

УДК 575.1744: 577. 152: 595

Н. Г. Гандірук, канд. біол. наук, доц.,
В. М. Тоцький, д-р біол. наук, проф., зав. каф.
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра генетики та молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ГЕН-ЕНЗИМНІ СИСТЕМИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ (СОД) ТА КАТАЛАЗИ І ПРИСТОСОВАНІСТЬ РІЗНИХ ЛІНІЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Вивчали стан ген-ензимних систем каталази (КФ. 1.11.1.6) і супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) (СОД) у генотипів дрозофіли, що відрізнялися між собою компонентами пристосованості (плодючістю, тривалістю життя тощо). З'ясовано, що більш висока експресивність ген-ензимних систем каталази і СОД властива краще пристосованим генотипам, а також — що лінійні відмінності активності ферментів обумовлені поліморфізмом їх електрофоретичних спектрів.

Ключові слова: генетичний поліморфізм, ген-ензимні системи, каталаза, супероксиддисмутаза, дрозофіла, пристосованість.

Процеси вільнорадикального окиснення, що вийшли з-під контролю антиоксидантного захисту, є однією з найважливіших проблем низької пристосованості організмів до умов довкілля [1, 2], передчасного старіння організмів [3] та багаточисельних захворювань [4, 5]. Антиоксидантна система запобігає накопиченню вільних радикалів, а тому обумовлює захист організмів від їх ушкоджуючої дії [6]. Стан антиоксидантної системи, важливими компонентами якої є СОД та каталаза, може свідчити про рівень життєздатності та пристосованості організмів [7].

Враховуючи вищезазначене, метою даного дослідження було вивчення залежності показників пристосованості дрозофіли від стану ген-ензимних систем каталази та СОД.

Матеріали і методи дослідження

Для вивчення активності та структурного поліморфізму ген-ензимних систем каталази та СОД використовували мух дикого типу Canton-S і мутантних ліній з високою (cinnabar) та низькою (vestigial) пристосованістю. Активність каталази вивчали колориметрично [8], а загальної СОД — спектрофотометрично [9] в супернатантах, отриманих після центрифугування гомогенатів тканин дрозофіли за 5 тис. g протягом 10 хвилин. Ідентифікацію множинних молекулярних форм каталази провадили за допомогою електрофорезу в ПААГ [10], активність різних ізоформ каталази оцінювали по інтен-

сивності розщеплення перекису водню в присутності фериціаніду калію та хлорного заліза, а СОД — за допомогою нітротетразолієвого синього [11]. Термостабільність каталази визначали шляхом інкубації гомогенату мух досліджуваних ліній при температурі 57 °С. Через 5, 10, 15, 20 і 30 хвилин відбирали проби для визначення залишкової активності ферменту.

Плодючість мух визначали як кількість лялечкових пупаріїв у потомстві однієї самки, яка відклала яйця протягом трьох діб. Для визначення тривалості життя мух утримували на поживному середовищі по 20 особин кожної статті. Підрахунок живих мух провадили щоденно, зміну корму здійснювали на 3-ю добу. Тривалість життя виражали кількістю днів, протягом яких відбувалася загибель 50 % мух (Lt50) [1].

Результати дослідження та їх аналіз

Дослідами виявлено значні генотипові особливості активності каталази та СОД в залежності від життєздатності досліджуваних генотипів (табл. 1). Характерним для всіх досліджуваних генотипів є одні й ті ж закономірності диференційної активності ген-ензимних систем каталази і СОД в процесі онтогенетичного розвитку.

Зокрема, в залежності від генотипу у мух чотиридобового віку активність каталази підвищується у 2,5–3,4 рази, а СОД — у 1,3–1,8 рази порівняно з мухами першої доби життя.

Максимальна активність каталази та СОД притаманна статевозрілим мухам у період з четвертої до дванадцятої діб життя, що свідчить про важливу роль цих ферментів на імагінальній стадії розвитку мух. Слід зазначити, що в період статевої зрілості мух активність обох досліджуваних ферментів значно вища у самок, ніж у самців. Отримані результати узгоджуються з даними літератури [11], згідно з якими в тканинах імаго активність каталази за їх старіння знижується.

В попередній роботі [12] було показано, що онтогенетичні особливості активності СОД обумовлені наявністю у клітинах ізоформ ферменту та різною їх активністю на різних етапах розвитку. Зокрема, підвищення загальної активності СОД на стадії імаго здійснюється переважно за рахунок малорухливої мітохондріальної форми ферменту ($R_f = 0,17$), яка появляється в цей період розвитку. За допомогою електрофоретичного розподілу множинних молекулярних форм каталази показано, що статевозрілі мухи мають підвищену активність малорухливої форми ферменту ($R_f = 0,25$).

Однак, у різних ліній мух рівень підвищення активності вищезначених ферментів на стадії імаго та тривалість цієї високої активності протягом життя мух суттєво відрізняються. У мух лінії *sp*, яким властиві високі показники тривалості життя та плодючості (табл. 1), активності СОД і каталази у чотиридобових особин на 23% і 10% відповідно вищі, ніж у мух *C-S*. У мух лінії *vg*, які мають низьку життєздатність (табл. 1), активності СОД і каталази на тому

ж етапі онтогенезу на 33% і 29% нижчі порівняно з тим же контролем (лінія С-S).

Таблиця 1

Активність каталази і СОД у різних ліній дрозофіли

Лінії мух	Тривалість життя (Lt_{50} , дні)	Плодючість (число нащадків від однієї самки за три дні)	Активність ферментів		
			Вік мух (дні)	Каталаза (мкмоль H_2O_2 /сек х мг тканини)	СОД (ум. од/хв х мг білка)
С - S	15,9 ± 2,1	50,0 ± 7,0	1	11,7 ± 1,4	2,08 ± 0,20
			4	39,9 ± 3,5	3,24 ± 0,32
			8	31,2 ± 3,1	3,10 ± 0,30
			12	29,7 ± 2,6	2,98 ± 0,30
			16	27,6 ± 2,5	2,61 ± 0,27
			20	18,6 ± 1,3	2,26 ± 0,12
сп	18,8 ± 1,9	67,0 ± 9,0	1	18,8 ± 1,4	2,10 ± 0,22
			4	47,2 ± 3,0	3,98 ± 0,30
			8	39,3 ± 2,9	3,62 ± 0,31
			12	35,1 ± 2,8	3,20 ± 0,28
			16	31,8 ± 2,6	3,00 ± 0,28
			20	18,3 ± 1,6	2,84 ± 0,20
vg	7,3 ± 0,8	36,0 ± 4,0	1	8,3 ± 1,0	1,62 ± 0,18
			4	28,2 ± 2,5	2,10 ± 0,19
			8	21,6 ± 2,2	2,00 ± 0,20
			12	10,8 ± 1,4	2,00 ± 0,16
			16	12,6 ± 1,7	1,89 ± 0,15
			20	8,7 ± 1,3	1,75 ± 0,14

Генотипові відмінності активності ферментів обумовлені їх поліморфізмом і різною активністю окремих ізоформ у різних генотипів. Зокрема, у мух лінії сп висока активність каталази зумовлена середньорухливою формою ферменту ($R_f = 0,55$), а у мух лінії vg ця форма ферменту відсутня. Притаманна цим мухам малорухлива форма ферменту ($R_f = 0,25$) є термолабільною.

Інкубація гомогенату мух лінії vg при температурі 57 °С протягом п'яти хвилин призводить до втрати 61% активності каталази, а у мух дикого типу активність каталази за цих же умов знижується лише на 7,7 % (табл. 2).

За даними літератури [13], мухи лінії vg, у яких виявлена термолабільна каталаза, мають на 28% нижчу виживаність в умовах жорсткої гіпертермії (41 °С, 15 хв.), ніж мухи дикого типу.

Таблиця 2

Генотипові особливості термостабільності каталази у дрозофіли

Час інкубації	Залишкова активність каталази після прогрівання гомогенатів при 57 °С					
	C-S		sp		vg	
	мкмоль H ₂ O ₂ /сек х мг тканини	% зменшення активності	мкмоль H ₂ O ₂ /сек х мг тканини	% зменшення активності	мкмоль H ₂ O ₂ /сек х мг тканини	% зменшення активності
Контроль	31,2 ± 2,7	-	39,3 ± 3,1	-	21,6 ± 1,8	-
5	28,8 ± 2,7	7,7	35,4 ± 3,3	9,9	8,2 ± 0,6*	61,0
10	24,1 ± 1,9*	22,8	16,7 ± 2,0*	57,5	-	-
15	18,0 ± 2,1*	42,3	16,1 ± 1,7*	59,3	-	-
20	16,0 ± 1,4*	50,2	12,7 ± 1,1*	67,7	-	-
30	5,0 ± 0,5*	84,4	-	-	-	-

* — зниження активності каталази достовірне
— не визначається

Таким чином, існує пряма залежність між експресивністю досліджуваних ген-ензимних систем та ступенем пристосованості різних генотипів дрозофіли, визначених за такими показниками як тривалість життя, плодючість та термостабільність особин. Отримані дані щодо кореляції експресивності функціонально пов'язаних ферментів антиоксидантного захисту (СОД і каталази) свідчать на користь формування адаптаційного комплексу генів [1, 14] та оптимального генного балансу [15] як шляхом взаємодії певних алелей структурних генів, так і, можливо, шляхом модифікації їх продуктів.

Висновки

1. Досліджувані генотипи дрозофіли за рівнем активності каталази та СОД можна розташувати у такій послідовності: sp > C-S > vg.
2. Добре пристосованим за ознаками тривалості життя, плодючості та термостабільності генотипам дрозофіли притаманні високі активності каталази та СОД.
3. Генотипові відмінності щодо активності досліджуваних ферментів обумовлені молекулярним поліморфізмом останніх.
4. Неоднакова чутливість каталази у різних ліній дрозофіли до високої температури обумовлена наявністю у них різних ізоформ цього ферменту.

Література

1. Тоцкий В. М., 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, № 2. — С. 1791–1799.
2. Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Наука, 1977. — С. 81–87.
3. Гуськов Р. А., Виленчик М. М., Кольтовер В. К. Роль свободных супероксидных радикалов в старении биологических объектов // Биофизика. — 1980. — Т. 25, 31. — С. 14–27.
5. Болдырев А. А., Куклей М. Л. Свободные радикалы в нормальном и ишемическом мозге // Нейрохимия. — 1996. — Т. 13. — С. 25–29.
6. Арбузова С. Б. Свободные радикалы в возникновении и клиническом проявлении синдрома Дауна // Цитология и генетика. — 1996. — Т. 30, № 2. — С. 65–70.
7. Воскресенский О. Н., Жутаев И. А., Богатырёв В. Н., Безуглый Ю. В. Антиоксидантная система, онтогенез и старение // Вопросы медицинской химии. — 1982. — Т. 28, № 1. — С. 14–27.
8. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И. Ферментативные механизмы антирадикальной защиты клеток при экстремальных состояниях // Вестник АН СССР. — 1982. — № 9. — С. 15–19.
9. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. — 1988. — 3. — С. 16–19.
10. Karkar P., Viswanathan B. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase // Indian J. Biochem. and Biophys. — 1984. — V. 21, № 2. — P. 130.
11. Davis B. J. Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Science. — 1964. — V. 121. — P. 401–427.
12. Корочкин Л. И., Серов О. А. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — С. 62–64.
13. Гандирук Н. Г., Тоцкий В. М. Экспрессия генов SOD в онтогенезе дрозофилы // Вісник ОДУ. — 1999. — Т. 4, вип. 3. — С. 31–34.
14. Алишбали Насер Мухамед, Хаустова Н. Д., Тоцкий В. Н. Приспособленность линий *Drosophila melanogaster*, мутантных по генам b, cn, vg // Вісник ОНУ. — 2002. — Т. 7, вип. 1. — С. 63–69.
15. Гандирук Н. Г., Полодієнко О. Б. Роль ген-ензимної системи супероксиддисмутази в адаптації дрозофіли до гіпертермії // Вісник ОДУ. — 2000. — Т. 5, вип. 1. — С. 86–90.
16. Тоцкий В. Н., Хаустова Н. Д., Гандирук Н. Г. Генный баланс и адаптация природных и искусственно созданных генотипов *Drosophila melanogaster* // Труды по фундаментальной и прикладной генетике. — Харьков: Штрих, 2001. — С. 140–151

Н. Г. Гандирук, В. М. Тоцкий

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ГЕН-ЭНЗИМНЫЕ СИСТЕМЫ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ (СОД) И КАТАЛАЗЫ И ПРИСПОСОБЛЕННОСТЬ РАЗНЫХ ЛИНИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Резюме

Изучали состояние ген-энзимных систем каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) у генотипов дрозофилы, отличающихся между собой жизнеспособностью. Установлено, что чем выше экспрессивность ген-энзимных систем СОД и каталазы, тем лучше приспособленность генотипов дрозофилы, которую оценивали по показателям продолжительности жизни, плодовитости и теплоустойчивости особей. Пока-

зано, что межлинейные различия активности исследуемых ферментов обусловлены их генетическим и биохимическим полиморфизмом.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, ген-энзимные системы, каталаза, супероксиддисмутаза, дрозофила, приспособленность.

Gandiruk N. G., Totskiy V. N.

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

**GENE-ENZYME SYSTEMS OF SUPEROXIDEDISMUTASE AND
KATALASE IN ADAPTATION OF *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Summary

The condition of gene-enzyme systems katalase (KF 1. 11. 1. 6) and superoxidedismutase (KF 1. 15. 1. 1) (SOD) in the genotypes of *Drosophila* shows, that they differ from each other by their degree of viability. It has been elucidated that the higher gene-enzymes expressivity of katalase and SOD systems coincides the better adaptation of genotypes *Drosophila*, that was appreciated by the significance of viable indicator, prothetic's and personal termostability. It has been discovered, that genotype peculiarity of enzyme activity was determined by their genetic and biochemical polymorphism.

Keywords: genetic polymorphism, gene-enzyme system, catalase, superoxidedismutase, *Drosophila* adaptation.