного розчину; V – кінцевий об'єм інкубаційного середовища (мл); v – об'єм ензимного розчину в інкубаційному середовищі (мл); t – тривалість ензимного гідролізу субстрату (хв); k – коефіцієнт перерахунку одиниць абсорбції в мікромолі утвореного ароматичного продукту. Питому активність (ПА) ензиму виражали в одиницях (О) в розрахунку на 1 мг протеїну досліджуваного розчину. За одну одиницю приймали кількість ензиму, що розщеплює 1 нмоль субстрату за 1 хв інкубації при 37 °С.

Одержані екстракти розділяли електрофоретично в кислих умовах (рН 4,5) в системі вертикально-пластинчастого 10%-го поліакриламідного гелю (розміри: 140×120×1 мм). Перед внесенням в слоти зразки змішували з розчином метилового зеленого, який вміщував 60% сахарози. Електрофорез проводили за сили струму 20 мА в розрахунку на один гелевий блок, після чого гелі відмивали та інкубували в присутності розчину кумасі блакитного. З метою виявлення зон локалізації протеїнів у гелі гідроліз ефірів проводили в присутності протеїнів-свідків із різною молекулярною масою, Да: БСА – 68 000; овальбумін – 43 000; трипсин підшлункової залози бика – 23 800; папаїн – 20 700; лізоцим – 17 500. Після 30 хв інкубації при 25 °С гелеві блоки відмивали дистиллятом, сканували та аналізували за допомогою комп'ютерної денситометрії. Кількісну оцінку електрофореграм провадили, використовуючи спеціальну програму АнаЗС.

Стан тіол-дисульфідної системи оцінювали за методом Еллмана [14, 15] за показниками кількості реакційноздатних протеїнових та непротеїнових –SH і –S–S– груп. Їх детекцію здійснювали методом зворотного амперометричного титрування розчином азотнокислого срібла (100 мкМ/л) в трис-гідроксиметиламінометані (20 мМ/л).

Одержані дані обробляли статистично [16, 17] за допомогою комп'ютерних програм Excel із пакета MS Office та Statistica.

Результати та обговорення

Під час вивчення механізмів дії різних токсикантів, біологічно активних речовин на активність того чи іншого ензиму, завжди необхідно зіставляти результати, одержані на екстрактах тканин, із результатами, одержані

ними на очищеному ензимі. Це зумовлено багатьма причинами, зокрема, одержані на екстрактах тканин дані можуть бути пов'язані не прямо, а опосередковано з дією ефекторів. Крім того, в тканинах існують компенсаторні механізми, здатні частково нівелювати дію тієї чи іншої речовини. З іншого боку, дані, одержані на очищеному ензимі, самі по собі не є самодостатніми, оскільки можуть необ'єктивно відображати ситуацію, яка має місце на рівні цілісного організму. Тому в подальшому ми вивчали дію солей металів на частково очищену трипсиноподібну пептидгідролазу личинок дрозофіли.

У ході очищення пептидгідролази після висолювання протеїнових компонентів нами було виявлено осади з різною активністю ензиму. При цьому в усіх одержаних протеїнових фракціях визначали концентрацію протеїну та активність ензиму порівняно з вихідним екстрактом (табл. 1). Вищий вихід протеїну спостерігався до 3,0 М концентрації сульфату амонію.

Як видно з таблиці, найбільші показники відносної активності було виявлено у фракціях, які були осаджені 2,5, 3,0 і 3,5 М розчином $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ці фракції характеризувалися найвищим коефіцієнтом очищення пептидгідролази.

Розподіл фракції протеїнів, осаджених при 3,0 М концентрації $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, проводили за допомогою гель-хроматографії на колонці (4,5×16,0 см) із сефадексом G-100 (Pharmacia, Швеція) при 4 °С в шафі низьких температур (Combicoldrac 11).

Елюцію проводили 0,01 М трис-ацетатним буфером (рН 7,05). В елюйованих фракціях (обсяги близько 3,0 мл) спектрофотометрично (280 нм) визначали вміст протеїну, а також амідазну активність за вказаним субстратом (рис. 1).

Як видно з рис. 1, внаслідок хроматографічного розділення на сефадексі G-100 3,0 М фракції було одержано 3 основних протеїнових піки. Проте лише фракції одного з них виявляли амідазну активність. Високий вміст протеїну і найбільша активність спостерігалися у фракціях № 14–25. Ці фракції об'єднували та використовували для іонообмінної хроматографії (рис. 2).

За допомогою гель-хроматографії лужну пептидгідролазу тканин личинок дрозофіли по відношенню до вихідного екстракту з ацетонового порошку було очищено в 2,9 раза з виходом ензиму 46%. Використання іонообмінної хроматографії з ДЕАЕ-целюлозою дало можливість очистити лужну пептидгідролазу тканин

Таблиця 1. Вміст протеїну та амідазна активність личинок дрозофіли лінії *Normal* у фракціях висолювання пептидгідролази сульфатом амонію

Досліджувана фракція, умови висолювання, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, М	[P], мг/мл	ВА, О/мл	ПА, О/мг	Коефіцієнт очищення
Вихідний екстракт	4,34 ± 0,01	6,70 ± 0,1	1,54 ± 0,50	–
I – 0,5	5,09 ± 0,06	1,50 ± 1,4	0,29 ± 0,09	0,2
II – 1,0	4,51 ± 0,02	0	0	0
III – 1,5	4,38 ± 0,06	1,10 ± 0,4	0,25 ± 0,01	0,2
IV – 2,0	3,38 ± 0,01	11,00 ± 1,4	3,25 ± 1,41	2,1
V – 2,5	2,56 ± 0,11	16,80 ± 0,4	6,56 ± 0,57	4,3
VI – 3,0	8,22 ± 0,06	85,80 ± 3,5	10,44 ± 0,14	6,8
VII – 3,5	4,51 ± 0,21	17,50 ± 1,3	3,88 ± 0,28	2,5
VIII – 4,0	2,62 ± 0,36	1,94 ± 0,3	0,74 ± 0,05	0,5
IX – 4,5	1,18 ± 0,13	0,22 ± 0,3	0,19 ± 0,11	0,1
X – 5,0	0,56 ± 0,06	0	0	0

Примітка: [P] – вміст протеїну в 1 мл розчину; ВА – відносна активність ензиму; ПА – питома активність ензиму

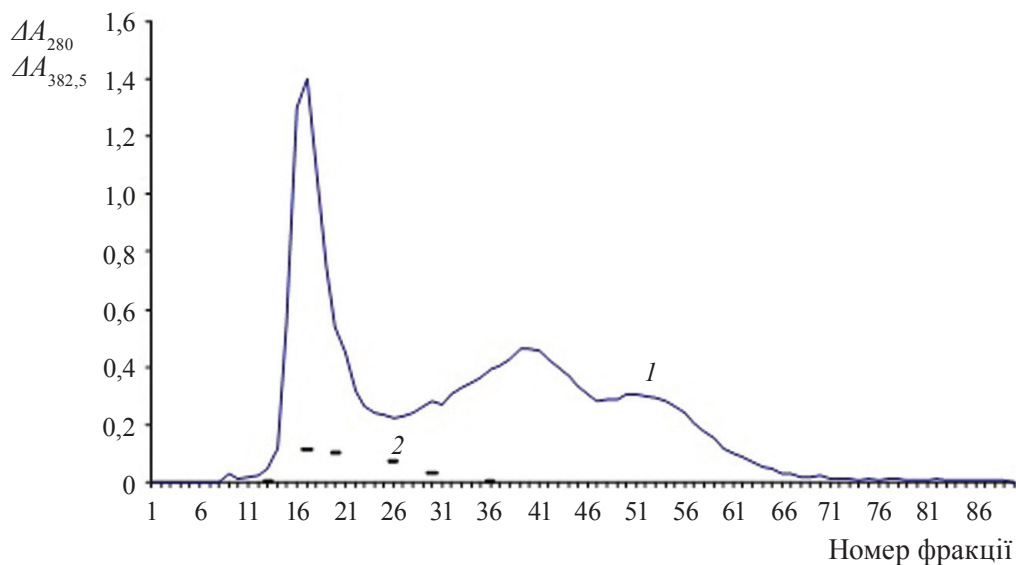


Рис. 1. Профіль елюції гелі-фільтрації на сефадексі G-100 висоленої сульфатом амонію 3,0 М фракції, що містить пептидгідролазу личинок дрозофіли: 1 – піки розподілу протеїну, 2 – лінія розподілу ензимної активності

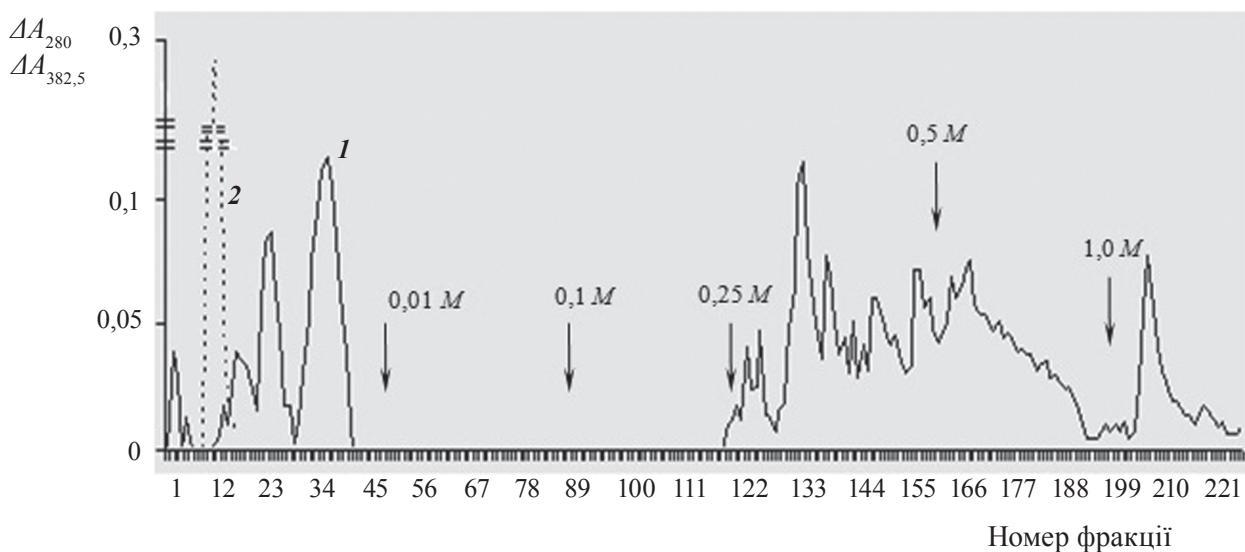


Рис. 2. Профіль елюції іонообмінної хроматографії на колонці зі сферичною ДЕАЕ-целюлозою, висоленої 2,5 М сірчанокислим амонієм фракції, що містить трипсиноподібну пептидгідролазу: вертикальними стрілками зазначено моменти зміни градієнта концентрації KCl. 1 – Вміст протеїну (абсорбція (A) при 280 нм, ум. од.), 2 – амідазна активність (абсорбція (A) при 382,5 нм, ум. од.)

личинок дрозофіли дикого типу – у 7,5 раза, однак втрата ензиму становила 92–94%.

Для аналізу очищеного ензиму нами був проведений електрофорез одержаної фракції у 10%-му ПААГ (рН 4,5). Результати електрофорезу наведено в табл. 2.

Внаслідок проведеного дослідження отримано один електрофоретичний пік з $R_f = 0,27$,

який у разі зіставлення із протеїном-свідком відповідає трипсину і має молекулярну масу 24 000 Да. Таким чином, електрофоретичними дослідженнями підтверджено, що ензим, одержаний за допомогою осадження 3,0 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і очищений гелі-хроматографією на сефадексі G-100, є однорідним протеїном, який складається з одного поліпептидного ланцюга.

Таблиця 2. Електрофоретичне очищення трипсиноподібної гідролази із *Drosophila melanogaster*

Фарбування зони	R_f	ВА, О/мл	ПА, О/мг
1	0,03	0,2	0
2	0,09	0	0
3	0,27	0,1	2,76

Примітка: R_f – показник коефіцієнта відносної електрофоретичної рухливості ензиму; ВА – відносна активність ензиму; ПА – питома активність ензиму

Активність пептидгідролази в нормальних умовах, а також її зміну за впливу солей металів вивчали на етапі вихідного екстракту, основних фракцій висолування та на рівні одержаного очищеного ензиму для порівняння рівня амідазної активності і визначення впливу різних етапів очищення на якість одержаного ензиму. Необхідно відзначити, що тенденція зміни пептидгідролазної активності у разі використання зазначених солей важких металів зберігалася для всіх досліджуваних ензимвміщуючих розчинів. Одержані дані представлені в табл. 3.

Якщо за низьких концентрацій солей деяких важких металів іноді спостерігалось статистично вірогідне підвищення протеолітичної активності, то збільшення вмісту солі в середовищі майже завжди інгібувало активність очищеного ензиму.

Вірогідне підвищення активності трипсиноподібної пептидгідролази личинок 1,0 мМ концентрацією солі спостерігалось лише за дослідження фракції 2,5 М висолу в разі додавання солі кадмію.

Дослідження активності пептидгідролази виявило такі закономірності: мінімальна концентрація CoCl_2 (0,2 мМ) незначною мірою впливала на ензимну активність – за дослідження 2,5 та 3,0 М фракцій спостерігалось невелике підвищення активності, та у разі очищеного ензиму – незначне інгібування; з підвищенням концентрації кобальту спостерігалось зниження активності; за концентрації 2,0 мМ активність ензиму була нижче контрольної приблизно в 2 рази і відмінності з контролем були вірогідні.

Іони міді вірогідно інгібували активність пептидгідролази, найбільше зниження

досліджуваного показника спостерігалось за концентрації 1,0 мМ.

Хлорид цинку спричиняв інгібувальну дію на активність ензиму практично за всіх концентрацій, найбільшу – за концентрації 1,0 (майже в 2 рази) і 2,0 мМ (більше, ніж у 5 разів у разі очищеного ензиму).

Хлорид кадмію, як і сіль цинку, практично у всіх випадках вірогідно знижував активність пептидгідролази, за концентрацій 1,0 і 2,0 мМ – більше ніж у 2 рази.

Одержані дані свідчать про існування ефекту інгібування трипсиноподібної протеїнази дрозофіли хлоридами всіх досліджених металів у високих концентраціях, проте за ними не можна судити про характер інгібувальної дії, і, тим більше, про його механізм. Вочевидь, виявлені зміни в прояві активності ензиму за дії іонів металів пов'язані із впливом їх на конформаційний стан пептидгідролази, з одного боку, і безпосередньо модифікацією активного центру ензиму – з іншого.

Як відомо, трипсиноподібні ензими належать до групи серинових протеїназ, що свідчить про значну роль гідроксильних радикалів серину та гістидину активного центру ензиму у зв'язуванні субстрату та реалізації ензимного акту [18, 19]. Очевидно присутність солей досліджених металів призводить до блокування активного центру ензиму, що ускладнює приєднання до нього субстрату. Не виключена також можливість взаємодії солей важких металів із субстратом – Na -бензоїл-DL-аргінін-*n*-нітроанлідом за рахунок присутності в його складі гуанідинового угруповання. Така взаємодія може призводити до хімічної модифікації субстрату та ускладнення його приєднання до активного центру ензиму.

Метали, що зв'язують функціональні групи ензимного протеїну, віддалені від активного центру, але важливі для підтримання його специфічної третинної і четвертинної структур (наприклад, сульфгідрильні групи), можуть спричиняти значний вплив на стабільність й інші колоїдно-хімічні властивості протеїну, а також на просторову конфігурацію каталітичного центру і, тим самим, на активність ензиму. Іон металу може утворювати безліч зв'язків із субстратом і відтягувати на себе їх електронну щільність. Більш того, такі ліганди, як CH_3COO - або OH - (порівняно з H_2O) здатні збільшувати електропо-

Таблиця 3. Вплив *in vitro* хлоридів важких металів на активність трипсиноподібної пептидгідролази личинок дрозофіли на етапах її виділення й очищення

Хлориди металів	Концентрація, мМ	Вихідний екстракт	Концентрація сірчанокислого амонію, М				Очищений ензим
			2,0	2,5	3,0	3,5	
Контроль		15,4 ± 0,5	32,5 ± 1,4	65,6 ± 0,6	104,4 ± 0,1	38,8 ± 0,3	115,3 ± 26,7
CoCl ₂	0,2	18,8 ± 4,4*	29,3 ± 1,8*	69,1 ± 0,4*	114,9 ± 1,7*	39,4 ± 2,4	103,4 ± 20,5*
	0,4	16,1 ± 2,5	24,9 ± 0,7*	72,1 ± 0,1*	114,6 ± 0,4*	36,5 ± 0,3*	96,0 ± 7,4*
	1,0	13,7 ± 1,5*	17,9 ± 0,1*	59,9 ± 2,0*	104,0 ± 1,7	33,9 ± 1,1*	93,2 ± 17,1*
	2,0	6,8 ± 0,7*	13,9 ± 4,9*	36,7 ± 0,4*	82,1 ± 3,5*	18,8 ± 4,0*	56,3 ± 8,6*
CuCl ₂	0,2	17,1 ± 4,0*	25,7 ± 0,4*	77,5 ± 3,1*	112,8 ± 0,3*	33,4 ± 0,1*	84,1 ± 15,9*
	0,4	5,4 ± 2,4	24,9 ± 0,3*	80,7 ± 0,7*	108,2 ± 1,1*	31,3 ± 0,7*	81,9 ± 11,4*
	1,0	5,5 ± 5,6*	3,6 ± 0,1*	44,9 ± 0,1*	89,6 ± 2,0*	11,2 ± 0,3*	55,2 ± 15,6*
ZnCl ₂	0,2	10,1 ± 1,1*	22,5 ± 0,7*	99,6 ± 1,8*	106,4 ± 2,7	34,0 ± 0,7*	73,9 ± 22,8*
	0,4	11,1 ± 0,8*	22,8 ± 0,1*	113,3 ± 1,0*	99,4 ± 0,1*	32,5 ± 2,1*	99,5 ± 13,1*
	1,0	3,6 ± 1,7*	8,6 ± 0,6*	68,4 ± 0,4	72,9 ± 1,0*	11,4 ± 0,1*	53,4 ± 14,8*
	2,0	0,1 ± 0,2*	3,6 ± 0,4*	54,7 ± 0,3*	27,3 ± 0,1*	5,5 ± 1,1*	13,7 ± 11,6*
CdCl ₂	0,2	8,3 ± 1,3*	17,9 ± 1,3*	76,2 ± 0,1*	100,7 ± 2,0	29,3 ± 1,3*	87,5 ± 18,2*
	0,4	7,8 ± 1,2*	16,4 ± 0,1*	76,2 ± 0,3*	107,2 ± 0,1	24,4 ± 1,0*	72,8 ± 8,0*
	1,0	7,3 ± 3,2*	15,8 ± 0,1*	142,6 ± 0,6*	92,7 ± 0,6*	25,1 ± 0,1*	2,4 ± 10,8*
	2,0	4,3 ± 2,4*	14,2 ± 1,1*	62,5 ± 0,9	81,2 ± 0,4*	14,2 ± 0,1*	60,8 ± 5,1*

Примітка: дані відображають питому активність пептидгідролази, $n = 4$. *Відмінності значень дослідних варіантів порівняно з відповідним контрольним варіантом вірогідні ($P < 0,05$)

зитивний характер металу та підвищувати його ефективність.

Для визначення механізмів інгібувальної дії солей важких металів на активність очищеної трипсиноподібної пептидгідролази ми провели вивчення впливу досліджуваних солей металів на рівень SH- і R-S-S-R-груп (символом R-S-S-R ми позначили органічні дисульфіди) очищеного ензиму. Ці дані наведено на рис. 3.

Результати, представлені на рисунку, свідчать про те, що додавання всіх досліджених солей призводить до зменшення вмісту вільних сульфгідрильних груп у молекулі ензиму і в окремих випадках до збільшення груп, де сірка пов'язана з тією чи іншою речовиною. Найбільшою мірою це було характерно для солей міді, кобальту та кадмію, і меншою мірою – для солі цинку.

Таким чином, використання іонообмінної хроматографії дало можливість очистити лужну пептидгідролазу тканин личинок дрозофіли. Електрофоретичними дослідженнями підтверджено, що ензим, одержаний за осаджен-

ня 3,0 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, і очищений за допомогою гель-хроматографії на сефадексі G-100, є однорідним протеїном, який складається з одного поліпептидного ланцюга.

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНОПОДОБНОЙ ГИДРОЛАЗЫ ИЗ *Drosophila melanogaster*

И. Л. Рыжко, Н. В. Мотрук, С. А. Петров

Одесский национальный университет
им. И. И. Мечникова, Украина;
e-mail: kira_ril@mail.ru

Исследовали влияние солей тяжелых металлов на частично очищенную методами высаливания, гель-хроматографии и электрофореза трипсиноподобную пептидгидролазу личинок дрозофилы. Влияние металлов на активность энзимов не всегда обусловлено их прямым взаимодействием с каталитическим центром. Установлено, что наибольшее ингибирующее действие проявляет хлорид кадмия, а наимень-

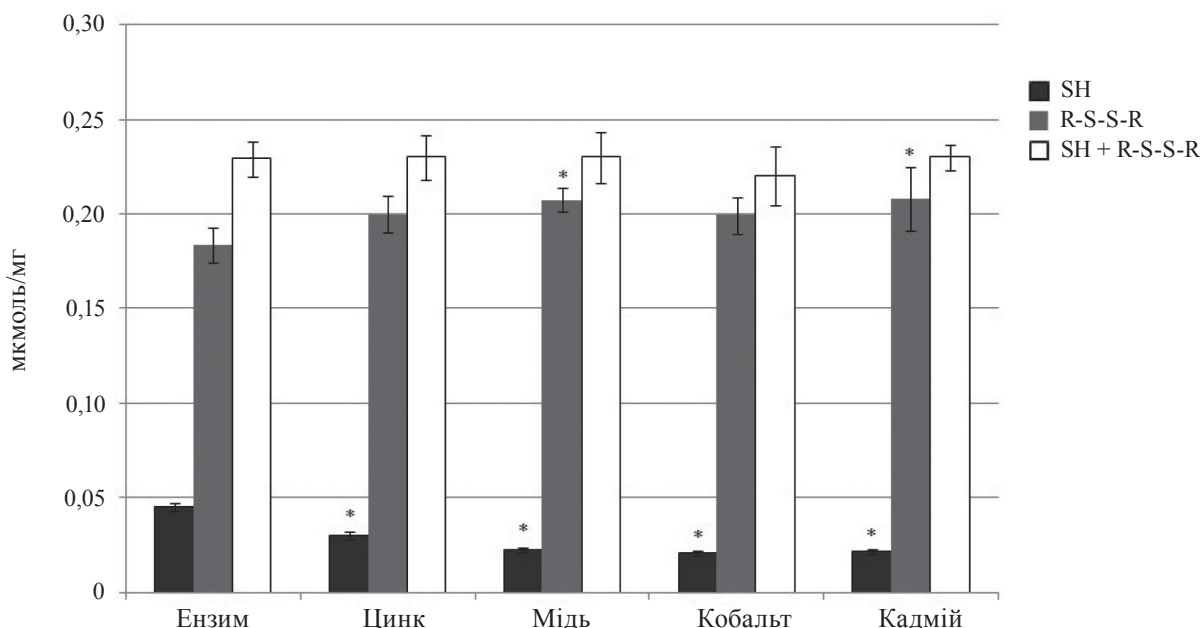


Рис. 3. Вміст (мкмоль/мг) SH- і SR-груп в ензимі за додавання солей важких металів. *Відмінність відносно контролю вірогідна, ($P < 0,05$)

шее – хлорид цинка. Так как во всех случаях были использованы исключительно хлориды металлов, можно считать доказанным дифференцированное влияние именно ионов металлов, а не ионов хлора на проявление амидазной активности трипсиноподобной пептидгидролазы личинок дрозофилы, что в целом согласуется с эффектами действия этих ионов на протеолитическую систему пищеварения на уровне живых организмов.

Ключевые слова: тяжелые металлы, пептидгидролаза, дрозофила.

INFLUENCE OF HEAVY METAL SALTS ON THE ACTIVITY OF TRYPSIN-LIKE HYDROLASES FROM *Drosophila melanogaster*

I. L. Ryzhko, N. V. Motruk, S. A. Petrov

Odessa I. I. Mechnikov National University, Ukraine;
e-mail: kira_ril@mail.ru

The influence of salts of heavy metals on trypsin-like peptide hydrolase of drosophila larvae partly refined by methods of salting-out, gel chromatography and electrophoresis has been researched. It is established that cadmium chloride is characterized by the greatest inhibitory effect, while zinc chloride by the lowest one. Since metal chlorides were used in

all cases, it is the differentiated effect of metal ions on manifestations of amidase activity of trypsin-like peptide hydrolase of drosophila larvae, which rather may be considered as proved than the effect of chlorine ions. This, as a whole, agrees with the effect of these ions on proteolytic digestion system at the level of live organisms.

Key words: heavy metals, peptide hydrolyse, drosophila.

References

1. Andriyevskiy O. M., Ryzhko I. L., Radionov O. O. Effect of metal ions on the level of proteolytic activity in the digestive system of *Drosophila ontogeny*. *Bulletin ONU. Biology*. 2002;7(1):15-21. (In Ukrainian).
2. Bigaliyev A. B. Genetic effect of salts of heavy metals as environmental pollutants. *Uspekhi sovrem. genet.* 1982;10:104-114. (In Russian).
3. Chougule N. P., Doyle E., Fitches E., Gatehouse J. A. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; *Lepidoptera: Noctuidae*) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *J. Insect Physiol.* 2008;Mar;54(3):563-572.
4. Vernet T., Khouri H. E., Laffamme P., Tessier D. C., Musil R., Gour-Salin B. J., Storer A. C., Thomas D. Y. Processing of the

- papain precursor. Purification of the zymogen and characterization of its mechanism of processing. *J. Biol. Chem.* 1991;266(32):21451-21457.
5. Petrov S. A. Features interaction functional related vitamins in the body of mussels, mullet and rats: Authoref. diss. for the degree of candidate of biol. sciences. Minsk, 1979. 20 p. (In Russian).
 6. Werzhbinskaja N. A., Savina N. V. Evolution the glycolytic system in the type of mollusk. *Zhurn. Evolution. Biochem. Physiol.* 1971;7(4):337-347. (In Russian).
 7. Melnikov N. N., Derkach E. A. Age characteristics of cadmium accumulation in the organs of rats under toxication and changes in acid-base balance of blood under different conditions of the antioxidant defense of the organism. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2004;76(6):95-99. (In Ukrainian).
 8. Mosolov V. V. Proteolytic enzymes. M.: Nauka, 1971. 414 p. (In Russian).
 9. Medvedev N. N. The practical genetics. M.: Nauka, 1968. 294 p. (In Russian).
 10. Andrievskiy A. M. The method of obtaining a partially purified alkaline peptidhydrolase from larvae of *Drosophila melanogaster*. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1985;57(4):54-59. (In Russian).
 11. Andrievskiy A. M., Katanenko S. V., Totskiy V. N. Ontogenetic features peptidhydrolases activity of extracts from tissues of *Drosophila melanogaster*. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1982;54(5):519-524. (In Russian).
 12. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193(1):265-275.
 13. Erlanger B., Kokovsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1961;95(2):271-278.
 14. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959;82:70-77.
 15. Zaporozhan V. N., Bokal I. I., Kostyushov V. V. Clinical significance of tioldisulfide system in HIV-infection. *Zhurn. AMN Ukraine.* 2009;15(1):175-187. (In Russian).
 16. Atramentova L. O., Utevsky O. M. Statistical Methods in Biology: A Textbook. Kharkiv: V. N. Karazin KNU, 2007. 288 p. (In Ukrainian).
 17. Rokitsky P. F. Biological statistics. – Minsk: Vysheishaya shkola, 1973. – 320 p. (In Russian).
 18. Kraut J. Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 1977;46:331-358.
 19. Sokolovskaja L. I., Slominsky A. Y., Volkov G. L. Induction of plasminogen catalytic activity by monoclonal antibody IV-Ic in the presence of divalent metal cations and α 2-antiplasmin. *Biohimiya.* 2006;71(6):778-785. (In Russian).

Отримано 10.09.2012