

УДК 577.123:577.121.6:577.2.04.

М. Лилик, асп., О. Сорочинська, асп., О. Манюх, асп., М. Байляк, канд. біол. наук
Державний Вищий Навчальний Заклад "Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника" Івано-Франківськ**СТАТЕВІ ОСОБЛИВОСТІ АМІНОКИСЛОТНОГО ОБМІНУ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*
ЗА СПОЖИВАННЯ АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТУ**

Досліджено вплив альфа-кетоглутарату на амінокислотний обмін у плодової мушки. Харчовий АКГ не впливав на масу тіла, вміст сечовини, активність глутаматдегідрогенази, аланін- та аспартамінотрансфераз у дводенних мух. Дводенні самки, а не самці, вирощені на АКГ, мали вищий вміст загального білка та вільних амінокислот. Водночас, АКГ призводив до зростання вмісту загального білка в обох статей 24-денного віку. Утримування на середовищі з АКГ знижувало загальну плодючість мух.

Ключові слова: альфа-кетоглутарат, *Drosophila melanogaster*, амінокислоти, загальний білок, плодючість.

Вступ. Альфа-кетоглутарова кислота (АКГ) є важливим інтермедіатом циклу трикарбонових кислот, а також бере участь у метаболізмі амінокислот. На даний час АКГ активно вивчається як харчова добавка, яка може мати багатосторонній позитивний вплив на організм [9; 31]. Зокрема показано, що додавання солей альфа-кетоглутарової кислоти до харчового раціону ссавців стимулює обмінні процеси та відновлення організму при ушкодженнях шлунково-кишкового тракту, травмах м'язів та кісток [7; 9; 10; 20]. Встановлено, що стимулювання синтезу білка при станах білкового дефіциту зумовлене тим, що АКГ активно використовується для біосинтезу амінокислот, зокрема проліну [26], глутамату, глутаміну, лейцину та аспартату [12; 18; 14]. У здорових людей з віком концентрація АКГ в плазмі крові суттєво знижується і при цьому уповільнюються процеси біосинтезу білка, тому було запропоновано розглядати АКГ як потенційно антивіковий фактор [9; 31]. На сьогодні наявні лише окремі дослідження з використання харчового АКГ для запобігання зниження функціональної активності та метаболічних процесів з віком. Так, виявлено, що харчовий АКГ здатен підтримувати редокс-гомеостаз у старих мишей [19]. На моделі нематоди *Caenorhabditis elegans* показана здатність екзогенного АКГ збільшувати тривалість життя шляхом індукції стану близького до дієтичного обмеження [5]. Популярним об'єктом у геронтологічних та дієтологічних дослідженнях останніх років стала плодова мушка *Drosophila melanogaster*. Зокрема на *D. melanogaster* активно вивчається вплив вуглеводної та білкової дієт на показники метаболізму і функціональне старіння організмів [21; 22]. У даній роботі з використанням *D. melanogaster* ми прагнули з'ясувати, чи існують статеві відмінності у впливі харчового АКГ на білковий обмін особин молодого та старшого віку. Оскільки вміст білка у плодової мушки тісно пов'язаний із плодючістю та тривалістю життя [25], нами також визначено яйценосність самок на контрольному та АКГ-вмісному середовищах.

Метою даної роботи було порівняти деякі показники амінокислотного та білкового обміну самців та самок *D. melanogaster* молодого та старшого віку та дослідити взаємозв'язок між плодючістю та вмістом білка у самок за вирощування на контрольному середовищі та середовищі з АКГ.

Матеріали і методи. У роботі використовували лабораторну дику лінію Canton S *D. melanogaster*, яка була надана Блюмінтонським Стоковим Центром університету Індіани (США). Батьківську культуру мух утримували на середовищі [14], яке містило (на 100 мл): 7,5 мл меляси; 5 г сухих пекарських дріжджів; 6,1 г кукурудзяної крупи; 1,2 г агару; 1 мл 18%-го розчину ніпагіну (для інгібування росту цвілевих грибів). Експериментальні культури мух вирощували на середовищі, яке містило 5% сухих пекарських дріжджів, 5% сахарози, 1% агару та 0,18% ніпагіну. Дане середовище приймали за конт-

рольне. У дослідні середовища додатково вносили 1 М розчин натрієвої солі альфа-кетоглутарової кислоти до кінцевої концентрації 10 мМ. Культивування проводили при 25 °С, постійній вологості (50-60%) та світловому режимі день:ніч – 16:8. За цих умов розвиток мух тривав 9-10 днів. Після досягнення дводенного віку мух або переносили на свіжі середовища того самого складу для отримання 24-денних особин, або використовували для біохімічних та фізіологічних тестів. Заміну середовищ проводили кожного другого дня.

У тесті на плодючість, одна особина чоловічої і одна особина жіночої статі утримувались в маленьких пробірках (15 × 60 мм) з 0,7 мл контрольного або АКГ-вмісного середовища. На свіже середовище мушок пересаджували кожен другий день. Через 24 год після пересадки на свіже середовище підраховували кількість яєць, які відклала самка. Для контрольної та дослідної груп було протестована плодючість для 20 пар мух.

Для біохімічних експериментів мух розділяли за статтю шляхом анестезування за допомогою вуглекислого газу. Масу однієї мухи визначали як середнє арифметичне десяти, зважених на торсійній вазі, особин. Вміст води визначали за різницею маси тіла плодової мушки до і після висушування у сушильній шафі при 60 °С.

Для отримання безклітинних екстрактів мух однієї статі зважували і гомогенізували у співвідношенні 1:10 (маса/об'єм) в охолоджену 50 мМ калій-фосфатну буфері (КФБ) (рН 7,0), який містив 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ фенілметилсульфонілфториду. Для визначення активності глутамінсинтази гомогенізацію мух проводили в 50 мМ Тріс-НСІ буфері (рН 7,0). Гомогенати центрифугували протягом 15 хв при 13000 г на центрифугі Eppendorf 5415R при 4 °С. Одержані супернатанти використовували для визначення біохімічних показників. Визначення активностей аспартамінотрансферази (АСТ) та аланінамінотрансферази (АЛТ) проводили з використанням відповідних діагностичних наборів фірми "Corgau" (Ломянки, Польща) згідно з інструкціями виробника. Активність глутаматдегідрогенази (ГДГ) визначали за методом Догерті [8], реєструючи зміну оптичного поглинання НАДН при 340 нм. Реакційна суміш в об'ємі 1 мл містила 50 мМ КФБ (рН 7,0), 20 мМ АКГ, 50 мМ NH₄Cl, 0,12 мМ НАДН та 10 мкл супернатанту. У бланки замість супернатанту вносили середовище гомогенізації. Для розрахунків використовували коефіцієнт молярної екстинції для НАДН – 6,22 мМ⁻¹·см⁻¹. Активність глутамінсинтази визначали непрямим колориметричним методом за кількістю утвореного фосфату при гідролізі АТФ у ході реакції синтезу глутаміну з глутамату та аміаку [28]. Реакційна суміш містила 50 мМ Тріс-НСІ (рН 7,0), 7,5 мМ АТФ, 100 мМ L-глутамату, 50 мМ NH₄Cl, 50 мМ MgCl₂ та 20 мкл супернатанту у кінцевому об'ємі проби 0,2 мл. Окремо готували бланки, які не містили супернатанту. Реакцію починали додаванням супернатанту. Проби інкубували протягом 20 хв

при 25 °С. Зупиняли реакцію додаванням 1,3 мл 0,8% FeSO₄ (свіжоприготовлений розчин у 0,015 н H₂SO₄). До проб додавали 0,3 мл 6,6% (NH₄)₆Mo₇O₂₄ у 7,5 н H₂SO₄ для визначення вивільненого фосфату; при цьому утворювався комплекс блакитного кольору, оптичну густину якого визначали при 700 нм. Для розрахунків будували калібрувальну криву на основі K₂HPO₄ (5 ммоль/л). Вміст сечовини визначали з використанням діагностичного набору фірми "Cormay" (Лоянка, Польща) згідно з інструкцією виробника. Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартний розчин сечовини (7,13 ммоль/л). Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [3], який ґрунтується на здатності білків утворювати забарвлені сполуки з барвником Кумасі яскраво-голубим G-250. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

Для визначення вмісту вільних амінокислот супернатанти змішували з трихлороцтовою кислотою (кінцева концентрація 10%) для осадження білків та повторно центрифугували. В надосадковій рідині визначали пул амінокислот нінгідринним методом за утворенням блакитного комплексу з максимумом поглинання при

570 нм [15]. Як стандарт використовували глютамінову кислоту (2 нмоль/л).

Дані представлено як середнє ± похибка середнього (M ± m). Статистичну обробку здійснювали за допомогою комп'ютерної програми "Mupova", використовуючи критерій Стьюдента.

Результати та обговорення. У роботі мух вирощували, починаючи зі стадії яйця, на дріжджово-сахарозному середовищі з оптимальним для мух співвідношенням компонентів (5%/5%). У дослідне середовище додавали 10 мМ альфа-кетоглутарат натрію. Раніше нами було показано, що дана концентрація АКГ не впливає на розвиток мух [24], збільшує вміст білка та активує антиоксидантний захист молодих мух [2].

Дводенні особи *D. melanogaster*, вирощені на контрольному та експериментальному середовищах, не відрізнялися за масою тіла (рис. 1А), при цьому маса самок була вищою, ніж у самців, що є характерно для цього виду комах [1]. Вміст води у тілі особин обох статей також не відрізнявся за вирощування на контрольному та дослідному середовищах (рис. 1Б).

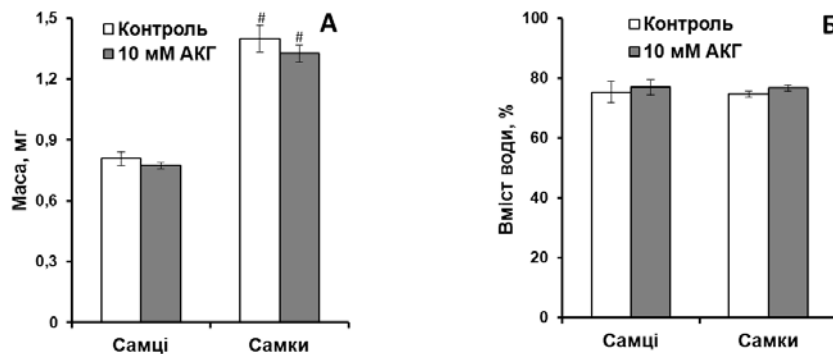


Рис. 1. Маса тіла (А) та вміст води (Б) у тілі дводенних особин *D. melanogaster* Canton S, вирощених на контрольному середовищі та середовищі, яке містило 10 мМ АКГ

Примітки: [#]Достовірно відрізняється від відповідного значення у самців з P < 0,05, n = 15

Водночас, вміст водорозчинного білка та вільних амінокислот був відповідно у 1,2 і 1,5 рази вищим у тілі самок, вирощених на середовищі з 10 мМ АКГ, порівняно із контрольними особинами (рис. 2). У контрольних і дослідних самців відмінностей за цими показниками не виявлено. Таким чином, харчовий АКГ може бути порізню за дією у білковий метаболізм молодих самців та самок плодової мушки. Слід зазначити, що у контрольних самок вміст амінокислот був у 1,7 рази нижчим, ніж у контрольних самців. Зростання вмісту амінокислот

та білка у дослідних самок може свідчити про те, що АКГ використовується для їхнього синтезу, як це було показано раніше [12; 14]. Проте не виключено, що АКГ може знижувати швидкість розпаду амінокислот та білків, таким чином підвищуючи загальний вміст білка у тілі. Щоб перевірити це припущення, ми визначили вміст сечовини у тілі мух, які розвивалися на контрольному і дослідному середовищах. Сечовина є одним з продуктів продукту розпаду білків та амінокислот у плодової мушки та інших тварин.

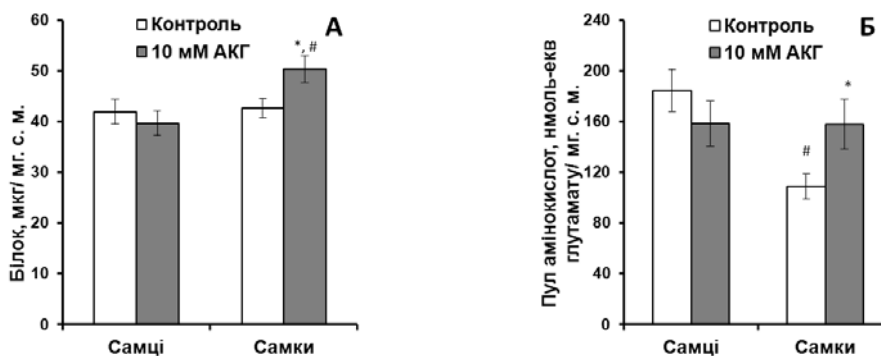


Рис. 2. Вміст водорозчинного білка (А) та вміст вільних амінокислот (Б) у тілі дводенних особин *D. melanogaster* Canton S, вирощених на контрольному середовищі та середовищі, яке містило 10 мМ АКГ

Примітки: ^{*}Достовірно відрізняється від відповідного контрольного значення та [#] від відповідного значення у самців з P < 0,05, n = 5-8

Як бачимо з табл. 1, вміст сечовини суттєво не відрізнявся у контрольних та дослідних особин. Таким чином, харчовий АКГ не впливав на швидкість катаболізму білків/амінокислот у плодової мушки.

Відомо, що у метаболізмі амінокислот АКГ бере участь як субстрат ферментів обміну амінокислот, зок-

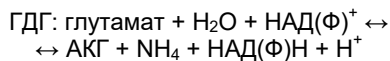
рема глутаматдегідрогенази та амінотрансфераз [9; 12]. Тому нами визначено активність глутаматдегідрогенази (ГДГ), аспаратамінотрансферази (АСТ), аланінамінотрансферази (АЛТ) та глутамінсинтази (ГС) у самців та самок *D. melanogaster*, вирощених на АКГ (Табл. 1).

Таблиця 2. Вміст сечовини та активність ферментів білкового обміну (мОд/мг білка) у дводенних особин *D. melanogaster* Canton S, вирощених на контрольному та АКГ-вмісному середовищах

Показник	Самці		Самки		Кількість повторів
	Контроль	10 мМ АКГ	Контроль	10 мМ АКГ	
Вміст сечовини, нмоль/мг с.м.	1,59±0,25	1,04±0,22	1,06±0,08	1,31±0,25	5
ГДГ, мОд/мг білка	8,31±1,0	8,40±2,82	9,19±1,92	10,2±0,9	5
АСТ, мОд/мг білка	75,2±5,7	67,6±4,39	67,4±4,17	61,6±4,4	5
АЛТ, мОд/мг білка	124±13	123±8	118±3	100±10	4
ГС, мОд/мг білка	328±13	283±11	264±20#	269±8	7

Примітка. *Достовірно відрізняється від відповідного контрольного значення та # від відповідного значення у самців з $P < 0,05$, $n = 4-7$.

Як бачимо, активність ГДГ, АСТ та АЛТ була подібною у дослідних та контрольних особин обох статей. Дані ферменти каталізують оборотні реакції:



АСТ: глутамат + оксалоацетат \leftrightarrow АКГ + аспарат

АЛТ: глутамат + піруват \leftrightarrow АКГ + аланін

Можемо припустити, що у нашому випадку у самок плодової мушки, за додавання АКГ, реакції можуть бути зсуненими у сторону синтезу відповідних амінокислот. ГДГ може забезпечувати синтез глутамату, який, у свою чергу, може використовуватися трансаміназами для синтезу аспарату та аланіну. При цьому слід зауважити, що амінувальна та дезамінувальна активності ГДГ визначаються ще і використанням різних відновних еквівалентів – НАДН і НАДФН відповідно [27]. Активність ГС, яка здійснює АТФ-залежний синтез глутаміну з глутамату, була на 14% нижчою у дослідних самців, порівняно з контрольними самцями. У дослідних самок активність ГС не відрізнялась від значень у контрольних самок. Отримані результати можуть свідчити про те, що зростання вмісту амінокислот у самок, очевидно, не пов'язано із зростанням синтезу глутаміну. Раніше нами було показано, що вирощування на АКГ збільшує синтез проліну у самок плодової мушки [2]. Тому можемо

припустити, що вищий вміст амінокислот у дослідних самок може бути пов'язаний з посиленням синтезу проліну, а також глутамату, аланіну, аспарату та лейцину, як це було показано раніше в інших тварин [14]. Цікавим фактом є зниження активності ГС у дослідних самців; водночас у самців відмічається тенденція до зниження вмісту вільних АК у тілі. Ймовірно, що харчовий АКГ у самців не активно задіяний в синтез амінокислот у самців, а включається в інші процеси. Зокрема, це може бути цикл Кребса для отримання енергії. Енергія самцям потрібна для активного руху, зокрема для зваблювання самок [13]. Водночас основна біологічна роль самок – це продукування здорового потомства. Ми можемо припустити, що інтенсифікація білкового синтезу у самок за споживання АКГ може сприяти забезпеченню необхідними ресурсами для продукування та відкладення достатньої кількості яєць. Для перевірки даного припущення нами була визначена плодючість самок на контрольному середовищі та середовищі з альфакетоглутаратом. Як бачимо з рис. 3, самки, вирощені і утримувані на АКГ-вмісному середовищі, мали нижчу плодючість починаючи з 6 до 16 доби, ніж контрольні самки. Окрім того, загальна кількість відкладених яєць була на 28% нижчою у самок на середовищі з 10 мМ АКГ, порівняно з контрольними самками.

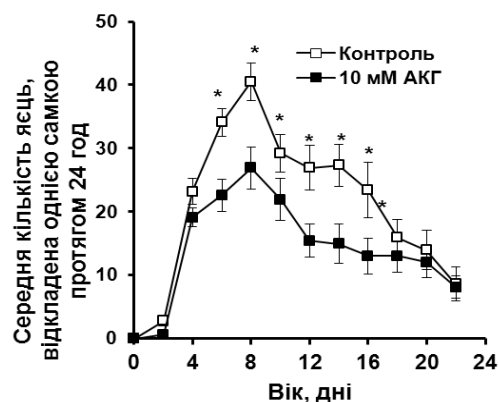


Рис. 3. Плодючість самок *D. melanogaster* Canton S за утримування на контрольному середовищі та середовищі, яке містило 10 мМ АКГ, $n = 20$

Примітки *Достовірно відрізняється від відповідного контрольного значення

Таким чином, на противагу очікуванням, харчовий АКГ призводив до зниження плодючості мух. Щоб з'ясувати, чи мала вплив АКГ-вмісна дієта на білковий обмін

мух у старшого віку, нами було визначено вміст загального білка у 24-денних самців та самок, утримуваних на середовищі з та без АКГ. З рис. 4 видно, що самці та

самки, утримувані на середовищі з 10 мМ АКГ, мали на 38% і 46% вищий вміст білка, ніж відповідні контрольні особини. Варто зазначити, що вміст білка у 24-денних самців та самок у контрольній групі був на 34% та 13% нижчим, ніж у відповідних молодих особин (рис. 1 та рис. 4). Проте між старшими та молодими особинами, утримуваними на середовищі з АКГ, суттєвих відмінностей у вмісті білка не було виявлено. Таким чином, АКГ запобігає зниженню вмісту білка у особин старшого віку. Водночас, вищий вміст білка у дослідних 24-денних самок, ніж у контрольних, може бути також частково зумовлений їх зниженою плодючістю: самки відкладають менше яєць і відповідно менше білкових ресурсів витрачається. З іншого боку, у дрозофіли, як і у багатьох інших

тварин, плодючість, зазвичай, обернено корелює з тривалістю життя, а саме знижена плодючість часто супроводжується збільшеною тривалістю життя та є характерною ознакою довгоживучих особин [6; 17]. Разом з тим, зниження білкового синтезу з віком є відмінною ознакою старіючих організмів у багатьох видів, в тому числі людини [23]. Таким чином, ми вважаємо, що зниження плодючості та збільшення вмісту загального білка у 24-денних особин плодової мушки слід розглядати як антивікові ефекти харчового АКГ, з іншого боку, наші результати свідчать, що *Drosophila melanogaster* може слугувати дешевим та надійним об'єктом для більш поглибленого вивчення антивікових механізмів АКГ.

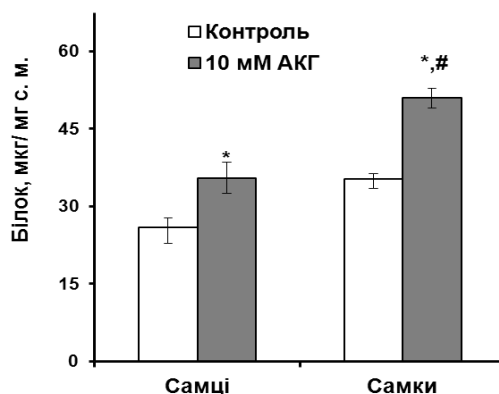


Рис. 4. Вміст водорозчинного білка у тілі 24-денних особин *D. melanogaster* Canton S, утримуваних на контрольному середовищі та середовищі, яке містило 10 мМ АКГ

Примітки *Достовірно відрізняється від відповідного контрольного значення та # від відповідного значення у самців з $P < 0,05$, $n = 4-7$

Висновки: Таким чином, додавання АКГ до харчового раціону плодової мушки *D. melanogaster* посилює синтез білків та амінокислот у старших особин обох статей та у молодих самок, але не у молодих самців. При цьому, активності важливих ферментів обміну амінокислот, а саме ГДГ, АЛТ, АСТ та ГС, залишалися незмінними у молодих мух. Утримування на АКГ-вмісному середовищі призводило до зниження загальної плодючості мух. Отримані результати свідчать про потенційні антивікові ефекти АКГ та наявність деяких відмінностей у шляхах утилізації екзогенного АКГ у самців та самок різного віку. Також результати свідчать про важливість використання обох статей модельних організмів у вивченні біологічних ефектів харчових добавок.

Подяка. Автори висловлюють подяку Блюмінстонському Стоковому Центру за надану культуру мух та професору В.І. Луцкаку за фінансову підтримку роботи, яка виконана у рамках держбюджетної теми "Вивчення молекулярних механізмів адаптації живих організмів до несприятливих чинників і розробка способів підвищення адаптаційного потенціалу" (№ держреєстрації 0115U002304).

Список використаних джерел

1. Arias A. *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century / A. Arias // *Methods Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 420. – P. 1-25.
2. Baylak M.M. Dietary alpha-ketoglutarate increases cold tolerance in *Drosophila melanogaster* and enhances protein pool and antioxidant defense in sex-specific manner / M.P. Lylyk, H.V. Shmihel, O.M. Sorochynska [et al.] // *J. Therm Biol.* – 2016. – Vol. 60. – P. 1-11.
3. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding / M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
4. Burrin D. Metabolic fates of dietary glutamate in the intestine / D. Burrin, B. Stoll // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2009. – Vol. 9. – P. 850-856.

5. Chin R.M. The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR / R.M. Chin, X. Fu, M.Y. Pai [et al.] // *Nature.* – 2014. – Vol. 510, N 7505. – P. 397-401.
6. Djawdan M. Metabolic aspects of the trade-off between fecundity and longevity in *Drosophila melanogaster* / M. Djawdan, T.T. Sugiyama, L.K. Schlaeger [et al.] // *Physiological Zoology.* – 1996. – Vol. 69, N 5. – P. 1176–1195.
7. Dobrowolski P. The effect of dietary administration of 2-oxoglutaric acid on the cartilage and bone of growing rats / P. Dobrowolski, E. Tomaszewska, M. Bienko [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2013. – Vol. 110, N 4. – P. 651-658.
8. Doherty D. L-Glutamate dehydrogenases (yeast) / D. Doherty // *Methods in Enzymol.* – 1970. – Vol. 17. – P. 850-856.
9. Harrison A.P. 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 / A.P. Harrison, S.G. Pierzynowski // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 59, N 1. P. 91-106.
10. Hou Y. Effects of α -ketoglutarate on energy status in the intestinal mucosa of weaned piglets chronically challenged with lipopolysaccharide / Y. Hou, K. Yao, L. Wang [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2011. – Vol. 106, N 3. – P. 357-363.
11. Hudson R.C. L-Glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism / R.C. Hudson, R.M. Daniel // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1993. – Vol. 106. – P. 767-792.
12. Yao K. Alpha-ketoglutarate inhibits glutamine degradation and enhances protein synthesis in intestinal porcine epithelial cells / K. Yao, Y. Yin, X. Li [et al.] // *Amino Acids.* – 2012. – Vol. 42, N 6. – P. 2491-2500.
13. Kowalski P. Courtship song in *Drosophila melanogaster*: a differential effect on male-female locomotor activity / P. Kowalski, S. Aubin, T. Martin Can // *J. Zool.* – 2004. – Vol. 82. – P. 1258-1266.
14. Lambert B.D. First-pass metabolism limits the intestinal absorption of enteral alpha-ketoglutarate in young pigs / B.D. Lambert, R. Filip, B. Stoll [et al.] // *J. Nutr.* – 2006. – Vol. 136. – P. 2779-2784.
15. Lee Y. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin / Y. Lee, T. Takahashi // *Analytical Biochemistry.* – 1966. – Vol. 14, Issue 1. – P. 71-77.
16. Lozinsky O. Sodium nitroprusside toxicity in *Drosophila melanogaster*: delayed pupation, reduced adult emergence, and induced oxidative/nitrosative stress in eclosed flies / O. Lozinsky, O. Lushchak, J. Storey [et al.] // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* – 2012. – Vol. 80. – P. 166-185.

17. Lushchak O.V. Balance between macronutrients affects life span and functional senescence in fruit fly *Drosophila melanogaster* / O.V. Lushchak, D.V. Gospodaryov, B.M. Rovenko [et al.] // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. – 2012. – Vol. 67, N 2. – P. 118–125.
18. Mühling J. Effects of alpha-ketoglutarate on neutrophil intracellular amino and alpha-keto acid profiles and ROS production / J. Mühling, F. Tussing, K.A. Nickolaus [et al.] // Amino Acids. – 2010. – Vol. 38. – P. 167–177.
19. Niemiec, T. Alpha-ketoglutarate stabilizes redox homeostasis and improves arterial elasticity in aged mice / T. Niemiec, J. Sikorska, A. Harrison, [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 62, N 1. – P. 37–43.
20. Radzki R.P. Anti-osteopenic effect of alpha-ketoglutarate sodium salt in ovariectomized rats / R.P. Radzki, M. Bienko, S.G. Pierzynowski // J. Bone Miner. Metab. – 2012. – Vol. 30, N 6. – P. 651–659.
21. Reis T. Effects of synthetic diets enriched in specific nutrients on *Drosophila* development, body fat, and lifespan / T. Reis // PLoS One. – 2016. – Vol 11, N 1. e0146758. doi: 10.1371/journal.pone.0146758.
22. Rovenko B.M. High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in *Drosophila melanogaster* / B.M. Rovenko, O.I. Kubrak, D.V. Gospodaryov [et al.] // J. Insect. Physiol. – 2015. – Vol. 79. – P. 42–54.
23. Salminen A., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., 2015. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases are sensors of energy metabolism, oxygen availability, and iron homeostasis: potential role in the regulation of aging process / A. Salminen, A. Kauppinen, K. Kaarniranta // Cell. Mol. Life Sci. – Vol. 72, N 20. – P. 3897–3914.
24. Shmihel H. Effect of alpha-ketoglutarate on pupation, feeding intensity and levels of some metabolites in larvae of *Drosophila melanogaster* / H.V. Shmihel, M.P. Lylyk, M.M. Bayliak // Visnyk of the Lviv university, Series biology. – 2014. – Vol. 66. – P. 91–99.
25. Skorupa D.A. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster* / D.A. Skorupa, A. Dervisefendic, J. Zwiener [et al.] // Aging Cell. – 2008. – Vol. 7, N 4. – P. 478–490. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00400.x.
26. Son E. Alpha-ketoglutarate stimulates procollagen production in cultured human dermal fibroblasts, and decreases UVB-induced wrinkle formation following topical application on the dorsal skin of hairless mice / E. Son, G. Choi, H. Kim [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2007. Vol. 30, N 8. – P. 1395–1399.
27. Tiwari A.K. Evaluation of sub-cellular distribution of glutamate dehydrogenase (GDH) in *Drosophila melanogaster* larvae / A.K. Tiwari, P. Panda, J.S. Purohit // Acta Histochem. – 2014. – Vol. 116, N 2. P.297–303.
28. Woolfolk C.A. Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli* / C.A. Woolfolk, B. Shapiro, E.R. Stadtman // Arch. Biochem. Biophys. – 1966. – Vol. 116. – P. 177–192.
29. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition / G. Wu // Amino Acids. – 2009. – Vol. 37. – P. 1–17.
30. Wu N. Alpha-Ketoglutarate: physiological functions and applications / N. Wu, M. Yang, U. Gaur [et al.] // Biomol. Ther. – 2016. – Vol. 24, N 1. – P. 1–8.
31. Zdzisinska B. Alpha-Ketoglutarate as a molecule with pleiotropic activity: well-known and novel possibilities of therapeutic use / B. Zdzisinska, A. Zurek, M. Kandefer-Szerszen // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 2016. (in press) DOI 10.1007/s00005-016-0406-x.
- absorption/metabolism, muscle performance, kidney function, bone formation and cancerogenesis, all viewed from a healthy ageing perspective state of the art-review article / A.P. Harrison, S.G. Pierzynowski // J. Physiol. Pharmacol. – 2008. – Vol. 59, N 1. P. 91–106.
10. Hou Y. Effects of α -ketoglutarate on energy status in the intestinal mucosa of weaned piglets chronically challenged with lipopolysaccharide / Y. Hou, K. Yao, L. Wang [et al.] // Br. J. Nutr. – 2011. – Vol. 106, N 3. – P. 357–363.
11. Hudson R.C. L-Glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism / R.C. Hudson, R.M. Daniel // Comp. Biochem. Physiol. – 1993. – Vol. 106. – P. 767–792.
12. Yao K. Alpha-ketoglutarate inhibits glutamine degradation and enhances protein synthesis in intestinal porcine epithelial cells / K. Yao, Y. Yin, X. Li [et al.] // Amino Acids. – 2012. – Vol. 42, N 6. – P. 2491–2500.
13. Kowalski P. Courtship song in *Drosophila melanogaster*: a differential effect on male–female locomotor activity / P. Kowalski, S. Aubin, T. Martin Can // J. Zool. – 2004. – Vol. 82. – P. 1258–1266.
14. Lambert B.D. First-pass metabolism limits the intestinal absorption of enteral alpha-ketoglutarate in young pigs / B.D. Lambert, R. Filip, B. Stoll [et al.] // J. Nutr. – 2006. – Vol. 136. – P. 2779–2784.
15. Lee Y. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin / Y. Lee, T. Takahashi // Analytical Biochemistry. – 1966. – Vol. 14, Issue 1. – P. 71–77.
16. Lozinsky O. Sodium nitroprusside toxicity in *Drosophila melanogaster*: delayed pupation, reduced adult emergence, and induced oxidative / nitrosative stress in eclosed flies / O. Lozinsky, O. Lushchak, J. Storey [et al.] // Arch. Insect Biochem. Physiol. – 2012. – Vol. 80. – P. 166–185.
17. Lushchak O.V. Balance between macronutrients affects life span and functional senescence in fruit fly *Drosophila melanogaster* / O.V. Lushchak, D.V. Gospodaryov, B.M. Rovenko [et al.] // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. – 2012. – Vol. 67, N 2. – P. 118–125.
18. Mühling J. Effects of alpha-ketoglutarate on neutrophil intracellular amino and alpha-keto acid profiles and ROS production / J. Mühling, F. Tussing, K.A. Nickolaus [et al.] // Amino Acids. – 2010. – Vol. 38. – P. 167–177.
19. Niemiec, T. Alpha-ketoglutarate stabilizes redox homeostasis and improves arterial elasticity in aged mice / T. Niemiec, J. Sikorska, A. Harrison, [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 62, N 1. – P. 37–43.
20. Radzki R.P. Anti-osteopenic effect of alpha-ketoglutarate sodium salt in ovariectomized rats / R.P. Radzki, M. Bienko, S.G. Pierzynowski // J. Bone Miner. Metab. – 2012. – Vol. 30, N 6. – P. 651–659.
21. Reis T. Effects of synthetic diets enriched in specific nutrients on *Drosophila* development, body fat, and lifespan / T. Reis // PLoS One. – 2016. – Vol 11, N 1. e0146758. doi: 10.1371/journal.pone.0146758.
22. Rovenko B.M. High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in *Drosophila melanogaster* / B.M. Rovenko, O.I. Kubrak, D.V. Gospodaryov [et al.] // J. Insect. Physiol. – 2015. – Vol. 79. – P. 42–54.
23. Salminen A., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., 2015. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases are sensors of energy metabolism, oxygen availability, and iron homeostasis: potential role in the regulation of aging process / A. Salminen, A. Kauppinen, K. Kaarniranta // Cell. Mol. Life Sci. – Vol. 72, N 20. – P. 3897–3914.
24. Shmihel H. Effect of alpha-ketoglutarate on pupation, feeding intensity and levels of some metabolites in larvae of *Drosophila melanogaster* / H.V. Shmihel, M.P. Lylyk, M.M. Bayliak // Visnyk of the Lviv university, Series biology. – 2014. – Vol. 66. – P. 91–99.
25. Skorupa D.A. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster* / D.A. Skorupa, A. Dervisefendic, J. Zwiener [et al.] // Aging Cell. – 2008. – Vol. 7, N 4. – P. 478–490. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00400.x.
26. Son E. Alpha-ketoglutarate stimulates procollagen production in cultured human dermal fibroblasts, and decreases UVB-induced wrinkle formation following topical application on the dorsal skin of hairless mice / E. Son, G. Choi, H. Kim [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2007. Vol. 30, N 8. – P. 1395–1399.
27. Tiwari A.K. Evaluation of sub-cellular distribution of glutamate dehydrogenase (GDH) in *Drosophila melanogaster* larvae / A.K. Tiwari, P. Panda, J.S. Purohit // Acta Histochem. – 2014. – Vol. 116, N 2. P.297–303.
28. Woolfolk C.A. Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli* / C.A. Woolfolk, B. Shapiro, E.R. Stadtman // Arch. Biochem. Biophys. – 1966. – Vol. 116. – P. 177–192.
29. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition / G. Wu // Amino Acids. – 2009. – Vol. 37. – P. 1–17.
30. Wu N. Alpha-Ketoglutarate: physiological functions and applications / N. Wu, M. Yang, U. Gaur [et al.] // Biomol. Ther. – 2016. – Vol. 24, N 1. – P. 1–8.
31. Zdzisinska B. Alpha-Ketoglutarate as a molecule with pleiotropic activity: well-known and novel possibilities of therapeutic use / B. Zdzisinska, A. Zurek, M. Kandefer-Szerszen // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 2016. (in press) DOI 10.1007/s00005-016-0406-x.

References

- Arias A. *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century / A. Arias // Methods Mol. Biol. – 2008. – Vol. 420. – P. 1–25.
- Bayliak M.M. Dietary alpha-ketoglutarate increases cold tolerance in *Drosophila melanogaster* and enhances protein pool and antioxidant defense in sex-specific manner / M.P. Lylyk, H.V. Shmihel, O.M. Sorochynska [et al.] // J. Therm Biol. – 2016. – Vol. 60. – P. 1–11.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
- Burrin D. Metabolic fates of dietary glutamate in the intestine / D. Burrin, B. Stoll // Am. J. Clin. Nutr. – 2009. – Vol. 9. – P. 850–856.
- Chin R.M. The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR / R.M. Chin, X. Fu, M.Y. Pai [et al.] // Nature. – 2014. – Vol. 510, N 7505. – P. 397–401.
- Djawdan M. Metabolic aspects of the trade-off between fecundity and longevity in *Drosophila melanogaster* / M. Djawdan, T.T. Sugiyama, L.K. Schlaeger [et al.] // Physiological Zoology. – 1996. – Vol. 69, N 5. – P. 1176–1195.
- Dobrowolski P. The effect of dietary administration of 2-oxoglutaric acid on the cartilage and bone of growing rats / P. Dobrowolski, E. Tomaszewska, M. Bienko [et al.] // Br. J. Nutr. – 2013. – Vol. 110, N 4. – P. 651–658.
- Doherty D. L-Glutamate dehydrogenases (yeast) / D. Doherty // Methods in Enzymol. – 1970. – Vol. 17. – P. 850–856.
- Harrison A.P. Biological effects of 2-oxoglutarate with particular emphasis on the regulation of protein, mineral and lipid

М. Лирик, асп., О. Сорочинская, асп., О. Манюх, асп., М. Байляк, канд. биол. наук
Государственное Высшее Учебное Заведение
"Прикарпатский национальный университет имени Васыля Стефанька", Ивано-Франковск, Украина

ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ АМИНОКИСЛОТНОГО ОБМЕНА В *DROSOPHILA MELANOGASTER* ЗА УПОТРЕБЛЕНИЯ АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТА

Исследовано влияние альфа-кетоглутарата (АКГ) на аминокислотный обмен у плодовой мушки. Пищевой АКГ не влиял на массу тела, содержание мочевины, активность глутаматдегидрогеназы, аланин- и аспаратаминотрансфераз в двухдневных мух. Двухдневные самки, а не самцы, выращенные на 10 мМ АКГ, имели высшее содержание общего белка и свободных аминокислот, а подопытные самцы – низшую активность глутаминсинтазы по сравнению с контрольными особями. В то же время, АКГ приводил к увеличению содержания общего белка в обоих полах 24-дневного возраста. Содержание на среде с АКГ снижало общую плодовитость мух.

Ключевые слова: альфа-кетоглутарат, *Drosophila melanogaster*, аминокислоты, общий белок, плодовитость.

M. Lylyk, PhD stud., O. Sorochynska, PhD stud., O. Maniukh, PhD stud., M. Bayliak, PhD.
Department of Biochemistry and Biotechnology, Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

GENDER DIFFERENCES OF AMINO ACID METABOLISM IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* ON ALPHA-KETOGLUTARATE-SUPPLEMENTED FOOD

The influence of alpha-ketoglutarate (AKG) on amino acid metabolism in the fruit fly was investigated. Dietary AKG did not affect body mass, urea content, activity of glutamate dehydrogenase, alanin- and aspartataminotransferase in two-day-old flies. Two-day-old females, but not males, grown on 10 mM AKG, had higher levels of total protein and free amino acids. However, AKG led to an increase in total protein in 24-day-old flies of both sexes. Maintenance on AKG-containing medium reduced overall fecundity of flies.

Keywords: alpha-ketoglutarate, *Drosophila melanogaster*, amino acids, total protein, fecundity.

УДК 581.711.712:581.132:504.055

Н. Нужина, канд. биол. наук, О. Ткачук, канд. биол. наук, А. Фукаляк, біолог II категорії
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ДИНАМІКА ПІГМЕНТНОГО КОМПЛЕКСУ ТРЬОХ ВИДІВ ШИПШИНИ ЗА УМОВ ГІПЕРТЕРМІЇ

Наведено дані про зміну вмісту фотосинтезуючих пігментів у листках рослин *Rosa donetzica*, *Rosa spinosissima*, *Rosa reversa* після короткотривалого впливу високої температури (+40°C). Встановлено, що рослини виду *Rosa donetzica* є найменш жаростійкими з досліджених видів.

Ключові слова: *Rosa*, фотосинтезуючі пігменти, гіпертермія.

Вступ. Дикорослі представники роду *Rosa* L. здавна були і залишаються дотепер цінними господарськими рослинами. Їх біохімічні властивості стали основою застосування шипшин у фармакології, біологічні особливості і декоративні якості використовують у садово-парковому будівництві. Успішність культивування шипшин залежить від багатьох факторів середовища. Одним з важливих факторів, що впливає на ріст і розвиток рослинного організму, як відомо, є температурний режим. Різкі коливання температури особливо негативно впливають на метаболізм рослини. За літературними даними, пігментний комплекс є дуже чутливим до змін температури середовища [3, 8, 10]. Зокрема встановлено, що адаптація фотосинтезуючої системи до температурного стресу полягає, у першу чергу, у зміні співвідношення хлорофілів a/b (chl a/chl b) і хлорофілів a+b/каротиноїди (chl a+chl b/car) [1, 3]. Зустрічаються дані про відмінний вплив гіпертермії на флавоноїди залежно від їхнього типу та місцезнаходження в рослині [13].

Метою нашої роботи було детальне вивчення динаміки пігментного комплексу відібраних для дослідів видів роду *Rosa* при вирощуванні в умовах оптимальних температур та після короткотривалої дії високотемпературного стресу.

Об'єкт та методи досліджень. Об'єктами дослідження слугували види роду *Rosa* з колекції Ботанічного саду ім. акад. О. В. Фоміна: *Rosa donetzica* Dubovik, *Rosa spinosissima* L., *Rosa reversa* Waldst. et Kit. Для дослідів відбирали види з різних природних ареалів, а отже з відмінною пристосованістю до високих температур.

У експерименті використовували листя трьохрічних рослин, отриманих вегетативно від шипшин, котрі зростають у колекційних експозиціях Ботанічного саду. Дослідження проводили в першій декаді червня, у період коли денна температура повітря становила +23...+25°C, на рослинах, які раніше не піддавалися дії гіпертермії.

Дослідні рослини, у горщиках з землею, прогрівали у повітряному термостаті за температури +40°C протягом трьох годин [5]. Температуру в термостаті контролювали термометром, розміщеним на рівні рослин. Передня стінка термостата була скляною і рослини перебували в умовах природного освітлення. Ми не використовували додаткового до природного освітлення при термообробці, оскільки відомі факти, про посилення інгібуючої дії високих температур при яскравому освітленні на фотосинтезуючу систему [2]. Контрольні рослини протягом трьох годин перебували в виключеному термостаті, для створення ідентичних умов освітлення.

Контрольна група рослин витримувалась при температурі +25°C. Всі дослідні проводили в чотирикратній повторюваності. Вміст пігментів визначали за допомогою спектрофотометра СФ-2000. Пігменти екстрагували з рослинного матеріалу 80 % ацетоном і визначали спектрофотометричним методом при $\lambda=663, 646, 470$ нм [12]. Вміст пігментів обчислювали з розрахунку на масу сирої речовини.

Сумарний вміст флавоноїдів в перерахуванні на рутин і абсолютно суху масу у відсотках визначали за методикою [9] при $\lambda=410$ нм.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Statistica 8, достовірність результатів визначали за t-критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Короткотривала дія високої температури на *R. donetzica* спричинила зменшення кількості хлорофілів a і b, ймовірно за рахунок їх руйнування. Особливо нестійкий до температурного стресу виявився хлорофіл b (рис. 1). Збільшення внаслідок стресу кількості каротиноїдів, а також зменшення показника (chl a + chl b)/ car вказують на формування адаптивної реакції за участю цих пігментів. Різде збільшення співвідношення chl a / chl b після прогрівання