

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

«ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИЧИНОК
ТРУТНЕВОГО РАСПЛОДА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ»

Студент  Яковлев Евгений Владимирович

Руководитель  Малышева Е.А.

Рецензент  Невитов М.Н.

Нормоконтролер  Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 14 июня № 13)
2022 г.

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой 
(протокол заседания ГЭК от 22.06.22 № 5)

Секретарь ГЭК  Клыченков С.В.

Пенза, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
1 Обзор литературы.....	6
1.1 Типы онтогенетических стратегий насекомых.....	6
1.2 Структура колонии медоносной пчелы и характеристика отдельных каст	9
1.2.1 Общая характеристика пчелиной семьи. Размножение.....	9
1.2.2 Рабочие пчёлы.....	12
1.2.3 Трутни.....	14
1.2.4 Продолжительность жизни трутней и процесс оплодотворения матки.....	15
1.2.5 Матка.....	17
1.3 Характеристика дегидрогеназ, сукцинатдегидрогеназы и ката- лазы.....	21
1.3.1 Дегидрогеназы.....	21
1.3.2 Каталаза.....	24
1.3.3 Сукцинатдегидрогеназа.....	27
2 Материалы и методы	29
2.1 Характеристика объекта исследования	29
2.2 Приготовление гомогената личинок трутневого расплода... ..	29
2.3 Определение концентрации белка методом Лоури	30
2.4 Определение общей дегидрогеназной активности	31
2.5 Определение сукцинатдегидрогеназной активно.....	32
2.6 Определение каталазной активности	32
2.7 Изучение белкового профиля гомогената.....	33
3 Результаты и обсуждение.....	35
3.1 Калибровка метода Лоури по БСА.....	35
3.2 Сортировка личинок трутней для приготовления гомогената.....	36
3.3 Общая дегидрогеназная активность.....	38

3.4 Каталазная активность.....	39
3.5 Сукцинатдегидрогеназная активность.....	41
3.6 Возможные причины изменения активности изученных ферментов.....	42
3.7 Изменение белкового профиля в онтогенезе личинок трутней.....	45
Выводы.....	53
Список литературы.....	56

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Онтогенез насекомых — сложное биологическое явление, затрагивающее все аспекты функционирования систем организма. Онтогенез насекомых может происходить как с метаморфозом, так и без, при этом при индивидуальном развитии особи после выхода из яйца, при нахождении в стадии личинки, происходят перестройки различных ферментативных систем, изменения в функционировании целых групп генов и регуляторных механизмов, обеспечивающих активность разных генных кластеров в тот или иной момент времени онтогенеза насекомого.

Изучение онтогенеза насекомых является важной проблемой биологии, в том числе биохимии и генетики, т. к. позволяет пролить свет на важные аспекты биологии развития и механизмы регуляции работы генов. Разные типы метаболизма, разные механизмы регуляции и функционирования систем развивающегося организма насекомого на разных стадиях возбуждают интерес исследователей по всему миру к данному явлению.

Изучение онтогенеза особей медоносной пчелы *Apis mellifera* является актуальной задачей современной биологии, т. к. понимание механизмов индивидуального развития различных типов особей пчелиного улья, во-первых, помогает выбирать более оптимальные условия для формирования здорового потомства в условиях производства продуктов пчеловодства как важной отрасли сельского хозяйства, во-вторых, помогает изучать как фундаментальные, так и частные характеристики индивидуального развития насекомых без метаморфоза. Часть данных особенностей, такие как быстрый рост массы тела за короткий промежуток времени нахождения личинки в ячейках сот, аррентотокный партеногенез, фенотипический полиморфизм при генетическом единообразии всей пчелиной колонии и механизмы его поддержания изучены уже

достаточно хорошо, однако вопросы биохимической регуляции как вышеперечисленных явлений, так и общей регуляции онтогенеза насекомых изучены достаточно слабо.

Целью данной работы является изучение биохимических особенностей онтогенеза трутней — гаплоидных особей пчелиного улья.

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

1. Изучить особенности функционирования ферментных систем развивающихся трутней на примере дегидрогеназной, каталазной и сукцинатдегидрогеназной систем в зависимости от степени развития личинки трутня.
2. Изучить особенности экспрессии генов путём сравнения белково-пептидных профилей личинок трутней разного возраста методом обращённо-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиенте ацетонитрила.

Магистерская диссертация написана на 60 листах, содержит 27 рисунков, 1 таблицу и список цитируемой литературы из 50 источников на русском и английском языке.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Типы онтогенетических стратегий насекомых

За время эволюционного развития насекомые как класс членистоногих эксплуатировали различные онтогенетические стратегии, часть из которых используется разными отрядами до сих пор. Предковые формы насекомых использовали простое прямое аметаболическое развитие, заключающееся в малом морфологическом, анатомическом и биологическом изменении в процессе всего времени существования отдельной особи (рис. 1). Личинки и ювенильные особи насекомых с таким типом развития мало отличаются от взрослых особей, главным отличием является лишь их размер. Единственным существенным изменением за время такого онтогенетического развития является начало полового размножения по достижению периода половой зрелости отдельной особи, когда периоды роста и линьки чередуются с периодами размножения. Современные отряды примитивно бескрылых щетинохвостки *Zygentoma* и древнечелюстные *Archaeognatha* в полной мере демонстрируют данные особенности.

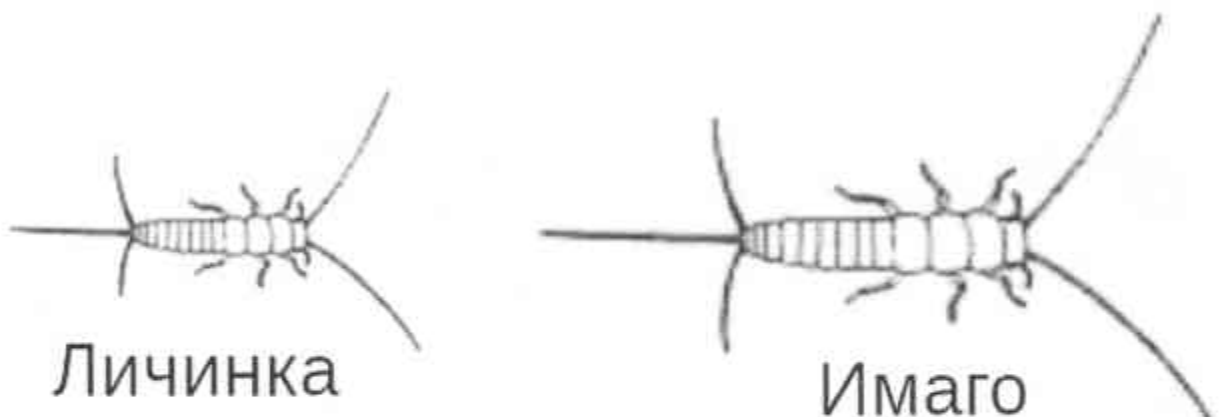


Рисунок 1. Аметаболический путь развития

Дальнейшая эволюция различных групп насекомых, связанная с модификацией организма и приспособлением его к полёту путём эволюции крыльев и силового полёта, побудила перейти на другой тип онтогенетического развития — гемиметаболический (рис. 2). Гемиметаболический тип заключается в статусе взрослой особи как терминальной стадии развития, при котором не происходит дальнейшего роста и линек, что является приспособлением к поддержанию структурной и функциональной целостности летательного аппарата насекомого.



Рисунок 2. Гемиметаболический путь развития

При этом происходит эволюционное изменение механизмов развития особи, выражающееся в последовательном, «замедленном» развитии летательного аппарата и некоторых других систем органов насекомого в процессе онтогенетического развития. Следствием развития такого типа онтогенеза является появление новой стадии — нимфы, которая обычно напоминает взрослую особь, но не имеет крыльев и органов полового размножения. [3] В более позднем возрасте у нимфы есть неподвижные зачатки крыльев в виде подушечек зачаточной ткани, которые с каждой линькой прогрессируют в развитии. Гемиметаболический тип онтогенеза встречается у отрядов древнекрылых *Palaeoptera* (семейства стрекозы *Odonata*, подёнки *Ephemeroptera*), многожилковые *Polyneoptera* (прямокрылые *Orthoptera*), группы *Condylgnatha* (полужёсткокрылые), трипсы *Thysanoptera* и пухоеды и вши *Psocodea*. В некоторых случаях гемиметаболические нимфы могут существенно отличаться как мор-

фологически, так и биохимически от имагиальных особей (например, как у подёнок и стрекоз), что связано с различиями в среде обитания и кормовой базы. В данном случае такие различия можно считать эволюционным механизмом диверсификации экологических ролей разных типов стадий развития. Другим примером дополнительного различия имагиальной и нимфальной особей является наличие покоящихся стадий между личиночной и взрослой особью как у представителей трипсов и некоторых полужёсткокрылых (такое явление получило название неометаболии) (рис. 3).



Рисунок 3. Неометаболический тип развития

Третий тип жизненного цикла насекомых — голометаболический — характеризуется наличием переходной стадии непитающейся куколки между личинкой и имаго (в данном случае стадия перед куколкой называется нимфой) (рис. 4). Появившись около 350 млн лет назад в каменноугольном периоде, голометаболический тип привёл к возникновению большого разнообразия насекомых, которое наблюдается до сих пор. [18,21]



Рисунок 4. Голометаболический путь развития

Группа *Holometabola* включает в себя 11 отрядов насекомых. 4 из которых приобрели чрезвычайный эволюционный успех: жесткокрылые *Coleoptera*, перепончатокрылые *Hymenoptera*, чешуекрылые *Lepidóptera* и двукрылые *Diptera*. Исторически первыми предположения о важности метаморфоза в процессе онтогенеза насекомых были высказаны ещё Аристотелем, и с тех пор было сформулировано несколько идей о происхождении голометаболического типа развития. Согласно одной из них стадия куколки произошла в результате отложенного эмбриогенеза стадии личинки. Таким образом личинка рассматривается как свободно живущий и самостоятельно питающийся эмбрион, а стадия нимфы сокращена до одной лишь куколки, которая занимается лишь метаморфозом, т. е. является лишь переходной стадией к имагинальной форме. Другая точка зрения основана на том, что стадии личинки и нимфы эквивалентны и неправомерно их разделять, т. е. все эти стадии являются личинками, но на разных этапах развития. В процессе эволюционного развития незрелая личиночная стадия у группы *Holometabola* настолько дифференцировалась в строении и функциональности от взрослой особи, что появилась нужна в дополнительной, переходной между двумя морфологиями стадии куколки.

Не смотря на существование исключений из общего паттерна онтогенетического развития среди представителей группы *Holometabola*, главная идея наличия нимфы и имаго состоит в том, что данные формы одного и того же организма имеют совершенно разные особенности функционирования, жизненного образа и трофических потребностей, что является сильным эволюционным преимуществом и помогает развиваться и адаптироваться независимо.

1.2 Структура колонии медоносной пчелы и характеристика отдельных каст

1.2.1 Общая характеристика пчелиной семьи. Размножение

Медоносные пчёлы в условиях культуры пчеловодства и при жизни в дикой природе формируют устойчивые высокоорганизованные колонии — семьи, основа которых — кастовая дифференциация особей. Такое функционально—кастовое разделение особей позволяет пчелиной семье иметь высокую эффективность в смысле поиска питания, защиты и выживания в неблагоприятные периоды. [7]

Не смотря на функциональные, фенотипические и генотипические различия, все особи пчелиной семьи происходят из яйца, отложенного маткой — королевой улья — в соты (рис. 5).

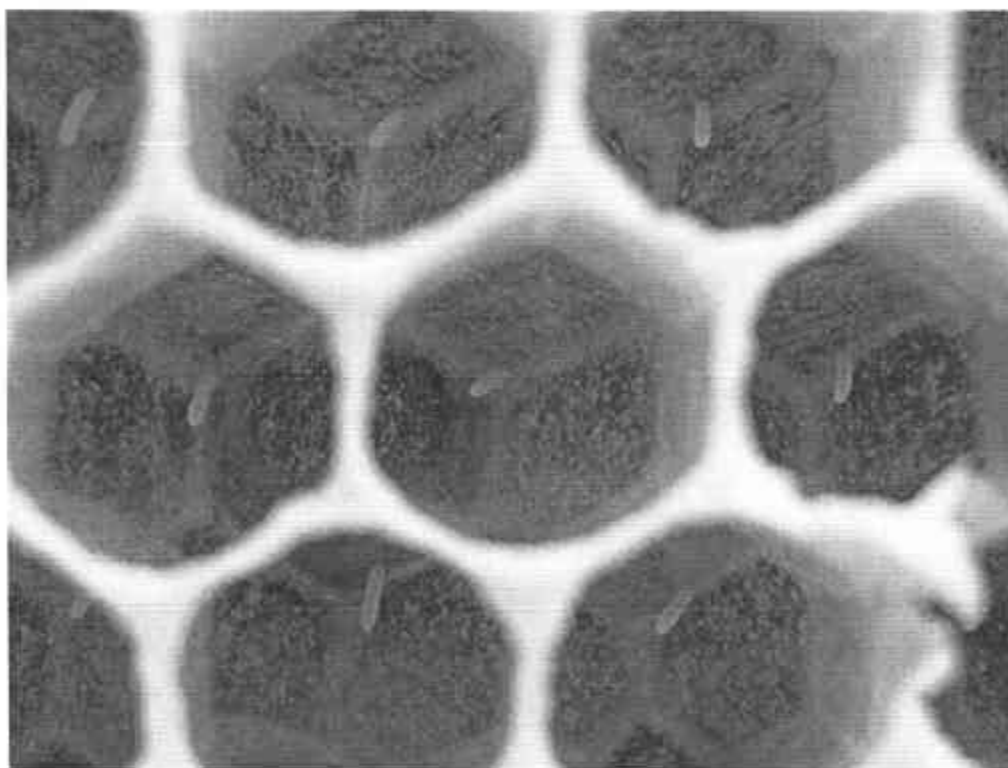


Рисунок 5. Пчелиные яйца на доньях сот

Одно из самых главных, однако не видных невооружённым взглядом, различий состоит в том, что яйца делятся на два типа: оплодотворённые и неоплодотворённые. [37] После кладки яиц соты заполняются специальной жидкостью — пчелиным молочком. Погружённые в молочко яйца, а затем и личинки, питаются содержимым этой жидкости и развиваются ускоренными

темпами. В зависимости от того, было оплодотворено яйцо или нет, из него произойдёт рабочая пчела или матка, или трутень соответственно. При этом в первом случае особь будет диплоидная и будет иметь женский биологический пол, во втором — гаплоидная и будет иметь мужской биологический пол. Таким образом часть особей в колонии появилась в результате партеногенеза (аррентотокия) и является гаплоидной, т. е. регуляция пола у пчёл происходит не в соответствии с гетерогаметным механизмом, а по гаплодиплоидному типу. [31]

Второй этап кастовой дифференцировки происходит после распечатки сот: женские и мужские личинки после первых двух–трёх суток питания маточным молочком израсходывают весь его запас и продолжают питаться пергой — смесь ферментированной пыльцы цветковых растений, относительно богата белком и углеводами, однако в случае, если колония готова разделиться, некоторые женские особи продолжают получать пчелиное молочко, называемое в данном случае маточным молочком, на всём протяжении своего развития, и из таких личинок развиваются матки. На рис.6 представлены основные фенотипы членов пчелиных каст.

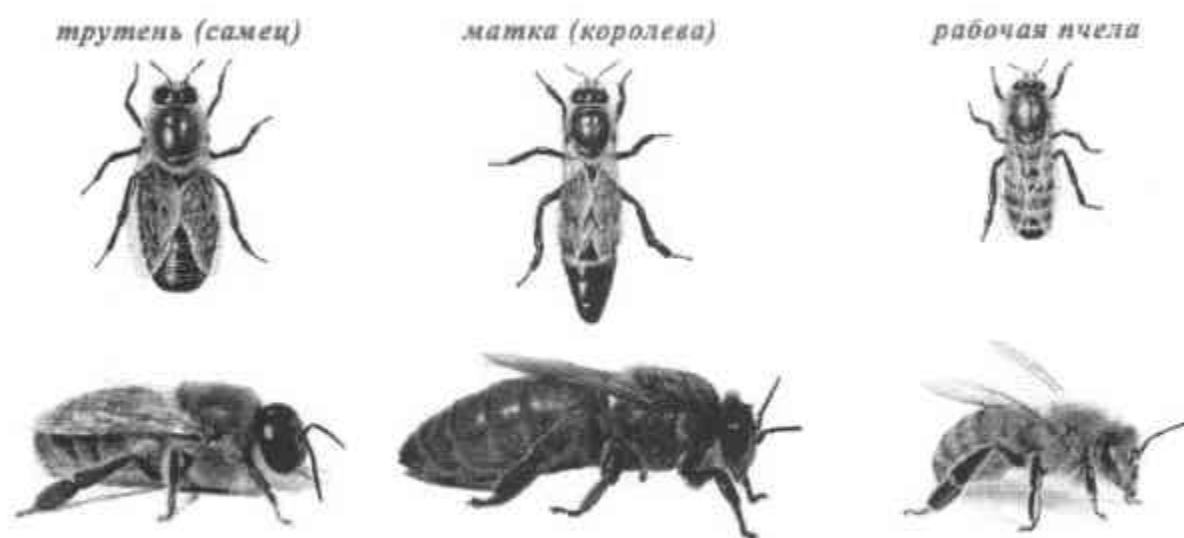


Рисунок 6. Графическое сравнение пчёл разных каст

На пятые–шестые сутки соты с развивающимися личинками запечатываются восковой пробкой, и личинки формируют куколки для прохождения метаморфоза (рис. 7).

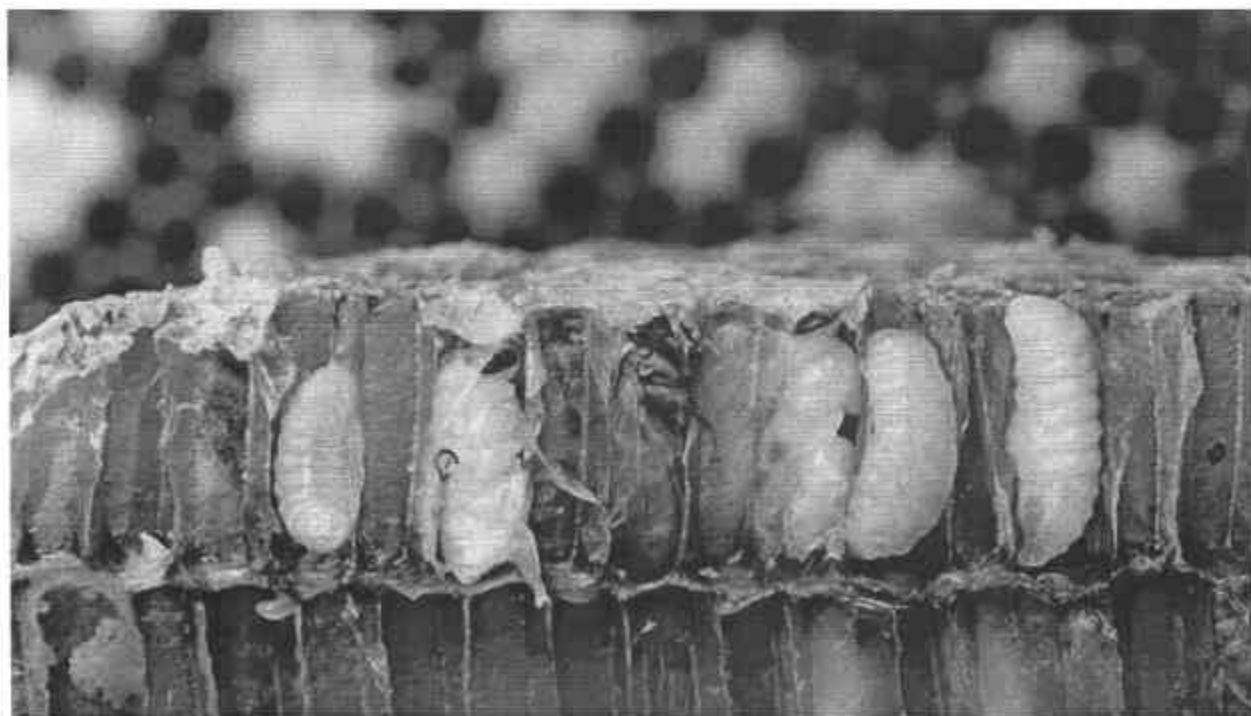


Рисунок 7. Различные стадии развития пчелы: от личинки через куколку к имаго

После окончания метаморфоза уже взрослая пчела челюстями фрагментирует крышку ячеек и выходит наружу, готовая к функционированию в качестве члена семьи. [5]

1.2.2 Рабочие пчёлы

Во многом функционирование пчелиной колонии базируется на различных субкастах рабочих пчёл. Рабочие пчёлы — это самки, которые не формируют органов размножения и не участвуют в кладке яиц, однако выполняют основные функции по прокорму растущих личинок, собирают нектар и пыльцу, формируют мёд, пергу, секретируют пчелиное молочко, готовят прополис и т. д. [12] Рабочие пчёлы характеризуются особой анатомией: у них

присутствуют гипофарингеальные железы, которые секретируют маточное молочко, специальные железы для ферментации нектара и пыльцы с целью производства мёда и перги, наличие зоба для нектара и корзиночек на третьей паре ног для пыльцы, которая хранится там во время вылета на медоносные растения.

Рабочие пчелы начинают свою жизнь внутри улья. По мере взросления они чередуют разные работы, включая поддержание чистоты улья, строительство ячеек, уход за расплодом, уход за маткой и изготовление меда. [41] Рабочие обязанности рабочих особей выполняются коллективно. Например, процесс выработки мёда является многостадийным и требует одновременной работы сразу нескольких особей: одни пчёлы отправляются на сбор нектара и доставляют его в улей, другие особи забирают нектар у прилетевших ос



Рисунок 8. Анатомия рабочей пчелы

обей и ферментируют его в зобе с использованием слюны, затем сливают полученную жидкость в соты, а третий тип рабочих пчёл участвуют в созревании мёда, испаря лишнюю влагу. [9] Тем временем пчелы-кормилицы используют эти запасы меда для кормления расплода — следующего поколения собирателей, кормилиц и производителей меда.

1.2.3 Трутни

Самцы пчел — трутни — вылупляются из яиц матки, которые не были оплодотворены. Это происходит на 2–3 неделю после кладки яиц, за несколько дней до появления первых рабочих особей и за восемь до появления новой молодой матки. [10] Яйца с куколками самцов располагаются по всему периметру сот. В среднем в семействе содержится до 400 трутней, однако в редких случаях их число может превышать тысячу. В первые майские дни трутень освобождается из своей ячейки и ещё около двух недель находится под активной опекой рабочих пчёл для скорейшего формирования мужской репродуктивной системы. В это время трутень активно питается мёдом и пергой и набирает массу. Примерно с первой недели жизни трутень начинает ненадолго покидать гнездо, а через 14 суток он первый раз вылетает с целью оплодотворить матку.

Для полноценного оплодотворения матки необходимо 5–7 трутней, проживающих в одном улье, однако в пчелиную колонию также активно принимаются и трутни из чужих семей, т. к. они повышают генетическое разнообразие колонии, поэтому чужих трутней рабочие пчёлы не только выгоняют, но и кормят как собственных.

Жизнь трутня в улье зависит от следующих факторов: присутствует ли в колонии молодая матка и насколько она способна к оплодотворению, общее состояние улья (наличие вирусных или паразитических инфекций, количество прокорма и общая численность как рабочих пчёл, так и самих трутней) и погодные условия. [17]

Перед брачным полетом матка осуществляет несколько ориентировочных облетов. Происходит это примерно на 3–5-й день после ее выхода с маточника. Брачный полет осуществляется на 7–10-й день и занимает не более 20 минут. Сроки могут сдвигаться при плохой погоде. Трутни во время брач-

ного полета собираются в нескольких местах на высоте от 10 метров. Неоплодную матку они вычисляют по выделяемому ею ароматическому секрету. Над водой пчелы не спариваются, так как в процессе падают. Трутни впрыскивают сперму в парные яйцеводы матки, откуда они поступают в семяприемник. Во время спаривания накапливается несколько миллионов сперматозоидов. Они сохраняются в семяприемнике матки в течение всей ее жизни[32].

Сперму содержат семенные пузырьки трутней. Во время спаривания она под давлением попадает в особый канал, откуда поступает в парные яйцеводы матки. Продвижение спермы обеспечивается слизью, выделяемой придаточными железами трутней. Матке необходимо определенное количество сперматозоидов (5–7 миллионов). Если за один облет она не получает нужного количества спермы, то процесс повторяется. [15] Если спаривание не произойдет в течение месяца, то способность матки к нему утрачивается. Она становится трутневой и прекращает вылеты.

1.2.4 Продолжительность жизни трутней и процесс оплодотворения матки

В основном трутень живет не дольше 2 месяцев. Трутни в улье являются самыми требовательными по количеству корма членами семейства, поэтому, как только сокращаются запасы питательного нектара, рабочие особи уничтожают ячейки с еще не вылупившимися трутнями, а созревших самцов ограничивают в еде. Если ситуация не налаживается через пару дней, ослабшего трутня вытесняют из улья рабочие пчелы и не пускают обратно, что в итоге заканчивается смертью насекомого, т. к. трутни не могут самостоятельно добывать нектар, пыльцу и готовить из них мёд и пергу. Однако вне зависимости от состояния улья и количества корма в нём при условии, что матка прекратила по той или иной причине кладку яиц, трутней оставляют в любом случае, потому что таким образом они становятся единственным источником генетического материала

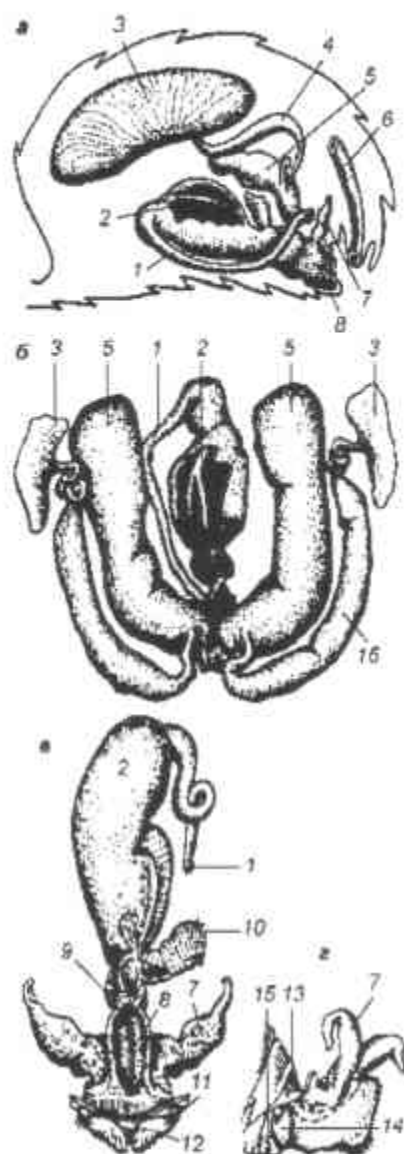


Рисунок 9. Строение половой системы трутня. а — размещение половых органов в брюшке; б — вид со спины; в — копулятивный аппарат в нормальном виде; г — копулятивный аппарат в вывороченном состоянии; 1 — семяизвергательный канал; 2 — луковица; 3 — семенник; 4 — семяпровод; 5 — придаточная железа; 6 — задняя кишка; 7 — рожки; 8 — основание пениса; 9 — спиральная полоска; 10 — перистый придаток; 11 — малая покровная пластинка; 12 — боковая покровная пластинка; 13 — последний тергит брюшка; 14 — последний стернит брюшка; 15 — покровная пластинка; 16 — семенной пузырек

В этом случае рабочие пчёлы выращивают новую матку и та оплодотворяется уже существующими в колонии трутнями. То же самое может произойти и в случае, если выгнанный из родного улья трутень нашёл другой улей без функционирующей матки: его оставят и будут обеспечивать кормом до тех пор, пока в улье не появится новая матка, готовая к оплодотворению.

Процесс спаривания для трутня смертелен, т. к. его основной половой орган расположен внутри брюшка, поэтому для оплодотворения трутень по сути выворачивает свои внутренние органы наружу, что приводит к неизбежной фатальной травматизации (на рис.9 представлено строение половой системы трутня).

Сам осеменительный орган располагает на своем конце осеменительной луковицы с рожками. [26] Погрузив их в отверстие, где расположено жало матки, трутень проникает в семенной карман матки и оставляет там свое семя. По окончании процесса половой орган трутня вместе с органами выворачивается до конца, и самец пчелы умирает.

1.2.5 Матка

Матка является центральной частью всех пчелиных семей, т. к. именно она является фактором, который поддерживает стабильность численности улья путём кладки яиц, причём именно матка решает, какая особь произойдёт из того или иного яйца, оплодотворяя его или нет. Индивидуальное развитие каждой матки занимает шестнадцать дней, три дня из которых она находится на стадии яйца, шесть дней питается маточным молочком внутри сот в виде личинки и семь дней проводит в стадии предкуколки и куколки. Сразу после появления зрелой особи из сот масса молодой матки составляет 200-400 мг. Продолжительность жизни маток сильно варьирует и зависит от многих факторов, однако в среднем матка живёт около 1 года. В природных условиях на продолжительность жизни матки оказывают сильное влияние климатические усло-

вия, уровень заболеваемости специфическими и неспецифическими инфекциями, климатические условия, сезонность, хищники, питающиеся мёдом и т. д. Сообщается, что в природных условиях около 80% маток не выживает после первого года своей жизни, только четверть маток живёт два года, и ни одна матка не выживает больше трёх лет. Иная картина наблюдается в контролируемых условиях пчеловодческих хозяйств, когда ульи оберегаются от хищников и инфекций, а во многих случаях при уменьшении кормовой базы и дополнительно подкармливаются: 35% маток способны прожить 4 года, однако в реальности с целью увеличения производительности продуктов пчеловодства на пасеках ежегодно происходит ротация маток либо для поддержания темпов производства мёда, перги, прополиса и т. д., либо для обновления хозяйства, например, для смены породы, и эти факторы как и культура пчеловодческого хозяйства и отрасли в целом сильно влияют на продолжительность жизни маток. [17,29]

Дифференцировка женских особей на матку и рабочих пчёл начинается ещё во время личиночного развития внутри сот. Личинки в возрасте до трех с половиной дней бипотентны, т. е. могут развиваться как в рабочих пчёл, так и в матку. Факторами такой дифференцировки является питание личинки, которое зависит от рабочих пчёл. В этот критический период, если личинка продолжает развиваться в присутствии маточного молочка, они становятся крупнее, растут быстрее и превращаются в маток. Личинки, питающиеся пергой, развиваются в рабочих пчёл, т. к. растут медленнее и не успевают заложить требуемое количество зачаточной ткани для развития половой системы на должном уровне за время метаморфоза.

Половая зрелость матки наступает через 5-6 дней после вылупления, а оогенез происходит через 3-7 дней после спаривания. По достижению половой зрелости происходят морфологические изменения в строении нижнечелюстных желез матки. Эти нижнечелюстные железы присутствуют у всех особей

уля, однако в зависимости от касты выполняют разные функции. Нижнечелюстные железы матки производят специальные вещества — феромоны, которые оказывают сильное влияние на поведение рабочих пчёл и трутней. На рис. 10 представлено строение половой системы пчелиной матки. Она состоит из двух яичников, парных яйцеводов, которые сливаются в непарный яйцевод, семяприёмник и влагалище. Яичники по форме напоминают грушу, которая широкой частью обращена к концу брюшка. Длина зрелого яичника у плодной матки 5—6 мм, а наибольший диаметр 3—4 мм. Яичник матки состоит из большого числа параллельно расположенных яйцевых трубочек (овариол). От широких концов яичников отходят парные яйцеводы, имеющие в средней части некоторое утолщение. Стенки яйцеводов имеют многочисленные складки, за счет которых может в значительной степени изменяться их объем. Увеличение объема яйцевода необходимо для временного хранения спермы у неплодных маток сразу же после спаривания их с трутнями. В этот момент в яйцевод попадает огромное количество спермы, откуда она постепенно, в течение 18—24 ч. переходит в семяприемник. [13] Кроме того, именно в средней части яйцевода скапливаются яйца, выпадающие из яйцевых трубочек, что обеспечивает более постоянную кладку яиц маткой.

Сверху над непарным яйцеводом расположен семяприемник. Он имеет шарообразную форму. Выводной проток семяприемника впадает в непарный яйцевод. Этот проток по выходу из семяприемника, прежде чем войти в непарный яйцевод, соединяется с протоком придаточной железы.

В месте выхода выводного протока из семяприемника образуется мышечный орган — семенной насосик, который играет основную роль в процессе подачи спермиев на яйцо, проходящее по яйцеводу.

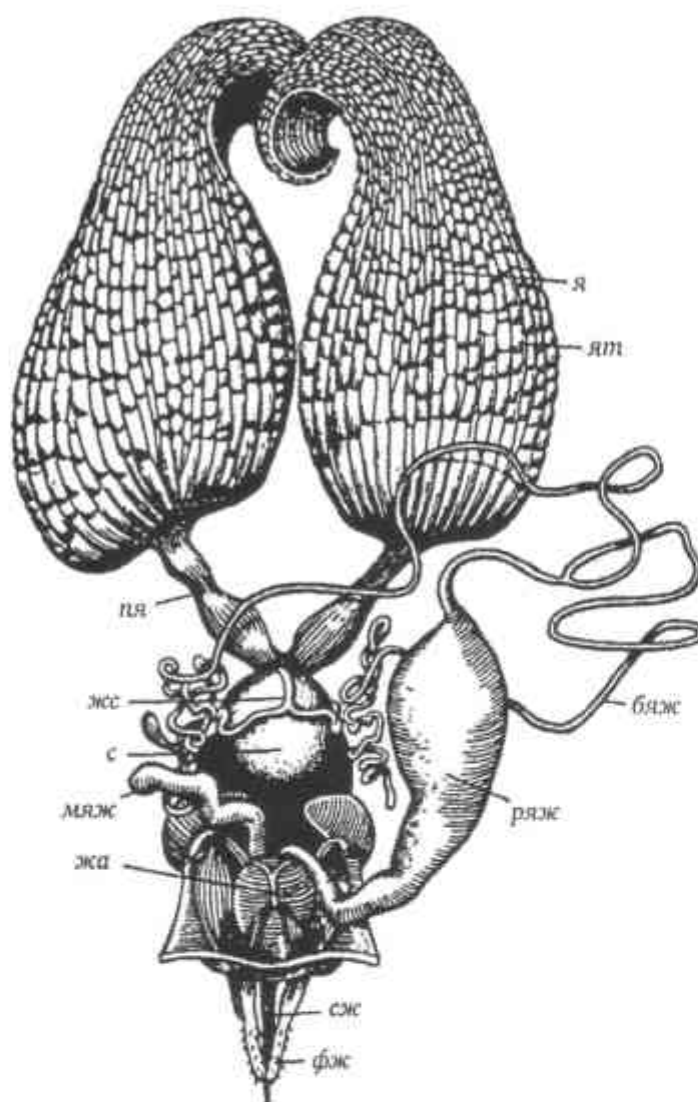


Рисунок 10. Половая система пчелиной матки. я — яичник; ят — яйцевые трубочки; бж — большая ядовитая железа; ряж — резервуар ядовитой железы; сж — стилеты жала; фж — футляр жала; жа — жалоносный аппарат; мж — малая ядовитая железа; с — семяприемник; жс — железа семяприемника; пж — парные яйцеводы

У старых маток часто нарушается функция семенного насосика, и они начинают откладывать большое количество неоплодотворенных яиц, что ведёт к образованию большого количества трутней.

За коротким непарным яйцеводом находится влагалище, которое, так же как и яйцевод, представляет собой трубку. Строение стенок влагалища такое

же, как и яйцевода: внутренняя стенка выстлана слоем хитина с эпителиальными клетками, а с внешней стороны стенки имеют мощные кольцевые мышцы. [39]

Внешний вид матки представлен на рис. 11.

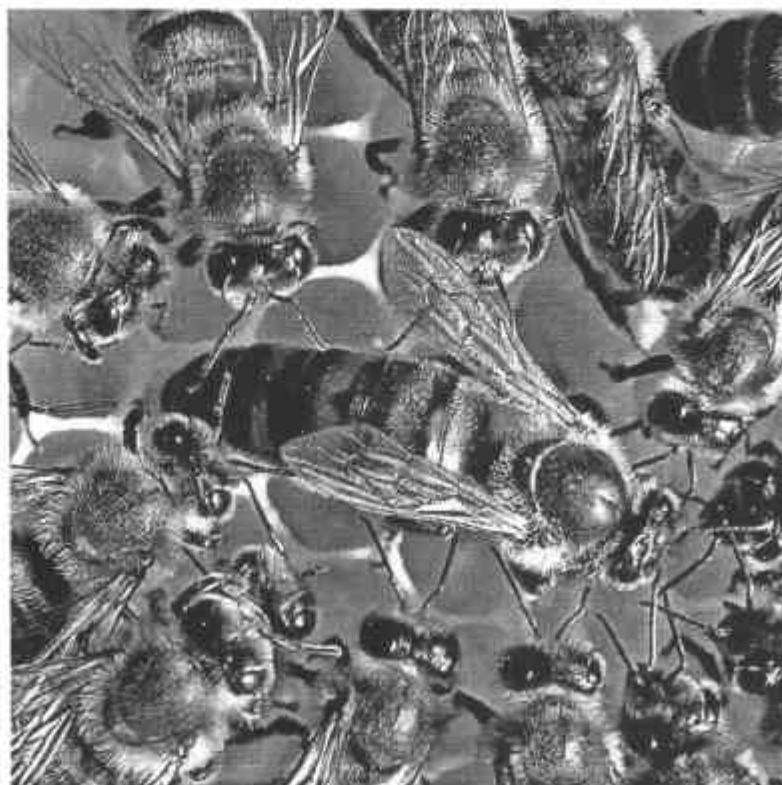


Рисунок 11. Матка в окружении рабочих пчёл

1.3 Характеристика дегидрогеназ, сукцинатдегидрогеназы и каталазы

1.3.1 Дегидрогеназы

Дегидрогеназы — многочисленные ферменты, относящиеся к классу оксидоредуктаз, которые катализируют реакции окисления субстрата восстанавливая акцептор электронов (зачастую это NAD или FAD). Механизм катализируемой реакции заключается в переносе гидрид-иона и выпуска в среду протона или переноса только двух протонов на конечный акцептор.

Дегидрогеназы широко распространены в природе. Они обнаружены во всех органах и тканях животных и растений, а также у микроорганизмов.

Сами по себе реакции ферментативного дегидрогенирования обратимы, однако при физиологических условиях реакции направлены только в одном направлении. Например, алкогольдегидрогеназа митохондрий человека катализирует распад этанола и других спиртов и ацеталей до соответствующих альдегидов и кетонов, в то время как алкогольдегидрогеназа дрожжей катализирует обратную реакцию с образованием этанола как конечного продукта метаболизма глюкозы. Дегидрогеназы отличаются высокой специфичностью и катализируют реакции окисления строго определенного субстрата или группы родственных ему соединений. Функции дегидрогеназ в организме человека и животных весьма многообразны. С реакций, катализируемых дегидрогеназами, начинается большинство аэробных процессов, завершающихся переносом водорода на кислород с образованием воды в качестве конечного продукта и выделением большого количества энергии, расходуемой организмом на осуществление всевозможных жизненных функций. [25]

Большинство дегидрогеназ для своего действия нуждается в присутствии ионов двухвалентных металлов, которые, по-видимому, стабилизируют активную структуру молекулы фермента и участвуют в активации субстрата.

Первичная структура дегидрогеназ, выделенных из различных источников, весьма сходна, особенно в отношении аминокислотных остатков, важных для осуществления каталитического акта. Пространственное расположение полипептидной цепи в области активного центра НАД-зависимых дегидрогеназ имеет большое сходство, что указывает на генетическую связь между этими ферментами. Строение активных центров ФАД- и НАД-зависимых дегидрогеназ различно.

Как правило, дегидрогеназы характеризуются наличием четвертичной структуры, т. е. молекулы индивидуальных ферментов состоят из различного количества субъединиц. На рис. 12 изображено строение алкогольдегидрогеназы человека, где отчётливо видно субъединичное строение фермента.

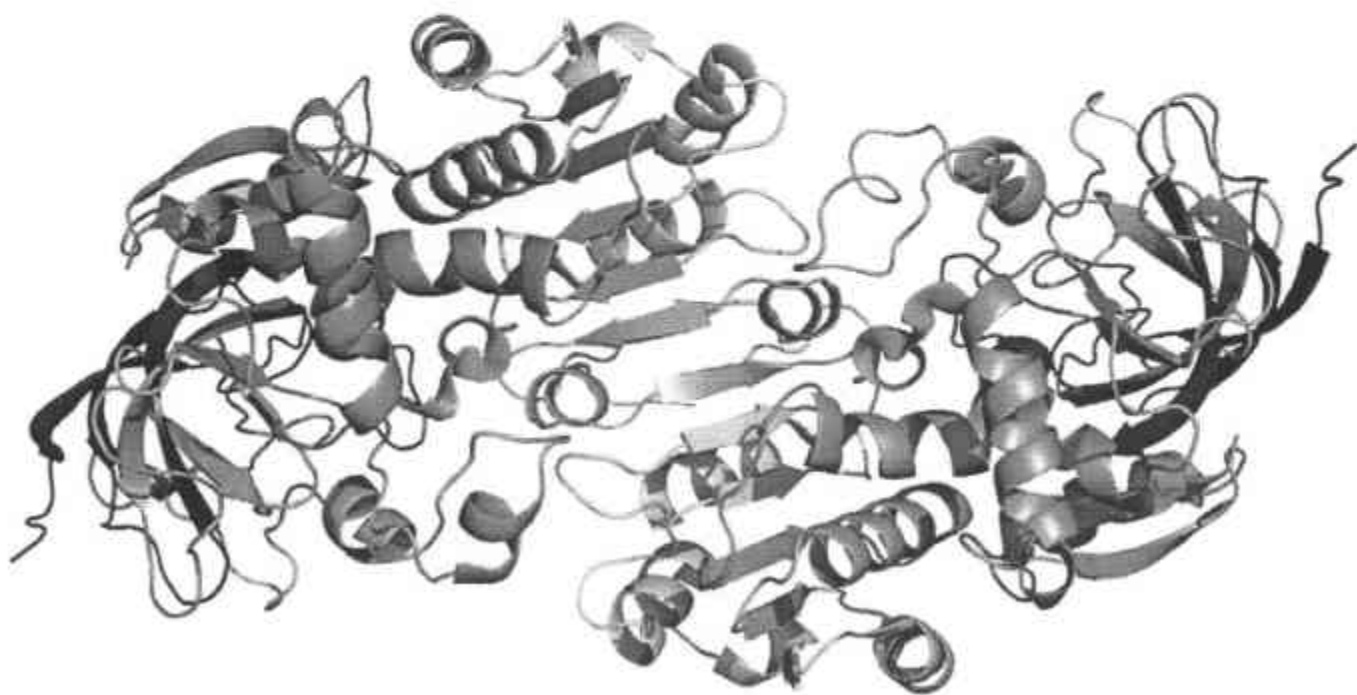


Рисунок 12. Пространственная структура алкогольдегидрогеназы человека

Субъединицы часто ферментативной активностью не обладают (это четко показано для НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ), она появляется только в результате ассоциации субъединиц в олигомер — активную молекулу фермента. Взаимодействие субъединиц в олигомере может приводить к кооперативности в функционировании активных центров фермента. Регуляция активности дегидрогеназ. может осуществляться путем взаимодействия с аллостерическими эффекторами — метаболитами, связывающимися на особых участках поверхности молекулы фермента. Наиболее типичными представителями регуляторных дегидрогеназ являются глутамат- и липоамиддегидрогеназы. [23]

Для многих дегидрогеназ охарактеризованы функциональные группы, участвующие в катализе, в связывании кофермента и субстрата. Наиболее изученными с этой точки зрения являются НАД- и НАДФ-зависимые дегидрогеназы. Остатки тирозина, гистидина и аспарагиновой кислоты принимают участие в связывании кофермента; роль кислотнo-основного катализатора играет либо остаток гистидина, либо ион металла. Большинство НАД-зависимых дегидрогеназ инактивируется при добавлении реагентов на сульфгидрильные (SH-) группы, например, пара-хлормеркурибензоата. Реактивация происходит при добавлении цистеина или глутатиона. Кофермент обладает защитным действием в отношении комплексов фермент — кофермент при инаktivации SH-реагентами. Многочисленные данные указывают на то, что SH-группы располагаются в активном центре дегидрогеназ или в непосредственной близости от него и участвуют в каталитическом акте, осуществляемом ферментом.

Большинство НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ специфичны по отношению к своим кофакторам; в то же время все исследованные дегидрогеназы оказались стереоспецифичными, причем одни из них при ферментативном восстановлении НАД (НАДФ) отщепляют и присоединяют водород по одну сторону пиридинового кольца молекулы кофермента, а другие — по другую, противоположную. Источник, из которого выделен фермент, в этом случае роли не играет, т. е. однотипные ферменты, выделенные из разных органов или тканей, имеют одну и ту же стереоспецифичность. Если фермент активен с НАД и с НАДФ, то стереоспецифичность одинакова по отношению к обоим коферментам. Наличие стереоспецифичности может иметь физиол. значение, обеспечивая возможность эффективного переноса водорода с одного субстрата на другой за счет последовательного действия двух функционально связанных дегидрогеназ.

1.3.2 Каталаза

Каталаза ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) представляет собой фермент, катализирующий дисмутацию перекиси водорода на кислород и

воду: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. [8] Каталаза является классическим гем-содержащим ферментом с атомом железа Fe в центре порфириновой системы, однако в семействе каталаз найдены и небольшая группа марганцевых ферментов, а также и так называемые каталазы-пероксидазы, содержащие гем, который содержит ковалентный триплет дистальных боковых цепей. Такие формы каталаз катализируют пероксидатические, а также каталатические реакции и работают по другому принципу, отличному от гем-содержащих классических каталаз.

Биологическая роль каталазы состоит в разрушении перекиси водорода, образующейся в клетках в результате действия ряда флавопротеиновых оксидаз (ксантиноксидазы, глюкозооксидазы, моноаминоксидазы и др.) в норме и при оксидативном стрессе. Присутствие каталазы обеспечивает эффективную защиту клеточных структур от деградации под действием перекиси водорода.

Каталаза широко распространена в тканях животных и растений и в микроорганизмах. Содержание каталаз в печени и эритроцитах млекопитающих составляет 0,1–0,2%, в отдельных штаммах микроорганизмов — до 5% сухого веса.

Каталаза разлагает перекись водорода с исключительно высокой скоростью и широко считается идеальным ферментом. При стандартных условиях одна молекула каталазы разлагает в секунду до 10^5 молекул пероксида водорода. [1] Оптимальное значение pH для каталазы лежит в интервале 6,0–8,0. Общепринятый механизм действия каталазы предполагает образование промежуточного комплекса фермента с H_2O_2 , который взаимодействует затем со второй молекулой перекиси водорода.

Активность каталазы ингибируется цианидом, фторидом, азидом, сульфидом, ацетатом, 3-амино-1,2,3-триазолом и его аналогами. Каталаза быстро инактивируется в растворе при pH больше 10,0 и меньше 4,0 и в присутствии

высоких концентраций мочевины или других вызывающих разрыв водородных связей агентов[20]. Инактивация фермента связана с образованием каталитически неактивных субъединиц.

Гемсодержащая молекула каталазы представлена на рис. 13 и состоит из четырёх субъединиц, каждая из которых в свою очередь разделена на два домена.

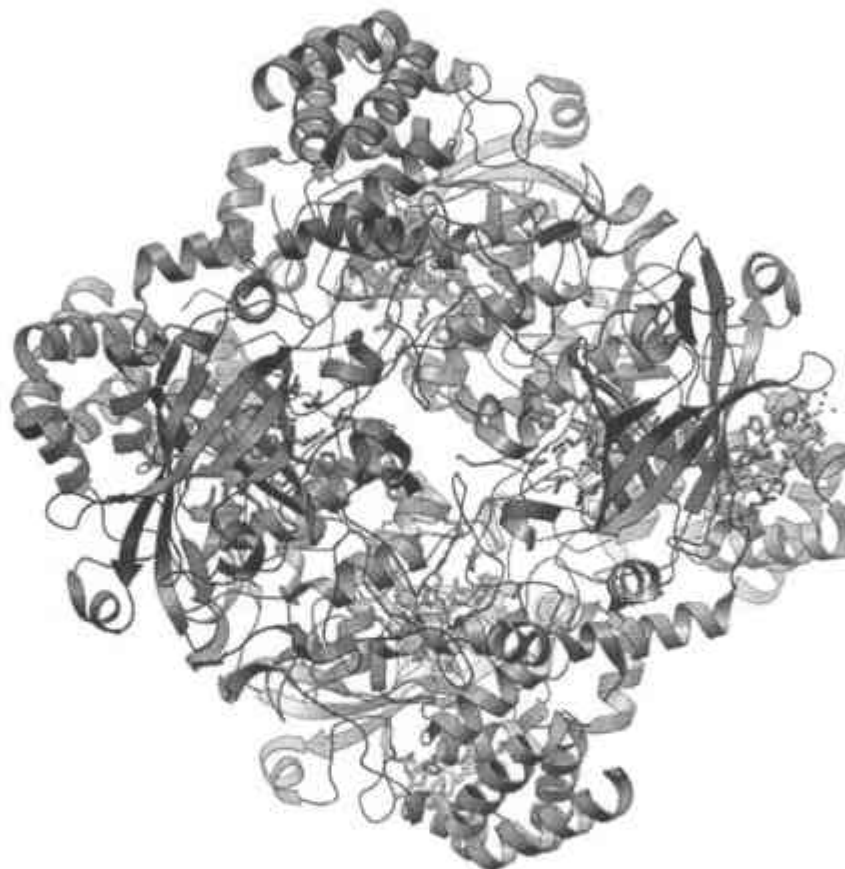


Рисунок 13. Строение каталазы

Внутреннее ядро каждой субъединицы — комплекс из восьми бета-бочек, ориентированных антипараллельно.

Каталаза играет решающую роль в адаптивном ответе на H_2O_2 и работает в комплексе с глутатионпероксидазой. Эти ферменты находятся на втором уровне защиты против активных форм кислорода, поэтому изменения в активности каталазы свидетельствуют об изменении оксидативного статуса клетки.

1.3.3 Сукцинатдегидрогеназа

Сукцинатдегидрогеназа представляет собой мембранный белок, гетеротетрамер: флавиновая субъединица массой около 70 кДа, железо-серный белок массой около 30 кДа и две гидрофобных якорных субъединицы массой 7-17 кДа. Флавиновая субъединица несёт на своей поверхности активный сайт всего фермента с необычным кофактором — 8α -N(3)-гистидил-FAD. Присоединение ФАД к гистидину стимулируется, но не зависит от наличия железо-серных субъединиц и присутствия интермедиатов цикла Кребса, таких как малат, сукцинат или фумарат. [11] Железо-серная субъединица имеет три разных железо-серных кластера: $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, $[3\text{Fe}-4\text{S}]$ и $[4\text{Fe}-4\text{S}]$. Якорные субъединицы удерживают всю ферментную молекулу в мембране и взаимодействуют с хиноновыми субстратами в составе внутренней мембраны митохондрий (рис. 14).

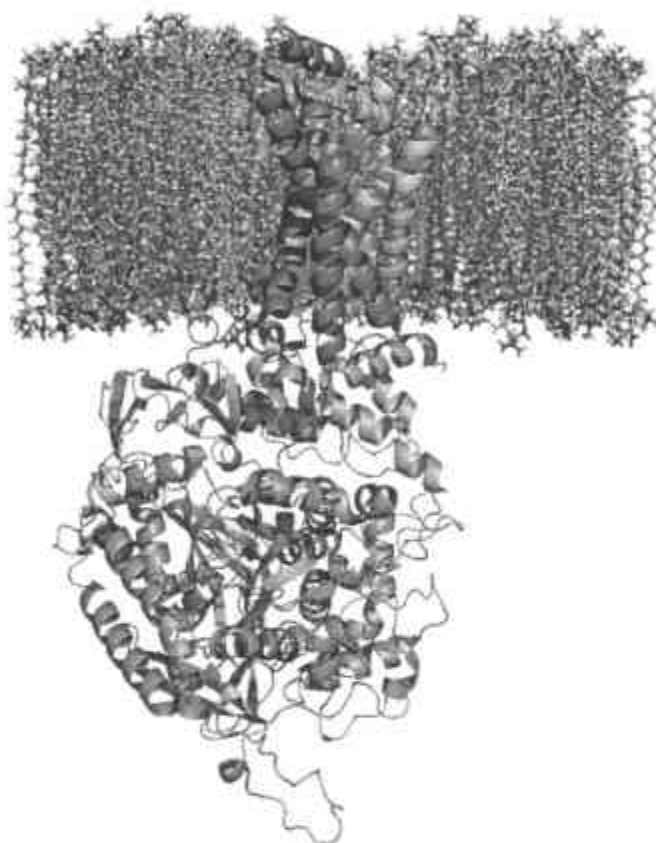


Рисунок 14. Молекулярная структура сукцинатдегидрогеназы

Исходя из роли фермента можно сказать, что сукцинатдегидрогеназа является ключевым ферментом аэробного окисления различных субстратов и продукции энергии, т. к. участвует не только в работе цикла трикарбоновых кислот, но также и в работе цепи переноса электронов, поэтому изменения в активности сукцинатдегидрогеназы свидетельствуют о наличии различных клеточных состояний, тесно связанных с энергетическими потребностями клетки. [21]

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика объекта исследования

Объектом исследования являлись личинки трутней возрастом 3, 5 и 7 суток. Личинки в вырезках сот были получены из частной пасеки, расположенной в Пензенском районе Пензенской области. После получения сот на пасеке они были упакованы в термоконтейнер и транспортированы в лабораторию при температуре ниже 0° С. В лабораторных условиях личинки в сотах до приготовления гомогената хранились в замороженном виде при -25° С.

2.2 Приготовление гомогената личинок трутневого расплода

Активность ферментов определяли в гомогенате личинок трутневого расплода разного возраста. Личинки трутней были изъяты из сот и рассортированы на группы по размеру, соответствующие возрасту личинок. Далее из каждой группы личинок был приготовлен 10%-й гомогенат по следующей схеме:

1. Масса личинок одного возраста в 1 гр была гомогенизирована в охлаждённом 0,9%-м растворе NaCl в гомогенизаторе Поттера до состояния однородной смеси.
2. Весь объём гомогенизата был центрифугирован с использованием рефрижератерной центрифуги при 3-4° С на скорости 5000 g 20 минут для удаления неразрушенных клеток и тканей.
3. Супернатант был профильтрован через бумажный фильтр для удаления липидных загрязнений

Для дальнейших манипуляций был использован полученный фильтрат, который хранился в замороженном виде при -25° С.

2.3 Определение концентрации белка методом Лоури

Для количественного определения содержания белка во фракциях после ионообменной хроматографии использовался метод Лоури, основанный на реакции ионов меди Cu^{2+} с пептидной связью. При этом медь переходит в Cu^+ и реагирует с реактивом Фолина-Чокальтеу (фосфомолибденовая кислота и фенол), образуется нестойкий продукт, переходящий в молибденовую синь, максимум абсорбции которой наблюдается при $\lambda = 750$. При этой длине волны увеличение концентрации белка зависит линейно от показателя оптической плотности. Чувствительность метода высокая (адекватные значения наблюдаются для концентраций белка от 10 до 100 мкг/мл).

Из каждой фракции отбиралась аликвота объёмом 0,5 мл, к аликвоте прибавлялся реактив С в количестве 1 мл (реактив С представляет собой смесь реактива В (0,5%-й раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-м растворе тартрата или цитрата натрия) и А (2%-й раствор Na_2CO_3 в 0,1 М NaOH) в соотношении 50:1), пробирка перемешивалась и смесь инкубировалась в течение 10 минут при комнатной температуре. Далее добавлялся реактив Фолина-Чокальтеу в количестве 100 мкл, после чего смесь снова интенсивно перемешивалась и далее инкубировалась при комнатной температуре в течение 40 минут. Измерение оптической плотности проводилось на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете толщиной 1 см против холостой пробы при длине волны $\lambda = 750$ нм. По полученным значениям оптической плотности была определена концентрация белка в каждой пробе с помощью градуировочного графика, построенного с использованием серии разведений БСА в пределах концентрации от 10 до 100 мкг/мл.

2.4 Определение общей дегидрогеназной активности

Общая дегидрогеназная активность была определена с использованием 2,3,5-трифенилтетразолиума хлорида. Метод основан на превращении 2,3,5-трифенилтетразолиума хлорида — бесцветной формы редокс-красителя — в 1,3,5-трифенилформазан, имеющий красно-розовый цвет (рис. 15).

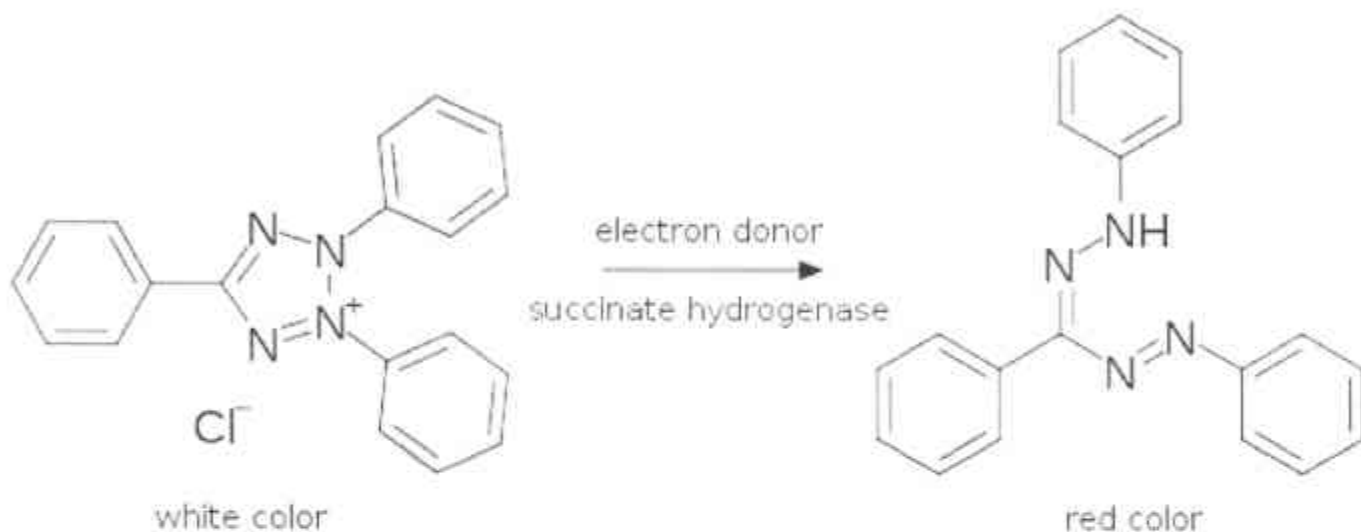


Рисунок 15. Реакция превращения 2,3,5-трифенилтетразолиума хлорида в 1,3,5-трифенилформазан

В условиях живых клеток или сред, содержащих активные дегидрогеназы, генерируются переносчики электронов, прежде всего восстановленный NAD, который является донором электронов для молекул красителя.

К 5 мл подготовленного 10%-го гомогената личинок трутневого расплода приливали 0,3 мл 3%-го водного раствора 2,3,5-трифенилтетразолиума хлорида, перемешивали и инкубировали 12 часов при комнатной температуре. После инкубации смешивали с равным объёмом гексана для экстракции образовавшегося формазана и измеряли интенсивность поглощения экстрагированной фазы на спектрофотометре при длине волны 485 нм (длина оптического пути 1 см, контроль — чистый гексан). Полученные результаты оптической плотности пересчитывали на мг белка в пробе по формуле:

$$\text{Активность} = \frac{\text{оптическая плотность, ед}}{\text{концентрация белка, мкг/мл}} \cdot 1000$$

2.5 Определение сукцинатдегидрогеназной активности

Специфическая сукцинатдегидрогеназная активность была определена с использованием феррицианида калия. Метод основан на использовании феррицианида калия в качестве конечного акцептора электронов: принимая электроны, окрашенный в жёлтый цвет раствор $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ обесцвечивается, что вызвано переходом Fe^{3+} в Fe^{2+} в составе $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Для определения сукцинатдегидрогеназной активности к 0,1 мл подготовленного 10%-го гомогената личинок трутневого расплода добавляли 2,5 мл 100 мМ натрий-фосфатного буфера ($\text{pH} = 7,8$) и 0,2 мл 2 мМ феррицианида калия. Смесь помещали в кювету спектрофотометра, показания прибора обнуляли и добавляли 0,2 мл 10 мМ сукцината натрия, сразу после чего регистрировали изменения оптической плотности при длине волны 420 нм. Активность фермента выражали в мМ/мин*мг белка превращённого субстрата.

5кз-х0з

2.6 Определение каталазной активности

Каталазная активность была измерена с использованием молибдата аммония. Суть метода заключается в измерении убыли пероксида водорода в пробах с использованием молибдата аммония, который образует окрашенный в синий цвет комплексное соединение с пероксидом водорода.

Для определения каталазной активности к 0,1 мл подготовленного раствора 10%-го гомогената личинок трутневого расплода добавляли 2 мл 0,03%-го раствора перекиси водорода и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. После инкубации каталазную реакцию разложения пероксида водорода останавливали добавлением 1 мл 4%-го раствора молибдата аммония в 0,1 н растворе серной кислоты и измеряли оптическую плотность

на спектрофотометре при длине волны 410 нм. В качестве контрольной пробы использовали смесь из 2,1 мл дистиллированной воды и 1 мл раствора молибдата аммония. Активность каталазы вычисляли по формуле (1) и выражали в мкат на мкг белка:

$$E = \frac{A_{\text{оп}} \cdot V \cdot t \cdot 22,2 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}}{C}, \text{ где}$$

E — активность каталазы, мкат/мкг;

$A_{\text{оп}}$ — оптическая плотность опытной пробы;

V — объём вносимой пробы, л;

t — время инкубации, с;

C — концентрация белка, мкг/мл.

2.7 Изучение белкового профиля гомогената

Для более детального изучения различия в работе других ферментных систем в процессе онтогенеза личинок трутневого расплода было решено получить профили экспрессии белкового пула гомогената личинок трутневого расплода с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Обращённофазная высокоэффективная жидкостная хроматография является вариантом жидкостной колоночной хроматографии и основана на разделении смеси молекул под действием тока элюента — подвижной фазы, через неподвижную матрицу носителя — неподвижную фазу. В варианте обращённофазной хроматографии в качестве неподвижной фазы используется неполярный носитель — чаще всего гранулы силикагеля, химически модифицированные различными функциональными группами (C18, C8 и так далее), а в качестве подвижной фазы — полярный растворитель (водные или чистые растворы ацетонитрила, метанола и так далее). В качестве колонок для ВЭЖХ используют стальные, пластиковые или стеклянные трубки,

ограниченные с обоих концов феррулами и плотно заполненные носителем — неподвижной фазой. В силу того, что гель, заполняющий колонку, упакован очень плотно, разделение идёт под большими значениями давления (порядка 10 МПа), что, с одной стороны, накладывает ограничения на подбор материалов для содержимого колонки, материала, из которого она изготовлена, а также других частей хроматографа, но с другой стороны позволяет проводить разделение смеси молекул с большой скоростью и эффективностью. Использование различных типов детекторов позволило методу ВЭЖХ занять одно из главенствующих положений среди остальных методов разделения биомолекул. Зачастую применяются спектрофотометрические, люминесцентные, кондуктометрические детекторы, которые позволяют в реальном времени следить за показаниями элюции веществ с колонки. Подключение к хроматографу автоматического коллектора фракций позволяет полностью автоматизировать процесс разделения и очистки молекул.

Для анализа полученных 10%-х гомогенатов использовалась хроматографическая система NGC Quest 10 Plus со спектрофотометрическим детектором, колонка SUPELCOSIL LC-18-T размерами 250x4,6 мм, размер частиц 5 мкм, коллектор фракций BioFrac. Разделение ОФ-ВЭЖХ выполнялась с градиентной элюцией от буфера А — водный 0,1%-й раствор фосфорной кислоты, до буфера В — 0,1%-й раствор фосфорной кислоты в 50%-м ацетонитриле. Детекция целевых молекул — пептидов — велась спектрофотометрически по поглощению на длине волны 220 нм.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Калибровка метода Лоури по БСА

Для количественного определения содержания белковых молекул в пробах 10%-го гомогената личинок трутневого расплода аналитическим методом необходимо построить калибровочные прямые по данным измерения оптической плотности стандартных растворов белка с применением метода Лоури. Полученная кривая зависимости концентрации БСА от оптической плотности представлена на рис. 16.

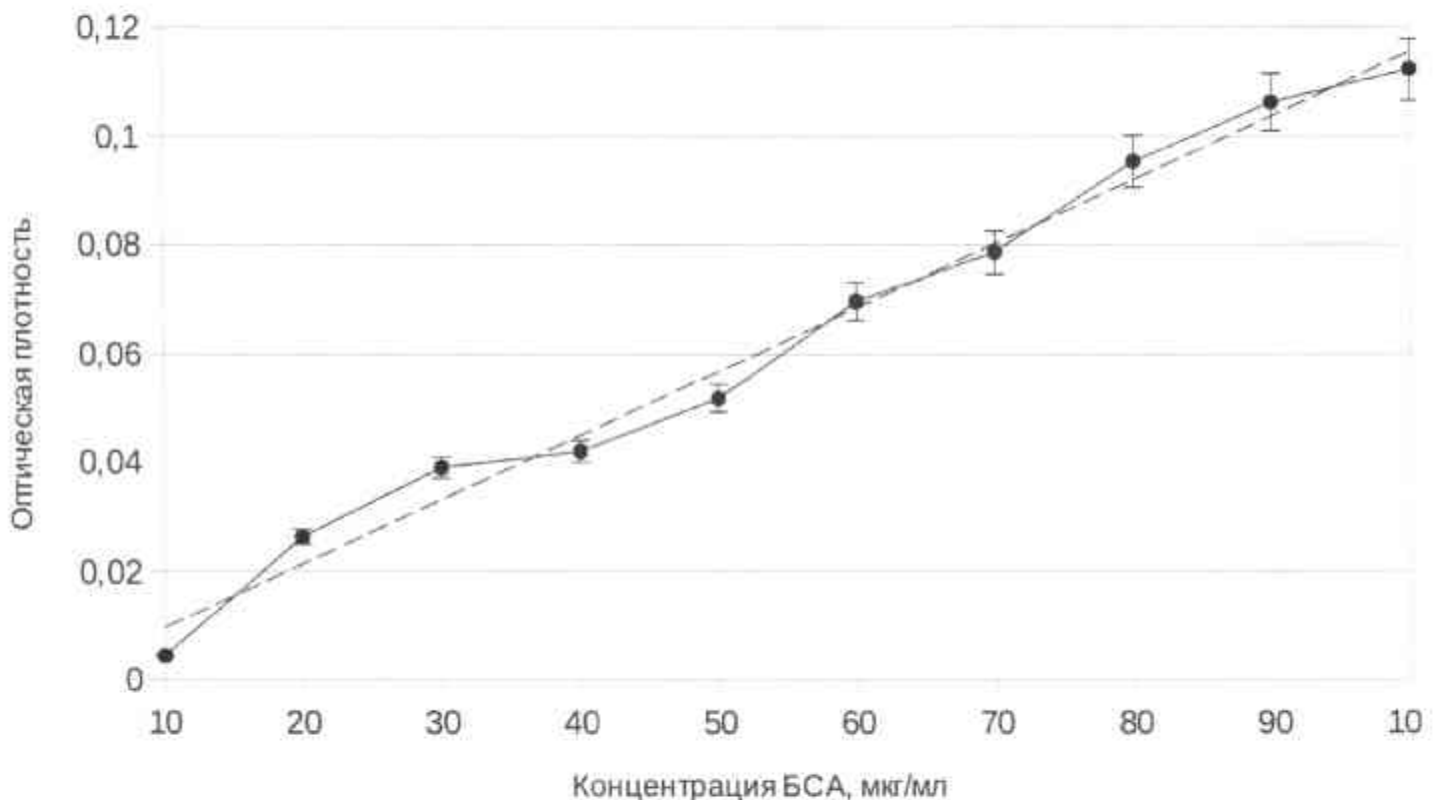


Рисунок 16. Калибровочная кривая зависимости оптической плотности от концентрации БСА в пробе (сплошная линия — экспериментальные данные, пунктирная — прямая, полученная методом наименьших квадратов)

По полученной экспериментальной кривой методом наименьших квадратов была получена идеальная прямая и уравнение этой прямой:

$$y = 0,012x - 0,002.$$

Расчёт концентрации белков в различных пробах производился с использованием полученного уравнения, т. е. аналитическим способом методом калибровочной прямой.

3.2 Сортировка личинок трутней для приготовления гомогената

Для приготовления гомогената личинок трутней различного возраста личинки предварительно прошли сортировку и на основании их размера были поделены на три опытные группы: условно 3, 5 и 7 сутки развития. Примеры личинок условных групп представлены на рис. 17-19.

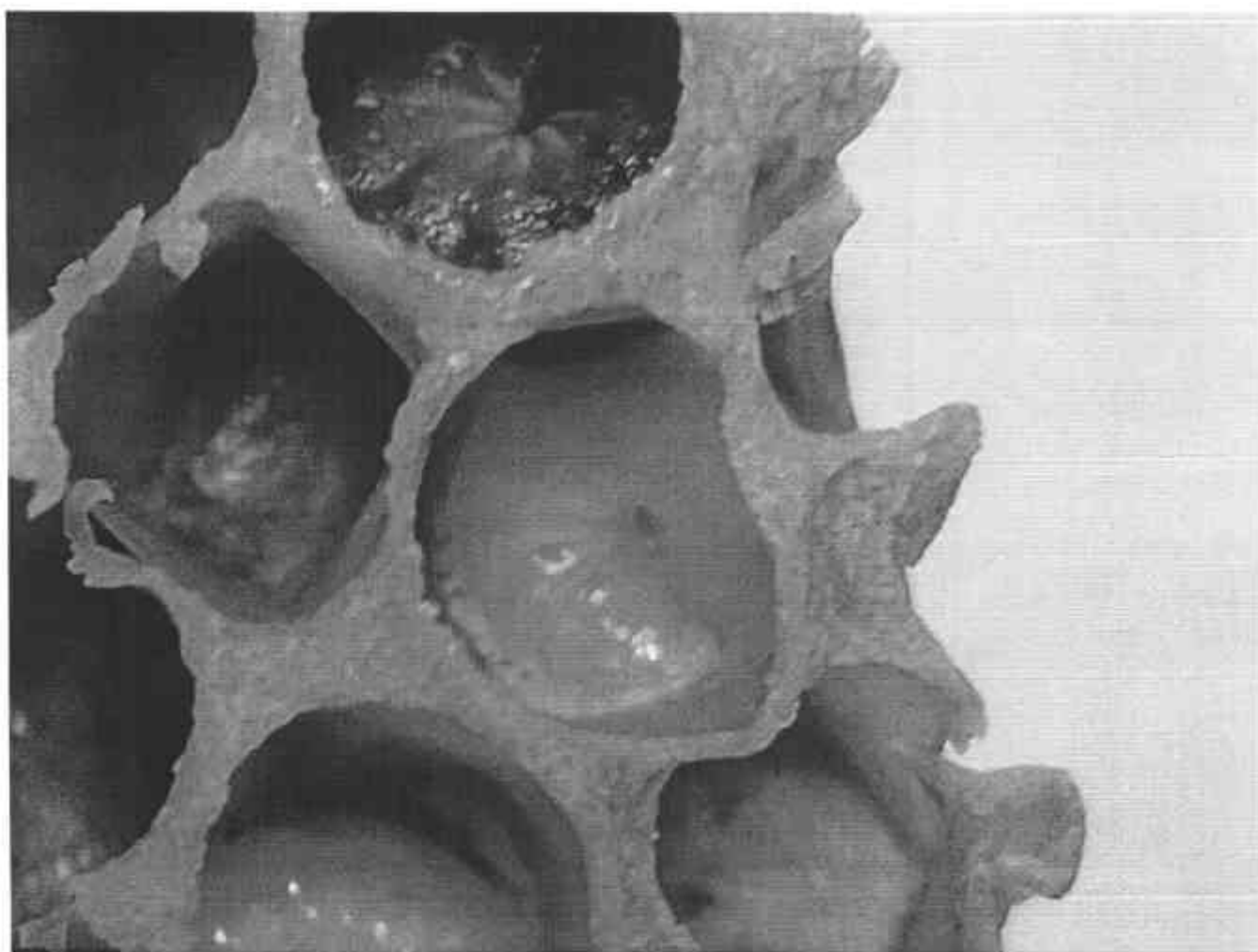


Рисунок 17. Пример личинок условной группы «3-е сутки» (в центре)

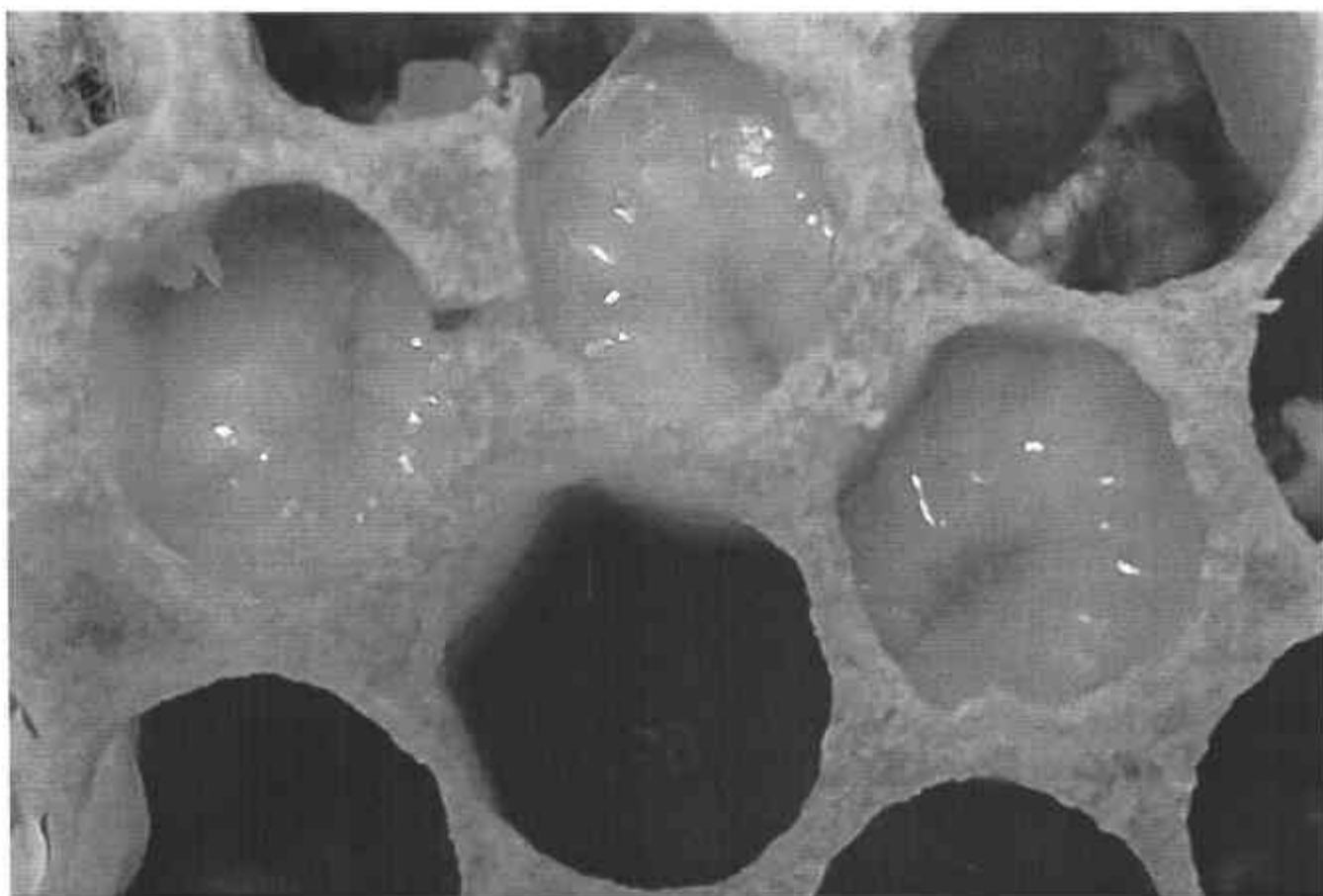


Рисунок 18. Пример личинок условной группы «5-е сутки» (все три)

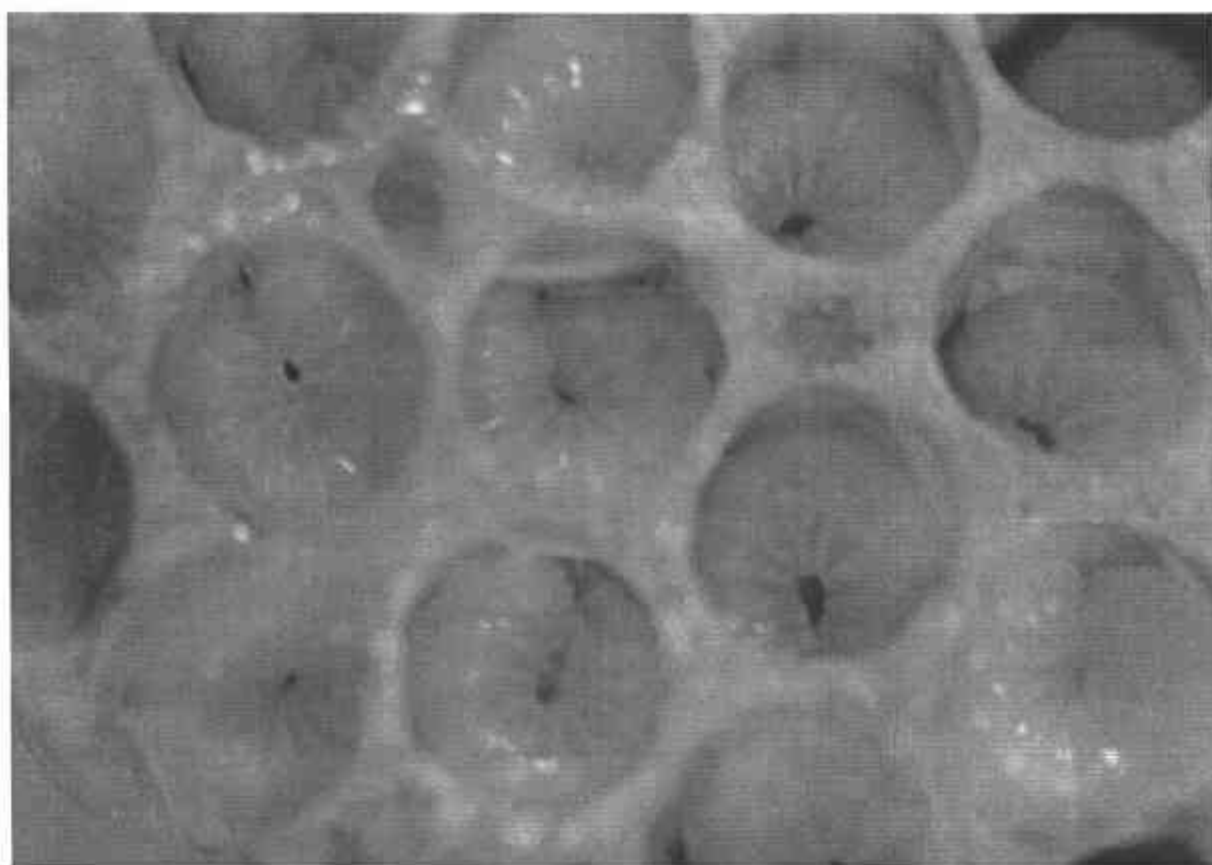


Рисунок 19. Пример личинок условной группы «7-е сутки» (все на фото)

Сортировка личинок проводилась, пока они находились в замороженном виде. Для приготовления гомогената не использовались повреждённые личинки или личинки с признаками заболеваний или другими видами порчи.

3.3 Общая дегидрогеназная активность

Результаты по измерению общей дегидрогеназной активности в зависимости от возраста личинок трутневого расплода представлены на рис. 20.

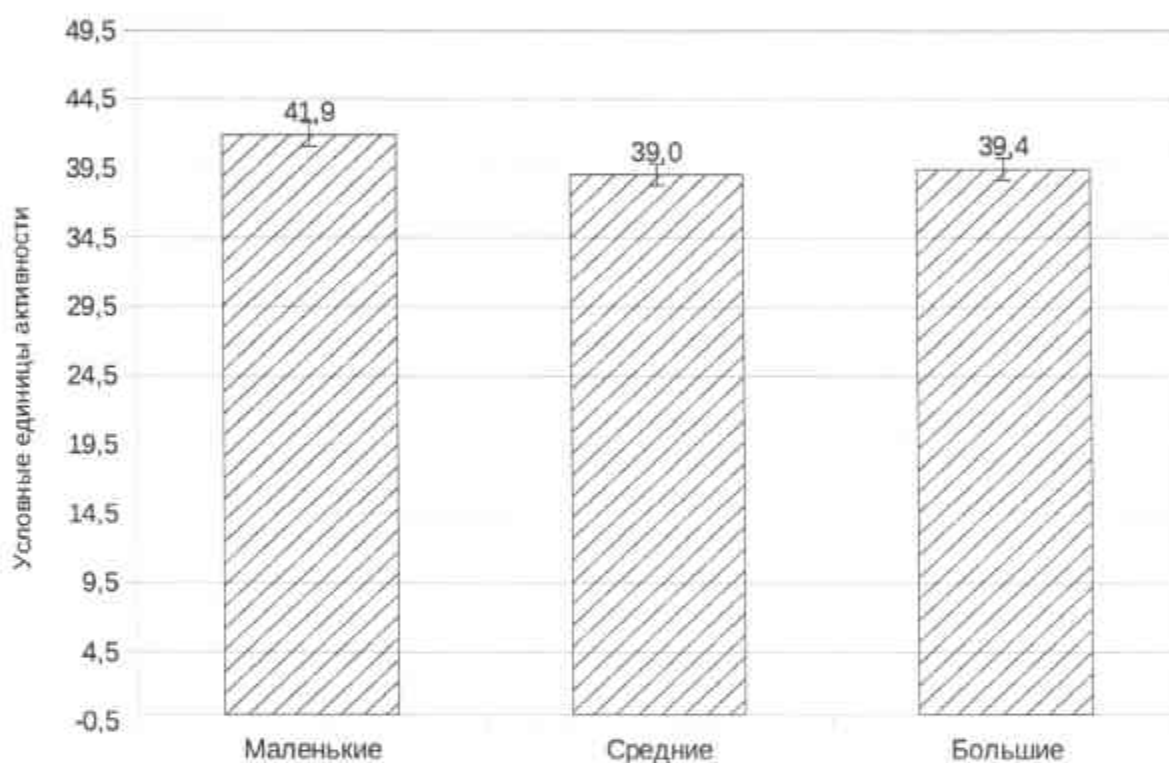


Рисунок 20. Результаты измерения общей дегидрогеназной активности

Как видно из результатов, общая дегидрогеназная активность личинок трутней статистически достоверно не изменяется в зависимости от их возраста. Отсутствие изменения общей дегидрогеназной активности, вычисленной пропорционально общему количеству белка в гомогенате, по-видимому, свидетельствует об отсутствии каких-либо стрессовых воздействий на развивающийся организм пчелиной личинки. Общая дегидрогеназная активность, полученная из расчётов без учёта изменения содержания количества белка в гомогенате, демонстрирует медленный рост (рис. 21).

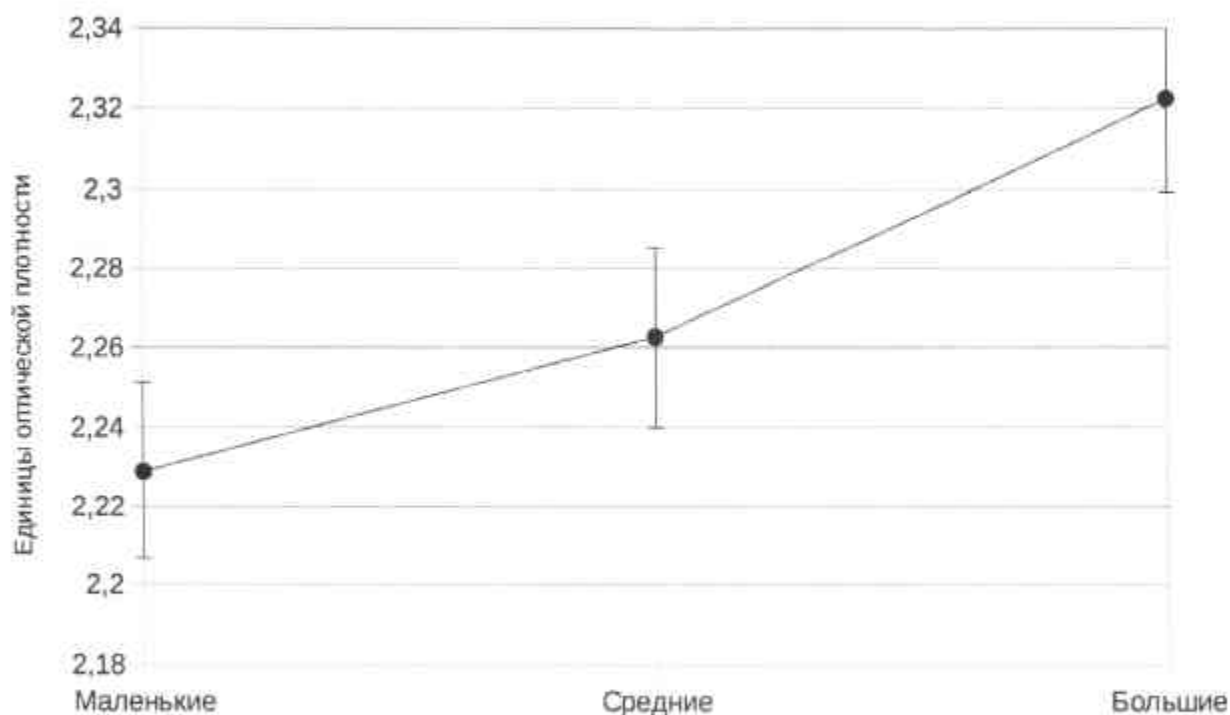


Рисунок 21. Изменение общей дегидрогеназной активности без учёта содержания белка

Независимое от содержания белка изменение активности дегидрогеназной системы развивающейся личинки свидетельствует о закономерном процессе развития организма трутня, т. е. с увеличением общего содержания белка увеличивается и дегидрогеназная активность как логичный результат общего увеличения доли фермента в общем белковом пуле личинки.

3.4 Каталазная активность

Результаты по измерению каталазной активности представлены на рис. 22.

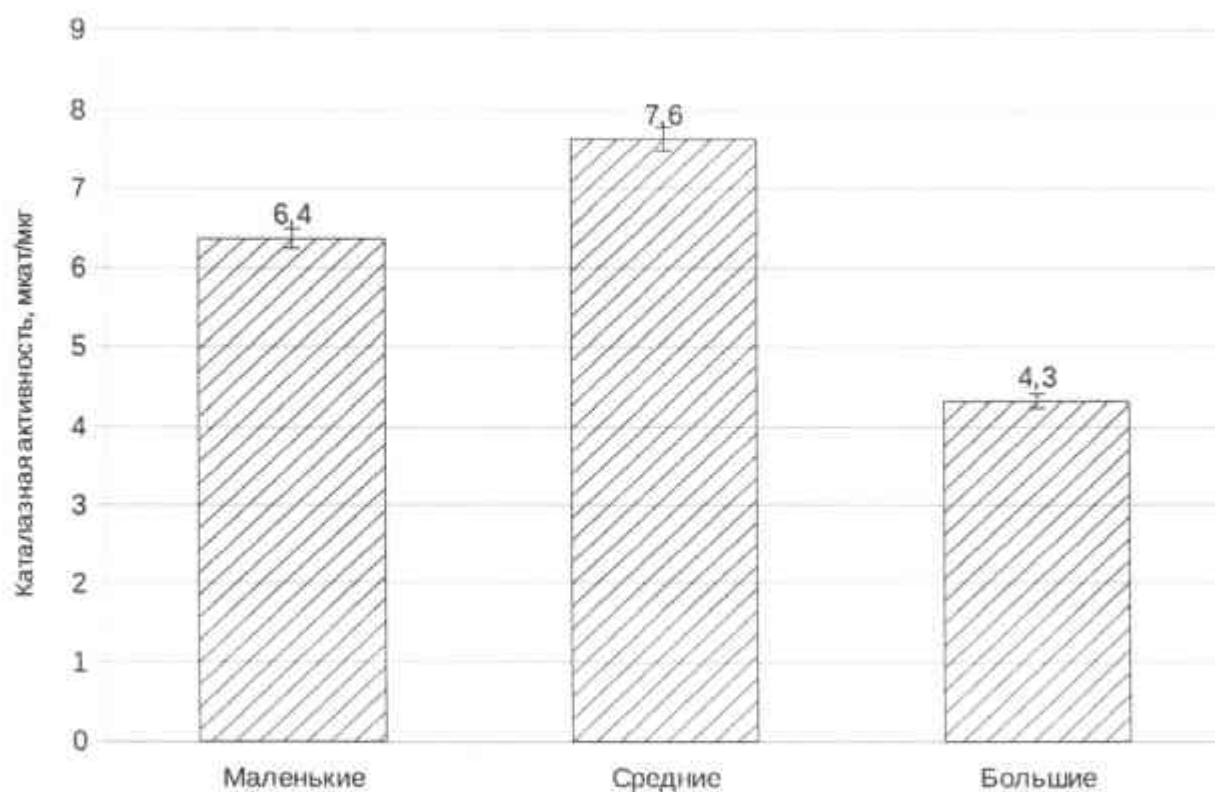


Рисунок 22. Изменение каталазной активности в зависимости от возраста личинки трутня

Анализируя результаты по измерению каталазной активности можно сказать, что у личинок разного возраста наблюдается статистически достоверное изменение каталазной активности: в гомогенате личинок условной группы «3-е сутки» каталазная активность ниже, чем у личинок группы «5-е сутки», но выше, чем у личинок из группы «7-е сутки».

Изменение активности каталазы свидетельствует об интенсивности оксидативного стресса: чем интенсивнее воздействие активных форм кислорода на клетку, тем выше активность каталазы, что является адаптивной реакцией клетки. Причиной возрастания количества активных форм кислорода может быть как увеличение интенсивности окислительного фосфорилирования в митохондриях клеток, так и возможное повреждение тканей организма и даже инфекция. Каталаза как фермент антиоксидантной защиты клеток многих эукариотических организмов расположена главным образом в пероксисомах и

активируется в ответ на увеличение митохондриальной продукции активных форм кислорода, прежде всего пероксида кислорода, что может быть вызвано различными метаболическими сдвигами в сторону увеличения производства АТФ. Увеличение содержания активных форм кислорода может быть также вызвано увеличением скорости окисления жирных кислот для энергетических нужд клетки. В процессе окисления жирных кислот пероксисомами образуется большое количество ацетил-КоА, который активно вовлекается в различные синтетические и энергетические процессы в клетке, прежде всего участвует в работе цикла Кребса в матриксе митохондрий.

Как следствие вышеизложенных фактов, увеличение содержания активных форм кислорода в тканях и клетках личинок трутневого расплода с третьей по пятые сутки может свидетельствовать об интенсификации процессов роста и деления клеток различных тканей развивающейся личинки трутня ускоренными темпами под продолжающимся влиянием биологически активных веществ маточного молочка. Уменьшение каталазной активности у личинок условной группы «7-е сутки» может свидетельствовать о запаздывающем уменьшении интенсивности роста личинки, вызванное переходом питания с маточного молочка, богатого различными биологически активными молекулами, такими как стероидные гормоны, трофические регуляторы роста и т. п., на более богатую белковыми молекулами смесь мёда и перги, но лишённую этих стимуляторов роста. Вследствие этого интенсивность энергетического обмена в клетках личинки уменьшается, что и уменьшает митохондриальную продукцию активных форм кислорода.

3.5 Сукцинатдегидрогеназная активность

Результаты измерения сукцинатдегидрогеназой — специфичной дегидрогеназой активности — представлены на рис. 23.

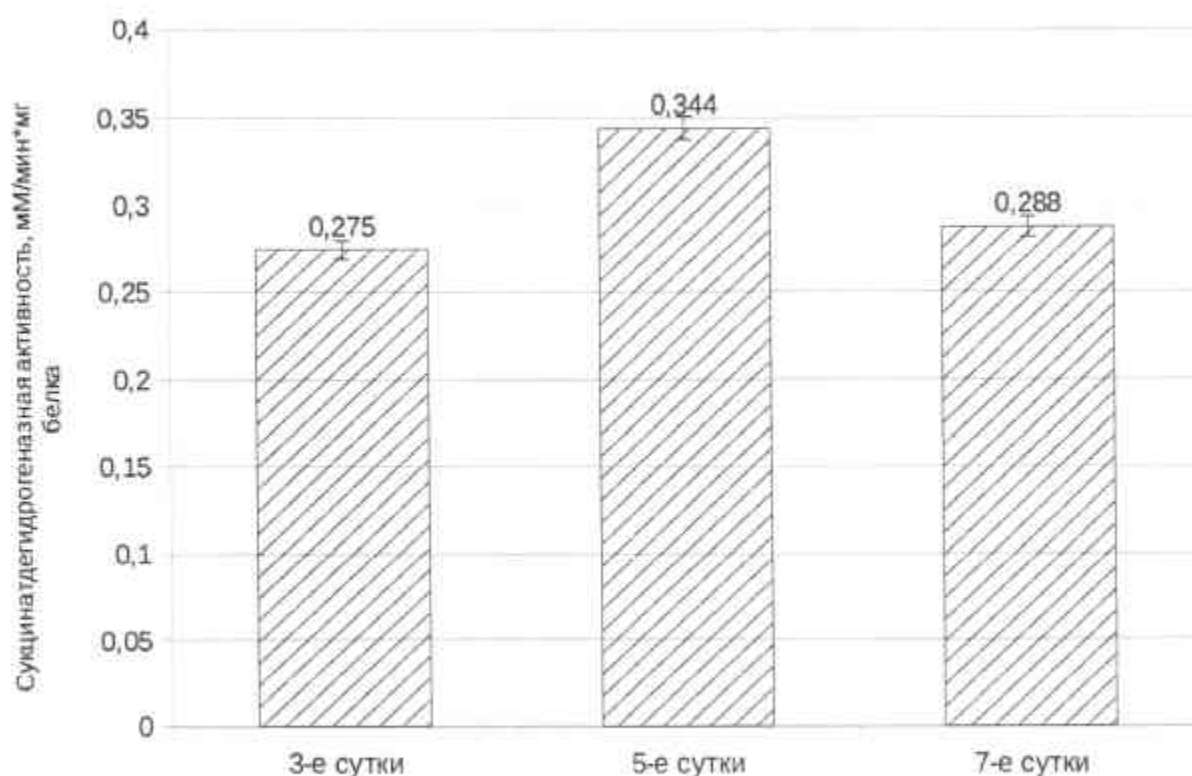


Рисунок 23. Результаты измерений сукцинатдегидрогеназной активности

Характер изменений в активности сукцинатдегидрогеназы, наблюдаемые в зависимости от возраста личинок, аналогичны характеру изменения активности каталазы, что подтверждает предположение о том, что с приближением фазы предкуколки, а затем куколки, у личинки уменьшается активность ферментативных систем, задействованных в окислительных процессах.

3.6 Возможные причины изменения активности изученных ферментов

Уменьшение активности каталазы и специфической сукцинатдегидрогеназной активности при росте общей дегидрогеназной активности, по-видимому, связано с изменением направленности метаболизма личинки трутня. Во-первых, на 4-5 сутки приходится максимум содержания белка в корме личинки, т. к. они ещё продолжают получать маточное молочко, богатое свободными аминокислотами, белками и регуляторными молекулами как пептидной,

так и стероидной природы, что увеличивает активность основных ферментативных систем, участвующих в синтезе запасных питательных веществ, прежде всего липидов, для увеличения массы жирового тела. Направленность метаболизма личинки, получающей маточное молочко, на синтез липидов из аминокислот путём переаминирования и деградации образующихся продуктов до ацетил-КоА вместе с ускорением энергетического обмена, вызванного быстрым ростом личинки, несколькими актами линьки и стремительным увеличением массы тела повышает продукцию активных форм кислорода, что приводит к активации неспецифичной пероксисомальной системы антиоксидантной защиты, что выражается в повышении активности каталазы. Во-вторых, увеличение синтетической активности тканей личинки требует больших энергетических затрат, что выражается в увеличении активности ферментных систем, прежде всего цикла Кребса и митохондриальной цепи переноса электронов, с целью продукции АТФ и других макроэргических соединений на повышенном уровне, что и выражается в увеличении сукцинатдегидрогеназной активности, т. к. этот фермент играет ключевую роль не только в функционировании цикла трикарбоновых как катализирующий реакцию превращения янтарной кислоты в фумаровую, но и как комплекс II — компонент цепи переноса электронов, регулирующий её работу путём формирования пула убихинола и поддержания работы Q-цикла.

На 5-6-е сутки происходит смена кормовой базы личинки: пчёлы-кормилицы больше не секретируют маточное молочко в ячейки с развивающимися трутнями, а вместо этого дают смесь из перги и мёда, содержащую значительно меньшее количество белкового компонента и увеличенную долю углеводов. На фоне этого наблюдается уменьшение каталазной и сукцинатдегидрогеназной активности, т. к. при уменьшении поступления аминокислот с пищей уменьшается и количество генерируемых в процессе метаболизма азотсодержащих молекул интермедиатов цикла Кребса (например, уменьшается скорость превращения валина, изолейцина, метионина и треонина в сукцинил-

КоА, аспарагина и аспартата в оксалоацетат, а глутамата в α -кетоглутарат), а синтез липидов для увеличения запасов жирового тела личинки происходит за счёт образования ацетил-КоА из продуктов гликолитического пути, что выражается в уменьшении активности сукцинатдегидрогеназы. С уменьшением активности цикла Кребса уменьшается и активность работы цепи переноса электронов, что влечёт за собой пониженное образование активных форм кислорода, в том числе и супероксида, превращаемого супероксиддисмутазой в пероксид водорода, разлагаемый каталазой, что и выражается в понижении каталазной активности у личинок группы «7-е сутки» по сравнению с личинками трутней группы «5-е сутки».

Другой причиной изменения направленности метаболических путей развивающейся личинки, выражающееся в изменении активности изучаемых ферментов, по-видимому, является подготовка к стадии предкуколки, образующейся на 8-е сутки, одновременно с запечатыванием сот. С закрытием сот прекращается постоянное пополнение объёма корма, доступного личинке, поэтому происходит изменение схемы питания: на стадии предкуколки энергия для метаморфоза трутня берётся за счёт окисления жирных кислот, образовавшихся в процессе липолиза жировой ткани жирового тела личинки. Одновременно с этим на стадии предкуколки замедляются процессы продукции энергии митохондриями, т. к. основная цель на данном этапе не увеличение массы тела личинки, а метаморфоз, выражающийся в контролируемом изменении строения тканей и органов личинки, закладке и развитии новых органов и т. п. Видимо, именно поэтому не наблюдается снижения общей дегидрогеназной активности на фоне понижения активности каталазы и сукцинатдегидрогеназы, т. к. дегидрогеназы как класс ферментов вовлечены во множество процессов синтеза и модификации сигнальных молекул и функционирования сигнальных внутри- и межклеточных путей.

3.7 Изменение белкового профиля в онтогенезе личинок трутней

Для получения более детальных данных о качественном и количественном изменении белкового профиля личинки на третьи, пятые и седьмые сутки развития гомогенат был изучен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Хроматограммы представлены на рис. 24-26.

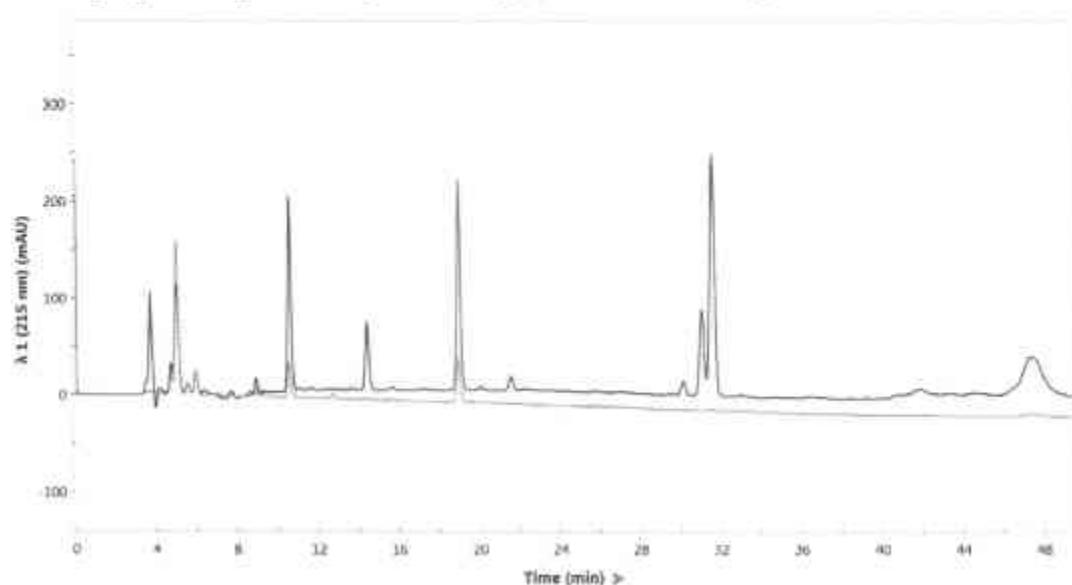


Рисунок 24. Хроматограмма разделения белков 10%-го гомогената личинок возрастом 3 суток (оранжевая линия — поглощение на длине волн 280 нм)..

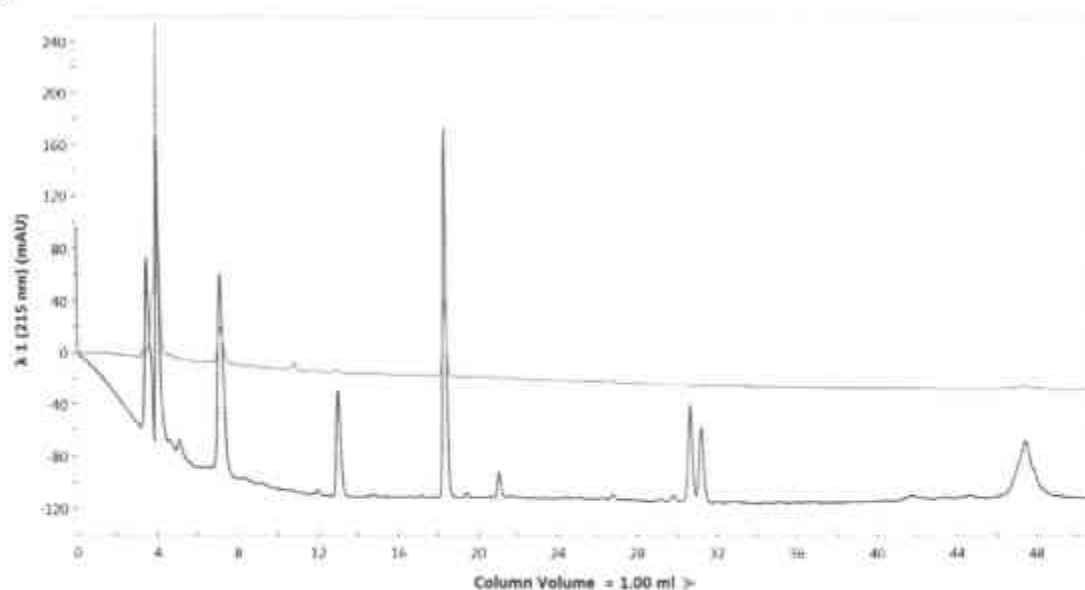


Рисунок 25. Хроматограмма разделения белков 10%-го гомогената личинок возрастом 5 суток (оранжевая линия — поглощение на длине волны 280 нм).

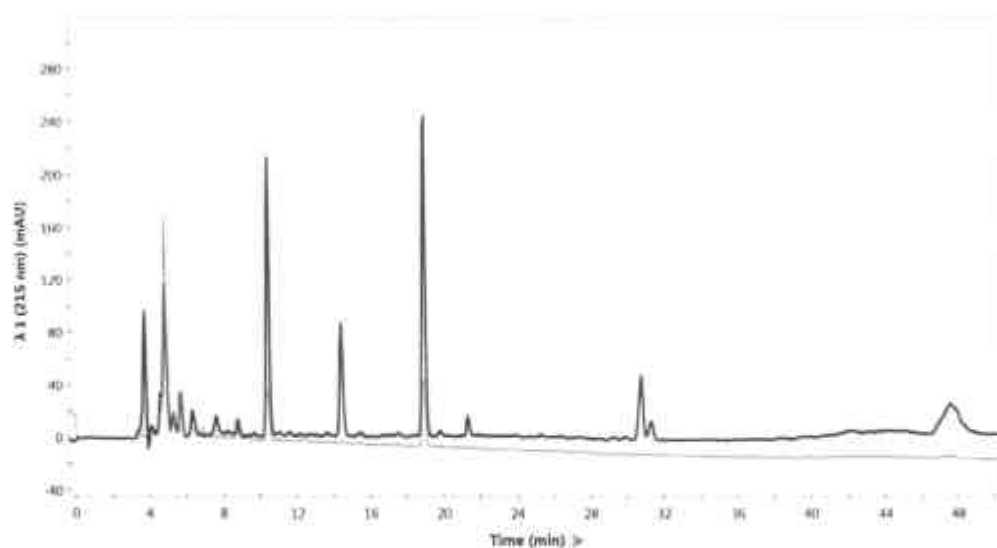


Рисунок 25. Хроматограмма разделения белков 10%-го гомогената личинок возрастом 7 суток (оранжевая линия — поглощение на длине волны 280 нм).

Анализ хроматограмм позволяет сказать, что с изменением возраста личинки происходят качественные и количественные изменения в белковом составе организма личинки.

Во-первых, наблюдается изменение в разнообразии белков и пептидов, содержащих ароматические аминокислоты, что выражается в изменении характера и количества пиков с поглощением на длинах волны 220 и 280 нм.

Если на хроматограмме разделения гомогената личинок возрастом 3 сутки наблюдается 6 пиков одновременного поглощения на длинах волн 220 и 280 нм, то на хроматограмме гомогената личинок возрастом 5 сутки уже только 4, однако количество таких пиков у личинок возрастом 7 суток возрастает до 9. Так как пептидная связь интенсивно поглощает на длине волны 220 нм, а радикалы ароматических аминокислот (триптофана и тирозина, в меньшей степени фенилаланина) на 280 нм, изучение хроматограмм с одновременной детекцией на обеих длинах волн позволяет сделать начальное заключение

об аминокислотном составе белков. Таким образом можно сказать, что в процессе онтогенеза личинок трутней происходят значительные изменения в наборе белков, имеющих в своём составе ароматические аминокислоты.

На рис. 26 представлено сравнение хроматограмм всех трёх типов изученных гомогенатов только по поглощению на длине волны 220 нм.

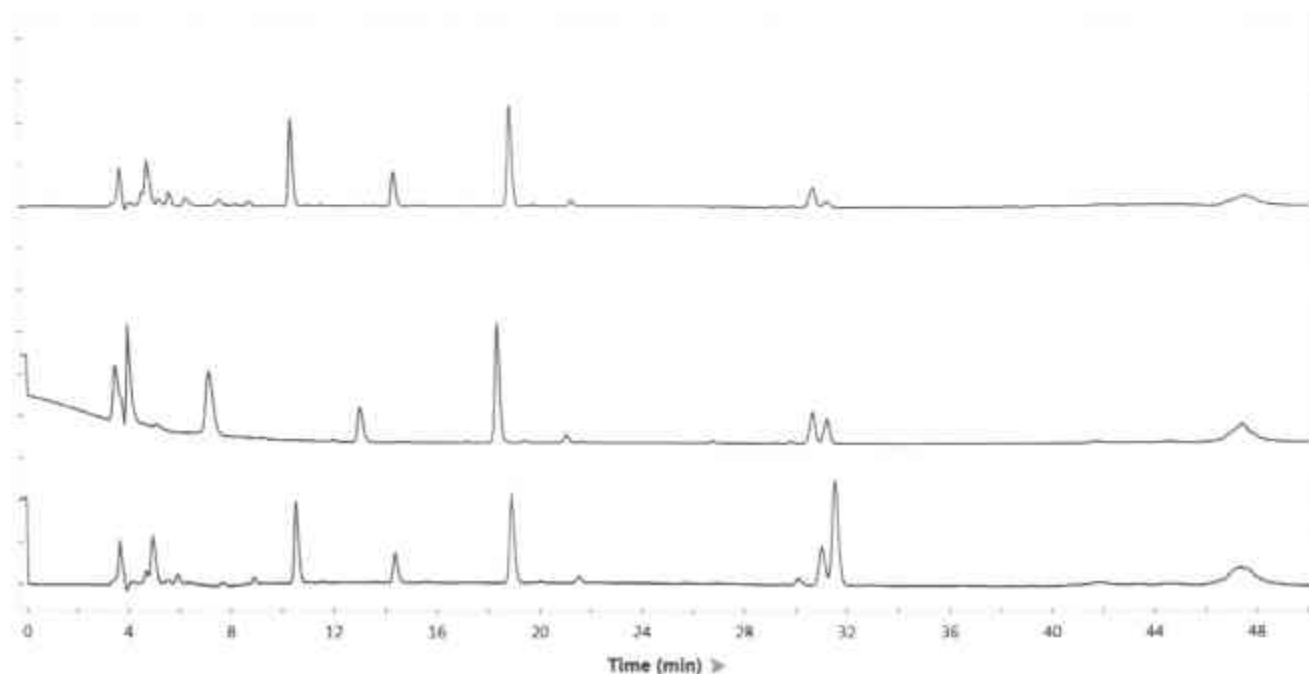


Рисунок 26. Сравнение хроматограмм разделения гомогенатов личинок трутневого расплода. Нижний график — гомогенат личинок возрастом трое суток, средний — пять суток, верхний — семь суток. Детекция на длине волны 220 нм

Анализ данных на рис. 26 с использованием ПО ChromLab позволил получить параметры данных пиков (маркировка по времени удерживания) (рис. 27).

щадь (доля площади конкретного пика от площади всех пиков хроматограммы, участвующих в расчёте), найденные с помощью ПО ChromLab, приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Параметры пиков

Время удерживания, мин	Высота, mAU	Относительная площадь, %	Время удерживания, мин	Высота, mAU	Относительная площадь, %
Гомогенат личинок трутней возрастом 3-е сутки			Гомогенат личинок трутней возрастом 5-е сутки		
3,66	115,72	8,01	3,49	140,21	12,91
4,09	14,82	1,23	3,99	234,41	16,41
4,69	32,27	1,61	5,12	11,37	0,98
4,94	115,87	8,36	7,14	150,87	16,11
5,54	8,04	0,52	13,02	83,9	6,9
5,92	22,55	1,24	18,37	292,63	19,55
8,9	17,34	0,84	21,07	20,36	1,32
10,53	203,5	12,05	30,71	74,93	6,36
14,38	71,12	4,69	31,27	59,1	5,19
18,91	217,3	14,74	47,47	43,42	14,27
21,55	14,66	1,06			
30,13	14,61	1,3			
31,03	79,2	6,14			
31,56	238,69	20,26			
41,83	6,25	1,31			
47,31	40,69	16,93			

Таблица 1. Продолжение

Время удерживания, мин	Высота, mAU	Относительная площадь, %	Время удерживания, мин	Высота, mAU	Относительная площадь, %
Гомогенат личинок трутней возрастом 7-е сутки					
3,7	103,5	9,97	10,38	211,47	17,7
4,08	12,48	1,22	14,38	84,98	7,9
4,79	111,85	12,84	18,89	255,8	22,39
5,27	13,45	1,03	21,31	14,83	1,34
5,66	33,3	2,67	30,76	41,17	5,57
6,3	19,78	2,16	31,32	12,38	1,41
7,59	13,69	1,65	47,57	22,33	11,24
8,76	12,39	0,91			

Анализ полученных данных позволяет заключить, что:

1. Разнообразие белков уменьшается к пятым суткам роста личинок, однако восстанавливается к седьмым суткам, если судить по количеству пиков на хроматограммах, что коррелирует с изменением каталазной и сукцинатдегидрогеназной активности у личинок данных возрастов.
2. Наблюдается закономерность в увеличении относительного содержания неизвестного белка, характеризуемого пиками с временем удерживания 18,91/18,37/18,89 у личинок 3, 5 и 7 суток соответственно: 14,74 → 19,55 → 22,39.
3. С увеличением возраста личинок уменьшается содержание белка, характеризуемого пиками с временем удерживания 31,56/31,27/12,38: 20,26 → 5,19 → 1,41.

4. Наибольшие изменения во временах удерживания наблюдаются для пиков, выходящих в первой трети градиента концентрации буфера В — 0,1%-го раствора трифторуксусной кислоты в 50%-м растворе ацетонитрила (первые 18 минут элюции), что связано с изменением физико-химических свойств разделяемых белков, т. к. на время удерживания влияет не только первичный аминокислотный состав белка, но и его различные модификации (аминирование, гликозилирование и т. д.).

Таким образом можно сказать, что с течением развития личинки трутня происходят качественные и количественные изменения в белковом составе клеток организма, что также сказывается и на активность изученных ферментов. Эти изменения направлены на увеличение массы личинки в период её развития и подготовку к предстоящему метаморфозу, характер этих изменений также зависит от типа корма, который получает личинка.

ВЫВОДЫ

В результате проведённых исследований были получены новые данные о биохимических особенностях личинок трутней в онтогенезе. В особенности были изучено функционирование ферментных систем развивающихся трутней на примере дегидрогеназной, каталазной и сукцинатдегидрогеназной систем в зависимости от степени развития личинки трутня.

Так же были изучены особенности экспрессии генов путём сравнения белково-пептидных профилей личинок трутней разного возраста методом обращённо-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиенте ацетонитрила.

В результате исследований было установлено, что общая дегидрогеназная активность личинок трутней статистически достоверно не изменяется в зависимости от их возраста. Отсутствие изменения общей дегидрогеназной активности, вычисленной пропорционально общему количеству белка в гомогенате, по-видимому, свидетельствует об отсутствии каких-либо стрессовых воздействий на развивающийся организм пчелиной личинки. Общая дегидрогеназная активность, полученная из расчётов без учёта изменения содержания количества белка в гомогенате, демонстрирует медленный рост.

Что касается результатов по измерению каталазной активности можно сказать, что у личинок разного возраста наблюдается статистически достоверное изменение каталазной активности: в гомогенате личинок условной группы «3-е сутки» каталазная активность ниже, чем у личинок группы «5-е сутки», но выше, чем у личинок из группы «7-е сутки».

Результаты изменений в активности сукцинатдегидрогеназы, наблюдаемые в зависимости от возраста личинок, аналогичны характеру изменения активности каталазы, что подтверждает предположение о том, что с приближением фазы предкуколки, а затем куколки, у личинки уменьшается активность ферментативных систем, задействованных в окислительных процессах.

По проведенным исследованиям мы можем сделать следующие выводы:

На 4-5 сутки обнаружился максимум содержания белка в корме личинки. Это происходит потому, что они продолжают получать маточное молочко, богатое свободными аминокислотами, белками и регуляторными молекулами как пептидной, так и стероидной природы, что увеличивает активность основных ферментативных систем, участвующих в синтезе запасных питательных веществ, прежде всего липидов, для увеличения массы жирового тела. Направленность метаболизма личинки, получающей маточное молочко, на синтез липидов из аминокислот путём переаминирования и деградации образующихся продуктов до ацетил-КоА вместе с ускорением энергетического обмена, вызванного быстрым ростом личинки, несколькими актами линьки и стремительным увеличением массы тела повышает продукцию активных форм кислорода, что приводит к активации неспецифичной пероксисомальной системы антиоксидантной защиты, что выражается в повышении активности каталазы.

Так же, увеличение синтетической активности тканей личинки требует больших энергетических затрат, что выражается в увеличении активности ферментных систем, прежде всего цикла Кребса и митохондриальной цепи переноса электронов, с целью продукции АТФ и других макроэнергетических соединений на повышенном уровне, что и выражается в увеличении сукцинатдегидрогеназной активности, т. к. этот фермент играет ключевую роль не только в функционировании цикла трикарбоновых как катализирующий реакцию превращения янтарной кислоты в фумаровую, но и как комплекс II — компонент цепи переноса электронов, регулирующий её работу путём формирования пула убихинола и поддержания работы Q-цикла.

Анализ полученных данных позволяет сделать окончательный вывод что:

1. Разнообразие белков уменьшается к пятым суткам роста личинок, но приходит в норму к седьмым суткам, если делать вывод по количеству пиков на хроматограммах, что коррелирует с изменением каталазной и сукцинатдегидрогеназной активности у личинок взятых в эксперимент.

2. Наблюдается последовательность в увеличении относительного содержания неизвестного белка, характеризуемого пиками со временем удерживания у личинок всех исследовательских групп соответственно.

3. Концентрация белка уменьшается с увеличением возраста личинок и напрямую зависит от этого показателя.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чиркин А.А., Коваленко Е.И., Зайцев В.В. Антиоксидантное действие гомогената расплода пчел - *Веснік Віцебскага Дзяржаўнага Універсітэта* 2012, 2 (68) 24-28.
2. Чиркин А.А., Коваленко Е.И., Зайцев В.В. Антиоксидантное действие гомогената расплода пчел - *Апитерапия сегодня - материалы XVI Всероссийской научной конференции*. 2013, 24-28.
3. Шикова Ю.В., Лиходед В.А., Сахаутдинова И.В., Петрова В.В., Шиков Н.А., Баймурзина Ю.Л., Бахтиярова С.Б., Зарипов Р.А. Мазь с экстрактом прополиса, трутневым расплодом пчел, маточным молочком и экстрактом ламинарии для подготовки шейки матки к родам – патент на изобретение RU 2496507 C1 2013.
4. Ягич А.О., Лосев А.М. Жирные кислоты в гомогенате трутневых личинок - *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства* 2018, 21-1, 179-181.
5. Sawczuk R, Karpinska J, Milyk W. What do we need to know about drone brood homogenate and what is known - *J Ethnopharmacol*. 2019, 245.
6. Seres A.B., Ducza E., Báthori M., et al. Raw drone milk of honeybees elicits uterotrophic effect in rats: evidence for estrogenic activity – *J. Med. Food*. 2013, 16(5), 404-409.
7. Прохода И.А. Апиларвепродукты - нетрадиционные продукты пчеловодства личиночного происхождения с иммуномодулирующими свойствами - *Аграрная Россия* 2009, 5, 37-38.
8. Рассказова Н.Т., Пулинец Е.К. Влияние гомогената трутневых личинок на воспроизводительную способность норок - *Кролиководство и звероводство*, 2017, 3, 75-77.
9. Рязанова Е.А., Никифорова Л.В. Действие трутневого расплода на гормональный статус крыс в зависимости от функционального состояния

- щитовидной железы - Материалы всероссийской научной конференции с международным участием "Биология в высшей школе: актуальные вопросы науки, образования и междисциплинарной интеграции" Рязань 2019, 92-94.
10. Будникова Н.В. Биологически активные соединения в трутневом расплоде - Пчеловодство 2009, 6, 52-53. 6. Бурмистрова Л.А., Будникова Н.В., Митрофанов Д.В. Гормоны трутневого расплода медоносных пчел - Апитерапия сегодня - материалы XVII Всероссийской научной конференции. ФГБНУ «НИИ пчеловодства». 2014, 107-112.
 11. Василенко Ю.К., Климова О.В., Лазарян Д.С. Биологические свойства трутневого расплода в условиях длительной гиперлипидемии - Химико-фармацевтический журнал 2002, 36, 8, 34-36.
 12. Воробьева В.Е. Влияние кормовой добавки из личинок трутней на морфометрические показатели толстого отдела кишечника индеек - современные проблемы ветеринарной практики в АПК - Всероссийская научно-практическая Интернет-конференция практикующих специалистов. Ставрополь 2016, 67-68.
 13. Голощапова С.С. Микроциркуляторные эффекты биологической активности апипродукта из трутневого расплода в условиях повышенного двигательного режима (экспериментально-гистофизиологическое исследование) - автореферат диссертации Смоленск 2015.
 14. Голощапова С.С., Литвин Ф.Б. Влияние апипродукта, полученного из трутневого расплода, на морфометрические показатели поперечнополосатой мышечной ткани мышей - Научнометодический электронный журнал Концепт 2015, 13, 3586-3590.
 15. Гришина Ж.В., Генгин М.Т., Моисеева А.А. Перспективы применения апипрепаратов в ноотропной терапии спортсменов - Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова с международным участием – М., 2017, 2111-2112.

16. Демина Л.Л., Гордина Е.Н., Устюжанинова Л.В. Биохимический состав гомогената трутневого расплода - Общество. Наука. Инновации (НПК-2017) - Сборник статей. Всероссийская ежегодная научно-практическая конференция. Киров 2017, 35-39.
17. Ежова И.В., Касумова А.М., Ливчиков А.С., Беляков С.С. Влияние кормовой добавки на основе липидной фракции трутневого расплода на биохимические показатели и продуктивность цыплят бройлеров - Инновационные идеи молодых исследователей для АПК России - Сборник статей Международной научно-практической конференции молодых ученых. 2018, 43-45.
18. Фолч Г. Пчелы и их продукты в фармацевтике прошлого. XXVI Междунар. конгр. по пчеловодству Апимондии (Австралия, Аделаида). Бухарест: Апимондия, 1977. С. 43-45.
19. Смирнова В. В. Фактор здорового питания. Пчеловодство. 2007;(7):58-61.
20. Krell R. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. Fao agricultural services bulletin. 1996;(124):409.
21. Waring C., Jump D. R. Rafter Beekeeping in Cambodia with *Apis dorsata*. Bee World. 2004;85(1):14-18.
22. Crane E. Bee and beekeeping: Science, Practice and World Resources. Ithaca, NY, USA: Cornstock Publ., 1990.
23. Chen P. P., Wongsiri S., Jamyanya T., Rinderer T. E., Vongsamanode S., Matsuka M., Sylvester H. A., Oldroyd B. P. Honey bees and other edible insects used as Human food in Thailand. American Entomologist, 1998;44(1):24-29.
24. Смирнов А. М., Чернов К. С. Пчеловодство Японии. Обзор XXV Междунар. конгр. по пчеловодству Апимондии (Гренобль, Франция). Бухарест: Апимондия, 1975. С. 27.

25. Кенигер Н., Аберсфельдер Г. Новые аспекты выращивания расплода медоносных пчел. XXX Междунар. конгр. по пчеловодству Апимондии (Нагойя, Япония). Бухарест: Апимондия, 1985. С. 35-38.
26. Mai K., Bobbert T., Kullmann V., Andres J., Rochlitz H., Osterhoff M., Weickert M. O., Bähr V., Möhlig M., Pfeiffer A. F. H., Diederich S., Spranger J. Free Fatty Acids Increase Androgen Precursors in Vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(4):1501-1507.
27. Прохода И. А. Трутнёвые личинки в косметической промышленности. *Пчеловодство*. 2006;(1):56-57.
28. Лазарян Д. С., Сотникова Е. М. Определение содержания липидного фосфора и фосфолипидов в расплоде пчёл. *Химико-фармацевтический журнал*. 2005;39(12):32-34.
29. Herren P., Ambühl D., Grunder J. Preliminary results of survey on food safety aspects of drone brood from *Apis mellifera* L. *INSECTA 2019*, Potsdam, Germany, 5-6 September 2019. Winterthur: ZHAW Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften, 2019.123.
30. Herren P., Fieseler L., Ambuehl D., Grunder J. Foodborne bacteria in raw drone brood of *Apis mellifera* - a preliminary survey. *Journal of Insects as Food and Feed*. 2020. pp. 1-6.
31. Yücel B., Açıkgöz Z., Bayraktar H., Seremet C. The effects of apilarnil (drone bee larvae) administration on growth performance and secondary sex characteristics of male broilers. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2011;10(17):2263-2266.
32. Лизунова А. С., Рязанова Е. А., Бурмистрова Л. А. Влияние трутнёвого расплода на гормональную активность щитовидной и паращитовидных желёз. *Пчеловодство*. 2018;(6):56-58.
33. Василенко Ю. К., Климова О. В., Лазарян Д. С. Биологические свойства трутневого расплода в условиях длительной гиперлипидемии. *Химико-фармацевтический журнал*. 2002;36(8):34-36.

34. Шоинбаева К. Б., Бигара Т., Калдыбекова Г. М. Создание биологически активного препарата из биларпродуктов. Евразийский Союз Ученых. 2016;(6):93-94.
35. Jensen A. B., Evans J., Jonas-Levi A., Benjamin O., Martinez I., Dahle B., Roos N., Lecocq A., Foley K. Standard methods for *Apis mellifera* brood as human food Journal of Apicultural Research. 2019;58(2):1-28.
36. Stoevesandt J., Trautmann A. Freshly squeezed: anaphylaxis caused by drone larvae juice. European annals of allergy and clinical immunology. 2017;50(5):232-234. <https://doi.org/10.23822/eurannaci.1764-1489.43>
37. Илиешиу Н. В., Кравченко М. Применение драже Апиларнил и Апиларнилпроп в качестве натуральных тонических и трофических продуктов пчеловодства в терапевтических витализирующих целях. XXIX международный конгресс по пчеловодству. Бухарест: Апимондия, 1983. С. 394-398.
38. Елистратов Д. Г., Трифонов В. Н. Биологически активная добавка к пище: пат. № 2415610 (Российская Федерация). №. 2009145760/13: заявл. 09.12.2009; опубл. 10.04.2011. Бюл. № 10, 7 с.
39. Здоровьева Е.В. и др. Физиолого-биохимический статус свинок при включении в рацион кормления гомогената трутневого расплода. «Аграрная наука в инновационном развитии АПК», 26-28 ноября. 2018. - С. 95.
40. Sawczuk, R., Karpinska, J., & Miltyk, W. (2018). What do we know and what we would like to know about drone homogenate. Journal of Ethnopharmacology.
41. Лазарян Д. С. Сравнительное изучение аминокислотного состава расплода пчёл. Химико-фармацевтический журнал. 2002;36(12):42-44.
42. Моисеева А. А., Генгин М. Т., Гришина Ж. В. Нейростимулирующие свойства препарата пептидов, выделенных из личинок трутневого расплода. Поволжский регион. Естественные науки. 2015;(4 (12)):3-9.

43. Голощапова С.С. Микроциркуляторные эффекты биологической активности апипродукта из трутневого расплода в условиях повышенного двигательного режима (экспериментально-гистофизиологическое исследование) - автореферат диссертации Смоленск 2015.
44. Голощапова С.С., Литвин Ф.Б. Влияние апипродукта, полученного из трутневого расплода, на морфометрические показатели поперечнополосатой мышечной ткани мышей - Научнометодический электронный журнал Концепт 2015, 13, 3586-3590.
45. Гришина Ж.В., Генгин М.Т., Моисеева А.А. Перспективы применения апипрепаратов в ноотропной терапии спортсменов - Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова с международным участием – М., 2017, 2111-2112.
46. Демина Л.Л., Гордина Е.Н., Устюжанинова Л.В. Биохимический состав гомогената трутневого расплода - Общество. Наука. Инновации (НПК-2017) - Сборник статей. Всероссийская ежегодная научно-практическая конференция. Киров 2017, 35-39.
47. Ежова И.В., Касумова А.М., Ливчиков А.С., Беляков С.С. Влияние кормовой добавки на основе липидной фракции трутневого расплода на биохимические показатели и продуктивность цыплят бройлеров - Инновационные идеи молодых исследователей для АПК России - Сборник статей Международной научно-практической конференции молодых ученых. 2018, 43-45.
48. Фолч Г. Пчелы и их продукты в фармацевтике прошлого. XXVI Междунар. конгр. по пчеловодству Апимондии (Австралия, Аделаида). Бухарест: Апимондия, 1977. С. 43-45.
49. Смирнова В. В. Фактор здорового питания. Пчеловодство. 2007;(7):58-61.
50. Krell R. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. Fao agricultural services bulletin. 2006;(124):409.