

**ІНДУКЦІЯ РАННІХ ЕКДИЗОНОВИХ ПУФІВ У СЛИННИХ ЗАЛОЗАХ
DROSOPHILA MELANOGASTER ПІД ВПЛИВОМ СИНТЕТИЧНИХ
АНАЛОГІВ ЕКДИЗОНУ ЗА УМОВ *IN VITRO***

В. Страшнюк^{1*}, О. Горенська¹, А. Марченко¹, В. Какпаков²

¹НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
майдан Свободи, 4, Харків 61022, Україна

²Інститут загальної генетики імені М.І. Вавилова РАН
вул. Губкіна, 3, Москва 119991, Російська Федерація
e-mail: vladimir.strashnyuk@mail.ru

У системі *in vitro* досліджено вплив на пуфінг політених хромосом *Drosophila melanogaster* двох синтетичних стероїдних препаратів – (24R)-3 β ,5-дигідрокси-5 α -стигмастан-6-ону і (24R)-5 α -стигмастан-3 β ,5,6 β -тріолу. Виявлено індукцію ранніх екдизонових пуфів, спричинену дією досліджуваних препаратів, що свідчить про те, що вони є біологічними аналогами екдизону. Обговорюється практичне значення гормонів комах. Запропоновано спосіб визначення екдизону та його аналогів у культуральному середовищі.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, аналоги екдизону, політени хромосоми, пуфінг.

Одним із ключових факторів онтогенезу комах є участь ендокринної системи у реалізації генетичної програми розвитку. Провідну роль у цих процесах відіграють гормон линьки екдизон і ювенільний гормон (ЮГ) [2, 11]. Їх вміст у гемолімфі змінюється залежно від стадії розвитку. Підвищення титру екдизону має місце під час линьок і метаморфозу. Міжлинкові періоди характеризуються високим рівнем ЮГ. Вони діють як неповні антагоністи, спричиняючи каскад змін генної активності, активуючи одні та пригнічуючи інші локуси хромосом [21, 29].

Одним із підходів до вивчення механізмів, що регулюють розвиток комах, є дослідження гормональної індукції в умовах культивування клітин і органів у системі *in vitro* [7, 20]. Патерни пуфів, що активуються екдизоном в умовах *in vitro*, збігаються зі змінами картини пуфінгу в онтогенезі личинок і передлялечок, які корелюють зі змінами рівня екдистерону в гемолімфі [20, 21].

Практичний інтерес до гормональних препаратів пов'язаний із можливістю за їх допомогою керувати розвитком комах, впливати на їхню життєздатність [12, 19]. У неоптимальних дозах і застосовані в критичні періоди розвитку, гормони безхребетних діють як інсектициди і використовуються для боротьби з комахами-шкідниками, ектопаразитами домашніх тварин, побутовими комахами, переносниками інфекційних хвороб тощо [5, 8, 9, 19].

Використання екдистероїдів як інсектицидів обмежене їхніми водорозчинними властивостями. У зв'язку з цим розробляються нові, у тому числі нерозчинні у воді, синтетичні препарати – аналоги екдизону, які потребують експериментальної перевірки.

Метою роботи було дослідити біологічну активність нових синтетичних стероїдних препаратів: (24R)-3 β ,5-дигідрокси-5 α -стигмастан-6-ону і (24R)-5 α -стигмастан-3 β ,5,6 β -тріолу.

Матеріали та методи

Особливості будови молекул досліджуваних препаратів порівнянно з різними формами екдизону наведені на рис. 1. Враховуючи специфічність реакції певних локусів політенних хромосом на дію екдистерону, як тест-систему для перевірки біологічної активності нових препаратів використовували пуфінг політенних хромосом. Дослідження проводили за умов *in vitro*.

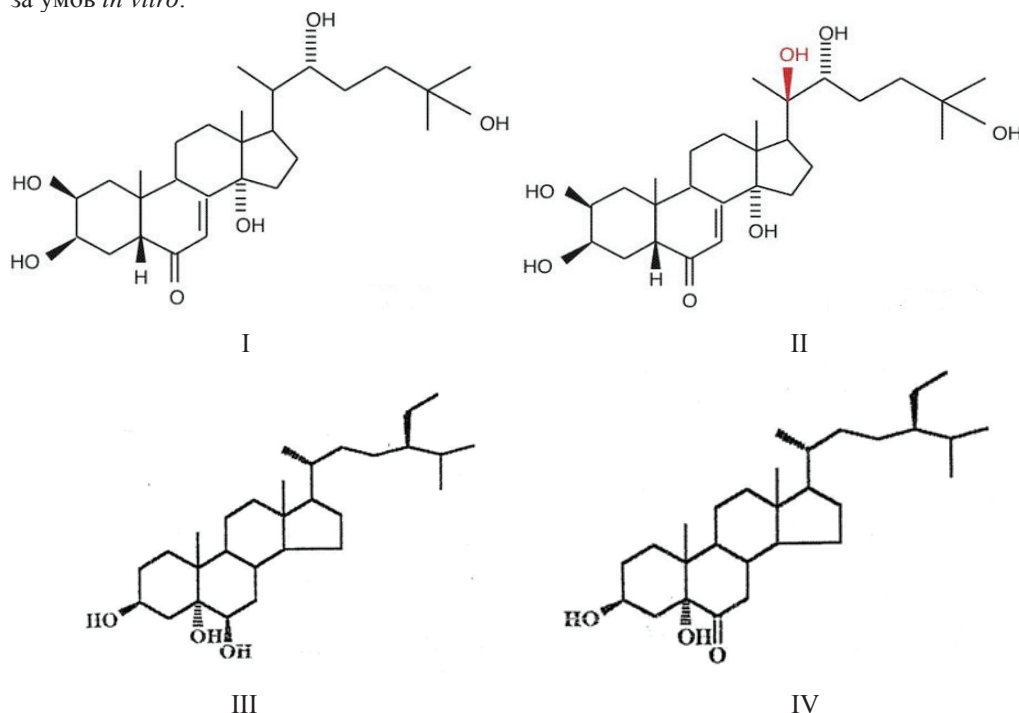


Рис. 1. Будова екдизону та його аналогів: I – α-екдизон; II – β-екдизон (20ОН-екдистерон, або екдистерон); III – (24R)-5а-стигмастан-3b,5,6b-тріол; IV – (24R)-3β,5-дигідрокси-5α-стигмастан-6-он.

Матеріалом для дослідження були слинні залози личинок лінії дикого типу *Oregon-R*. Культури дрозофіли розвивалися в умовах термостату за температури $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$. У дослід брали личинок 3-ї стадії розвитку в міжлиньковий період розвитку незадовго до настання стадії «блукуючої личинки» (пуфова стадія PS-1 за Ешбернером [21]), для чого використовували синхронізовану культуру дрозофіли, отриману при короткотривалій яйцекладці – за 2–3 год. На цій стадії розвитку активності екдизонових пуфів не спостерігається.

Вихідний розчин містив 1 мг/мл стероїдного препарату, розчиненого у спиртовому розчині з концентрацією етанолу 10% об. Для дослідження пуфінгу вихідний розчин змішували з фізіологічним розчином Ефруссі-Бідла у співвідношенні 1:1000, тим самим досягаючи концентрації стероїдного препарату 1 мкг/мл. Слинні залози личинок витримували в одержаному середовищі протягом 30 хв за температури $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$. У контролі інкубацію слинних залоз проводили у розчині Ефруссі-Бідла за відсутності стероїдних препаратів.

Пуфову активність досліджували на давлених ацетоорсеїнових препаратах політенних хромосом [14]. Локалізацію пуфів проводили за уточненими мапами Бріджеса [27]. Вивчали індукцію ранніх екдизонових пуфів: 2B5-6, 50CD, 63F, 71CE, 88D, 93D. Розміри пуфів зіставляли з шириною хромосом у районі близько розташованого диску, не залуче-

ного у процес пуфіювання. Відношення пуф/диск слугувало мірою пуфової активності. Вимірювання проводили за допомогою окуляр-мікрометра при збільшенні $\times 600$.

Результати і їхнє обговорення

Проведені дослідження показали, що обидва препарати – і (24R)-3 β ,5-дигідрокси-5 α -стигмастан-6-он, і (24R)-5 α -стигмастан-3 β ,5,6 β -тріол – спричиняють індукцію ранніх екдизонових пуфів у досліджених локусах політених хромосом. Активацію пуфів у відповідних локусах ілюструють наведені мікрофотографії (рис. 2, б, в). У контролі, за відсутності стероїдних препаратів, екдизонових пуфів не спостерігали (рис. 2, а).

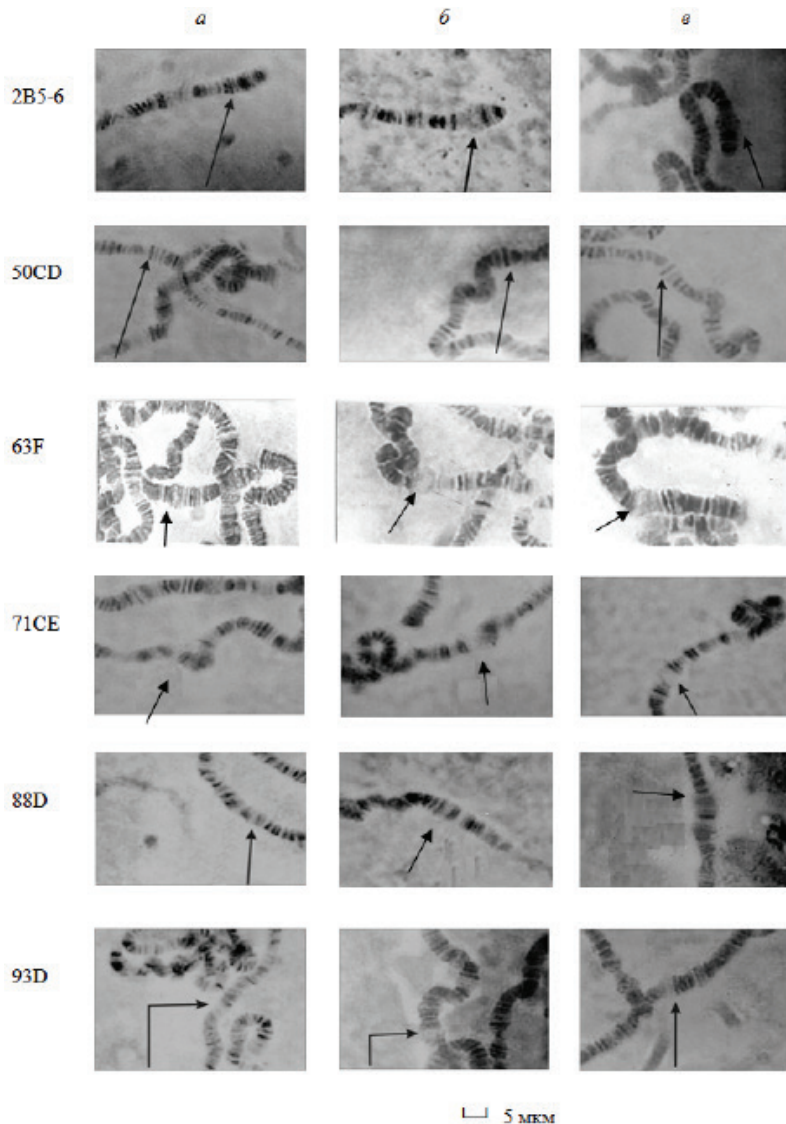
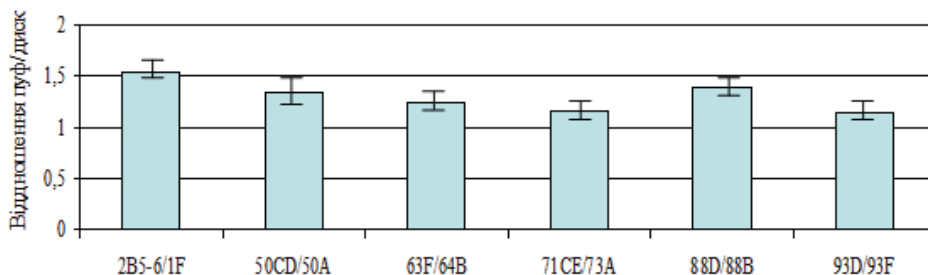


Рис. 2. Індукція *in vitro* ранніх екдизонових пуфів у політених хромосомах *Drosophila melanogaster* під впливом синтетичних аналогів екдизону: а – контроль, б – (24R)-3 β ,5-дигідрокси-5 α -стигмастан-6-он, в – (24R)-5 α -стигмастан-3 β ,5,6 β -тріол; забарвлення ацетоорсеїном, збільшення $\times 600$.

Розміри пувів, активованих (24R)-3 β ,5-дигідрокси-5 α -стигмастан-6-оном і (24R)-5 α -стигмастан-3 β ,5,6 β -тріолом, становили у середньому 1,2–1,8 бала (відмінність від контролю: $p < 0,001$) (рис. 3). Серед них добре виражений пув 2B5-6, який, як відомо, відіграє ключову роль у активації каскаду екдизонових пувів [23]. У локусі розташований ген *ecs* (*ecdysterone sensitivity*), мутації або делеції якого призводять до повної втрати здатності клітин реагувати на гормон, зупинки розвитку наприкінці 3-ї личинкової стадії навіть за наявності у гемолімфі екдизону.

а



б

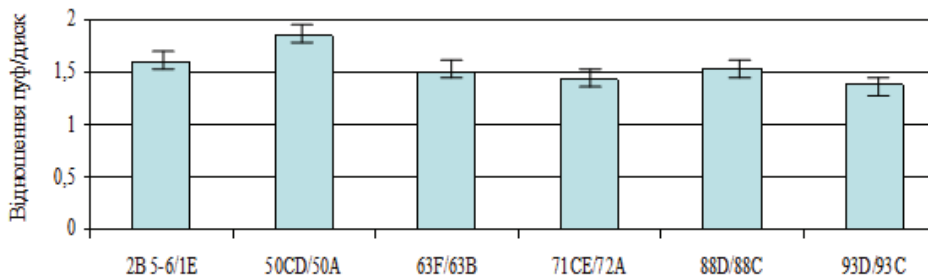


Рис. 3. Розміри ранніх екдизонових пувів у політених хромосомах *Drosophila melanogaster* при дії (24R)-3 β ,5-дигідрокси-5 α -стигмастан-6-ону (а) і (24R)-5 α -стигмастан-3 β ,5,6 β -тріолу (б) за умов *in vitro*.

Раніше було встановлено функціонування каскадного механізму активації генів у онтогенезі дрозофіли під впливом екдизону. Для пояснення цього процесу Ешбернер запропонував тригерну модель [22], яка у подальшому була доповнена Річардсом [29]. Згідно з цією моделлю, екдизонові пуфи поділяються на ранні та пізні. Ранні пуфи активуються за кілька (до 30-ти) хвилин після контакту з гормоном, досягають максимуму за 4 год, а потім регресують. Пізні пуфи, які поділяють на ранні-пізні та пізні, активуються після затримки у кілька годин.

Дослідженню генетичних і молекулярних механізмів дії екдизону приділяється велика увага. На сьогодні доведена ключова роль білкового рецептора у дії гормону. Припускається, що саме структура рецептора, яка змінюється під впливом гормону, і є причиною різнобічного впливу екдизону на розвиток комах [6, 11, 26]. Це також пояснює наявність великої кількості його аналогів і агоністів, хімічна структура яких часто не має нічого спільного з природними гормонами [11, 30].

Індукцію ранніх екдизонових пувів у дрозофіли за умов *in vitro* під впливом різних форм екдизону та його аналогів досліджували у роботах Берендеса [24], Ешбернера [20], Полуектової та ін. [15], Річардса [28] та інших авторів. Активацію пувів вдається ви-

кликати також шляхом ін'єкції стероїдних препаратів у гемолімфу личинок [25]. Екдизон також спричиняє регресію міжлинькових пувів. Раніше у системі *in vitro* ми досліджували активність екдистерону рослинного походження російського виробництва «ЭСО» у складі препарату ВЕСБ (вітамінний, екдистероновий стимулятор бджіл) [13]. Біологічну активність (24R)-3 β ,5-дигідрокси-5 α -стигмастан-6-ону і (24R)-5 α -стигмастан-3 β ,5,6 β -тріолу за допомогою пуф-тесту досліджено нами вперше.

Активність різних форм екдизону та його аналогів значною мірою залежить від наявності й кількості гідроксильних груп у бічному ланцюзі. Найактивніші сполуки (як β -екдизон) мають гідроксильні групи у положенні C20 і C22 (рис. 1); α -екдизон не має ОН-групи у положенні C20, і його активність на два порядки нижча, ніж β -екдизону. Але навіть за відсутності бічного ланцюга, або коли він вуглеводневий, аналоги гормону здатні проявляти активність, хоч і на невисокому рівні [20, 28]. Як і природні екдистероїди, молекули досліджених нами препаратів мають стероїдне ядро і бічний вуглеводневий ланцюг, їхні стероїдні ядра мають відмінності за положенням ОН-груп порівняно з α - і β -екдизоном.

Як уже було зазначено, практичний інтерес до гормональних препаратів пов'язаний із можливістю їх використання для керування онтогенезом комах і розробки нових біологічних методів регуляції чисельності комах-шкідників. Гормони здатні спричиняти різноманітні порушення розвитку, морфози та загибель комах. Специфічний вплив гормональних препаратів на комах виключає можливість звикання. Крім того, вони не мають токсичної дії на птахів і ссавців, що важливо з точки зору екологічної безпеки [5].

Багато рослин серед вторинних метаболітів здатні синтезувати сполуки, що імітують гормон лінки комах, так звані фітоекдизони. Припускається, що їхня присутність у тканинах рослин відіграє важливу роль у механізмах захисту рослин від шкідників. На сьогодні немає однозначної відповіді на питання про роль фітоекдизонів у житті рослин, дослідження складних взаємовідносин і коеволуційної адаптації між рослинами і тваринами триває. Дослідження у цьому напрямі передбачають можливість розвитку методів генної інженерії сільськогосподарських рослин, спрямованих на отримання стійких сортів [19].

Однак практичне значення гормонів членистоногих цим не обмежується. Наявні прямі докази щодо адаптивного значення екдизонів при пошкоджуючих впливах. Екдизони задіяні у процесах регенерації, детоксикації, підвищують рівень енергетичного обміну у комах [3]. Ендокринна система відіграє важливу роль у захисті комах в умовах стресу [17]. Екдистерон застосовується у бджільництві у складі препарату, який використовують для активації життєдіяльності бджіл, ослаблених зимівлею, несприятливим живленням і низкою захворювань [12]. Виявлено адаптогенну [16] та генопротекторну [4] дію рослинних екдистероїдів на ссавців, а також участь екдистерону в протипухлинних процесах [10]. Фітоекдистероїди використовуються для розробки фармакологічних препаратів, які підвищують фізичну працездатність, мають тонізуючу й анаболічну дію та призначені для профілактики і лікування хвороб, викликаних фізичними перевантаженнями у праці та спорті [1, 18].

Наведені дані літератури свідчать про те, що дослідження різноманітних властивостей і біологічної активності гормонів комах становлять значний практичний інтерес. У зв'язку з цим важливим є отримання і вивчення біологічної дії гормональних препаратів із новими властивостями.

Таким чином, на основі проведених досліджень можна зробити висновок про те, що нові синтетичні препарати – (24R)-3 β ,5-дигідрокси-5 α -стигмастан-6-он і (24R)-5 α -стигмастан-3 β ,5,6 β -тріол проявляють біологічну активність, тотожну екдизону.

З урахуванням специфічності набору пуфів, що активуються гормоном, пуф-тест був використаний нами для розробки способу визначення екдизону та його аналогів у культуральному середовищі [13].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Биляч Я. И. Исследование и стандартизация лекарственного средства для повышения физической работоспособности: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 03.00.02. Пятигорск, 2009. 20 с.
2. Буров Н. В. Механизмы гормональной регуляции линьки и метаморфоза // Тр. Всесоюз. энтомолог. об-ва. Л.: Наука, 1983. Т. 64. С. 44–63.
3. Головкин В. А., Волянский Ю. Л., Шахбазов В. Г. и др. Проблемы неспецифической устойчивости тутового шелкопряда. Физиологические, генетические, иммунологические и микробиологические аспекты. Харьков: РИП «Оригинал», 1996. 236 с.
4. Губский Ю. Н., Левицкий Е. Л., Холодова Ю. Д. и др. Механизмы генопротекторного действия препарата на основе фитоэкдистероидов (БТК-8Л) в условиях повреждения хроматина тетрахлорметаном // Биохим. журнал. 1993. Т. 65. № 6. С. 75–83.
5. Де Вильде Я. Гормональная борьба с насекомыми // Наука и человечество. М.: Знание, 1976. С. 147–153.
6. Жимулев И. Ф. Современные представления об организации и функционировании политенных хромосом // Сорос. образов. журнал. 1997. № 10. С. 2–7.
7. Какпаков В. Т. Культивирование клеток и тканей беспозвоночных // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1998. С. 241–250.
8. Какпаков В. Т., Солопов Н. В. Биотехнологический метод регуляции численности оводов-возбудителей энтомозов северных оленей // Ветеринарная патология. 2009. № 1. С. 80–83.
9. Ковганко В. Н., Быховец А. И., Золотарь Р. М. и др. Оценка токсического действия α -хлорпиридинсодержащих производных стероидных триолов $3\beta,5\alpha,6\beta$ -триолов и 5β -3-гидрокси-6-кетонів на личинки колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. (Coleoptera) // Весці НАН Беларусі. Сер. аграр. навук. 2011. № 4. С. 68–72.
10. Коновалова Н. П., Митрохин И. Ю., Волкова Л. М. и др. Экдистерон модулирует противоопухолевую активность цитостатиков и их действие на биосинтез макромолекул в органах животных-опухоленосителей // Изв. РАН. Сер. биол. 2002. № 6. С. 650–658.
11. Митрофанов В. Г. Молекулярно-генетические механизмы действия гормонов развития у насекомых // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 5. С. 330–344.
12. Пат. №2034504 Российская Федерация, МКИ 6A23K1/18. Препарат для стимуляции размножения насекомых / Какпаков В. Т., Кулинич А.В. (Россия); заявл. 18.11.1993; опубл. 10.05.1995. 4 с.
13. Пат. № 27010 Україна, МПК 2006 G01N33/554, G01N33/567. Спосіб визначення екдизону у культуральному середовищі / Страшнюк В. Ю., Горенська О. В., Какпаков В. Т.; Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна. № u 2007 06744; заявл. 15.06.2007; опубл. 10.10.2007, Бюл. 16. 4 с.
14. Полуэктова Е. В., Евгеньев М. Б. Техника изготовления препаратов политенных хромосом // Методы биологии развития. М.: Наука, 1974. С. 517–519.
15. Полуэктова Е. В., Мухоматова Л. М., Какпаков В. Т., Митрофанов В. Г. Кинетика пуффинга районов-индикаторов экдистерона в хромосомах слюнных желез личинок *Drosophila virilis* Sturt., культивируемых *in vitro* // Онтогенез. 1987. Т. 18. № 2. С. 140–146.

16. Пчеленко Л. Д., Метелкина Л. Г., Володина С. О. Адаптогенный эффект экидистероидсодержащей фракции *Serratula coronata* L. // Химия растительного сырья. 2002. № 1. С. 69–80.
17. Раушенбах И. Ю., Суханова М. Ж., Хирашима А. и др. Роль системы экидистероидов в регуляции размножения *Drosophila* в стрессирующих условиях среды // Докл. РАН. 2000. Т. 375. № 4. С. 568–570.
18. Тимофеев Н. П. Фитоэкидистероиды: Фармакологическое использование и активность // Мед. науки. 2005. Т. 4. №10. С.26–66.
19. Уфимцев К. Г. Действие экидистероидов растения *Serratula coronata* L. на развитие и поведение личинок некоторых видов насекомых-фитофагов: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16. Сыктывкар, 2004. 185 с.
20. Эшбернер М. Генетический и гормональный контроль пуффинга политенных хромосом *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 1974. Т. 5. № 2. С. 107–121.
21. Ashburner M. Puffing patterns in *Drosophila melanogaster* and related species // Results and problems in cell differentiation. Berlin: Springer-Verlag, 1972. P. 101–151.
22. Ashburner M. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* II. The effect of inhibitors of protein synthesis // Develop. Biol. 1974. Vol. 39. P. 141–157.
23. Belyaeva E. S., Vlasova I. F. Biyasheva Z. M. et al. Cytogenetic analysis of the 2B3-4-2B11 region of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. II Changes in 20-OH-ecdysone puffing caused by genetic defects of puff 2B5 // Chromosoma. 1981. Vol. 84. P. 207–219.
24. Berendes H. D. The effect of ecdysone analogues on the puffing pattern of *Drosophila hydei* // Dros. Inform. Serv. 1968. Vol. 43. P. 145.
25. Clever U., Clever I., Storbeck I., Young N. L. The apparent requirement of two hormones α - and β -ecdysone for moulting induction in insect // Develop. Biol. 1973. Vol. 31. P. 47–60.
26. Hill R. J., Billas I. M. L., Bonneton F. et al. Ecdysone receptors: from the Ashburner model to structural biology // Ann. Rev. Entomol. 2012. Vol. 58. P. 251–271.
27. Lindsley D. L., Grell E. H. Genetic variations of *Drosophila melanogaster* // Carnegie Inst. Wash. Publ. 1968. N 627. 472 p.
28. Richards G. The relative biological activities of α - and β -ecdysone and their 3-dehydro derivatives in the chromosome puffing assay // J. Insect Physiol. 1978. Vol. 24. P. 329–335.
29. Richards G. The ecdysone regulatory cascades in *Drosophila* // Advances in Developmental Biology. 1997. Vol. 5. P. 81–135.
30. URL [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://ecdybase.org/>.

Стаття: надійшла до редакції 26.12.14

доопрацьована 21.04.14

прийнята до друку 03.06.14

IN VITRO INDUCTION OF EARLY ECDYSONE PUFFS IN THE SALIVARY GLANDS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* UNDER THE INFLUENCE OF SYNTHETIC ANALOGUES OF ECDYSONE**V. Strashnyuk¹, O. Gorenskaya¹, A. Marchenko¹, V. Какпаков²**¹*Institute of Biology of V. N. Karazin National University of Kharkiv
4, Svobody Sq., Kharkiv 61022, Ukraine*²*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science
3, Gubkin St., Moscow 119991, Russian Federation
e-mail: vladimir.strashnyuk@mail.ru*

The influence of two synthetic steroids – (24R)-3 β ,5-dihydroxy-5 α -stihmasthan-6-on and (24R)-5 α -stihmasthan-3 β ,5,6 β -triol on the puffing in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes was studied in the system *in vitro*. It was shown that the investigated preparations cause the induction of early ecdysone puffs, indicating that they are biological analogues of ecdysone. The practical importance of insect hormones is discussed. A method for determining ecdysone and its analogues in the culture medium is proposed.

Keywords: Drosophila melanogaster, ecdysone analogues, polytene chromosomes, puffing.

ИНДУКЦИЯ РАННИХ ЭКДИЗОНОВИХ ПУФОВ В СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ПОД ВЛИЯНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ЭКДИЗОНА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***В. Страшнюк¹, О. Горенская¹, А. Марченко¹, В. Какпаков²**¹*НИИ биологии Харьковского национального университета
имени В.Н. Каразина
пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина*²*Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН
ул. Губкина, 3, Москва 119991, Российская Федерация
e-mail: vladimir.strashnyuk@mail.ru*

В системе *in vitro* исследовано влияние на пуффинг политенных хромосом *Drosophila melanogaster* двух синтетических стероидных препаратов – (24R)-3 β ,5-дигидрокси-5 α -стигмастан-6-она и (24R)-5 α -стигмастан-3 β ,5,6 β -триола. Выявлена индукция ранних экдизоновых пуфов, обусловленная действием исследуемых препаратов, что свидетельствует о том, что они являются биологическими аналогами экдизона. Обсуждается практическое значение гормонов насекомых. Предложен способ определения экдизона и его аналогов в культуральной среде.

Ключевые слова: Drosophila melanogaster, аналоги экдизона, политенные хромосомы, пуффинг.