

ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ ИЗМЕНЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СПЕКТРА ГЕМОЛИМФЫ ЛИЧИНОК *DROSOPHILA MELANOGASTER* АДАПТИВНЫМ ОТВЕТОМ К ТОКСИКАНТАМ?

Е.С. Селезнёва, И.В. Кисса, Е.И. Теньгаев, Е.А. Полетаева¹
З.П. Белоусова, П.П. Пурыгин, Ю.П. Зарубин²

При воздействии различными азолами и их производными на личинки *Drosophila melanogaster* выявили методом тонкослойной хроматографии изменение состава свободных аминокислот гемолимфы. Обнаружили, что изменения пула зависят не только от свойств тестируемых веществ, но и от их концентрации.

Введение

В последние годы интенсивно изучается проблема влияния малых доз токсикантов на различные организмы и возможные механизмы адаптации к ним. Это связано с постоянно увеличивающимся загрязнением окружающей среды химическими веществами, ранее в биосферу не поступавшими, и к которым у организмов еще не выработались защитные механизмы. Вещества попадают в организм самыми разными путями: через воду, воздух, пищу, почву. Очень часто, попадая в организм, вещества подвергаются метаболической активации и становятся либо антимутагенами, либо мутагенами. Большую роль в биотрансформации веществ, поступающих в организм с пищей, играет печень, поэтому многие исследователи изучают ядерный аппарат гепатоцитов млекопитающих. Биотрансформация веществ осуществляется в микросомах печени [1]. Однако существует очень мало данных о биотрансформации различных соединений у насекомых, а между тем у дрозофилы есть ферменты, сходные с таковыми в микросомной фракции печени млекопитающих.

Одним из хорошо работающих механизмов адаптации к токсикантам и мутагенам является ферментная репаративная система. Попадая в организм, токсиканты в высоких дозах ингибируют системы репарации, но их действие в малых дозах практически не изучалось.

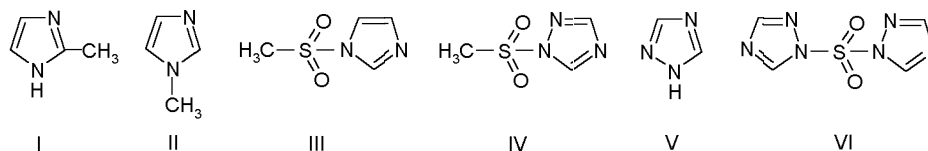
Об интенсивности белкового обмена можно судить по количественному и качественному составу аминокислот в тканевых жидкостях.

¹Екатерина Сергеевна Селезнёва, Ирина Владимировна Кисса, Евгений Иванович Теньгаев, Елена Анатольевна Полетаева, кафедра зоологии, генетики и общей экологии, Самарский государственный университет

²Зоя Петровна Белоусова, Пётр Петрович Пурыгин, Юрий Павлович Зарубин, кафедра органической химии, Самарский государственный университет

1. Методика исследования

В качестве объекта исследования были использованы личинки *Drosophila melanogaster*, которые в течение одного часа подвергались действию различных химических соединений: 2-метилимидазола (I), N-метилимидазола (II), имидазолида метансульфонокислоты (III), 1,2,4-триазолида метансульфонокислоты (IV), 1,2,4-триазола (V), N,N'-сульфурил-ди(1,2,4-триазола) (VI) (см. рисунок).



Вещества использовали либо в концентрациях, вызывающих 50 % гибель личинок, либо в концентрациях, не разрушающих мембраны эритроцитов.

Затем с помощью тонкослойной хроматографии проводили качественный анализ аминокислот в гемолимфе личинок дрозофилы второго возраста (36 часов развития после вылупления из яйца), подверженных воздействию исследуемых веществ в течение 1 часа. Вещества растворяли в физиологическом растворе для насекомых. Для анализа 200 личинок растирали в ступке с 2 мл дистиллированной воды. Суспензия наносилась на специальную бумагу-основу для экспресс-тестов марки 11 (ТУ 13-7308001-721-85, производства Малиновской бумажной фабрики).

Бумажные диски с высушенным материалом помещали в пластиковые пробирки на 0,5 мл и заливали экстрагирующей жидкостью (метанол-вода, 6:4 (об.)), закрытые пробирки оставляли на сутки при комнатной температуре.

Для разделения смесей аминокислот использовали пластинки ВЭТСК Sorbfil с толщиной слоя силикагеля 160 мкм. Элюат наносили на пластинки с помощью капилляров при постоянном просушивании. Для хроматографирования использовалась система *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (3:1:1 (об.)). Камеру ТСХ заполняли 25 мл элюента за 1 час до хроматографирования.

Для проявления аминокислот использовали нингидриновый реагент. Для его приготовления 500 мг нингидрина растворяли в смеси 85 мл ацетона и 5 мл уксусной кислоты и смешивали с 5 мл 1 % раствора ацетата кадмия. Хроматограмму опрыскивали под тягой и высушивали сначала при комнатной температуре, а затем в сушильном шкафу в течение 1–2 минут для ускорения проявления.

2. Результаты исследования

Результаты эксперимента приведены в таблице. Все исследуемые вещества в дозе LD₅₀ на дрозофилах проявили мутагенную активность, которая была минимальной или полностью отсутствовала при воздействии веществ в концентрациях, не повреждающих мембраны эритроцитов человека.

Таблица

Изменение спектра аминокислот в гемолимфе у личинок второго возраста при действии на них химическими соединениями I–VI в различных концентрациях ³

Аминокислоты	Конт-роль	I LD ₅₀ , 25*	I min, 0,5*	II LD ₅₀ , 0,5*	II min, 0,01*	III LD ₅₀ , 1*	III min, 0,1*	IV LD ₅₀ , 0,32*	IV min, 0,25*	V min, 0,1*	VI min, 0,1*
Аланин	да	много	да	много	да	да	нет	нет	да	да	да
Глицин	да	да	да	да	да	много	нет	много	да	да	да
Пролин	да	да	да	да	да	да	да	нет	да	да	да
Цистеин	да	да	да	да	да	да	да	да	да	да	да
Аргинин	да	много	да	много	да	нет	нет	нет	нет	нет	да
Лизин	да	много	да	много	да	нет	нет	да	нет	да	да
Лейцин	да	нет	да	нет	да	да	нет	да	да	да	да
Гистидин	да	да	да	да	да	нет	нет	нет	нет	да	да
Валин	нет	нет	нет	нет	нет	нет	да	нет	да	нет	нет
Тирозин	да	да	да	да	да	да	нет	нет	нет	да	да
Орнитин	да	да	да	да	да	да	да	да	да	да	да
Метионин	да	да	да	да	да	да	нет	да	нет	да	да

В дозе LD₅₀ у личинок наблюдалось повышенное содержание аминокислот в гемолимфе, причем для каждого из веществ спектр аминокислот специфичен, так, например, соединения I и II вызывали повышение количества аланина, аргинина, лизина; соединения III и IV – глицина. Некоторые аминокислоты исчезали из организма личинок: так, например, действие соединения II приводило к исчезновению лейцина, действие соединений III и IV – к исчезновению аргинина, лизина, гистидина, а действие соединения IV в дополнение к перечисленным – аланина и пролина. В концентрациях, не повреждающих мембраны эритроцитов, соединения I и II не изменяли спектр аминокислот по отношению к норме, а соединения III и IV приводили к исчезновению аргинина, лизина, гистидина, тирозина и метионина.

Соединение V в дозе, не повреждающей мембраны эритроцитов, слабо изменяло спектр аминокислот – исчезал аргинин, а его сульфурильное производное VI в той же дозе не влияет на спектр аминокислот.

3. Обсуждение результатов

Все исследованные нами соединения являются высокотоксичными в биологическом отношении. По-видимому, воздействие этих веществ в высокой концентрации приводит к необратимым разрушениям клеточных структур, к повреждению белков, о чем свидетельствует сильное изменение аминокислотного спектра. Изменение состава гемолимфы говорит также о нарушении регуляторных процессов поддержания гомеостаза. Известно, что при различных отравлениях в моче и крови млекопитающих нехарактерные для нормы аминокислоты свидетельствуют об изменении белкового обмена. Появление или исчезновение аминокислот в тканевых жидкостях сильно влияет на цитогенетический гомеостаз, на сам процесс адаптиогенеза. Так, в нашем эксперименте в дозе LD₅₀ из гемолимфы личинок исчезают только лейцин, аргинин и лизин. В работах на млекопитающих было показано, что исчезновение из диеты именно этих аминокислот, а также некоторых других приводит

³* – Концентрация тестируемых веществ дана в мг/мл

к дезорганизации митотического аппарата [1]. Например, избыток аланина индуцирует у млекопитающих мутагенез [2]. Мы также обнаружили избыток аланина в гемолимфе личинок дрозофилы при действии веществ в дозах, вызывающих мутагенез. Таким образом, можно предположить, что при действии малых доз веществ изменение спектра аминокислот является следствием физиологической адаптации к токсикантам, так, исчезновение лейцина, цистеина и гистидина свидетельствует о высокой потребности организма личинок в этих аминокислотах. Лейцин, гистидин и цистеин играют очень важную роль в активных центрах многих ферментов [3]. Несомненно, необходимы более сложные эксперименты, которые позволят выяснить роль различных аминокислот в механизмах адаптациогенеза, однако уже полученные результаты свидетельствуют в пользу нашего предположения о том, что изменение спектра аминокислот при воздействии веществ I–VI в концентрациях, не повреждающих мембраны эритроцитов, является адаптивным ответом.

Литература

- [1] Ильинских Н.Н., Медведев М.А., Бессуднова С.С., Ильинских И.Н. Мутагенез при различных функциональных состояниях организма / Томск: ТГУ. 1990. 228 с.
- [2] Cebhart B.F. Implication of the effects of maternal diets in various species // J. Anim. Sci. 1973. V.36. N 1. P.167–173.
- [3] Альберт А. Избирательная токсичность / М.: Медицина, 1989. Т.2. С.372.

CAN AMINO ACID SPECTRUM CHANGES IN DROSOPHILA MELANOGASTER HEMOLYMPH BE CONSIDERED AN ADAPTIVE RESPONSE TO TOXICANTS?

E. Seleznyova, E. Ten'gaev, I. Kissa, E. Poletaeva⁴
Z. Belousova, P. Purygin, Yu. Zarubin⁵

After the action of different azoles and their derivatives on *Drosophila melanogaster* larvae, some changes were detected in the composition of hemolymph free amino acids, using the thin-layer chromatography method. Pool changes have been discovered to depend not only on the properties of the substances being tested, but also on their concentration.

⁴Ekaterina Seleznyova, Evgeny Ten'gaev, Irina Kissa, Elena Poletaeva, chair of zoology, genetics and general ecology, Samara state university.

⁵Zoya Belousova, Pyotr Purygin, Yury Zarubin, chair of organic chemistry, Samara state university.