

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИН СЛИННИХ ЗАЛОЗ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ПІД ВПЛИВОМ МОНОТЕРПЕНІВ

**Т. Г. Алексєєва¹, С. В. Білоконь¹, М. В. Нестеркіна²,
І. А. Кравченко², Т. О. Черкасова¹**

¹ - Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса, Україна

² - Державний університет «Одеська політехніка», Одеса, Україна

t.aleksieieva@onu.edu.ua; s.v.belokon@onu.edu.ua

Вступ

Стурбованість станом навколишнього середовища обмежує використання традиційних пестицидів та інших речовин, призначених для контролю за шкідниками. Пошук більш безпечних для людини та середовища і, водночас, ефективних сполук привернув увагу до монотерпеноїдів та їх похідних. Для речовин монотерпенової природи показано цілий спектр ефектів, серед яких є антимікробні, антиоксидантні, протизапальні, інсектицидні та репелентні властивості (Acamovic et al., 2005; Christaki et al., 2012; Zeng et al, 2015; Islam, 2017; Jioti et al., 2019 та ін.). Незважаючи на численні роботи і висунуті гіпотези, механізм дії монотерпенів у якості природних інсектицидів та їх вплив на фізіологію, онтогенез комах та функціонування генетичного апарату їх клітин ще не є остаточно визначеним, що і зумовлює інтерес до проведення досліджень на такому модельному об'єкті як *D. melanogaster*.

Метою даного дослідження було визначення структури та функціонування політенних хромосом клітин слинних залоз *D. melanogaster* під впливом речовин монотерпенової природи.

Об'єкти та методи дослідження

Як об'єкти дослідження використовували моноциклічні терпеноїди, що містять у своїй структурі функціональні групи різної природи: гідроксигрупу (карвакрол та тимол) та карбонільну групу (карвон). Згідно з даними літератури, вказані речовини мають доведені антимікробні та знеболювальні властивості (Park et al., 2008; De Sousa et al., 2011). Окрім того, встановлено вплив положення гідроксильної групи на прояв антибактеріальної активності ізомерних терпеноїдів карвакролу та тимолу (Kachur et al., 2020).

Для досліджень була обрана лінія мух дикого типу C-S, яка широко використовується для з'ясування біологічної активності, мутагенності та токсичності різних речовин (Wurgler et al, 1986; Chyb, Gompel, 2013).

Личинки від трьох батьківських пар розвивалися на стандартному цукрово-дріжджовому живильному середовищі (10 мл) за температури $24,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ у стаканчиках об'ємом 60 мл. Монотерпени додавали до поживного середовища до кінцевої концентрації у 0,02%. Враховуючи погану розчинність досліджуваних монотерпенів у воді, для утворення істинного розчину вказаних сполук використовували як розчинник 1,2-пропіленгліколь; у якості негативного контролю використовували чисте живильне середовище, у якості позитивного – середовище з додаванням відповідної кількості 1,2-пропіленгліколю.

При проведенні цитогенетичних досліджень визначали середню кількість клітин у слинних залозах личинок дрозофіли третього віку, а також ступінь політенії хромосом у цих клітинах. Оцінку сили впливу досліджуваного фактора – речовин монотерпенової природи здійснювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу. Визначали відсоткове співвідношення ядер з різним ступенем політенії, а також середні показники ступеня для кожного дослідного і контрольного варіанту (Страшнюк та ін., 2019). Отримані дані про ступінь політенії хромосом у контролі та за додавання досліджуваних речовин зводили у ряди розподілів ознак. Вірогідність відмінностей рядів розподілів порівнювали за допомогою критерію Пірсона (Атраментова, Утевська 2008). При визначенні середнього показника політенії для доведення статистично вірогідних відмінностей використовували критерій Крамера-Уелча (Орлов, 2004). Відсоток асинапсису для хромосом з порушенням кон'югації розраховували по відношенню кількості хромосом з порушенням кон'югації до кількості досліджених ядер на препарат (Тагліна, 2006). Експерименти проводили у трьох серіях, для кожного варіанту досліду і контролю кожної серії досліджували слинні залози не менш ніж 10 личинок жіночої статі.

Результати та обговорення

Морфологічні характеристики слинних залоз личинок дослідних і контрольних варіантів виявилися досить варіативними, показано наявність як міжваріантної, так і внутрішньоваріантної мінливості. Оцінку стану слинної залози проводили за середньою кількістю клітин на залозу, який визначали, підраховуючи кількість ядер на давлених ацетоорсеїнових препаратах. Найвищу кількість клітин у залозі виявили у личинок

контрольного варіанту (124,45), а найменшу – 92,09 – у личинок, вирощених на середовищі з додаванням 1,2-пропіленгліколю (різниця між середніми значеннями для варіантів складала 32,35 при $HP_{05} = 18,44$). З даних літератури відомо про малотоксичність 1,2-пропіленгліколю (Дымент и др., 1978), який широко використовується у фармацевтичній промисловості у якості допоміжної речовини; тим не менш, у наших дослідах виявлений значний негативний вплив цього реагенту на інтенсивність поділу клітин, і, відповідно, на їх загальну кількість у слинній залозі. Серед дослідних варіантів лише вирощені на середовищі з додаванням карвону личинки мали вірогідно меншу середню кількість клітин на залозу (104,64) у порівнянні з контрольним варіантом. Додавання карвакролу (113,77) і тимолу (116,29) у середовище не позначилося суттєво на розвитку досліджуваних органів личинок дрозофіли, кількість клітин у залозі у цих варіантах наближалася до контролю і мала вірогідні відмінності від показника личинок, вирощених на середовищі з чистим розчинником – 1,2-пропіленгліколем. Таким чином, можна резюмувати, що вплив, який здійснювали тимол та карвакрол на мітотичну активність клітин слинних залоз личинок дрозофіли, певним чином нівелював негативну дію 1,2-пропіленгліколю.

З метою загальної оцінки функціонування генетичного апарату клітин слинних залоз було досліджено ступінь політенізації їх хромосом. Побудова рядів розподілів клітин з ядрами різної ступені політенізації також виявила негативний вплив 1,2-пропіленгліколю: наявність цього розчинника в поживному середовищі призвела до більш ранньої зупинки циклів ендоредуплікації у окремих клітинах слинних залоз. Так, у середовищі з поліпропіленгліколем більш ніж 20 відсотків клітин (у контролі – лише 8 %) зупинялося на сьомому циклі політенізації і не переходило на наступні, вищі рівні. Таке уповільнення спостерігалось і на кожному наступному етапі, результуючись у найменшому відсотку клітин з максимальним ступенем політенізації (2048C) – приблизно 3% у порівнянні з контрольними 17%. Як і у випадку з кількістю клітин у слинних залозах, досліджувані речовини монотерпенової природи виявляли неоднозначний вплив на інтенсивність проходження циклів редуплікації хромосом. Так, у порівнянні з 1,2-пропіленгліколем, усі три монотерпени вірогідно зменшували кількість клітин з ядрами, що

зупинилися на цьому циклі ендоредуплікації, наближаючись до показників контролю. Взагалі, криві розподілу клітин на класи у дослідних варіантах з карвакролом і карвоном були дуже подібні до такої у контролі, у той час як для варіанту з тимолом зафіксовані вірогідні відмінності як від контролю, так і від варіанту з чистим розчинником – 1,2-пропіленгліколем. Характер кривої розподілу ядер по класам з різним ступенем політенії під впливом карвакролу мав тенденцію до збільшення питомої ваги останнього класу (26 % порівняно з 17% для контролю і 3% для 1,2-поліпропіленгліколю). Подібне збільшення кількості клітин, які пройшли десять циклів ендоредуплікації під впливом карвакролу було встановлено нами раніше (Nesterkina et al., 2018). Як сам карвакрол, так і його етери впливали на активність генетичного апарату клітин слинних залоз, виявляючи різноплановий ефект (Nesterkina et al., 2020), який залежав від взаємозв'язку структура-активність.

Лише для хромосом найбільшого класу (2048C) у клітинах личинок мух, вирощених на поживному середовищі з додаванням карвакролу, було помічено явище спонтанного асинапсису. Випадки асинапсису відбувались стохастичним чином (не було встановлено закономірності розшарування стосовно певних ділянок політенних хромосом, як це було показано у роботах (Taglina, 2006; Strashnyuk et al., 2009), проведених на спеціально відселектованих лініях). Асинапсис у хромосомах вищого ступеню політенізації складав лише 2,43% від загальної кількості проаналізованих клітин усіх стадій політенії та 9,28% від кількості клітин у класі з вищим ступенем політенізації. Для політенних хромосом личинок мух використаної нами лінії C-S характерний повний соматичний синапсис гомологів, зокрема, подібних розходжень у наших дослідях раніше виявлено не було. Не помічено асинаптичних розшарувань хромосом у інших варіантах дослідів і у контролі під час трьох серій експерименту.

Визначення показника середнього ступеню політенії хромосом (СПХ), який дозволяє оцінити дозу генів у ядрах клітин такого типу тканин, для усіх досліджених варіантів, показало пригнічення політенізації при внесенні у поживне середовище, яким живляться личинки, чистого розчинника 1,2-пропіленгліколю. СПХ клітин таких личинок був найменшим ($776,94 \pm 74,58$) у той час як показники усіх інших варіантів наближалися або перевищували 1000. Порівняння СПХ клітин у контрольному та варіантах з монотерпенами

продемонструвало близькість значень для контролю ($1051,55 \pm 41,21$), тимолу ($993,87 \pm 52,01$) та карвону ($1008,11 \pm 54,26$), у той час як СПХ клітин личинок, вирощених на середовищі з додаванням карвакролу ($1178,97 \pm 43,35$), вірогідно перевищували відповідні значення цього показника решти варіантів.

Таким чином, встановлено, що досліджувані речовини чинять пролонговану дію, впливаючи на функціонування клітин слинних залоз дрозофіли як на ембріональному (мітотична активність), так і на постембріональному етапі (проходження клітинами циклів ендоредуплікації хромосом). Біологічні ефекти досліджуваних монотерпенів детерміновані їх хімічною структурою. Показано, що внесення 1,2-пропіленгліколю у середовище мало власний негативний вплив на досліджувані показники, тому використання його у якості розчинника у подібних дослідах є проблематичним.

The investigated monoterpenes (carvone, thymol and carvacrol) have a prolonged effect influencing the functioning of the cells of the salivary glands of *Drosophila* both at the embryonic (mitotic activity) and at the postembryonic stage (passage of the endoreduplication cycles of chromosomes by the cells). The biological effects of the monoterpenes under study are determined by their chemical structure. It was demonstrated that the addition of 1,2-propylene glycol to the cultural medium had its own negative effect on the studied parameters; therefore, its use as a solvent in such experiments requires further research.

ПОКАЗНИКИ ПРИСТОСОВАНOSTІ КОМАХ І ГЕНОТОКСИЧНИЙ ЕФЕКТ МОНОТЕРПЕНІВ У БІОТЕСТУВАННІ НА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

**С. В. Білоконь¹, Т. Г. Алексєєва¹, М. В. Нестеркіна²,
І. А. Кравченко²**

¹ - Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса, Україна

² - Державний університет «Одеська політехніка», Одеса, Україна

s.v.belokon@onu.edu.ua, t.alieksieieva@onu.edu.ua

Вступ

В останні роки актуальним є розробка нових джерел безпечних та екологічно чистих рослинних препаратів з інсектицидною та акарицидною дією. Перспективними у цьому напрямку є дослідження терпеноїдів, що