

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АНАЛОГА ЮВЕНИЛЬНОГО ГОРМОНА
НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА
ФЕРМЕНТОВ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА
BOMBYX MORI L. НА ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОМ ЭТАПЕ
ЕГО ЛИЧИНОЧНОГО РАЗВИТИЯ***

Аннотация. Исследовано влияние аналога ювенильного гормона (АЮГ) препарата «Манта» на протеолитический комплекс ферментов тканей и органов тутового шелкопряда. Установлено, что воздействие АЮГ на протеолитические ферменты имеет тканеспецифичный характер, характеризуется определенной направленностью, развитием во времени и сопровождается активированием или ингибированием активности ферментов, а также приводит к удлинению личиночной фазы развития на сутки и возрастанию шелконосности тутового шелкопряда на 8%.

Ключевые слова: протеолитический комплекс ферментов, аналог ювенильного гормона, продуктивность, шелкообразование, регуляция роста и развития, *Bombyx mori L.*

S. Klunova, S. Balobanova
Moscow State Pedagogical University

STUDYING OF JUVENILE HORMONE ANALOG INFLUENCE ON THE ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYME COMPLEX OF TISSUES AND ORGANS OF THE SILKWORM *BOMBYX MORI L.* AT THE FINAL STAGE OF LARVAL DEVELOPMENT

Abstract. The effect of juvenile hormone analogs (AJH) drug “Manta” on proteolytic enzyme complex of tissues and organs of the silkworm has been studied. We showed that the effect of AJH on proteolytic enzymes has tissue specificity, is characterized by a certain orientation, development during some time and is accompanied by activation or inhibition of enzyme activity that also leads to the one day larval phase development lengthening and silkworm 8% silk formation increase.

Key words: proteolytic complex of enzymes, an analog of juvenile hormone, productivity, formation of silk, regulation of growth and development, *Bombyx mori L.*

Успехи, достигнутые в последние годы эндокринологией насекомых, позволили разработать новые подходы повышения продуктивности хозяйственно полезных насекомых с помощью применения регуляторов роста и развития гормональной природы [4; 5; 6]. Наиболее перспективным соединением среди синтетических аналогов ювенильного гормона оказался препарат «Манта», разработанный на основе метапрена сотрудниками фирмы Zoeson (США) специально для повышения продуктивности тутового шелкопряда. Биохимические основы, обеспечивающие регуляторное действие на процессы образования белков шелка ювенильными гормонами и их аналогами, окончательно не расшифрованы [7].

Целью данной работы явилось изучение влияния действия синтетического аналога ювенильного гормона – препарата «Манта», на активность протеолитического комплекса ферментов в тканях и органах тутового шелкопряда на заключительном этапе его личиночного развития в связи с процессами шелкообразования и продуктивностью.

Методы исследования. В качестве биологического материала использовали личинок тутового шелкопряда породы Кавказ1, предоставленных сотрудниками ГНУ РНИС

* © Клунова С.М., Балобанова С.П.

шелководства РАСХ (Ставропольского край). Гусениц 3-го дня V возраста обрабатывали раствором АЮГ из расчета $3,12 \times 10^{-4}$ мг активного вещества на одну гусеницу. Через 24 и 120 часов после обработки из организма насекомого выделяли ткани и органы, экстрагировали из них 0,15 М NaCl растворимые белки и определяли в последних общую протеолитическую активность по методу Ансона. За единицу протеолитической активности принимали такое количество ферментного препарата, которое вызывало увеличение оптической плотности на 0,01.

Результаты исследования. Проведение производственных испытаний показало, что обработка гусениц АЮГ приводит к удлинению личиночной стадии развития на сутки и возрастанию шелконосности тутового шелкопряда на 8%. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что воздействие АЮГ на протеолитические ферменты тутового шелкопряда тканеспецифично, характеризуется определенной направленностью и развитием во времени (см. табл.).

Так, через сутки после обработки гусениц АЮГ активность отдельных пептидогидролаз в кишечнике существенно возрастает (в 2-5 раз), что отражает усиление процессов распада белков корма и увеличение концентрации пула свободных аминокислот и пептидов в тканях насекомого. К концу V возраста под воздействием АЮГ состояние протеолитического комплекса подопытных насекомых соответствует периоду активного питания, присущего личинкам середины последнего личиночного возраста.

Таблица

Влияние препарата «Манта» на активность пептидогидролаз тканей и органов гусениц тутового шелкопряда V возраста

Активность ферментов в условных единицах/мг белка						
Дни V возраста						
4 день V возраста			8 день V возраста			
Кишечник						
pH	Контроль	Манта	Эффект,%	Контроль	Манта	Эффект,%
1	2	3	4	5	6	7
3,0	21,71±0,46	56,89±0,66	+162,04	42,60±0,40	158,19±10,10	+271,34
3,6	18,59±0,21	53,57±0,48	+188,16	21,02±0,16	111,52±9,85	+430,54
6,2	16,28±0,90	46,18±0,12	+183,66	4,47±0,12	46,18±1,21	+933,11
7,2	28,65±1,21	62,56±0,24	+118,36	4,09±0,24	39,72±3,70	+871,15
8,2	60,98±5,42	201,31±5,41	+230,12	3,83±0,20	13,33±0,87	+248,04
8,7	79,33±6,21	243,85±1,14	+207,38	4,61±0,17	14,72±0,65	+219,30
9,0	91,61±0,78	254,38±2,57	+177,67	8,02±0,56	29,16±1,34	+263,59
9,6	94,79±0,80	262,71±4,02	+177,15	6,87±0,28	34,08±2,12	+396,07
Σ	411,94	1181,45		95,51	446,9	
Жировое тело						
3,0	5,95 ±0,22	1,37 ±0,12	-76,97	91,03±8,30	78,90±4,39	-13,32
3,6	7,16 ± 0,60	1,28 ±0,08	-82,12	70,78±6,70	39,98±2,78	-43,51
6,2	0,91 ±0,05	0,43 ±0,03	-52,74	1,05±0,09	3,08 ± 1,13	+293,33
7,2	2,38 ±0,10	0,090±0,008	-96,22	9,40±0,87	7,75 ± 0,15	-17,55
8,2	12,65±0,98	0,030±0,002	-99,76	10,97±1,12	3,90 ± 0,17	-64,45
8,7	0,34 ±0,02	1,8 ±0,10	+444,11	5,27±0,47	7,18 ± 0,65	+36,24
9,0	5,72 ±0,50	0,22±0,01	-96,15	16,60±1,12	7,80 ± 0,22	-53,01
9,6	2,61±0,20	0,81±0,07	-68,96	14,97±1,32	1,16 ± 0,11	-92,25
Σ	37,72	6,08		220,07	149,75	
Каркас						
3,0	5,82±0,17	5,72±0,25	-1,72	9,56±0,23	8,98±0,64	-6,06

3,6	1,10±0,01	0,20±0,01	-81,82	4,82±0,15	3,56±0,21	-26,14
6,2	2,45±0,13	1,34±0,10	-45,30	5,37±0,34	4,51±0,25	-16,01
7,2	0,66±0,02	0,12±0,01	-81,82	2,24±0,12	2,10±0,17	-6,25
8,2	1,20±0,08	1,40±0,11	+16,66	3,93±0,24	4,17±0,24	+6,11
8,7	0,80±0,04	1,00±0,07	+25,00	1,25±0,02	1,58±0,11	+26,40
9,0	0,56±0,01	0,69±0,04	+23,21	2,43±0,11	2,78±0,22	+14,40
9,6	3,78±0,21	3,33±0,22	-11,90	6,86±0,26	5,64±0,26	-17,78
Σ	16,37	13,8		36,46	33,32	
Гемолимфа						
3,0	3,57±0,17	7,07 ±0,50	+50,49	21,07±0,25	24,60±1,64	+16,75
3,6	4,16±0,22	11,95 ±0,20	+287,26	15,53±0,14	20,14±0,67	+29,68
6,2	2,35±0,05	2,31 ±0,12	-1,70	15,69±1,12	17,31±0,19	+10,32
7,2	7,23±0,41	1,68 ±0,07	-76,77	13,28±0,68	15,72±0,82	+18,37
8,2	4,90±0,24	1,79 ±0,08	-63,47	7,28±0,15	7,01±0,37	-3,70
8,7	0,32±0,01	1,87 ±0,06	+484,37	5,24±0,31	4,24±0,28	-19,08
9,0	2,99±0,08	1,01 ±0,09	-66,22	2,76±0,02	1,59±0,01	-42,39
Гемолимфа						
9,6	2,20±0,08	1,44 ±0,04	-34,54	2,04±0,10	1,64±0,06	-19,60
Σ	27,72	29,12		82,89	92,25	
Фибринозный отдел шелкоотделительной железы						
3,0	5,92±0,41	24,85±1,21	+319,76	22,18±0,50	40,94±0,85	+84,58
3,6	1,48±0,08	5,38±0,31	+263,51	15,45±1,04	8,79±0,67	-43,11
6,2	5,55±0,32	2,01±0,18	-63,78	4,30±0,33	3,67±0,37	-14,65
7,2	3,33±0,30	3,64±0,20	+9,31	7,61±0,69	14,82±1,02	+94,74
8,2	2,59±0,21	0,14±0,01	-94,59	2,87±0,22	10,63±0,75	+270,38
8,7	5,92±0,15	4,24±0,36	-28,37	1,98±0,33	2,09±0,20	+5,55
9,0	5,92±0,47	1,72±0,02	-70,94	2,42±0,22	1,84±0,20	-23,96
9,6	6,10±0,23	5,17±0,12	-15,24	0,77±0,03	5,51±0,23	+615,58
Σ	36,81	47,15		57,58	88,29	
Серициновый отдел шелкоотделительной железы						
3,0	12,90 ±0,78	31,98 ±0,49	+147,90	25,24±0,56	66,25±2,56	+162,48
3,6	3,09 ±0,09	4,50±0,36	+45,63	4,38±0,36	15,00±0,96	+342,46
6,2	3,63 ±0,29	3,37 ±0,14	-7,16	3,78±0,21	16,01±0,45	+323,54
7,2	6,13 ±0,33	8,55 ±0,39	+39,48	10,50±0,68	13,58±0,82	+29,33
8,2	4,54 ±0,05	1,05 ±0,08	-76,87	10,57±0,50	22,08±1,08	+108,89
8,7	0,120±0,001	2,25±0,10	+875,00	3,03±0,16	8,33±0,50	+174,91
9,0	0,800±0,005	3,37±0,20	+321,25	6,81±0,25	6,25±0,21	-8,22
9,6	2,72 ±0,01	4,68±0,03	+72,06	4,16±0,23	8,02±0,16	+92,78
Σ	33,93	59,75		68,47	155,52	

Балансовые опыты показали, что значительная часть шелкового волокна формируется за счет ^{14}C -белков жирового тела и каркаса [2]. Гормональной индукции под влиянием экзогенного эффектора процессов синтеза белков и усиления резервирования их в жировом теле и каркасе соответствует уменьшение активности пептидогидролаз в этих тканях. Характер воздействия препарата АЮГ сохраняется для большинства энзимов протеолитического комплекса вплоть до конца V возраста, что приводит к торможению процессов деструкции белков жирового тела и каркаса и удержанию их в тканях.

Наряду с отмеченными выше закономерностями установлено проявление инверсии гормонального эффекта АЮГ на активность некоторых пептидогидролаз, в частности энзима с оптимумом рН 6,2 жирового тела. В противоположность этому, активность щелочных протеиназ (рН-оптимум 8,2 жирового тела и рН-оптимум 8,2; 8,7; 9,0 каркаса)

под воздействием экзогенного препарата аналога ЮГ постепенно возрастает от середины V возраста к концу исследуемого периода, что совпадает с синтезом и последующим процессингом в покровных тканях насекомого проферментов сериновых протеиназ, участвующих в осуществлении каскадных механизмов [4; 8].

Гормональный эффект препарата «Манта» на активность большинства ферментов протеолитического комплекса гемолимфы имеет альтернативный характер по отношению к таковому каркаса, что свидетельствует о наличии функциональной связи между ними. Следовательно, под воздействием АЮГ интенсифицируются не только процессы депонирования запасных белков в жировом теле и каркасе тутового шелкопряда, но и процессы мобилизации шелкоотделительной железой через посредство гемолимфы азотсодержащих ресурсов тканей [2].

Существенное возрастание активности ряда исследуемых ферментов фиброинового отдела шелкоотделительной железы наблюдается в конце V личиночного возраста, когда инициируется фаза «непрямого» образования шелкового волокна, осуществляющаяся за счет метаболитов распадающихся белков тканей. Изменение программы белкового обмена сопровождается инверсией гормонального эффекта АЮГ на активность некоторых пептидогидролаз (рН-оптимум 3,6; 8,2; 8,7; 9,6) фиброинового отдела шелкоотделительной железы.

Характерно, что степень возрастания активности протеолитических ферментов в серициновом отделе в ряде случаев значительно превышает таковую фиброинового отдела. Не исключено, что в составе выделяемого шелка из организма шелкопряда экскретируются избытки аминокислот, возникающие при интенсификации процессов протеолиза в шелкоотделительной железе и являющиеся ядом для насекомых. Косвенным подтверждением такого предположения является высокая концентрация свободных аминокислот в протоке шелкоотделительной железы и гибель гусениц при искусственном прерывании секреции [3].

Полученные данные свидетельствуют о том, что максимальный эффект стимулирования активности после воздействия гормонального препарата в функционально связанных тканях и органах (гемолимфа, фиброиновый и серициновый отделы шелкоотделительной железы) присущ энзимам с оптимумами рН 3,0; 3,6 и 6,2 и в дополнении к ним ферментам шелкоотделительной железы с рН-оптимумами 7,2; 8,2 и 9,6. Ранее показано, что наибольшую корреляцию с процессами шелкообразования и продуктивности у тутового шелкопряда проявляют аспартатные и цистеиновые протеиназы с оптимумами рН 3,0; 3,6 и 6,2, принимающие участие в гидролизе запасных белков насекомого [2; 1].

Таким образом, регулируя обмен веществ на уровне организма, аналог ЮГ препарат «Манта» углубляет конкретные аспекты специализации белкового обмена на синтез белков шелка в тканях и органах тутового шелкопряда, что обеспечивает повышение продуктивности насекомого.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Богословский В.В. Биохимические тесты прогнозирования продуктивности и гетерозиса у тутового шелкопряда // Вестник Рос. академии с-х наук. – 2009. – №2. – С. 84-86.
2. Клунова С.М., Ярыгин Д.В. Внутриклеточный протеолиз и его регуляция у насекомых: Монография. – М.: МПГУ, 2001. – 104 с.
3. Клунова С.М. Азотистый обмен в шелкоотделительной железе тутового шелкопряда: Автореф. канд. биол. наук. – М.: МПГУ, 1970. – 24 с.
4. Кутузова Н.М. Гормональная регуляция активности некоторых ферментных систем насекомых: Автореф. докт. биол. наук. – М.: ГОУ ВПО МПГУ, 2006. – 48 с.
5. Митрофанов В.Г. Молекулярно-генетический механизм действия гормонов развития у насекомых//Онтогенез. – 2007. – Т. 38. – С. 330-344.

6. Филиппович Ю.Б., Лаптева Т.И., Никитина И.Л. Основы биохимии тутового шелкопряда. – М.: Прометей, 1992. – С. 308.
7. Goodman W.G., Granger N.A., The juvenile hormones. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), Comprehensive Molecular Insect Science. – 2005. – Vol. 3. – P. 319-408.
8. Kaji, K., Tomino, S. & Asano, T. A serine protease in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*: protein sequencing, identification of cDNA, demonstration of its synthesis as zymogen form and activation during midgut remodeling // Insect Biochem Mol Biol. – 2009. – 39(3). – P. 207-217.