

УДК 577.152.31:591.3/.4/.8:595.773.4

**А. М. Андриевский**, канд. биол. наук, доц., докторант, **В. А. Кучеров**, мл. науч. сотр., **В. Н. Тоцкий**, д-р биол. наук, проф., зав. каф. Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина, E-mail: andriev\_scar@mail.ru

## СИСТЕМА КАРБОКСИЭСТЕРАЗ *DROSOPHILA MELANOGASTER* В ОНТОГЕНЕЗЕ

Методом специфической гистохимической окраски гелевых блоков после электрофореза с последующей компьютерной денситометрией изучали качественные и количественные изменения ферментов подподкласса гидролаз эфиров карбоновых кислот в онтогенезе дрозофилы. Показано многообразие гидролаз эфиров карбоновых кислот на стадиях эмбрионального и постэмбрионального развития плодовой мушки. Установлена зависимость молекулярных форм различных эстераз и интенсивности их проявления на электрофореграммах от фазы онтогенеза.

**Ключевые слова:** гидролазы эфиров карбоновых кислот, онтогенез, дрозофила.

Согласно имеющимся в литературе данным, гидролазы эфиров карбоновых кислот (КФ: 3.1.1) у животных представлены различными группами ферментов: карбоксиэстеразами (КФ: 3.1.1.1), расщепляющими эфиры алифатических спиртов, арилэстеразами (КФ: 3.1.1.2), гидролизующими эфиры ароматических спиртов, ацетилэстеразами (КФ: 3.1.1.6), ацетилхолинэстеразами и холинэстеразами (КФ: 3.1.1.7 и 3.1.1.8), а также другими со сходной функцией ферментами [1–5].

Главная функция этих ферментов определяется непосредственным участием в метаболизме разнообразных эфиров карбоновых кислот в клетках, как пищеварительной, кровеносной, нервной, выделительной, половой и других систем. У некоторых видов насекомых обнаружены эстеразы, расщепляющие сложные эфиры карбоновых кислот, входящие в состав кормовой среды [6]; ацетилхолинэстеразы, регулирующие уровень ацетилхолина в постсинаптических структурах нервной ткани и контролирующие двигательную активность организма [7, 8]; эстеразы ювенильного гормона и феромонов, ответственные за метаморфоз и половые отношения в репродуктивный период [9, 10]; карбоксиэстеразы, расщепляющие инсектициды и другие токсические вещества сложноэфирной природы [11, 12]. От каталитической функции этих ферментов может зависеть степень приспособленности организма к факторам окружающей среды. К сожалению, роль гидролаз эфиров карбоновых кислот в формировании онтогенетических и филогенетических адаптивных реакций животных остаётся мало изученной.

Эстеразы могут существовать в виде множественных молекулярных форм, отражающих как генотипическую, так и паратипическую изменчивость организмов. Однако, если генотипическая изменчивость определяется разнообразием аллелей конкретного локуса, то паратипическая — главным образом посттрансляционной модификацией конечных генопродуктов. Немаловажную роль в этом модификационном процессе играют гидролитические ферменты, в частности протеиназы, осуществляющие реакции ограниченного и неограниченного протеолиза. Таким образом, отдельные биохимические признаки являются результатом экспрессии соответствующих аллельных генов и модифицирования их продуктов при определенных условиях внешней и внутренней среды [5, 13].

Как показано на биологических объектах разных систематических групп [14–21], аллельная детерминация и активность ряда ферментов претерпевают существенные изменения в ходе индивидуального развития организмов. При этом наблюдаемые изменения могут отражать процесс дифференциации клеток и тканей, а также адаптационную способность особей при переходе от одной стадии онтогенеза к другой. Наиболее интересными, на наш взгляд, являются возрастные перестройки функционирования гидролитических ферментов у насекомых с полным типом превращения, в частности у плодовой мухи *D. melanogaster* [22]. Используя этот вид в качестве модельного объекта, мы исследовали многообразие форм гидролаз эфиров карбоновых кислот на всех этапах развития насекомого. В задачи исследования входило: 1) оптимизация условий экстрагирования из тканей различных молекулярных форм гидролаз эфиров карбоновых кислот; 2) компьютерная оценка интенсивности проявления на электрофореграммах отдельных эстераз в онтогенезе; 3) изучение некоторых физико-химических свойств исследуемых ферментов, включая субстратную специфичность, прочность связывания с мембранными структурами в разные возрастные периоды, относительную электрофоретическую подвижность.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования служила линия *Normal* дрозофилы чернобрюхой (*Drosophila melanogaster* Meigen). Используемая линия представляет собой дикий тип мухи, который характеризуется проявлением доминантных внешних признаков (красно-коричневые глаза, серое тело, длинные крылья и т. д.) и в течение многих поколений практически не даёт по ним расщепления.

Мух выращивали на простой четырёхкомпонентной питательной среде [23] при температуре 25°C. При этих условиях жизненный цикл мух от стадии яйца до стадии имаго осуществлялся за 12 суток.

Опытный материал, соответствующий каждой стадии развития, получали от одной популяции, особей которой скрещивали инбред-

но. С целью получения одновозрастного синхронизированного потомства молодых половозрелых мух (25 самок и 25 самцов) выдерживали на свежеприготовленном корме в течение 3–4 часов, после чего переводили на новую питательную среду того же состава. Материалом для исследования ферментов служили 18–20-часовые эмбрионы, 3-суточные личинки и куколки, а также имагинальные формы, достигшие полового созревания (3-й день после вылета из пупариума). С целью учёта половых различий в изоформах эстераз самцов и самок разделяли и анализировали отдельно. Взвешенный с точностью до 1 мг материал (массой 25, 50 и 100 мг) гомогенизировали в течение 2 мин в 0,1 М глицин-NaOH буфере (рН 9,0) и в том же буфере с добавкой тритона X-100 в конечной концентрации 1%. В ряде экспериментов в качестве экстрагентов использовали 0,01 М уксусно-аланиновый буфер (рН 4,5) и 0,1 М фосфат-фосфатный буфер (рН 7,4) отдельно либо с добавкой β-меркаптоэтанола в конечной концентрации 2,5%. Соотношение биологического материала и экстрагента во всех вариантах опытов составляло 1:6. Установлено, что экстракция щелочным буфером (рН 9,0) с 1%-ным тритоном X-100 является оптимальной для выявления множественных молекулярных форм изучаемых гидролаз эфиров карбоновых кислот дрозофилы.

Свежеприготовленные гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при 10 000 g на холоде (4°C). Полученные экстракты переносили в эппендорфы, а осадки ресуспендировали в том же глицин-NaOH буфере с тритоном и без тритона и повторно центрифугировали при тех же условиях.

Компоненты всех полученных экстрактов одновременно подвергали электрофоретическому разделению в системе вертикально-пластинчатого щелочного (рН 8,3) 10% геля (размеры: 140 × 120 × 1 мм). Пробы в щели гелевого блока вносили в объёме 10 мкл с добавкой 5 мкл 0,01% раствора бромфенолового синего, содержащего 60% сахарозы. В опыте с отдельно взятыми α-нафтилацетатом и β-нафтилацетатом (рис. 1, А и Б) объём анализируемых проб в расчёте на одну щель увеличивали в 2 раза. Электрофорез проводили в течение первых 10 мин при силе тока 10 мА; в течение следующих 20 мин — при 20 мА; далее, в течение 3 часов силу тока поддерживали на уровне 40 мА в расчёте на два гелевых блока. Поскольку в кишечнике личинок всегда содержится большое количество пищевой массы, в качестве контроля на возможное присутствие в ней эстераз была взята проба экстракта питательной среды, разработанной личинками в течение трёх суток. Этот экстракт исследовали по той же схеме, что и экстракты тканей дрозофилы. Исследования показали, что экстракт переработанной питательной среды, содержащей специфическую микробиоту [24], не содержит даже следовых количеств гидролаз эфиров карбоновых кислот (первые два трека фореграмм, приведенных на рис. 1: В–Е, не содержат окрашенных полос). В связи с этим можно считать, что наблюдаемые на электрофореграммах окрашенные

зоны представляют собой множественные молекулярные формы ферментов, принадлежащих тканям дрозофилы.

О возможном неспецифическом эстеразном действии протеолитических ферментов, вероятно присутствующих в экстрактах тканей дрозофилы, судили по интенсивности расщепления используемых субстратов химотрипсином ("Reanal", Венгрия), трипсином ("Spofa", Чехия) и папаином ("Merck", Германия). Указанные ферменты вносили в щели гелевых блоков в количестве 20 мкг, предварительно растворяя их в 0,01 М уксусно-аланиновом буфере pH 4,5. Экспериментально установлено, что из трёх перечисленных выше протеиназ, обладающих эстеразной активностью, только химотрипсин проявлял невысокую активность исключительно по отношению к  $\beta$ -нафтилацетату, однако зона расположения этого фермента в геле после электрофореза не совпадала ни с одной из зон  $\beta$ -специфичных эстераз дрозофилы (рис. 1).

После электрофоретического разделения гели отмывали от щелочного рабочего буфера дистиллированной водой и выдерживали 10–15 мин в 0,1 М фосфат-фосфатном буфере pH 7,4. Нейтрализованные таким образом гелевые блоки помещали в инкубационные среды, содержащие отдельные субстраты:  $\alpha$ -нафтилацетат,  $\beta$ -нафтилацетат и  $\alpha$ -нафтилпропионат (по 50 мг на 50 мл фосфатного буфера), либо смеси  $\alpha$ -нафтилацетата с  $\beta$ -нафтилацетатом (по 25 мг каждого на 50 мл фосфатного буфера). В отдельном эксперименте показано, что использование смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтилацетатов в указанных концентрациях не вызывает заметных изменений в проявлении полос на электрофореграммах.

Навески субстратов перед внесением в буфер растворяли в 100 мкл диметилформамида. Вслед за субстратами в среду инкубации вносили прочный синий RR в количестве 50 мг в расчёте на 50 мл используемого буфера или на один гелевый блок. Пробы инкубировали при температуре 25°C в течение 20 мин или 1 часа, после чего жидкость декантировали, а гели многократно промывали дистиллированной водой. С целью усиления окраски зон геля со следовым или низким содержанием некоторых форм эстераз, время инкубации в отдельных опытах увеличивали до 12 часов. В результате реакции одновременного азосочетания нафтола с прочным синим RR в местах локализации эстераз образуется чрезвычайно стойкий азокраситель, который тут же выпадает в осадок, прокрашивая зоны геля в определённый цвет. Окраска зависит в основном от положения гидроксильной группы нафтола —  $\alpha$  или  $\beta$ . В первом случае участки геля окрашиваются в коричневый (или чёрный) цвет, во втором — в пурпурный. После гистохимического выявления молекулярных форм эстераз, гелевые блоки сканировали и анализировали с помощью компьютерной программы "АнаИС" (Поджарский М. А., Рыбалка Д. Г., 2004 г.). Об экспрессивности эстераз судили по уровню оптической плотности окрашенных зон геля после вычитания фонового показателя контрольного участка

соответствующего гелевого блока, находящегося вне поля разделения ферментов.

В работе использовали реактивы фирм "Reanal", "Chemapol" и "Ferak", а также установку для электрофореза марки "VE-4" производства ООО "Helicon" (Россия).

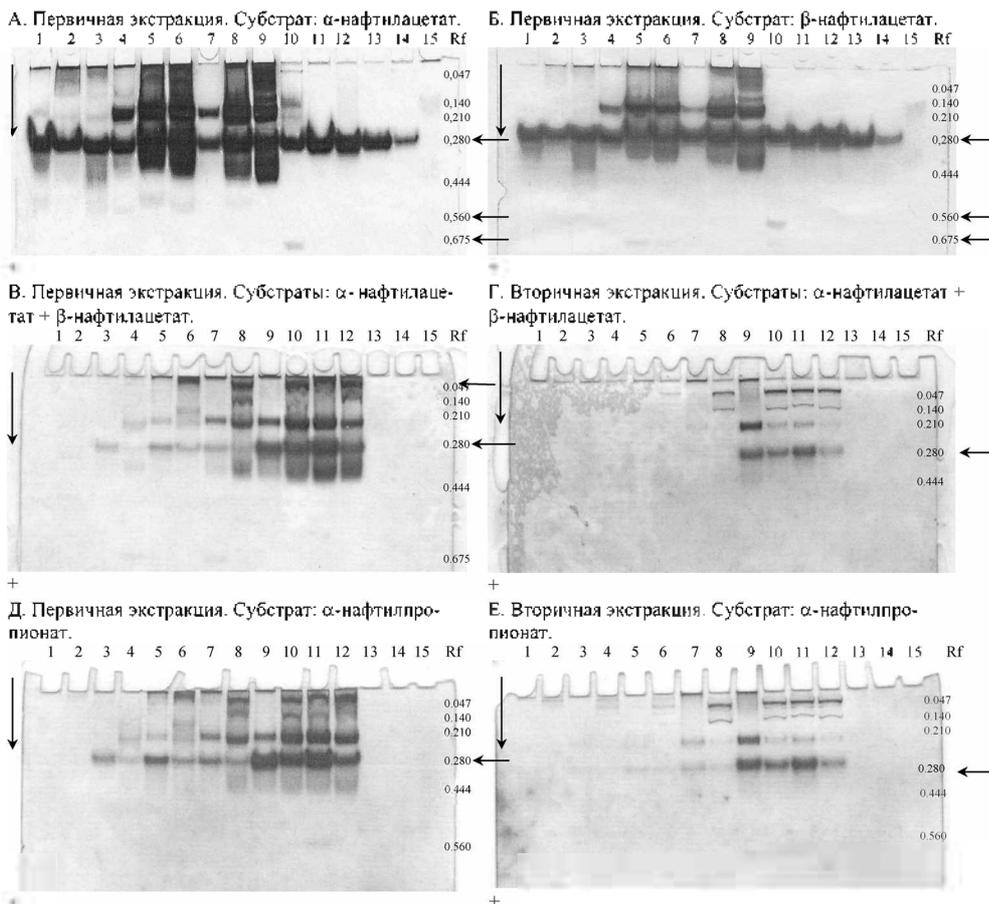


Рис. 1. Спектры гидролаз эфиров карбоновых кислот в онтогенезе *Drosophila melanogaster*:

Треки на фореграммах А и Б: экстракты личинок, куколок и имаго, соответственно приготовленные на буферных растворах с рН 4,5 (1, 4, 7), 7,4 (2, 5, 8), 9,0 (3, 6, 9), а также в присутствии 2,5%  $\beta$ -меркаптоэтанола (10-14); 15 — химотрипсин; инкубация 12 часов, 25°C. Треки на фореграммах В-Е: 1 — питательная среда; 2 — питательная среда + тритон 1%; 3 — яйца; 4 — яйца + тритон 1%; 5 — личинки; 6 — личинки + тритон 1%; 7 — куколки; 8 — куколки + тритон 1%; 9 — имаго; 10 — имаго + тритон 1%; 11 — имаго самцы + тритон 1%; 12 — имаго самки + тритон 1%; 13 — химотрипсин; 14 — трипсин; 15 — папаин; инкубация 1 час, 25°C. Горизонтальные стрелки —  $\beta$ -специфичные эстеразы; вертикальные стрелки — направление движения ферментов в гелевом блоке во время электрофореза.

## Результаты исследования и обсуждение

Предварительно проведенные исследования показали, что подавляющее большинство электрофоретически выявленных молекулярных форм эстераз дрозофилы обладает способностью расщеплять отдельно взятые  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтоловые эфиры уксусной и пропионовой кислот (рис. 1, А, В, Д). Несмотря на то, что данные соединения довольно близки по химической природе, использование их в разных сочетаниях и соотношениях позволяет выявить явное предпочтение одних эстераз к  $\alpha$ -нафтоловым эфирам, а других — к  $\beta$ -нафтоловым. При одновременном использовании  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтилацетатов у одних изоформ ферментов проявляется специфичность к  $\alpha$ -нафтилацетату, а у других изоформ — к  $\beta$ -нафтилацетату. Во многих других случаях один и тот же фермент может расщеплять оба типа субстратов, однако степень специфичности фермента к  $\alpha$ - и  $\beta$ -субстратам может быть не одинаковой и изменяться в зависимости от стадий индивидуального развития мухи и других причин.

Учитывая эффект частичного перекрытия субстратной специфичности у отдельных эстераз, определяли количество молекулярных форм и выраженность окраски их полос при наличии в инкубационных средах отдельно взятых  $\alpha$ - или  $\beta$ -субстратов, а также при совместном их применении. Такой подход дал возможность проследить за изменениями количества форм и функционального состояния этих ферментов в ходе индивидуального развития дрозофилы.

Как видно из рис. 1, А-Е, экстракция тканей дрозофилы буфером, содержащим тритон X-100, приводит к увеличению числа выявленных молекулярных форм эстераз, обладающих активностью в присутствии  $\alpha$ -нафтоловых эфиров уксусной и пропионовой кислот ( $R_f = 0,047, 0,140$  и  $0,210$ ). Это особенно характерно для экстрактов эмбрионов, личинок, куколок и самцов имаго: их эстеразы наиболее активно гидролизуют  $\alpha$ -нафтилпропионат. Оказалось, что независимо от объекта исследования после экстракции буфером, содержащим тритон X-100, заметно снижается интенсивность окраски полосы эстеразы с  $R_f = 0,280$ , предпочитающей  $\beta$ -субстрат. Можно предположить, что снижение  $\beta$ -эстеразной активности в этих экспериментах вызвано слабым ингибирующим действием тритона X-100 на соответствующие ферменты. Как видно из рис. 1, Г и Е, повторная экстракция тканей не приводит к извлечению качественно новых молекулярных форм эстераз по сравнению с первичной экстракцией. Однако эффективность повторного экстрагирования на количественный выход ферментов в разные фазы развития мухи свидетельствует о дифференциальной прочности связывания мембранными структурами тех или иных молекулярных форм ферментов в зависимости от возраста и пола исследуемых мух. Так, например, оказалось, что у самцов при повторной экстракции щелочным буфером, не содержащим тритон, извлекается при-

мерно столько же тканевой эстеразы, специфичной к  $\alpha$ -нафтилацетату, сколько и при первичной экстракции. Повторная экстракция  $\alpha$ -специфичной эстеразы из тканей взрослых самок, а также куколок, дает выход лишь следовых количеств исследуемого фермента, что может быть результатом более прочного связывания его с мембранами у этих объектов.

Результаты проведенных исследований позволяют утверждать, что карбоксиэстеразы плодовой мушки представлены четырьмя основными молекулярными формами, хорошо отличающимися по электрофоретической подвижности и проявлению эстеразной активности. Степень выраженности на электрофореграммах полос отдельных эстераз сильно зависит от стадии развития насекомого и возрастает в процессе развития мух, достигая максимального проявления у имаго (особенно у самцов).

Из представленных на рис. 2, а также в табл. 1 данных видно, что наибольшая оптическая плотность полос отдельных форм исследуемых ферментов наблюдается у имагинальных форм дрозофилы. Судя по оптической плотности наблюдаемых фракций, уровень каталитической выраженности молекулярных форм (1а и 1б)  $\beta$ -специфичной эстеразы взрослой мухи в 6-9 раз превосходит таковой у личинок и куколок. Нарастание активности в период от стадии личинки до стадии имаго характерно также и для форм эстераз, предпочитающих  $\alpha$ -нафтилацетат. При этом оптическая плотность некоторых полос на электрофореграммах в случае имаго значительно выше (в 3,7-4,3 раза), чем в опытах с куколками и личинками. В общих чертах эта закономерность сохраняется при исследовании эстераз вторичных экстрактов тканей разновозрастных объектов — эмбрионов, личинок, куколок и имаго. В этом случае наиболее показательными оказываются онтогенетические изменения функциональной активности эстераз, предпочитающих  $\beta$ -субстрат (рис. 1, Г и Е). К тому же эти ферменты проявляют ярко выраженный половой диморфизм: при использовании смеси субстратов у 3-суточных самцов полосы  $\beta$ -специфичной эстеразы на электрофореграммах более интенсивно окрашены, чем в случае самок того же возраста.

Наблюдаемые в онтогенезе изменения (рис. 2 и табл. 1) свидетельствуют о том, что изучаемые гидролазы эфиров карбоновых кислот представляют собой группу весьма важных для процессов развития ферментов, качественные и количественные показатели которых отражают уровень экспрессии соответствующих генов на разных стадиях развития дрозофилы.

Наряду с главными формами в экстрактах тканей эмбрионов, личинок, куколок и имаго обычно присутствует небольшое число быстроподвижных ( $R_f = 0,560$  и  $0,765$ ) и слабо проявляющихся фракций эстераз (рис. 1). Как правило, они лучше выявляются по гидролизу  $\alpha$ -нафтилпропионата, и их можно рассматривать как формы, сопутствующие основным мажорным компонентам. Кроме того, об-

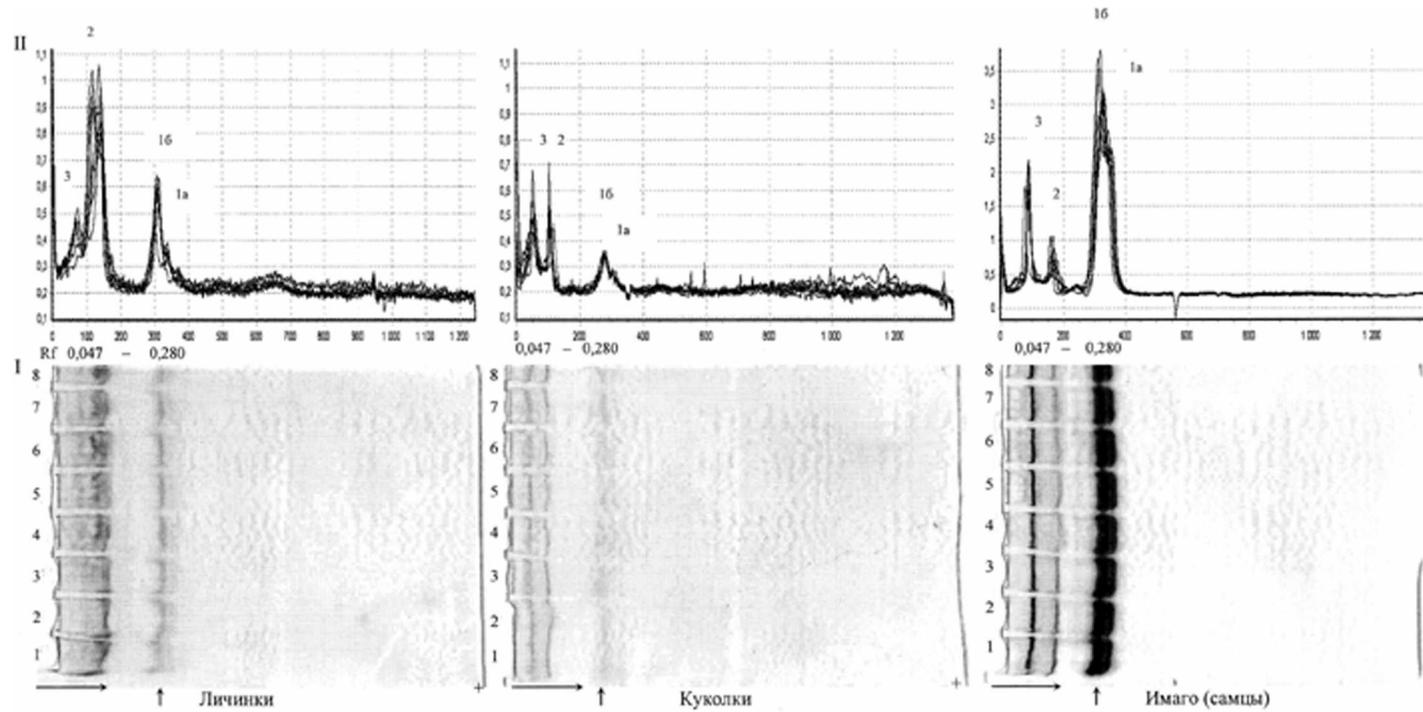


Рис. 2. Интенсивность проявления гидролаз эфиров карбоновых кислот в онтогенезе *Drosophila melanogaster*:

Первичная экстракция: 1 : 6, глицин-NaOH буфер pH 9,0 с 1% тритоном X-100. Инкубация: pH 7,4, 20 мин, 25°C. Субстраты:  $\alpha$ -нафтилацетат +  $\beta$ -нафтилацетат. I — электрофореграммы: 1-8 — номера треков; горизонтальными стрелками указано направление движения ферментов в геле, вертикальными — локализация  $\beta$ -специфичных эстераз; II — денситограммы: по оси x — длина треков (пиксели), по оси y — оптическая плотность ( $\Delta D_{60}$ , относительные единицы) ферментных фракций (1a, 16, 2 и 3) личинок, куколок и самцов имаго

ращает на себя внимание размытая лидирующая зона ( $R_f \approx 0,444$ ), представленная плохо фокусирующимися белковыми компонентами, обладающими довольно высокой  $\alpha$ -эстеразной активностью. Эта эстеразная фракция практически полностью элюируется при первичной экстракции и может рассматриваться как результат модификации основной формы эстеразы ( $R_f = 0,047$ ), обладающей высокой специфичностью к  $\alpha$ -субстратам. Количество её может быть увеличено путём введения в гомогенат таких восстановителей, как  $\beta$ -меркаптоэтанол, дитиотреитол, глутатион восстановленный и угнетено с помощью окисленного глутатиона. Возможно, этот фермент является мономерным деградантом  $\alpha$ -эстераз дрозофилы, представляющих собой белки с четвертичной структурой. Высказанное предположение может оказаться вполне оправданным, если учесть, что некоторые (а возможно и все) гидролазы данной группы (подобно ацетилхолинэстеразе высших организмов) исходно представляют собой олигомеры, состоящие из нескольких субъединиц, обладающих самостоятельной эстеразной активностью [4].

Таблица 1

**Количественные изменения экспрессии основных форм гидролаз эфиров карбоновых кислот в онтогенезе *Drosophila melanogaster***

Молекулярные формы эстераз	Стадии развития		
	Личинка	Куколка	Имаго (самцы)
1a	0.344 ± 0.010	0.275 ± 0.002	2.376 ± 0.048
1б	0.556 ± 0.027	0.351 ± 0.004	3.220 ± 0.112
2	0.838 ± 0.038	0.510 ± 0.020	0.807 ± 0.064
3	0.447 ± 0.020	0.520 ± 0.020	1.900 ± 0.076

Примечание: 1a и 1б — молекулярные формы  $\beta$ -специфичной эстеразы; 2 и 3 —  $\alpha$ -специфичные эстеразы; данные отражают средние значения оптической плотности ферментных фракций —  $\Delta D_{50}$  и их стандартные ошибки —  $m$  при  $n = 8$ .

**Выводы**

1. Гидролазы эфиров карбоновых кислот у дрозофилы представлены несколькими группами ферментов, различающимися электрофоретической подвижностью и избирательным проявлением активности в отношении  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтоловых эфиров низших карбоновых кислот.
2. Наиболее полно спектр изучаемых  $\alpha$ - и  $\beta$ -эстераз представлен в щелочных тритон-содержащих экстрактах тканей эмбрионов, личинок, куколок и имаго, однако  $\beta$ -эстеразная активность одной из главных эстераз после экстракции в присутствии тритона X-100 оказалась менее выраженной.

3. Максимальный выход в раствор большинства гидролаз эфиров карбоновых кислот наблюдается в процессе их первичной экстракции, что указывает на хорошую растворимость этих ферментов в водной среде и слабую ассоциированность их с мембранами.
4. В процессе онтогенетического развития у дрозофилы наблюдаются качественные и количественные изменения со стороны гидролаз эфиров карбоновых кислот, что, по-видимому, отражает дифференциальную активность генов и модификацию их продуктов в онтогенезе насекомого.

### Литература

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — М.: Мир, 1982. — Издание в 3-х томах. — Т. 1. — 389 с.
2. Берстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 464 с.
3. Лизосомы. Методы исследования / Под ред. Д. Дингла. — М.: Мир, 1980. — 342 с.
4. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. — М.: Мир, 1986. — 374 с.
5. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и соавт. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
6. Характеристика кишечных липаз и новые сведения о механизме питания личинок златоглазки обыкновенной *Chrysopa carnea* / И. Г. Язловецкий, Е. И. Лупу, П. Б. Каплан, К. М. Аймерт // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 1993. — Т. 29, № 2. — С. 139-145.
7. Characterization and gene cloning of neurotactin, a *Drosophila* transmembrane protein related to cholinesterases / S. de la Escalera, E. O. Bockamp, F. Moya, M. Piovant, F. Jimenez / The EMBO J., 1990. — Vol. 9, № 11. — P. 3593-3601.
8. Hal L. M. C., Spierer P. The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader / The EMBO J., 1986. — V. 5, № 11. — P. 2949-2954.
9. A novel protein that binds juvenile hormone esterase in fat body tissue and pericardial cells of the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. / M. Shanmugavelu, A. R. Baytan, J. D. Chesnut, B. C. Bonning / The Journal of Biological Chemistry, 2000. — Vol. 275, № 3. — P. 1802-1806.
10. Корочкин Л. И. Клонирование, экспрессия, регуляция тканеспецифических генов у дрозофилы // Генетика. — 1995. — Т. 31, № 8. — С. 1029-1042.
11. Kinetic and molecular differences in the amplified and non-amplified esterases from insecticide-resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes / S. H. P. P. Karunaratne, J. Hemingway, K. G. I. Jayawardena, V. Dassanayakai, A. Vaughan / The Journal of Biological Chemistry, 1995. — Vol. 270, N 52. — P. 31124-31128.
12. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphateresistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects (immunology/insecticides/resistance/detoxification) / C. Mouchts, M. Magnint, J.-B. Bergo, M. De Silvestri, V. Beyssatt, N. Pasteurt, G. P. Georghiot / Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987. — V. 84. — P. 2113-2116.
13. Балакирев Е. С., Аюала Ф. Дж. Нуклеотидная изменчивость  $\beta$ -эстеразных генов в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Успехи соврем. биологии. — 2004. — Т. 124, № 4. — С. 378-389.
14. Estudio del proceso de extraccion de esterasa a partir de *Plexaura homomalla* y evaluacion de su actividad enzimatica / Rivas de la Vega Yaelis, Gonzales Lavaut Jose A., Avila Gonzalez Rizette, Ruiz Coballero Ritsie, Sordo Martinez Lisette, Castro Nodal Mayra // Acta farm. bonaerense. — 1999. — Vol. 18, N 3. — P. 165-170.

15. *Экспрессивность* ген-энзимных систем и показатели жизнеспособности в онтогенезе инбредных линий и гибридов дрозофилы / В. Н. Тоцкий, Н. Д. Хаустова, А. М. Андриевский, Н. Г. Гандирук, Г. И. Белова, Е. В. Есеркепова // Генетика. — 1990. — Т. 26, № 10. — С. 1791–1799.
16. *Tavares Mara Garcia, de Azeredo-Oliveira Maria Tercilia Vilela, Ceron Carlos Roberto.* Tissue-specific expression of esterases in *Triatoma infestans* (Triatominae, Heteroptera) // Genet. and Mol. Biol. — 1998. — Vol. 21, N 4. — P. 461–464.
17. Иванова Е., Стойкова Т., Вълчев И., Колева С., Мурлева П. Электрофоретично проучване на неспецифичните естерази при вида *Reticulitermes lucifugus*, разпространен в България // Науч. тр. Биол. / Пловдив. унив. — 1999. — Т. 35, № 6. — С. 99–103.
18. *Есеркепова Е. В., Жан Зе Ук, Тоцкий В. Н.* Регуляция экспрессии ген-энзимных систем эстераз в процессе развития разных линий *D. melanogaster* // Генетика развития растений и животных. Тез. докл. II Всесоюз. совещ. "Генетика развития". — Ташкент, 1990. — Т. 1, ч. 2. — С. 215–217.
19. *Тоцкий В. Н., Жан Зе Ук.* Регуляция экспрессии ген-энзимных систем в онтогенезе дрозофилы при неблагоприятных условиях её развития и существования // Генетика развития растений и животных. Тез. докл. II Всесоюз. совещ. "Генетика развития". — Ташкент, 1990. — Т. 1, ч. 2. — С. 260–262.
20. *Есеркепова Е. В., Жан Зе Ук, Тоцкий В. Н.* Аллозимы F и S эстеразы-6 и адаптация к повышенной температуре у *D. melanogaster* // Генетика насекомых. Тез. докл. I Всесоюз. конф. — М.: Наука, 1991. — С. 43.
21. *Тоцкий В. Н., Есеркепова Е. В., Жан Зе Ук.* Ген-энзимная система эстеразы-6 и устойчивость дрозофилы к повышенной температуре // Генетика. — 1994. — Т. 30, № 3. — С. 342–348.
22. *Андриевский А. М., Катаненко С. В., Тоцкий В. Н.* Онтогенетические особенности пептидгидролазной активности экстрактов тканей *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. — 1982. — Т. 54, № 5. — С. 519–524.
23. *Медведев Н. Н.* Практическая генетика. — М.: Наука, 1966. — 240 с.
24. *Андриевский А. М., Курьята Н. В., Елинская Н. А.* Состав и характеристика микробиоты кишечника дрозофилы на отдельных стадиях её развития / Тез. докл. IV симпозиума "Биологические механизмы старения". — Харьков, 2000. — С. 104.

**О. М. Андриєвський, В. О. Кучеров, В. М. Тоцький**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
кафедра генетики та молекулярної біології,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна, E-mail: andriev\_scar@mail.ru

### **СИСТЕМА КАРБОКСИЕСТЕРАЗ *DROSOPHILA MELANOGASTER* В ОНТОГЕНЕЗІ**

#### **Резюме**

Методом специфічного гістохімічного забарвлення гелевих блоків після електрофорезу з наступною комп'ютерною денситометрією вивчали кількісні та якісні зміни ферментів підкласу гідролаз ефірів карбонових кислот в онтогенезі дрозофіли. Виявлено молекулярний поліморфізм естераз на стадіях ембріонального та постембріонального розвитку плодової мушки. Встановлено залежність молекулярних форм різноманітних естераз та інтенсивності їх прояву на електрофореграмах від фази онтогенезу.

**Ключові слова:** гідролази ефірів карбонових кислот, онтогенез, дрозофіла.

**A. M. Andrievsky, V. A. Koocherov, V. N. Totsky**

Odessa National I. I. Mechnikov University,

Department of Genetics and Molecular Biology,

Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine, E-mail: andriev\_scar@mail.ru

**THE CARBOXYESTERASES SYSTEM OF *DROSOPHILA*  
*MELANOGASTER* IN ONTOGENESIS**

**Summary**

The quantitative and qualitative changes in the enzymes subclass of the ethers of carbonic acids hydrolases in drosophila ontogenesis were studied by the method of specific histochemical colouring of the gel blocks after the electrophoresis with the following computer densitometry. The variety of the ethers of carbonic acids hydrolases was revealed on the stages of embryonic and postembryonal development of drosophila. The dependence between the molecular forms of various esterases and intensity of their display on electrophorogramme upon the stage of ontogenesis were established

**Keywords:** ethers of carbonic acids hydrolases, ontogenesis, drosophila.