

УДК 577.152.31:577.151.04:595.773.4

**А. М. Андриевский**, канд. биол. наук, доц., докторант  
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
кафедра генетики и молекулярной биологии,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, E-mail: andriev\_scar@mail.ru

### ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ *IN VITRO* НА ЭКСПРЕССИЮ АКТИВНОСТИ ГИДРОЛАЗ ЭФИРОВ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ОНТОГЕНЕЗЕ ОСОБЕЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Используя метод вертикально-пластинчатого щелочного электрофореза в полиакриламидном геле, разделяли белки буферно-трисовых экстрактов тканей личинок, куколок и самцов имаго дрозофилы дикого типа. После электрофореза гели выдерживали в инкубационной среде (рН 7,4), содержащей  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтилацетаты, прочный синий, а также соли одно- и двухвалентных (за исключением германия) металлов. Уровень активности отдельных эстераз определяли по интенсивности окрашивания фракций, соответствующих локализации ферментов в геле и содержащих продукты азосочетания нафтолов и диазония. Установлено ингибирующее действие на эстеразы подавляющего большинства ионов тяжёлых металлов; обнаружена активация  $\beta$ -специфичной эстеразы ионами щелочных металлов; допускается стабильность металл-эстеразных комплексов для ионов  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  с низким проявлением ферментативной активности. Рассчитаны коэффициенты ингибирования ионами металлов аллозимов *S* и *F*  $\beta$ -специфичной эстеразы личинок, куколок и имаго, а также определены показатели межаллозимного соотношения уровней экспрессии -  $S/F$  - для каждого варианта опытов. Обсуждается вопрос о чувствительности карбоксиэстераз к катионам исследуемых металлов в онтогенезе.

**Ключевые слова:** гидролазы эфиров карбоновых кислот, аллозимы  $\beta$ -эстеразы, ионы металлов, онтогенез, дрозофила.

Известно, что ионы металлов, взаимодействуя с белками, участвуют в образовании ионных, электростатических либо координационных связей, устойчивость которых определяется энергией ионизации взаимодействующих атомов, а также другими факторами их окружения [1, 2]. Кроме того, контактируя с полипептидной цепью, ионы металлов могут нарушать гидратную оболочку белка, приводя к изменению его нативной конформации. Подобные реакции несомненно отражаются на каталитических функциях ферментов. В этом случае особенно эффективно взаимодействие ионов металлов с ферментами, в активный либо акцепторный центры которых входят аминокислотные радикалы с хорошо поляризуемыми атомами (прежде всего, кислорода и серы) [3]. К группе таких ферментов относятся и эстеразы эфиров карбоновых кислот, в структуре которых установлено наличие анионного центра (ацетилхолинэстераза и подобные ей ферменты).

Несмотря на разностороннюю изученность гидролитических ферментов животных организмов, в научной литературе практически отсутствует информация о конкретном влиянии ионов различных металлов на каталитическую функцию карбоксиэстераз. С одной стороны это, возможно, связано с тем, что среди ферментов данной группы, как правило, отсутствуют металлозависимые эстеразы, которые адекватно реагировали бы на присутствие хелатирующих реагентов

(ЭДТА и других), с другой стороны – при изучении сходных по биохимическим свойствам ферментов исследователи сталкиваются с методическими трудностями их препаративного разделения.

Принимая во внимание биологическую роль этих ферментов в жизнедеятельности насекомых, в данной работе ставилась цель изучить влияние *in vitro* ионов металлов, в том числе и тяжёлых, на важнейшие эстеразы эфиров карбоновых кислот дрозофилы. Особый интерес вызывал вопрос об онтогенетических особенностях устойчивости эстераз и некоторых их аллозимов к непосредственному действию ионов металлов, используемых в оптимальных концентрациях.

### Материалы и методы исследования

Экспериментальным материалом служили разновозрастные 3-суточные личинки, куколки и самцы имаго единой популяции *Drosophila melanogaster* Meigen, по морфологическим признакам представляющей собой линию дикого типа – *Одесская I*. Мух содержали на простой питательной среде при 25°C [4]. С целью получения ферментсодержащих экстрактов группы отобранных личинок, куколок и половозрелых самцов гомогенизировали в 0,1 М глицин-NaOH буфере pH 9,0 с 1% тритоном X-100, исходя из расчёта – 10 мкл раствора на одну особь. Приготовленные гомогенаты центрифугировали на холоде при 10 000 г в течение 15 мин, после чего супернатанты отделяли от осадков. Перед электрофоретическим разделением к 10 мкл отдельной пробы полученного экстракта приливали 5 мкл 0,01% раствора бромфенолового синего, приготовленного на 60% растворе сахарозы. Щелочной электрофорез проводили в 10% полиакриламидном геле пластинчатой формы с размерами 140 × 120 × 1 мм. После разделения белковых компонентов экстракта каждую пластину геля разрезали по вертикали на две равные части и отдельно отмывали от электродного буфера дистиллированной водой до нейтрального значения pH; далее, выдерживали 10 мин в 0,1 М трис-глициновом буфере pH 7,4. Подготовленные таким образом гелевые блоки выдерживали в течение 10 мин в 25 мл 0,1 М трис-глицинового буфера (pH 7,4), содержащего отдельно взятые соли в конечных концентрациях: NaCl – 15,6 мМ, KCl – 15,6 мМ, CaCl<sub>2</sub> – 7,8 мМ, MnCl<sub>2</sub> – 7,8 мМ, CoCl<sub>2</sub> – 7,8 мМ, NiCl<sub>2</sub> – 7,8 мМ, CuCl<sub>2</sub> – 0,6 и 6,0 мМ, ZnCl<sub>2</sub> – 7,8 мМ, Ge-ОЭДФ-(оксиэтилдифосфат)-Ca – 1,6 и 4,0 мМ, CdCl<sub>2</sub> – 7,8 мМ, HgCl<sub>2</sub> – 7,8 мМ, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> – 7,8 мМ. Далее, в инкубационные смеси добавляли по 12 мг α-нафтилацетата и β-нафтилацетата, а также 25 мг прочного синего ВВ, предварительно растворённых в 50 мкл диметилформамида. Гели контрольных вариантов обрабатывали буферным раствором, не содержащим используемых солей металлов.

Ферментативную реакцию проводили в течение 20 мин при 25°C, после чего гелевые пластины заливали кипящей дистиллированной водой, тем самым инактивируя ферменты и прекращая реакцию азосочетания.

В отдельной серии опытов после обработки исходными растворами хлоридов никеля, меди и цинка гелевые блоки отмывали 2 л дистиллированной воды и инкубировали в буферной среде, содержащей субстраты и диазоний при указанных выше условиях.

После остановки биохимических реакций гелевые блоки промывали водой и сканировали при высоком уровне чувствительности, сохраняя цифровую информацию в формате BMP. Полученные изображения денситометрировали, используя специальную лицензионную компьютерную программу «АнаИС»

(Поджарский, Рыбалка, 2004 г.). Об уровне экспрессии отдельных фракций ферментов судили по показателям их оптической плотности ( $\Delta D_{60}$ , относительные единицы), зависящей от количества продуктов азосочетания. Средние значения  $\Delta D_{60}$  при  $n = 8$  использовали для расчёта коэффициентов ингибирования либо активации аллозимов  $\beta$ -специфичной эстеразы по  $\frac{\Delta D_{60} \text{ Est}^S (F)_{\text{control}}}{\Delta D_{60} \text{ Est}^S (F)_{\text{metal}}}$  а также показателей аллозимного соотношения по  $\frac{\Delta D_{60} \text{ Est}^S}{\Delta D_{60} \text{ Est}^F}$ .

Статистическую обработку первичных данных проводили согласно [5], используя компьютерную программу "Excel". Ту же программу применяли для иллюстрации полученных результатов.

В работе использовали химические реагенты фирм "Reanal" (Венгрия), "Chemapol" (Чехия), "Ferak" (Германия), "Acros organics" (США), «Рехим» (Россия) квалификации «х. ч.» и «о. с. ч.», а также прибор для электрофореза "VE-4" российского производства.

Автор выражает благодарность заведующей кафедрой неорганической химии и полимеров ОНУ имени И. И. Мечникова профессору И. И. Сейфуллиной за любезно предоставленный препарат комплексной соли германия с целью апробации его действия на гидролитические ферменты животного происхождения.

### Результаты исследования и обсуждение

Судя по результатам денситометрии, представленным на рис. 1, ионы всех тяжёлых металлов, а также кальция и марганца, введенные в инкубационную среду в виде солей в установленных концентрациях, в той или иной степени влияют на проявление активности различных гидролаз эфиров карбоновых кислот личинок дрозофилы. При этом одни из них по отношению к отдельным ферментам обладают ингибирующим действием, другие существенно активируют гидролиз применяемых субстратов. Так, при наличии в среде инкубации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Ge}^{4+}$  (1,6 мМ) достоверно повышается активность тетрамерной ацетилхолинэстеразы, тогда как ионы  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , а также  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  существенно понижают каталитическую функцию этой эстеразы. В этом случае особенно выражено ингибирующее действие ионов никеля, меди и цинка: в их присутствии ацетилхолинэстеразная активность снижается примерно в 2 раза.

Ещё более выражено негативное (за исключением  $\text{Co}^{2+}$ ) влияние ионов используемых металлов на ацетилэстеразу: по сравнению с контролем, в зависимости от добавленного катиона, активность этого фермента снижается на 50–75%.

Чувствительной к подавляющему большинству ионов тяжёлых металлов, а также кальция и марганца оказалась и  $\beta$ -специфичная аромэстераза, представленная двумя аллозимами – *S* (медленноподвижным) и *F* (быстроподвижным). Как видно из рис. 1 и рис. 4 (Личинки), показатели степени инактивации обоих аллозимов  $\beta$ -специфичной аромэстеразы личинок ионами одного и того же металла практически совпадают. Следует подчеркнуть что, в отличие от других эстераз, в случае аромэстеразы присутствие в инкубационной среде ионов кобальта не сказывается на проявлении её активности.

В отличие от ацетилхолинэстеразы личинок, ацетилхолинэстераза куколок оказалась чувствительной не только к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Ge}^{4+}$  (1,6 мМ); её активность значительно стимулировали  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  (в низкой концентрации),  $\text{Cd}^{2+}$  и в меньшей степени –  $\text{Pb}^{2+}$ . Мощное ингибирующее действие проявляли ионы

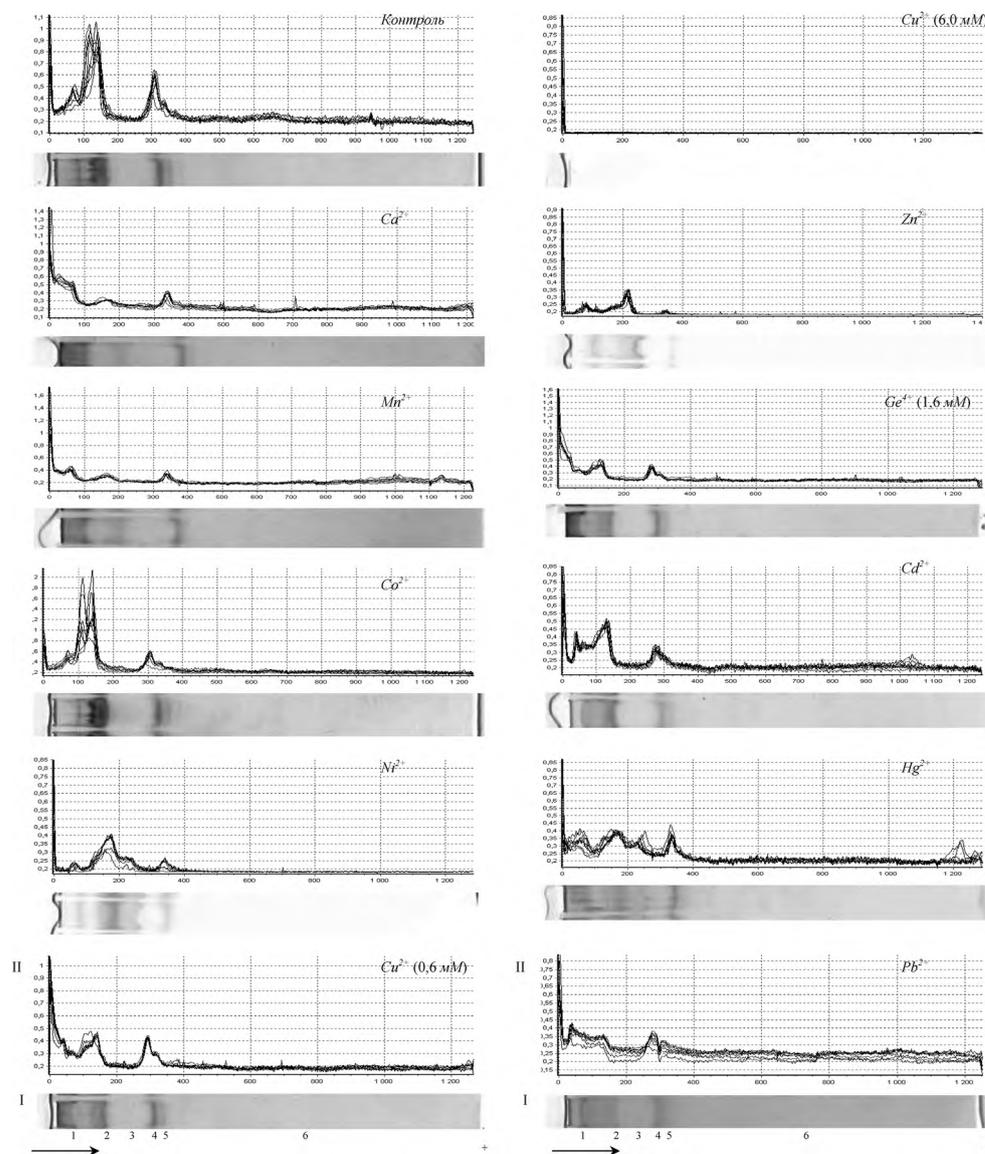


Рис. 1. Активность гидролаз эфиров карбоновых кислот личинок *Drosophila melanogaster* в гелевом блоке в присутствии ионов металлов: I - электрофореграммы: стрелками указано направление движения ферментов в гелевом блоке во время электрофореза; представлено по одному треку из 8 для каждого варианта. II - денситограммы: приведены линии по 8 трекам; по оси x: длина трека (пиксели), по оси y: оптическая плотность ( $\Delta D_{500}$ , относительные единицы). 1 - ацетилхолинэстераза (тетрамер), 2 - ацетилэстераза, 3 - ацетилхолинэстераза (димер), 4 - аромэстераза (*S*-аллозим), 5 - аромэстераза (*F*-аллозим), 6 - ацилэстераза

Влияние ионов металлов на карбоксиэстеразы дрозофилы

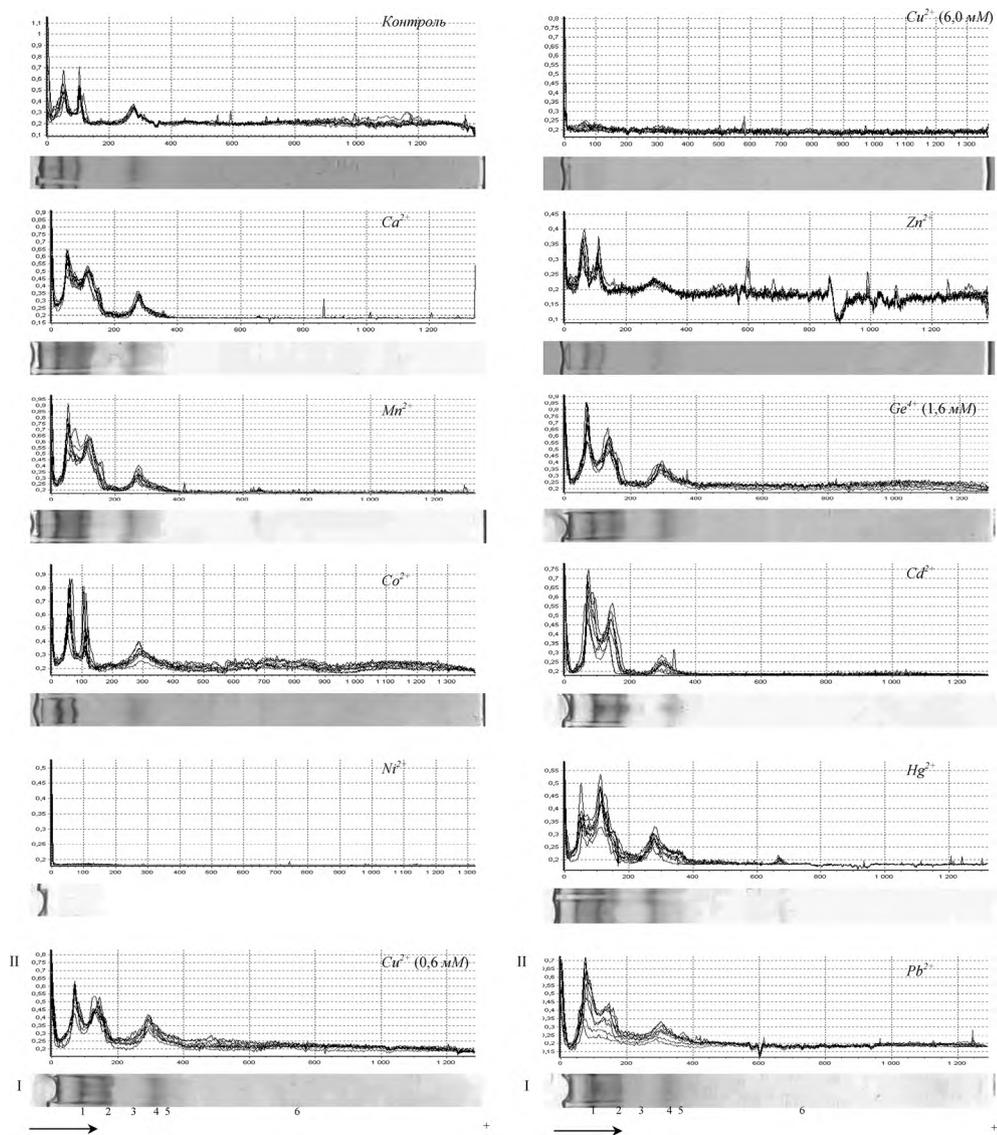


Рис. 2. Активность гидролаз эфиров карбоновых кислот куколок *Drosophila melanogaster* в гелевом блоке в присутствии ионов металлов: обозначения те же, что и на рис. 1

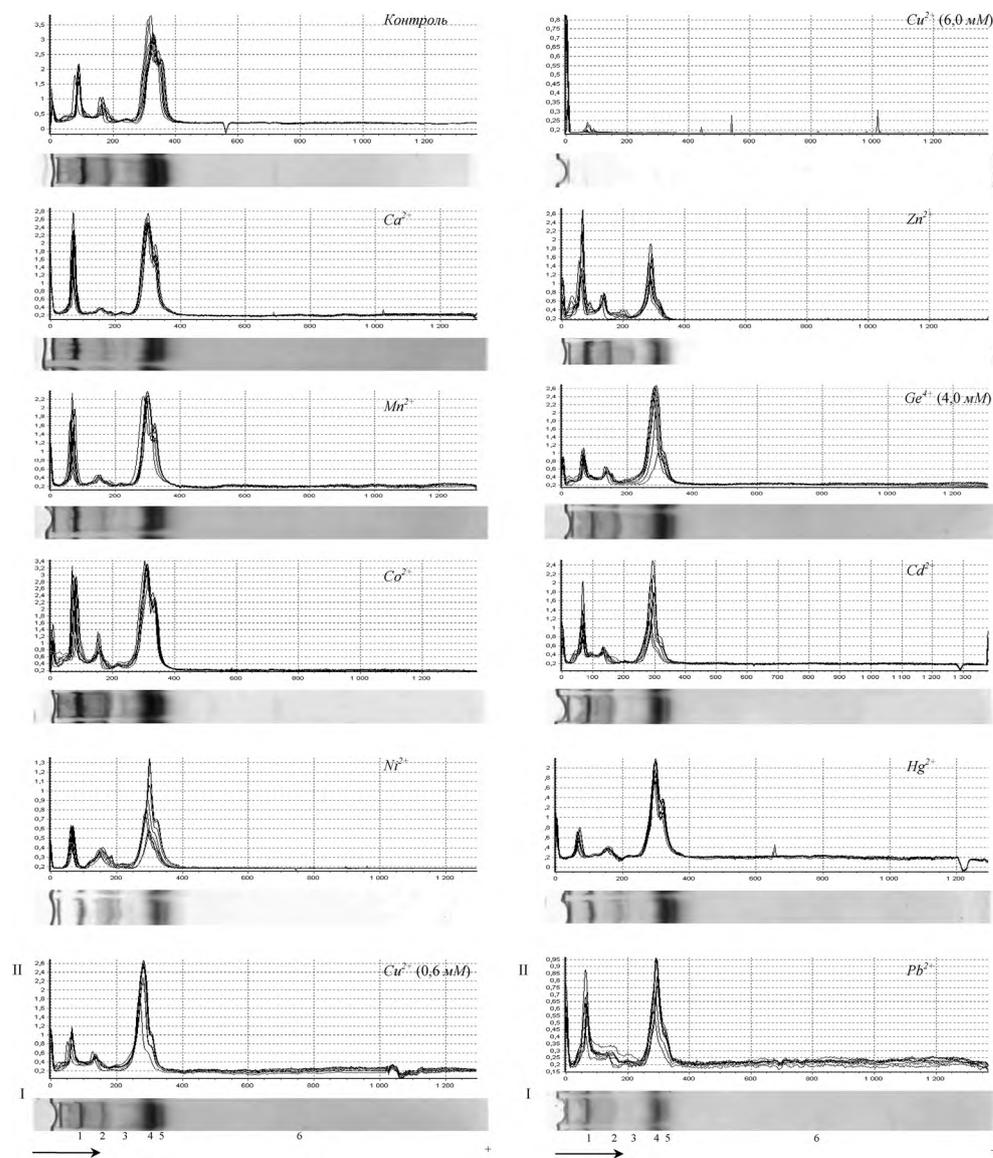


Рис. 3. Активность гидролаз эфиров карбоновых кислот имаго самцов *Drosophila melanogaster* в гелевом блоке в присутствии ионов металлов: обозначения те же, что и на рис. 1

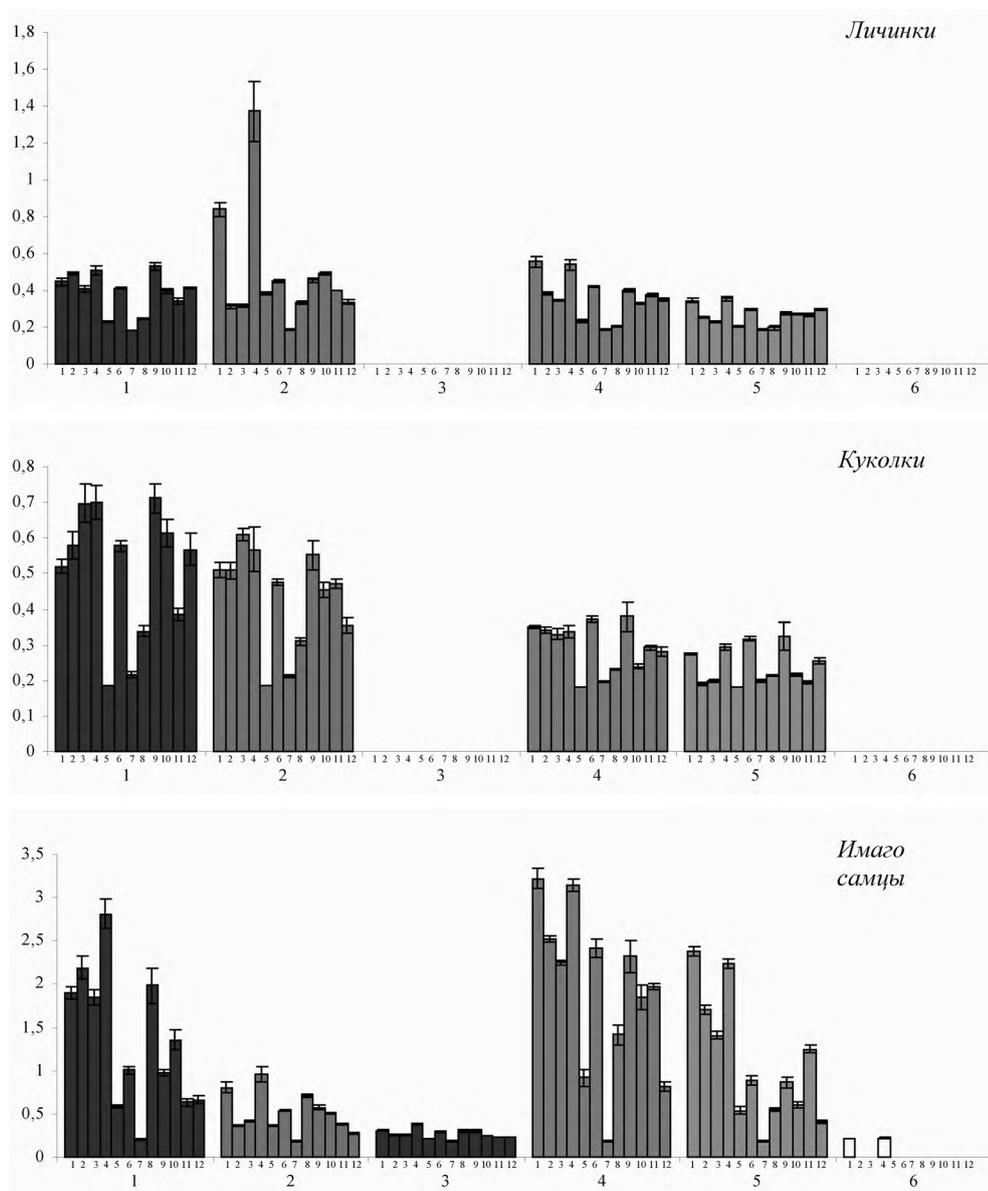


Рис. 4. Влияние ионов металлов на экспрессию гидролаз эфиров карбоновых кислот личинок, куколок и имаго самцов *Drosophila melanogaster*. По оси y: оптическая плотность ( $\Delta D_{500} \pm m$  при  $n = 8$ , относительные единицы), отражающая экспрессию ферментов. По горизонтали: 1 - ацетилхолинэстераза (тетрамер), 2 - ацетилэстераза, 3 - ацетилхолинэстераза (димер), 4 - аромэстераза (*S*-аллозим), 5 - аромэстераза (*F*-аллозим), 6 - ацилэстераза; 1 - Контроль, 2 -  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 -  $\text{Mn}^{2+}$ , 4 -  $\text{Co}^{2+}$ , 5 -  $\text{Ni}^{2+}$ , 6 -  $\text{Cu}^{2+}$  (0,6 мМ), 7 -  $\text{Cu}^{2+}$  (6,0 мМ), 8 -  $\text{Zn}^{2+}$ , 9 -  $\text{Ge}^{4+}$  (1,6 мМ: Личинки и Куколки; 4,0 мМ: Имаго самцы), 10 -  $\text{Cd}^{2+}$ , 11 -  $\text{Hg}^{2+}$ , 12 -  $\text{Pb}^{2+}$

$\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  (в высокой концентрации) и  $\text{Zn}^{2+}$ . Сходным образом в присутствии тех же ионов проявляется активность ацетилэстеразы куколок, но в этих условиях фермент оказывается более устойчивым по сравнению с той же эстеразой личинок.

Аллозимы аромэстеразы куколок во многих случаях реагируют на ионы многих металлов практически одинаково, за исключением ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ . Устойчивость *S*-аллозима к ионам кальция и марганца довольно высокая, в то время как *F*-аллозим легко угнетается в присутствии этих ионов (рис. 2 и рис. 4 (*Куколки*)).

Как видно из рис. 3, наиболее выражено избирательность действия ионов металлов на гидролазы эфиров карбоновых кислот проявляется у взрослых самцов. Ацетилхолинэстераза в форме тетрамера сильно активируется ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$  и в большей степени по сравнению с ферментом личинок и куколок угнетается ионами никеля, меди, ртути и свинца. Но, в отличие от ферментов личинок и куколок, ацетилхолинэстераза половозрелых самцов обладает высокой устойчивостью к ионам цинка. В противоположность этому, димер ацетилхолинэстеразы имаго наиболее чувствителен к высоким концентрациям ионов  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ . Ионы двух последних металлов ингибируют его активность, а ионы кобальта – активируют. Ацетилэстераза самцов имаго реагирует на катионы примерно так же, как и фермент личинок, однако стимулирующий эффект  $\text{Co}^{2+}$  менее выражен. К тому же, как и ацетилхолинэстераза, ацетилэстераза характеризуется более высокой устойчивостью к действию ионов  $\text{Zn}^{2+}$ .

Реакции аллозимов аромэстеразы на присутствие в среде таких ионов, как  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  (высокая концентрация),  $\text{Hg}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  во многом сходны: все указанные ионы в той или иной степени угнетают активность как *S*-, так и *F*-формы фермента. В то же время медленноподвижный аллозим оказывается более устойчивым к ионам цинка, германия и кадмия, а также менее чувствительным по сравнению с *F*-аллозимом к действию невысоких концентраций ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (рис. 3 и рис. 4). Наконец, у самцов имаго проявляется крайне слабая активность ацилэстеразы, которая полностью инактивируется ионами всех металлов, за исключением  $\text{Co}^{2+}$ .

Как следует из результатов отдельной серии опытов (рис. 5), наряду с ионами кобальта и кальция (в отдельных случаях –  $\text{Mn}^{2+}$ ) активирующим действием на большинство эстераз обладают ионы натрия и калия. Введенные в инкубационную среду в высокой концентрации (15,6 мМ), эти ионы (особенно  $\text{K}^{+}$ ) значительно (на 10–40%) повышают активность ацетилхолинэстеразы и обоих аллозимов аромэстеразы самцов имаго. В то же время присутствие ионов щелочных металлов никак не сказывается на проявлении активности ацетилэстеразы.

В рамках проведенного исследования особый интерес вызывает дифференциальная чувствительность аллозимов *S* и *F* аромэстеразы личинок, куколок и имаго к различным ионам металлов. О том, как реагируют разные аллозимы на катионы одного типа можно судить по различиям коэффициентов ингибирования либо активации, рассчитанных для каждой молекулярной формы фермента относительно показателей проявления их активности в контрольных вариантах (рис. 6). Так, у личинок коэффициенты ингибирования *S*- и *F*-аллозимов ионами  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Ge}^{4+}$  практически совпадают.

Небольшие межаллозимные отличия в чувствительности наблюдаются в отношении ионов ртути. Более эффективно *F*-аллозим угнетается ионами  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$ , причём в присутствии ионов свинца экспрессия аллозима *S* слабо отличается

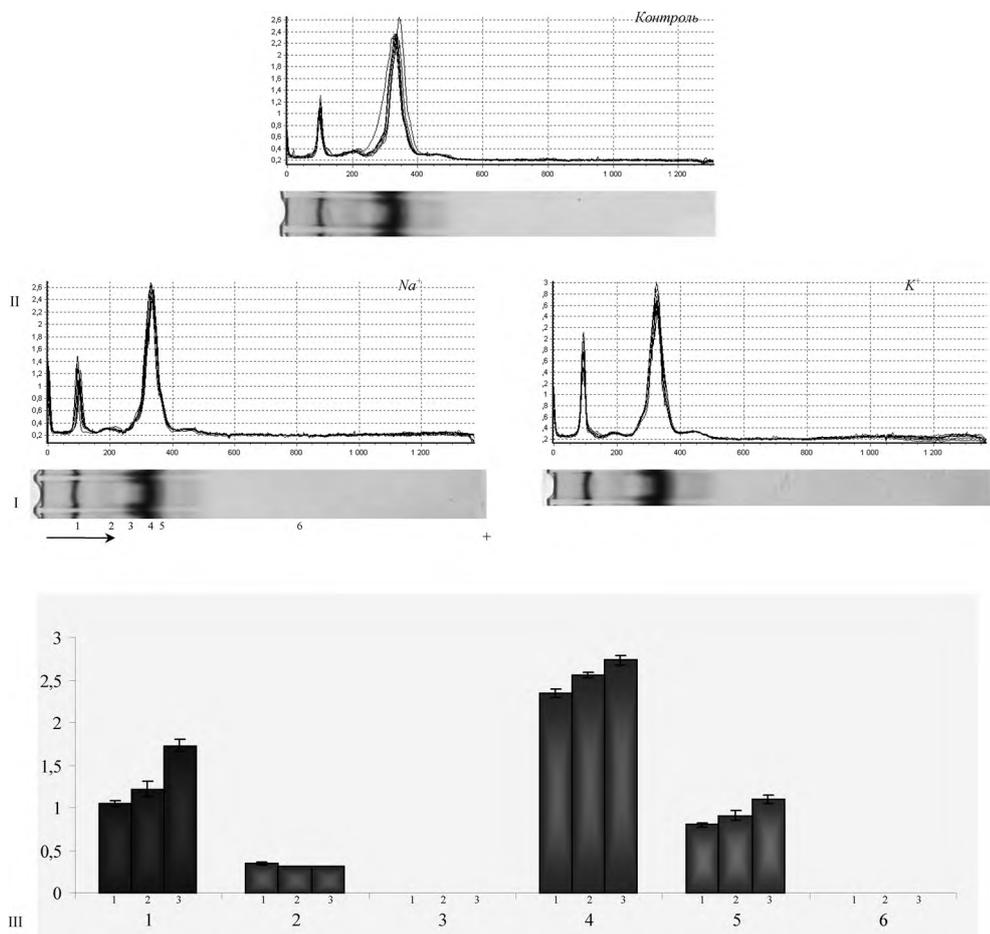


Рис. 5. Активация гидролаз эфиров карбоновых кислот имаго самцов *Drosophila melanogaster* ионами щелочных металлов: I - электрофореграммы: представлено по одному треку из 8 по каждому варианту опытов; 1 - ацетилхолинэстераза (тетрамер), 2 - ацетилэстераза, 3 - ацетилхолинэстераза (димер), 4 - аромэстераза (*S*-аллозим), 5 - аромэстераза (*F*-аллозим), 6 - ацилэстераза. II - денситограммы: по оси y: оптическая плотность ( $\Delta D_{500}$ , относительные единицы) по результатам анализа 8 треков; по оси x: длина треков (пиксели). III - гистограмма: по оси y: оптическая плотность ( $\overline{\Delta D_{500}} \pm m$  при  $n = 8$ , относительные единицы); по горизонтали: 1- 6 - порядковые номера ферментов, соответствующие фракциям на электрофореграммах; 1 - *Контроль*, 2 -  $\text{Na}^+$ , 3 -  $\text{K}^+$

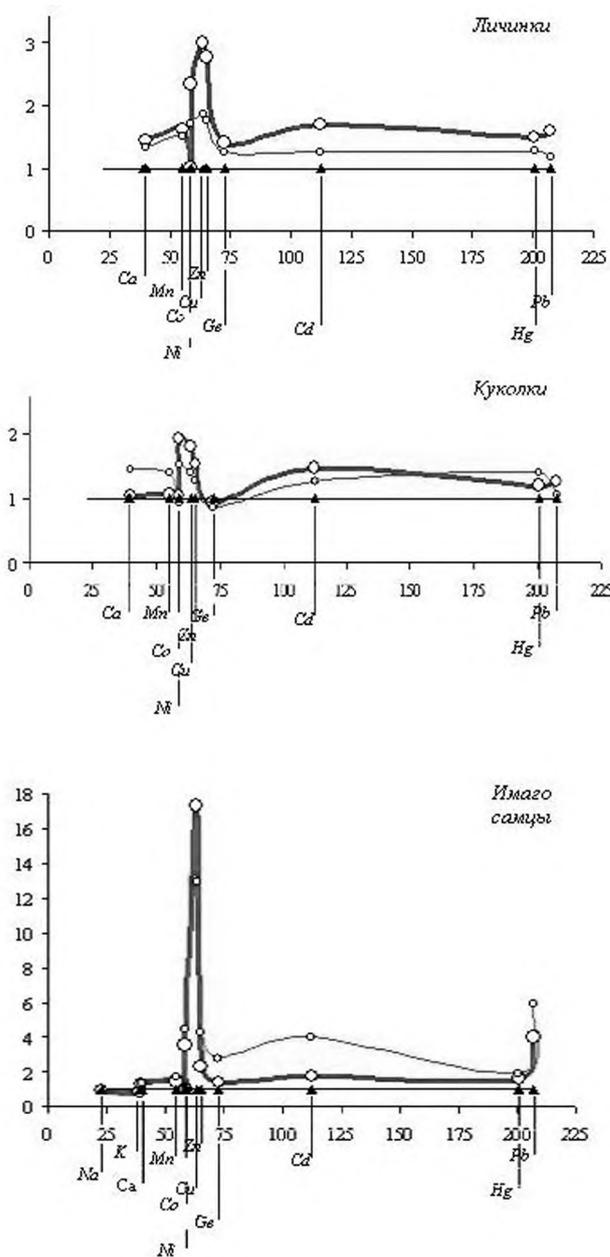


Рис. 6. Эффективность влияния ионов металлов на экспрессию аллозимов аромэстеразы личинок, куколок и имаго самцов *Drosophila melanogaster*. По оси y: значения > 1 – коэффициенты ингибирования S-аллозима (⊖) и F-аллозима (⊕), рассчитанные по  $\frac{\Delta \overline{Do} Est^{S(F)}}{\Delta \overline{Do} Est^{S(F)_{control}}}$  где  $\Delta \overline{Do}$  – средний показатель оптической плотности для S (F)-аллозима контрольного и опытного вариантов (n = 8); значения < 1 – коэффициенты активации; прямая с ординатой y = 1 – линия индифференции. По оси x: относительные атомные массы металлов

от уровня проявления активности в контроле. Ещё более выраженным оказалось действие на быстроподвижную форму  $\beta$ -эстеразы ионов  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ : несмотря на то, что хлорид меди использован в меньшей концентрации, нежели хлориды никеля и цинка, влияние  $\text{Cu}^{2+}$  превосходит влияние как  $\text{Ni}^{2+}$ , так и  $\text{Zn}^{2+}$  (рис. 6).

Как видно из рис. 6, *F*-аллозим аромэстеразы куколок наиболее чувствителен к ионам никеля; в меньшей степени – к  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ . Незначительные отклонения в экспрессии *S*- и *F*-аллозимов наблюдаются в присутствии ионов кадмия, ртути и свинца, что указывает на их сходное влияние на активность разных молекулярных форм эстеразы куколок. При этом, незначительной активирующей способностью обладают ионы  $\text{Co}^{2+}$  (по отношению к *F*-аллозиму) и  $\text{Ge}^{4+}$  (по отношению к *S*- и *F*-аллозимам). Наконец, в отличие от медленноподвижной формы фермента куколок, их *F*-аллозим оказался в одинаковой степени чувствительным к ионам кальция и марганца.

Что касается  $\beta$ -специфичной эстеразы половозрелых самцов, то её *S*- и *F*-аллозимы примерно в равной мере подвержены активирующему действию ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  и ингибирующему – ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Hg}^{2+}$ . Более устойчивым по сравнению с *F*-аллозимом оказался аллозим *S* в присутствии  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ge}^{4+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  и особенно  $\text{Cd}^{2+}$ . Совершенно противоположным эффектом обладают ионы меди: при высокой их концентрации более резистентно ведёт себя *F*-аллозим, тогда как активность *S*-формы  $\beta$ -эстеразы снижается примерно на 95% (рис. 6).

На рис. 7 представлены показатели соотношений уровней экспрессии *S*- и *F*-аллозимов аромэстеразы личинок, куколок и имаго для контрольных и опытных вариантов. Из рисунка видно, что все используемые металлы в ионной форме в разной степени снижают уровень *S*-аллозима личинок. При этом ни один из показателей найденных соотношений не превышает их уровня у контрольных личинок. В большинстве случаев то же самое наблюдается в случае *S*-аллозима аромэстеразы куколок. Исключение составляют варианты, в которых использованы хлориды  $\text{Ca}$ ,  $\text{Mn}$  и  $\text{Hg}$ . Это указывает на то, что более чувствительным к ингибирующему действию ионов указанных металлов является быстроподвижный аллозим куколок. В то же время показатели межаллозимного соотношения в опытах с добавлением  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ge}^{4+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , и  $\text{Pb}^{2+}$  практически совпадают с показателем контрольного варианта куколок, что говорит о почти одинаковой чувствительности *S*- и *F*-аллозимов аромэстеразы куколок к перечисленным ионам тяжёлых металлов.

Для аромэстеразы половозрелых самцов характерно то, что их *S*-аллозим оказывается менее чувствительным к действию ионов всех металлов, за исключением меди. В то же время экспрессия *F*-аллозима более всего угнетается ионами цинка, германия и кадмия, к которым *S*-аллозим проявляет достаточно высокую устойчивость.

О стабильности образующихся комплексов ионов металлов с эстеразами дрозофилы можно судить по проявлению их активности после обработки растворами  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$  и  $\text{ZnCl}_2$  с последующей отмывкой дистиллированной водой и нейтральным буфером. Как видно из рис. 8, после удаления свободных катионов ион-ферментные комплексы практически всех исследуемых эстераз самцов имаго сохраняют лишь 50–60% своей исходной активности. При этом наименее активными агрегатами являются  $\text{Cu}^{2+}$ -ацетилхолинэстераза,  $\text{Cu}^{2+}$ - и  $\text{Zn}^{2+}$ -ацетилэстераза, *S*- и *F*-аллозимы  $\text{Cu}^{2+}$ - и  $\text{Zn}^{2+}$ -аромэстеразы. Их нафтилацетазная активность проявляется в меньшей степени по сравнению с теми же эстеразами, модифицированными ионами  $\text{Ni}^{2+}$ .

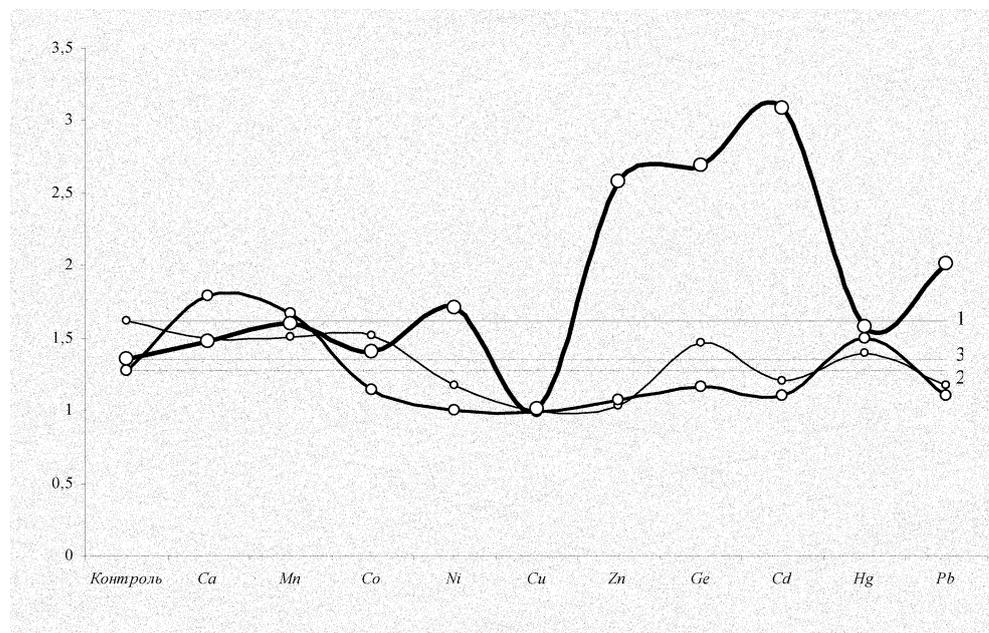


Рис. 7. Межаллозимные соотношения экспрессии аромэстеразы личинок, куколок и имаго самцов *Drosophila melanogaster* в условиях действия ионов металлов: По оси у: показатели соотношений  $\Delta\overline{Do Est^s} / \Delta\overline{Do Est^f}$ . По оси х: Контроль и обозначения металлов, расположенных в порядке возрастания относительной атомной массы.  $\circ$  — личинки,  $\ominus$  — куколки,  $\oplus$  — имаго самцы. 1 — уровень кон-троля личинок, 2 — уровень контроля куколок, 3 — уровень контроля имаго самцов

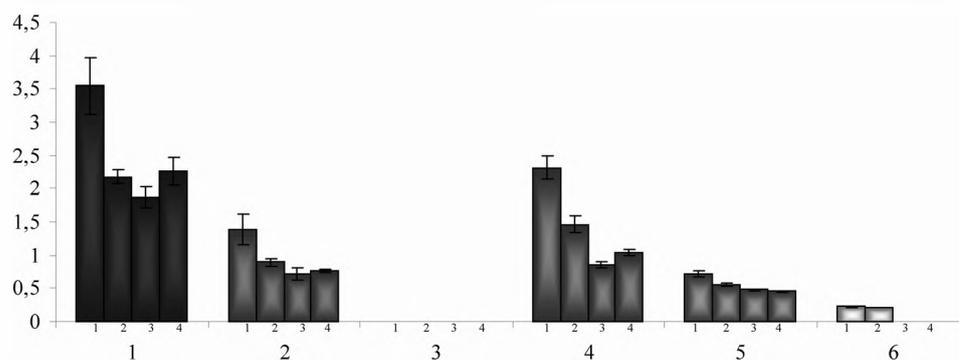


Рис. 8. Ферментативная экспрессия связанных с ионами тяжёлых металлов эстераз самцов имаго *Drosophila melanogaster*: По оси у: оптическая плотность ( $\Delta\overline{Do} \pm m$  при  $n = 8$ , относительные единицы). По горизонтали: 1 — ацетилхолинэстераза (тетрамер), 2 — ацетилэстераза, 3 — ацетилхолинэстераза (димер), 4 — аромэстераза (*S*-аллозим), 5 — аромэстераза (*F*-аллозим), 6 — ацилэстераза; 1 — *Контроль*, 2 —  $Ni^{2+}$ -эстераза, 3 —  $Cu^{2+}$ -эстераза, 4 —  $Zn^{2+}$ -эстераза

## Выводы

1. Ионы лёгких и тяжёлых металлов в определённых концентрациях *in vitro* оказывают эффективное влияние на активность гидролаз эфиров карбоновых кислот *Drosophila melanogaster*.

2. Ионы Na и K в концентрациях 15,6 мМ активируют ацетилхолинэстеразу, а также S- и F-аллозимы аромэстеразы половозрелых самцов дрозофилы.

3. Ионы Ca и Co в концентрации 7,8 мМ активируют ацетилхолинэстеразу личинок, куколок и имаго.

4. Ионы тяжёлых металлов ( $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ge^{4+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  и  $Pb^{2+}$ ) в разной степени ингибируют ацетилхолинэстеразу, ацетилэстеразу и аллозимы аромэстеразы личинок, куколок и имаго.

5. Аллозимы S и F аромэстеразы личинок, куколок и имаго обладают разной устойчивостью к одним и тем же катионам.

## Литература

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: в 3-х т. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – 389 с.
2. Медянцева Э. П., Вертлиб М. Г., Будников Г. К. Ионы металлов как эффекторы ферментов // Успехи химии, 1998. – Т. 67, № 3. – С. 252–260.
3. Варфоломеев С. Д., Галиев И. А., Уторов И. В. Каталитические центры гидролаз: структура и каталитический цикл // Успехи химии, 2005. – Т. 74, № 1. – С. 67–83.
4. Медведев Н. Н. Практическая генетика. – М.: Наука, 1966. – 240 с.
5. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973. – 320 с.

## О. М. Андрієвський

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
кафедра генетики та молекулярної біології,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, E-mail: andriev\_scar@mail.ru

## ВПЛИВ ІОНІВ МЕТАЛІВ *IN VITRO* НА ПРОЯВ АКТИВНОСТІ ГІДРОЛАЗ ЕФІРІВ КАРБОНОВИХ КИСЛОТ ЛИЧИНОК, ЛЯЛЕЧОК І ІМАГО *DROSOPHILA MELANOGASTER*

### Резюме

Використовуючи метод вертикально-пластинчастого лужного електрофорезу в поліакриламідному гелі, розділяли білки буферно-трионових екстрактів тканин личинок, лялечок і самців имаго дрозофіли дикого типу. Після електрофорезу гелі експонували в інкубаційному середовищі (рН 7,4), що містило  $\alpha$ - і  $\beta$ -нафтилацетати, міцний синій, а також солі одно- і двовалентних (за виключенням германію) металів. Рівень активності окремих естераз визначали за інтенсивністю фарбування фракцій, що відповідають локалізації ферментів у гелі й утримують продукти азосполучення нафтолів і діазонію. Встановлено інгібуючу дію на естерази більшості іонів важких металів; виявлена активація  $\beta$ -специфічної естерази іонами лужних металів; припускається стабільність метало-естеразних комплексів для іонів  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  і  $Zn^{2+}$  з низьким проявом ферментативної активності. Розраховано коефіцієнти інгібування іонами металів алозимів S і F  $\beta$ -специфічної естерази личинок, лялечок і имаго, а також визначені показники межалозимного співвідношення рівнів експресії – S/F – для кожного варіанту дослідів. Обговорюється онтогенетична залежність чутливості карбоксиестераз до катіонів металів.

**Ключові слова:** гідролази ефиров карбоновых кислот, алозимами  $\beta$ -естерази, іони металів, онтогенез, дрозофіла.

**A. M. Andrievsky**

Odessa National University, Department of Genetics and Molecular Biology,  
Dvoryanskaya str., 2, Odessa, 65082, Ukraine, E-mail: andriev\_scar@mail.ru

**CARBONIC ACID ETHERS HYDROLASES OF LARVAE, PUPAE AND IMAGO  
*DRO-SOPHILA MELANOGASTER* AT INFLUENCE OF THE METAL IONS *IN VITRO***

**Summary**

Using the method of vertical-plate alkaline electrophoresis in polyacrylamid gel we have separated the ferment-containing buffer-triton tissue extracts of the larvae, pupae and male imago of the wild-type *Drosophila*. After the electrophoresis, the gel was exposed to the incubatory medium (pH 7,4) contained  $\alpha$ - and  $\beta$ -naphthylacetates, prussian blue, as well as the salts of one- and two-valence (excepting germanium) metals. The level of activity of some esterases was determined by controlling the intensity of colouring of the different fractions corresponding to the ferment localization in gel, containing the products of azocoupling of naphthols and diazonium. It was found out that the majority of ions of heavy metals has the inhibiting influence on esterases. At the same time the  $\beta$ -specific esterase can be activated by the ions of alkali elements. It is shown that metal-esterase complexes containing  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  are stable and have low level of the fermentative activity. The coefficients of inhibition of the allosimes of *S* and *F*  $\beta$ -specific esterases of larvae, pupae and imago by metal ions were calculated. The characteristics of the interallosime relationship of the expressivity level *S/F* for each variant of experiment were determined. The question connected with ontogenetic sensibility of the carboesterases to metal ions is discussed.

**Keywords:** the ethers of carbonic acids hydrolases, allosimes of  $\beta$ -esterase, metal ions, ontogenesis, *Drosophila*.