

## ОБМЕЖЕННЯ ВМІСТУ ВУГЛЕВОДІВ У ДІЄТІ ЛИЧИНОК СПРИЧИНЮЄ ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС У ДОРОСЛИХ КОМАХ *Drosophila melanogaster*

Б. М. РОВЕНКО, В. І. ЛУЩАК, О. В. ЛУЩАК

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника,  
Івано-Франківськ, Україна;  
e-mail: olehl@pu.if.ua

Досліджено вплив 20- та 1%-их глюкози і фруктози, що входили до складу дієти личинок плодової мушки *Drosophila melanogaster*, на рівень окислених протеїнів та ліпідів, вміст низькомолекулярних антиоксидантів, активність антиоксидантних і пов'язаних з ними ензимів у дорослих комах. Показано, що обмеження вмісту вуглеводів у дієті личинок призводить до виникнення оксидативного стресу в дорослих комах. Свідченням цього є підвищений на 40–50% вміст карбонільних груп та знижений на 60–70% рівень тіолових груп протеїнів, а також чотириразово збільшений вміст пероксидів ліпідів у дводенних мух обох статей, які розвивалися на дієті з вмістом вуглеводів 1%. Оксидативний стрес, спричинений обмеженням вмісту вуглеводів у дієті личинок, зумовлює активацію антиоксидантного захисту, по-різному вираженого в самців і самок плодової мушки. Підвищення активності супероксиддисмутази та тіоредоксинредуктази в умовах калорійного обмеження тільки в самців було асоційоване із вдвічі вищою активністю *NADPH*-продукуючих ензимів – глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та ізоцитратдегідрогенази. У самців обмеження вмісту вуглеводів у дієті личинок зумовлює підвищення вмісту сечової кислоти, але зниження активності каталази, тоді як у самок величини цих показників змінюються в протилежному напрямку. Одержані результати дозволяють стверджувати про різну участь низькомолекулярних антиоксидантів – глутатіону та сечової кислоти, а також антиоксидантного ензиму каталази в захисті самців і самок плодової мушки від оксидативних пошкоджень макромолекул, зумовлених обмеженням калорійності дієти личинок.

**Ключові слова:** *Drosophila melanogaster*, дієта, калорійне обмеження, глюкоза, фруктоза, оксидативний стрес.

**В**углеводи є основою харчового раціону людини і більшості тварин [1, 2]. Вони абсолютно необхідні для проходження низки реакцій енергетичного обміну [1, 3], є складовими клітинних мембран та інших клітинних компонентів [4], виконують роль регуляторних сигналів [5, 6], беруть участь у захисних реакціях організму [7] тощо.

Незважаючи на широкий спектр біологічних функцій, в багатьох дослідженнях було показано, що надлишок вуглеводів у дієті людини і тварин може спричинити появу метаболічних порушень та виникнення низки захворювань, зокрема метаболічного синдрому, ожиріння і цукрового діабету 2-го типу [1, 3, 8, 9]. Натомість, обмеження вмісту вуглеводів в раціоні розглядається як один із можливих шляхів продовження тривалості та поліпшення якості життя [10]. Вважають, що в разі обмеження кількості калорій в раціоні знижується продукція активованих форм кисню (АФК), в основному мітохондріями, що

сповільнює процеси старіння [3, 10]. Щоправда, дослідження останніх 10–15 років щодо впливу калорійності дієти на вільнорадикальні процеси в модельних об'єктах, передусім у нематод *Caenorhabditis elegans* та плодової мушки *Drosophila melanogaster*, поставили під сумнів уже усталене твердження про існування оберненого кореляційного зв'язку між продукцією АФК та обмеженням кількості калорій в дієті. Зокрема, було показано, що обмеження кількості калорій не знижує, а, навпаки, підвищує продукцію АФК, зумовлює розвиток помірного оксидативного стресу [11, 12]. Оксидативний стрес здатний максимально активувати захисні та адаптивні можливості організму в умовах нестачі поживних речовин чи за дії інших стресорних чинників [12]. Ця концепція, відома під назвою теорії «гормезису», активно розвивається і сьогодні [10–12]. Другим проблемним аспектом щодо взаємозв'язку між обмеженням калорійності дієти та вільнорадикальними процесами є те,

що він описаний, в основному, для дорослих організмів, тоді як вплив обмеження калорій на метаболізм АФК у молодих особин вивчений недостатньо. Водночас, добре відомо, що необхідність у калоріях та доступних джерелах енергії істотно залежить від віку та стадії розвитку модельних організмів [13, 14]. Молоді особини чутливіші до дисбалансу чи нестачі поживних речовин у харчовому раціоні [13]. Оскільки в молодому віці відбувається закладка і/або розвиток багатьох органів, умови харчування молодих особин можуть позначатися на фізіологічному статусі особин у зрілому віці [13, 14]. Це значною мірою стосується тих біологічних моделей, життєвий цикл яких відзначається складними метаморфозами, як, наприклад, плодової мушки. АФК у плодової мушки безпосередньо залучені до переходу від личинкової стадії розвитку до стадії лялечки та імаго [15], а концентрація їх у клітинах може залежати від умов харчування [10–12]. Проте, незважаючи на досить тісний зв'язок у плодової мушки між метаболізмом АФК, метаморфозом і дієтою, досліджень, які б описували характер і особливості такого взаємозв'язку вкрай мало. З огляду на це метою нашої роботи було дослідити, як обмеження калорій, досягнуте шляхом зниження вмісту вуглеводів у дієті личинок, впливає на перебіг вільнорадикальних процесів та стан антиоксидантної системи в дорослих комах *D. melanogaster*.

### Матеріали і методи

**Реактиви.** У роботі використовували фенілметилсульфонілфторид, 1-хлор-2,4-динітробензол (ХДНБ), відновлений глутатіон, окислений глутатіон, NADP<sup>+</sup>, NADPH, глюкозо-6-фосфат, етилендіамінтетраоцтову кислоту, ксиленол оранжевий, гідропероксид кумену (ГПК), сульфат заліза(II), 2,4-динітрофенілгідразин (ДНФГ), N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін, трис-НСІ, HEPES (4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинсульфонову кислоту), 5,5'-дитіо-біс(2-нітро)бензойну кислоту (ДТНБ) виробництва компанії Sigma-Aldrich (США), гуанідин-НСІ виробництва Fluka (Німеччина), діагностичний набір Liquick Cor-UA 60 для визначення вмісту сечової кислоти виробництва компанії Cormau (Польща). Всі інші реактиви були вітчизняного виробництва, кваліфікації не нижче чда.

**Утримання батьківської та експериментальної популяції мух *D. melanogaster*.** У роботі використовували лабораторну дику лінію Canton S плодової мушки *D. melanogaster*, яка була люб'язно надана Блумінгстонським

стоковим центром (США). Батьківську популяцію мух утримували на дріжджово-мелясному середовищі, що містило 6% (маса/об'єм) дріжджів, 4% (об'єм/об'єм) меляси, 1,25% (маса/об'єм) агар-агару і 0,4% (об'єм/об'єм) пропіонової кислоти для інгібування росту цвільових грибів. Для збору яєць батьківських особин переносили на 18 год на експериментальні середовища, які містили 4% (маса/об'єм) дріжджів та 20 чи 1% (маса/об'єм) глюкози або фруктози, 1,25% (маса/об'єм) агар-агару і 0,4% (об'єм/об'єм) пропіонової кислоти. Загальна калорійність живильних середовищ із концентрацією вуглеводів 20% становила 847 ккал/л. За 1%-ї концентрації вуглеводів у середовищі загальна калорійність середовищ становила 87 ккал/л. Для підтримання однакової щільності популяції в скляні ємності місткістю 250 мл на експериментальні середовища (25 мл) вносили 260–280 яєць. Після виходу імаго з лялечки їх переносили у скляні ємності з відповідним експериментальним середовищем і утримували там протягом двох днів. Через два дні мух розділяли за статтю, поміщали в рідкий азот та використовували для подальших аналізів.

**Визначення кількості спожитої їжі.** Кількість спожитої їжі визначали з використанням харчового барвника діамантового синього E133 (FD & C Blue N 1) згідно з [16] з деякими модифікаціями. Цей метод є непрямим методом визначення кількості спожитої їжі у *D. melanogaster* і базується на визначенні кількості спожитого разом із живильним середовищем барвника діамантового синього E133, максимум оптичного поглинання якого складає 629 нм. Для визначення кількості спожитої їжі 15 личинок третьої стадії розвитку переносили в чашки Петрі з 30 мл експериментального середовища, що містило 0,5% (маса/об'єм) барвника E133. Після перебування личинок на експериментальному середовищі протягом 20 хв їх відбирали і поміщали в рідкий азот. Супернатанти одержували гомогенізацією личинок мух в 50 мМ калій-фосфатному буфері (КФБ) (рН 7,5) при кімнатній температурі (21 °С) у співвідношенні 1 : 100 (маса/об'єм). Після центрифугування (16 000 g, 10 хв, 21 °С) на центрифугу Eppendorf 5415R (Німеччина), одержані супернатанти змішували з 50 мМ КФБ (рН 7,5) у співвідношенні 1 : 1 і повторно центрифугували (16 000 g, 7,5 хв, 21 °С). Калібрувальну криву будували за оптичним поглинанням розчину барвника E133 в концентрації від 0,4 до 6,4 мкг/мл. Оптичне поглинання дослідних та калібрувальних

проб визначали на спектрофотометрі Specol 211 (Carl Zeiss, Німеччина) при 629 нм. Для виключення оптичного поглинання пігментів личинок плодкових мух кожна дослідна проба мала відповідний контроль – аналогічно одержаний взірець із личинок, які споживали середовище без барвника.

*Визначення показників оксидативного стресу.* Підготовку супернатантів для визначення біохімічних показників та маркерів оксидативного стресу проводили як описано раніше [17, 18]. Вміст карбонільних груп у протеїнах (КП) визначали спектрофотометрично за поглинанням 2,4-динітрофенілгідразонів і розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції 2,4-динітрофенілгідразонів при 370 нм  $22\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [19]. Вміст КП виражали в наномоль КП на міліграм загального протеїну. Рівень пероксидів ліпідів визначали в реакції із ксиленол оранжевим [20] згідно з протоколом, детально описаним раніше [17], і виражали в наномоль еквівалентів ГПК на загальну кількість ліпідів в 1 г сирової маси. Загальний вміст ліпідів, у свою чергу, визначали згідно з [21] з деякими модифікаціями. Вміст вільних тіолів (SH-вмісних сполук) встановлювали методом Еллмана [22] з використанням ДТНБ, як описано раніше [17]. Вміст тіольних груп протеїнів (ТП) вираховували як різницю загальних та низькомолекулярних тіолів (НМТ). Вміст тіолів виражали в мікромоль SH-груп на 1 мг протеїну.

Визначення концентрації сечової кислоти проводили ензиматично в системі спряжених реакцій за оптичним поглинанням хіноніміну при 540 нм, утвореного у взаємодії ЕСМА (натрієвої солі N-етил-N-(3-сульфопропіл)-3-метилоксаніліну), 4-аміноантипірину та пероксиду водню з використанням тест-системи Liquick Cog-UA 60. Пероксид водню утворювався під час розщеплення уриказою сечової кислоти. Концентрацію сечової кислоти визначали на 96-лунковому мікроплейтридері (Labsystem Multiscan MCC/340, Фінляндія) в об'ємі проби 250 мкл. Реакційна суміш містила 100 мМ PIPES-буфер (піперазин-N,N'-біс(2-етансульфонова кислота) з рН 7,0, 0,78 мМ 4-аміноантипірин, 0,67 мМ ЕСМА, 3,8 мкМ гексаціаноферат натрію, 38,34 мкат/л пероксидази, 1,65 мкат/л урикази та 20–25 мкл супернатанту. Для того, щоб виключити поглинання пігментів тканин мух за цієї довжини хвилі, кожна проба мала відповідний контроль, який замість реакційної суміші містив 50 мМ HEPES-буфера (рН 7,0). Іншим контролем слугувала реакційна суміш без су-

пернатанту (замість супернатанту додавали відповідну кількість 50 мМ HEPES-буфера (рН 7,0). Концентрацію сечової кислоти в пробах оцінювали відносно стандартного розчину сечової кислоти (600 мкМ/л), різні об'єми якого використовували для побудови калібрувальної кривої.

*Визначення активності антиоксидантних і пов'язаних з ними ензимів та концентрації загального протеїну.* Активність ензимів визначали як описано раніше [17, 18]. Активність супероксиддисмутази (СОД) – за ступенем інгібування реакції окислення кверцетину супероксид аніон-радикалом при 406 нм [18]. За одиницю активності СОД приймали таку кількість ензиму (на 1 мг протеїну), яка інгібує реакцію окислення кверцетину на 50% від максимальної швидкості. Константи половинного інгібування ( $K_{50}$ ) визначали за допомогою програми KINETICS (версія 3.1) [23].

Активність каталази реєстрували за швидкістю розкладу пероксиду водню при 240 нм на спектрофотометрі СФ-46 (Ломо, СРСР), використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції для пероксиду водню  $39,4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [24]. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-РДГ), NADP-залежної ізоцитратдегідрогенази (ІЦДГ), глутатіонредуктазної активності тіоредоксинредуктази (ТР) визначали при 340 нм на спектрофотометрі Specol 211 (Carl Zeiss, Німеччина), реєструючи швидкість утворення або використання NADPH. Для виключення можливості цих процесів за дії інших ензимів для кожної з досліджуваних проб реєстрували швидкість реакції у відповідному контролі (повна суміш для визначення активності із супернатантом, але без субстрату), значення яких віднімали від експериментальних проб (із субстратом відповідного ензиму). Для розрахунків питомої активності ензимів використовували коефіцієнт екстинкції для NADPH  $6220\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Активність глутатіон-S-трансферази (Г-S-T) встановлювали шляхом вимірювання зміни абсорбції утвореного комплексу між глутатіоном і ХДНБ при 340 нм, використовуючи для розрахунків активності коефіцієнт молярної екстинкції цього комплексу –  $9600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Всі реакції проводили при 25 °С, ініціюючи внесенням супернатанту. За одну одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка використовує 1 мкмоль субстрату або утворює 1 мкмоль продукту за хвилину. Питома активність Г-6-РДГ, ІЦДГ, ТР, Г-S-T і каталази виражали в міжнародних оди-

ниціях активності (Од) або в міліюдиницях (МОд) та нормували на міліграм розчинного в супернатанті протеїну.

Концентрацію протеїну вимірювали за методом Бредфорд із використанням кумасі яскраво-блакитного G-250 [25]. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

*Статистична обробка результатів.* Дані представлені як середнє арифметичне  $\pm$  похибка середнього арифметичного. Вірогідність різниці між середніми арифметичними оцінювали за критерієм Стюдента з використанням комп'ютерної програми MYNOVA (версія 1.3).

### Результати та обговорення

Обмеження вмісту вуглеводів у дієті личинок спричинює оксидативний стрес у дорослих мухах. АФК, утворені як побічні продукти в ензиматичних та неензиматичних реакціях вуглеводного обміну, здатні пошкоджувати клітинні структури [1, 9]. Рівень КП та ТП, а також концентрацію пероксидів ліпідів вважають надійними маркерами окисного пошкодження клітинних структур та їх складових [26, 27].

Вміст КП, ТП і пероксидів ліпідів у тілі дорослих мух в цьому дослідженні залежав від концентрації вуглеводів у дієті личинок (рис. 1, А–В). Зокрема, самці і самки, які роз-

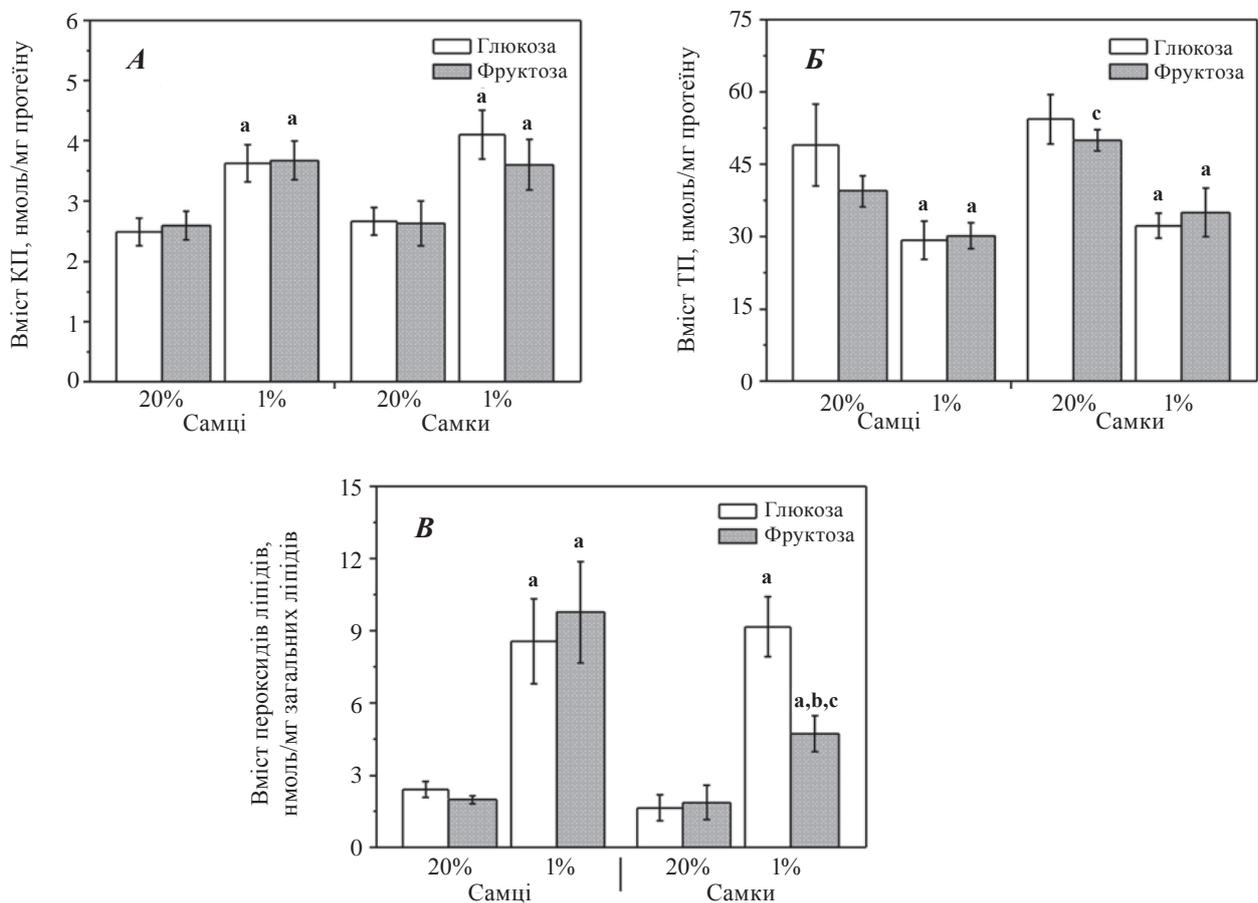


Рис. 1. Вміст карбонільних груп протеїнів (КП) – А, тіольних груп протеїнів (ТП) – Б, пероксидів ліпідів – В у дводенних мух *D. melanogaster*, які розвивалися на дієтах з 20- і 1%-ю глюкозою і фруктозою, ( $M \pm m$ ,  $n = 5-7$ ). Тут і на рис. 2–3: <sup>a</sup> дані вірогідно відрізняються ( $P < 0,05$ ) від відповідних значень в особин тієї ж статі, яких утримували на дієтах з тим самим вуглеводом у вищій концентрації; <sup>b</sup> дані вірогідно відрізняються ( $P < 0,05$ ) від значень для особин тієї самої статі, яких утримували на дієтах з іншим вуглеводом; <sup>c</sup> дані вірогідно відрізняються ( $P < 0,05$ ) від відповідних значень показників в особин протилежної статі

вивалися на дієтах з 1%-ю глюкозою та фруктозою, мали на 40–50% вищий вміст КП та на 60–70% нижчий вміст ТП, ніж ті особини, які розвивалися на дієтах з 20%-им вмістом відповідних вуглеводів (рис. 1, А, Б). Вміст пероксидів ліпідів у самців, до складу дієти яких входили 1%-ні вуглеводи, був приблизно у чотири рази вищим, ніж у тих особин, яких утримували на дієтах із вищим вмістом вуглеводів. У самок, які розвивалися на дієтах з 1%-ю глюкозою чи фруктозою цей показник був відповідно вищим у 4,5 та 2,5 рази, ніж у тих особин, яких утримували на дієтах з 20% зазначених вуглеводів (рис. 1, В).

Підвищення вмісту окислених протеїнів і ліпідів у комах, які на личинковій стадії утримувались на дієтах із низьким вмістом вуглеводів, найвірогідніше, пов'язане з підвищенням стаціонарної концентрації АФК. Підвищення концентрації АФК, у свою чергу, може бути зумовлене прискоренням обміну речовин, на що опосередковано вказує посилене споживання їжі личинками в разі обмеження її калорійності (табл. 1). Прискорення обміну речовин часто пов'язане з перевантаженням мітохондріального транспортного ланцюга, витоком з нього електронів і, як наслідок, утворенням АФК [28]. З іншого боку, підвищений вміст окислених протеїнів і ліпідів у комах, які розвивалися на дієтах із низьким вмістом вуглеводів, може бути результатом зсуву балансу утворення та деградації цих біомолекул. Так, зниження інтенсивності обміну протеїнів та синтезу протеїнів/амінокислот *de novo* є однією з причин накопичення модифікацій у молекулах протеїнів, що призводить до старіння [29]. Зниження синтезу протеїнів *de novo* мог-

ло мати місце за утримання комах на дієтах із низьким вмістом вуглеводів, адже в цих умовах кількість спожитих дріжджів, які є основним джерелом харчового протеїну, була вищою від кількості спожитих вуглеводів (табл. 1). У дослідженнях Л. Янгмена та співавт. [30] було показано, що обмеження вмісту протеїнів в їжі знижує кількість оксидативно пошкоджених молекул протеїнів у самому організмі, що добре узгоджується з нашими результатами.

Вищий вміст пероксидів ліпідів у разі обмеження вмісту вуглеводів в їжі комах, може бути наслідком інтенсивного розщеплення ліпідів в реакціях мікросомного окислення, що було показано в роботах, проведених на щурах [31, 32]. Як і в нашій роботі (рис. 1, В), в дослідженні Р. Хашмі та співавт. [32] вміст пероксидів ліпідів залежав від статі особин.

Ми також не виключаємо, що обмеження вмісту вуглеводів у дієті личинок зумовлює якісні перебудови протеїнів і ліпідів у дорослих комах, які були асоційовані з підвищенням вмісту КП і ТП, а також зі збільшенням ненасиченості жирних кислот у складі ліпідів. Наслідком цього міг бути стаціонарно вищий рівень їх пероксидного окислення. Проте, виникнення цих модифікацій біомолекул внаслідок окислювальних пошкоджень видається нам аргументованішим. Таким чином, наші результати свідчать про розвиток оксидативного стресу в дорослих мух, які на личинковій стадії утримувалися на дієті з низькими концентраціями вуглеводів.

*Оксидативний стрес, спричинений обмеженням вуглеводів у дієті личинок, зумовлює активацію антиоксидантного захисту в дорослих комах. У захисті від оксидативного стресу*

Таблиця 1. Кількість спожитої їжі личинками третьої стадії *D. melanogaster* у дводенних мух, які розвивалися на дієтах з 20 і 1% глюкози і фруктози ( $M \pm m$ ,  $n = 5-7$ )

Концентрація вуглеводу, %	Кількість спожитої їжі, нл/личинку	Кількість спожитого вуглеводу, мкг/личинку	Кількість спожитих дріжджів, мкг/личинку
<i>Глюкоза</i>			
20	21,7 ± 0,34	4,33 ± 0,92	0,87 ± 0,18
1	56,7 ± 4,6 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,27 ± 0,35 <sup>a</sup>
<i>Фруктоза</i>			
20	47,6 ± 6,6 <sup>b</sup>	9,51 ± 0,92 <sup>b</sup>	1,91 ± 0,26 <sup>b</sup>
1	61,4 ± 3,3 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,46 ± 0,13

<sup>a</sup> Дані вірогідно відрізняються ( $P < 0,05$ ) від відповідних значень в особин, яких утримували на дієтах із вищим вмістом (20%) того самого вуглеводу. <sup>b</sup> Дані вірогідно відрізняються ( $P < 0,05$ ) від відповідних значень в особин, яких утримували на дієтах з іншим вуглеводом (глюкозою).

задіяна клітинна мережа ензимів та низькомолекулярних сполук, яких об'єднують під назвою антиоксидантна система [33]. Незважаючи на те, що компоненти антиоксидантної системи функціонують як єдине скоординоване ціле, їх традиційно розділяють на дві підгрупи: антиоксиданти першої та другої лінії захисту [26]. Ензимами та низькомолекулярними речовинами, які безпосередньо взаємодіють з АФК, знешкоджуючи їх, називають першою лінією захисту. Глутатіон та сечова кислота є низькомолекулярними речовинами, а супероксиддисмутаза (СОД) і каталаза – ензимами, які належать до цієї групи антиоксидантів [26, 33].

Зміна вмісту вуглеводів у дієті личинок плодової мушки від 20 до 1% зумовлює компенсаторне підвищення вмісту сечової кислоти у відповідь на зниження активності СОД в самців. Зокрема, обмеження вмісту глюкози в дієті личинок не впливає на активність СОД, проте вміст сечової кислоти в самців, які роз-

вивалися на дієті з 1% вуглеводів був удвічі вищим, ніж у тих особин, які розвивалися на дієті з 20% вуглеводів (рис. 2, А, В). І, навпаки, обмеження вмісту фруктози в дієті личинок від 20 до 1% не позначається на вмісті сечової кислоти в тілі самців, проте супроводжується підвищенням активності СОД на 70% (рис. 2, А, В). Такий синергізм у роботі СОД і сечової кислоти може бути пов'язаний з тим, що в дрозофіли сечова кислота бере безпосередню участь у знешкодженні супероксид-аніон радикала [34]. Зв'язувати супероксид-аніон у прямій неензиматичній реакції здатний також глутатіон [35]. Щоправда, обмеження вмісту вуглеводів у дієті самців не позначається на рівні низькомолекулярних тілових сполук (представлених, в основному, глутатіоном) у нашому дослідженні (табл. 2). Натомість, у разі обмеження вмісту глюкози і фруктози в дієті личинок до 1% активність каталази в самців приблизно на 40% нижча, ніж в осо-

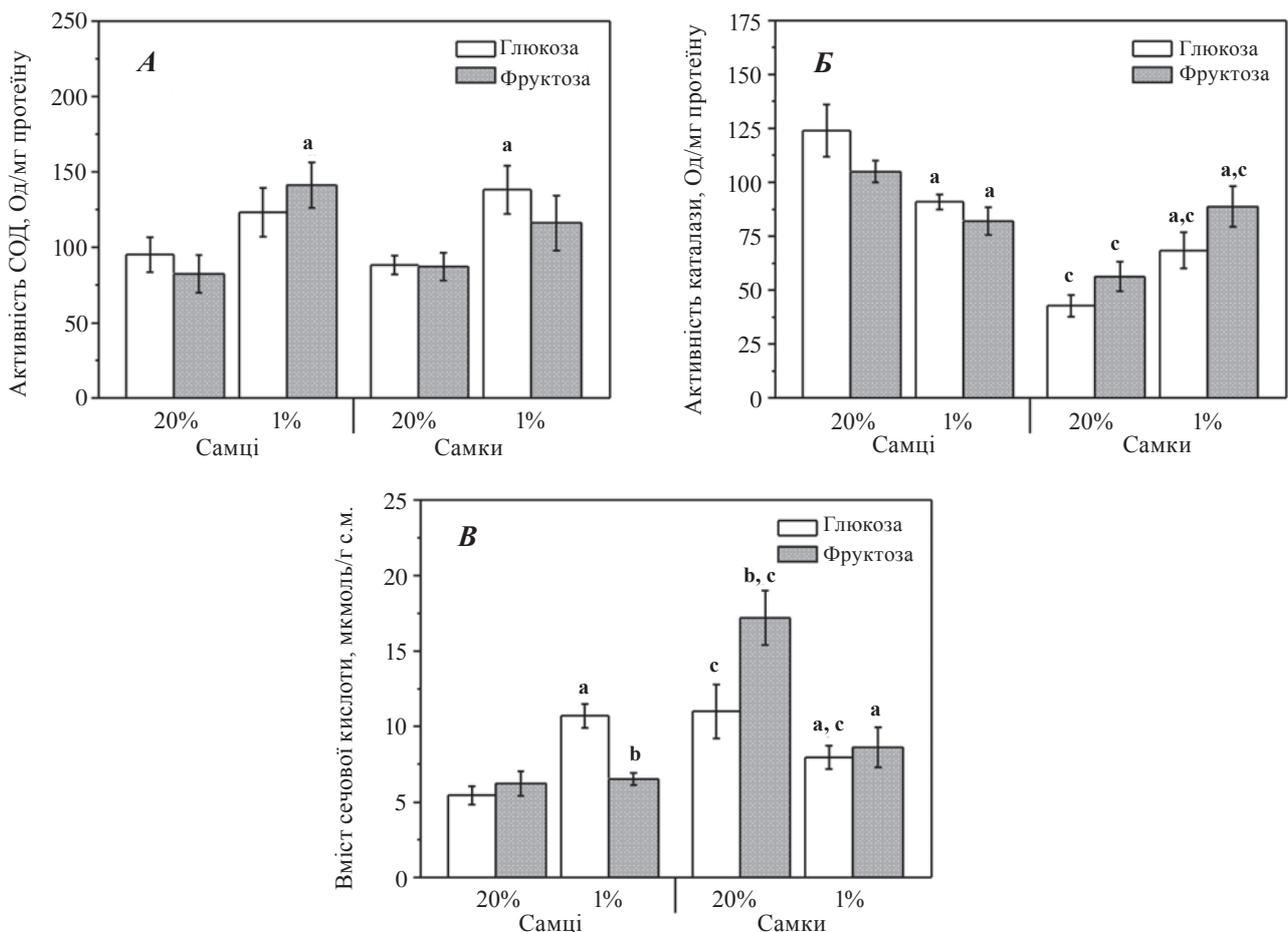


Рис. 2. А – активність супероксиддисмутази (СОД), Б – активність каталази, В – вміст сечової кислоти у дводенних мух *D. melanogaster*, які розвивалися на дієтах з 20 і 1% глюкози і фруктози; с.м. – сира маса

бин, які розвивалися на дієті з 20% вуглеводів (рис. 2, Б).

Дещо іншу картину в кооперативній роботі головних компонентів антиоксидантної системи ми спостерігали в самок. Так, за 1%-го вмісту вуглеводів у дієті личинок активність СОД на 50% вища, ніж за 20%-го вмісту вуглеводів у дієті личинок (рис. 2, А). Проте, на відміну від самців, у самок за обмеження вмісту глюкози і фруктози в дієті личинок вміст сечової кислоти на 50% нижчий, а активність каталази на 55% вище від відповідних значень в особин, які розвивалися на дієті з 20% вуглеводів (рис. 2, Б, В). На додаток, активність цього ензиму в самок є нижчою, ніж у самців, на всіх досліджуваних типах дієт (рис. 2, Б). Вміст НМТ у самок, як і в самців не залежить від концентрації вуглеводів у дієті (табл. 2). Наші результати стосовно статевих відмінностей в активності каталази узгоджуються з попередньо одержаними даними [18], а також результатами Дж. Балларда зі співавт. [36], які показали, що самки *D. simulans* мали нижчу порівняно із самцями активність каталази, незважаючи на інтенсивніше утворення пероксиду водню мітохондріями. Неодноразово було показано, що пероксид водню у відносно високих концентраціях здатний інгібувати каталазу [37, 38]. Основна частина внутрішньоклітинного пероксиду водню в клітині утворюється у разі порушення роботи електрон-транспортного ланцюга мітохондрій [28]. Щоправда, є й інші джерела пероксиду водню в клітині. Зокрема, показано, що цитозольна форма СОД може істотно збільшувати концентрацію пероксиду водню у *C. elegans* [39]. Інгібування каталази під впливом пероксиду водню, утвореного в супероксиддисмутазній реакції, могло б відбуватися в самців, де нами було знайдено обернений зв'язок між активністю СОД та каталази (рис. 2, А, Б). Проте такого зв'язку між активністю згаданих ензимів в самок не було знайдено. Натомість і в самців, і в самок існувала обернена кореляція між активністю каталази та вмістом сечової кислоти ( $R^2 = 0,47$ ;  $P < 0,05$ ). Цей факт заслуговує особливої уваги, адже пероксид водню може утворюватися як побічний продукт діяльності ксантиноксидоредуктази – ензиму синтезу сечової кислоти [8, 37]. Було показано, що в умовах посиленого використання вуглеводів як джерела енергії, що мало місце в нашому експерименті, відбувається посилений розклад пуринових нуклеотидів [1, 8]. Таким чином, утворення сечової кислоти може бути пов'язане із

продукцією пероксиду водню, який інгібує каталазу. Більше того, сечова кислота здатна активувати NADPH-оксидазу та NO-синтазу, що може сприяти підвищенню стаціонарної концентрації АФК у клітині [8]. Окрім цього, сечова кислота здатна також безпосередньо інгібувати каталазу [40]. У зв'язку з цим можна припустити, що сечова кислота прямо чи опосередковано залучена до зниження активності каталази в обох статей. Оскільки сечова кислота здатна також знешкоджувати пероксид водню в прямій неензиматичній реакції [8], ймовірно, що за цих умов існує компенсаторне заміщення функцій каталази сечовою кислотою, можливі механізми якого розкриті нами вище. Локалізація одного (*ma-1*) із чотирьох генів, які впливають на активність ксантиноксидоредуктази, в X-хромосомі [41, 42] може бути причиною статевих відмінностей щодо вмісту сечової кислоти в нашому експерименті.

Другу лінію антиоксидантного захисту формують ензими, спряжені з функціонуванням низькомолекулярного антиоксиданта глутатіону [26]. Активність Г-S-T – ензиму, який використовує глутатіон для нейтралізації токсичних продуктів вільнорадикального окислення [26, 33], на 50% вища в самців, ніж у самок, але не залежить від вмісту вуглеводів у дієті личинок (табл. 2). Проте, концентрація вуглеводів позначається на активності ензимів, які підтримують стаціонарний пул глутатіону в організмі комах. Так, обмеження вмісту і глюкози, і фруктози в дієті личинок було асоційоване з підвищенням на 15–20% глутатіонвідновлювальної активності тіоредоксинредуктази (ТР) (рис. 3, А). Щоправда, така зміна активності ТР у самців є вірогідною тільки у разі обмеження споживання фруктози. Як відомо, ТР здатна відновлювати як глутатіон, так і тіоредоксин в клітинах комах [43]. У нашому дослідженні проводилося визначення тільки глутатіонвідновлювальної активності ТР. Підвищений рівень глутатіонвідновлювальної активності ТР у дорослих комах за обмеження вмісту вуглеводів у дієті личинок свідчить про ефективність роботи систем, залучених у підтримання стабільного рівня глутатіону, який безпосередньо здатний знешкоджувати АФК. На користь цього твердження служить те, що нами не було знайдено змін у вмісті НМТ, представлених, головним чином, глутатіоном у дорослих комах обох статей, які б залежали від концентрації вуглеводів у дієті личинок (табл. 2).

Для підтримки пулу відновленого глутатіону ТР потребує відновних екви-

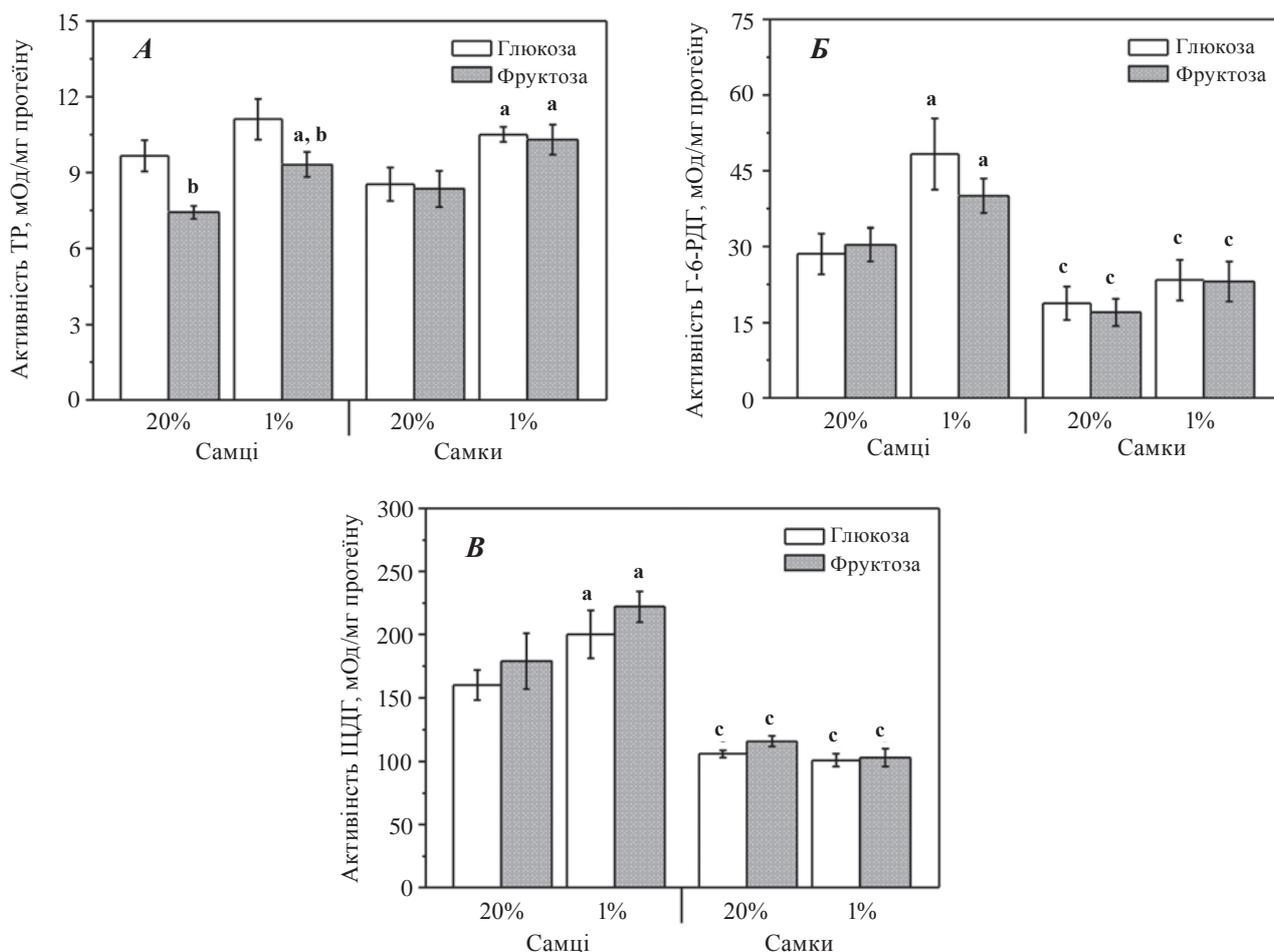


Рис. 3. А – активність тіоредоксинредуктази (ТР), Б – глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-РДГ) та В – NADP-залежної ізоцитратдегідрогенази (ІЦДГ) у дводенних мух *D. melanogaster*, які розвивалися на дієтах з 20 і 1% глюкози і фруктози

Таблиця 2. Вміст низькомолекулярних тіолів (НМТ) та активність глутатіон-S-трансферази (Г-S-T) у дводенних мух *D. melanogaster*, які розвивалися на дієтах з 20 і 1% глюкози і фруктози ( $M \pm m$ ,  $n = 5-7$ )

Концентрація вуглеводу, %	Вміст НМТ, нмоль/г с.м.		Активність Г-S-T, мОд/мг протеїну	
	Самці	Самки	Самці	Самки
<i>Глюкоза</i>				
20	1,60 ± 0,17	1,68 ± 0,21	326 ± 27	243 ± 10 °
1	1,43 ± 0,24	1,62 ± 0,24	369 ± 34	280 ± 25 °
<i>Фруктоза</i>				
20	1,91 ± 0,17	1,34 ± 0,34	343 ± 12	260 ± 24 °
1	1,79 ± 0,33	1,66 ± 0,19	361 ± 19	264 ± 24 °

° Дані вірогідно відрізняються ( $P < 0,05$ ) від відповідних значень показників в особин протилежної статі; с.м. – сира маса.

валентів у формі NADPH [43], які продукуються, головним чином, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою (Г-6-РДГ) і NADP-залежною ізоцитратдегідрогеназою (ІЦДГ) [44]. Підвищення активності ТР у самців за обмеження вмісту вуглеводів у дієті личинок асоційоване із підвищенням активності Г-6-РДГ та ІЦДГ приблизно на 30% (рис. 3, Б, В). Натомість, вміст вуглеводів у дієті личинок не впливає на активність зазначених NADPH-продукуючих ензимів у самок (рис. 3, Б, В). Разом з тим, активність Г-6-РДГ та ІЦДГ у самок, яких утримували на всіх типах досліджуваних дієт, є приблизно вдвічі нижчою за значення відповідних показників у самців (рис. 3, Б, В). Подібні статеві відмінності активності NADPH-продукуючих ензимів було знайдено нами і раніше [18]. Причиною їх, вочевидь, є статева різниця базальної експресії цих ензимів [44, 45], яку детально обговорено в нашій попередній роботі [18].

Загалом, одержані результати дозволяють стверджувати, що оксидативний стрес, спричинений обмеженням вуглеводів у дієті личинок, зумовлює активацію антиоксидантного захисту, по-різному вираженого в самців і самок плодової мушки. Це стосується, перш за все, встановленої оберненої кореляції між активністю каталази та вмістом сечової кислоти в самців і самок, яка свідчить про те, що формування компенсаторних механізмів у діяльності цих компонентів антиоксидантного захисту в умовах обмеження і надлишку калорій в дієті визначаються статтю плодової мушки. Той факт, що підвищення активності ТР в особин обох статей в разі обмеження вмісту вуглеводів у дієті личинок тільки в самців, зумовлює підвищення активності Г-6-РДГ та ІЦДГ може бути спричинене різними потребами самців і самок у підтриманні пулу відновленого глутатіону, які закріплено генетично.

*Вид моносахариду в дієті личинок несуттєво позначається на рівні маркерів оксидативного стресу та активності антиоксидантних і пов'язаних з ними ензимів у дорослих комах.* Існує низка досліджень, проведених на ссавцях та інших модельних організмах, які вказують на різну участь глюкози і фруктози в ензиматичних та неензиматичних обмінних процесах, залучених у продукцію АФК [1, 3, 9]. Для плодової мушки *D. melanogaster* ці вуглеводи є основою харчового раціону, а, отже, її еволюція як біологічного виду відбувалася синергічно з адаптацією до виживання в умовах споживання їжі з цими моносахаридами

[2]. Ймовірно, що саме такі генетичні передумови визначали формування приблизно однакового метаболічного профілю в діяльності антиоксидантної системи та систем, залучених у продукції АФК. Так, нами було знайдено тільки незначні відмінності у величинах досліджуваних показників у мух, які споживали глюкозу або фруктозу. Зокрема, вміст пероксидів ліпідів у самок, які розвивалися на дієті з 1% фруктози був удвічі нижчим, ніж у тих особин, які розвивалися на дієтах з 1% глюкози (рис. 1, В). Ми пов'язуємо таку різницю у величині цього показника, насамперед, зі зміною вмісту загальних ліпідів, а не зі зміною стаціонарної концентрації АФК. Так, вміст загальних ліпідів у самок, які споживали фруктозу, був вірогідно вищим, ніж у тих, які споживали глюкозу (дані не представлено). Нами також було знайдено різницю у вмісті сечової кислоти, яка залежала від наявності того чи іншого моносахариду в дієті личинок. У самців, які споживали на личинковій стадії 1%-ну фруктозу, вміст сечової кислоти на 65% нижчий, ніж у тих, яких утримували на 1%-й глюкозі. Самки, які розвивалися на дієтах з 20% фруктози, навпаки, мають вдвічі вищий вміст сечової кислоти, ніж особини, які розвивалися, споживаючи 20%-ну глюкозу (рис. 2, В). У людини та інших ссавців знайдено підвищення вмісту сечової кислоти внаслідок виснаження запасів АТР, спричиненого інтенсивним фосфорильованням моносахаридів на перших етапах їх засвоєння [8]. Тому виявлена різниця у вмісті сечової кислоти в самців, які споживали глюкозу і фруктозу, може вказувати на більш виражений оксидативний стрес в особин, які споживали глюкозу, спричинений нестачею енергетичних ресурсів. На користь цього може також свідчити вища на 20% активність ТР у самців, які споживали глюкозу, а не фруктозу (рис. 3, А). Цікаво, що схожі результати одержано нашими колегами в дослідженнях із пекарськими дріжджами, які свідчать про те, що фруктоза в низьких концентраціях захищає пекарські дріжджі від оксидативних пошкоджень [46]. Захисні властивості фруктози в нашому експерименті, найімовірніше, пов'язані з реорганізацією енергетичного обміну внаслідок підвищеного споживання фруктози як на рівні клітин, так і на рівні організму. Зокрема, личинки плодових мух споживали більше середовища, яке містило фруктозу, а не глюкозу. Щоправда, ця різниця була вірогідною лише за високих концентрацій вуглеводів у середовищі (табл. 1).

Таким чином, обмеження вмісту глюкози, порівняно з обмеженням вмісту фруктози

в дієті личинок, тільки незначно підвищує напруженість оксидативного стресу в дорослих самців, але не самок. Це дозволяє нам дійти висновку, що обмеження калорійності їжі спричинює оксидативний стрес та активацію системи антиоксидантного захисту незалежно від виду моносахариду, який входить до складу дієти личинок, але є опосередкованим генетично зумовленими особливостями обміну речовин у самців і самок.

Роботу було виконано в рамках держбюджетної теми «Вивчення механізмів пристосування організмів до несприятливих умов навколишнього середовища з метою розробки методів підвищення їх адаптаційного потенціалу» (державний реєстраційний номер – 0107U001367). Автори висловлюють подяку Н. Перхулін і І. Юркевичу за допомогу в проведенні деяких експериментів, а також к.б.н., доц. М. Байляк та к.б.н. О. Кубрак за активну дискусію щодо інтерпретації одержаних результатів.

**ОГРАНИЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОВ В ДИЕТЕ ЛИЧИНОК ВЫЗЫВАЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У ВЗРОСЛЫХ НАСЕКОМЫХ *Drosophila melanogaster***

*Б. М. Ровенко, В. И. Лушчак, О. В. Лушчак*

Прикарпатский национальный университет имени Василя Стефаника, Ивано-Франковск, Украина; e-mail: olehl@pu.if.ua

Исследовано влияние 20- и 1%-й глюкозы и фруктозы, входящих в состав диеты личинок плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, на уровень окисленных протеинов и липидов, содержание низкомолекулярных антиоксидантов, активность антиоксидантных и связанных с ними ферментов у взрослых насекомых. Показано, что ограничение содержания углеводов в диете личинок приводит к возникновению оксидативного стресса у взрослых насекомых. Свидетельством этого является повышенное на 40–50% содержание карбонильных групп протеинов и сниженный на 60–70% уровень тиоловых групп протеинов, а также четырехкратное увеличение содержания пероксидов липидов у двухдневных мух обоих полов, которые развивались на диете с 1%-ым содержанием углеводов. Оксидативный стресс, вызванный ограничением содержания углеводов в диете личинок, вызывает активацию антиоксидантной защиты, по-разному выраженной у самцов и самок плодовой мушки. Повышение

активности супероксиддисмутазы и тиоредоксинредуктазы в условиях калорийного ограничения только у самцов ассоциируется с повышением активности NADPH-продуцирующих ферментов – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы в два раза. У самцов ограничение содержания углеводов в диете личинок вызывает повышение содержания мочевой кислоты, но снижение активности каталазы, тогда как у самок величины этих показателей меняются в противоположном направлении. Полученные результаты свидетельствуют о разном вовлечении низкомолекулярных антиоксидантов – глутатиона и мочевой кислоты, а также антиоксидантного фермента каталазы в защите самцов и самок плодовой мушки от окислительных повреждений макромолекул, обусловленных ограничением калорийности диеты личинок.

**Ключевые слова:** *Drosophila melanogaster*, диета, калорийное ограничение, глюкоза, фруктоза, окислительный стресс.

**CARBOHYDRATE RESTRICTION IN THE LARVAL DIET CAUSES OXIDATIVE STRESS IN ADULT INSECTS OF *Drosophila melanogaster***

*B. M. Rovenko, V. I. Lushchak, O. V. Lushchak*

Vassyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine; e-mail address: olehl@pu.if.ua

The influence of 20 and 1% glucose and fructose, which were components of larval diet, on the level of oxidized proteins and lipids, low molecular mass antioxidant content as well as activities of antioxidant and associated enzymes in adult fruit fly *Drosophila melanogaster* were investigated. The restriction of carbohydrates in larval diet leads to oxidative stress in adult insects. It is supported by 40–50% increased content of protein carbonyl groups and by 60–70% decreased level of protein thiol groups as well as by a 4-fold increase of lipid peroxide content in 2-day-old flies of both sexes, developed on the diet with 1% carbohydrates. Oxidative stress, induced by carbohydrate restriction of the larval diet, caused the activation of antioxidant defence, differently exhibited in male and female fruit flies. Caloric restriction increased activity of superoxide dismutase and thioredoxin reductase associating only in males with 2-fold higher activity of NADPH-producing enzymes – glucose-6-phosphate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase. Carbohydrate restriction in the larval

diet caused the increase of uric acid content, but the decrease in catalase activity in males. In females the values of these parameters were changed in opposite direction compared with males. The obtained results let us conclude the different involvement of low molecular mass antioxidants, glutathione and uric acid, and antioxidant enzyme catalase in the protection of male and female fruit fly macromolecules against oxidative damages, caused by calorie restriction of larval diet.

**Key words:** *Drosophila melanogaster*, diet, caloric restriction, glucose, fructose, oxidative stress.

1. Tappy L., Le K.-A. // *Physiol. Rev.* – 2010. – **90**, N 1. – P. 23–46.
2. Keller A. // *Curr. Biol.* – 2007. – **17**, N 3. – P. R77–R81.
3. Basciano H., Federico L., Adeli K. // *Nutr. Metab. (Lond)*. – 2005. – **2**, N 1. – P. 5.
4. Hua S., An H. J. // *BMB Rep.* – 2012. – **45**, N 6. – P. 323–330.
5. Havula E., Hietakangas V. // *Semin. Cell. Dev. Biol.* – 2012. – **23**, N 6. – P. 640–647.
6. Coutinho M. F., Prata M. J., Alves S. // *Mol. Genet. Metab.* – 2012. – **105**, N 4. – P. 542–550.
7. Zhang X. L. // *Curr. Med. Chem.* – 2006. – **13**, N 10. – P. 1141–1147.
8. Johnson R. J., Perez-Pozo S. E., Sautin Y. Y. et al. // *Endocr. Rev.* – 2009. – **30**, N 1. – P. 96–116.
9. Schalkwijk C. G., Stehouwer C. D., van Hinsbergh V. W. // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2004. – **20**, N 5. – P. 369–382.
10. Speakman J. R., Mitchell S. E. // *Mol. Aspects Med.* – 2011. – **32**, N 3. – P. 159–221.
11. Rattan S. I. // *Mech. Ageing Dev.* – 2004. – **125**, N 4. – P. 285–289.
12. Birringer M. // *Pharm. Res.* – 2011. – **28**, N 11. – P. 2680–2694.
13. Stephen A., Alles M., de Graaf C. et al. // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2012. – **66**, N 7. – P. 765–779.
14. Godfrey K. M., Barker D. J. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2000. – **71**, N 5 (Suppl.). – P. 1344S–1352S.
15. Milton V. J., Sweeney S. T. // *Dev. Neurobiol.* – 2012. – **72**, N 1. – P. 100–110.
16. Skorupa D. A., Dervisefendic A., Zwiener J., Pletcher S. D. // *Aging Cell.* – 2008. – **7**, N 4. – P. 478–490.
17. Lushchak O. V., Rovenko B. M., Gospodaryov D. V., Lushchak V. I. // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* – 2011. – **160**, N 1. – P. 27–34.
18. Ровенко Б. М., Луцшак О. В., Лозінський О. В. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2012. – **84**, № 5. – С. 97–105.
19. Lenz A.-G., Costabel U., Shaltiel S., Levine R. L. // *Anal. Biochem.* – 1989. – **177**, N 2. – P. 419–425.
20. Hermes-Lima M., Willmore W. G., Storey K. B. // *Free Radical. Biol. Med.* – 1995. – **19**, N 3. – P. 271–280.
21. Wawrik B., Harriman B. H. // *J. Microbiol. Meth.* – 2010. – **80**, N 3. – P. 262–266.
22. Ellman G. L. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – **82**, N 1. – P. 70–77.
23. Brooks S. P. J. // *BioTechniques.* – 1992. – **13**. – P. 909–911.
24. Aebi H. // *Meth. Enzymol.* – 1984. – **105**. – P. 121–126.
25. Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
26. Lushchak V. I. // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2007. – **72**, N 8. – P. 809–827.
27. Lushchak V. I., Semchyshyn H. M., Lushchak O. V. / *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, Blackwell Publishing Ltd, 2011. – P. 420–431.
28. Murphy M. P. // *Biochem. J.* – 2009. – **417**, N 1. – P. 1–13.
29. Sohal R. S. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – **33**, N 1. – P. 37–44.
30. Youngman L. D., Park J. Y., Ames B. N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – **89**, N 19. – P. 9112–9116.
31. Ефендиев А. М., Керимов Б. Ф. // *Вопр. мед. хим.* – 1994. – **40**, № 2. – С. 34–37.
32. Hashmi R. S., Siddiqui A. M., Kachole M. S., Pawar S. S. // *J. Nutr.* – 1986. – **116**, N 4. – P. 682–688.
33. Sohal R. S., Orr W. C. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1992. – **663**. – P. 74–84.
34. Hilliker A. J., Duyf B., Evans D., Phillips J. P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – **89**, N 10. – P. 4343–4347.
35. Jouini M., Lapluye G., Huet J. et al. // *J. Inorg. Biochem.* – 1986. – **26**, N 4. – P. 269–280.
36. Ballard J. W., Katewa S. D., Melvin R. G., Chan G. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2007. – **1114**. – P. 93–106.
37. Groeger G., Quiney C., Cotter T. G. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2009. – **11**, N 11. – P. 2655–2671.
38. Nicholls P. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2012. – **525**, N 2. – P. 95–101.
39. Cabreiro F., Ackerman D., Doonan R. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – **51**, N 8. – P. 1575–1582.

40. *Hargreaves A. B., Lobo L. C., Calmon Lemme C., Hasson A.* // *Cancer Res.* – 1959. – **19**, N 5. – P. 468–471.
41. *Nissani M., Liu C. P.* // *Gen. Res.* – 1977. – **29**, N 2. – P. 159–170.
42. *Tahoe N. M., Dean A. M., Curtsinger J. W.* // *Gene.* – 2002. – **297**, N 1–2. – P. 221–228.
43. *Missirlis F., Rahlfs S., Dimopoulos N. et al.* // *Biol. Chem.* – 2003. – **384**, N 3. – P. 463–472.
44. *Barroso J. B., Peragon J., Garcia-Salguero L. et al.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2001. – **33**, N 8. – P. 785–796.
45. *Williamson J. H., Bentley M. M.* // *Genetics.* – 1983. – **103**, N 4. – P. 649–658.
46. *Semchyshyn H. M., Lozinska L. M.* // *FEMS Yeast Res.* – 2012. – **12**, N 7. – P. 761–773.

Отримано 04.02.2013