

УДК 577.15 : 612.346

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.53177

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАСОМ В КЛЕТКАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ

© О. В. Сокур, М. А. Тимошенко, Т. В. Коваль, Л. И. Богун

Исследовано химотрипсино-, трипсино- и каспазоподобную протеасомальные активности в клетках поджелудочной железы и установлено их изменение при экспериментальном панкреатите – повышение химотрипсиноподобной ATF-независимой активности на фоне снижения трипсиноподобной и каспазоподобной активностей. При этом, снижение трипсиноподобной активности происходило за счет ATF-зависимого гидролиза, тогда как каспазоподобной – за счет ATF-независимого гидролиза

Ключевые слова: протеасома, химотрипсиноподобная активность, трипсиноподобная активность, каспазоподобная активность, поджелудочная железа, панкреатит

The caspase-, chymotrypsin- and trypsin-like proteasomal activities in pancreas cells were investigated under the experimental pancreatitis. It has been shown the increase of ATF-independent chymotrypsin-like activity at reduction of trypsin-like and caspase-like activities. At the same time the reduction of trypsin-like activity was due to ATF-dependent hydrolysis, whereas the reduction of caspase-like activity was due to ATF-independent proteolysis

Keywords: proteasome, caspase-like activity, chymotrypsin-like activity, trypsin-like activity, pancreas, pancreatitis

1. Введение

В последнее время внимание исследователей сосредоточено на убиквитин-зависимой протеасомной деградации белков, которая является конечным этапом внутриклеточного протеолиза. Ключевым участником протеасомной деградации является мультисубъединичный белковый комплекс 26S-протеасома, которая состоит из протеолитического ядра – 20S-протеасомы и одной или двух регуляторных частиц. Протеасомы осуществляют протеолиз около 80 % цитозольных и ядерных белков. Конститутивные 26S-протеасомы участвуют в регуляции таких клеточных процессов, как репликация и репарация ДНК, транскрипция, передача сигналов, клеточный цикл, апоптоз. Они гидролизуют убиквитинированные белки в ATF-зависимой реакции. 20S-протеасомы способны как самостоятельные частицы гидролизировать некоторые белки без их предварительного убиквитинирования независимо от ATF. Протеасомы обладают химотрипсиноподобной (гидролиз после гидрофобных и ароматических аминокислот Leu, Tyr, Phe), трипсиноподобной (гидролиз после положительно заряженных Lys и Arg) и каспазоподобной активностями (гидролиз после отрицательно заряженных Asp и Glu), обеспечивая модификацию структуры белков и влияя, таким образом, на их функциональную активность [1].

2. Литературный обзор и постановка проблемы

Известно, что нарушение в функционировании системы внутриклеточного протеолиза играет важную роль в патогенезе многих заболеваний [2]. В экспериментальных исследованиях показано изменение активности и состава пула 26S протеасом в патогенезе таких нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, амиотропный латеральный склероз, прионовые болезни [3]. Деградация белков в клетке, которую осуществляют протеасомы, играет важную роль в процессе развития злокачественных новообразований различных локализаций, в частности предстательной железы, молочной железы, кишечника [4–6]. Однако в большинстве исследований внимание уделяется изучению убиквитинирования белков, в то время как активность протеасом исследована недостаточно.

Острый панкреатит – воспалительный процесс поджелудочной железы (ПЖ), в который могут также вовлекаться другие органы [7, 8]. Характерным морфологическим феноменом при данном заболевании является гибель клеток ПЖ. Процесс клеточной гибели происходит как в физиологических условиях, так и при целом ряде патологических состояний – воспалении, ишемии, токсическом воздействии. В экспериментальных исследованиях показано, что при

остром панкреатите гибель панкреатоцитов происходит путем некроза и апоптоза [9]. Однако индукция одного из этих процессов ведет к подавлению другого. В частности, показана роль воспаления в изменении типа смерти клетки, а именно в ингибировании апоптоза, что ведет к стимуляции некроза и прогрессированию панкреатита [10]. Это связано с повышением активности убиквитин-лигазы Mdm2, которая блокирует работу протеина p53, являющегося координатором важнейших клеточных процессов, – апоптоза, остановки клеточного цикла, старения клетки, восстановления ДНК. О тесной связи протеасом с апоптозом свидетельствует наличие в их составе каспазного активного центра.

Таким образом, изучение активности протеасом может иметь прогностическое значение для оценки развития острого панкреатита на раннем этапе и скорректировать его лечение. В связи с этим целью данной работы явилось изучение изменения активности протеасомной системы при остром панкреатите.

3. Материалы и методы

Исследование проводилось на белых крысах-самцах (n=10) с начальной массой тела 220±20 г. Острый панкреатит вызывали интраперитонеальным введением по 2,5 мл L-аргинина в дозе 0,1 г/кг дважды с интервалом 1 час, растворенного в физиологическом растворе [11]. Контрольной группе вводили 2,5 мл физиологического раствора. Образцы ткани ПЖ отбирали через 24 часа после последнего введения L-аргинина.

Замороженную ткань ПЖ гомогенизировали в ледяном 50 мМ HEPES-буфере (pH 7,5), содержащем 1 мМ дитиотреитол, 5 мМ MgCl₂, 20 мМ KCl (1:3) и центрифугировали при 10 тыс. g в течении 30 минут (4 °C). Супернатант использовали для определения активности протеасом.

Активности протеасом определяли методом расщепления флюорогенных пептидов [12]. Каспазоподобная (КП), химотрипсиноподобная (ХТП) и трипсиноподобная (ТП) активности были определены с использованием в качестве субстратов пептидов Z-LLE-AMC, Suc-LLVY-AMC и LSTR-AMC, соответственно. Продукт 7-амино-4-метилкумарин (AMK) измеряли при λ_{ex}=375 нм, λ_{em}=440 нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501.

К 200 мкл HEPES-буфера добавляли 20 мкл супернатанта, содержащего 30 мкг белка, и 10 мкл АТФ в конечной концентрации 28 мкМ для определения ХТ и ТП активности или 14 мкМ для определения КП активности. Реакцию инициировали добавлением 10 мкл соответствующего субстрата в конечной концентрации 18 мкМ для определения ХТП и ТП и 45 мкМ для КП активности. Реакционную смесь инкубировали в течении 30 минут при 37 °C, после чего добавляли 300 мкл ледяного этанола с последующим добавлением через 10 мин 1 мл H₂O. Концентрацию белка определяли методом Бредфорд [13].

Экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Для определения вероятных различий между средними значениями

двух выборок использовали *t*-критерий Стьюдента [14]. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего (M±m).

Для гистологических исследований образцы ткани ПЖ фиксировали в 10 % растворе формалина. Образцы обрабатывали общепринятыми методами: после стандартной проводки по спиртам заливали парафином и готовили срезы толщиной 5–6 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином [15]. Анализ гистологических препаратов проводили с помощью светового микроскопа Olympus VX-41 при увеличении ×100 и ×200.

4. Результаты исследования и их обсуждение

Для подтверждения типичных патологических процессов, которые сопровождают развитие острого панкреатита были проведены гистологические исследования. После введения L-аргинина установлено снижение массы ПЖ, что косвенно отражает некротические процессы (табл. 1). Соотношение массы ПЖ к общей массе тела в экспериментальной группе достоверно снизилось на 16 % по сравнению с контролем. Известно, что прогрессирование патологического процесса с формированием панкреонекроза сопровождается повреждением тканей в очаге воспаления и снижением массы ПЖ. По современным представлениям независимо от внешнеорганный этиологического фактора главную роль в развитии панкреатита играет внутриорганный активация протеолитических ферментов (в первую очередь трипсина), вырабатываемых ПЖ. Под влиянием внутриклеточно активированных трипсина и химотрипсина происходит гидролиз протеиновых структур, что приводит к нарушению функций клеточных элементов или их гибели, а также нарушению проницаемости сосудов. Следствием этих процессов является развитие аутолиза с гемorragиями и жировыми некрозами [16].

Таблица 1
Вес крыс и ПЖ в норме и при моделировании острого панкреатита

Группы	Вес крыс, г	Вес ПЖ, г	% относительно массы крыс
Контроль	255,021±8,198	0,431±0,022	0,169
Панкреатит	230,21±4,604	0,326±0,01	0,142*

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем

При гистологических исследованиях было установлено, что в контрольной группе общая структура ПЖ не нарушена. Ацинусы в основном состояли из типичных экзокриноцитов с эозинофильными секреторными гранулами в апикальной части, базофильной цитоплазмой и круглым ядром в базальной части. Протоки ПЖ были выстланы кубическим эпителием без морфологических изменений, в просвете которых находились оксифильные массы. Интима, медиа и адвентиция стенок внутриорганных артерий и вен были без патологических изменений. Островки Лангерганса имели нормальный размер и форму и

состояли из полигональных клеток с мелкозернистой цитоплазмой, расположенных в центре (В-клетки) и относительно небольших клеток по периферии островка (А-клетки), между которыми были видны выстланные эндотелием синусоиды (рис. 1).

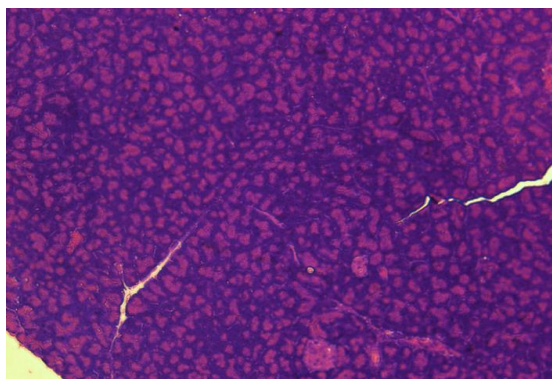


Рис. 1. Гистоструктура поджелудочной железы (контроль)

При моделировании острого панкреатита влияние L-аргинина приводило к нарушению архитектоники ПЖ, при котором основная масса железистой ткани была с явлениями дистрофического и некробиотического поражения панкреоцитов (рис. 2, 3).

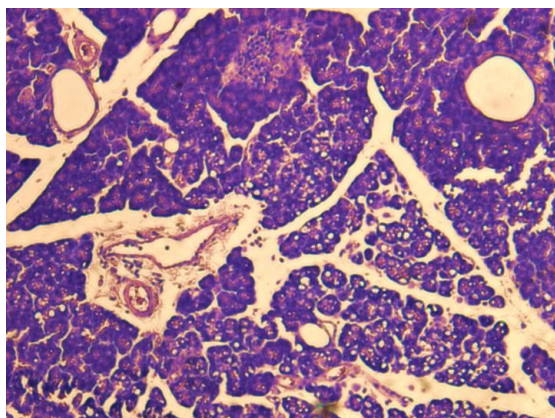


Рис. 2. Гистоструктура поджелудочной железы (острый панкреатит). Некробиотические изменения ацинарных клеток, вакуолизация цитоплазмы

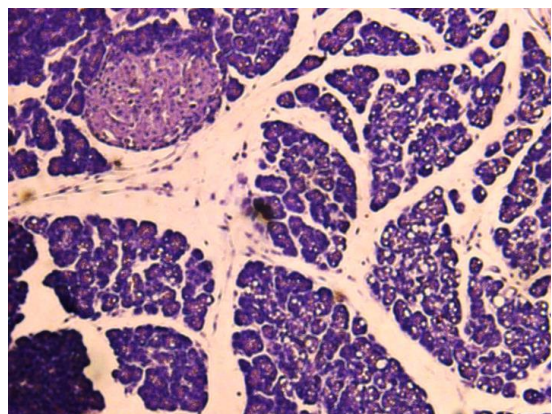


Рис. 3. Гистоструктура поджелудочной железы (острый панкреатит). Некробиотические изменения ацинарных клеток, вакуолизация цитоплазмы. Разрежение островка Лангерганса

В дольках ПЖ, сохранивших ацинарное строение, наблюдались панкреоциты с признаками дистрофии и некробиоза: уменьшение в размерах, повышение базофилии цитоплазмы, уменьшение в размерах зимогенной зоны, наличие очагов ацинусов с вакуолизированной цитоплазмой и пикнотичными ядрами. Единичные вакуоли наблюдались в отдельных панкреатических островках Лангерганса. Кровеносные сосуды и капилляры как внутри дольки, так и междольковые были расширены и полнокровны, а стенки сосудов – утолщены и отечны. Между ацинусами внутри дольки и в междольковой соединительной ткани также наблюдался отек (рис. 2, 3). Таким образом, результаты гистологического исследования демонстрируют, что введение аргинина вызывает обширное повреждение ацинарной зоны ПЖ.

В результате биохимического исследования клеток ПЖ установлено изменение трех видов протеолитической активности протеасом (ХТП, ТП и КП) при остром панкреатите (рис. 4–6). ХТП тотальная активность протеасом имела тенденцию к повышению на 48 % по сравнению с таковой в нормальной ткани (рис. 4). Как известно, полный специфический протеолиз белков является АТФ-зависимым процессом и происходит в 26S-протеасоме, которая расщепляет белки, несущие убиквитины, тогда как в 20S-протеасоме разрушаются аномальные и короткоживущие белки без присоединения убиквитинов [17]. Также выявлено увеличение на 59 % АТФ-независимой ХТП активности, что указывает на гидролиз белков, происходящий без участия убиквитинов. Следовательно, можно предположить, что увеличение ХТП активности протеасом происходило за счет активности 20S субкомплекса и было связано с изменением его субъединичного состава.

Нами установлено достоверное снижение ТП и КП активности протеасом на 33 % и 59 % соответственно. Однако необходимо отметить, что снижение тотальной ТП активности протеасом происходило за счет АТФ-зависимого гидролиза (снижение на 69 %), тогда как КП активности – за счет АТФ-независимого гидролиза (на 68 %).

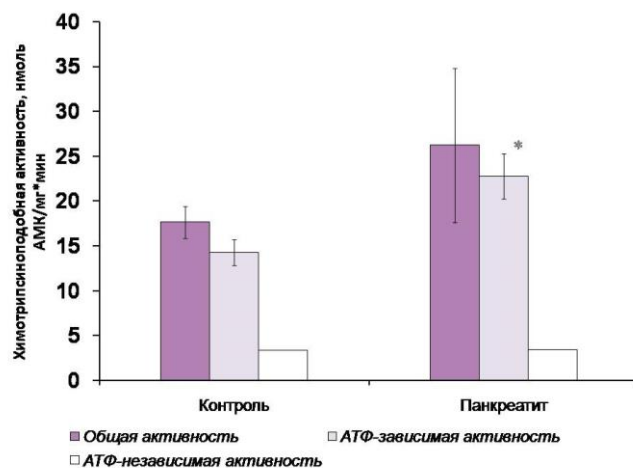


Рис. 4. Химотрипсиноподобная активность протеасом. * – p<0,05 по сравнению с контролем

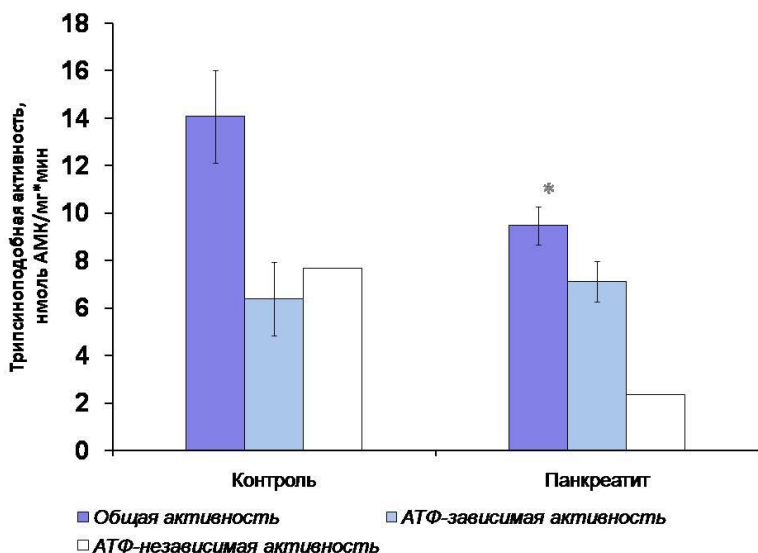


Рис. 5. Трипсиноподобная активность протеасом.
* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

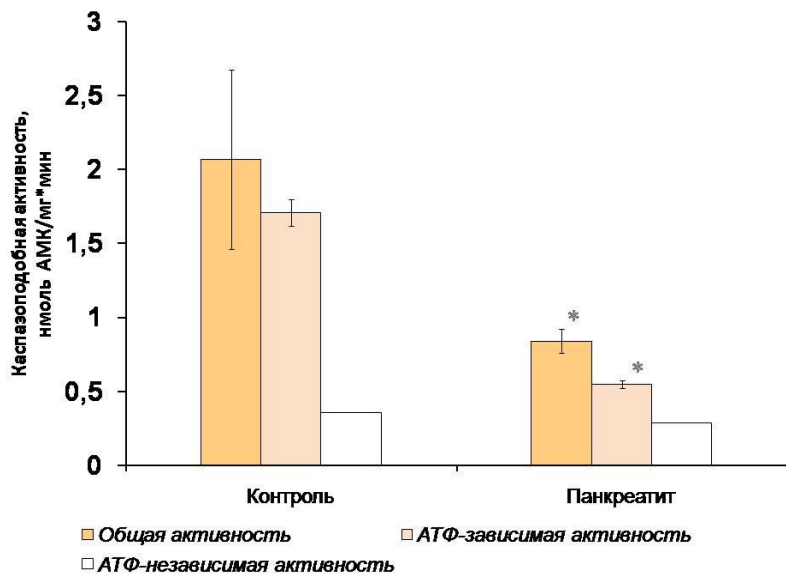


Рис. 6. Каспазоподобная активность протеасом.
* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Подобные изменения сказываются на активностях пула протеасом: возрастает ХТП активность, но падает ТП и КП активности что, вероятно, можно рассматривать как неблагоприятный прогностический признак, характеризующий отсутствие адекватной регуляции протеасомной системы и может быть связано с тем, что при ингибировании КП активности происходит накопление убиквитинированных белковых конъюгатов. Результатом таких процессов может быть подавление апоптоза и стимуляция некроза, что приводит к прогрессированию панкреатита. При этом протеасома практически теряет способность гидролизовать пептидные связи после остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот. Кроме того, известно, что при многих воспалительных патологических процессах конститутивная протеасома переходит в

форму иммунопротеасомы, обладающей альтернативной специфичностью и каталитической эффективностью по отношению к процессингу внутриклеточных белков [18]. Замена конститутивных субъединиц на иммунные сопровождается формированием модифицированных форм протеасом и приводит к изменению ферментативной активности. Так, было выявлено, что повышение активности протеасом при раке кишечника связано с изменением субъединичного состава ядра протеасом [19, 20].

Известны данные о том, что АТФ-независимая субъединица 19S регуляторного комплекса протеасом PSMD2 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2) связана с метастазированием и плохим прогнозом при раке легких. При снижении экспрессии PSMD2 в составе протеасом наблюдается ингибирование апоптоза и снижение пролиферативной активности, что сопровождается снижением активности 26S протеасом и нарушением баланса между фосфорилированным Akt и p38 [21].

Для протеолиза белка скорость-лимитирующей является ХТП активность протеасомы. Ингибирование или инактивация методом мутагенеза ТП и КП активности оказывают гораздо меньшее влияние на скорость гидролиза полипептидной цепи. Поскольку все три каталитические субъединицы являются частью единого комплекса, они аллостерически влияют на активность друг друга. Связывание субстрата субъединицы с ХТП активностью увеличивает КП активность, а связывание субстрата каспазоподобной активности ингибирует ХТП активность.

Предполагают, что при гидролизе полипептидной цепи сначала активируется ХТП сайт, который расщепляет ее на пептидные фрагменты, затем этот ХТП сайт аллостерически инактивируется и КП сайт расщепляет образовавшиеся на первой стадии пептиды на более мелкие фрагменты, после чего активные центры освобождаются и цикл повторяется [22]. Однако, нами установлено снижение КП активности протеасом, что свидетельствует об блокировании протеолиза белков.

Кроме того, полученный результат согласуется с литературными данными о том, что при замене протеолитических конститутивных субъединиц на иммунные более выраженными становятся ХТП активности при уменьшенной КП активности [23]. Это обуславливает способность протеасом образовывать антигенные эпитопы с нужной С-концевой аминокислотой, гидрофобной или положительно заряжен-

ной. Однако обнаруженная нами динамика изменения активностей не объясняется только заменой протеолитических субъединиц, но носит более сложный характер, зависящий и от других факторов, в том числе, регуляторов протеасом. Протеасомы играют важную роль в поддержании функциональной активности клеток, в частности в регуляции работы сигнальных систем, которые активируются при взаимодействии ростовых факторов с соответствующими рецепторами [24]. Известно, что убиквитин-зависимая протеасомная система принимает участие в разрушении многих регуляторных белков, в том числе молекул путей передачи сигналов от ростовых факторов и, частично, самих рецепторов ростовых факторов, а также белков-регуляторов клеточного цикла, таких как p27 и циклин E [25]. Также многие белки, опосредующие программируемую клеточную гибель, являющиеся субстратами для протеасом: опухолевый супрессор p53, ингибитор NF-kB IκB, белки семейства Bcl-2, белки, контролирующие активность каспаз (IAPs), и другие [26]. Вероятно, специфический внутриклеточный протеолиз играет важную роль в патогенезе панкреатита, что определяет большую значимость показателей протеасомной системы.

5. Выводы

Анализ полученных данных указывает на изменение ХТП, ТП и КП протеасомальных активностей в клетках поджелудочной железы при экспериментальном остром панкреатите: повышение ХТП активности за счет увеличения АТФ-независимого протеолиза на фоне снижения ТП и КП активностей. При этом, снижение ТП активности происходило за счет АТФ-зависимого гидролиза, тогда как КП – за счет АТФ-независимого гидролиза. Таким образом, в результате исследования выявлены особенности протеазной активности протеасом, что определяет важный вклад внутриклеточного специфического протеолиза в развитие панкреатита.

Литература

1. Orłowski, M. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids [Text] / M. Orłowski, C. Cardozo, C. Michaud // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32, Issue 6. – P. 1563–1572. doi: 10.1021/bi00057a022
2. Dahlmann, B. Role of proteasomes in disease [Text] / B. Dahlmann // *BMC Biochemistry*. – 2007. – Vol. 8. – P. S3. doi: 10.1186/1471-2091-8-s1-s3
3. Ciechanover, A. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases [Text] / A. Ciechanover, P. Brundin // *Neuron*. – 2003. – Vol. 40, Issue 2. – P. 427–446. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00606-8
4. Chen, C. Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer [Text] / C. Chen, A. K. Seth, A. E. Aplin // *Molecular Cancer Research*. – 2006. – Vol. 4, Issue 10. – P. 695–707. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-06-0182
5. Voutsadakis, I. A. The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer [Text] / I. A. Voutsadakis // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. – 2008. – Vol. 1782, Issue 12. – P. 800–808. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.06.007

6. Sharova, N. Multiple forms of proteasomes and their role in tumor fate [Text] / N. Sharova, L. Zakharova // *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*. – 2008. – Vol. 2, Issue 3. – P. 152–161. doi: 10.2174/187221408786241847
7. Banks, P. A. Practice guidelines in acute pancreatitis [Text] / P. A. Banks, M. L. Freeman // *The American Journal of Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 101, Issue 10. – P. 2379–2400. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00856.x
8. Bhatia, M. Apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis: is it good or bad? [Text] / M. Bhatia // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2004. – Vol. 8, Issue 3. – P. 402–409. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00330.x
9. Gukovskaya, A. S. Cell death pathways in pancreatitis and pancreatic cancer [Text] / A. S. Gukovskaya, S. J. Pandol // *Pancreatology*. – 2004. – Vol. 4, Issue 6. – P. 567–578. doi: 10.1159/000082182
10. Gukovskaya, A. S. Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat [Text] / A. S. Gukovskaya, P. Perkins, V. Zaninovic, D. Sandoval, R. Rutherford, T. Fitzsimmons, S. J. Pandol, S. Poucell-Hatton // *Gastroenterology*. – 1996. – Vol. 110, Issue 3. – P. 875–884. doi: 10.1053/gast.1996.v110.pm8608898
11. Hegyi, P. L-arginine-induced experimental pancreatitis [Text] / P. Hegyi, Z. Jr. Rakonczay, R. Sári, C. Góg, J. Lonovics, T. Takács, L. Czákó // *World Journal of Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 10, Issue 14. – P. 2003–2009. doi: 10.3748/wjg.v10.i14.2003
12. Kirk, C. J. Assessment of cytokine-modulated proteasome activity [Text] / C. J. Kirk, S. R. Powell, E. J. Miller // *Methods in Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 1172. – P. 147–162. doi: 10.1007/978-1-4939-0928-5_13
13. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [Text] / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72, Issue 1-2. – P. 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
14. Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
15. Горальський, Л. П. Основи гістологічної техніки і морфо-функціональні методи дослідження у нормі та при патології [Текст] / Л. П. Горальський, В. Т. Хомич, О. І. Кононський. – Житомир: Полісся, 2005. – 288 с.
16. Фирсова, В. Г. Деструктивный панкреатит: механизмы гибели клетки и их возможное клиническое значение [Текст] / В. Г. Фирсова, В. В. Паршиков // *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 100–106.
17. Kisselev, A. F. Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings [Text] / A. F. Kisselev, D. Kaganovich, A. L. Goldberg // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277, Issue 25. – P. 22260–22270. doi: 10.1074/jbc.m112360200
18. Цимоха, А. С. Протеасомы: участие в клеточных процессах [Текст] / А. С. Цимоха // *Цитология*. – 2010. – Т. 52, № 4. – С. 277–300.
19. Fuchs, D. Increased expression and altered subunit composition of proteasomes induced by continuous proteasome inhibition establish apoptosis resistance and hyperproliferation of Burkitt lymphoma cells [Text] / D. Fuchs, C. Berges, G. Opelz, V. Daniel, C. Naujokat // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2007. – Vol. 103, Issue 1. – P. 270–283. doi: 10.1002/jcb.21405
20. Arlt, A. Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in 62 colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) [Text] / A. Arlt, I. Bauer, C. Schafmayer, J. Tepel, S. S. Mu-

erkoster, M. Brosch, C. Roder, H. Kalthoff, J. Hampe, M. P. Moyer, U. R. Folsch, H. Schafer // *Oncogene*. – 2009. – Vol. 28, Issue 45. – P. 3983–3996. doi: 10.1038/onc.2009.264

21. Matsuama, Y. Proteasomal non-catalytic subunit PSMD2 as a potential therapeutic target in association with various clinicopathologic features in lung adenocarcinomas [Text] / Y. Matsuama, M. Suzuki, C. Arima, Q. M. Huang, S. Tomida, T. Takeuchi, R. Sugiyama, Y. Itoh, Y. Yatabe, H. Goto, T. Takahashi // *Molecular Carcinogenesis*. – 2011. – Vol. 50, Issue 4. – P. 301–309. doi: 10.1002/mc.20632

22. Kisselev, A. F. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown [Text] / A. F. Kisselev, T. N. Akopian, V. Castillo, A. L. Goldberg // *Molecular Cell*. – 1999. – Vol. 4, Issue 3. – P. 395–402. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80341-x

23. Rock, K. L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides [Text] / K. L. Rock, A. L. Goldberg // *Annual Review of Immunology*. – 1999. – Vol. 17, Issue 1. – P. 739–779. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.739

24. Kim, W. Y. The role of VHL mutation in human cancer [Text] / W. Y. Kim, W. G. Kaelin // *Journal of Clinical Oncology*. – 2004. – Vol. 22, Issue 24. – P. 4991–5004. doi: 10.1200/jco.2004.05.061

25. Kudo, Y. p27Kip1 Accumulation by inhibition of proteasome function induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells [Text] / Y. Kudo, T. Takata, I. Ogawa, T. Kaneda, S. Sato, T. Takekoshi, M. Zhao, M. Miyauchi, H. Nikai // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – Vol. 6, Issue 3. – P. 916–923.

26. Tu, Y. The ubiquitin proteasome pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis [Text] / Y. Tu, J. Xu, Z. G. Zhou, C. Y. Wang // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2012. – Vol. 5, Issue 8. – P. 726–738.

References

1. Orłowski, M., Cardozo, C., Michaud, C. (1993). Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry*, 32 (6), 1563–1572. doi: 10.1021/bi00057a022

2. Dahlmann, B. (2007). Role of proteasomes in disease. *BMC Biochemistry*, 8, S3. doi: 10.1186/1471-2091-8-s1-s3

3. Ciechanover, A., Brundin, P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases. *Neuron*, 40 (2), 427–446. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00606-8

4. Chen, C., Seth, A. K., Aplin, A. E. (2006). Genetic and Expression Aberrations of E3 Ubiquitin Ligases in Human Breast Cancer. *Molecular Cancer Research*, 4 (10), 695–707. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-06-0182

5. Voutsadakis, I. A. (2008). The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 1782 (12), 800–808. doi: 10.1016/j.bbdis.2008.06.007

6. Sharova, N., Zakharova, L. (2008). Multiple Forms of Proteasomes and their Role in Tumor Fate. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, 2 (3), 152–161. doi: 10.2174/187221408786241847

7. Banks, P. A., Freeman, M. L. (2006). Practice Guidelines in Acute Pancreatitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 101 (10), 2379–2400. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00856.x

8. Bhatia, M. (2004). Apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis: is it good or bad? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8 (3), 402–409. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00330.x

9. Gukovskaya, A. S., Pandol, S. J. (2004). Cell death pathways in pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatology*, 4 (6), 567–586. doi: 10.1159/000082182

10. Gukovskaya, A., Perkins, P., Zaninovic, V., Sandoval, D., Rutherford, R., Fitzsimmons, T., Pandol, S. J., Poucell-Hatton, S. (1996). Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat. *Gastroenterology*, 110 (3), 875–884. doi: 10.1053/gast.1996.v110.pm8608898

11. Hegyi, P., Rakonczay, Z. Jr., Sári, R., Góg, C., Lonovics, J., Takács, T., Czákó, L. (2004). L-arginine-induced experimental pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 10 (14), 2003–2009. doi: 10.3748/wjg.v10.i14.2003

12. Kirk, C. J., Powell, S. R., Miller, E. J. (2014). Assessment of cytokine-modulated proteasome activity. *Methods in Molecular Biology*, 1172, 147–162. doi: 10.1007/978-1-4939-0928-5_13

13. Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999

14. Stanton, G. (1998). *Medicobiologicheskaya sytistika [Biomedical Statistics]*. Moscow: Praktika, 459.

15. Goralsky, L. P., Khomuch, V. T., Kononsky, O. I. (2005). *Osnovy gistologichnoji tekhniki i morfo-funkcionalni metody doslidlzhennya u normi ta pry patologii [Fundamentals of histological techniques and morphofunctional research methods in health and disease]*. Zhitomyr: Polissya, 288.

16. Firsova, V. G., Parshikov, V. V. (2013). Destrktivnyi pankreatit: mekhanizmy gibeli kletki i ih vozmozhnoe klinicheskoe znachenie [Destructive pancreatitis: mechanisms of cell death and possible clinical importance]. *Journal of Experimental and Clinical Surgery*, 6 (1), 100–106.

17. Kisselev, A. F., Kaganovich, D., Goldberg, A. L. (2002). Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (25), 22260–22270. doi: 10.1074/jbc.m112360200

18. Tcimoha, A. S. (2010). Proteasomy: uchastie v kletochnyh procesah [Proteasomes: participation in cellular processes]. *Cytology*, 52 (4), 277–300.

19. Fuchs, D., Berges, C., Opelz, G., Daniel, V., Naujokat, C. (2007). Increased expression and altered subunit composition of proteasomes induced by continuous proteasome inhibition establish apoptosis resistance and hyperproliferation of Burkitt lymphoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103 (1), 270–283. doi: 10.1002/jcb.21405

20. Arlt, A., Bauer, I., Schafmayer, C., Tepel, J., Muerkoster, S. S., Brosch, M., Roder, C., Kalthoff, H., Hampe, J., Moyer, M. P., Folsch, U. R., Schafer, H. (2009). Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in 62 colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene*, 28 (45), 3983–3996. doi: 10.1038/onc.2009.264

21. Matsuama, Y., Suzuki, M., Arima, C., Huang, Q. M., Tomida, S., Takeuchi, T., Sugiyama, R., Itoh, Y., Yatabe, Y., Goto, H., Takahashi, T. (2011). Proteasomal non-catalytic subunit PSMD2 as a potential therapeutic target in association with various clinicopathologic features in lung adenocarcinomas. *Molecular Carcinogenesis*, 50 (4), 301–309. doi: 10.1002/mc.20632

22. Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Castillo, V., Goldberg A. L. (1999). Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Molecular Cell*, 4 (3), 395–402. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80341-x

23. Rock, K. L., Goldberg, A. L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annual Review of Immunology*, 17 (1), 739–779. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.739

24. Kim, W. Y., Kaelin, W. G. (2004). The role of VHL mutation in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22 (24), 4991–5004. doi: 10.1200/jco.2004.05.061

25. Kudo, Y., Takata, T., Ogawa, I., Kaneda, T., Sato, S., Takekoshi, T., Zhao, M., Miyauchi, M., Nikai, H. (2000). p27Kip1 Accumulation by inhibition of proteasome function

induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.*, 6 (3), 916–923.

26. Tu, Y., Xu, J., Zhou, Z. G., Wang, C. Y. (2012). The ubiquitin proteasome pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 5 (8), 726–738.

Дата надходження рукопису 15.10.2015

Сокур Олеся Вадимовна, доктор біологічних наук, старший научний співробітник, завідувачка лабораторії, Научно-экспериментальная лаборатория «Физико-химической биологии» научно-учебного центра «Институт биологии», Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 60, г. Киев, Украина, 01601
E-mail: dolesya60@mail.ru

Тимошенко Мария Александровна, кандидат біологічних наук, молодший научний співробітник, Научно-экспериментальная лаборатория «Физико-химической биологии» научно-учебного центра «Институт биологии», Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 60, г. Киев, Украина, 01601
E-mail: maria.bulavka@gmail.com

Коваль Татьяна Владимировна, вчений інженер, Научно-экспериментальная лаборатория «Физико-химической биологии» научно-учебного центра «Институт биологии», Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 60, г. Киев, Украина, 01601
E-mail: stanya@bigmir.net

Богун Лариса Ивановна, кандидат біологічних наук, старший научний співробітник, Научно-экспериментальная лаборатория «Физико-химической биологии» научно-учебного центра «Институт биологии», Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 60, г. Киев, Украина, 01601
E-mail: bogynal@gmail.com

УДК 602.6:577.1

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.53844

КОНСТРУЮВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ДІАГНОСТИКУМУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ГЛІФОСАТ-РЕЗИСТЕНТНОЇ ГЕНЕТИЧНО-МОДИФІКОВАНОЇ СОЇ

© В. Г. Спиридонов, Я. В. Хоменко, В. Д. Іщенко, В. С. Гончаренко, Н. М. Шимко, Д. Ю. Рибальченко

В процесі роботи рекомбінантним ферментом 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат синтазою (CP4 EPSPS), що надає ознаки толерантності до гліфосату ГМ-сої, імунізовано домашню курку та отримання жовткові специфічні антитіла IgY. Представлені етапи конструювання імуноферментного діагностичного комплексу, що дозволяє виявляти не менше 0,1 % генетично-модифікованої сої, стійкої до гліфосату

Ключові слова: генетично модифіковані рослини, ІФА, 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат синтаза, жовткові антитіла

During research we have utilized recombinant enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (CP4 EPSPS), conferring resistance to glyphosate for GM soybean, for the hen immunization and obtaining specific yolk antibodies IgY. Stages of ELISA development that can detect at least 0,1 % of GM-soybean resistant to glyphosate were present

Keywords: genetically modified plants, enzyme immunoassay, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, yolk antibodies

1. Вступ

Стійкі до гербіцидів трансгенні культури складають близько 60 % всіх генетично-модифікованих с.-г. культур, серед яких перше місце посідає гліфосат-резистентна соя, обсяги річного виробництва

якої сягають більше 260 мільйонів тон. Сьогодні країнами лідерами у виробництві сої є Сполучені Штати, Бразилія та Аргентина в яких депоновано більше 80 % світового виробництва сої [1]. Зростання виробництва соєвих бобів в основному обумов-