

УДК: 757.22:547.857.4

**Формирование приспособленности при хроническом действии кофеина у *Drosophila melanogaster***  
О.В.Горенская

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)  
olgavg@bk.ru

Изучено хроническое действие кофеина на протяжении семи поколений в концентрациях 1 мг/мл, 0,5 мг/мл и 0,25 мг/мл на формирование комплекса адаптивно важных признаков у неселектированной линии дикого типа Canton-S *Drosophila melanogaster*. Показано, что действие кофеина вызывает снижение плодовитости и жизнеспособности, временной сдвиг в интенсивности откладывания яиц в сторону ранней репродукции, снижение устойчивости генетического аппарата ооцитов к действию мутагена и снижение показателя средней степени политении хромосом (СПХ) слюнных желез личинок. К пятому поколению хронического действия кофеина в концентрации 0,25 мг/мл развивается устойчивость к изучаемому воздействию у мух, и показатели приспособленности практически достигают уровня контроля. Значение средней СПХ снижается после трех поколений воздействия, что, очевидно, связано с особенностями генетических механизмов адаптации к изменяющимся условиям существования.

**Ключевые слова:** дрозофила, кофеин, адаптация, плодовитость, жизнеспособность, доминантные летальные мутации, степень политении хромосом.

**Формування пристосованості при хронічній дії кофеїну у *Drosophila melanogaster***  
О.В.Горенська

Вивчена хронічна дія кофеїну впродовж семи поколінь у концентраціях 1 мг/мл, 0,5 мг/мл і 0,25 мг/мл на формування комплексу адаптивно важливих ознак у неселектованій лінії дикого типу Canton-S *Drosophila melanogaster*. Показано, що дія кофеїну викликає зниження плодючості і життєздатності, часовий зсув інтенсивності відкладання яєць у бік ранньої репродукції, зниження стійкості генетичного апарату ооцитів до дії мутагену та зниження показника середнього ступеня політенії хромосом (СПХ) слинних залоз личинок. Після п'ятого покоління хронічної дії кофеїну в концентрації 0,25 мг/мл показники пристосованості практично досягають рівня контролю. Значення середнього СПХ знижується після трьох поколінь дії, що, ймовірно, пов'язано з особливостями генетичних механізмів адаптації до умов існування, що змінюються.

**Ключові слова:** дрозофіла, кофеїн, адаптація, життєздатність, плодючість, домінантні летальні мутації, ступінь політенії хромосом.

**Formation of the adaptability of *Drosophila melanogaster* at the chronic action of caffeine**  
O.V.Gorenskaya

The influence of caffeine in the concentrations of 1 mg/ml, 0,5 mg/ml and 0,25 mg/ml during seven generations of treatment on formation of *Drosophila melanogaster* adaptive important traits complex has been studied. It has been shown, that chronic action of caffeine is accompanied by the decrease of descendants quantity at both the stages imago and pupa, temporal change in the intensity of laying eggs toward early reproduction, decline of stability of oocyte genetic apparatus to the action of mutagen and decline of middle chromosomes polythyeny level of larvae salivary glands. After the fifth generation of chronic action of caffeine in the concentration of 0,25 mg/ml values of adaptive traits reach the control level. The depressive action of caffeine on reduplication process after three generations of the influence has been observed.

**Key words:** drosophila, caffeine, adaptation, viability, fecundity, dominant lethal mutations, level of polythyeny.

**Введение**

Оценка хронического действия биологически активных веществ на жизнедеятельность организмов является чрезвычайно актуальной в современных условиях в связи с непрерывно ухудшающейся экологической ситуацией в мире. Наиболее распространенным природным веществом умеренно токсического действия является кофеин (1,3,7-trimethylxanthine). Из данных литературы известно, что высокие дозы кофеина оказывают мутагенный эффект (Clark, Clark, 1968), приводят к ускоренному старению организмов (Nikitin et al., 2008), значительно снижают плодовитость

*Drosophila* (Itoyama, de Campos Bicudo, 2000). Однако данные о влиянии малых доз этого биологически активного вещества на проявление адаптивных свойств организма очень малочисленны, неизученным остается вопрос об особенностях формирования приспособленности организмов к хроническому действию малых концентраций кофеина на протяжении поколений.

Важным механизмом, лежащим в основе приспособленности к внешнему хроническому воздействию биологически активных веществ, является формирование комплекса адаптивно важных признаков, а именно жизнеспособности, плодовитости и выживаемости особей на разных стадиях индивидуального развития. Эти показатели во многом определяются состоянием эндокринной системы организма. Так, эффективным способом защиты от внешних неблагоприятных воздействий является нейроэндокринная стресс-реакция. Сходство в нейрохимических и физиологических изменениях у беспозвоночных и позвоночных в ответ на внешнее стрессорное воздействие свидетельствует о том, что реакция на стресс – это совокупность древних, сохраненных в эволюции механизмов (Раушенбах, 1997; Neckameyer, Weinstein, 2005). Это делает дрозофилу, как наиболее изученный с генетической точки зрения объект, уникальной моделью для изучения особенностей формирования приспособленности к хроническому (на протяжении ряда поколений) действию кофеина. Более того, у дрозофилы контроль приспособленности (а именно способности оставить потомство и адаптироваться к внешним неблагоприятным факторам внешней среды) осуществляется теми же гормонами, которые задействованы в стресс-реакции (Раушенбах, 1997).

Одним из генетических механизмов адаптации *Drosophila* к изменяющимся условиям среды является уровень политенизации гигантских хромосом слюнных желез, поскольку степень умножения генома в клеточном ядре положительно коррелирует со стрессоустойчивостью, плодовитостью и другими компонентами приспособленности организма (Страшнюк и др., 1995).

Целью данной работы был анализ компонентов приспособленности при формировании у линии дикого типа *Drosophila melanogaster* комплекса адаптивно важных признаков при хроническом действии малых концентраций кофеина.

#### Методика

В работе использовалась неселектированная линия дикого типа Canton-S (C-S) *Drosophila melanogaster*. Мухи развивались при температуре  $24,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  на стандартной сахарно-дрожжевой среде с добавлением кофеина в концентрациях 1 мг/мл (опыт 1), 0,5 мг/мл (опыт 2) и 0,25 мг/мл (опыт 3) на протяжении семи поколений.

Оценивали следующие показатели приспособленности. Показатели реальной плодовитости и жизнеспособности определяли как количество потомков от одной пары мух на стадии куколки и стадии имаго (за первые семь суток развития от момента вылета имаго) соответственно. В каждом варианте опыта и в каждом поколении учитывали потомство от 15 пар родительских особей. Параллельно учитывали количество особей, погибших на стадии куколки.

Частота доминантных летальных мутаций (ДЛМ) учитывалась как процент неразвившихся яиц от общего числа оплодотворенных яиц (Тихомирова, 1990). При этом классифицировали прозрачные яйца как неоплодотворенные, светлые матовые – как ранние летали (гибель произошла в первые 9 часов развития), темные – как поздние летали (гибель произошла после 9 часов развития). Просмотрено не менее 700 яиц от 100 самок в каждом варианте эксперимента.

Об анеуплоидии судили по частоте нерасхождений X-хромосом у самок по стандартной методике (Тихомирова, 1990). В каждом варианте эксперимента и в каждом поколении просмотрено не менее 300 особей.

Для определения показателя потенциальной плодовитости (интенсивности яйцекладки) учитывалось ежесуточное количество яиц от одной пары мух на протяжении десяти дней с момента вылета имаго. Одновременно тестировалось по 20 семей в каждом варианте опытов и в каждом поколении. Параллельно велся учет количества неоплодотворенных яиц (прозрачные яйца).

Степень политении хромосом исследовали у самок личинок в конце 3-го возраста. На данном этапе развития инициации новых циклов эндоредупликации не происходит и в слюнных железах дрозофилы можно наблюдать четыре класса ядер с уровнем политении 256C, 512C, 1024C и 2048C (Rodman, 1967). Препараты готовили по методике давленных ацетоорсеиновых препаратов слюнных желез дрозофилы (Полуэктова, Евгеньев, 1974). Различия по СПХ оценивали цитоморфометрическим методом: хромосомы с разной степенью политении различаются по ширине хромосом и интенсивности их окрашивания ацетоорсеином (Страшнюк и др., 1995). Анализировали по 10–12 препаратов после одного, двух, трех и семи поколений воздействия различными концентрациями кофеина.

В качестве контроля использовали мух линии C-S, которые развивались на стандартной среде,

не содержащей кофеин. Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики (Лакин, 1990).

### Результаты

Количество потомков, оставленных одной парой особей, зависит от плодовитости родителей и жизнеспособности потомков на эмбриональной, личиночной и куколочной стадиях развития. Как для показателя реальной плодовитости, так и жизнеспособности существуют одинаковые тенденции при развитии мух на среде, содержащей кофеин (табл. 1).

**Таблица 1.**  
**Динамика показателей реальной плодовитости и жизнеспособности при хроническом влиянии разных концентраций кофеина у линии дикого типа Canton-S**

Поколение	Реальная плодовитость			Жизнеспособность		
	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3
Контроль	209,7±8,4			197,9±8,2		
F <sub>1</sub>	108,7±10,8*	131±2,0*	154,2±4,7*	75,9±9,3*	89,7±1,9*	108,5±7,8*
F <sub>2</sub>	101,8±7,6*	161,2±9,4*	182,6±2,8*	73,5±6,1*	124,1±8,4*	148,6±7,7*
F <sub>3</sub>	97,6±8,4*	132,6±3,8*	182,3±5,8*	63,4±6*	113,6±4,4*	147,8±8,8*
F <sub>4</sub>	142,5±8,0*	133,6±8,9*	162,4±3,7*	118,2±5,6*	116,6±7,4*	132,5±9,5*
F <sub>5</sub>	67,2±8,5*	170,2±9,2*	209±9,9	45,2±2,7*	145,2±9,1*	189,3±8,5
F <sub>6</sub>	128,6±9,1*	168,2±3,9*	201,3±5,6	90,1±9*	135,8±4,9*	181±6,2
F <sub>7</sub>	96±7,4*	133,8±3,3*	187,2±4,7*	60,2±3,2*	116,2±2,1*	172,4±5,7*

\* – достоверность отличий от контроля  $p \leq 0,05$ .

Во всех вариантах опытов отмечено снижение ( $p \leq 0,05$ ) изучаемых показателей после одного поколения развития мух на среде, содержащей биологически активное вещество. Очевидно, снижение численности особей в F<sub>1</sub> обусловлено избирательной гибелью мух, наиболее чувствительных к данному воздействию. Действие минимальных концентраций (0,5 мг/мл и 0,25 мг/мл, опыты 2 и 3 соответственно) сопровождается постепенным увеличением показателей реальной плодовитости и жизнеспособности, начиная со второго поколения; показатели достигают уровня контроля к пятому поколению (опыт 3). При развитии мух в среде, содержащей максимальную концентрацию кофеина (1 мг/мл, опыт 1), реальная плодовитость составляет от 32% (F<sub>5</sub>) до 68% (F<sub>4</sub>) от уровня контроля, при этом максимальное количество потомков наблюдается после четырех поколений воздействия, затем изучаемый показатель снижается.

Процент особей, погибших на стадии куколки, практически одинаков после одного поколения развития мух на среде, содержащей различные концентрации биологически активного вещества (табл. 2).

**Таблица 2.**  
**Количество особей, погибших на стадии куколки, при хроническом действии разных концентраций кофеина (%)**

	Длительность воздействия, поколения							
	Контроль	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>
Опыт 1	5,6	30,2	27,8	35	17,1	32,7	29,9	37,3
Опыт 2	5,6	31,5	23,0	14,3	12,7	14,7	19,3	13,2
Опыт 3	5,6	29,6	18,6	18,9	18,4	9,4	9,8	7,8

В опытах 2 и 3 количество особей, погибших на стадии куколки, постепенно снижается, вплоть до седьмого поколения. Действие максимальной концентрации (опыт 1) приводит к увеличению процента погибших особей. Однако к F<sub>4</sub> показатель снижается, что сопровождается увеличением и жизнеспособности, и реальной плодовитости (Горенская, Бугорская, 2008).

Максимальное количество отложенных за сутки яиц в контроле приходится на пятый день жизни мух, и показатель потенциальной плодовитости держится на достаточно высоком уровне до седьмых суток. В дальнейшем намечается спад и тенденция к повышению интенсивности откладывания яиц на десятые сутки с момента вылета имаго. При действии кофеина в концентрации

1 мг/мл (опыт 1, рис. 1), начиная со второго поколения, интенсивность яйцекладки максимально увеличена на четвертые сутки ( $p \leq 0,05$  по сравнению с этим же периодом в контроле) и держится на высоком уровне до шестых суток. В дальнейшем характер изучаемого показателя изменяется так же, как и в контроле – постепенный спад и тенденция к повышению на десятые сутки. Длительность воздействия кофеина приводит к постепенному снижению интенсивности откладки яиц, и к седьмому поколению хронического действия биологически активного вещества изучаемый показатель снижен в 2,2 раза по сравнению с контролем, однако максимума он достигает к 4-м суткам и держится на этом уровне вплоть до 10-х суток развития мух.

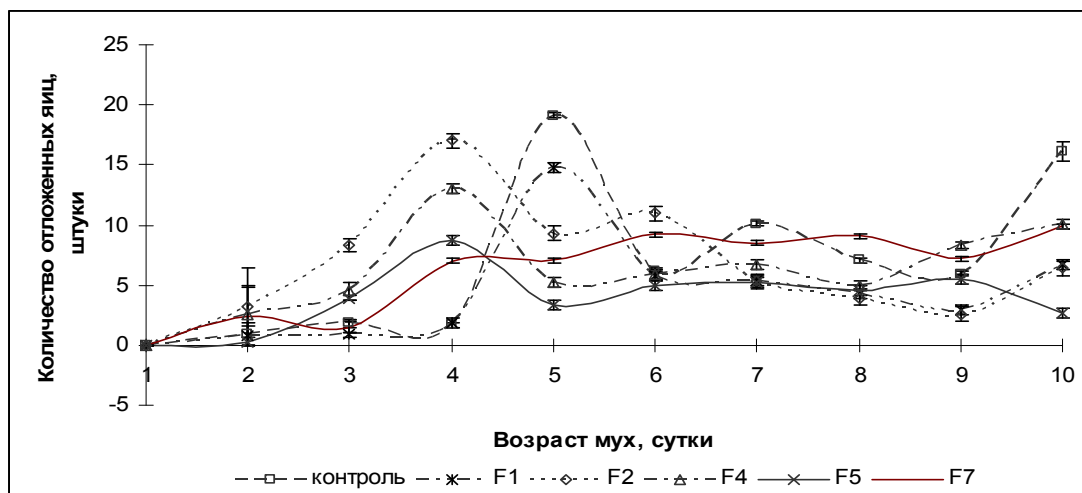


Рис. 1. Влияние кофеина в концентрации 1 мг/мл (опыт 1) на показатель потенциальной плодовитости (интенсивность яйцекладки) на протяжении семи поколений воздействия

В опыте 2 при изучении интенсивности откладывания яиц наблюдается та же тенденция, что и в опыте 1. Таким образом, обнаружен временной сдвиг в интенсивности откладывания яиц самками дрозофилы при хроническом действии кофеина в концентрациях 1 мг/мл и 0,5 мг/мл. При действии кофеина в концентрации 0,25 мг/мл (опыт 3) на протяжении семи поколений изучаемый показатель достоверно не отличается от контроля. Общее количество отложенных яиц при действии кофеина в опыте 1 снижено на 25% по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ), в опытах 2 и 3 – на 28 и 18% соответственно ( $p \leq 0,05$ ).

Количество неоплодотворенных яиц во всех вариантах опытов резко повышается после одного поколения развития мух в среде, содержащей биологически активное вещество (табл. 3). Однако в опыте 3 (действие минимальной концентрации кофеина) их количество к седьмому поколению достигает уровня контроля ( $p \leq 0,05$ ).

Таблица 3.  
Количество неоплодотворенных яиц при хроническом действии разных концентраций кофеина (%)

	Длительность воздействия, поколения							
	Контроль	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>
Опыт 1	0,14±0,06	2,45±0,09*	1,74±0,06*	1,0±0,09*	2,77±0,05*	3,74±0,08*	2,69±0,02*	2,02±0,05*
Опыт 2	0,14±0,06	1,45±0,09*	1,39±0,04*	1,1±0,09*	0,71±0,07*	2,02±0,06*	1,4±0,08*	0,72±0,08*
Опыт 3	0,14±0,06	2,42±0,03*	1,39±0,04*	1,56±0,07*	2,26±0,03*	1,69±0,09*	0,56±0,03	0,16±0,08

\* – достоверность отличий от контроля  $p \leq 0,05$ .

В табл. 4 показаны результаты исследования влияния кофеина на суммарную частоту ДЛМ, частоту поздних ДЛМ у мух линии C-S и частоту анеуплоидных мутаций на протяжении семи поколений воздействия.

Таблица 4.  
 Влияние кофеина на частоту мутационных изменений у мух линии дикого типа Canton-S

	Изучаемый показатель, варианты опыта							
	Суммарная частота ДЛМ, %			Частота поздних ДЛМ, %			Частота нерасхождений X-хромосом, %	
	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3	Опыт 2	Опыт 3
Контроль	2,17±0,05			0,4±0,05			0,9±0,09	
F <sub>1</sub>	5,5±0,1*	5,65±0,1*	3,77±0,1*	0,6±0,09	0,58±0,07	0,3±0,03*	1,0±0,08	1,1±0,08
F <sub>2</sub>	5,37±0,1*	3,44±0,4*	3,21±0,6	0,7±0,05*	0,2±0,02*	0,4±0,05	-	-
F <sub>3</sub>	3,5±0,5*	3,42±0,5	3,16±0,8	0,25±0,09	0,1±0,01*	0,4±0,04	1,3±0,08	1,2±0,06
F <sub>4</sub>	2,51±0,47	4,75±0,4*	3,5±0,9	0,43±0,05	0,7±0,09*	0,7±0,04*	-	-
F <sub>5</sub>	3,7±0,8	5,0±0,4*	2,7±0,09*	1,2±0,4	0,9±0,05*	0,5±0,04	1,6±0,08	1,3±0,09
F <sub>6</sub>	7,11±1,6*	8,5±1,47*	5,46±1,2*	2,3±0,03*	1,2±0,05*	1,3±0,04*	-	-
F <sub>7</sub>	7,7±1,45*	8,78±1,8*	9,98±1,6*	2,1±0,08*	1,5±0,05*	1,32±0,2*	6,33±0,1*	1,2±0,08

\* – достоверность отличий от контроля  $p \leq 0,05$ .

Суммарная частота ДЛМ, % достоверно отличается от контроля после одного поколения развития мух в среде, содержащей биологически активное вещество, во всех вариантах опыта, увеличиваясь от 73,7% до 160,4%. В опытах 1 и 2 изучаемый показатель достигает уровня контроля к четвертому и третьему поколениям соответственно. К седьмому поколению суммарная частота ДЛМ, % возрастает по сравнению с уровнем контроля в 3,5; 4,1 и 4,6 раза, соответственно опыты 1, 2, 3. Частота поздних ДЛМ, как видно из таблицы, во всех вариантах опытов постепенно увеличивается по мере увеличения длительности воздействия на мух в ряду поколений. Изучаемый показатель к пятому–шестому поколению развития мух в среде, содержащей биологически активное вещество, вырос в 5,5 раза (действие концентрации 1 мг/мл, опыт 1), в 3,4 раза (0,5 мг/мл, опыт 2) и в 3,3 (0,25 мг/мл, опыт 3). Уровень анеуплоидии увеличивается ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контролем только в опыте 2 после семи поколений развития мух на среде, содержащей биологически активное вещество.

Изменение средних значений СПХ под влиянием разных концентраций кофеина на протяжении семи поколений воздействия показано в табл. 5.

Таблица 5.  
 Изменение средних значений СПХ при длительном воздействии разных концентраций кофеина

	Длительность воздействия, поколения				
	Контроль	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>7</sub>
Опыт 1	922,4 ± 7,4	860,6 ± 11,9*	901,8 ± 13,5	928,1 ± 9,5	854,3 ± 10,71*
Опыт 2	922,4 ± 7,4	888,1 ± 13,2*	915,4 ± 7,4	888,9 ± 11,8*	796,66 ± 3,7*
Опыт 3	922,4 ± 7,4	914,2 ± 11,3	909 ± 9,5	861,4 ± 12,3*	875,1 ± 7,87*

\* – достоверность отличий от контроля  $p \leq 0,05$ .

Средние значения СПХ под влиянием кофеина снижаются на 6,7% и на 3,7% (соответственно действие кофеина в концентрации 1 мг/мл (опыт 1) и 0,5 мг/мл (опыт 2)) после одного поколения воздействия, затем, к F<sub>2</sub>, достигают уровня контроля, и к седьмому поколению снижение показателя средней СПХ составляет 7,4%, 13,6% и 5,1%, соответственно опыт 1, опыт 2 и опыт 3. Показанные изменения средних значений СПХ вызваны перераспределением количества ядер с разным уровнем политенизации в слюнных железах дрозофилы (Горенская, 2009). Так, при действии кофеина в концентрациях 1 мг/мл и 0,5 мг/мл в F<sub>1</sub> увеличивается количество ядер со степенью политениции 512С и снижается количество ядер 1024С и 2048С, а в F<sub>2</sub> распределение ядер с разным уровнем политенизации практически не отличается от контроля. После семи поколений воздействия кофеина во всех вариантах опытов отмечено увеличение количества ядер с уровнем политениции 256С. Действие минимальной изученной концентрации кофеина (0,25 мг/мл, опыт 3) вызывает перераспределение ядер с разным уровнем политениции по сравнению с контролем после трех поколений воздействия.

При оценке взаимодействия между длительностью воздействия кофеина и признаками общей



приспособленности по результатам корреляционного анализа (табл. 6) установлена тесная положительная взаимосвязь для количества поздних ДЛМ во всех вариантах опытов и ранних ДЛМ и суммарной частоты ДЛМ при действии кофеина в концентрации 0,5 мг/мл (опыт 2). Таким образом, длительное действие кофеина во всех изученных концентрациях сопровождается накоплением мутационных изменений в поколениях. При этом увеличение частоты мутаций происходит за счет ранних доминантных летальных мутаций.

**Таблица 6.**  
**Корреляционный анализ длительности воздействия разных концентраций кофеина (различные варианты опытов) и признаков общей приспособленности *Dr. melanogaster* ( $r_s, p$ )**

	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3
Значение средней СПХ	-0,3, >0,05	-0,7, >0,05	-0,7, >0,05
Количество неоплодотворенных яиц	0,4, >0,05	0,45, >0,05	0,02, >0,05
Ранние ДЛМ	0,43, >0,05	0,83, <0,05	0,43, >0,05
Поздние ДЛМ	0,72, <0,05	0,78, <0,05	0,9, <0,05
Суммарная частота ДЛМ	0,6, >0,05	0,76, <0,05	0,6, >0,05
Реальная плодовитость	-0,5, >0,05	0,05, >0,05	0,14, >0,05
Жизнеспособность	-0,5, >0,05	-0,02, >0,05	0,14, >0,05
Количество особей, погибших на стадии куколки	0,57, >0,05	-0,05, >0,05	-0,29, >0,05

Результаты корреляционного анализа между соответствующими признаками приспособленности при действии разных концентраций кофеина (табл. 7) показали общие закономерности в изменении таких показателей, как жизнеспособность, реальная плодовитость, количество поздних ДЛМ и суммарной частоты ДЛМ при сравнении эффекта от действия кофеина в концентрациях 0,5 мг/мл и 0,25 мг/мл (опыты 2 и 3).

**Таблица 7.**  
**Корреляционный анализ соответствующих признаков приспособленности при хроническом действии разных концентраций кофеина (разные варианты опытов) у дрозофилы ( $r_s, p$ )**

	Опыт 1 – опыт 2	Опыт 1 – опыт 3	Опыт 2 – опыт 3
Значение средней СПХ	0,7, >0,05	-0,1, >0,05	0,5, >0,05
Количество неоплодотворенных яиц	0,83, <0,05	0,34, >0,05	0,38, >0,05
Ранние ДЛМ	0,86, <0,05	0,31, >0,05	0,19, >0,05
Поздние ДЛМ	0,81, <0,05	0,63, >0,05	0,81, <0,05
Суммарная частота ДЛМ	0,83, <0,05	0,83, <0,05	0,83, <0,05
Реальная плодовитость	0,12, >0,05	-0,02, >0,05	0,95, <0,05
Жизнеспособность	0,24, >0,05	-0,02, >0,05	0,88, <0,05
Количество особей, погибших на стадии куколки	0,24, >0,05	0,14, >0,05	0,67, >0,05

Тесная положительная взаимосвязь выявлена и для таких показателей, как количество неоплодотворенных яиц и ранняя, поздняя и суммарная частота ДЛМ при действии кофеина в концентрациях 0,5 мг/мл и 1 мг/мл (опыты 1 и 2). Таким образом, формирование приспособленности к хроническому действию кофеина у дрозофилы зависит от концентрации действующего вещества и сопровождается изменениями как на организменном уровне, что выражается в изменениях численности, плодовитости и выживаемости особей, находящихся на разных стадиях индивидуального развития, так и на уровне генома, а именно в степени политенизации хромосом слюнных желез. При оценке общих тенденций при формировании у дрозофилы приспособленности к хроническому действию кофеина очевидно, что подавление процессов размножения повышает у организмов устойчивость к внешнему воздействию и способствует выживанию в неблагоприятных условиях.

### Обсуждение

Обсуждая механизмы, лежащие в основе формирования приспособленности у дрозофилы к неблагоприятным факторам среды, в первую очередь следует отметить изменения в эндокринной системе, поскольку способность оставить потомство и адаптироваться к внешним неблагоприятным факторам контролируется теми же гормонами, которые задействованы и в стресс-реакции насекомых (Раушенбах, 1997).

В ответ на действие неблагоприятных факторов внешней среды у личинок дрозофилы развивается адаптивная стресс-реакция, аналогичная стресс-реакции млекопитающих (Раушенбах, 1990, 1997). Это неспецифическая гормональная реакция, суть которой заключается в резком возрастании уровня биогенных аминов (дофамин, октопамин), ювенильного гормона и экдистероидов, которые обеспечивают повышение энергетического метаболизма. У имаго *Drosophila* стресс-связанными гормонами являются дофамин, октопамин, ювенильный гормон и экдистероиды. Биогенные амины, контролируя энергетический метаболизм насекомых, играют роль в адаптации индивидуумов к неблагоприятным условиям (Rauschenbach et al., 2005).

Основным стероидным гормоном у *Drosophila melanogaster* является экдизон. Его активный метаболит, 20-ОН-экдизон, важен для линьки и метаморфоза *Drosophila melanogaster*. 20-ОН-экдизон связывается с гетеродимерным ядерным рецептором, состоящим из экдизонового рецептора (EcR) и ультраспиракла (USP). Когда экдизон взаимодействует с рецептором, комплекс связывается уже с коактиваторами, которые задействуют гистоновые трансферазы, и, таким образом, активируются различные гены, включая гены транскрипционных факторов, шаперонов, гены апоптоза и каталазы (Simon et al., 2003).

Второй гормон мух, ювенильный гормон, также контролирует ход постэмбрионального развития дрозофилы до периода формирования пупариума. 20-ОН-экдизон и ювенильный гормон действуют как неполные антагонисты и в разные периоды онтогенеза активируют различные паттерны генов, которые закономерно сменяются параллельно со сменой уровня гормонов в гемолимфе (Жимулев, 1994). А поскольку ультраспиракл (USP) может служить рецептором и для ювенильного гормона (Simon et al., 2003), мы можем предположить, что формирование адаптивного ответа у мух дикого типа в ответ на хроническое действие кофеина в небольших концентрациях связано с нарушением в гемолимфе насекомых баланса основных гормонов развития, а именно ювенильного гормона и экдистерона. Это нарушение вызывает снижение количества потомков на стадиях яйца (показатель потенциальной плодовитости), куколки (реальная плодовитость) и имаго (жизнеспособность), показанное в работе. Подтверждением этого предположения служат результаты работы, в которой показана положительная корреляция плодовитости и уровня 20-ОН-экдизона в гемолимфе *Drosophila* (Warren et al., 2001). Отмечена сниженная плодовитость дрозофилы линии *woc* (генотип *woc<sup>rgl</sup>/TM6B Tb*), которая несет в гетерозиготе мутантную аллель гена *woc* (*without children[rgl]*), по сравнению с линией дикого типа Canton-S. Ген *woc* кодирует белок, который в качестве транскрипционного фактора регулирует активность фермента 7,8-дегидрогеназы и, таким образом, продукцию экдизона в протаракальных клетках кольцевой железы. Экдизоновый титр у личинок третьего возраста, гетерозиготных по гену *woc*, составляет 66% от этого же показателя у линии дикого типа. Кроме того, показано, что и добавление в среду кофеина в концентрации 2000 мг/мл приводит к снижению плодовитости у *Drosophila prosaltans* (Itoyama, de Campos Bicudo, 2000).

Следует отметить, что снижение титра 20-ОН-экдизона ведет к повышению устойчивости к различным стрессовым воздействиям. Так, в работе (Simon et al., 2003) показано, что линия *Drosophila melanogaster*, гетерозиготная по мутации экдизонового рецептора (EcR), характеризуется увеличением продолжительности жизни (на 40–50 % у гетерозигот) и устойчивостью к различным стрессам. Однако снижение активности EcR не ведет к потере репродуктивного потенциала. Эффект увеличения стрессоустойчивости показан и для самок мутантной линии *DTS-3*. Данная мутация непосредственно влияет на биосинтез экдизона благодаря присутствию в структуре кодируемых ими белков Kruppel Zn-finger доменов. При этом у самок мутантной линии титр экдизона снижен на 50% (Simon et al., 2003).

Кроме того, есть данные, показывающие, что еще одним важным гормональным путем регуляции таких адаптивно важных признаков, как рост, развитие, плодовитость, метаболический гомеостаз и продолжительность жизни у различных модельных организмов и, в частности, у дрозофилы является инсулиновый путь (Broughton et al., 2005). В геноме дрозофилы есть семь генов инсулиноподобных пептидов, которые независимо регулируются на уровне транскрипции в ответ на изменение условий питания, а также тканеспецифическим образом на разных стадиях онтогенеза. Об эффектах каждого пептида в отдельности известно мало. Однако выяснено, что инсулиновый сигналинг контролирует стрессоустойчивость и репродукцию у дрозофилы (Seehuus et al., 2006). Так,

в работе (Tatar, 2004) показано, что яичники самок с мутацией рецептора инсулина напоминают таковые в состоянии репродуктивной диапаузы. Возможно, снижение общего количества отложенных яиц при действии кофеина, показанное в данной работе, может быть вызвано и изменениями в инсулиновом метаболическом пути, поскольку выработка ювенильного гормона контролируется инсулиновыми пептидами. Например, лишение дрозофил инсулинсинтезирующих клеток снижает фертильность, однако увеличивает устойчивость к оксидативному стрессу (Giannakou, Partridge, 2004).

Снижение общего количества отложенных яиц во всех вариантах опытов по сравнению с контролем можно объяснить и включением стресс-реакции у мух. При стрессе происходит накопление зрелых яиц у дрозофилы вследствие повышения титра ювенильного гормона и дегградация части ранних вителлогенических ооцитов при повышении титра 20-гидроксиэкдизона (Rauschenbach et al., 2005). Кроме того, при изучении эколого-генетических взаимодействий в системе дрожжи-дрозофила с использованием линий дрожжей с нарушенным синтезом эргостерина (основной предшественник экдизона и 20-ОН-экдизона, который мухи получают из среды) показаны снижение в скорости откладывания яиц и полная потеря выводимости яиц (Лучникова и др., 1981).

Здесь интересно отметить, что на сегодняшний день у имаго *Drosophila* неизвестны другие функции экдизона, кроме связи его с процессом оогенеза. Так, экдистероиды регулируют оогенез, вителлогенез и репродукцию. У взрослых мух главным стероидогенным органом является яичник самок (фолликулярные клетки соматического происхождения и питающие клетки) и семенники самцов (Kozlova, Thummel, 2000).

Обнаруженный в работе временной сдвиг в интенсивности откладывания яиц самками дрозофилы при хроническом действии кофеина в концентрациях 1 мг/мл и 0,5 мг/мл к третьему поколению хронического воздействия можно объяснить отбором в пользу максимально ранней репродукции. Действительно, показано, что адаптация к неблагоприятным воздействиям (в частности, к хроническому действию высоких концентраций кофеина – 1,25 мг/мл и 2,5 мг/мл, добавленных в питательную среду) у дрозофилы приводит к ускоренному старению (Nikitin et al., 2008).

Процессы эндоредупликации также находятся под гормональным контролем, а именно экдизон и ювенильный гормон, действуя как неполные антагонисты, детерминируют процессы, которые ведут к нарушению нормального хода митоза и дифференцировке политенных клеток. Показано, что добавление аналога экдизона в питательную среду приводит к снижению эндорепликативной активности политенных хромосом дрозофилы (Страшнюк та ін., 2004). В работе (Белоусова та ін., 2004) показано увеличение показателя степени политении хромосом в ядрах клеток слюнных желез при выращивании дрозофилы на среде с добавлением метопрена (аналог ювенильного гормона). Угнетение функции эндоредупликации в клетках слюнных желез личинок после одного поколения воздействия кофеина, показанное в работе, связано, очевидно, с изменением гормонального баланса. По мнению В.Б.Сапунова, сдвиг гормонального баланса в сторону повышения титра ювенильного гормона при недостаточном или непригодном питании может вызвать усиление мутационного процесса у дрозофилы (Сапунов, 1980), что подтверждают и результаты данной работы – в поколениях при хроническом действии кофеина происходит увеличение частоты ДЛМ и возрастает уровень анеуплоидных мутаций.

Известно, что механизм действия кофеина основан на его способности конкурентно связываться с некоторыми подтипами аденозиновых рецепторов, регулируя, таким образом, уровень цАМФ в клетках (Sawin et al., 2000) и повышая уровень внутриклеточного кальция. В работе (Itoyama et al., 1997) показано, что кофеин может блокировать клеточный цикл культуры клеток человека на стадии G2 и снижать митотический индекс у личинок третьего возраста *Drosophila prosaltans*. В то же время известно, что переход от митотического цикла к циклам эндоредупликации связан с ингибированием М-фазной циклинзависимой киназы и активацией S-фазных киназ (Sauer et al., 1995). Установлена экспрессия циклина E, активирующего S-фазу клеточного цикла (Larkins et al., 2001). Анализируя показанные в работе изменения показателя средней СПХ, можно предположить, что кофеин участвует в регуляции перехода от митотических циклов к циклам эндоредупликации, контролируя уровень циклинов и циклинзависимых киназ.

Известна еще одна особенность кофеина – способность напрямую связываться с биополимерами, такими как нуклеиновые кислоты и ферменты (Deriabina et al., 2006; Poltev et al., 2003). Связывание с двуспиральной ДНК может привести, в свою очередь, к изменению конформации молекулы, а это один из уровней регуляции генной активности. При этом могут нарушаться паттерны генов, отвечающие за синтез основных гормонов развития, вызывая нарушение их баланса. А это, согласно полученным в данной работе результатам, приводит к изменению ряда адаптивно важных признаков. Кроме того, изменения в регуляции генной активности, вызванные кофеином, могут быть



причиною подавлення активності ферментів, учасуючих в репарації. І як следствие – накоплення мутаційних змін у поколіннях при хронічному впливі кофеїна.

Як відомо, високі дози кофеїна викликають порушення процесів постреплікативної репарації (Савицький і др., 1989). Збільшення частоти мутацій при формуванні адаптивного відповіді у мух дикого типу в відповідь на хронічне дію малих концентрацій біологічно активного речовини може бути опосередковано порушеним процесом мейоза, що знаходиться під контролем основних гормонів розвитку (Буров, 1983). А це призводить, відповідно, і до порушення процесу сперматогенезу, що проявилось в показаному в роботі збільшенні кількості неоплодотворених яєць. Аналогічна закономірність спостерігалась і в роботі (Бородин, 1987), коли стресорні впливи призводили до подавлення реплікативного і репаративного синтезу ДНК в сперматоцитах мишей. Наслідком цих подій стало підвищення частоти унівалентів статевих хромосом і малих аутосом.

Формування стійкості у *Drosophila* до хронічного дію кофеїна відбувається при дії мінімальної концентрації 0,25 мг/мл (досвід 3) до п'ятого покоління. Цей процес може бути пов'язаний з індукцією транспозицій і ексцизій МДГ стресовими впливами (Васильєва і др., 1997). Припускається, що в відповідь на негативний вплив середовища з серії багаточисельних алелів у популяції відбирається саме та структурна різноманітність генів, яка при даних умовах має селективне переважання (Тоцький і др., 2002). За думкою В.Н.Тоцького, під впливом екологічних факторів в генотипі окремих популяцій формуються певні сукупності коадаптивних алелів, названі адаптаційними комплексами генів (АКГ). Ці комплекси і визначають стійкість окремих до різних факторів зовнішнього середовища.

Таким чином, формування пристосованості до хронічного дію кофеїна у дрозофіли залежить від концентрації діючої речовини і супроводжується змінами як на організмічному рівні, що виражається в змінах чисельності, плодовитості і виживаності окремих, що знаходяться на різних стадіях індивідуального розвитку, так і на рівні геному, а саме в ступені політенізації хромосом слинних залоз. Можливо передбачити, що пряме або опосередковане дію кофеїна викликає зміни в гормональному балансі окремих *Drosophila*, що тягне за собою зміну комплексу адаптивно важливих ознак, спрямованого на підтримку життєздатності в несприятливих умовах.

### Висновки

Вивчено хронічне дію кофеїна протягом семи поколінь в концентраціях 1 мг/мл, 0,5 мг/мл і 0,25 мг/мл на формування комплексу адаптивно важливих ознак у невідібраної лінії дикого типу Canton-S *Drosophila melanogaster*. Показано, що дію кофеїна викликає зниження плодовитості і життєздатності, тимчасовий зсув в інтенсивності відкладання яєць в бік ранньої репродукції, зниження стійкості генетичного апарату ооцитів до дію мутагену і зниження показателя середньої ступені політенізації хромосом слинних залоз личинок. До п'ятого покоління хронічного дію кофеїна в концентрації 0,25 мг/мл розвивається стійкість до досліджуваного впливу у мух, і показники пристосованості практично досягають рівня контролю. Значення середньої СПХ зменшуються після трьох поколінь впливу, що, очевидно, пов'язано з особливостями генетичних механізмів адаптації до змінюваних умов існування.

### Список літератури

- Белоусова І.Б., Страшнюк В.Ю., Шахбазов В.Г. Вплив метопрену на ступінь політенії гігантських хромосом і прояви кількісних ознак у *Drosophila melanogaster* Meig. // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2004. – Вип.37. – С. 125–130.
- Бородин П.М. Стрес і генетична змінчивість // Генетика. – 1987. – Т.23, №6. – С. 1003–1010.
- Буров В.Н. Механізми гормональної регуляції линьки і метаморфоза // В кн.: Гормональна регуляція розвитку комах. – Л.: Наука, 1983. – С.44.
- Васильєва Л.А., Ратнер В.А., Бубенщикова Е.В. Стресова індукція транспозицій ретротранспозонів дрозофіли: реальність явища, характерні особливості і можлива роль в швидкій еволюції // Молекулярна генетика. – 1997. – Т.33, № 8. – С. 1083–1093.
- Горенська О.В., Бугорська Н.В. Вплив кофеїна на деякі адаптивно важливі ознаки у *Drosophila melanogaster* Meig. // Вісник Харківського національного університету. Сер. біологія. – 2008. – Вип.8 (№828). – С. 30–34.
- Горенська О.В. Дію кофеїна на ендоредуплікацію у *Drosophila melanogaster* Meig. // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – Вип.4. – С. 21–25.

- Жимулев И.Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. – Новосибирск: ВО Наука, 1994. – 565с.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352с.
- Лучникова Е.М., Инге-Вечтомов С.Г., Ибрагимов А.И. и др. Влияние на метаморфоз и воспроизводительную функцию *Drosophila melanogaster* генетических изменений в синтезе стероидов *Saccharomyces cerevisiae* в двухвидовой системе: продуцент-потребитель // Исследования по генетике. – Л.: ЛГУ, 1981. – №9. – С.54.
- Полуэктова Е.В., Евгеньев М.Б. Техника изготовления препаратов политенных хромосом // Методы биологии развития. – М.: Наука, 1974. – С. 517–519.
- Раушенбах И.Ю. Нейрэндокринная регуляция развития насекомых в условиях стресса. – Новосибирск: Наука, 1990. – 160с.
- Раушенбах И.Ю. Стресс-реакция насекомых: механизм, гормональный контроль, роль в адаптации // Генетика. – 1997. – Т.33, №8. – С. 1110–1118.
- Савицкий В.В., Лучникова Е.М., Некрестьянова Л.В. Влияние дефицита стероидов в питании самок дрозофилы на частоту рентген-индуцированной эмбриональной гибели в мутаген-чувствительных линиях с дефектом репарации // Генетика. – 1989. – Т.25, №4. – С. 650–658.
- Сапунов В.Б. О роли эндокринной системы в процессе возникновения мутаций // Журнал общей биологии. – 1980. – Т.XLI, №2. – С. 192–199.
- Страшнюк В., Горенська О., Непейвода С., Шахбазов В. Вплив віку та аналога екдизону на ендоредуплікацію політенних хромосом і швидкість розвитку *Drosophila melanogaster* Meig. // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2004. – Вип.38. – С. 99–106.
- Страшнюк В.Ю., Непейвода С.Н., Шахбазов В.Г. Цитоморфометрическое исследование политенных хромосом *Drosophila melanogaster* Meig. в связи с эффектом гетерозиса, отбором по адаптивно важным признакам и полом // Генетика. – 1995. – Т.31, №1. – С. 24–29.
- Тихомирова М.М. Генетический анализ. – Л.: Издательство ЛГУ, 1990. – 280с.
- Тоцкий В.Н., Хаустова Н.Д., Алшибли Н.М. и др. Генетико-биохимические механизмы онтогенетической и филогенетической адаптации // Цитология и генетика. – 2002. – №3. – С. 69–75.
- Broughton S.J., Piper M.D.W., Ikeya T. et al. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol.102, №8. – P. 3105–3110.
- Clark A.M., Clark E.G. The genetic effects of caffeine in *Drosophila melanogaster* // Mutation Research. – 1968. – №6. – P. 227–234.
- Deriabina A.S., Grokhlina T.I., Polteva N.A. et al. Study of mechanisms of some caffeine biological effects via computer. Simulation of its interactions with DNA fragments // J. Mol. Struct. (Theochem). – 2006. – Vol.769, №1–3. – P. 97–101.
- Itoyama M.M., Bicudo H.E., Cordeiro J.A. Effects of caffeine on mitotic index in *Drosophila prosaltans* (Diptera) // Rev. Bras. Genet. – 1997. – №20. – P. 655–658.
- Itoyama M.M., de Campos Bicudo H.E. Effect of stannous chloride combined with caffeine on fecundity of *Drosophila prosaltans* // Genetics and Molecular Biology. – 2000. – Vol.23, №1. – P. 105–107.
- Giannakou M.E., Partridge L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival // Trends Cell Biol. – 2004. – Vol.14, №8. – P. 408–412.
- Kozlova T., Thummel C.S. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila* // Trends Endocrinol. Metabol. – 2000. – Vol.11, №7. – P. 276–280.
- Larkins B.A., Dilkes B.P., Dante R.A. et al. Investigating hows and why of DNA endoreduplication // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol.52, №355. – P. 183–194.
- Neckameyer W.S., Weinstein J.S. Stress affects dopaminergic signaling pathways in *Drosophila melanogaster* // Stress (Amsterdam, Netherlands). – 2005. – Vol.8, №2. – P. 117–132.
- Nikitin A.G., Navitskas S., Gordon L.N. Effect of varying doses of caffeine on life span of *Drosophila melanogaster* // J. Gerontol.: Biol. Sci. – 2008. – Vol.63A, №2. – P.149–150.
- Poltev V.I., Grokhlina T.I., Deriabina A. et al. Caffeine interaction with nucleic acids. Molecular mechanics calculations of model systems for explanation of mechanisms of biological actions // Theor. Chem. Acc. – 2003. – Vol.110, №6. – P. 466–472.
- Rauschenbach I.Y., Shumnaya L.V., Khlebodarova T.M. et al. Role of phenol oxidases and tyrosine hydroxylase in control of dopamine content in *Drosophila virilis* under normal conditions and heat stress // J. Insect Physiol. – 2005. – Vol.41. – P. 279–286.
- Rodman T.C. DNA replication in salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster* at successive larval and prepupal stages // Genetics. – 1967. – Vol.55. – P. 375–386.

Sauer K., Knoblich J.A., Richardson H. et al. Distinct modes of cycling E/cdc2c kinase regulation and S-phase control in mitotic and endoreduplication cycles of *Drosophila* embryogenesis // Genet. Dev. – 1995.– Vol.9.– P. 1327–1339.

Sawin E.R., Ranganathan R., Horvitz H.R. C. elegans locomotor rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway // Neuron. – 2000. – №26. – P. 619–631.

Seehuus S.-C., Norberg K., Gimsa U. et al. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol.103, №4. – P. 962–967.

Simon A.F., Shih C., Mack A., Benzer S. Steroid control of longevity in *Drosophila melanogaster* // Science. – 2003. – Vol.299. – P. 1407–1410.

Tatar M. The neuroendocrine regulation of *Drosophila* aging // Experim. Gerontol. – 2004. – Vol.39. – P. 1745–1750.

Warren J.T., Wismar J., Subrahmanyam B., Gilbert L. *Woc (without children)* gene control of ecdysone biosynthesis in *Drosophila melanogaster* // Molecular and cellular endocrinology. – 2001. – Vol.181. – P. 1–14.

---

**Представлено: П.Ю.Монтвідом / Presented by: P.Yu.Montvid**

**Рекомендовано до друку: А.В.Некрасовою / Recommended for publishing by: A.V.Nekrasova**

*Подано до редакції / Received: 15.04.2010.*

© О.В.Горенська, 2010

© O.V.Gorenskaya, 2010