

СТРАШНЮК В. Ю.[✉], ТАГЛІНА О. В.

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,

Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4

[✉] volodymyr.strashnyuk@gmail.com, (067) 947-83-50**РЕПРОДУКЦІЯ ТА ЕНДОРЕДУПЛІКАЦІЯ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG.
ЗА ВПЛИВУ НІТРАТУ СВИНЦЮ**

Мета. Метою роботи було дослідити репродуктивну здатність та ступінь політенії хромосом у *Drosophila melanogaster* Meig. за впливу різних концентрацій нітрату свинцю. **Методи.** Матеріалом для досліджень була лінія дикого типу *Canton-S*. Мухи розвивалися на стандартному цукрово-дріжджовому середовищі, до якого в умовах експерименту додавали нітрат свинцю у концентраціях 0,1, 1 і 10 мг/мл. Репродуктивну здатність лінії оцінювали за кількістю нащадків імаго. Ступінь політенії хромосом у слинних залозах личинок досліджували наприкінці 3-ї стадії розвитку цитоморфометричним методом. **Результати.** Кількість нащадків імаго знижувалася за додавання у живильне середовище нітрату свинцю: за концентрації 0,1 мг/мл на 22,8 %, за 1 мг/мл – на 38,9 %. Концентрація 10 мг/мл була летальною. Самці проявляли більшу чутливість до препарату порівняно з самками. Ступінь політенії хромосом у слинних залозах личинок знизився в середньому на 5,0–6,5 %. **Висновки.** Нітрат свинцю спричиняє суттєве, дозозалежне зниження репродуктивної здатності плодових мушок і має токсичну дію на клітини дрозофіли, пригнічуючи процес ендоредуплікації.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster* Meig., важкі метали, плодючість, політенія хромосоми, ступінь політенії.

На сьогодні однією з найбільш актуальних екологічних проблем є забруднення середовища солями важких металів. Сполуки на основі важких металів спричиняють численні порушення в життєдіяльності окремо взятого організму і природних екосистем. Прикладом є солі свинцю, які навіть у низьких концентраціях здатні викликати імунні, психоневрологічні, гематологічні та інші порушення в організмі [1–3]. Дослідження біологічної дії важких металів стають все більш актуальними, враховуючи посилення впливу на біосферу антропогенного чинника.

Свинець як токсикант відноситься до речовин першого класу небезпеки. Його вміст у продуктах харчування, питній воді, атмосферному повітрі жорстко нормується [2, 4]. На думку експертів ВООЗ, концентрації свинцю, яка була б безпечною для здоров'я, не існує [1]. Особливо шкідливим є вплив свинцю на дітей молодшого віку [2, 4].

Основними джерелами свинцевого забруднення середовища є відходи і побічні продукти металургійних підприємств, теплові електростанції, кар'єри і шахти з видобутку поліметалевих руд, неочищені стічні води, транспорт, отрутохімікати та ін. Сполуки свинцю можуть тривалий час зберігатися в об'єктах навколишнього середовища, мігрувати, накопичуватися в організмах тварин і людини, завдаючи при цьому непоправної шкоди здоров'ю [4].

В останні роки науковці активно досліджують вплив важких металів, зокрема свинцю, на репродуктивну функцію, морфо- і онтогенез [2–5]. Водночас самі автори вказують на нестачу наукової інформації з цієї тематики.

Метою роботи було дослідити репродуктивну здатність та ступінь політенії хромосом у *Drosophila melanogaster* Meig. за впливу різних концентрацій нітрату свинцю. У завдання роботи входило вивчення впливу нітрату свинцю на кількість нащадків імаго, співвідношення статі, а також на рівень ендоредуплікації в слинних залозах личинок дрозофіли за різних концентрацій наявної речовини.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень була лінія дикого типу *Canton-S*. Мухи розвивалися на стандартному цукрово-дріжджовому середовищі за температури 24°C. В умовах експерименту до живильного середовища додавали нітрат свинцю у концентраціях 0,1, 1 і 10 мг/мл.

Репродуктивну здатність мух визначали за кількістю нащадків імаго, отриманих від однієї пари мух. Цей показник залежить від плодючості батьківського покоління та виживання нащад-

ків на преімагінальних стадіях розвитку. Згідно з Yamasaki [6], він тісно корелює із загальною пристосованістю особин. Проведено три повторності експерименту. У кожному варіанті досліджено потомство від 25–29 батьківських пар.

Політенні хромосоми вивчали на давлених препаратах слинних залоз дрозофіли, забарвлених ацетоорсеїном: 2 % орсеїну (Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина) у 45 % розчині оцтової кислоти (Реахімтранс, Київ, Україна). Препарати отримували на стадії блукаючої личинки наприкінці 3-ї стадії розвитку. Хромосоми досліджували за допомогою світлового мікроскопа (МБІ-6, «ЛОМО», Санкт-Петербург, Росія). Відмінності за ступенем політенії хромосом визначали цитоморфометричним методом [7]. Контрольні вимірювання ширини хромосом проводилися в межах диска 22А хромосоми 2L за збільшення мікроскопа $\times 560$. Співвідношення класів ядер із різним ступенем політенії вивчали за збільшення $\times 140$.

Розподіл ядер із різним рівнем політенії досліджували на тотальних препаратах слинних залоз. На підставі отриманих даних розраховували середній ступінь політенії хромосом у нормі та за впливу нітрату свинцю. У кожному варіанті дослідження вивчено препарати не менш як десяти личинок.

Згідно з Rodman [8], ініціювання нових циклів ендоредуплікації в політенних хромосомах припиняється за декілька годин до личинкопередлячкової лінки (формування пупарію). Гігантські хромосоми на цей час досягають ступенів політенії 256С, 512С, 1024С та 2048С. Кожен цикл ендоредуплікації призводить до

двократного збільшення кількості хроматинових фібрил у політенних хромосомах. Тому ядра з різним рівнем політенії можна легко розрізнити візуально. На цитологічних препаратах хромосоми з різним ступенем політенії відрізняються за шириною та інтенсивністю забарвлення (рис. 1). Товщина хромосом ядер різних класів у межах диска 22А, який використовувався для контрольних вимірювань, становила відповідно 1,6, 2,3, 3,2 і 4,6 мкм. Хромосоми з більшим ступенем політенії інтенсивніше забарвлюються ацетоорсеїном.

Проведено статистичний аналіз даних [9]. Перевірку на нормальність розподілів визначали методом Шапіро-Уїлка. Відмінності між різними варіантами дослідження визначали за допомогою дисперсійного аналізу. Значущість відмінностей оцінювали за t -критерієм Стюдента. Для множинних порівнянь застосовували поправку Бонферроні. Відмінності від контролю вважали значущими за $p \leq 0,05$ ($p' \leq 0,025$).

Результати та обговорення

Результати дослідження впливу нітрату свинцю на репродуктивну здатність плодових мушок представлені на рис. 2. Кількість нащадків імаго знижувалася за всіх вивчених концентрацій препарату. З'ясовано залежність змін досліджуваного показника від вмісту нітрату свинцю у живильному середовищі. За концентрації препарату 0,1 мг/мл вихід імаго зменшився в середньому на 22,8 % ($p < 0,002$), за 1 мг/л – на 38,9 % ($p < 0,002$). Концентрація 10 мг/мл виявилася летальною, за цих умов ми взагалі не отримали потомства мух.

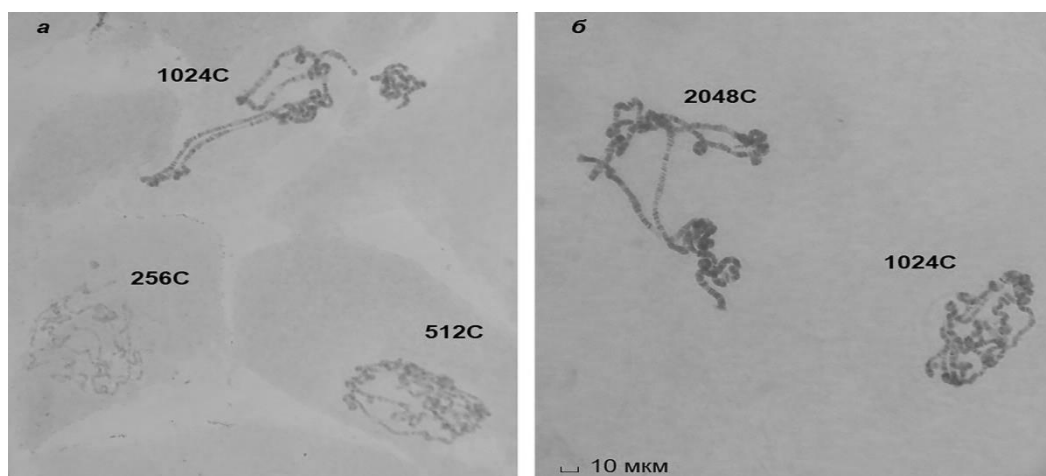


Рис. 1. Хромосоми слинних залоз личинок *D. melanogaster* з різним ступенем політенії (забарвлення ацетоорсеїном, збільшення $\times 140$): а – проксимальна частина слинної залози; б – дистальна частина слинної залози.

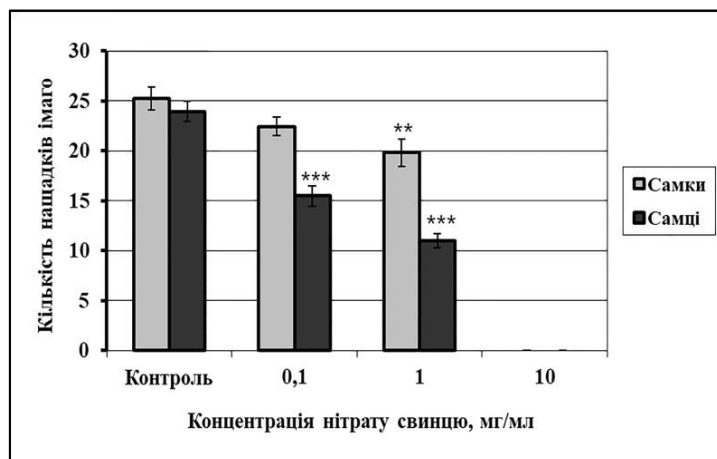


Рис. 2. Кількість нащадків імаго *D. melanogaster* за різної концентрації нітрату свинцю у живильному середовищі. Різниця відносно контролю значуща за: ** $p < 0,02$; *** $p < 0,002$.

Результати дослідження свідчать також про різну чутливість самок і самців до дії нітрату свинцю. Якщо у контролі співвідношення статей не відрізнялося від 1:1, то за концентрації препарату 0,1 мг/мл частка самців становила 40,9 %, а за концентрації 1 мг/мл – 35,7 %. В обох випадках зниження частки самців було значущим ($p < 0,001$).

Таким чином, нітрат свинцю спричиняє пригнічувальну дію на репродуктивну здатність плодових мушок. Вплив препарату залежить від його концентрації у живильному середовищі. Самці проявляють більшу чутливість до препарату у порівнянні з самками.

Одержані результати узгоджуються з даними про вплив солей свинцю на репродуктивну здатність тварин, отриманими на інших модельних об'єктах, зокрема на щурах [2, 5].

Іншим завданням роботи було дослідити вплив нітрату свинцю на ендоредуплікацію гігантських хромосом у дрозофіли. Враховуючи, що концентрація препарату 10 мг/мл виявилася летальною, дослідження ступеня політенії хромосом у слинних залозах личинок дрозофіли досліджували за концентрацій 0,1 та 1 мг/мл.

Відсотковий розподіл ядер із різним ступенем політенії хромосом представлено на рисунку 3. Згідно з отриманими даними, за додавання у живильне середовище нітрату свинцю у концентраціях 0,1 та 1 мг/мл спостерігається збільшення частки ядер зі ступенем політенії 512С ($p < 0,02$) і зменшення кількості ядер 1024С ($p < 0,05$). Частка ядер із мінімальним ступенем політенії (256С) не зазнавала істотних змін, а кількість ядер з максимальною плоідністю (2048С) була незначною як в контролі, так і в умовах дії досліджуваного фактора.

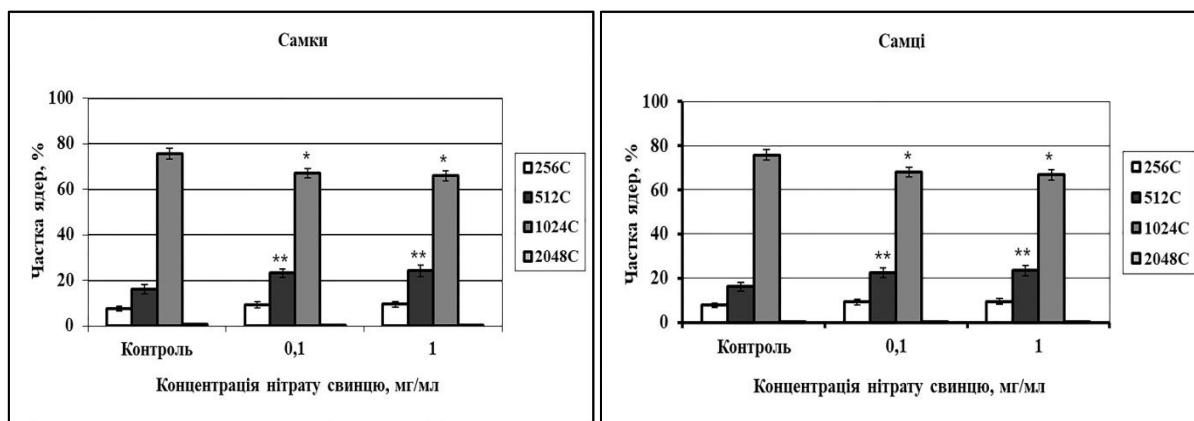


Рис. 3. Розподіл ядер із різним ступенем політенії хромосом у слинних залозах личинок *D. melanogaster* за різної концентрації нітрату свинцю у живильному середовищі. Різниця відносно контролю значуща за: * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$.

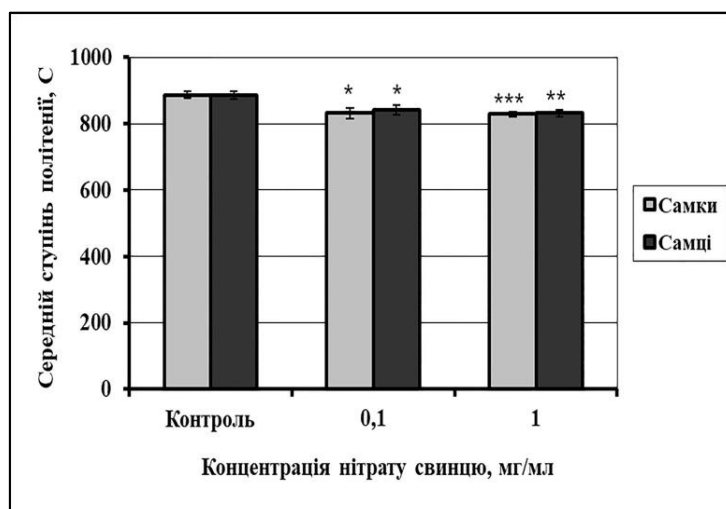


Рис. 4. Середні значення ступеня політенії хромосом у слинних залозах личинок *D. melanogaster* за різної концентрації нітрату свинцю у живильному середовищі. Різниця відносно контролю значуща за: * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,002$.

На рисунку 4 представлені дані про середній ступінь політенії у різних дослідних варіантах. Цей показник був розрахований на основі відсоткового співвідношення ядер із різним ступенем політенії.

Згідно з отриманими результатами, ступінь політенії хромосом в умовах додавання у живильне середовище нітрату свинцю у концентраціях 0,1 та 1 мг/мл знизився в середньому на 6,2–6,5 % у самок ($p < 0,05$ – $0,002$) і на 5,0–6,0 % у самців ($p < 0,05$ – $0,02$). Відмінності в дії різних концентрацій препарату були несуттєвими. Виражене у відсотках, здавалося б незначне, зниження плоідності геному насправді означає зменшення кількості копій ДНК на клітину в середньостатистичному вимірі на 44–58 одиниць. До того ж, враховуючи особливості матричного синтезу, ефект має посилюватися на рівні транскрипції та трансляції.

Отримані дані свідчать про те, що нітрат свинцю спричиняє токсичну дію на клітини дрозофіли, пригнічуючи процес ендоредуплікації.

Відомо, що ендоецикли сприяють прискореному росту [10], реагуванню на фізіологічний стрес [11–13] та адаптації до умов навколишнього середовища [13, 14], регуляції гомеостазу та регенерації тканин [15]. Ендоредуплікація лежить в основі альтернативного проліферації так званого ауксетичного способу росту. За оцінками експертів, у такий спосіб продукується близько половини біомаси планети [16].

Як і проліферативний ріст, ендоредуплікація є досить чутливою до дії як генетичних, так і зовнішніх чинників [17]. Зокрема, у роботі [18] з'ясовано вплив на ендоредуплікацію та життєздатність плодкових мушок монотерпеноїдів та похідних фенолу. Зокрема, пригнічувальну дію мало додавання евгенолу у культуральне середовище. В іншій роботі [19] виявлено суттєве зниження ступеня політенії хромосом дрозофіли за впливу новітніх пестицидів Лінтур® та Квадріс® (відповідно на 31,3 % та 50,1 %).

Дані про вплив токсичних сполук на процес ендоредуплікації у дрозофіли були покладені в основу розробленого нами способу визначення токсичної дії хімічної речовини [21].

Висновки

Кількість нащадків імаго знижувалася за додавання у живильне середовище нітрату свинцю: за концентрації 0,1 мг/мл – на 22,8 %, за 1 мг/мл – на 38,9 %. Концентрація 10 мг/мл була летальною. Самці проявляли більшу чутливість до препарату порівняно з самками. Ступінь політенії хромосом у слинних залозах личинок знизився в середньому на 5,0–6,5 %. Отримані дані свідчать про те, що нітрат свинцю спричиняє суттєве, дозозалежне зниження репродуктивної здатності плодкових мушок і має токсичну дію на клітини дрозофіли, пригнічуючи процес ендоредуплікації.

References

1. WHO: Lead poisoning and health. *Newsroom*. 23 August 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>.
2. Kolosova I.I. Effect of lead acetate, salts of heavy metals on reproduction. *Bulletin of Problems in Biology and Medicine*. 2013. Vol. 2 (103), Is. 3. P. 13–17. [in Russian] / Колосова И.И. Влияние ацетата свинца, солей тяжёлых металлов на репродуктивную функцию. *Вісник проблем біології та медицини*. 2013. Т. 2 (103), Вип. 3. С. 13–17.
3. Nefodova O.O., Zadesenets I.P., Galperin A.I. Influence of cadmium and lead compounds on morphogenesis of internal organs in ontogenesis. *Bulletin of Problems in Biology and Medicine*. 2017. Vol. 3 (141), Is. 4. P. 61–66. [in Russian] / Нефьодова О.О., Задесенец І.П., Гальперин А.І. Влияние соединений кадмия и свинца на морфогенез внутренних органов в онтогенезе. *Вісник проблем біології та медицини*. 2017. Т. 3 (141), Вип. 4. С. 61–66.
4. Morais S., Costa F.G., Pereira M.L. Heavy metals and human health. In: *Environmental Health - Emerging Issues and Practice*. 2012. P. 227–246. doi: 10.5772/29869.
5. Kolosova I.I. Morphological characteristics of rat ovaries at different stages of pregnancy in normal and in condition of lead intoxication. *Bulletin of Problems in Biology and Medicine*. 2016. Vol. 1 (103), Is. 1. P. 281–287. [in Ukrainian] / Колосова І.І. Морфологічна характеристика яєчників щурів на різних термінах вагітності в нормі та за умов свинцевої інтоксикації. *Вісник проблем біології та медицини*. 2016. Т. 1 (126), Вип. 1. С. 281–287.
6. Yamasaki T. Measurement of fitness and its components in six laboratory strains of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1984. Vol. 108. P. 201–211.
7. Strashnyuk V.Yu., Nepeivoda S.N., Shakhbazov V.G. Cytomorphometric analysis of *Drosophila melanogaster* Meig. polytene chromosomes in relation to heterosis, selection for adaptively valuable traits, and sex. *Rus. Journ. Genet.* 1995. Vol. 31. P. 17–21.
8. 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.
9. Atramentova L.O., Utevska O.M. Statistika dlia biologiv. Kharkiv: Vydavnytstvo “NTMT”, 2014. 331 p. [in Ukrainian] / Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистика для біологів. Харків: Видавництво «НТМТ», 2014. 331 с.
10. Marguerat S., Bähler J. Coordinating genome expression with cell size. *Trends Genet.* 2012. Vol. 28. P. 560–565. doi: 10.1016/j.tig.2012.07.003.
11. Fox D.T., Duronio R.J. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development*. 2013. Vol. 140. P. 3–12. doi: 10.1242/dev.080531.
12. Skorobagatko D.A., Mazilov A.A., Strashnyuk V.Yu. Endoreduplication in *Drosophila melanogaster* progeny after exposure to acute γ -irradiation. *Radiat Environ Biophys*. 2020. doi: 10.1007/s00411-019-00828-8.
13. Zhuravleva L.A., Strashnyuk V.Yu., Shakhbazov V.G. Influence of culture density on the polyteny degree of giant chromosomes in inbred lines and hybrids of *Drosophila melanogaster*. *Tsitol Genet.* 2004. Vol. 38. P. 46–51 [In Russian] / Журавлёва Л.А., Страшнюк В.Ю., Шахбазов В.Г. Влияние плотности культуры на степень политенности гигантских хромосом инбредных линий и гибридов *Drosophila melanogaster*. *Цитология и генетика*. 2004. Т. 38, № 3. С. 46–51.
14. Dyka L.D., Shakina L.A., Strashnyuk V.Yu., Shchorbatov Yu.G. Effects of 36,6 GHz and static magnetic field on degree of endoreduplication in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Int. J. Radiat. Biol.* 2016. Vol. 92. P. 222–227. doi: 10.3109/09553002.2016.1137105.
15. Øvrebø J.I., Edgar B.A. Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration. *Development*. 2018. doi: 10.1242/dev.156034.
16. Sugimoto-Shirasu K., Roberts K. “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr.t Opin. Plant Biol.* 2003. Vol. 6. P. 544–553.
17. Shakina L.A., Strashnyuk V.Yu. Genetic, molecular, and humoral endocycle-regulating mechanisms. *Rus. Journ. Genet.* 2011. Vol. 47. P. 1151–1160. doi:10.1134/S1022795411100164.
18. Nesterkina M., Bilokon S., Aliksieieva T., Chubyk I., Kravchenko I. The influence of monoterpenoids and phenol derivatives on *Drosophila melanogaster* viability. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2018. Vol. 21. P. 793–796. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.06.004>.
19. Bilokon S.V., Aliksieieva T.G. Stupin' politenii gigantskykh chromosom *Drosophila melanogaster* za dii pestytsydiv. *Drosophila v Experimentalnij Genetytsi ta Biologii: Materialy VI Mizhnarodnoi Konferentsii* (Kharkiv, Serpen' 20–24, 2018). Kharkiv, 2018. S. 12–15. [in Ukrainian] / Білоконь С.В., Алексеева Т.Г. Ступінь політенії гігантських хромосом *Drosophila melanogaster* за дії пестицидів. *Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології: Матеріали VI Міжнародної наук. конф.* (Харків, 20–24 серпня 2018 р.). Харків, 2018. С. 12–15.
20. Strashnyuk V.Yu., Taglina O.V., Bilokon S.V., Aliksieieva T.G. Metod vyznachennia toxichnoi dii khimichnoi rechovyny: pat. 116640 Ukraina: (2006.01) G01N 33/554. № u 2019 03850; appl. 15.04.2019; publ. 11.11.2019, Bul. No. 21. 4 p. [in Ukrainian] / Страшнюк В.Ю., Тагліна О.В., Білоконь С.В., Алексеева Т.Г. Спосіб визначення токсичної дії хімічної речовини: пат. 137874 Україна: МПК (2006.01) G01N 33/554. № u 2019 03850; заявл. 15.04.2019; опубл. 11.11.2019, Бюл. № 21. 4 с.

STRASHNYUK V.Yu., TAGLINA O.V.

V.N. Karazin Kharkiv National University,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svoboda sq., 4, e-mail: volodymyr.strashnyuk@gmail.com

REPRODUCTION AND ENDOREDUPPLICATION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG. WHEN INFLUENCED BY LEAD NITRATE

Aim. The purpose of investigation was to study the reproductive ability and polyteny degree of chromosomes in *Drosophila melanogaster* Meig. under the influence of various concentrations of lead nitrate. **Methods.** Canton-S wild-

type strain was used as the material. Flies developed on standard sugar-yeast medium, to which in the experiment lead nitrate was added in concentrations of 0.1, 1, and 10 mg/ml. The reproductive ability of the strain was evaluated by the number of adult offspring. The polyteny degree of chromosomes was studied on squashed preparations of larva salivary glands stained with aceto-orsein by cytomorphometry. The preparations were obtained at late 3rd instar. **Results.** The number of adult offsprings decreased when lead nitrate was added to the nutrient medium: at a concentration of 0.1 mg/ml – by 22.8 %, at 1 mg/ml – by 38.9 %. A concentration of 10 mg/ml was lethal. Males showed greater sensitivity to the drug compared to females. The degree of polyteny of chromosomes in the salivary glands of larvae decreased on average by 5.0–6.5 %. **Conclusions.** Lead nitrate causes a significant, dose-dependent decrease in the reproductive ability of fruit flies and has a toxic effect on *Drosophila* cells, inhibiting the process of endoreduplication. **Keywords:** *Drosophila melanogaster* Meig., heavy metals, fecundity, giant chromosomes, polyteny.