

УДК 575.167:577.645:595

## ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ SOD В ОНТОГЕНЕЗІ ДРОЗОФІЛИ

Гандірук Н. Г., Тоцький В. М.

Одеський державний університет, кафедра генетики та молекулярної біології,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 270026, Україна

Вивчали активність та поліморфізм супероксиддисмутази в онтогенезі дрозофіли. Виявлені спільні закономірності змін активності та множинних молекулярних форм ферменту для різних генотипів. У процесі індивідуального розвитку дрозофіли активність ферменту підвищується переважно в мітохондріях, що обумовлено зникненням у імаго малоактивної швидко рухливої та появою високоактивної повільно рухливої форми супероксиддисмутази.

**Ключові слова:** супероксиддисмутаза, дрозофіла, онтогенез, поліморфізм.

Серед ферментів, які мають пряме відношення до механізмів адаптації [2, 8] та затримки старіння [3], важливим є супероксиддисмутаза (далі СОД). СОД забезпечує захист клітин від токсичної дії супероксидних радикалів кисню, які постійно утворюються в організмі в результаті аеробних процесів. Ураховуючи велику небезпеку для клітин супероксидних радикалів, важливо визначити роль СОД у забезпеченні нормального функціонування організму, його індивідуального розвитку та життєздатності.

СОД існує в трьох формах з різною клітинною локалізацією: мітохондріальна (m-СОД, містить  $Mn^{2+}$ ), цитоплазматична (s-СОД, містить  $Cu^{2+}$  і  $Zn^{2+}$ ), та позаклітинна. Адаптивні можливості різних форм СОД у процесі онтогенетичного розвитку організму не встановлені, хоча є окремі друковані праці, в яких показані особливості активності цього ферменту на різних стадіях індивідуального розвитку тварин [5].

Ми вивчали динаміку активності та поліморфізм СОД в онтогенезі дрозофіли.

### Матеріал і методи дослідження

Досліди ставили на інбредних лініях *D. melanogaster* Normal, black, brown та гібридах першого покоління, отриманих у результаті схрещування  $b \times N$  і  $b \times bw$ . Загальну активність СОД визначали спектрофотометрично [7] в супернатантах, отриманих після центрифугування гомогенатів тканин дрозофіли за 5 тис.  $q$  протягом 10'. Активність СОД, локалізованої в мітохондріях, визначали в суспензіях мітохондрій, отриманих повторним центрифугуванням за умови: 12 тис.  $q$  протягом 15' з наступною передінкубацією в 1%-ному тритоні. Супернатант після другого центрифугування використовували для визначення активності цитоплазматичної СОД.

Поліморфізм СОД визначали методом електрофорезу в ПААГ [6]. Ідентифікацію множинних молекулярних форм ферменту на електрофореграмах здійснювали за допомогою нітротетразолієвого синього [4].

Активність ферменту розраховували на 1 мг білка в пробі, який визначали за методом Лоурі [9].

Плодючість мух визначали за числом лялечкових пупаріїв у потомстві однієї самки, що відкладала яйця протягом трьох діб.

### Експериментальна частина та аналіз результатів

Установлено, що в різні періоди індивідуального розвитку дрозофіли відбуваються значні зміни активності та множинних молекулярних форм СОД. Виявлені загальні закономірності онтогенетичних змін цього ферменту, властивих усім досліджуваним генотипам дрозофіли. На личинковій стадії дрозофіли активна СОД локалізована переважно в цитоплазмі клітин. У мітохондріях личинок досліджуваній фермент має дуже низьку активність (табл. 1). На стадії лялечки активність СОД у мітохондріях дрозофіли підвищується. Максимальна активність загальної СОД властива дрозофілі на стадії імаго, що свідчить про важливу адаптивну роль ферменту на цій стадії розвитку мух. У процесі онтогенетичного розвитку різних генотипів дрозофіли від личинки до імаго активність s-СОД підвищується в межах 30—50%, а m-СОД — у 3,5—5,0 разів. Тому на стадії імаго активність m-СОД перевищує активність s-СОД. Таким чином, підвищення загальної активності СОД у процесі індивідуального розвитку відбувається переважно за рахунок мітохондріального ферменту.

Онтогенетичні особливості активності СОД можуть бути обумовлені поліморфізмом цього ферменту. Дійсно, на різних стадіях онтогенезу виявляються значні особливості електрофоретичних спектрів СОД. Найбільша кількість множинних молекулярних форм ферменту з максимальною активністю властива мухам у віці 3—7 днів (рис. 1). На цій стадії онтогенезу s-СОД представлена трьома електрофоретичними фракціями: швидкорухливою анодною, середньорухливою катодною та ще однією фракцією, що займає проміжне положення між цими двома. Ці дані збігаються з літературними [4], згідно з якими s-СОД є димером і складається з двох субодиниць. Тому спектр s-СОД у гетерозиготних за локусом Sod-1

Таблиця 1

Онтогенетичні особливості активності СОД у ліній та гібридів *D. melanogaster* ( $n = 10$ )

Форми СОД	Стадії онтогенезу	Активність СОД в ум. од. $\times 1'$ /мг білка				
		Normal	black	brown	b $\times$ N	b $\times$ bw
Загальна	імаго (5-й день)	3,24 $\pm$ 0,32	2,76 $\pm$ 0,28	2,45 $\pm$ 0,25	3,80 $\pm$ 0,30	2,10 $\pm$ 0,19
	лялечка (2-й день)	2,84 $\pm$ 0,21	2,10 $\pm$ 0,19	2,10 $\pm$ 0,18	3,00 $\pm$ 0,24	2,14 $\pm$ 0,16
	личинка (3-й день)	2,08 $\pm$ 0,17	1,78 $\pm$ 0,21	1,71 $\pm$ 0,15	2,22 $\pm$ 0,18	1,63 $\pm$ 0,13
Цитоплазматична	імаго (5-й день)	2,10 $\pm$ 0,12	1,85 $\pm$ 0,16	1,42 $\pm$ 0,13	2,13 $\pm$ 0,21	1,88 $\pm$ 0,15
	лялечка (2-й день)	1,68 $\pm$ 0,08	1,62 $\pm$ 0,11	1,50 $\pm$ 0,12	1,90 $\pm$ 0,17	1,38 $\pm$ 0,10
	личинка (3-й день)	1,50 $\pm$ 0,10	1,42 $\pm$ 0,14	1,27 $\pm$ 0,10	1,49 $\pm$ 0,13	1,21 $\pm$ 0,11
Мітохондріальна	імаго (5-й день)	2,28 $\pm$ 0,09	2,12 $\pm$ 0,13	1,94 $\pm$ 0,11	2,85 $\pm$ 0,16	2,13 $\pm$ 0,12
	лялечка (2-й день)	1,43 $\pm$ 0,08	1,29 $\pm$ 0,09	1,20 $\pm$ 0,10	1,72 $\pm$ 0,11	1,20 $\pm$ 0,09
	личинка (3-й день)	0,64 $\pm$ 0,09	0,37 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,03

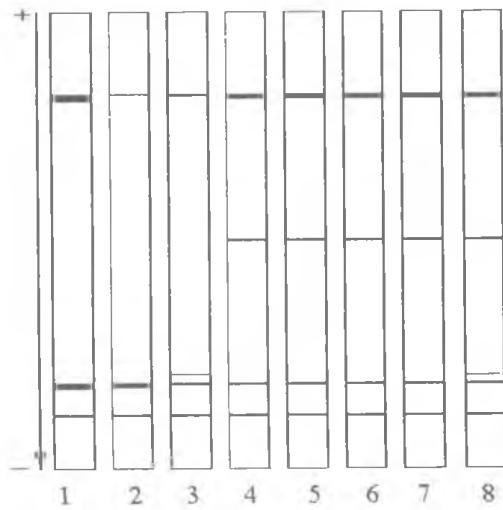


Рис. 1. Множинні молекулярні форми цитоплазматичної СОД в онтогенезі дрозофіли дикого типу (стадії: 1 — личинка, 2 — лялечка, 3—8 — імаго 1-го, 3-го, 5-го, 7-го, 15-го дня)

людей складається із трьох ізоферментів: двох гомополімерів та одного гібридного. Для імаго дрозофіли максимальна активність властива малорухливій фракції s-СОД. Швидкорухлива фракція ферменту у статевозрілих мух складається з двох субфракцій. У молодих нестатевозрілих імаго та у старих мух, в яких згасає репродуктивна функція, з'являється третя субфракція швидкорухливої s-СОД. Інтенсивність забарвлення смуг менша на електрофореграмах молодих та старих мух порівняно із статевозрілими. На електрофореграмах тканин личинок та лялечок виявлено лише дві форми s-СОД.

Активність m-СОД у личинок та лялечок обумовлена швидкорухливою анодною формою ферменту, яка відсутня у імаго (рис. 2). На стадії імаго в мітохонд-

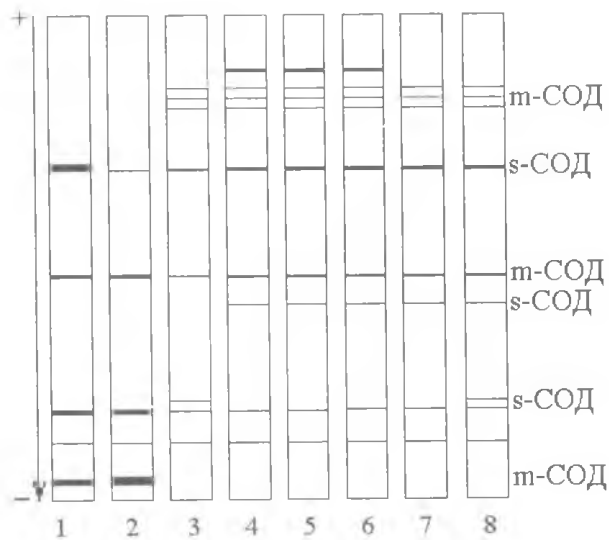


Рис.2. Множинні молекулярні форми загальної СОД в онтогенезі дрозофіли дикого типу (стадії: 1 — личинка, 2 — лялечка, 3—8 — імаго 3-го, 5-го, 7-го, 10-го, 15-го дня)

ріях виявляється малорухлива форма m-SOD, що складається з трьох—чотирьох субфракцій. Саме ця форма SOD і забезпечує підвищення активності ферменту у мух на стадії імаго.

Виявлені значні генотипові відмінності в активності досліджуваного ферменту. Найвища активність як s-SOD, так і m-SOD виявляється у дрозофіли лінії N, а найнижча активність SOD на всіх стадіях розвитку дрозофіли властива лінії bw, яка несе маркерну мутацію в хромосомі 2. Загальна активність SOD у дрозофіли лінії N на стадії імаго на 32 % вища порівняно з активністю ферменту у мух лінії bw.

Гібридні форми дрозофіли, отримані в результаті схрещування досліджуваних ліній, значно відрізняються активністю SOD як між собою, так і від батьківських форм. У гібрида b × N активність SOD на всіх стадіях розвитку вища порівняно з активністю цього ферменту у мутантній лінії b. Порівняно з дикою лінією N активність SOD у гібридів b × N незначно (на 20%) вища в мітохондріях на стадії імаго. Виявилось, що підвищена активність SOD у гібрида b × N спостерігається на фоні гетерозисного ефекту щодо плодючості, виявленого у цього гібрида. В протилежність цьому, гібрид, отриманий за схрещування ліній b × bw виявляє таку ж або навіть нижчу активність SOD, що й батьківські форми мух. Цікаво, що і плодючість гібридів b × bw нижча плодючості батьківських форм.

Проведений аналіз динаміки активності та поліморфізму SOD свідчить, що у різних генотипів мух виявляються однакові закономірності зміни диференційної активності ген-ензимної системи SOD у процесі онтогенетичного розвитку. Незалежно від генотипу мухи на стадії імаго в період статевої зрілості мають значно вищу активність SOD, ніж в інші стадії онтогенезу. Ця активність головним чином обумовлена появою специфічної для стадії імаго малорухливої m-SOD, що містить  $Mn^{2+}$ . Отримані результати узгоджуються з даними літератури [1], згідно з якими в тканинах імаго активність цитоплазматичної  $Cu^{2+}$ -SOD з віком не змінюється, в той час як активність  $Mn^{2+}$ -SOD знижується.

## Література

1. Воскресенский О. Н., Жутаев И. А., Богатырев В. Н., Безуглый Ю. В. Антиоксидантная система, онтогенез и старение // Вопр. мед. химии. — 1982. — Т. 28, № 1. — С. 14—27.
2. Гусев В. А., Брусов О. С., Панченко Л. Ф. SOD-радиобиологическое значение и возможности // Вопр. мед. химии. — 1980. — Т. 26, № 3. — С. 291—301.
3. Гуськов Р. А., Виленчик М. М., Кольтовер В. К. Роль свободных супероксидных радикалов в старении биологических объектов // Биофизика. — 1980. — Т. 25, № 1. — С. 102—106.
4. Корочкин Л. И., Серов О. А. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — С. 62.
5. Лемешко В. В., Никитченко Ю. В., Ланкин В. З. Ферменты утилизации гидропероксидов и кислорода в миокарде крыс разного возраста // Бюлл. эксп. биол. и медицины. — 1985. — Т. 49, № 5. — С. 363—365.
6. Davis B. I. Disc electrophoresis // Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Science. — 1964. — V. 121. — P. 401—427.
7. Kakkar P., Viswanathan B. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase // Indian J. Biochem. and Biophys. — 1984. — V. 21, № 2. — P. 130.
8. Loven D. A roll reduced oxyden species in heat induced cell killing and the induction of thermotolerance // Med. Hypotheses. — 1988. — V. 26, № 1. — P.39—50.
9. Lowry O. L., Rosebrough N. I, Farr A. L., Randall R. Protein measurement with the folinphenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — V. 193, № 1. — P. 265—275.

## **ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ SOD В ОНТОГЕНЕЗЕ ДРОЗОФИЛЫ**

**Гандирук Н. Г., Тоцкий В. Н.**

Одесский государственный университет, кафедра генетики и молекулярной биологии,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 270026, Украина

### **Резюме**

Изучали активность и полиморфизм супероксиддисмутазы в онтогенезе дрозофилы. Установлены общие закономерности изменений активности и множественных молекулярных форм фермента для разных генотипов. В процессе индивидуального развития дрозофилы активность фермента увеличивается главным образом в митохондриях, что обусловлено исчезновением у них на стадии имаго низкоактивной быстроподвижной и проявлением высокоактивной медленно подвижной формы супероксиддисмутазы.

**Ключевые слова:** супероксиддисмутаза, полиморфизм, дрозофила, онтогенез.

## **SOD-GENES EXPRESSY DURING THE DROSOPHILE ONTOGENES**

**Gandiruk N. G., Totsky V. N.**

Odessa State University, Department of Genetics and Molecular Biology,  
Dvoryanskaya St. 2, Odessa, 270026, Ukraine

### **Summary**

In the article the dynamic of activity and polymorphism of superoxide dismutase (SOD) during the drosophile ontogenesis has been observed. The authors determine some common regularities of changes for both the enzyme activity and their numerous molecular forms. During the process of drosophile individual evolution it is in the mitohondrian where in general the enzyme activity increases. The reason is that at imago phase a SOD form of low activity and high mobility disappears and one of high activity and low mobility comes into being.

**Keywords:** superaydismutase, Drosophile, ontogenesis, polymorphism.