

УДК 577.152.34.083.042.591.434:595.773.4:591.3

Андрієвський О. М., канд. біол. наук, доц.,

Рижко І. Л., студ., бакалавр, Радіонов О. О., студ., бакалавр

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

## ВПЛИВ ІОНІВ МЕТАЛІВ НА РІВЕНЬ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ ДРОЗОФІЛИ В ОНТОГЕНЕЗІ

Вивчали динаміку змін протеазної активності кишечника дрозозфіли за впливу іонів металів *in vivo*. Показано загальні закономірності змін цієї активності на різних стадіях розвитку під впливом зовнішніх чинників. Виявлено значні відмінності в рівнях прояву анілідазної та естеразної активностей трипсиноподібного ферменту кишечника у різних ліній дрозозфіли.

Ключові слова: протеоліз, іони металів, онтогенез, дрозозфіла.

Прояв активності протеолітичних ферментів в онтогенезі може бути важливим показником фізіологічного стану тієї чи іншої системи організму, що зазнає вікових змін в конкретних умовах навколишнього середовища [1, 2]. У зв'язку з цим дослідження динаміки пептидгідролазної активності становить істотний інтерес при з'ясуванні впливу екзогенних чинників (у даному випадку — іонів металів) на процеси життєдіяльності та індивідуального розвитку.

Обраний нами об'єкт дослідження (*Drosophila melanogaster*), привертає до себе увагу доступністю, зручністю у використанні, багатобічною вивченістю в генетичному аспекті. З іншого боку, фізіолого-біохімічні особливості цього об'єкта ще недостатньо вивчені, що, безсумнівно, ускладнює його широке використання при моделюванні екстремальних ситуацій у біологічних системах.

При виконанні даної роботи ставили за мету з'ясувати особливості функціонування протеолітичних ферментів дрозозфіли в онтогенезі, для чого досліджували і порівнювали динаміку змін активності кишкових протеаз ліній Normal і Меллер-5 під дією іонів металів *in vivo*.

### Матеріали і методи

Дослідження провадили на двох генетичних лініях *Drosophila melanogaster*: нормальній лінії — Normal (N) — сіре тіло, коричнево-червоні очі — і мутантній — Меллер-5, яка відрізняється від мухи дикого типу жовтим забарвленням тіла (y) та абрикосовими очима (w<sup>a</sup>). Крім того, X-хромосома мутанта містить дві інверсії — sc<sup>8</sup> і δ49, що повністю виключає кросинговер між статевими хромосомами самок [8, 11].

Розвиток окремих популяцій мух здійснювався на стандартному живильному середовищі [1, 8], що містило іони важких і лужних металів, а також кальцію. Солі металів (хлориди Na, K, Co, Cu, Ca і сульфат Zn) вводили до складу корму у співвідношенні 2 мг NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>; 1 мг CaCl<sub>2</sub> і 0,2 мг CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, Zn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CdCl<sub>2</sub> на 1 мл корму. До середовища, в якому розвивалися контрольні мухи, солей металів не додавали.

У дослідах використовували тільки синхронізований матеріал: личинки, лялечки та імаго 3-денного віку. З цією метою статевозрілих (2-3-добових) самок і самців поміщали в посудини зі свіжим живильним середовищем для отримання нащадків (кладки яєць). Цих мух витримували в стандартних умовах (26 °С, нормальна вологість повітря) протягом 3 годин, після чого переводили на інше середовище.

Екстракти з експериментального матеріалу одержували за наступною схемою: личинок, лялечок і імаго відокремлювали від живильної суміші чи субстрату і гомогенізували в 0,1 М буфері гліцин-NaOH (рН 9,0) при кімнатній температурі протягом 1-3 хвилин. Після цього гомогенати центрифугували 15 хвилин при 12000 об/хв. Вміст білка в екстрактах визначали методом Лоурі та співавторів [13]. Отримані екстракти аналізували і за необхідності зберігали при температурі -10 — -15 °С.

Протеолітичну активність визначали за допомогою двох субстратів — БАПНА (бензоїларгінін-п-нітроанлід) і БАЕЕ (бензоїларгінін-етилловий ефір), яких використовували у вигляді 1 мМ водяних розчинів. Метод визначення естеразної активності трипсину і трипсиноподібних ферментів [3-7, 9] оснований на кількісній спектрофотометричній реєстрації одного із продуктів гідролізу складного ефіру, що відрізняється більш високою оптичною щільністю при довжині хвилі 253 нм [14]. Метод визначення анілідазної активності пептидгідролази оснований на спектрофотометричній реєстрації (382,5 нм) п-нітроанліну, що утворюється в реакції гідролітичного розщеплення БАПНА. Питому активність (ПА) ферменту виражали в міліодинацях (МО) в розрахунку на 1 мг білка досліджуваного екстракту тканини. За одну міліодинацію приймали кількість ферменту, який розщеплював 1 мкмоль субстрату за 1 хв інкубації при +37 °С.

Отримані дані піддавали статистичній обробці [10]. Представлені в роботі рисунки отримані з використанням комп'ютерної програми "Excel".

### Результати досліджень та їх аналіз

У ході онтогенезу зміни протеолітичної активності ферментів кишечника як у дрозофіли дикого типу, так і у Меллер-5 носять подібний характер (рис. 1-4). Найбільш інтенсивний гідроліз субстратів (БАПНА, БАЕЕ) спостерігається в присутності екстрактів личинок. Це пояснюється тим, що стадія личинки є дуже важливою у циклі розвитку мухи. У цей період йде інтенсивне споживання їжі, накопичування запасних речовин, линяння, підготовка до перетворення у лялечку і лізису тканин окремих систем організму. Під час проходження стадії лялечки відбувається перебудова цілого

ряду органів і тканин. Стадія імаго також є активною, однак інтенсивність споживання живильних речовин дорослими мухами є значно меншою у порівнянні з личиночною формою. Це призводить до більш низької активності протеаз імаго у порівнянні з такою у личинок. Слід зазначити, що імагінальні форми дрозоділи 1–2 днів життя можуть взагалі не виявляти протеолітичної активності травної системи до моменту переведення їх на повноцінне живильне середовище.

Незважаючи на виявлені типи онтогенетичні зміни пептидгідролазної активності травної системи, які властиві, мабуть, всім представникам виду, досліджуванні нами лінії на стадії личинки істотно розрізняються рівнем БАПНА-азної та БАЕЕ-естеразної активностей (рис. 1 – 4, контрольні варіанти).

У дії іонів металів на активність протеаз у ліній Меллер-5 і Normal є багато спільного, однак спостерігаються і істотні відмінності. Так, іони  $Zn^{++}$ ,  $Co^{++}$  і  $Na^+$  викликають практично однакове підвищення протеолітичної активності у личинок обох ліній. Інші ж іони виявляють неоднозначну дію: у одній лінії мух вони спричиняють активування систем протеолізу, у іншій — гноблення. Так, наприклад, у личинок Меллер-5, що знаходилися на живильному середовищі з добавками іонів  $Cu^{++}$ , спостерігається зниження активності, а у личинок Normal — підвищення.

Як видно з рисунка 1, питома БАЕЕ-естеразна активність пептидгідролази личинок лінії Normal, що утримувалися на живильному середовищі з наявністю  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Cu^{++}$ , у 1,5–2 рази вища, ніж така у контролі. У лялечок пептидгідролазна активність у присутності іонів металів більш виражена, ніж у їх відсутність, причому  $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Co^{++}$  і  $Cu^{++}$  активують фермент майже в 2 рази ефективніше, ніж  $Na^+$ ,  $K^+$  і  $Ca^{++}$  у малій концентрації. У імаго підвищення активності протеази спостерігалось тільки за наявністю  $Ca^{++}$  у високій концентрації і  $Zn^{++}$ . У лінії Меллер-5 (рис. 2) БАЕЕ-естеразна активність пептидгідролази личинок, що знаходилися на живильному середовищі з додаваннями іонів  $Ca^{++}$  у малій концентрації,  $Zn^{++}$ ,  $Co^{++}$ , підвищувалася в 2 рази в порівнянні з контролем, а в присутності іонів  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$  — в 3–4 рази. У лялечок підвищення активності протеаз спостерігалось в присутності іонів  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$  (найвища активність виявлялася на середовищі із додаванням  $Ca^{++}$ ). У імаго незначну активацію зареєстровано на живильному середовищі з додаванням іонів  $Na^+$ .

Підвищення БАПНА-азної активності пептидгідролази личинок лінії Normal (рис. 3) спостерігалось за їх розвитку на живильному середовищі з добавками іонів  $Ca^{++}$  і  $Co^{++}$  (у 1–1,5 рази), а також іонів  $Na^+$ ,  $Zn^{++}$  і  $Cu^{++}$  у 3–4 рази у порівнянні з контролем. У лялечок підвищення БАПНА-азної активності відзначалось під впливом іонів  $Na^+$  і  $K^+$ . В той же час у імаго активації протеолізу не зареєстровано.

У личинок лінії Меллер-5 на живильному середовищі з іонами  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Zn^{++}$  БАПНА-азна активність травної системи підвищувалася у 2 рази, а за наявності  $Co^{++}$  — у 4 рази (рис. 4). У лялечок значна стимуляція БАПНА-азної активності спостерігалася тільки на живильному середовищі з іона-

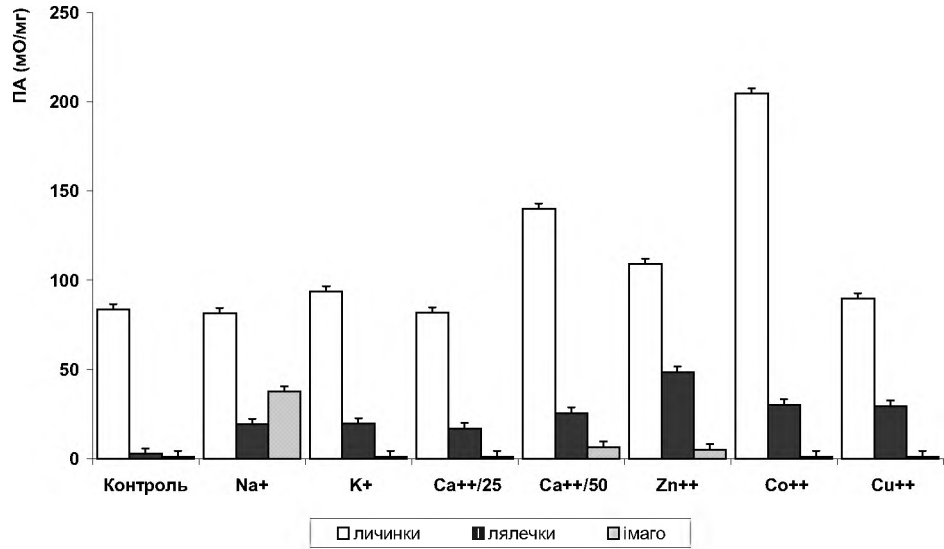


Рис. 1. БАЕЕ-естеразна активність пептидгідролази травного тракту дрозозфіли лінії Normal, яка розвивалася на живильному середовищі з добавками іонів металів

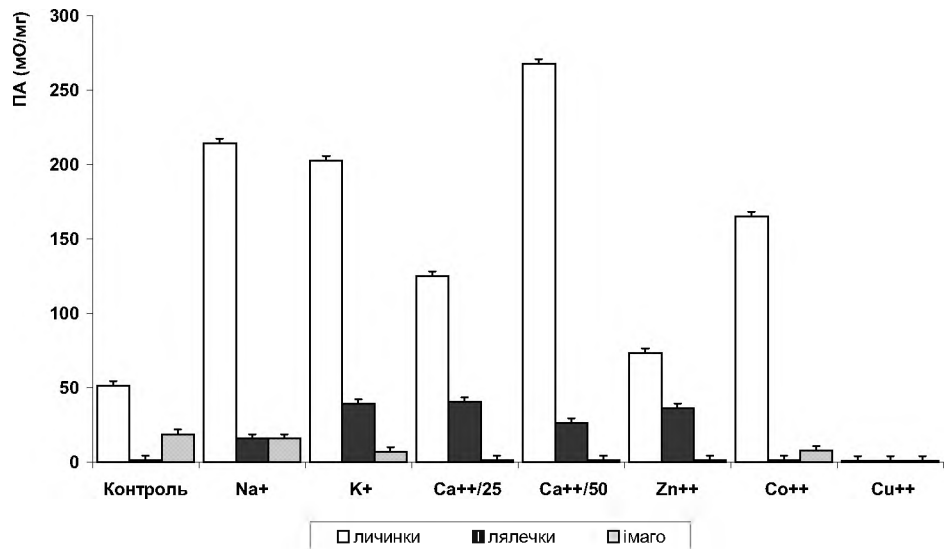


Рис. 2. БАЕЕ-естеразна активність пептидгідролази травного тракту дрозозфіли лінії Меллер-5, яка розвивалася на живильному середовищі з добавками іонів металів

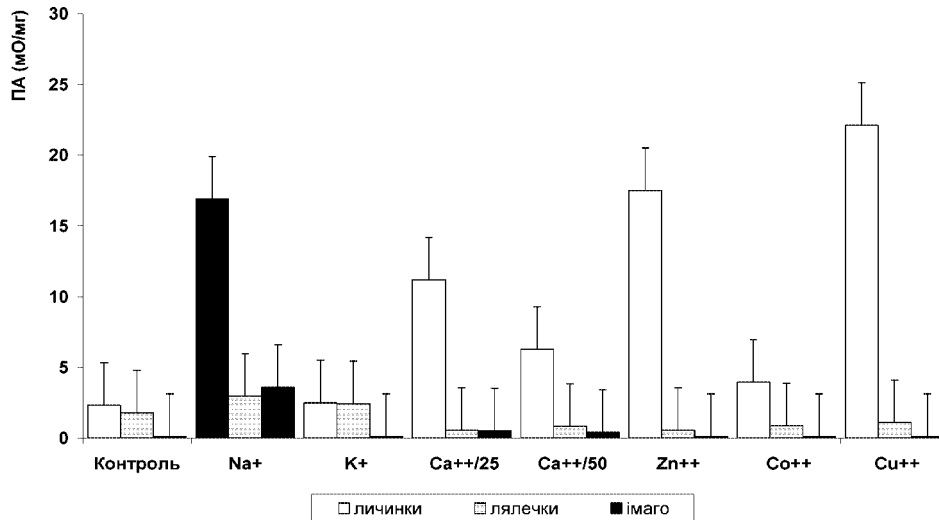


Рис. 3. БАПНА-азна активність пептидгідролази травного тракту дрозоділи лінії Normal, яка розвивалася на живильному середовищі з добавками іонів металів

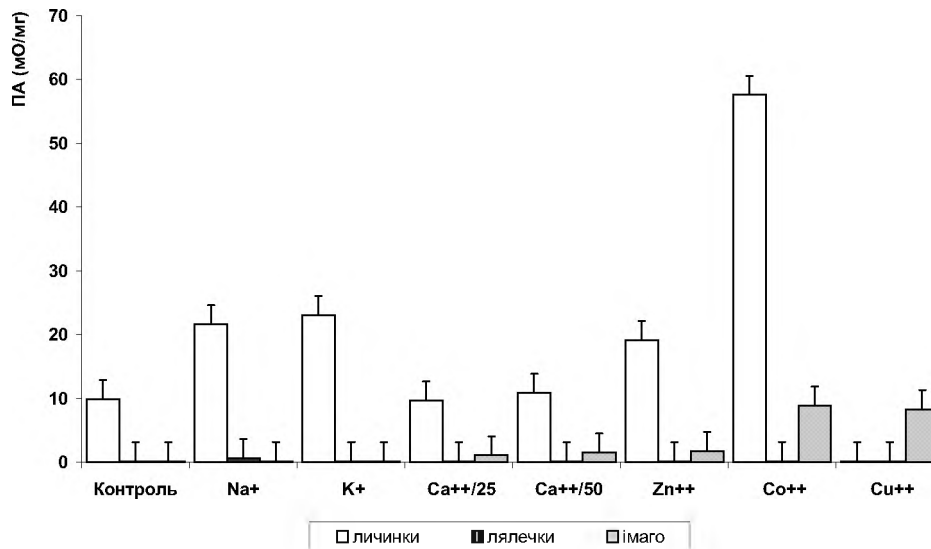


Рис. 4. БАПНА-азна активність пептидгідролази травного тракту дрозоділи лінії Меллер-5, яка розвивалася на живильному середовищі з добавками іонів металів

ми  $\text{Na}^+$ . У імаго було зареєстровано підвищення БАПНА-азної активності на живильному середовищі з добавками іонів  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$  і  $\text{Cu}^{++}$ . Слід зазначити, що в присутності  $\text{Co}^{++}$  виявлена максимальна протеолітична активність у порівнянні з контролем.

Найбільш показовими є результати, отримані при дослідженні екстрактів лялечок обох ліній. Саме на цій стадії за нормальних умов протеази інгібуються природними інгібіторами і прояв пептидгідролазної активності за наявності іонів свідчить про можливий вплив цих іонів на взаємодію ферментів і інгібіторів.

На підставі отриманих даних можна припустити, що рівень активності кишкових протеаз, відповідальних за засвоєння кормового білка, може бути своєрідним показником адаптивності тваринного організму за несприятливих умов навколишнього середовища, особливо при його забрудненні солями важких металів.

### Література

1. Андрієвський А. М., Катаненко С. В., Тоцький В. Н. Онтогенетические особенности пептидгидролазной активности экстрактов тканей *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. — 1982. — Т. 54, № 5. — С. 519-524.
2. Андрієвський А. М., Радіонов Д. Б., Федоренко Л. В., Скиба Я. Е. Онтогенетические изменения в системе протеолиза у отдельных линий дрозофилы в норме и при тепловом воздействии // III международный симпозиум: Биологические механизмы старения. Харьков. 19-21 мая 1998 г. — 1998. — С. 27
3. Антонов В. К. Химия протеолиза — М.: Наука, 1983. — 367 с.
4. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. — М.: Высш. школа, 1977. — 280 с.
5. Бородинская И. Н., Мишунин И. Ф. Методы определения активности протеолитических ферментов // Укр. биохим. журн. — Т. 60, № 2. — 1988. — С. 105-119.
6. Виноградова Р. П. Молекулярные основы действия ферментов. — Киев: Вища школа, 1978. — 280 с.
7. Колодзейская М. В., Пилявская А. С. Пептидазы. — К.: Наукова думка, 1982. — 176 с.
8. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
9. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты. — М.: Наука. — 1971. — 414 с.
10. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — 150 с.
11. Тоцький В. М. Генетика. — Одеса: Астропринт, 1998. — Т. 2. — 276 с.
12. Erlanger B., Kokovsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. and Biophys. — 1961. — V. 95, № 2. — P. 271-278.
13. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — V. 193, № 1. — P. 265-275.
14. Trautschold I., Werle E. Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikreins und seiner Inaktivatoren // Z. Phys. Chem. — 1961. — V. 325. — S. 48-59.

**Андрієвський А. М., Рыжко И. Л., Радионов А. А.**

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА УРОВЕНЬ  
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ  
СИСТЕМЫ ДРОЗОФИЛЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ**

**Резюме**

Изучали динамику изменения активности кишечных протеаз дрозофилы при действии ионов металлов *in vivo*. Показаны общие закономерности изменения активности указанных ферментов на разных стадиях развития мухи в норме и под влиянием ионов металлов. Обнаружены значительные различия в уровнях проявления анилидазной и эстеразной активностей трипсиноподобного фермента кишечника у мух различных линий.

**Ключевые слова:** протеолиз, ионы металлов, онтогенез, дрозофила.

**Andriyevsky A. M., Ryzhko I. L., Radionov A. A.**

Odessa National University after I. I. Mechnikov, Department of Genetics and Molecular Biology,  
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**THE EFFECT OF METAL IONS ON DROSOPHILA DIGESTIVE  
TRACT PROTEOLYTIC ACTIVITY DURING ONTOGENESIS**

**Summary**

The dynamics of drosophila digestive tract protease activity changes *in vivo* has been studied. There were established the general rules of activity changes in digestive tract at different stages of development under and out factor influence.

The significant changes of anilidase and esterase tripsine activities like enzyme in phenotypically different strains were observed.

**Key words:** proteolysis, metal ions, ontogenesis, drosophila.