

УДК 591. 1.05

М.С. МАРТИРОСЯН, А.Х. АГАДЖАНЫН

РЕГУЛИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КАТАБОЛИЗМА ПРОЛИНА НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ МЕТАМОРФОЗА ФАСОЛЕВОЙ ЗЕРНОВКИ *ACANTHOSCELIDES OBTECTUS* SAY

Изучено влияние различных соединений на пролиноксидазную (ПО) и пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназную (П5КД) активность на всех стадиях метаморфоза фасолевого зерновки *A. Obtectus* Say. Фтористый натрий значительно подавляет активность ПО и П5КД. Исследовано также влияние различных концентраций цитрата и адениловых нуклеотидов на активность ферментов катаболизма пролина у жуков фасолевого зерновки. Высокие концентрации указанных соединений ингибируют активность ферментов, которая более чем на 87% ингибируется аденозин-трифосфорной кислотой при концентрации 10^{-5} М.

Пролиноксидаза (КФ 1.2.2.1) обнаружена в бактериях, растениях, тканях животных и связана с мембранами митохондрий [1]. Окисление пролина в последних протекает в присутствии кислорода с участием цитохрома С в качестве акцептора электронов. Второй фермент, пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназа (П5КД), на пути окисления пролина в глутамат катализирует этот процесс с участием лишь окисленной формы никотинамид-аденин-динуклеотида (НАД).

У *Bradyrhizobium japonicum* был открыт put A ген, кодирующий бифункциональный белок с пролиндегидрогеназной (ПД) и П5КД активностью, которая имеется у *E. coli* и *Salmonella typhimurium* [2].

Нарушение катаболизма пролина из-за дефицита ПО сопровождается гипергликемией I типа, следствиями которой являются незначительная психомоторная задержка, эпилепсия, ожирение, сколиоз, гипокальциемия [3].

В настоящем сообщении приводятся результаты активности ПО и П5КД и их регуляторные возможности на различных стадиях метаморфоза фасолевого зерновки.

Материал и методика. Объектами исследования служили личинки, куколки и жуки фасолевого зерновки *Acanthoscelides Obtectus* Say. Гомогенизацию проводили в 0.1М калийфосфатном буфере (рН 8.0). Инкубационная среда для определения ПО и П5КД содержала 53мМ калийфосфатного буфера (рН 8.0), 0.2мМ L- пролина, 1.6мкМ цитохрома С и 4мкМ НАД⁺. Инкубацию проводили при 37°C в течение 60мин. Реакцию останавливали добавлением 96% -ого охлажденного этанола в соотношении 1:1. Осадок удаляли центрифугированием при 10000об/мин в течение 10 мин.

Об активности ПО и П5КД судили по синтезированному глутамату, со-

держание которого определяли методом бумажной хроматографии. Определение плотности окраски проводили путем фотометрирования на фотокориметре типа КФК-2 с зеленым фильтром.

Результаты и обсуждение. Ранее исследованиями нашей лаборатории [4] была обнаружена довольно высокая активность ферментов окисления пролина у фасолевой зерновки особенно на фазе личиночной стадии и имаго. В первую очередь мы изучили влияние некоторых эффекторов на активность ПО и П5КД в гомогенатах личинок и жуков фасолевой зерновки. Полученные данные приведены в табл. 1

Таблица 1

Влияние различных соединений на активность ПО и П5КД в гомогенатах личинок и жуков фасолевой зерновки A. Obiectus Say

Варианты	Концентрация эффекторов, М	Активность ПО и П5КД, мкМ глу на 1г ткани	
		личинки	жуки
полная среда (п. с.)		13.96 ± 1.86	13.78 ± 1.25
п.с+ цитрат	5 · 10 ⁻⁵	7.96 ± 0.71	6.78 ± 0.61
п.с.+ АТФ	5 · 10 ⁻⁵	6.80 ± 0.62	5.57 ± 0.48
п.с + АТФ + цитрат	5 · 10 ⁻⁵	7.86 ± 0.80	5.05 ± 0.40
NaF	1 · 10 ⁻⁵	2.25 ± 0.15	2.23 ± 0.15
NaF	2 · 10 ⁻⁵	1.51 ± 0.05	0.827 ± 0.01

Данные свидетельствуют, что внесение в инкубационную среду цитрата и АТФ значительно снижает активность ферментов окисления пролина. Этот факт является скорее всего исключением, нежели закономерностью, ибо у других объектов, в частности в проросших семенах гороха и в различных органах сазана, где не столь высока активность ПО и П5КД, указанные соединения, наоборот, примерно в 5–10 раз стимулируют активность [5] ферментов катаболизма пролина. Это позволяет сделать заключение, что при высокой активности ПО и П5КД указанные эффекторы подавляют действие ферментов. По-видимому, когда в организме интенсивно происходит распад пролина, указанные соединения балансируют метаболизм пролина аналогично регулированию фосфофруктокиназной активности – одного из ключевых ферментов анаэробного распада глюкозы – гликолиза. Наблюдается некоторое ослабление подавляющего влияния указанных эффекторов при их совместном применении.

В следующей серии экспериментов изучено влияние фтористого натрия на активность ПО и П5КД в гомогенатах личинок и жуков фасолевой зерновки с учетом того факта, что фтористый натрий ингибирует процесс гликолиза, который снабжает клетки энергией. Следовало установить ингибирование активности ПО и П5КД фасолевой зерновки этим соединением, ибо окончательно установлено, что у насекомых пролин, содержащийся в гемолимфе, является энергетическим субстратом при полете. Разумеется у насекомых может быть своего рода конкуренция между гликолизом и процессом распада пролина. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что фтористый натрий у личинок ингибирует активность ферментов окисления пролина в 6–9 раз, а у жуков – 6–16 раза. По-видимому, имеет место конкурен-

ция между указанными процессами, и она более выражена у жуков, т. к. работами многих авторов [8] установлено, что пролин используется как “топливо” при полете.

Установлено, что у кровососущей мухи цеце в гемолимфе углеводы либо отсутствуют, либо имеются в небольшом количестве, но зато велико количество пролина, который служит “топливом” при полете. При этом иминогруппа пролина переносится на подходящие акцепторы, а углеродный скелет этой аминокислоты окисляется в летательных мышцах [6].

В литературе имеются данные относительно роли пирувата и пролина, которые снимают ингибирующее влияние фтористого натрия на дыхание листьев шпината [7]. Результаты опытов последнего автора свидетельствуют о стимулировании свободным пролином поглощения кислорода тканями.

Таблица 2

Влияние различных концентраций цитрата, аденозин-монофосфата (АМФ), аденозин-дифосфата (АДФ) и аденозин-трифосфата (АТФ) на активность ПО и П5КД у жуков фасоловой зерновки

Варианты	Концентрация, <i>М</i>	Активность ПО и П5КД, мкМ глу на 1г ткани	
		гомогенат	митохондрии
полная среда (п. с.)		15.5 ± 1.50	23.6 ± 2.10
п. с. + цитрат	1 · 10 ⁻⁵	12.3 ± 1.02	20.5 ± 2.0
	3 · 10 ⁻⁵	11.2 ± 1.50	20.6 ± 2.30
	5 · 10 ⁻⁵	9.0 ± 0.70	16.7 ± 1.50
	1 · 10 ⁻⁴	12.0 ± 1.02	11.3 ± 1.0
п. с. + АМФ	1 · 10 ⁻⁶	19.4 ± 1.80	19.0 ± 1.80
	3 · 10 ⁻⁶	19.4 ± 1.40	9.8 ± 0.80
	5 · 10 ⁻⁶	13.0 ± 1.30	0.61 ± 0.08
	1 · 10 ⁻⁵	0.72 ± 0.07	0.4 ± 0.07
п. с. + АДФ	1 · 10 ⁻⁶	14.8 ± 1.50	14.4 ± 1.40
	3 · 10 ⁻⁶	10.8 ± 1.0	17.4 ± 1.80
	5 · 10 ⁻⁶	8.6 ± 0.80	17.0 ± 1.70
	1 · 10 ⁻⁵	8.4 ± 0.80	16.7 ± 1.50
п. с. + АТФ	1 · 10 ⁻⁶	13.2 ± 1.40	51.1 ± 2.60
	3 · 10 ⁻⁶	1.4 ± 1.10	43.5 ± 2.20
	5 · 10 ⁻⁶	9.6 ± 0.90	41.2 ± 2.15
	1 · 10 ⁻⁵	7.5 ± 0.60	15.8 ± 1.40

Установлено, что внесение в среду пролина способствует повышению уровня поглощения кислорода митохондриями по сравнению с нормальным дыханием. Этот опыт Бритиковым [7] был проведен на фоне ингибирования гликолиза фтористым натрием, однако без него результат оказался аналогичным. Сравнивая эти исследования с результатами, полученными на изолированных митохондриях летательных мышц [8–10], он допускает, что одной из причин стимулирующего влияния пролина на окислительные процессы может быть высокая избирательная проницаемость внешних мембран митохондрий для пролина, а также его способность быстрее других субстратов вовлекаться в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) через глутамат, переаминирование которого обеспечивает регенерацию компонентов

этого цикла. В наших экспериментах, по-видимому, фтористый натрий не подавляет стимулирующую роль пролина на дыхание, тем не менее значительно ингибирует активность ПО и ПСКД. Дальнейшие эксперименты следует проводить по поглощению митохондриями кислорода в условиях эксперимента.

Нами изучено влияние различных концентраций цитрата и адениловых нуклеотидов на активность ПО и ПСКД у жуков фасолевой зерновки. Полученные данные приведены в табл. 2

Полученные данные свидетельствуют, что высокие концентрации указанных соединений ингибируют активность ферментов окисления пролина как в митохондриях, так и на уровне целого гомогената, в отличие от других объектов, у которых, наоборот, происходит стимулирование активности ферментов [5]. Примечательно, что среди адениловых нуклеотидов ингибирующее влияние АДФ выражено гораздо слабее по сравнению с АМФ. Более того, в митохондриях активность ферментов при концентрации АТФ $10^{-6} M$ более чем в 2 раза выше по сравнению с контрольным вариантом, в то время как АТФ является ингибитором фосфофруктокиназы, одного из ключевых ферментов гликолиза. Однако его концентрация ($10^{-5} M$) ингибирует активность ферментов окисления пролина почти в 2 раза. По всей вероятности, у жуков (возможно, и у насекомых) происходит конкуренция между гликолизом и процессом распада пролина, т. к. известно, что АМФ является активатором фосфофруктокиназы. Однако в литературе имеются противоречивые данные относительно указанного факта. По данным авторов [11] в митохондриях синей мухи процесс окисления пролина стимулируется АДФ в присутствии олигомицина, а также при высоком уровне неорганического фосфата в присутствии ротенона, арсенита и арсената. По их мнению первый этап окисления пролина катализируется пролиндегидрогеназой, для которой АДФ является аллостерическим эффектором. Работами нашей лаборатории показано, что у фасолевой зерновки начальный этап окисления пролина катализируется не пролиндегидрогеназой, а пролинооксидазой.

Кафедра биохимии

Поступила 16.04.2001

ЛИТЕРАТУРА

1. Jonson A.V., Streker H. J. – J. Biol. Chem., 1962, v. 237, p.1876–1881.
2. Straub P.F., Reynolds P.H., Althomsons S., Mett V., Zhu Y, Shearer G., Kohl D.H. – Appl. Environ Microbiol., 1996, №62(1), p. 221–229.
3. Jaeken J., Goemans N., Fryns J.P., Francois I, de-Zegher F. – J. Inher. Metab. Dis., 1996, №19(3), p. 275–277.
4. Гукасян Дж. Г., Агаджанян А. Х. – Биолог. ж. Армении, 1988, т. 41, с. 307–312.
5. Молаи Рад М. Б., Агаджанян А. Х. – Биолог. ж. Армении, 1999, т. 3–4, №52, с. 242–246.
6. Гильмур Д. Метаболизм насекомых. М.: Мир, 1968.
7. Бритиков Е. А. Биологическая роль пролина. М.: Наука, 1975.
8. Sacktor B., Childress C. C. – Arch Biochem. Biophys., 1967, v.120, p.583–588.
9. Van Den Bergh S. – Biochem. J., 1964. v. 93, p. 128–136.
10. Bursell E. – Comp. Biochem. Physiol., 1966, v. 19, p. 809–818.
11. Hansford R. G., Sacktor B. – J. Biol. Chem., 1970, v. 245, p. 991–994.

ՊՐՈԼԻՆԻ ԿԱՏԱԲՈԼԻԶՄԻՆ ՄԱՄՆԱԿՑՈՂ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՈՒՄԸ ԼՈՐՈՒ ԸՆԴԱԿԵՐԻ
ՓՈԽԱԿԵՐՊՈՒԹՅԱՆ ՏԱՐԲԵՐ ՓՈՒԼԵՐՈՒՄ

Ամփոփում

Ուսումնասիրվել է տարբեր միացությունների ազդեցությունը պրոլինօքսիդազի (ՊՕ) և պիրոլին-5-կարբօքսիլատ-դեհիդրոգենազի (Պ5ԿԴ) վրա լոբու ընդակերի փոխակերպության տարբեր փուլերում: Նատրիումի Ֆտորիդը զգալիորեն ճնշում է ֆերմենտների ակտիվությունը: Հետազոտվել է նաև ցիտրատի և ադենիլայի նուկլեոտիդների ազդեցությունը լոբու ընդակերի բզեզների ՊՕ-ի և Պ5ԿԴ-ի վրա: Նշված միացությունների բարձր կոնցենտրացիաները ճնշում են ֆերմենտների ակտիվությունը, ընդ որում ավելի քան 87%-ով ճնշվում է ԱԵՖ-ի $10^{-5} M$ կոնցենտրացիայի դեպքում:

M.S. MARTIROSIAN, A.Kh. AGHADJANIAN

REGULATION OF ACTIVITY OF PROLINE DEGRADATION ANZYMES
IN DIFFERENT STAGES OF METAMORPHOSES HARICOT
BEETLEFLY ACANTOSCELIDES OBTECTUS SAY

Summary

The influence of different components on proline oxidaze (PO) and piroline-5-carboxilate dehydrogenaze (P5KD) has been studied. In all stages of metamorphoses of the haricot beetlefly *Acantoscelides Obtectus Say*. NaF considerably depresses PO and P5KD activity. The influence of different concentrations of citrate and adenylic nucleotides on enzymes activity of proline degradation of beetles has been investigated. The high concentrations of the stated compounds depress the activity of enzymes which are depressed by ATF more than 87% under $10^{-5} M$.