

УДК: 757:57.022:547.857.4

Влияние кофеина на некоторые адаптивно важные признаки у *Drosophila melanogaster* Meig.

О.В.Горенская, Н.В.Бугорская

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

Изучено влияние кофеина в концентрациях 1 мг/мл, 0,5 мг/мл и 0,25 мг/мл на показатели реальной плодовитости, жизнеспособности и приспособленности (относительной эффективности размножения) у *Drosophila melanogaster* на протяжении семи поколений воздействия. Показано, что хроническое действие кофеина сопровождается снижением количества потомков как на стадии имаго, так и на стадии куколки. Выявлена зависимость относительной приспособленности от концентрации изучаемого биологически активного вещества и длительности его воздействия.

Ключевые слова: *реальная плодовитость, жизнеспособность, приспособленность, дрозофила, кофеин.*

Введение

Кофеин (1,3,7-триметилксантин) – наиболее часто используемое вещество умеренно токсического действия. Из данных литературы известно, что высокие дозы кофеина приводят к нарушению процессов репарации, оказывая мутагенный эффект (Clark, Clark, 1968); помимо этого, в последнее время в высоких концентрациях кофеин используется как инсектицид. Однако данные о влиянии малых доз этого биологически активного вещества на проявление адаптивных свойств организма очень малочисленны, неизученным остается вопрос о хроническом действии малых концентраций кофеина.

Известно, что стресс-реакция, которая развивается в ответ на действие неблагоприятных факторов внешней среды, обладает высокой степенью эволюционного консерватизма. Это делает насекомых уникальной моделью для изучения хронического действия различных биологически активных веществ.

Приспособленность генотипов к различным условиям существования определяется, в первую очередь, репродуктивным успехом, т.е. количеством потомков. Важнейшими компонентами приспособленности являются жизнеспособность и плодовитость.

Целью данной работы был анализ показателя приспособленности, как одного из компонентов адаптивной ценности, у мух дикого типа *Drosophila melanogaster* при хроническом действии малых концентраций кофеина.

Материалы и методы

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. Определялось количество потомков от одной пары мух на стадиях куколки (учитывалось количество пупариев) и имаго. Учет проводили у 15 пар в каждом варианте опыта и в каждом поколении. Соответственно, учитывалось потомство от 330 родительских пар.

Количество потомков, оставленных одной парой особей, зависит от плодовитости родителей и жизнеспособности потомков на эмбриональной, личиночной и куколочной стадиях развития. Учитывая это, мы оценивали показатели реальной плодовитости (среднее количество образовавшихся пупариев от одной пары мух), жизнеспособности (среднее число потомков на стадии имаго от одной пары мух) и показатель приспособленности (относительной эффективности размножения) (Айала, Кайгер, 1988). В качестве контроля использовали мух линии *C-S*, которые развивались на стандартной среде, не содержащей кофеин. Относительная приспособленность особей рассчитывалась как отношение среднего числа потомков от одной пары мух (во всех вариантах опыта) к среднему числу потомков от одной пары мух линии *C-S* (контроль). Поскольку экспериментальная часть работы проводилась в течение шести месяцев, контрольные значения показателей плодовитости и жизнеспособности измерялись на каждом этапе опыта, приблизительно каждые две недели. Это проводилось с целью исключить влияние на изучаемые показатели сезонных факторов (Литвинова, 1977; Гордеева, 2004).

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

Результаты и обсуждение

Изменения показателя жизнеспособности при хроническом действии разных концентраций кофеина (различные варианты опытов) на протяжении семи поколений развития мух дикого типа представлены на рис. 1. Во всех вариантах опытов отмечено снижение ($P>0,95$) изучаемого показателя после одного поколения развития мух в среде, содержащей биологически активное вещество. В опытах 2 и 3 отмечается возрастание показателя жизнеспособности к пятому поколению развития мух в среде, содержащей кофеин. При этом количество потомков от одной пары мух при хроническом действии минимальной концентрации биологически активного вещества достигает уровня контроля. При развитии мух в среде, содержащей концентрацию кофеина 1 мг/мл (опыт 1), максимальное количество потомков наблюдается после четырех поколений воздействия, затем изучаемый показатель снижается.

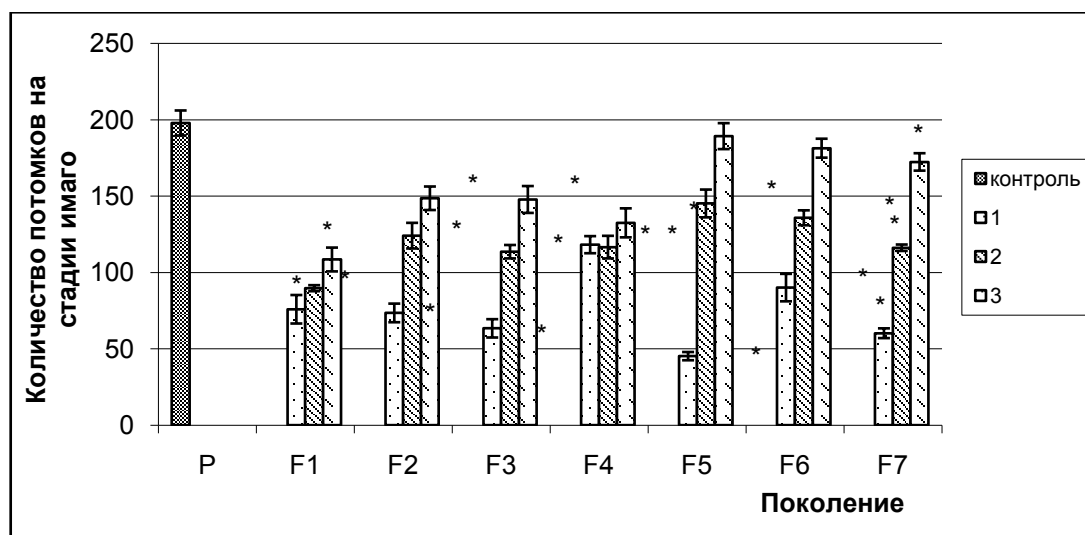


Рис. 1. Влияние разных концентраций кофеина на показатель жизнеспособности у линии дикого типа *Canton-S* (1 – опыт 1, концентрация кофеина в среде 1 мг/мл; 2 – опыт 2, концентрация кофеина в среде 0,5 мг/мл; 3 – опыт 3, концентрация кофеина в среде 0,25 мг/мл)
Примечание: * – отличие от контроля $P>0,95$.

На рис. 2 показано изменение количества куколочных пупариев от одной пары особей дрозофилы линии дикого типа *C-S* при хроническом действии кофеина на протяжении семи поколений.

Резкое снижение показателя реальной плодовитости во всех вариантах опытов наблюдается после одного поколения развития мух в среде, содержащей кофеин ($P>0,95$). Действие минимальных концентраций (опыты 2 и 3) сопровождается постепенным увеличением изучаемого показателя, начиная со второго поколения, достигая уровня контроля к пятому поколению (опыт 3). При развитии мух в среде, содержащей максимальную концентрацию кофеина (опыт 1), реальная плодовитость составляет от 32% (F_5) до 68% (F_4) от уровня контроля.

Одним из основных условий, обеспечивающих адаптацию организмов к неблагоприятным условиям среды, является стресс-реакция. Важнейшими звеньями стресс-реакции насекомых являются биогенные амины (дофамин, октопамин), ювенильный гормон и экдистероиды (Раушенбах, 1997). При стрессе их уровень резко возрастает, обеспечивая повышение энергетического метаболизма и, тем самым, обеспечивая адаптацию индивида, и затем, как следствие, адаптацию на популяционном уровне.

Гормоны, задействованные в стресс-реакции, также контролируют приспособленность (Груntenко и др., 2005), важнейшим компонентом которой является способность оставить потомство и способность адаптироваться к неблагоприятным условиям. Анализируя результаты, полученные в данной работе, можно предположить, что в результате действия хронического стрессирующего фактора, у мух, при формировании адаптивного ответа, в гемолимфе нарушается баланс основных гормонов развития, а именно ювенильного гормона и экдистерона. Известно, что при стрессе возрастает титр ювенильного гормона, и это приводит к остановке откладывания яиц (Раушенбах и др., 2005), в то же время при стрессе повышается и уровень 20-гидроксиэкдистерона, что вызывает замедление вителлогенеза (Gruntenko et al., 2005). Эти изменения и обеспечивают адаптацию индивидуума и популяцию к неблагоприятным условиям. Можно предположить, что хроническое действие малых концентраций кофеина (опыты 2 и 3) позволяет к пятому поколению адаптироваться

к действию изучаемого стрессующего фактора и по показателям жизнеспособности и реальной плодовитости практически достигнуть уровня контроля. Иными словами, можно предположить развитие к пятому поколению устойчивости к изучаемому воздействию у мух дикого типа. Этот процесс также может быть связан, по мнению Л.А.Васильевой с соавт. (Васильева и др., 1997), с индукцией транспозиций и эксцизий МДГ стрессовыми воздействиями. По мнению авторов, стрессовая индукция транспозиций является одним из факторов производства новой генетической изменчивости популяций при прохождении их через «бутылочное горлышко».

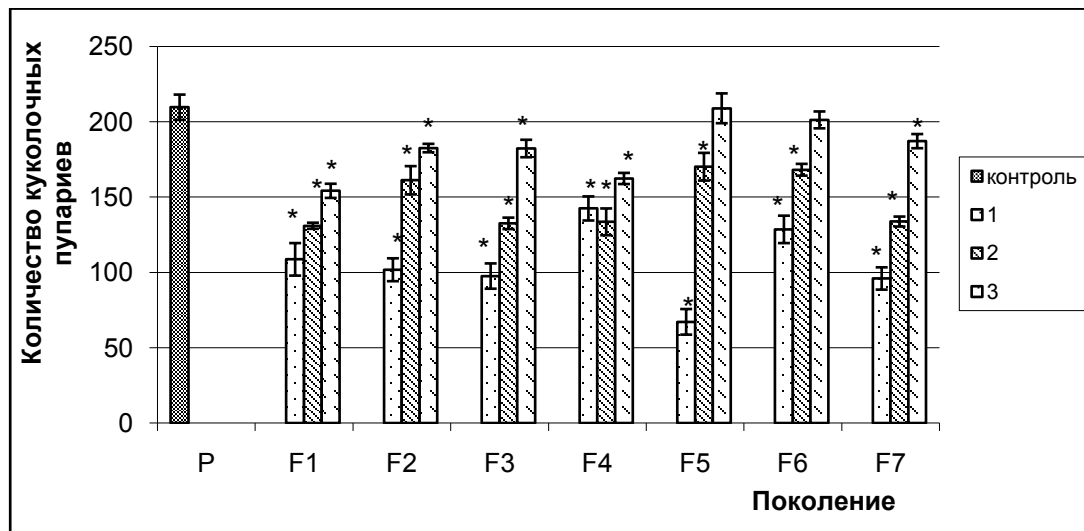


Рис. 2. Реальная плодовитость у линии дикого типа Canton-S при действии разных концентраций кофеина (1 – опыт 1, концентрация кофеина в среде 1 мг/мл; 2 – опыт 2, концентрация кофеина в среде 0,5 мг/мл; 3 – опыт 3, концентрация кофеина в среде 0,25 мг/мл)
Примечание: * – отличие от контроля $P > 0,95$.

Предполагается, что в ответ на отрицательное влияние среды из серии множественных аллелей в популяции отбирается именно та структурная разновидность генов, которая при данных условиях имеет селективное преимущество (Тоцкий и др., 2002). По мнению В.Н.Тоцкого, под давлением экологических факторов в генотипах особей популяции формируются определенные совокупности коадаптивных аллелей, названные адаптивными комплексами генов (АКГ). Эти комплексы и определяют устойчивость особей к различным факторам внешней среды. Исходя из полученных в работе результатов, можно предположить возможное формирование АКГ к четвертому–пятому поколению при хроническом действии кофеина в исследуемых концентрациях.

В то же время, уменьшение количества потомков от одной пары особей может быть также объяснено различными причинами: снижением фертильности самок, снижением части оплодотворенных самок, смертностью на предимагинальных стадиях развития (Лучникова, 1978).

В настоящее время показано, что механизм действия кофеина основан на его способности связываться с аденозиновыми рецепторами. При этом происходит изменение уровня цАМФ в клетке. Этот эффект носит временный характер, поскольку клетка компенсирует ингибированный фермент синтезом его дополнительных порций. Это точно соответствует медицинскому определению лекарственной зависимости (Хухо, 1990).

В то же время, кофеин способен 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, а также быть причиной подавления активности ферментов, участвующих в репарации. Можно предположить, что изменение показателей плодовитости и жизнеспособности, как генетически детерминированных количественных признаков, может быть в какой-то мере связано с особенностями связывания кофеина с молекулой ДНК.

Интересно отметить, что процент особей, погибших на стадии куколки, практически одинаков после одного поколения развития мух на среде, содержащей биологически активное вещество, во всех вариантах опытов (рис. 3).

В опытах 2 и 3 данный показатель постепенно снижается, вплоть до седьмого поколения. Действие максимальной концентрации (опыт 1) сопровождается увеличением процента погибших особей на стадии куколки. Исключение составляет резкое снижение изучаемого показателя после

четырёх поколений развития мух в среде, содержащей кофеин. Следует отметить, что именно к четвертому поколению в опыте 1 происходит увеличение и жизнеспособности, и плодовитости.

В табл. 1 показана относительная приспособленность линии дикого типа при хроническом действии различных концентраций кофеина. Установлено, что при действии концентрации 1 показатель относительной приспособленности имеет волнообразный характер. Постепенное снижение отмечено к третьему поколению и резкий подъем – к четвертому. В дальнейшем динамика изменений изучаемого показателя носит нестабильный характер, снижаясь к каждому нечетному поколению.

Действие как концентрации 2, так и концентрации 3 сопровождается увеличением показателя относительной приспособленности уже после одного поколения развития мух в среде, содержащей кофеин. Хроническое действие кофеина на протяжении четырех поколений приводит к возрастанию изучаемого показателя, причем, в случае действия концентрации 3, относительная приспособленность почти достигает уровня контроля.

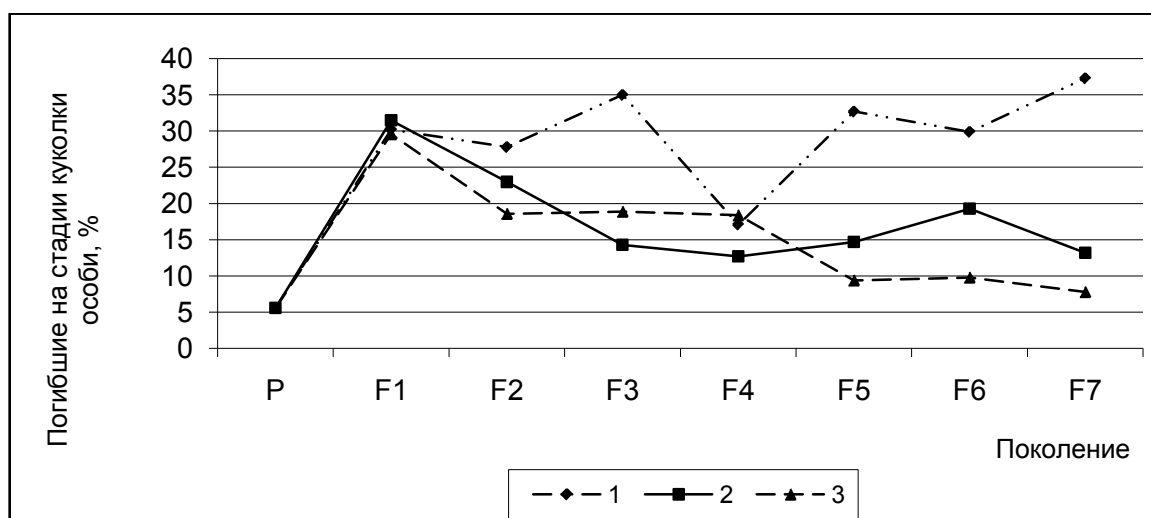


Рис. 3. Количество особей, погибших на стадии куколки, при развитии мух на среде, содержащей кофеин (1 – опыт 1, концентрация кофеина в среде 1 мг/мл; 2 – опыт 2, концентрация кофеина в среде 0,5 мг/мл; 3 – опыт 3, концентрация кофеина в среде 0,25 мг/мл)

Таблица 1.

Относительная приспособленность мух линии дикого типа *Canton-S* при условии развития в среде, содержащей кофеин

	Поколение						
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇
Опыт 1	0,38	0,37	0,32	0,6	0,22	0,46	0,3
Опыт 2	0,45	0,63	0,57	0,6	0,73	0,69	0,59
Опыт 3	0,55	0,75	0,75	0,67	0,96	0,92	0,87

Выводы

Установлено снижение количества потомков на стадии имаго и на стадии куколки у мух линии дикого типа *Canton-S* при хроническом действии кофеина в концентрациях 1 мг/мл, 0,5 мг/мл и 0,25 мг/мл на протяжении семи поколений. Значения показателей жизнеспособности и реальной плодовитости достигают уровня контроля при хроническом действии биологически активного вещества в минимальной концентрации к пятому поколению.

Показано, что хроническое действие низких концентраций кофеина приводит к постепенному уменьшению количества мух, погибших на стадии куколки. В то время как при действии кофеина в концентрации 1мкг/мл количество потомков, погибших на стадии куколки, постепенно увеличивается.

Относительная приспособленность зависит от концентрации изучаемого биологически активного вещества и достигает уровня контроля при действии кофеина (0,25 мг/мл) к пятому поколению.

Список литературы

Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. – М.: Мир, 1988. – Т.3. – 336с.

- Васильева Л.А., Ратнер В.А., Бубенщикова Е.В. Стрессовая индукция транспозиций ретротранспозонов дрозофилы: реальность явления, характерные особенности и возможная роль в быстрой эволюции // Молекулярная генетика. – 1997. – Т.33, №8. – С. 1083–1093.
- Гордеева И.В. Циклические изменения генетической структуры природной популяции *Drosophila melanogaster* как реакция на сезонные колебания численности // Циклы. Материалы шестой Международной конференции. – Ставрополь, 2004. – Т.1. – С. 177–188.
- Груntenко Н.Е., Карпова Е.К., Алексеев А.А. и др. Экспериментальное снижение уровня дофамина драматически снижает приспособленность *Drosophila virilis* // ДАН. – 2005. – Т.401. – С. 424–426.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352с.
- Литвинова Е.М. Биология размножения дрозофилы // Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле. – Новосибирск: Наука, 1977. – С. 19–61.
- Лучникова Е.М. Регуляция численности и структура популяции у дрозофилы // Дрозофила в экспериментальной генетике. – Новосибирск: Наука, 1978. – С. 171–196.
- Раушенбах И.Ю. Стресс-реакция насекомых: механизм, гормональный контроль, роль в адаптации // Генетика. – 1997. – Т.33, №8. – С. 1110–1118.
- Раушенбах И.Ю., Груntenко Н.Е., Карпова Е.К. и др. 20-гидроксиэкизон взаимодействует с ювенильным гормоном и дофамином в контроле плодовитости *Drosophila virilis* // ДАН. – 2005. – Т.400. – С. 847–849.
- 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.
- Хухо Ф. Нейрохимия. Основы и принципы. – М.: Мир, 1990. – 384с.
- Clark A.M., Clark E.G. The genetic effects of caffeine in *Drosophila melanogaster* // Mutation Research. – 1968. – №6. – P. 227–234.
- Deriabina A.S., Grokhilina 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.
- Gruntenko N.E., Karpova E.K., Adonyeva N.V. et al. Juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone and dopamine interaction in *Drosophila virilis* reproduction under normal and nutritional stress conditions // Insect Physiol. – 2005. – Vol.51. – P. 417–425.
- Poltev V.I., Grokhilina 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.

Вплив кофеїну на деякі адаптивно важливі ознаки у *Drosophila melanogaster* Meig.

О.В.Горенська, Н.В.Бугорська

Вивчено вплив кофеїну у концентраціях 1 мг/мл, 0,5 мг/мл і 0,25 мг/мл на показники реальної плодючості, життєздатності і пристосованості (відносної ефективності розмноження) у *Drosophila melanogaster* на протязі семи поколінь впливу. Показано, що хронічна дія кофеїну супроводжується зниженням кількості потомків як на стадії імаго, так і на стадії лялечки. Виявлено залежність відносної пристосованості від концентрації досліджуваної біологічно активної речовини та тривалості її впливу.

Ключові слова: *реальна плодючість, життєздатність, пристосованість, дрозофіла, кофеїн.*

The influence of caffeine on the some important adaptive traits in *Drosophila melanogaster* Meig.

O.V.Gorenskaja, N.V.Bugorskaja

The influence of caffeine in the concentration of 1 mg/ml, 0,5 mg/ml and 0,25 mg/ml on real fecundity, viability and fitness (relative efficiency of reproduction) in *Drosophila melanogaster* after seven generations of the treatment was studied. It is shown, that the chronic action of caffeine is accompanied by a decrease of the quantity of descendants as at a stage of imago as at a stage of pupa. Dependence of relative fitness on the concentration of the studied biologically active substance and on the time of its influence is revealed.

Key words: *real fecundity, viability, fitness, Drosophila melanogaster, caffeine.*

Представлено: П.Ю.Монтвідом

Рекомендовано до друку: А.В.Некрасовою