

УДК 575.174.4: 577.152.1: 595.773.4.

Гандірук Н. Г., канд. біол. наук, доц., Полодієнко О. Б. канд. біол. наук, доц. Одеський державний університет, кафедра генетики та молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

РОЛЬ ГЕН-ЕНЗИМНОЇ СИСТЕМИ СУПЕР-ОКСИДДИСМУТАЗИ В АДАПТАЦІЇ ДРОЗОФІЛИ ДО ГІПЕРТЕРМІЇ

Вивчали стан ген-ензимної системи супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) (СОД) у генотипів дрозофіли, що відрізнялися між собою ступенем теплостійкості. Досліджуваних мух утримували протягом тридцяти поколінь в умовах дії підвищеної температури. З'ясовано, що в умовах жорсткої гіпертермії (41 °С протягом 15 хвилин) активність супероксиддисмутази у мух популяції *gle* не змінюється, однак переважно виживають особини, гетерозиготні по локусу *Sod*, які містять гібридну форму ферменту, що поєднує високу активність алозиму СОД-S з термостабільністю алозиму СОД-F. В умовах помірної гіпертермії (29 °С) активність ферменту в популяції мух мутантної лінії *e* підвищується. Це обумовлено добром особин з більш активною S-формою ферменту.

Ключові слова: супероксиддисмутаза, гіпертермія, дрозофіла.

Згідно з адаптивно-регуляторною теорією адаптація організму до несприятливих умов зовнішнього середовища обумовлена регуляцією метаболічних процесів, що підтримують гомеостаз [7]. Життєздатність та адаптивні можливості організму в значній мірі залежать від стану біооксидантної системи [1]. Серед біооксидантів, що регулюють інтенсивність вільно-радикальних реакцій, провідне місце належить супероксиддисмутазі (КФ 1.15.1.1) (СОД). Цей фермент підтримує певний рівень вільно-радикального окислення фосфоліпідів мембранних структур клітини, що є однією з найважливіших умов клітинного гомеостазу [3]. Роль ферменту підвищується за умови термічних впливів на організм, які супроводжуються підвищеною генерацією супероксидних радикалів кисню [4]. Можна припустити, що стійкість організму до підвищеної температури значною мірою залежить від алозимної належності та активності *Sod*. Метою даної роботи є вивчення стану ген-ензимної системи СОД за адаптації дрозофіли до гіпертермії.

Матеріали і методи дослідження

Для визначення стану ген-ензимної системи СОД за адаптації дрозофіли до гіпертермії використовували гібридів дрозофіли $N \times e$ та $N \times gle$, які відрізнялися ступенем теплостійкості. Досліджуваних мух утримували протягом тридцяти поколінь за різних температурних умов. Мух кожного гібриду в залежності від умов утримання розділяли на три групи. Одну групу мух з моменту закладки культивували при 25 °С (контроль); другу групу — при 29 °С (помірна гіпертермія); третю групу мух піддавали жорсткій гіпертермії шляхом витримування триденних імаго кожного з тридцяти поколінь при температурі 41 °С протягом 15 хвилин. Мух, що виживали, утримували при 25 °С.

Гібридні форми мух отримували шляхом схрещувань самок *Normal* з самцями *ebony* (*e*) або *glass ebony* (*gl e*). Серед нащадків F_1 відбирали гібридних самців з диким фенотипом і схрещували з самками з фенотипом *e* або *gl e*. В другому і наступних тридцяти поколіннях відбирали для подальших схрещувань гібридних самців з диким фенотипом і гомозиготних мутантних самок з фенотипом *e* або *gl e*.

В F_{30} кожної групи мух відбирали сегрегантів з фенотипами *e* чи *gl e* для їх розмноження і отримання експериментальних популяцій. Контрольні популяції мух *e* та *gl e* одержували шляхом розмноження сегрегантів F_{30} , яких отримували за культивування при температурі 25 °С. Піддослідні популяції мух *e* та *gl e* формували розмноженням сегрегантів, отриманих за культивування мух в умовах підвищених температур.

У мух контрольних та піддослідних популяцій *e* та *gl e* вивчали ступінь експресивності ген-ензимної системи СОД. Активність СОД визначали спектрофотометрично [9] в супернатантах, отриманих після центрифугування гомогенатів тканин дрозофіли при 5 тис. *g* протягом 10 хвилин. Поліморфізм СОД визначали методом електрофорезу в ПААГ [8].

Плодючість мух визначали як кількість лялечкових пупаріїв у потомстві однієї самки, що відкладала яйця протягом трьох діб. Теплостійкість визначали як виживання мух після дії на організм сублетальної ($Lt50$) для лінії *N* температури і виражали в процентах — відношенням числа мух, що вижили, до загального числа мух, взятих у дослід [6].

Експериментальна частина та аналіз результатів

Досліджувані гібриди мух $N \times e$ та $N \times gl e$ відрізнялися ступенем стійкості до жорсткої гіпертермії (41 °С, 15 хв.). Гібриди $N \times e$ виявилися значно чутливішими до цих умов, ніж гібриди $N \times gl e$. Якщо гібридних мух $N \times e$ після такої гіпертермії виживало лише 43%, то гібридів $N \times gl e$ — 69%. Тому ми зазначили гібрид $N \times e$ як теплочутливий, а гібрид $N \times gl e$ як теплостійкий.

Досліджувані гібриди дрозофіли відрізнялися також ступенем стійкості до тривалого впливу на них гіпертермії. Мухи теплочутливого гібриду $N \times e$ повністю гинули в третьому-п'ятому поколіннях за регулярної дії на триденних мух жорсткої гіпертермії. Якщо ж цей гібрид утримували протягом 30 поколінь в умовах помірної гіпертермії (культивування при 29 °С), то це призводило до добору особин з підвищеною теплостійкістю. В тридцятому поколінні стійкість гібридних мух до жорсткої гіпертермії зросла до 65% порівняно з 43% у гібридів першого покоління. Однак плодючість цих мух зменшилася на 16%.

Мухи теплостійкого гібриду $N \times gl e$ виявилися неплодючими за їх утримання при 29 °С. Тому їх утримували протягом 30 поколінь в умовах регулярної (в кожному поколінні) дії жорсткої гіпертермії. Утримання в цих умовах не призвело до підвищення їх теплостійкості, однак плодючість цих мух збільшилась на 20%.

Таким чином, мухи теплочутливого гібриду $N \times e$ пройшли тривалий добір в умовах помірної гіпертермії, а мухи теплостійкого гібриду $N \times gl e$ — в умовах жорсткої гіпертермії. Для вивчення ролі локуса *Sod* в адаптивних реакціях дрозофіли отримували популяції шляхом розмноження сегрегантів *e* та *gl e*, які виникали у тридцятому поколінні гібридів.

Контрольні популяції мух *e* та *gl e*, отримані за культивування відповідних сегрегантів при температурі 25 °С, відрізнялися між собою активністю СОД (табл. 1). У сегрегантів *e*, отриманих в F₃₀ теплочутливого гібриду *N × e*, активність СОД на 34% нижча, ніж у сегрегантів *gl e*, отриманих в F₃₀ теплостійкого гібриду *N × gl e*.

Таблиця 1
Активність СОД в експериментальних популяціях мух, в ум. од. / хв. × мг білка

Популяції мух \ Умови культивування	Контроль (25 °С)	Гіпертермія
<i>gl e</i>	5,82 ± 0,36	5,72 ± 0,52 P ₂ > 0,1
<i>e</i>	3,84 ± 0,28 P ₁ < 0,001	5,80 ± 0,42 P ₂ < 0,001

Примітка: P₁ — показник вірогідності відмінностей активності СОД між контрольними популяціями; P₂ — показник вірогідності відмінностей активності СОД між відповідними контрольними та дослідними популяціями.

Виявлено, що особливості активності СОД у дрозофіли, які формуються в результаті їх тривалого добору в умовах гіпертермії, залежать від генотипу мух, що проходили добір. Зокрема, утримування гібриду *N × gl e* в умовах жорсткої гіпертермії не призвело до достовірних змін активності СОД у їх сегрегантів порівняно з активністю ферменту у мух контрольної популяції. У мух піддослідної популяції *e*, отриманої після тридцяти поколінь добору в умовах помірної гіпертермії, активність СОД підвищилась в 1,5 рази порівняно з мухами контрольної популяції.

Однією з можливих причин, що забезпечують різний рівень активності СОД у мух зазначених популяцій, може бути молекулярний поліморфізм цього ферменту [6]. Ми вивчили ізоферментний спектр цитоплазматичної СОД у мух контрольних та піддослідних популяцій за допомогою електрофорезу в ПААГ (табл. 2).

Таблиця 2
Динаміка алельних частот *Sod* у популяціях дрозофіли за впливу на них гіпертермії

Популяції мух	Умови культивування	Частота класів, M ± m		
		<i>Sod^S</i>	<i>Sod^F</i>	<i>Sod^F/Sod^S</i>
<i>gl e</i>	Контроль	0,60±0,07	0,19±0,03	0,21±0,02
	Жорстка гіпертермія	0,19±0,02	0,16±0,01	0,65±0,06
<i>e</i>	Контроль	0,26±0,03	0,56±0,06	0,18±0,02
	Помірна гіпертермія	0,55±0,05	0,24±0,03	0,21±0,01

Відомо, що цитоплазматична СОД є димером [2], а тому її ізоферментний спектр складається з трьох молекулярних форм: двох гомополімерних і одної гібридної. Зазначені форми відрізняються між собою електрофоретичною рухливістю. F-форма цього ферменту є анодною швидкорухливою, S-форма — катодною повільнорухливою, а гібридна F/S-молекулярна форма має проміжну рухливість.

Отримані популяції мух є гетерогенними за алельним складом локуса *Sod*, і ці популяції відрізняються співвідношенням SS, FF та FS-генотипів. У контрольній популяції мух *gl e* переважають гомозиготні за S-алелем локуса *Sod* особини (60% від загальної кількості особин в популяції). Співвідношення гомозиготних за F-алелем локуса *Sod* та гетерозиготних F/S особин у цій популяції складає 1:1. Переважання в популяції особин, що містять у геномі S-алель локуса *Sod* (всього 104 з 128 досліджених) забезпечує високу активність ферменту, виявлену у цих мух. Відомо, що S-алель кодує більш активну S-форму ферменту [10]. Умови жорсткої гіпертермії призводять до переважного виживання гетерозиготних щодо локуса *Sod* особин. Їх чисельність у популяції *gl e* за 30 поколінь зростає з 20% до 65%. Збільшення в умовах жорсткої гіпертермії долі гетерозиготних особин у популяції *gl e* не призвело до достовірних змін активності ферменту, оскільки доля особин, що мають S-алель локуса *Sod*, як контрольної, так і піддослідної популяції складає більше 80% від загальної кількості особин. Переважний добір в екстремальних умовах (41 °С) гетерозиготних особин по локусу *Sod* свідчить, що пристосованість до жорсткої гіпертермії забезпечується наявністю в клітинах не лише активної S-форми СОД, але й її термостабільної F-форми.

У контрольній популяції мух *e* переважають особини з F-алелем локуса *Sod* (74%), який є більш розповсюдженим у природі [10]. Тривалий добір мух в умовах помірної гіпертермії призводить до підвищення частоти S-алеля у мух піддослідної популяції *e* до 76% порівняно з 44% цього алеля у мух контрольної популяції. Таке підвищення частоти S-алеля обумовлене переважним добром відповідних гомозигот. Оскільки S-форма СОД відрізняється високою каталітичною активністю, то саме добір на її користь обумовлює підвищення активності СОД у мух піддослідної популяції *e*. Одночасно добір мух, що містять S-форму ферменту, забезпечує підвищення їх теплостійкості.

Таким чином, отримані результати свідчать, що одним із генетичних механізмів пристосування популяцій до гіпертермії є добір певних алельних генів локуса *Sod* під контролем діючого чинника середовища. Утримування в умовах жорсткої гіпертермії теплостійких гібридів $N \times gl e$ призводить до виживання гетерозигот, які містять як високоактивну термочутливу S-форму, так і низькоактивну термостабільну F-форму супероксиддисмутази. Пристосованість до помірної гіпертермії у гібридів $N \times e$ формується шляхом добору особин, що містять активну S-форму ферменту.

Література

1. Воскресенский О. Н., Безуглый Ю. В., Бобырев В. Н. Антиоксидантная система, онтогенез и старение // Вопр. мед. химии. — 1982. — Т. 28, № 1. — С. 14—27.
2. Гандірук Н. Г., Тоцький В. М. Експресія генів *Sod* в онтогенезі дрозофіли // Вісник Одеського державного університету. — 1999. — Т. 4, вип. 3. — С. 31—35.
3. Гусев В. А., Брусов О. С., Панченко Л. Ф. Супероксидный радикал и супероксиддисмутаза в свободнорадикальной теории старения // Вопр. мед. химии. — 1980. — Т. 4. — С. 19—26.
4. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Геворкян Д. М. Ферментативные механизмы антирадикальной защиты клеток при экстремальных состояниях // Вестник АН СССР. — 1982. — № 9. — С. 15—19.
5. Страшнюк В. Ю., Воробьев Л. И., Шахбазов В. Г. Вклад гетерозиготности по хромосоме 2 и эффект гетерозиса у *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1985. — Т. 21, № 11. — С. 1828—1833.

6. Тоцкий В. Н., Хаустова Н. Д., Андриевский А. М., Гандирук Н. Г., Белова Г. И., Есеркепова Е. В. Экспрессивность ген-энзимных систем и показатели жизнеспособности в онтогенезе инбредных линий и гибридов дрозофилы // Генетика. — 1990. — Т. 26, № 10. — С. 1791—1799.
7. Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Наука, 1977. — С. 81—87.
8. Davis B. J. Disc electrophoresis /Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Science. — 1964. — V. 121. — P. 401—427.
9. Kakkar P., Viswanathan B. A modified spectrophotometry assay of superoxide dismutase // Indian J. Biochem and Biophys. — 1984. — V. 21, № 2. — P. 21.
10. Peng N., Moya J., Ayala F. Irradiation resistance conferred by superoxide dismutase: Possible adapter role of a natural polymorphism in *Drosophila melanogaster* // Department of Genetics University of California. — 1985. — P. 210—218.

Гандирук Н. Г., Полодиенко О. Б.

Одесский государственный университет, кафедра генетики
и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

РОЛЬ ГЕН-ЭНЗИМНОЙ СИСТЕМЫ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В АДАПТАЦИИ ДРОЗОФИЛЫ К ГИПЕРТЕРМИИ

Резюме

Изучали состояние ген-энзимной системы супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) (СОД) у особей искусственно полученных популяций дрозофилы, отличающихся теплоустойчивостью. Исследуемых мух содержали на протяжении тридцати поколений в условиях жесткой и перmissive гипертермии. Установлено, что в результате адаптации дрозофилы к жесткой гипертермии (41 °С на протяжении 15 минут) селективное преимущество имеют гетерозиготные по локусу *Sod* мухи, у которых высоко активный аллозим СОД-S сочетается с термостабильным аллозимом СОД-F. В условиях умеренной гипертермии (29 °С) происходит преимущественный отбор особей дрозофилы, гомозиготных по S-аллелю локуса *Sod*.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, гипертермия, дрозофила.

Gandiruk N. G., Polodienko O. V.

Odessa State University, Department of Genetics and Molecular Biology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

THE ROLE OF GENE-ENZYME SYSTEM OF SUPEROXIDEDISMUTASE IN ADAPTATION OF DROSOPHILA TO HYPERTHERMIA

Summary

The condition of gene-enzyme superoxidedismutase system (KF 1.15.1.1) (SOD) in species of artificially received populations of *Drosophila* characterized by heat resistance has been studied. The studied thirty generations of the fly were kept under the conditions of strong and permissive hyperthermia. It was found out that as a result of adaptation to strong hyperthermia (15 minutes at 41 degrees Centigrade) locus SOD heterozygous flies in which highly active allozyme SOD-S was combined with thermostable allozyme SOD-F revealed selective priority. Under the conditions of moderate hyperthermia (29 degrees Centigrade) preferential selection of *Drosophila* species homozygous in S-allele of SOD locus occurs.

Key words: superoxidedismutase, hyperthermia, *Drosophila*.