

УДК 577.152.31:591.3/.4/.8:595.773.4

**А. М. Андриевский**, канд. биол. наук, доц., **И. Л. Рыжко**, асп.,  
**В. А. Кучеров**, мл. науч. сотр., **Д. Б. Радионов**, зав. лаб.  
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,  
кафедра генетики и молекулярной биологии,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина, E-mail: kira\_ril@mail.ru

## ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ПРОЯВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ В ТКАНЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* В ОНТОГЕНЕЗЕ

Используя метод щелочного электрофореза, а также гистохимическую реакцию одновременного азосочетания с последующим компьютерным денситометрированием гелевых блоков, изучали влияние одноразовых добавок в питательную среду солей тяжёлых металлов на экспрессивность карбоксиэстераз дрозофилы на основных стадиях её развития. Показано, что хлориды Co, Cu, Zn и Cd в концентрации 0,02 мМ практически не вызывают изменений в системе карбоксиэстераз на фазах развития личинки, куколки или имаго. Хлорид Cd, в отличие от солей других металлов, в концентрации 0,08 мМ сильно угнетает экспрессию всех основных форм эстераз, особенно у личинок и куколок. У самцов имаго обнаружено активирующее действие ионов  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  на некоторые изоформы ферментов. Установлена летальная для личинок дрозофилы доза  $CdCl_2$ . Соли Co, Cu и Zn в высокой концентрации (0,20 мМ) не вызывают летального эффекта, однако существенно влияют на проявление активности различных форм карбоксиэстераз в течение всего периода развития дрозофилы.

**Ключевые слова:** соли тяжёлых металлов, карбоксиэстеразы, онтогенез, дрозофила.

Многочисленные данные литературы указывают на то, что ионные формы тяжёлых металлов в зависимости от концентрации их в окружающей среде могут выступать с одной стороны специфическими стимуляторами биохимических процессов, с другой — вызывать токсические эффекты, нарушая многие важнейшие функции организма, включая и его жизнеспособность [1–4].

Ионы металлов часто служат компонентами каталитически активных центров жизненно важных ферментов или являются активаторами этих ферментов. Они нередко участвуют в стабилизации и формировании третичной и четвертичной структур молекул белков (ферментов и металлопротеидов, у которых ферментативная активность не обнаружена) [5–8].

В небольших концентрациях тяжёлые металлы играют роль неконкурентных ингибиторов ферментов. В более высоких концентрациях они выступают как инактиваторы, т. е. действуют как денатурирующие агенты. Одной из особенностей токсических металлов является

то, что в отличие от органических ядов они не могут быть превращены в безвредные метаболиты. В результате они аккумулируются в клетках различных тканей, нарушая их биологические функции [9–11].

В данной работе мы преследовали цель изучить онтогенетические изменения в экспрессии карбоксиэстераз плодовой мухи, развивающейся на питательной среде с добавками солей тяжёлых металлов. В связи с этим предстояло решить следующие задачи: 1) установить действие *in vivo* одноразовых добавок  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  и  $\text{CdCl}_2$ , взятых в концентрациях 0,02 мМ, 0,08 мМ и 0,20 мМ, на ферменты карбоксиэстеразной системы дрозофилы. Выбор указанных концентраций обоснован экспериментально и связан с тем, что действие более низких доз солей не эффективно, тогда как более высокие дозы оказываются летальными [9]; 2) выявить различия в эффектах солей тяжёлых металлов в ходе постэмбрионального развития мухи.

### Материалы и методы исследования

Исходным экспериментальным материалом служила линия дикого типа *Drosophila melanogaster* Meig., содержащаяся в стационарных условиях при температуре 25 °С на стандартной питательной среде [12]. Хлориды Co, Cu, Zn и Cd ("х. ч.") добавляли в кормовую смесь в момент её горячего разлива в указанных концентрациях, предварительно растворяя соли в 1 мл дистиллированной воды. В контрольные варианты добавляли равные количества растворителя.

Для получения синхронного потомства по 50 одновозрастных самцов и самок из одной лабораторной популяции выдерживали на питательной среде, содержащей добавку соли, в течение 3 часов, после чего переводили на обычный корм. Потомство в контрольных группах получали по той же схеме.

Трёхсуточных личинок, куколок, а также самцов и самок имаго новообразовавшегося поколения отбирали по 5 экземпляров и использовали для приготовления экстрактов тканей. Имаго предварительно наркотизировали эфиром и разделяли на самцов и самок.

В качестве экстрагента использовали 0,1 М глицин-NaOH буфер pH 9,0, содержащий 1 % тритона X-100. Гомогенизацию опытного материала проводили в 10 мкл указанного буфера, после чего пробы центрифугировали 15 минут при 12 000 об./мин на холоде (4 °С).

Полученные экстракты подвергали электрофоретическому разделению в щелочных условиях (pH 8,3) в системе вертикально-пластинчатого полиакриламидного геля (размеры: 140 × 120 × 1 мм). Перед внесением 10 % в слоты 10 мкл образца смешивали с 5 мкл 0,1 % раствора бромфенолового синего, содержащего 60 % сахарозы. Электрофорез проводили при силе тока 20 мА в расчёте на один гелевый блок, после чего гели отмывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH, выдерживали 15 мин в фосфатном буфере pH 7,4 и инкубировали в среде того же буфера в присутствии субстратов  $\alpha$ -

и  $\beta$ -нафтилацетатов, взятых по 25 мг в расчёте на 50 мл инкубационной смеси. С целью выявления зон локализации карбоксиэстераз в геле гидролиз эфиров проводили в присутствии диазония синего прочного RR (50 мг на 50 мл смеси), вступающего с нафтоловыми продуктами в реакцию одновременного азосочетания, приводящую к образованию нерастворимого азокрасителя. После 30–60 минут инкубации при 25 °С гелевые блоки отмывали, сканировали и анализировали с помощью компьютерной денситометрии. Количественную оценку электрофореграмм проводили, используя специальную программу "АнаИС".

В работе использованы реактивы фирм "Reanal" (Венгрия), "Chemapol" (Чехия), а также установки для электрофореза "VE-4" и "VE-3" (Россия).

### **Результаты исследований и обсуждение**

Как видно из электрофореграммы, представленной на рис. 1 А, соли тяжёлых металлов, используемые в малой концентрации (0,02 мМ), практически не оказывают влияния на систему карбоксиэстераз личинок, куколок и имаго дрозофилы. Обращает на себя внимание чётко выраженный на имагинальной стадии развития мухи половой диморфизм, проявляющийся в экспрессии  $\beta$ -фильного фермента ( $R_f = 0,270$ ): постэлектрофоретическая выраженность этой карбоксиэстеразы у самцов примерно в 2 раза превосходит таковую у самок. К тому же, судя по таким общим показателям, как реальная плодовитость и жизнеспособность, по которым оценивалось состояние популяции, развивавшейся на фоне минимальной концентрации солей, опытные группы организмов мало отличались от контрольных.

Иным оказывается действие солей тяжёлых металлов, взятых в более высокой концентрации — 0,08 мМ (рис. 1 Б). Так, хлористый кадмий сильно угнетает  $\alpha$ - и  $\beta$ -фильные карбоксиэстеразы личинок и куколок и существенно подавляет экспрессию этих ферментов у самцов и самок имаго. В отличие от этого, соли Co, Cu и Zn как у куколок, так и у самцов имаго заметно стимулируют экспрессию  $\beta$ -фильной карбоксиэстеразы, в то же время слабо влияя на степень выраженности других изоформ.

Как активирующее ( $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ), так и угнетающее ( $Cd^{2+}$ ) действие катионов на стадиях куколки и имаго, очевидно, связано с их способностью накапливаться в тканях личинок в результате их интенсивного питания и проявлять эффект в более поздние периоды развития дрозофилы. Наряду с влиянием на систему карбоксиэстераз используемые соли металлов в умеренной концентрации заметно снижают плодовитость и жизнеспособность дрозофилы. Наибольшим токсическим эффектом обладает соль кадмия. Введенная в питательную среду в концентрации 0,20 мМ, она оказывается летальной для личинок раннего возраста. В то же время хлориды Co, Cu и Zn оказывают менее токсическое действие. Что касается карбоксиэстеразной системы, то на стадии куколки и имаго она оказывается более чувстви-

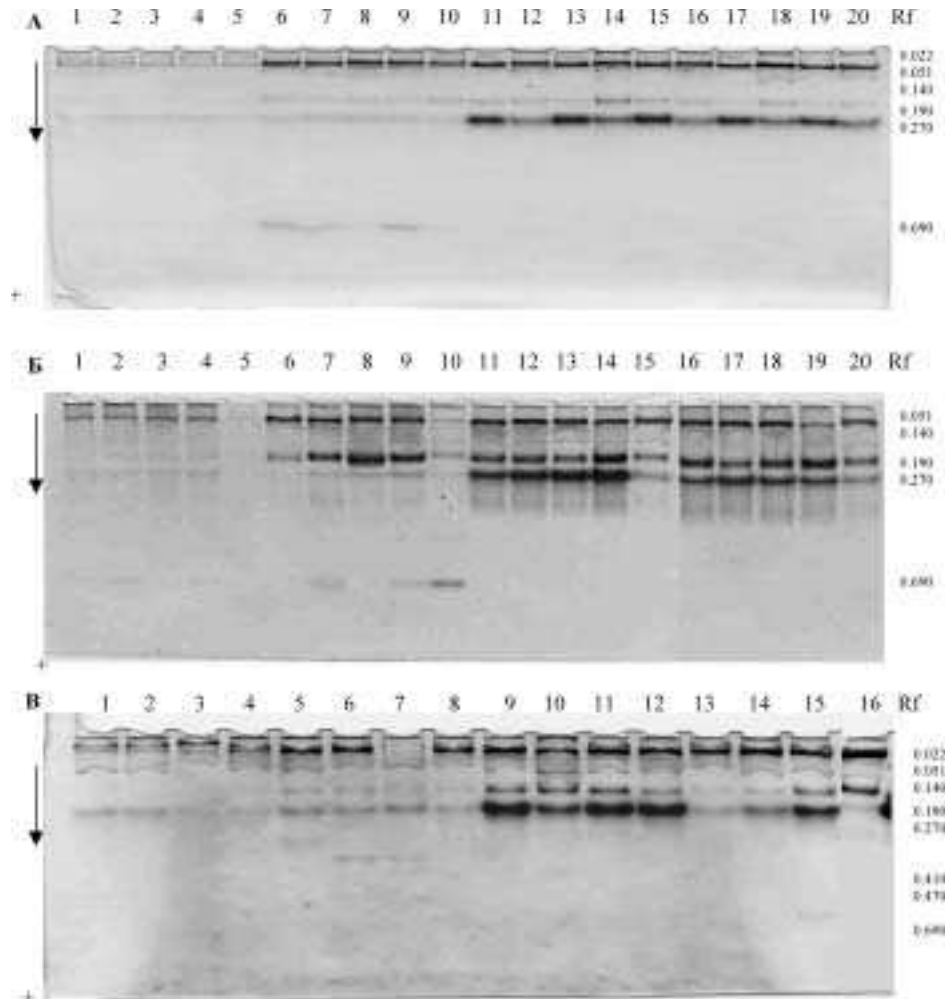


Рис. 1. Онтогенетические изменения в системе карбоксиэстераз дрозофил, развивавшихся на питательных средах с добавками солей тяжёлых металлов:

А — концентрация солей — 0,02 мМ. Инкубация 30 мин. Слоты: 1–5 — личинки (соответственно контроль,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ); 6–10 — куколки (соответственно контроль,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ); 11–20 — имаго (соответственно контроль ♂♂ – ♀♀,  $\text{CoCl}_2$  ♂♂ – ♀♀,  $\text{CuCl}_2$  ♂♂ – ♀♀,  $\text{ZnCl}_2$  ♂♂ – ♀♀,  $\text{CdCl}_2$  ♂♂ – ♀♀).

Б — концентрация солей — 0,08 мМ. Инкубация 60 мин. Слоты: 1–5 — личинки (соответственно контроль,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ); 6–10 — куколки (соответственно контроль,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ); 11–15 — имаго ♂♂ (соответственно контроль,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ); 16–20 — имаго ♀♀ (соответственно контроль,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ).

В — концентрация солей — 0,20 мМ. Инкубация 60 мин. Слоты 1–4 — личинки (соответственно контроль,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ); 5–8 — куколки (соответственно контроль,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ); 9–16 — имаго (соответственно контроль ♂♂ – ♀♀,  $\text{CoCl}_2$  ♂♂ – ♀♀,  $\text{CuCl}_2$  ♂♂ – ♀♀,  $\text{ZnCl}_2$  ♂♂ – ♀♀).

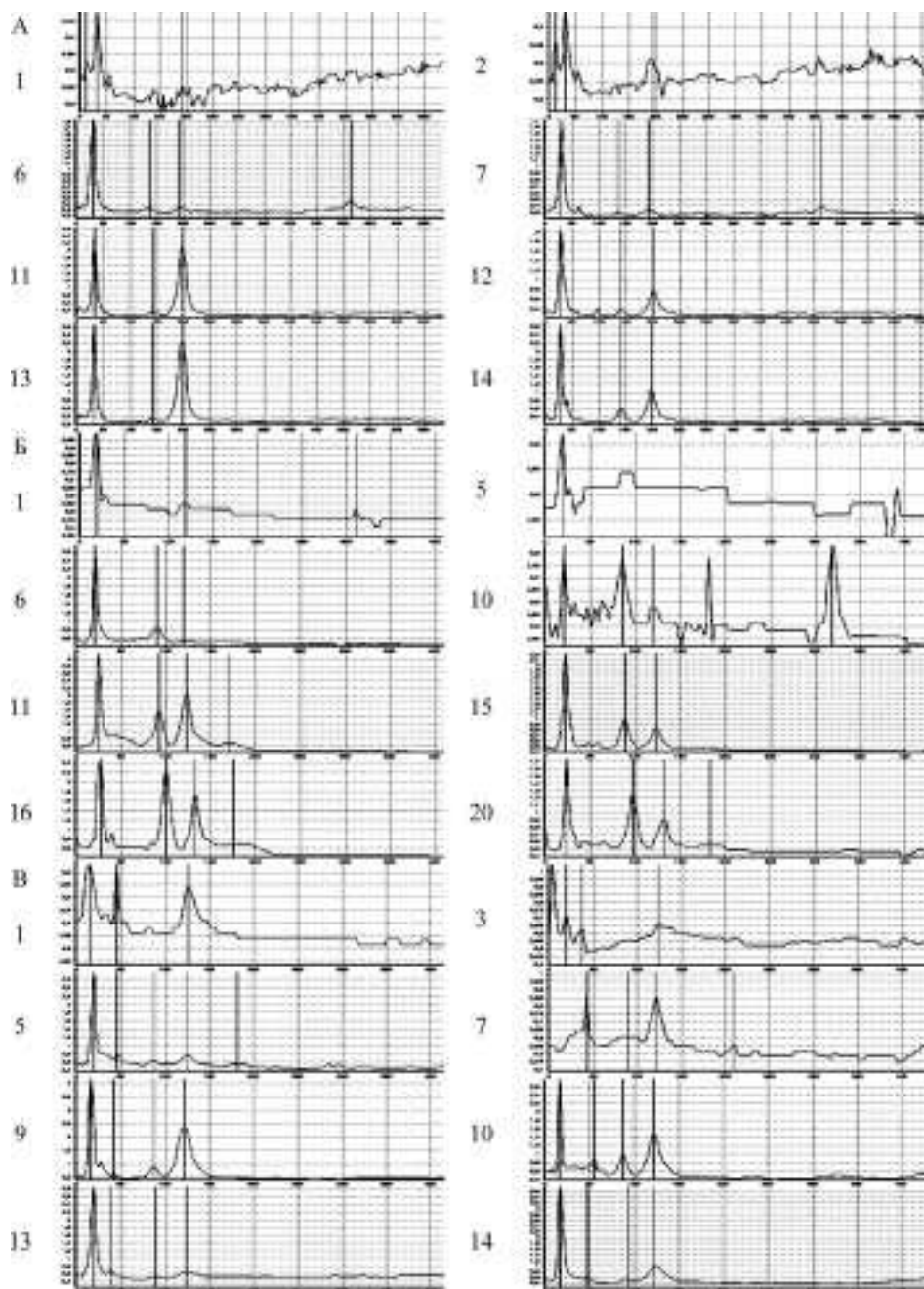


Рис. 2. Денситограммы отдельных треков гелевых блоков, представленных на рис. 1:

По оси  $x$  — длина трека (пиксели); по оси  $y$  — оптическая плотность фракций, соответствующих местам локализации карбоксиэстераз в геле (условные единицы).

тельной к высокой концентрации хлористой меди: в первом случае блокируется наименее подвижная ( $R_f = 0,051$ )  $\alpha$ -фильная карбоксиэстераза, во втором — быстроподвижная ( $R_f = 0,190$ )  $\alpha$ -эстераза и  $\beta$ -фильная ( $R_f = 0,270$ ) карбоксиэстераза (рис. 1 В). В целом развитие дрозофилы на питательной среде, содержащей высокие концентрации используемых солей, характеризуется низкой реальной плодовитостью и жизнеспособностью.

Количественная оценка экспрессивности изоформ карбоксиэстераз на стадиях постэмбрионального развития дрозофилы при действии солей тяжёлых металлов представлена на денситограммах наиболее показательных вариантов (рис. 2 А–В). В каждом конкретном случае по показателю оптической плотности соответствующей фракции карбоксиэстеразы можно судить о степени выраженности активности фермента в зависимости от условий развития экспериментального объекта.

### Выводы

1. Хлориды Co, Cu, Zn, Cd в малых концентрациях (0,02 мМ) в составе питательной среды не оказывают заметного влияния на ферменты карбоксиэстеразной системы в течение всего периода развития дрозофилы.
2. Умеренные количества (0,08 мМ) хлоридов Co, Cu и Zn оказывают стимулирующее действие на отдельные изоформы куколок и самцов имаго. CdCl<sub>2</sub> в той же концентрации проявляет ингибирующий эффект на экспрессию основных форм карбоксиэстераз независимо от фазы развития плодовой мухи.
3. Система карбоксиэстераз дрозофилы обладает неодинаковой чувствительностью к различным солям тяжёлых металлов, введенным в питательную среду в концентрации 0,20 мМ. Наименьшим токсическим действием обладает хлорид кобальта, наибольшим — хлорид меди; та же концентрация соли кадмия является летальной для личинок раннего возраста.

### Литература

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — М.: Мир, 1982. — Издание в 3-х томах. — Т. 1. — 389 с.
2. Лизосомы. Методы исследования / Под ред. Д. Дингла. — М.: Мир, 1980. — 342 с.
3. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и соавт. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
4. Тоцький В. М., Гандірук Н. Г., Ланцман І. В. Життєздатність і частота кросинговеру на ділянці b-сп хромосоми 2 у *Drosophila melanogaster* за вмісту солей важких металів у поживно-му середовищі // Вісник ОНУ. — 2003. — Т. 8. — Вип. 1. — С. 75–80.
5. Бигалиев А. Б. Генетический эффект солей тяжёлых металлов как загрязнителей окружающей среды // Успехи современной генетики. — 1982. — Вип. 10. — С. 104–114.
6. Тоцький 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. Тоцкий В. Н., Джан Зе Ук. Регуляция экспрессии ген-энзимных систем в онтогенезе дрозофилы при неблагоприятных условиях её развития и существования // Генетика развития растений и животных. Тез. докл. II Всесоюз. совещ. "Генетика развития". — Ташкент: 1990. — Т. 1, ч. 2. — С. 260–262.
8. Андриевский А. М., Катаненко С. В., Тоцкий В. Н. Онтогенетические особенности пептид-гидролазной активности экстрактов тканей *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. — 1982. — Т. 54, № 5. — С. 519–524.
9. Андриевський О. М., Рижко І. Л., Радіонов О. О. Фізіолого-біохімічні показники в онтогенезі дрозофіли за впливу солей металів // Вісник ОНУ. — 2003. — Т. 8. — Вип. 1. — С. 9–18.
10. Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле / Под ред. В. В. Хвостовой. — Новосибирск: Наука, 1977. — 278 с.
11. Ермолаев М. В., Ильичева Л. П. Биологическая химия. — М.: Медицина, 1989. — 320 с.
12. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1966. — 240 с.
13. Кроть М. Ю. Воздействие тяжёлых металлов на неспецифические эстеразы в опытах *in vitro* // Сб. науч. тр. / ВНИИ вет. сан., гигиенич. и экол. — 1996. — 100. — С. 61–64.

**О. М. Андриевський, І. Л. Рижко, В. О. Кучеров, Д. Б. Радіонов**

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,  
кафедра генетики та молекулярної біології,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна, E-mail: kira\_ril@mail.ru

### **ВПЛИВ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ПРОЯВ АКТИВНОСТІ КАРБОКСИЕС-ТЕРАЗ В ТКАНИНАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* В ОНТОГЕНЕЗІ**

#### **Резюме**

Використовуючи метод лужного електрофорезу, а також гістохімічну реакцію одночасного азосполучення з наступним комп'ютерним денситометруванням гелевих блоків, вивчали вплив одноразових домішок у живильне середовище солей важких металів на експресивність карбоксиестераз дрозофіли на основних стадіях її розвитку. Показано, що хлориди Co, Cu, Zn і Cd у концентрації 0,02 мМ практично не викликають змін у системі карбоксиестераз на фазах розвитку личинки, лялечки чи імаго. Хлорид Cd, на відміну від солей інших металів, у концентрації 0,08 мМ сильно пригнічує експресію всіх основних форм естераз, особливо личинок і лялечок. У самців імаго виявлено активуючу дію іонів Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> та Zn<sup>2+</sup> на деякі ізоформи ферментів. Установлено летальну для личинок дрозофіли дозу CdCl<sub>2</sub>. Солі Co, Cu та Zn у високій концентрації (0,20 мМ) не викликають летального ефекту, однак істотно впливають на прояв активності різними формами карбоксиестераз протягом усього періоду розвитку дрозофіли.

**Ключові слова:** солі важких металів, карбоксиестерази, онтогенез, дрозофіла.

**A. M. Andrievsky, I. L. Ryzhko, V. A. Koocherov, D. B. Radionov**

Odessa National I. I. Mechnikov University,

Department of Genetics and Molecular Biology,

Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine, E-mail: kira\_ril@mail.ru

**INFLUENCE OF THE HEAVY METALS SALTS ON DISPLAY OF  
*DROSOPHILA MELANOGASTER* CARBOXYESTERASES ACTIVITY  
IN THE TISSUES IN ONTOGENESIS**

**Summary**

Using a method of alkaline electrophoresis, and also the histochemical reaction of simultaneous azo combination with the subsequent computer densitometry of the gel blocks, influence of disposable additives of the heavy metals salts in a nutrient medium on drosophila carboxyesterases expression at the basic stages of its development has been studied. There were established, that chlorides Co, Cu, Zn and Cd in concentration of 0,02 mM practically do not cause changes in carboxyesterases system on the phases of larvae, chrysalices or imago development. Chloride Cd, as against salts of other metals, in 0,08 mM concentration strongly oppresses expression of all the basic forms of esterase, especially at larvae and chrysalices. Activating action on some enzymes izoforms of  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions at imago male has been revealed. The lethal doze of  $\text{CdCl}_2$  for drosophila larvae has been established. The salts of Co, Cu and Zn in the high concentration (0,20 mM) do not cause the lethal effect, however the essentially influence on the display of activity by various forms of carboxyesterase during the period of drosophila development.

**Keywords:** salts of heavy metals, carboxyesterase, ontogenesis, drosophila.