

УДК 577.044:575.16:546.95

І. Л. Рижко, асп., **О. М. Андрієвський**, канд. біол. наук, доц., докторант
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра генетики та молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна, E-mail: kira_ril@mail.ru

ПОКАЗНИКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ В ОНТОГЕНЕЗІ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ДИКОГО ТИПУ ЗА ДІЇ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Досліджували вплив солей важких металів на темпи розвитку, реальну плодючість та виживаність нащадків дрозофіли, а також на експресію гідролітичних ферментів: лужну пептидгідролазу кишечника та тканинні карбоксиестерази дрозофіли на основних стадіях її розвитку. Показані відмінності у дії *in vivo* важких металів на активність пептидгідролази та основних карбоксиестераз. Встановлено, що за дії солей металів спостерігається зміна темпів розвитку дрозофіли, її реальна плодючість, виживаність, а також мінливість показників активності протеази та експресії досліджуваних молекулярних форм карбоксиестераз.

Ключові слова: дрозофіла, темпи розвитку, плодючість, виживаність, гідролітичні ферменти, солі важких металів.

Забруднення навколишнього середовища та його вплив на живі організми вже багато років є основною проблемою біології. Мінеральні сполуки — це необхідна складова функціонування всіх живих організмів, але водночас вони можуть бути одним із основних та найбільш небезпечних факторів забруднення. Чимало досліджень присвячено дії різноманітних екзогенних чинників, в тому числі неорганічних сполук, на нормальну життєдіяльність організмів. Результати цих праць свідчать про розвиток оксидативного стресу, порушення мембранних структур, зміни на генетичному рівні та зміни активності адаптивних ферментів під впливом важких металів та металів зі змінною валентністю [1–6]. У попередніх публікаціях нами показано вплив солей металів на окремі показники життєдіяльності *Drosophila melanogaster* [7, 8]. В даній роботі проведено порівняння дії солей металів на плодючість, виживаність дрозофіли та на активність лужної пептидгідролази і деяких карбоксиестераз.

Метою роботи було визначення впливу солей важких металів на окремі фізіолого-біохімічні показники *Drosophila melanogaster*. У зв'язку з цим вирішували наступні завдання: 1) виявляли зміни у строках розвитку дрозофіли на всіх етапах онтогенезу за дії металів; 2) визначали вплив солей важких металів (Co, Cu, Zn та Cd) на показники плодючості та виживаності дрозофіли; 3) порів-

нювали вплив металів на рівень активності пептидгідролази та карбоксиестераз плодової мушки на різних етапах її онтогенетичного розвитку.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проводили на лабораторній інбредній лінії *Drosophila melanogaster* (Meig.) — *Normal* (сіре тіло, коричнево-червоні очі, нормальні крила). Використовували тільки синхронізований матеріал: личинки, лялечки й імаго 3-денного віку, яких у кожному варіанті експерименту отримували шляхом схрещування 50 самиць із 50 самцями однієї загальної популяції.

Розвиток досліджуваних мікропопуляцій мух проходив на стандартному живильному середовищі [9, 10]; в окремих випадках — з додаванням солей важких металів, взятих у різних концентраціях. Солі металів (хлористий кадмій, хлористий кобальт, хлориста мідь та хлористий цинк) у вигляді водного розчину вводили у живильне середовище одноразово з метою одержання кінцевих концентрацій солей від 0,02 до 0,2 мМ. Контрольні мухи розвивалися на живильному середовищі без додавання солей металів.

Реальну плодючість визначали за кількістю лялечок, що утворилися за тих чи інших індивідуальних умов. Вживаність оцінювали по числу імаго, що вилуплювались із загального числа лялечок. З метою з'ясування ступеня впливу солей важких металів на показники плодючості і вживаності дрозофіли кількість лялечок і імаго у контрольних варіантах приймали за 100%. У ході роботи визначали також зміни в термінах розвитку дослідних популяцій у порівнянні з контрольними.

Для визначення впливу солей металів на пептидгідролазну активність дрозофіли *in vivo*, отримували експериментальний матеріал за наступною схемою: личинок, лялечок і імаго відокремлювали від живильної суміші або субстрату і гомогенізували в 0,1 М гліцин-NaOH буфері (рН 9,0) при кімнатній температурі протягом 1–3 хвилин. Після цього гомогенати центрифугували 15 хвилин при 10 000 g.

Концентрацію білка визначали за методом Lowry et al. [11], протеолітичну активність визначали з використанням у якості субстрату БАПНА (бензоїларгінін-*n*-нітроанілід), який застосовували у вигляді 1 мМ водного розчину. Метод визначення анілідазної активності пептидгідролази [12] заснований на спектрофотометричній реєстрації (382,5 нм) *n*-нітроаніліну, що утворюється в результаті реакції розщеплення субстрату трипсиноподібною пептидгідролазою. Питому активність (ПА) ферменту виражали в міліюдиницях (МО) у розрахунку на 1 мг білка досліджуваного розчину. За одну міліюдиницю приймали кількість ферменту, що розщеплює 1 мкмоль субстрату за 1 хвилину інкубації при 37°C.

З метою визначення впливу *in vivo* зазначених солей металів на карбоксиестеразну активність дрізофіли, личинок, куколок, а також самців та самок імаго нового покоління відбирали по 5 екземплярів та використовували для виготовлення екстрактів тканин. У якості екстрагента застосовували 0,1 М гліцин-NaOH буфер рН 9,0, який вміщував 1% тритону X-100. Гомогенізацію дослідного матеріалу проводили в 10 мкл вказаного буфера, після чого проби центрифугували 15 хвилин при 10 000 g на холоді (4°C).

Отримані екстракти підлягали електрофоретичному розподілу в лужних умовах (рН 8,9) в системі вертикально-пластинчастого 10% поліакриламідного гелю (розміри: 140×120×1 мм). Перед внесенням в слоти зразки (по 10 мкл) змішували з 5 мкл 0,01% розчину бромфенолового синього, який вміщував 60% сахарози. Електрофорез проводили при силі струму 20 мА у розрахунку на один гелевий блок, після чого гелі відмивали у дистильованій воді до нейтрального значення рН, витримували 15 хвилин в фосфатному буфері рН 7,4 та інкубували в тому ж буфері в присутності субстратів α - та β -нафтилацетатів (по 25 мг у розрахунку на 50 мл інкубаційної суміші). З метою виявлення зон локалізації карбоксиестераз в гелі гідроліз ефірів проводили в присутності діазонія синього міцного RR (50 мг на 50 мл суміші), який вступає з нафтоловими продуктами в реакцію одночасного азосполучення, що призводить до створення нерозчинного азобарвника. Після 30–60 хвилин інкубації при 25°C гелеві блоки відмивали дистильованою водою, сканували та аналізували за допомогою комп'ютерної денситометрії. Кількісну оцінку електрофореграм проводили, використовуючи спеціальну програму "АнаЗС".

Отримані дані піддавали статистичній обробці [13], використовуючи комп'ютерну програму "Excel".

Результати дослідження та його обговорення

При проведенні порівняльної оцінки дії важких металів на живий організм використовували три концентрації їх солей — 0,02, 0,08 та 0,2 мМ. Ці концентрації експериментально визначені як мінімальна (0,02 мМ), середня (0,08 мМ) та напівлетальна (0,2 мМ) для всіх досліджуваних солей.

Перш за все за дії металів слід відзначити зміни у строках розвитку дрізофіли від стадії личинки до стадії імаго (рис. 1). Всі використані солі важких металів навіть при концентрації 0,02 мМ викликають затримку онтогенетичного розвитку. Найбільш сильний ефект спостерігається за дії хлориду міді та цинку. Ці солі викликають затримку розвитку на 4 доби, тоді як кадмій затримує розвиток на 3 доби, а кобальт — лише на 1 добу на стадії личинки.

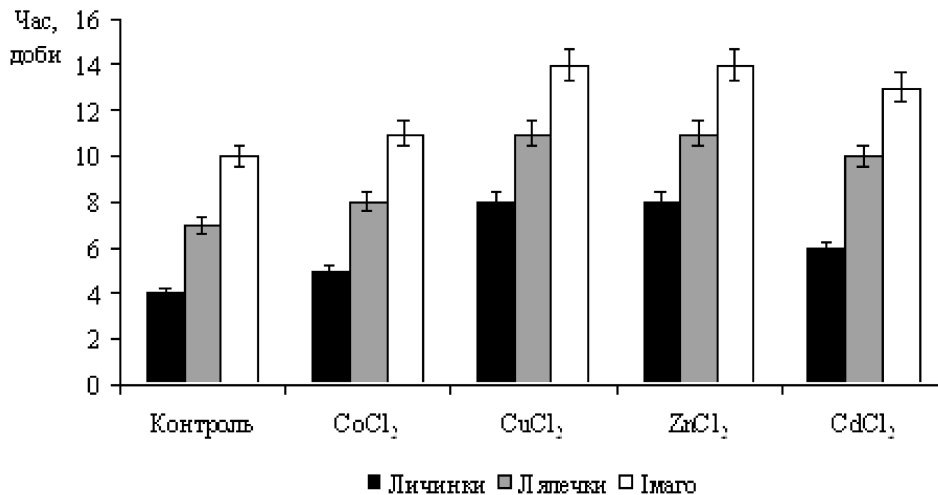


Рис. 1. Зміни у строках розвитку *Drosophila melanogaster* дикого типу за дії солей важких металів

На рисунках 2–4 наведені показники плодючості, виживаності дрозофіли, а також активності пептидгідролази та окремих форм карбоксиестераз. Останні у дрозофіли представлені чотирма формами: найменш рухливою (форма № 4, $R_f = 0,051$) α -фільною карбоксиестеразою; рухливою (форма № 3, $R_f = 0,190$) α -естеразою та β -фільними (форма № 2, $R_f = 0,270$ і форма № 1, $R_f = 0,690$) карбоксиестеразами.

За мінімальної концентрації (0,02 мМ) у середовищі хлорид міді знижує показник плодючості дрозофіли на 20% у порівнянні з контрольним варіантом (рис. 2). Незважаючи на це, виживаність лялечок, що залишилися, складає майже 100%. Сіль кадмію у цьому випадку знижує реальну плодючість плодової мушки на 50%, а виживаність нащадків на 64%. Хлориди цинку та кобальту призводять до зниження плодючості на 78 та 88% відповідно. Виживаність нащадків у цих варіантах не перевищувала 20% у порівнянні з контролем.

Активності личинкової пептидгідролази та карбоксиестераз у присутності мінімальних концентрацій солей усіх вказаних важких металів майже не відрізнялися від таких показників у личинок, які розвивалися в середовищі без додавання металів. Питома активність лялечкової пептидгідролази у порівнянні з активністю личинкової протеази майже у всіх варіантах дослідів була нижчою на 20%, а у випадку хлориду кадмію — на 50%. У той же час у прояві експресії карбоксиестераз виявляються такі відмінності від контрольних показників: зниження активності на 20% у випадку солі кобальту та на 40% у випадку використання кадмію. Хлориди міді та цинку не викликали істотної зміни цього показника.

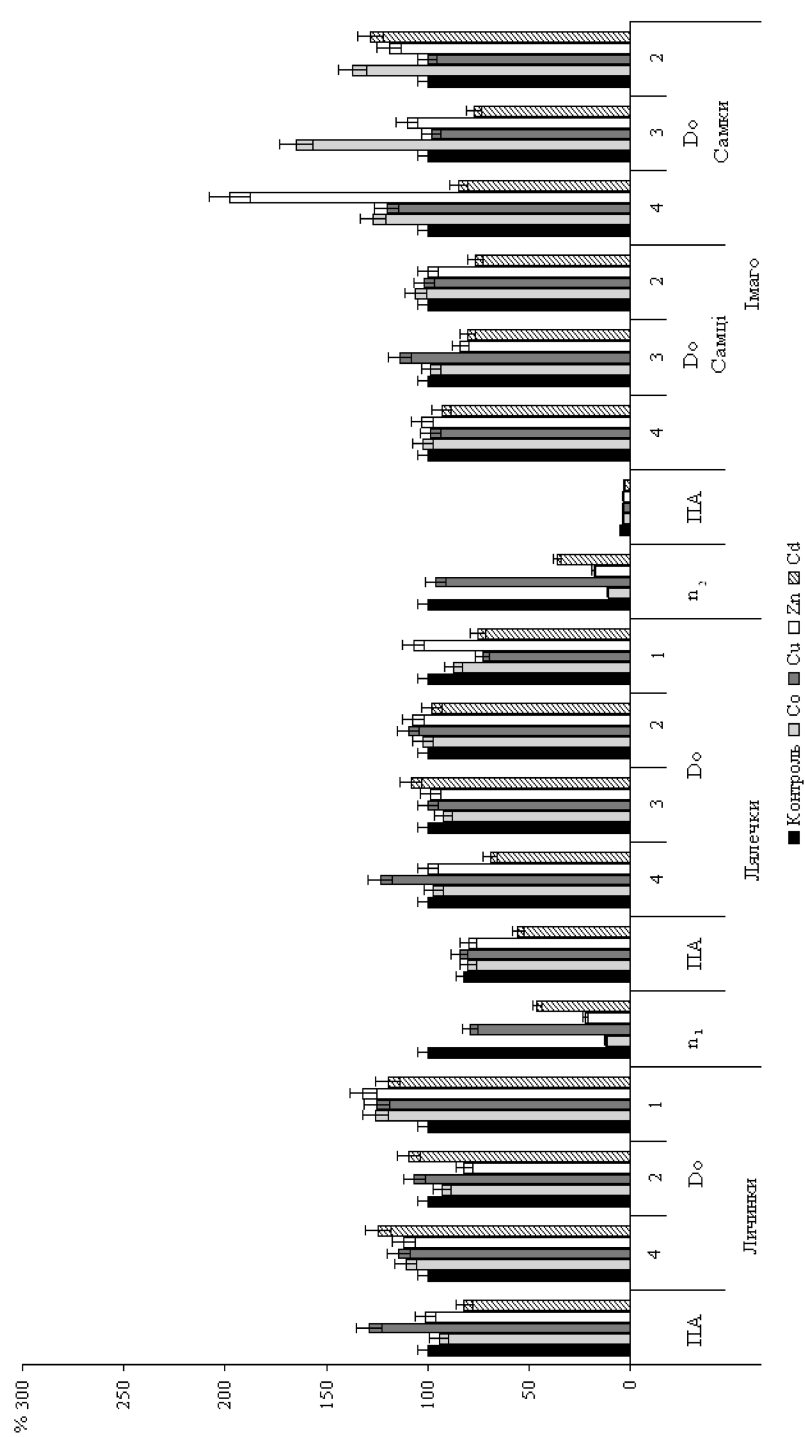


Рис. 2. Показники життєздатності *Drosophila melanogaster* дикого типу за умов розвитку в присутності солей важких металів, доданих до живильного середовища в концентрації 0,02 mM:

ПА — питома активність пептидгідролази; Do — оптична щільність як показник експресії окремих форм (1–4) карбоксиестераз;
n₁ — реальна плодючість, n₂ — виживаність

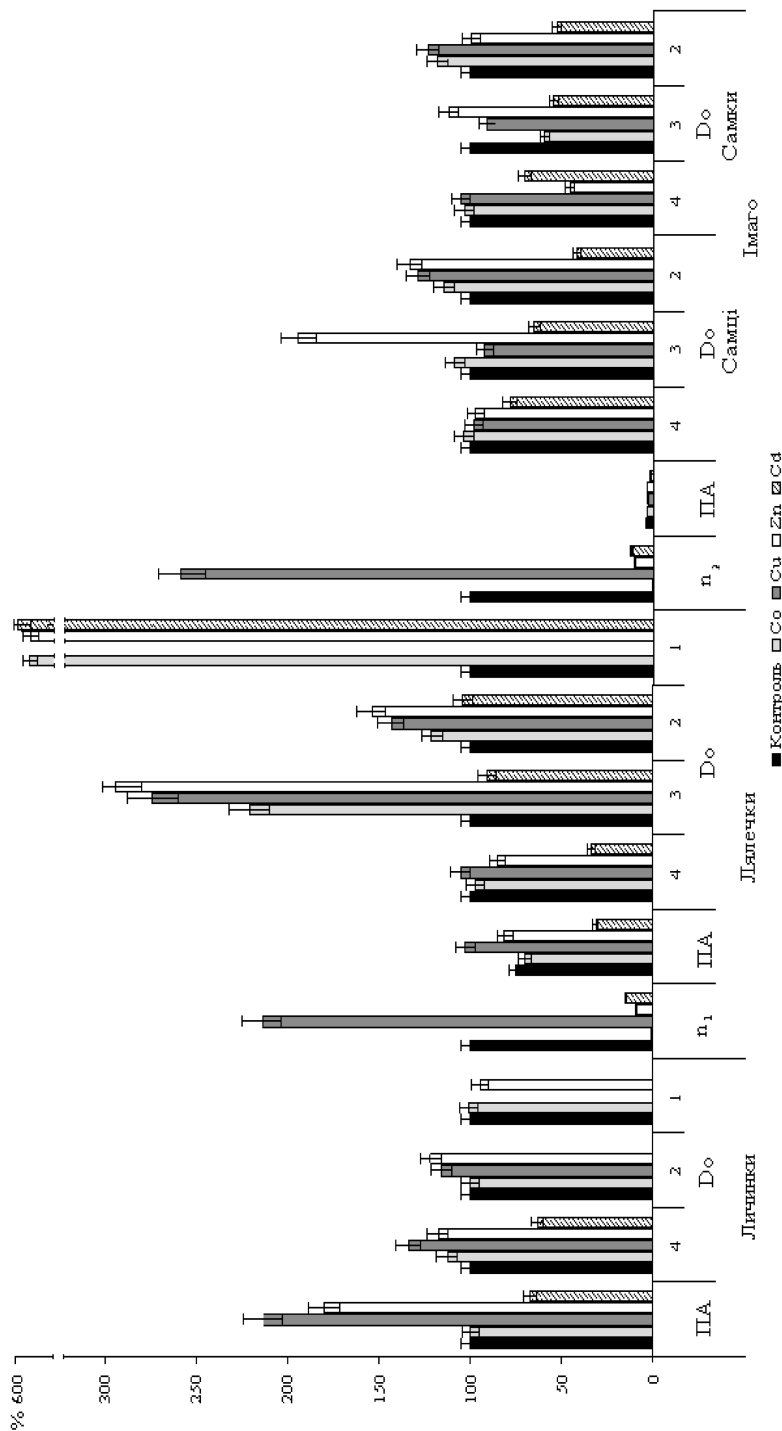


Рис. 3. Показники життєздатності *Drosophila melanogaster* дикого типу за умов розвитку в присутності солей важких металів, доданих до живильного середовища в концентрації 0,08 мМ:

ПА — питома активність пептидгідролази; Do — оптична щільність як показник експресії окремих форм (1–4) карбоксиестераз;
n₁ — реальна плодючість, n₂ — виживаність

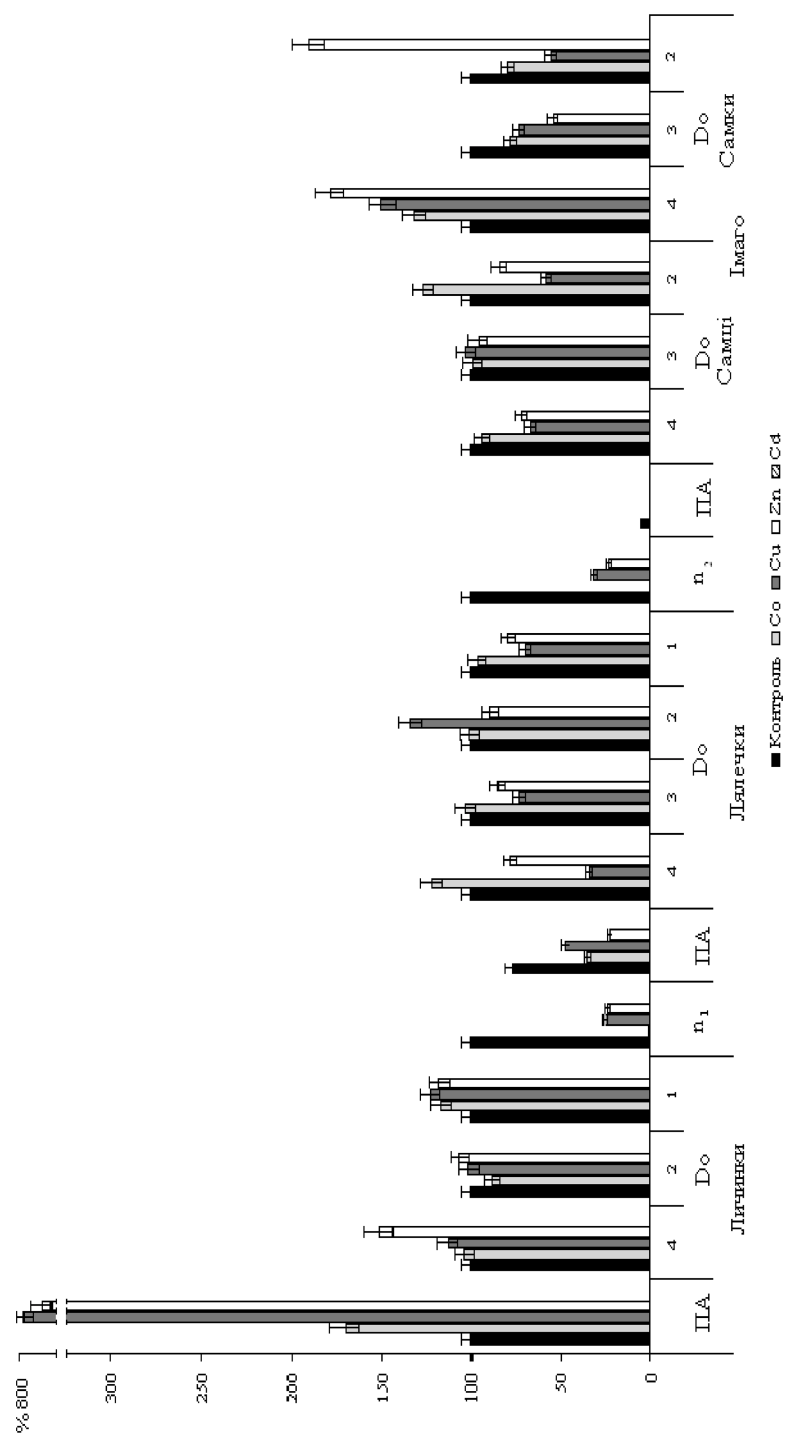


Рис. 4. Показники життєздатності *Drosophila melanogaster* дикого типу за умов розвитку в присутності солей важких металів, доданих до живильного середовища в концентрації 0,2 мМ:

ПА — питома активність пептидгідролази; Do — оптична щільність як показник експресії окремих форм (1–4) карбоксиестераз;
n₁ — реальна плодючість, n₂ — виживаність

Для імагінальної стадії розвитку дрозофіли характерний дуже низький показник активності лужної пептидгідролази — лише 5% у порівнянні з протеазою личинки в контрольному варіанті досліду та близько 3% у випадку додавання всіх солей важких металів. Однак за нормальних умов розвитку цій стадії притаманна досить висока активність карбоксиестераз. Солі кобальту, міді та цинку підвищують цей показник — найбільш сильне активування спостерігається у самок, у той час як кобальт викликає зниження активності карбоксиестераз на 30% як у самців, так і у самок плодової мушки.

За збільшення вмісту солей у кормовому середовищі до 0,08 мМ їх вплив виявляється дещо іншим (рис. 3). Найбільш виразна дія спостерігається у випадку міді, за доданням якої плодючість і виживаність дрозофіли перевищують такі ж показники контрольних мух у 2 рази. За наявності 0,08 мМ всіх інших металів у середовищі має місце досить помітне зменшення цих показників — вони не перевищують 15%.

Питома активність трипсиноподібної пептидгідролази личинок за додавання солей кобальту та кадмію у концентрації 0,08 мМ гальмується менш істотно; однак присутність хлоридів міді та цинку викликає збільшення в 2 рази у порівнянні з контролем. У випадку додання міді та кадмію спостерігається майже повне інгібування активності окремих форм карбоксиестераз, що, можливо, пов'язано з інгібуванням ферментів іонами міді та кадмію *in vivo* на стадії личинки; кобальт та цинк достовірних змін не викликають. Як і у випадку концентрації 0,02 мМ, активність протеази лялечок нижча у контрольних варіантах у порівнянні з личинковим ферментом. Якщо у попередньому випадку солі металів майже не змінювали показник активності, то за дією 0,08 мМ концентрації хлориди міді та цинку виявляється підвищення активності пептидгідролази, а сіль кадмію сильно інгібує цей показник. Карбоксиестеразна активність за цих умов зростає від 2 до 6 разів в залежності від складу живильного середовища; виключенням є дія хлориду міді, яка викликає зникнення однієї з форм цих ферментів. У імаго активність пептидгідролази майже у всіх варіантах дослідів не перевищує 3% (за дії кадмію — 1,5%). При цьому карбоксиестеразна активність виявилася досить високою. Щодо дії солі кадмію, то у самців спостерігається зниження активності естераз до 60%, тоді як у самок — до 50%. Аналогічний вплив на карбоксиестеразну систему самок спричиняє сіль кобальту.

За концентрації 0,2 мМ (рис. 4) солі кадмію у живильному середовищі спостерігалось найбільш значне пригнічення показників життєдіяльності дрозофіли. Якщо незначна кількість яєць за цих умов і була відкладена мухами, то личинки з них не розвивалися. Другим за ступенем пригнічення розвитку дрозофіли є хлорид кобальту — плодючість за його дії складала лише 1%, але

виживаність нащадків практично дорівнювала нулю. Солі міді та цинку за тих же умов призводять до зниження плодючості до 26% при 32-відсотковій виживаності нащадків.

Незважаючи на дуже низькі показники плодючості та виживаності плодової мушки, питома активність пептидгідролази личинок при додаванні міді зростає в 9 разів, а при додаванні цинку — в 7 разів; хлорид кобальту активує протеазу у 2 рази у порівнянні з контролем. У протилежність цьому, активність карбоксиестераз личинок за наявності цих солей практично не змінюється. На стадії лялечки для всіх досліджуваних ферментів спостерігається інгібування активності майже у 2 рази; лише сіль кобальту практично не впливає на активність карбоксиестераз. На стадії імаго солі важких металів, додані до живильного середовища, повністю інгібують протеолітичну активність, тоді як карбоксиестерази виявляються більш стійкими. В окремих випадках активність цих ферментів суттєво перевищувала той же показник у імаго контрольних мух.

Висновки

1. Солі важких металів у концентрації 0,02 мМ у живильному середовищі викликають зміну строків розвитку *Drosophila melanogaster*. Найбільш сильний вплив виявляють солі міді та цинку (затримка на 4 доби), найменший — кобальту (на 1 добу).

2. Хлорид кобальту в концентрації 0,02 мМ значно пригнічує показники плодючості та виживаності дрозозфіли (майже на 88%). Сіль міді в концентрації 0,08 мМ призводить до збільшення цих показників в 2 рази у порівнянні з контролем. При концентрації 0,2 мМ мідь та цинк пригнічують плодючість та виживаність більш ніж на 70%, кобальт — на 99%, а сіль кадмію повністю інгібує показники життєздатності.

3. Активність пептидгідролази та карбоксиестераз личинок майже не змінюється під впливом солей важких металів у низьких концентраціях; збільшення вмісту металів у кормовому середовищі призводить до активації пептидгідролази та інгібування карбоксиестераз окремими хлоридами. Пептидгідролазна активність на стадії імаго за умов розвитку в присутності солей металів майже не спостерігається. У той самий час карбоксиестерази виявляються більш стійкими до дії токсикантів.

Література

1. Ермолаев М. В., Ильичева Л. П. Биологическая химия. — М.: Медицина, 1989. — 320 с.
2. Бигалиев А. Б. Генетический эффект солей тяжёлых металлов как загрязнителей окружающей среды // Успехи современной генетики. — 1982. — Вип. 10. — С. 104–114.
3. Мельникова Н. М., Деркач Є. А. Вікові особливості кумуляції кадмію в органах токсикованих щурів і зміни показників кислотно-лужного стану крові за різних умов

- антиоксидантного захисту організму // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 6. — С. 95–99.
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 поживному середовищі // Вісник ОНУ. — 2003. — Т. 8. — Вип. 1. — С. 75–80.
 5. Буланкина Н. И., Ганусова Г. В., Охрименко С. М., Яковенко М. Г. Влияние хлорида кобальта и триптофана на некоторые показатели метаболизма у крыс разного возраста // Тез. V міжнар. симпозіуму "Біологічні механізми старіння". — Харків, 2002. — С. 74.
 6. Kotorman M., Laszlo K., Nemcsok J., Simon L. M. Effects of Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ on activities of some digestive enzymes in carp *Cyprinus carpio* L. // J. Environ. Sci. and Health. — 2000. — N 9. — P. 1517–1526.
 7. Андрієвський О. М., Рижко І. Л., Радіонов О. О. Вплив іонів металів на рівень протеолітичної активності травної системи дрозофіли в онтогенезі // Вісник ОНУ. Біологія. — 2002. — Т. 7. — Вип. 1. — С. 15–21.
 8. Рижко І. Л., Андрієвський О. М. Життєздатність *Drosophila melanogaster* в умовах дії солей важких металів // Вісник ОНУ. Біологія. — 2004. — Т. 9. — Вип. 1. — С. 113–119.
 9. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
 10. Андрієвський А. М., Катаненко С. В., Тоцький В. Н. Онтогенетические особенности пептидгидролазной активности экстрактов тканей *Drosophila melanogaster* // Укр. біохім. журн. — 1982. — Т. 54; № 5. — С. 519–524.
 11. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265–275.
 12. Erlanger B., Kokovsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. and Biophys. — 1961. — Vol. 95, N 2. — P. 271–278.
 13. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высшая школа, 1973. — 320 с.

И. Л. Рыжко, А. М. Андриевский

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина, E-mail: kira_ril@mail.ru

ПОКАЗАТЕЛИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ В ОНТОГЕНЕЗЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ДИКОГО ТИПА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СОЛЕЙ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Резюме

Исследовали влияние солей тяжёлых металлов на темпы развития, реальную плодовитость и выживаемость потомства дрозофилы, а также на экспрессию гидролитических ферментов: щелочную пептидгидролазу кишечника и тканевые карбоксиэстеразы дрозофилы на основных стадиях её развития. Показаны различия в действии *in vivo* тяжёлых металлов на активность пептидгидролазы и основных карбоксиэстераз. Установлено, что при действии солей металлов наблюдается изменение темпов развития дрозофилы, её реальная плодовитость, выживаемость, а также изменчивость показателей активности протеазы и экспрессии исследуемых молекулярных форм карбоксиэстераз.

Ключевые слова: дрозофила, темпы развития, плодовитость, выживаемость, гидролитические ферменты, соли тяжёлых металлов.

I. L. Ryzhko, A. M. Andrievsky

Odessa National I. I. Mechnikov University,
Department of Genetics and Molecular Biology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine, E-mail: kira_ril@mail.ru

**VITALITY CHARACTERISTICS IN THE *DROSOPHILA*
MELANOGASTER ONTOGENESIS OF THE WILD TYPE UNDER THE
INFLUENCE OF HEAVY METALS SALTS**

Summary

The influence of heavy metals salts on the rates of development, real vitability and survival rate of posterity of drosophila, and also on expression of hydrolytic enzymes: alkaline peptidehydrolyses of intestines and tissue carboxyesterases of drosophila at the basic stages of its development has been investigated. The distinctions in the influence *in vivo* of heavy metals on peptidehydrolyses and the basic carboxyesterases activity are shown. It is established that the influence of metal salts causes changing of rates of drosophila development, its real vitability, survival rate, and variability of parameters of proteases activity and expression of researched molecular forms of carboxyesterases.

Keywords: drosophila, rates of development, vitability, survival rate, hydrolytic enzymes, heavy metals salts.