М. А. ХАЧАТРЯН, Т. Г. АРУТЮНЯН, М. А. ДАВТЯН

УРЕОТЕЛИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА *BOMBYX MORI* L.

Изучались ферменты и субстраты цикла мочевинообразования в онтогенезе тутового шелкопряда. В процессе развития этого типичного урикотелического организма (грина, гусеница, кукла, бабочка) орнитинный цикл действует только у гусениц, что обусловлено особенностями развития этой стадии.

Хотя тутовый шелкопряд (*Bombyx mori* L) является урикотелическим организмом, в жировом теле его, как и многих насекомых, обнаружена аргиназа [12, 16, 17, 20, 21]. Имеются данные о наличии у гусениц тутового шелкопряда также ферментов, обеспечивающих биосинтез аргинина из цитруллина и аспартата [11, 13, 15]. В гемолимфе гусениц тутового шелкопряда выявлены орнитин, цитруллин, аргинин и мочевины [12, 17]. В предыдущих наших исследованиях [2, 7, 8] было показано, что жировое тело гусеницы тутового шелкопряда, помимо аргиназы, аргининосукцинатсинтетазы, аргининосукциназы и всех субстратов орнитинового цикла, содержит ферменты биосинтеза цитруллина (карбамилфосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамилазы). Таким образом, было доказано наличие орнитинового цикла на стадии гусеницы у тутового шелкопряда, хотя последний является урикотелическим организмом.

Полученные данные являются новым аргументом в пользу положения о первостепенном значении условий обитания организмов в механизме становления уреотелизма, допускающего возможность чередования или даже совместного существования различных типов экскреции азота в определенных условиях развития [4—6].

Развитие тутового шелкопряда как насекомого с полным превращением (яйцо, гусеница, куколка, бабочка) носит фазный характер. Следовательно, обменные процессы, в том числе и обмен белков, будут иметь различную направленность.

В представленной работе приводятся данные, полученные нами при изучении всех ферментных этапов орнитинового цикла мочевинообразования в онтогенезе этого насекомого, кроме ранее изученного этапа гусеницы.

Материал и методика. Объектом исследования служил тутовый шелкопряд породы АрС-43 весенней и осенней выкормки 1972—1974 гг. (Шелководческая станция Института земледелия МСХ АрмССР).

Гомогенизацию производили в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Эльведжема со стеклянным пестиком. Аргиназную активность определяли методом Ратнер [19],

путем инкубирования гомогенатов при 37°C в течение 90 мин в глициновом буфере (0,04М, рН 9,5) в присутствии L-аргинина (50 мкмоль) и $MnCl_2$ (5 мкмоль). Общий объем пробы составлял 5,1 мл. Количество образовавшейся мочевины определяли уреазным способом с последующим определением аммиака микродиффузионным методом Зеллингсона [22] в модификации Силаковой и сотр. [9].

Активность фермента выражали в мкмольях мочевины на 1 г свежей ткани.

Синтез цитруллина изучали в условиях, описанных Браунштейном и сотр. [3]. Гомогенат (20%), приготовленный в изотоническом растворе KCl, центрифугировали 10 мин при 9000 об/мин. Полученный осадок суспензировали в изотоническом растворе KCl и снова центрифугировали 10 мин. Промытый осадок суспензировали в изотоническом растворе KCl. 1 мл этой суспензии вносили в опытную пробу объемом в 3,5 мл, которая содержала: $NaHCO_3$ —30 мкмоль, $MgSO_4$ —35 мкмоль, NH_4Cl —25 мкмоль, L-орнитин—40 мкмоль, DL-глутаминовая кислота—120 мкмоль, АТФ—10 мкмоль, K-фосфатный буфер (рН 7,2)—1,3 мл, 0,017М—конечная концентрация и KCl—до изотонической концентрации среды. Инкубацию проводили при 37°C в атмосфере кислорода в течение 60 мин, после чего пробы фиксировали добавлением 2 мл 20-процентного раствора ТХУ, центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли цитруллин колориметрическим методом. Контрольные пробы инкубировали без добавления орнитина и глутаминовой кислоты.

Цитруллин определяли колориметрическим методом Арчибальда [10]. К 1 мл кислого экстракта (супернатанта) добавляли 2 мл кислотной смеси $H_2SO_4:H_3PO_4$ (1:3) и 0,25 мл 3-процентного водного раствора диацетилмонооксида, хорошо перемешивали и подогревали в темноте (45 мин). После охлаждения колориметрировали в течение последующих 20 мин при 490 мкм (ФЭК-56) против контроля на реактивы. Активность процесса биосинтеза цитруллина выражали в мкмольях образовавшегося цитруллина на 1 г свежей ткани. Вышеописанным методом одновременно определяли активность карбамилфосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамиллазы.

Аргининосукцинатсинтетазная и аргининосукциназная активности определяли методом Ратнер [18]. Гомогенаты, приготовленные на 0,05М калий-фосфатном буфере, инкубировали в присутствии L-аспартата—20 мкмоль, АТФ—10 мкмоль, $MgSO_4$ —5 мкмоль, янтарной кислоты—20 мкмоль и аргиназы—1 мг (20 ед.). Общий объем пробы составлял 3,8 мл. Инкубацию проводили при 37°C в течение 40 мин в атмосфере кислорода. Образовавшуюся мочевины определяли уреазным методом. Контрольную пробу инкубировали без добавления аминокислот. Активность ферментов выражали в мкмольях образовавшейся мочевины на 1 г свежей ткани.

Результаты и обсуждение. Первой стадией в онтогенезе тутового шелкопряда является грена. В развивающейся грене происходит оформление личинки, которое длится 9—11 дней.

Инкубацию грены проводили в термостате при 26°C. Активность ферментов определяли в гомогенатах грены I, III, VI, IX дня развития и у мурашей.

Данные табл. I свидетельствуют о том, что из ферментов орнитинового цикла в грене активностью обладают аргининосукцинатсинтетаза, аргининосукциназа и аргиназа, причем по мере развития грены возрастает активность указанных ферментов.

Отсутствие активности карбамилфосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамиллазы говорит о том, что она не связана с обезвреживанием аммиака.

Гусеничная стадия является единственной стадией в онтогенезе тутового шелкопряда, при которой организм питается и развивается за счет питательных веществ окружающей среды. В предыдущих наших

Таблица 1
Ферменты орнитинового цикла в развивающейся грене,
мкмоль мочевины на 1 г свежей ткани

Дни развития	Карбамилфосфат- синтетаза и орни- тинтранскарба- милаза		Аргининосукци- натсинтетаза и аргининосукциназа		Аргиназа	
I	—	—	7,30±2,150 (5)	—	12,87±0,568 (6)	—
До инкубации	—	—	—	—	—	—
III	—	—	6,10±1,622 (6)	—	21,38±0,751 (6)	—
VI	—	—	8,54±1,652 (6)	—	33,05±0,481 (6)	—
IX	—	—	10,73±0,832 (6)	—	35,94±0,008 (6)	—
Мураши	—	—	16,96±0,000 (4)	—	161,45±4,242 (6)	—

исследованиях [2, 7, 8] было показано, что жировое тело гусеницы тутового шелкопряда содержит все субстраты орнитинового цикла и все ферменты его обладают активностью (карбамилфосфатсинтетаза, орнитинтранскарбамилаза, аргининосукцинатсинтетаза, аргининосукциназа и аргиназа), которая, как и экскреция мочевины, постепенно возрастает по мере развития гусеницы. На основании полученных данных было сделано заключение, что на стадии гусеницы и особенно в процессе развития ее появляются и усиливаются признаки уреотелизма [7, 8].

Следующей стадией в онтогенезе тутового шелкопряда является стадия куколки, которая в отличие от гусеницы не обменивается с окружаю-

Таблица 2
Ферменты орнитинового цикла в развивающейся куколке,
мкмоль мочевины на 1 г свежей ткани

Дни развития	Карбамилфосфат- синтетаза и орни- тинтранскарбами- лаза		Аргининосукци- натсинтетаза и ар- гининосукциназа		Аргиназа	
	осенняя выкорм- ка, 1972 г.	весенняя выкорм- ка, 1973 г.	осенняя выкорм- ка, 1972 г.	весенняя выкорм- ка, 1973 г.	осенняя вы- кормка, 1972 г. (3 повтор- ности)	весенняя выкормка, 1973 г. (4 повтор- ности)
I день окукливания	—	—	—	—	38,83	79,20
III день окукливания	—	—	—	—	111,07	195,30
V день куколки	—	—	—	—	149,03	192,00
VII день куколки	—	—	—	—	318,70	215,10
IX	—	—	—	—	10,87	37,80
XI	—	—	—	—	21,23	40,50
XIII	—	—	—	—	41,83	54,45
XV	—	—	—	—	165,70	157,95
XVIII	—	—	—	—	126,23	102,15
Бабочки, I день	—	—	—	—	438,93	646,20

щей средой и по мере развития превращается в бабочку. Из ферментов орнитинового цикла, как показано в табл. 2, обнаружена лишь активность аргиназы. Наблюдаемые колебания в аргиназной активности в процессе окукливания, по-видимому, совпадают с перестройкой ткани гусеницы в ткань бабочек. Высокой аргиназой и слабой аргининосукцинат-синтетазной и аргининосукциназой активностью обладают бабочки. Высокая аргиназная активность на этой стадии онтогенеза насекомого, вероятно, обусловлена необходимостью превращения аргинина в орнитин для биосинтеза пролина, который является важным энергетическим субстратом для летательных мышц [20]. Возможность превращения аргинина в орнитин и далее в пролин у тутового шелкопряда показана в предыдущих работах нашей лаборатории [1].

Таким образом, в онтогенезе тутового шелкопряда орнитиновый цикл действует только у гусениц, что обусловлено, по-видимому, особенностями развития этой стадии, т. е. условиями обитания на поверхности листьев шелковицы с активным обменом между внешней средой и организмом, обеспечивающим его водой.

Итак, у тутового шелкопряда, типичного урикотелического организма, на определенном этапе развития появляются признаки уреотелизма.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и проблемная лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступило 12.V 1975 г.

Մ. Ն. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Տ. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ՈՒՐԵՈՒԹԵԼԻԿ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԸ ԹԹԵՆՈՒ ՇԵՐԱՄԻ
(*Bombyx mori* L.) ՕՆԹՈԳԵՆԵՏԻՎ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել են թթենու շերամի (*Bombyx mori* L.) օնթոգենեզում
ցիկլի բոլոր ֆերմենտները:

Հարգացող սաղմում հայտնաբերվել են արգինինոսուկցինատսինթետազա, արգինինոսուկցինազա և արգինազա, որոնց ակտիվությունը սաղմի զարգացմանը զուգընթաց բարձրանում է: Կարբամիլֆոսֆատսինթետազային և օրնիտինտրանսկարբամիլազային ակտիվության բացակայությունը վկայում է, որ վերը նշված ֆերմենտների ակտիվությունը կապված չէ ամոնիակի շեղոքացման հետ:

Մեր նախորդ հետազոտություններից պարզվել է, որ թթենու շերամի թրթուռների ճարպային մարմնիկը պարունակում է օրնիտինային ցիկլի բոլոր սուբստրատները և օժտված է այդ ցիկլի բոլոր ֆերմենտների արտահայտված ակտիվությամբ: Թրթուռի զարգացման ընթացքում աստիճանաբար բարձրանում է ֆերմենտների ակտիվությունը, ինչպես նաև միզանյութի արտազատումը: Հարսնյակավորման ընթացքում հայտնաբերվել է միայն արգինազային ակտիվություն, որի նկատվող տատանումները, հավանաբար, համ-

ընկնում են թրթուռի հյուսվածքները թիթևուի հյուսվածքների վերափոխման հետ: Թիթևուները օժտված են բարձր արգինազային ակտիվությամբ:

Այսպիսով, թիթևու շերամի օնթոգենեզում, որը տիպիկ ուրիկոթելիկ օրգանիզմ է, օրնիտինազին ցիկլը գործում է միայն թրթուռային էտապում, որը պայմանավորված է այդ էտապի զարգացման առանձնահատկություններով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ագաճանյան Ա. Խ., Դավթյան Մ. Ա. Биологический журнал Армении, 27, 5, 1974.
2. Արությունյան Դ. Գ., Ագաճանյան Ա. Խ., Անանյան Լ. Գ., Տեմերձյան Ա. Տ., Գեվորկյան Ա. Տ., Զարոբյան Դ. Կ., Խաչատրյան Մ. Ա. 3-й Всесоюзный биохим. съезд (тезисы), Рига, 1, 1974.
3. Браунштейн А. Б., Северина И. С., Бабская Ю. Е. Биохимия, 21, 738, 1956.
4. Դավթյան Մ. Ա. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 4, 237, 1968.
5. Դավթյան Մ. Ա., Բунатյան Գ. Խ., Գեվորկյան Դ. Մ., Բաբլոյան Բ. Տ., Սետրոսյան Լ. Ա. Второй Всесоюзный биохим. съезд (тезисы), Ташкент, секция № 7, 1969.
6. Դավթյան Մ. Ա., Բунатյան Գ. Խ., Գեվորկյան Դ. Մ., Սետրոսյան Լ. Ա. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 6, 15, 1970.
7. Կարապետյան Տ. Ա., Արությունյան Դ. Գ., Դավթյան Մ. Ա. Биологический журнал Армении, 26, 7, 1973.
8. Կարապետյան Տ. Ա., Արությունյան Դ. Գ., Դավթյան Մ. Ա. Биологический журнал Армении, 26, 12, 1973.
9. Силакова А. И., Труш Г. Н., Являкова А. Вопросы мед. химии, 8, 588, 1962.
10. Archibald R. M. J. Biol. Chem., 156, 121, 1944.
11. Davis C. R. F. J. Invest Physiol., 8, 377, 1962.
12. Garcia J. and Tixier M. C. R. Bull. Paris, 150, 632, 1956.
13. Hinton T. Arch. Biochem. Biophys., 62, 78, 1956.
14. House H. L. In Physiology of insecta, p. 769, Ed by Rockstein. M. New York, Acad. Press inc., 1956.
15. Inokuchi T., Horie J. and Ito T. Biochem and Biophys. Res., Commun, 35, 6, 1969.
16. Kilby B. A. and Neville E. J. Expt. Biol., 34 (2), 1957.
17. Lewenbook L. Insect biochemistry. A report on symposium VII. Proc. 4-th Intern. Congreas, Bioch., 12, 239, 1959.
18. Ratner S., Pappas A. J. Biol. Chem., 179, 1183, 1949.
19. Ratner S., Morell H. and Carvalho E. Arch. Biochem. Biophys., 91, 280, 1960.
20. Reddy S. R. and Campbell J. W. Biochem. J., 115, 495, 3, 1969.
22. Szarkowske L., Porembska Z. Acta Biochem. pol., 6, 273, 1959.
22. Selingson D. a. Selingson H. J. Lab. and Clin. Med. 38, 324, 1951.