

УДК 575.224.2:577.15:595.773.4

С. Л. Міресь, канд. біол. наук, доц.,
О. М. Андрієвський, канд. біол. наук, доц.
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра генетики і молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: andriev_scar@mail.ru

ЕКСПРЕСИВНІСТЬ β -СПЕЦИФІЧНОЇ КАРБОКСИЕСТЕРАЗИ ТА МАСА ТІЛА У САМЦІВ І САМОК ІМАГО *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Визначали типи розподілу показників експресії β -естерази та маси тіла імагінальних форм самців і самок дрозофіли ліній *Canton-S*, *Bar* та *vestigial*. Отримані кількісні характеристики піддавали кореляційному аналізу. Встановлено відсутність кореляції між рівнем експресивності β -естерази та масою тіла як у самців, так і у самок досліджуваних ліній *Drosophila melanogaster*.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, лабораторні лінії, експресивність β -карбоксіестерази, маса тіла особин.

Естерази, до яких належить β -карбоксіестераза, виконують в організмі важливу роль підтримки фізіологічного балансу вільних і зв'язаних органічних кислот та спиртів, приймають участь у детоксикації ксенобіотиків і таким чином можуть демонструвати адаптаційні можливості організму [1]. Як відомо, у багатьох токсикологічних та фармакогенетичних дослідженнях розрахунки ведуться саме на одиницю маси тіла [2], але в літературі майже відсутня інформація про зв'язок ферментів, що приймають участь у детоксикації, з масою тіла. Відомо, що активність деяких з цих ферментів корелює з масою тіла, а деяких — ні [3]. Стосовно карбоксіестераз нами не було знайдено подібних даних. Тому метою даної роботи було визначення можливої наявності кореляційного зв'язку між експресивністю β -специфічної карбоксіестерази та масою тіла імагінальних форм самців і самок *Drosophila melanogaster* трьох колекційних ліній: *Canton-S*, *Bar*, *vestigial*.

В задачі дослідження входило: 1) встановити рівень експресивності β -естерази самців та самок досліджуваних ліній дрозофіли; 2) визначити масу тіла особин імаго, що належать до різних ліній; 3) встановити можливу наявність взаємозв'язку між експресивністю β -естерази та масою тіла дрозофіли на імагінальній стадії розвитку.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальним матеріалом слугували самці і самки імаго лабораторних ліній *Drosophila melanogaster* (Meigen) дикого типу (*Canton-S*, *C-S*), а також мутантних: *Bar* (*B*, I хромосома, смуговидні очі) і *vestigial* (*vg*, II хромосома, недорозвинуті крила). Мух утримували за стаціонарних умов на стандартному живильному середовищі при температурі 25 °C [4].

β -Форму карбоксиестерази визначали за допомогою вертикально-пластинчастого електрофорезу у 10 % поліакриламідному гелі при pH 8,3 та силі струму 40 мА. Гомогенат тканин готували з окремо взятих особин імаго одного віку (3 доба розвитку) в 10 мл 0,1 М гліцин- $NaOH$ буфера pH 9,0, що містив 1 % тритону X-100. Отримані гомогенати центрифугували протягом 15 хв при 10 000 g та 4 °C. До відібраних екстрактів додавали по 5 мл 0,01 % розчину бромфенолового синього, що містив 60 % сахарози. Підготовлені зразки піддавали електрофоретичному розподілу, після чого гелеві блоки відмивали дистильованою водою до нейтрального значення pH та витримували 15 хв в 50 мл 0,1 М трис-гліцинового буфера pH 7,4. Потім інкубували в 25 мл того ж буфера з додаванням 12 мг β -нафтилацетату та 25 мг синього міцного ВВ. Інкубація гелей в субстратному середовищі тривала 20 хв, після чого реакційну суміш декантували, а гелі заливали кип'ячою дистильованою водою, сканували й аналізували за допомогою комп'ютерної денситометрії, використовуючи спеціальну ліцензійну програму "АнаИС". Про рівень експресивності досліджуваного ферменту судили по інтенсивності забарвлення азобарвником індивідуальної зони гелю, що співпадає з місцем специфічного розташування β -карбоксиестерази на момент завершення електрофорезу. Експресію ферменту виражали через відносні одиниці оптичної щільності (ΔDo).

Масу особин імаго визначали після наркотизації мух, безпосередньо перед виготовленням із них екстрактів, шляхом зважування на аналітичних терезах з точністю до 0,1 мг.

Перевірку на характер статистичного розподілу отриманих дат, що відображали експресивність ферменту та масу тіла досліджуваних мух, проводили за допомогою критерію Шاپіро — Уїлка (W). При $W_{\text{факт.}} > W_{\text{табл.}}$ розподіл вважали нормальним [5, 6].

Достовірність відмінностей показників у імаго різної статі визначали за непараметричним критерієм Уїлкоксона (U) для малих вибірок [5, 6].

Кореляційні зв'язки визначали за допомогою непараметричного коефіцієнту кореляції Спірмена (r_s). Розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми "Microsoft Excel". Достовірність отриманих показників кореляції визначали за спеціальними таблицями при рівні значущості $P \leq 0,05$ [5, 6].

Повторність спостережень складала: для самців та самок лінії *Canton-S* — по 14 пар дат, для особин ліній *vestigial* і *Bar* — по 15 пар дат.

У роботі використовували реактиви фірм "Reanal" (Угорщина) та "Chemapol" (Чехія), а також установку для електрофорезу "VE-4" російського виробництва (м. Москва, МДУ, "Helikon").

Результати дослідження та обговорення

Нормальний розподіл є найбільш поширеним розподілом у математичній статистиці. Він оперує безперервними випадковими величинами, значення яких визначаються безліччю одночасно діючих незалежних факторів. Нормальний розподіл є характерним для багатьох кількісних ознак, до яких можна віднести також експресивність ферментів і масу тіла. Проте часто в біологічних дослідженнях замість очікуваного нормального розподілу виникає асиметричний. Причин цього явища декілька. Це можуть бути механічні причини, пов'язані з технікою проведення досліджень, недостатня вибірка, або особливі умови зовнішнього середовища, за яких відбувається розвиток організму. Генетична причина асиметрії обумовлюється взаємодіями алельних і неалельних генів. До речі, двовершинність кривої розподілу може вказувати на дію дизруптивного добору або наявність поліморфних угруповань у популяціях. У будь-яких випадках перевірка даних на нормальність розподілу становить першу процедуру статистичного аналізу.

Так, аналіз отриманих нами кількісних даних про експресивність β -естерази та масу тіла на нормальність розподілу показав наступне (табл. 1).

З наведеної таблиці можна бачити, що нормальним є розподіл пари даних лише для варіанта "Самки C-S"; отже, тільки для цього варіанта можна застосовувати параметричні статистичні методи. У всіх інших варіантах нормально розподіляється тільки одна ознака з пари. Для особин ліній B та *vg* — це експресивність ферменту, а для самців лінії C-S — це маса тіла. В цих випадках для обробки результатів використовували непараметричні критерії.

Як відомо з попередніх досліджень [1, 7, 8], у дрозофіли існує статевий диморфізм з багатьох ознак, таких як активність ферментів, тривалість життя тощо. Враховуючи цю обставину, за наявності у досліджуваній вибірці двох морфогруп кореляційний аналіз проводили для кожної групи окремо з метою запобігання отриманню невірних результатів. Тому для досліджуваних ліній проводили порівняльний аналіз кількісних показників у самців та самок окремо (табл. 2).

Порівняльний аналіз за допомогою непараметричного критерію Уїлкоксона (*U*) вказує на наявність достовірної різниці між показниками ознак досліджуваних самців та самок, за виключенням експресивності ферменту у мух лінії *vg*. В інших варіантах самці переважають самок за експресивністю β -естерази, а самки переважають самців за масою тіла.

У зв'язку з цим кореляційний аналіз ми проводили окремо для самців і самок кожної лінії. У разі використання критерію Спірмена було отримано такі результати (табл. 3).

Незважаючи на різні значення коефіцієнтів кореляції, наведених у таблиці 3, достовірної кореляції у всіх варіантах дослідження не було. Таким чином, можна зробити висновок, що показники активності β -естерази та маси тіла дрозофіли на імагінальній стадії розвитку не залежать один від одного.

Таблиця 1
Визначення типу розподілу досліджуваних кількісних показників імаго *Drosophila melanogaster*

Критерій Шатро — Вілка	C-S			B			vg		
	Самці (n = 14)		Самки (n = 14)	Самці (n = 15)		Самки (n = 15)	Самці (n = 15)		Самки (n = 15)
	Експресія ферменту	Маса тіла	Експресія ферменту	Маса тіла	Експресія ферменту	Маса тіла	Експресія ферменту	Маса тіла	Експресія ферменту
$W_{факт.}$	0,026	0,876	0,916	0,931	1,012	0,765	0,947	0,778	1,012
$W_{табл.}$	0,874	0,874	0,874	0,874	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881
	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Примітка: * — дані у вибірці виявляють нормальний розподіл ($P \leq 0,05$).

Таблиця 2
Показники експресивності β -естерази та маси тіла імаго різних ліній *Drosophila melanogaster*

C-S			B			vg		
Експресія ферменту, ΔDo		Маса тіла, мг	Експресія ферменту, ΔDo		Маса тіла, мг	Експресія ферменту, ΔDo		Маса тіла, мг
Самці	Самки	Самці	Самки	Самці	Самки	Самці	Самки	Самки
1,006	0,413*	0,911	1,457*	2,127	1,234*	0,783	1,280*	0,713
						0,598	0,648	1,003*

Примітка: * — відмінності достовірні у порівнянні з самцями ($P \leq 0,05$).

Таблиця 3

Кореляція між експресивністю β-естерази та масою тіла
Drosophila melanogaster за критерієм Спірмена

Коефіцієнт кореляції Спірмена	C-S		B		vg	
	Самці (n = 14)	Самки (n = 14)	Самці (n = 15)	Самки (n = 15)	Самці (n = 15)	Самки (n = 15)
$r_{s \text{ факт.}}$	- 0,011	+ 0,076	+ 0,181	+ 0,342	- 0,210	+ 0,207
$r_{s \text{ табл.}}$	± 0,540	± 0,540	± 0,520	± 0,520	± 0,520	± 0,520

Примітка: при $r_{s \text{ факт.}} < r_{s \text{ табл.}}$ — кореляція відсутня.

Висновки

1. За показником експресії β-естерази самці ліній *Canton-S* та *Bar* істотно переважають самок. У мух лінії *vestigial* достовірної різниці між самками та самцями за зазначеною ознакою не встановлено.
2. Маса тіла самок всіх досліджуваних ліній значно більша, ніж у самців.
3. Між рівнем експресивності β-естерази та масою тіла імагінальних форм самців і самок досліджуваних ліній немає прямої залежності.

Література

1. Мироть Е. Л., Козерецкая И. А., Андриевский А. М. Полиморфизм и экспрессия карбокси-эстераз у самцов в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Чернобыльской зоны отчуждения // Фактори експер. еволюції організмів (Зб. наук. праць). — Київ, 2008. — Т. 4. — С. 293-297.
2. Куценко С. А. Основы токсикологии. — Санкт-Петербург, 2002. — 119 с.
3. Валкин И. Ю. Экологофизиологическая характеристика густены (*Blicca bjoerkna*) Куйбышевского водохранилища: Автореф. дис. на соиск. науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.16. — Ульяновск, 2008. — 24 с.
4. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
5. Атраментова Л. О., Утевська О. М. Статистичні методи в біології: Підручник. — Х.: ХНУ, 2007. — 288 с.
6. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Вышэйшая школа, 1973. — 328 с.
7. Андриевский А. М. Половой диморфизм по экспрессии гидролаз эфиров карбоновых кислот в популяциях *Drosophila melanogaster* // Вісник ОНУ, 2004. — Т. 9, Вип. 1. — С. 7-16.
8. Андриевский А. М., Кучеров В. А., Кундиева Е. П. Половые различия активности карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* дикого типа // Вісник ОНУ, 2006. — Т. 11, Вип. 9. — С. 23-33.

С. Л. Мирось, А. М. Андриевский

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: andriev_scar@mail.ru

**ЭКСПРЕССИВНОСТЬ β -СПЕЦИФИЧНОЙ КАРБОКСИЭСТЕРАЗЫ
И МАССА ТЕЛА У САМЦОВ И САМОК ИМАГО *DROSOPHILA
MELANOGASTER***

Резюме

Определяли типы распределения показателей экспрессии β -эстеразы и массы тела имагинальных форм самцов и самок дрозофилы линий *Canton-S*, *Bar* и *vestigial*. Полученные количественные данные подвергали корреляционному анализу. Установлено отсутствие корреляции между уровнем экспрессивности β -эстеразы и массой тела как у самцов, так и у самок исследуемых линий *Drosophila melanogaster*.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, лабораторные линии, экспрессивность β -карбоксиэстеразы, масса тела особей.

S. L. Miros, A. M. Andrievsky

Odesa National Mechnykov University
Department of Genetics and Molecular Biology
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: andriev_scar@mail.ru

**THE EXPRESSIVENESS OF β -SPECIFIC CARBOXYLESTERASE AND
BODY MASS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* IMAGO MALE
AND FEMALE**

Summary

The types of indices distribution of β -carboxylesterase expressiveness and body mass of male and female imago lines *Canton-S*, *Bar* and *vestigial* have determined. Derived qualitative characteristics were obtained by correlation analysis. The absent of correlation between β -carboxylesterase expressiveness and body mass of both male and female imago of *Drosophila melanogaster* have been find.

Key words: *Drosophila melanogaster*, laboratory lines, expressiveness of β -carboxylesterase, mass of imago body