

МОЖЛИВІ МЕХАНІЗМИ ЗАХИСНОЇ ДІЇ АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТУ ЗА ВПЛИВУ РІЗНИХ СТРЕСОРИВ НА ПЛОДОВУ МУШКУ *DROSOPHILA MELANOGASTER* CANTON S

М. П. ЛИЛИК, М. М. БАЙЛЯК

Кафедра біохімії та біотехнології,
ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника»,
вул. Шевченка, 57, Івано-Франківськ 76018, Україна;
e-mail: bayliak@ukr.net

Альфа-кетоглутарова кислота – важливий інтермедіат циклу Кребса та метаболізму амінокислот. В останні роки показана роль альфа-кетоглутарової кислоти як потужного природного детоксифікуючого агенту. У даній роботі досліджено здатність натрієвої солі альфа-кетоглутарової кислоти (АКГ) послаблювати токсичний вплив нітропрусиду натрію на розвиток личинок та збільшувати стійкість дорослих особин плодової мушки *Drosophila melanogaster* Canton S до холододового стресу. Нітропрусид натрію (НПН) широко використовується як донор оксиду азоту у медицині, проте може бути токсичним для багатьох організмів за високих концентрацій через індукцію оксидативного/нітрозативного стресів. У даній роботі показано, що додавання АКГ до їжі зменшує інгібуючий вплив НПН на лялькування *D. melanogaster* Canton S. Кількість личинок, які досягали стадії лялечки на дієті з 10 мМ АКГ і 1 мМ НПН, була на 20% вищою, ніж на середовищі з 1 мМ НПН. Встановлено, що захисна дія АКГ не пов'язана зі зменшенням споживання личинками їжі, яка містить НПН, та зі взаємодією з продуктами розпаду НПН – іонами заліза та нітрит-іонами. Продуктами розпаду НПН є також ціанід-іони, які проявляють високу токсичність. Раніше було показано, що АКГ може взаємодіяти з ціанідами, утворюючи ціаногідринний комплекс, який легко піддається подальшому метаболізму. Очевидно, саме цей механізм має місце у нашому випадку і частково запобігає токсичним ефектам НПН на плодову мушку. Дводенні особини *D. melanogaster* Canton S, вирощені на середовищі з 10 мМ АКГ, порівняно з контрольними особинами, характеризувалися вищою стійкістю до короткотривалого холододового стресу (15 хв при 0°C), що виражалось у зменшенні часу відновлення з холододової коми. Мухи, які утримувались на середовищі з АКГ, мали вищу активність каталази та вищий рівень високомолекулярних і низькомолекулярних тіольних сполук, порівняно з контрольними особинами. Вміст проліну у самок, вирощених на середовищі з АКГ, був вищим в 1,4 рази, порівняно з контрольними самками. Отримані результати свідчать про те, що вирощування на 10 мМ АКГ збільшує стійкість дорослих дводенних особин *D. melanogaster* до холододового стресу через активацію антиоксидантного захисту та збільшення вмісту кріопротекторної амінокислоти проліну.

Ключові слова: альфа-кетоглутарат, *Drosophila melanogaster*, лялькування, нітропрусид натрію, холододовий стрес, антиоксидантний захист, пролін.

Вступ. Альфа-кетоглутарат (АКГ) – важливий інтермедіат циклу Кребса, який бере участь в забезпеченні клітин енергією, а також у метаболізмі амінокислот та білків. Експериментально доведено, що додавання солей альфа-кетоглутарової кислоти до харчового раціону тварин може стимулювати обмінні процеси та відновлення організму при різноманітних травмах (Harrison and Pierzypowski, 2008). Повідомляється також, що АКГ послаблює токсичні ефекти різних ксенобіотиків (Bhattacharya et al., 2009; Mitchell et al., 2013) та може брати участь у підтриманні редокс-гомеостазу (Niemiec et al., 2011).

У попередніх наших дослідженнях було показано, що додавання до середовища культивування натрієвої солі АКГ за концентрацій 0,01-10,0 мМ послаблює частково токсичну дію етанолу, але не нітропрусиду

натрію (НПН), на лялькування плодової мушки *Drosophila melanogaster* лінії W¹¹¹⁸ (Lylyk et al., 2014). При цьому вирощування на АКГ збільшувало стійкість цих мушок до холододового стресу. Мухи лінії W¹¹¹⁸ – це мутанти за геном white, отримані з дикої лінії мух Canton S. Показано, що ця мутація може впливати на низку фізіологічних і метаболічних процесів, зокрема збільшувати чутливість мух до стресу (Lozinsky et al., 2012). Тому у даній роботі ми зосередили свою увагу на вивченні впливу екзогенного АКГ на стійкість лінії *D. melanogaster* Canton S до низки стресових чинників та з'ясуванні можливих біохімічних механізмів дії даної кетокислоти.

Матеріали і методи. У дослідженнях використовували лабораторну дикую лінію Canton S плодової мушки *D. melanogaster*, надану Блумінгтонським стоковим центром (США).

Експериментальні культури плодової мушки вирощували на дріжджово-сахарозному середовищі наступного складу (на 100 мл): 5 г сухих пекарських дріжджів, 5 г сахарози, 1 г агару та 1 мл 18%-го ніпагіну (для інгібування росту цвілевих грибів) (Lozinsky et al., 2012). Залежно від умов експерименту в середовище додатково вносили (подані кінцеві концентрації): 1) 10 мМ розчин натрієвої солі АКГ; 2) 1 мМ нітропрусид натрію (НПН); 3) 1 мМ НПН та 10 мМ АКГ. Тепле середовище розливали у банки і після застигання середовища у кожен банку вносили по 100 яєць. Культивування проводили при 25°C, постійній вологості та світловому режимі день:ніч – 16:8. Починаючи з четвертого дня, щодня підраховували кількість утворених лялечок у кожній банці. По досягненню дорослими мухами дводенного віку їх використовували для фізіологічних тестів чи біохімічного аналізу.

Кількість спожитої їжі личинками третьої стадії розвитку визначали з використанням харчового барвника діамантового синього E133 (FD & C Blue N 1) за методом, описаним в (Lushchak et al., 2011).

Визначення продуктів розпаду НПН (оксиду азоту, •NO, та іонів заліза, Fe²⁺) проводили у 5% розчині сахарози. Вміст іонів заліза визначали за взаємодією із 1,10-фенантроліном (Lee et al., 1948). Вивільнення оксиду азоту з НПН оцінювали непрямим методом: за взаємодією його стабільної форми – нітриту з реактивом Гріса (Privat et al., 1997).

Для визначення стійкості до холодого стресу дорослих мушок, вирощених на середовищі з і без АКГ, розділяли за статями шляхом анестезування CO₂. По 10 особин кожної статі вносили у біологічні пробірки, закриті ватним корком та піддавали дії холодого стресу шляхом утримування при 0°C протягом 15 хв. По завершенні інкубації вимірювали час виходу мух із холодової коми за вставанням мушок на лапки (David et al., 1998).

Визначення біохімічних показників проводили у супернатантах, отриманих шляхом гомогенізації мух у співвідношенні 1:10 в 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,0), який містив 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ фенілметилсульфонілфториду. Активність каталази визначали за швидкістю розкладання пероксиду водню (Aebi., 1984). Визначення проліну проводили за нінгідриновим методом Бергмана і Локслея (Bergman and Loxley, 1970). Вміст SH-груп у білках та низькомолекулярних сполуках визначали методом Елмана (Ellman, 1959). Для визначення SH-груп у низькомолекулярних сполуках, білки попередньо

осаджували 10% трихлороцтовою кислотою. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда (Bradford, 1976) з використанням бичачого альбуміну як стандарту.

Дані представлені як середнє арифметичне з 4-6 незалежних повторів ± похибка стандартного відхилення. Вірогідність різниці між середніми арифметичними оцінювали за критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення.

Вплив АКГ на швидкість лялькування D. melanogaster Canton S на середовищі з НПН. Раніше було показано, що додавання до середовища високих концентрацій НПН, який широко використовується в дослідженнях як донор оксиду азоту, призводить до затримки розвитку плодової мушки (Lozinsky et al., 2012). Беручи до уваги здатність АКГ проявляти детоксифікуючу дію за впливу різних ксенобіотиків (Bhattacharya et al., 2009; Mitchell et al., 2013), нами було досліджено здатність АКГ послаблювати токсичну дію НПН на плодову мушку. Як бачимо з рис. 1А, при вирощуванні на середовищі з 1 мМ НПН швидкість заляльковування личинок суттєво сповільнювалася і загальний вихід лялечок зменшувався приблизно на 50%, що добре узгоджується з даними інших авторів (Lozinsky et al., 2012). При сумісному додаванні до середовища 1 мМ НПН і 10 мМ АКГ спостерігалось збільшення загальної кількості утворених лялечок до 70%.

Токсичну дію НПН пов'язують насамперед з розвитком оксидативного/нітрозитивного стресу (Babich et al., 1998) та блокуванням ЕТЛ мітохондрій. За блокування ЕТЛ, в першу чергу, відповідає ціанід-іон, який вивільняється при розпаді НПН і зв'язується з цитохромоксидазою (Mitchell et al., 2013). Розвиток оксидативного і нітрозитивного стресів зумовлений вивільненням оксиду азоту та іонів вільного заліза (II) (Babich et al., 1998; Lozinsky et al., 2012). Щоб з'ясувати можливі механізми протекторної дії АКГ, ми визначили інтенсивність споживання їжі личинками, а також вміст продуктів розпаду НПН у середовищі з додаванням і без додавання АКГ. Личинки споживали у 1,6 рази менше їжі на середовищі з НПН (рис. 1В). Додавання 10 мМ АКГ до середовища, яке містило 1 мМ НПН, не впливало на інтенсивність споживання їжі личинками. АКГ не впливав також на швидкість розкладання НПН і відповідно на рівень продуктів його розпаду – іонів заліза та нітрит-іонів (табл. 1). Таким чином, АКГ не проявляє здатності хелатувати залізо і взаємодіяти з оксидом азоту (нітрит-іонами). Іншим продуктом розпаду НПН є ціанід-іон.

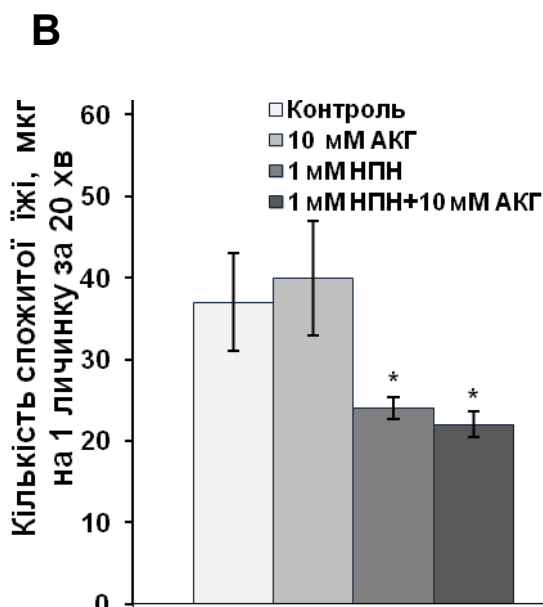
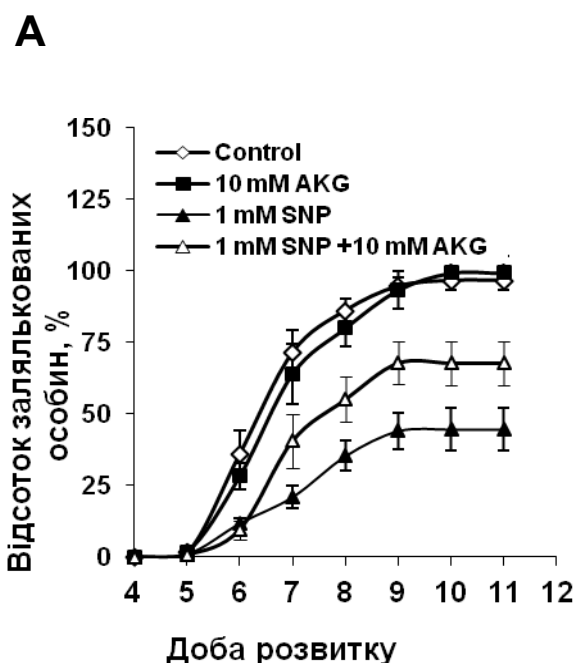


Рис. 1. Швидкість заляльковування (А) та інтенсивність споживання їжі личинками (В) *D. melanogaster Canton S* на дріжджово-сахарозному середовищі, яке містило 1 мМ НПН, 10 мМ АКГ, або їх суміш, n=4-6.

Fig. 1. Pupation rate (A) and food consumption (B) by *D. melanogaster Canton S* larvae on yeast-sucrose diets supplemented with 10 mM AKG, 1 mM SNP, or their mixture, n = 4-6.

*Значення достовірно відрізняється від відповідного значення без НПН з $P < 0,05$.

*Significantly different from respective values without SNP with $P < 0.05$.

Раніше було показано, що АКГ може взаємодіяти з ціанідами, утворюючи ціаногідриновий комплекс, який легко піддається подальшому метаболізму (Bhattacharya et al., 2009; Mitchell et al., 2013). Очевидно, саме цей механізм має місце у нашому випадку і частково запобігає розвитку токсичних ефектів НПН.

Стійкість дводенних особин плодової мушки, вирощених на середовищі з АКГ, до дії холодового стресу. Наступним етапом нашої роботи стало дослідження стійкості до дії холодового стресу дорослих особин плодової мушки, вирощених на середовищі з АКГ. При зниженні температури безхребетні впадають в холодову кому. Час виходу з холодової коми є мірою чутливості до холодового стресу: чим швидше особини отямлюються від холодової

коми, тим вони стійкіші до холодового стресу (David et al., 1998). З рис. 2. видно, що мухи, вирощені на середовищі з 10 мМ АКГ, виходили з холодової коми набагато швидше, ніж контрольні особини. Таким чином, вирощування на АКГ збільшує адаптаційний потенціал та стійкість плодової мушки до нетривалого холодового стресу. Відомо, що перехід з температур замерзання до вищих температур у холоднокровних тварин супроводжується розвитком оксидативного стресу (Lushchak, 2011). Тому ми припустили, що вища резистентність мух, які споживали середовище з АКГ, до холодового стресу може бути зумовлена, принаймні частково, більш потужною системою антиоксидантного захисту.

Таблиця 1.

Концентрація загального заліза і нітрит-іонів у розчині 1 мМ НПН у 5% сахарозі при додаванні 10 мМ АКГ після 2-годинного інкубування при 25 °С (n=4)

Table 1.

Concentrations of total iron and nitrite ions in 1 mM SNP solution in 5% sucrose after incubation at 25°C for 2 h in the presence or absence of 10 mM AKG (n = 4)

Параметр	Середовище	
	1 мМ НПН	1 мМ НПН+10 мМ АКГ
Загальне Fe, мкг/мл	0,202±0,016	0,191±0,010
NO ₂ ⁻ , мкг/мл	5,87±0,29	5,41±0,32

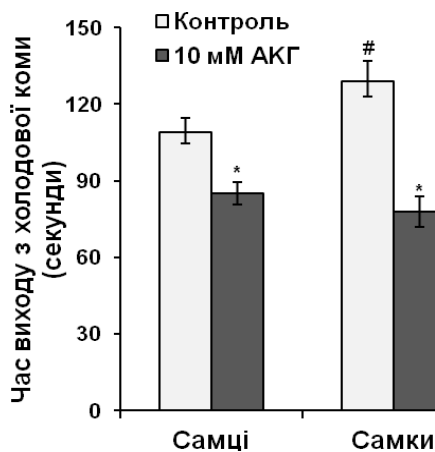


Рис. 2. Час виходу з холодової коми дводенних мух *Canton S*, вихованих на середовищі з 10 мМ АКГ та підданих дії холодового стресу при 0°C протягом 15 хв, n=5.

*Значення достовірно відрізняється від відповідного значення в контролі (без АКГ) та # від відповідного значення у самців з $P < 0,05$.

Fig. 2. Recovery time from chill coma of two-day-old *Canton S* flies grown on yeast-sucrose medium supplemented with 10 mM AKG. Flies were exposed to cold stress at 0°C for 15 min, n=5.

*Significantly different from respective control values (without AKG) and # from respective values of males with $P < 0.05$.

Для перевірки цього припущення, визначили активність каталази, одного з основних антиоксидантних ферментів, та рівень високомолекулярних та низькомолекулярних тіол-вмісних сполук, які відіграють важливу роль у підтриманні редокс-гомеостазу в організмі (Lushchak, 2011). Як видно з табл. 2, дані показники були вищими у особин, які споживали середовище з АКГ. Таким чином, вирощування на АКГ активує антиоксидантний захист плодової мушки *Canton S*. Очевидно, що спожитий АКГ включається в цикл Кребса, зумовлюючи його

Таблиця 2.

Активність каталази, вміст тіолів та проліну у тілі дводенних мух *D. melanogaster Canton S*, вирощених на середовищі з чи без АКГ.

Параметр	Самки	
	Контроль	10 мМ АКГ
Каталаза, Од/мг білка	232±14 [#]	257±6 ^{*.#}
Білкові тіоли, нмоль/ мг білка	8,1±12,6	116±13 [*]
Низькомолекулярні тіоли, нмоль/ мг білка	26,4±2,3	37,9±5,1 [*]
Пролін, нмоль/ мг сирової маси	0,28±0,09	0,87±0,17 [*]

*Значення достовірно відрізняється від відповідного значення в контролі (без АКГ) та # від відповідного значення у самців з $P < 0,05$, n=6.

*Significantly different from respective control values (without AKG) and # from respective values of males with $P < 0.05$, n=6.

інтенсифікацію та продукцію відновних коферментів. Це посилює, у свою чергу, діяльність ЕТЛ мітохондрій, що супроводжується збільшенням продукції АФК і, як наслідок, активацією антиоксидантного захисту. На підтвердження цього раніше було показано, що АКГ може стимулювати біосинтез глутатіону у культурі клітин (Whillier et al., 2011).

У захисті від холодового стресу у плодової мушки важливу роль відіграє пролін, рівень якого зростає при холодовій адаптації мух (Misener et al., 2001). Припускається, що пролін діє як антифриз, запобігаючи замерзанню гемолімфи. Оскільки АКГ є попередником проліну, ми визначили вміст цього метаболіту у тілі плодової мушки. Вміст проліну у самок, вирощених на середовищі з АКГ, був в 1,4 рази вищим, ніж у контрольних самок (табл. 2). Можна припустити, що екзогенний АКГ у плодової мушки також використовується для синтезу проліну, який бере участь у забезпеченні резистентності до холодового стресу.

Висновки

1. Встановлено, що при сумісному споживанні плодовою мушкою 10 мМ АКГ та 1 мМ НПН послаблюється токсична дія НПН, що відображається у збільшенні загальної кількості утворених лялечок *D. melanogaster Canton S*.
2. Дводенні самці та самки *Canton S*, вирощені на середовищі з 10 мМ АКГ, характеризуються вищою стійкістю до короткотривалого холодового стресу, що виражається у зменшенні часу виходу мух з холодової коми.
3. Підвищення стійкості до холодового стресу у дорослих мух, вирощених на АКГ, може пояснюватись активацією антиоксидантного захисту та зростанням синтезу проліну.

Table 2.

Catalase activity, levels of thiols and proline in the body of two-day-old *D. melanogaster Canton S* flies reared on the medium with or without AKG.

Список літератури:

1. Aebi H. Catalase *in vitro* // Meth. Enzymol. – 1984. – Vol. 105. – P. 121-126.
2. Babich H., Zuckerbraun H. L., Ricklis A. S., Blau L. *In vitro* toxicity of sodium nitroprusside to human endothelial ECV304 cells // Environ. Toxicol. Pharmacol. – 1998. – Vol. 5, No. 2. – P. 135-144.
3. Bergman I., Loxley R. New spectrophotometric method for the determination of proline in tissue hydrolyzates // Anal. Chem. – 1970. – Vol. 42, No. 7. – P. 702-706.
4. Bhattacharya R., Satpute R., Hariharakrishnan J. et al. Acute toxicity of some synthetic cyanogens in rats and their response to oral treatment with alpha-ketoglutarate // Food Chem. Toxicol. – 2009. – Vol. 47. – P. 2314-2320.
5. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, No. 1-2. – P. 248-254.
6. David R. J., Gibert P., Pla E. et al. Cold stress tolerance in *Drosophila*: analysis of chill coma recovery in *D. melanogaster* // J. Therm. Biol. – 1998. – Vol. 23, No. 5. – P. 291-299.
7. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – Vol. 82. – P. 70-77.
8. Harrison A. P., Pierzynowski S. G. Biological effects of 2-oxoglutarate with particular emphasis on the regulation of protein, mineral and lipid absorption/metabolism, muscle performance, kidney function, bone formation and cancerogenesis, all viewed from a healthy ageing perspective state of the art-review article // J. Physiol. Pharmacol. – 2008. – Vol. 59 (Suppl. 1). – P. 91-106.
9. Lee T. S., Kolthoff I. M., Leussing D. L. Reaction of ferrous and ferric iron with 1,10-phenanthroline. I. dissociation constants of ferrous and ferric phenanthroline // J. Am. Chem. Soc. – 1948. – Vol. 70, No. 7. – P. 2348-2352.
10. Lozinsky O., Lushchak O., Storey J., Storey K., Lushchak V. Sodium nitroprusside toxicity in *Drosophila melanogaster*: delayed pupation, reduced adult emergence, and induced oxidative stress // Archives of insects biochemistry and physiology. – 2012. – Vol. 80. – P.166-185. doi: 10.1002/arch.21033
11. Lylyk M., Shmihel H., Kozachok O., Bayliak M. Alpha-ketoglutarate modifies toxic action of sodium nitroprusside and ethanol on *Drosophila melanogaster* // Ukr. Biochem. J., Supplement 2 “Materials of XI Ukrainian Biochemical congress (Kyiv, October 6-10, 2014)”. – Vol. 86, No. 5. – P. 249-250.
12. Lushchak V. I. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 153. – P.175-190. doi: 10.1016/j.cbpc.2010.10.004
13. Lushchak, O. V., Rovenko, B. M., Gospodaryov, D. V., Lushchak, V. I. *Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. – 2011. – Vol. 160, No. 1. – P. 27-34. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.04.019
14. Misener S. R., Chen C., Walker V. K. Cold tolerance and proline metabolic gene expression in *Drosophila melanogaster* // J. Insect. Physiol. – 2001. – Vol. 47, No. 4-5. – P. 393-400.
15. Mitchell B., Bhandari R., Beberta V. et al. Toxicokinetic profiles of α -ketoglutarate cyanohydrin, a cyanide detoxification product, following exposure to potassium cyanide // Toxicol. Lett. – 2013. – Vol. 222, No. 1. – P. 83-89. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.07.008
16. Niemiec T., Sikorska J., Harrison A. et al. Alpha-ketoglutarate stabilizes redox homeostasis and improves arterial elasticity in aged mice // Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 62. – P. 37-43.
17. Privat C., Lantoine F., Bedioui F. et al. Nitric oxide production by endothelial cells: comparison of three methods of quantification // Life Sci. – 1997. – Vol. 61, No. 12. – P. 1195-1202.
18. Whillier S., Garcia B., Chapman B. Glutamine and α -ketoglutarate as glutamate sources for glutathione synthesis in human erythrocytes // FEBS J. – 2011. – Vol. 278. – P. 3152-3163. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08241.x

POSSIBLE PROTECTIVE MECHANISMS OF ALPHA-KETOGLUTARATE ON FRUIT FLY *DROSOPHILA MELANOGASTER* CANTON S UNDER EXPOSURE TO DIFFERENT STRESSORS

M. P. Lylyk, M. M. Bayliak

Alpha-ketoglutaric acid is an important intermediate in Krebs cycle and in metabolism of amino acids. In recent years, the role of alpha-ketoglutaric acid as a powerful natural detoxifying agent was demonstrated. This work aimed to study the ability of the sodium salt of alpha-ketoglutaric acid (AKG) to alleviate the toxic effects of sodium nitroprusside on the larvae development and to increase the resistance of D. melanogaster Canton S flies to cold stress. Sodium nitroprusside (SNP) is widely used as a donor of nitric oxide in medicine but may be toxic for many organisms at high concentrations due to the induction of oxidative/nitrosative stress. This study shows, that food supplementation with AKG alleviates the inhibitory effect of SNP on D. melanogaster Canton S pupation. The number of larvae reached the pupa stage on diet with 10 mM AKG and 1 mM SNP was 20% higher than on diet with 1 mM SNP. The reduced food intake of larvae grown on medium with SNP was not changed by AKG supplementation, and AKG also did not affect the levels of total iron and nitrite ions released from SNP. SNP decomposition is also accompanied by the release of highly toxic cyanide moieties, and the ability of AKG to interact with cyanide ions was reported earlier. It seems that the cyanide-binding capability may be important in prevention of the toxic effects of SNP on D. melanogaster. Two-day-old adult Canton S flies reared on 10 mM AKG were more resistant to cold stress treatment and faster recovered from chill coma (0°C for 15 min) than control ones. Flies reared on AKG had the higher catalase activity and the higher levels of high- and low-molecular mass thiols comparing with the controls. Proline level was 1.4-fold higher in AKG-reared females in comparison with control females. The obtained results suggest, that dietary AKG provides cold stress resistance of two-day-old D. melanogaster flies due to the enhancement of antioxidant system capacity and synthesis of cryoprotective amino acids, such as proline.

Key words: alpha-ketoglutarate, Drosophila melanogaster, pupation, sodium nitroprusside, cold stress, antioxidant defense, proline.

Одержано редакцією 12.05.2015