

## ПОМІРНИЙ ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС У ПЛОДОВОЇ МУШКИ *Drosophila melanogaster*, СПРИЧИНЕНИЙ ПРОДУКТАМИ РОЗЩЕПЛЕННЯ САХАРОЗИ

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

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

Досліджено вплив 6%-ї сахарози та еквімолярної суміші глюкози і фруктози у складі дієти личинок плодової мушки *Drosophila melanogaster* на рівень окислених протеїнів та ліпідів, активність антиоксидантних і пов'язаних з ними ензимів у дорослих комах. Показано, що вирощування личинок на дієті із сахарозою призводить до розвитку помірного оксидативного стресу в дорослих комах, який різною мірою виражений в обох статей. У самців окисних пошкоджень зазнавали, в основному, молекули протеїнів, тоді як у самок — ліпідні молекули. Про це свідчить підвищений на 77% вміст карбонільних груп протеїнів та знижений на 40% рівень протеїнових SH-груп у самців, які споживали сахарозу. У самок, які споживали сахарозу, вміст пероксидів ліпідів на 44% вищий, ніж в особин, які утримувались на дієті з еквімолярною сумішшю глюкози і фруктози. Виникнення оксидативного стресу в самок, які споживали сахарозу, супроводжується підвищенням активності каталази, супероксиддисмутази та тіоредоксинредуктази на 30, 15 та 34% відповідно. Одержані результати дають підстави вважати, що форма надходження глюкози і фруктози в організм плодової мушки впливає на перебіг вільнорадикальних процесів.

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

Сахароза, один із найрозповсюдженіших вуглеводів у харчовому раціоні людини, останнім часом активно замінюється альтернативними підсолоджувачами [1–3]. До них належать, зокрема, кукурудзяні сиропи, які є сумішами моносахаридів, де масова частка фруктози складає в середньому 55% від загального вмісту, а решта припадає на глюкозу [2]. Таким чином, за своїм хімічним складом кукурудзяні сиропи дуже подібні до сахарози, однак у них відсутній глікозидний зв'язок між глюкозою і фруктозою.

Незважаючи на широке впровадження кукурудзяних сиропів у виробництво, в низці досліджень було показано, що їх вживання може бути шкідливим для людини і тварин [1–6]. Зокрема, надмірне споживання суміші моносахаридів може призводити до виникнення ожиріння, цукрового діабету другого типу [1, 3], артеріальної гіпертензії [4, 6], запалення [2, 6] та інших патологічних станів, розвиток яких пов'язують із перевантаженням асиміляційних систем клітини [1–3]. Інтенсифікація метаболізму та посилення роботи електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, у свою чергу, можуть супроводжуватися підвищенням концентрації активо-

ваних форм кисню (АФК) та ініціювати розвиток оксидативного стресу [1–3].

Негативний вплив моносахаридів на організм людини і тварин також пов'язують з їх здатністю неферментативно взаємодіяти з молекулами протеїнів, нуклеїнових кислот та ліпідів у реакціях глікації, спричинюючи втрату нативної структури та порушення функцій біомолекул [1, 2, 5, 7]. АФК, які можуть утворюватися за взаємодії продуктів глікації, додатково слугують пошкоджуючими агентами макромолекул [5, 8].

Сахароза, яка є нередукуючим вуглеводом, здатна вступати в реакції глікації та основні метаболічні перетворення тільки після розщеплення до глюкози і фруктози [9, 22, 24] за дії ензиму сахарази ( $\beta$ -фруктофуранозидази, 3.2.1.26) [24]. Це дало нам підстави припустити, що сахароза та суміш глюкози і фруктози можуть по-різному впливати на перебіг метаболічних процесів, зокрема тих, в яких можуть утворюватися АФК.

З огляду на наведені вище аргументи, ми намагалися визначити, як споживання сахарози або еквімолярної суміші глюкози і фруктози впливає на перебіг вільнорадикальних процесів і функціонування антиоксидантної

системи дорослих комах *Drosophila melanogaster*, а також залежність такого впливу від статі плодової мушки.

### Матеріали і методи

**Реактиви.** В роботі використовували фенолметилсульфонілфторид (ФМСФ), 1-хлор-2,4-динітробензол (ХДНБ), відновлений глутатіон, окислений глутатіон, NADP<sup>+</sup>, NADPH, глюкозо-6-фосфат, етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА), ксиленол оранжевий, гідропероксид кумену (ГПК), сульфат заліза, 2,4-динітрофенілгідазин (ДНФГ), N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), трис-НСІ, 5,5'-дитіо-біс(2-нітро)бензойну кислоту (ДТНБ) виробництва компанії Sigma-Aldrich (США), гуанідин-НСІ виробництва Fluka (Німеччина). Всі інші реактиви були вітчизняного виробництва, кваліфікації не нижче чда.

**Утримання батьківської та експериментальної популяції мух *D. melanogaster*.** У роботі використовувалася лабораторна дика лінія *IF* плодової мушки *D. melanogaster*, яку було зібрано в Івано-Франківську в серпні 2007 року. Батьківська популяція мух утримувалася на дріжджово-мясяному середовищі, що містило 6% (маса/об'єм) дріжджів, 4% (об'єм/об'єм) м'яса, 1,3% (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, 6% (маса/об'єм) сахарози або еквімолярної суміші глюкози і фруктози (ГФС), 1,3% (маса/об'єм) агар-агару і 0,4% (об'єм/об'єм) пропіонової кислоти. Загальна калорійність живильних середовищ складала 107 ккал/л. Для підтримання однакової щільності популяції на експериментальні середовища (25 мл середовища в ємності місткістю 250 мл) вносили 260–280 яєць. Після вилуплення імаго їх переносили в ємності з відповідним експериментальним середовищем і утримували там протягом двох днів. Через два дні мух розділяли за статями та використовували для біохімічних аналізів.

**Одержання супернатантів.** Мух однієї статі зважували і гомогенізували у співвідношенні 1 : 10 (маса/об'єм) в охолодженому 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,5), який містив 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ ФМСФ. Гомогенати центрифугували протягом 15 хв при 16 000 g на центрифугу Eppendorf 5415R при температурі 4 °С. Одержані супернатан-

ти використовували для визначення вмісту карбонільних груп протеїнів (КП), низько- і високомолекулярних тіолів (сульфгідрильних груп низькомолекулярних сполук і протеїнів), а також активності ензимів. Для визначення вмісту пероксидів ліпідів мух зважували і гомогенізували у співвідношенні 1 : 10 (маса/об'єм) у 96%-му охолодженому етанолі (4 °С) та центрифугували протягом 5 хв при 5 000 g та температурі 4 °С. Супернатанти одразу використовували для визначення вмісту пероксидів ліпідів.

**Визначення показників оксидативного стресу.** Маркери оксидативного стресу визначали, як описано раніше [10, 11], а вміст КП у протеїнах – спектрофотометрично за поглинанням 2,4-динітрофенілгідазонів, які утворюються за взаємодії КП із ДНФГ, і розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної абсорбції 2,4-динітрофенілгідазонів при 370 нм 22 000 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> [12]. Вміст КП виражали в наномолях на міліграм протеїну. Рівень пероксидів ліпідів визначали в реакції із ксиленолом оранжевим [13] згідно з протоколом, детально описаним раніше [11], і виражали в наномолях еквівалентів ГПК на 1 г сирової маси. Концентрацію вільних тіолів визначали методом Елмана [14] з використанням ДТНБ при 412 нм, як наведено в [11]. Для визначення вмісту низькомолекулярних тіолів (НМТ) супернатанти обробляли ТХО до кінцевої концентрації 10%, центрифугували протягом 5 хв при 16 000 g та температурі 4 °С; одержаний супернатант використовували для аналізу. Вміст високомолекулярних тіолів (ВМТ) вираховували як різницю загальних та низькомолекулярних тіолів. Концентрацію тіолів виражали в мікромольних SH-груп на 1 мг протеїну.

**Визначення активності антиоксидантних і пов'язаних з ними ензимів та концентрації загального протеїну.** Активність ензимів визначали, як описано раніше [10, 11], активність супероксиддисмутази (СОД) – за ступенем інгібування реакції окислення кверцетину супероксидним радикалом при 406 нм [10]. За одиницю активності СОД приймали таку кількість ензиму (на міліграм протеїну), яка інгібує реакцію окислення кверцетину на 50% від максимальної швидкості. Константи половинного інгібування ( $K_{50}$ ) визначали за допомогою програми KINETICS (версія 3.1) [15].

Активність каталази реєстрували за швидкістю розкладу пероксиду водню при 240 нм на спектрофотометрі СФ-46 (Ломо, СРСР), використовуючи коефіцієнт молярної абсорбції для пероксиду вод-

ню  $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [16]. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ), NADP-залежної ізоцитратдегідрогенази (ІЦДГ), глутатіонредуктазної активності тіоредоксинредуктази (ТР) визначали при 340 нм за допомогою спектрофотометра Specol 211 (Carl Zeiss, Німеччина), реєструючи швидкість утворення чи використання NADPH. Для того, щоб виключити можливість утворення чи використання NADPH іншими ензимами, для кожної з досліджуваних проб реєстрували швидкість реакції у відповідних бланках (повна суміш для визначення активності із супернатантом, але без відповідного субстрату), значення яких віднімали від експериментальних проб (із субстратом відповідного ензиму). Для розрахунків питомої активності ензимів використовували коефіцієнт абсорбції для NADPH  $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Активність глутатіон-S-трансферази (Г-S-T) визначали шляхом вимірювання зміни абсорбції утвореного комплексу між глутатіоном і ХДНБ при 340 нм, використовуючи для розрахунків активності коефіцієнт молярної абсорбції цього комплексу  $-9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Всі реакції проводили при  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  і розпочинали внесенням супернатанту. За одну одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, яка використовує  $1 \text{ мкМ}$  субстрату або утворює  $1 \text{ мкМ}$  продукту за  $1 \text{ хв}$ . Питому активність Г-6-ФДГ, ІЦДГ, ТР, Г-S-T і каталази виражали в міжнародних одиницях активності (Од) чи міліодинах (мОд) та нормували на міліграм розчинного протеїну в супернатанті.

Концентрацію протеїну вимірювали за методом Бредфорда із використанням кумасі яскраво-блакитного G-250 [17]. 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 *t*-критерієм Стьюдента з використанням комп'ютерної програми MYNova (версія 1.3).

### Результати та обговорення

Якісний вміст вуглеводів у раціоні визначає перебіг метаболічних процесів у людини і тварин [3] та може спричинювати зміни в роботі антиоксидантної системи [1, 2, 11].

*Форма надходження глюкози і фруктози в організм плодової мушки визначає інтенсивність вільнорадикальних процесів.* АФК, утворені як

побічні продукти вуглеводного обміну, можуть пошкоджувати клітинні структури [5]. Рівень КП і ВМТ, а також концентрацію пероксидів ліпідів вважають надійними маркерами пошкодження клітинних структур та їх складових, зокрема протеїнів і ліпідів [18, 19]. Вміст КП, ВМТ і пероксидів ліпідів у тілі мух у нашому дослідженні залежить від типу вуглеводу в їхній дієті (рис. 1, А–В). Так, самці, які розвивалися на дієті з 6%-ю сахарозою, мають на 77% вищий вміст КП та на 40% нижчий вміст ВМТ, ніж ті особини, які розвивалися на ізокалорійній дієті з ГФС (рис. 1, А, Б). Форма надходження глюкози і фруктози в організм самців не позначається на вмісті пероксидів ліпідів в їх тілі (рис. 1, В). У самок, навпаки, надходження глюкози і фруктози у різних формах – вільній (ГФС) та в складі сахарози впливає на вміст пероксидів ліпідів, а також на вміст ВМТ, але ніяк не позначається на вмісті КП (рис. 1, А–В). Зокрема, у разі утримання на дієті з 6%-ю сахарозою вміст ВМТ та пероксидів ліпідів у тілі самок на 26 і 44% відповідно вище за значення цих показників в особин, які споживали ГФС (рис. 1, Б, В).

Одержані результати дозволяють зробити висновок, що на процеси вільнорадикального окислення впливає форма, у якій глюкоза і фруктоза надходять в організм. Так, на відміну від дієти з ГФС, дієта із сахарозою індукує окисні модифікації, які залежать від статі плодової мушки. Зокрема, у самців окисних пошкоджень зазнають протеїни. Про це свідчить підвищений вміст КП та знижений рівень ВМТ в особин, які споживали сахарозу, порівняно з тими самцями, які розвивалися на дієті із ГФС. У самок, які споживали сахарозу, навпаки, окисним пошкодженням піддаються виключно ліпіди. Свідченням цього є вищий вміст пероксидів ліпідів у тих самок, які споживали сахарозу, а не ГФС. Таким чином, дієта із ГФС, порівняно з дієтою, що містила сахарозу, не спричинює вираженіші окисні модифікації протеїнів чи ліпідів у плодової мушки, що не узгоджується з даними, одержаними для інших організмів [2, 4, 6, 8]. Проте такі результати можуть бути логічно аргументовані. По-перше, суміш глюкози і фруктози зазвичай зустрічається в плодах [20], які є природною їжею плодової мушки [21]. Використані нами дієти з концентрацією 6% ГФС і сахарози відповідають фізіологічній концентрації зазначених вуглеводів у природній їжі (~ 5% глюкози і фруктози в більшості фруктів) [20]. Тому ми можемо припустити, що плодови мушки захищені від окисних пошкоджень

біомолекул у разі споживання ГФС, оскільки ці умови наближені до природних. По-друге, наявність глікозидного зв'язку між молекулами глюкози і фруктози визначає необхідність додаткового етапу в асиміляції сахарози за участю сахарози [2, 22, 24]. Для синтезу чи активації цього ензиму, очевидно, необхідні затрати додаткової енергії. Зважаючи на те, що засвоєння вуглеводів на початкових стадіях і так характеризується виснаженням запасів АТР [3], можна припустити, що саме нестача енергії спричинює помірний оксидативний стрес у мух обох статей, які споживали сахарозу. Не виключено, що власне активація чи підвищення біосинтезу сахарози, які залежать від концентрації сахарози, а також глюкози і фруктози [22], можуть призводити до виникнення оксидативного стресу. Хоча безпосереднього взаємозв'язку між цими процесами (функціонуванням сахарози і виникненням оксидативного стресу) не виявлено, відомо, що підвищення активності сахарози супроводжує гіперглікемію у тварин [23]. Тривала гіперглікемія, в свою чергу, призводить до виникнення окисних модифікацій молекул протеїнів і ліпідів [25]. У дослідженнях, проведених на попелицях *Acyrtosiphon pisum* [24], в харчовому раціоні яких, подібно до плодової мушки, переважають вуглеводи, було показано, що поглинання і швидкість засвоєння глюкози і фруктози, утворених під час розщеплення сахарози сахарозою, відбувається порізнному. Зокрема, глюкоза практично відразу вбудовується в олігосахариди за участю сахарози, тоді як фруктоза вивільняється і бере участь у підтриманні осмотичного тиску в гемолімфі комах [24]. Зважаючи на те, що фруктоза сприяє утворенню АФК більшою мірою порівняно з глюкозою [5, 26], це може бути ще однією причиною вищого рівня маркерів оксидативного стресу у мух, які споживали сахарозу, а не ГФС у нашому дослідженні. Ми також не виключаємо можливості того, що за даних умов фруктоза опосередковано за участю АФК [5] чи безпосередньо, з'єднуючись із молекулами протеїнів та ліпідів у реакціях фруктозилування, могла брати участь у регуляції функціональної активності макромолекул [26].

Форма надходження глюкози і фруктози в організм плодової мушки впливає на активність антиоксидантних і пов'язаних з ними ензимів. Основні антиоксидантні ензими, супероксиддисмутаза і каталаза захищають макромолекули від окислення шляхом нейтралізації АФК [11, 18]. Активність СОД і каталази у самок, які споживали сахарозу, були на 30 та 15% відповідно вищими, ніж ці показники в

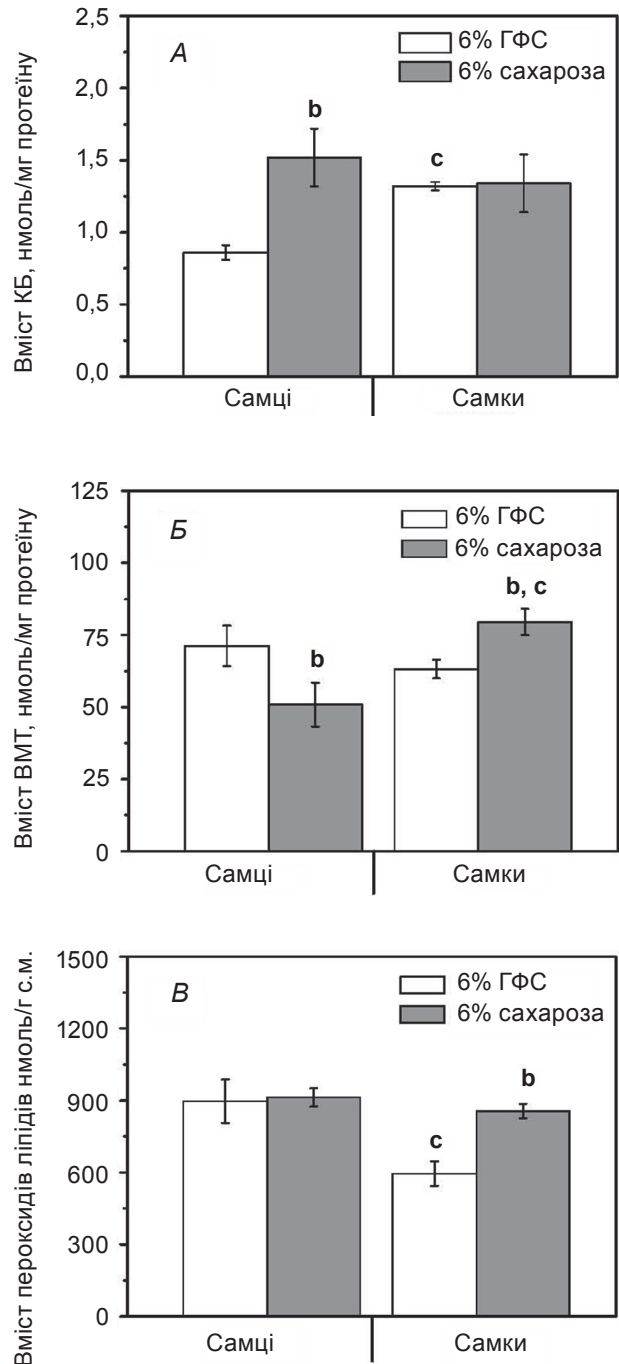


Рис. 1. Вміст карбонільних груп протеїнів, КП (А), високомолекулярних тіолів, ВМТ (Б) та пероксидів ліпідів (В) у дводенних мух *D. melanogaster*, які розвивалися на дієтах із сахарозою та ГФС. Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  похибка середнього арифметичного,  $M \pm m$  ( $n = 5-10$ ). <sup>b</sup>Дані вірогідно відрізняються ( $P < 0,05$ ) від значень для особин тієї ж статі, яких утримували на дієтах з іншим вуглеводом; <sup>c</sup>вірогідно відрізняються ( $P < 0,05$ ) від відповідних значень в особин різних статей

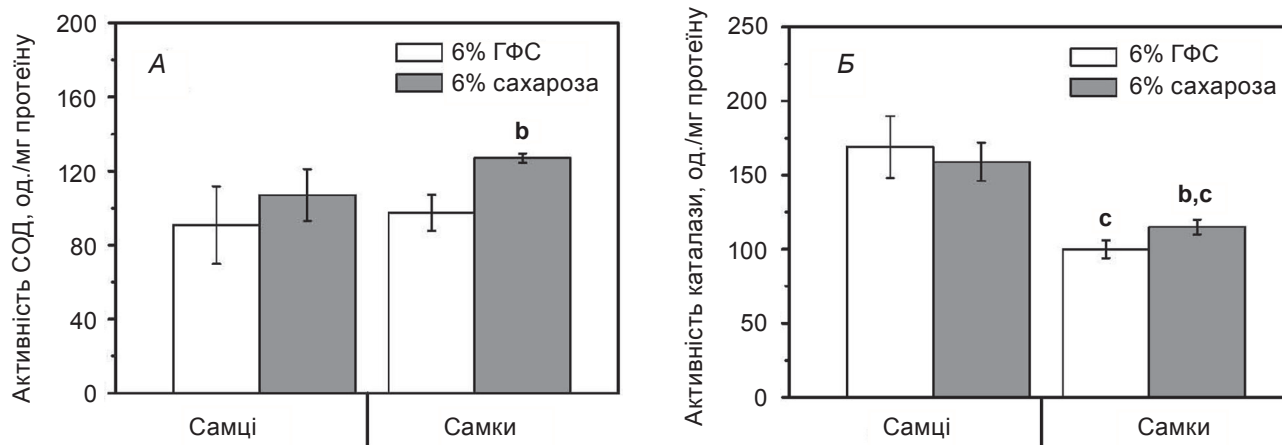


Рис. 2. Активність супероксиддисмутази, СОД (А) та каталази (Б) у дводенних мух *D. melanogaster*, які розвивалися на дієтах із сахарозою та ГФС. Решта інформації аналогічна наведеній на рис. 1

особин, яких годували ГФС (рис. 2, А, Б). У самців, натомість, активність СОД і каталази не залежать від форми, в якій моносахариди надходять в організм (рис. 2, А, Б).

Таким чином, одержані дані свідчать про формування різної відповіді головних компонентів антиоксидантної системи в самців і самок плодової мушки в захисті від окисних пошкоджень макромолекул за споживання глюкози і фруктози у вільній формі (ГФС) та у складі сахарози. Ця різниця може бути зумовлена різними харчовими потребами самців і самок, і, як наслідок, вищою інтенсивністю окислювальних процесів у самок. Так, відомо, що самки у зв'язку з необхідністю підтримання репродуктивної функції споживають більше їжі, ніж самці [27]. Споживання їжі, багатой на вуглеводи, як у плодової мушки, так і в інших тварин зумовлює активацію інсулінопосередкованого сигнального шляху, фосфорилування протеїнів якого регулює активність транскрипційних факторів родини Foxo (forkhead box O) [28]. Транслокація протеїнів родини Foxo із цитоплазми клітини в ядро забезпечує транскрипцію протеїнів, залучених в адаптацію організму до дії зовнішніх чинників [28, 29]. Зокрема, dFoxo регулює транскрипцію основних антиоксидантних ензимів [28]. Транслокація dFoxo та транскрипція антиоксидантних ензимів, які ним регулюються, зокрема СОД і каталази, в нашому разі може відбуватися в самок під час розщеплення сахарози за участю сахарози. При цьому можливе утворення більшої кількості вільної фруктози, ніж глюкози [24], яка слабше активує транспортування сигналу від інсуліноподібних пептидів [2, 3]. Неодно-

разово було показано, що СОД і каталазі належить провідна роль у захисті від окисних модифікацій ліпідів [30, 31]. Це дослідження не є виключенням, адже характер і відсутність змін в активності СОД і каталази, як у самців, так і у самок, відповідають таким для вмісту пероксидів ліпідів (рис. 2, А, Б, рис. 1, В). Подібний характер активності СОД, каталази та вмісту пероксидів ліпідів можуть свідчити також про залучення цих ензимів у формування окислювальних пошкоджень макромолекул, що ймовірно має певне пристосувальне значення і, очевидно, здійснюється за участю Foxo. У недавніх дослідженнях із *Caenorhabditis elegans* було показано, що надекспресія СОД і каталази, хоча і сприяли підвищенню тривалості життя за участю Foxo, проте не знижували кількість окислювальних пошкоджень макромолекул [29]. Субстрат і продукт супероксиддисмутазної реакції, супероксиданіон та пероксид водню, модифікуючи молекули протеїнів і ліпідів, можуть також активувати системи безпосередньо не пов'язані з антиоксидантним захистом, наприклад, роз'єднувати процеси окислення і фосфорилування в мітохондріях. Проте такі взаємодії насамкінець призводять до зниження концентрації АФК [29, 32]. Таким чином, наші дослідження стосовно діяльності головних антиоксидантних ензимів у плодової мушки за споживання ГФС і сахарози не суперечать як класичним, так і новим уявленням про їх участь у регуляції окисно-відновного статусу клітин.

Низькомолекулярні тіолвімісні антиоксиданти (низькомолекулярні тіоли, НМТ), як і антиоксидантні ензими здатні безпосеред-

ньо взаємодіяти з АФК та запобігати окисним пошкодженням макромолекул [10, 18, 31]. Незважаючи на дещо вищий вміст НМТ в особин обох статей, які споживали сахарозу, а не ГФС, вірогідних відмінностей цього показника в досліджуваних групах комах не було виявлено (дані не представлено). Форма, в якій знаходилися вуглеводи в дієті мух, не впливала також на активність глутатіон-S-трансферази (дані не представлено) – ензиму, який використовує глутатіон для нейтралізації токсичних продуктів вільнорадикального окислення [33].

Концентрацію глутатіону в клітинах ссавців підтримує глутатіонредуктаза, а в комах – тіоредоксинредуктаза (ТР), яка здатна відновлювати як глутатіон, так і тіоредоксин [34]. У нашому дослідженні проводилося визначення тільки глутатіонредуктазної активності ТР. Встановлено, що тип вуглеводів у дієті не позначається на глутатіонредуктазній активності цього ензиму в самців (таблиця). Проте активність цього ензиму на 34% є вищою в самок, які споживали середовище із сахарозою, порівняно з тими, яких утримували на дієті з ГФС. Це є ще одним свідченням активації системи антиоксидантного захисту в самок, які споживали сахарозу. Той факт, що підвищення глутатіонредуктазної активності ТР не спричинює підвищення концентрації НМТ, можна пояснити активним використанням НМТ для відновлення протеїнових молекул. Можливо, саме тому в самок, які розвивалися на дієті із сахарозою, не виявлено окисних пошкоджень протеїнів, а вміст ВМТ є вищим, ніж у тих, які розвивалися на дієті з ГФС (рис. 1, А, Б).

Для підтримки пулу відновленого глутатіону ТР потребує відновних еквівалентів у формі NADPH [34], які продукуються, головним чином, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою (Г-6-ФДГ) і NADP-залежною ізоцитратдегідрогеназою (ІЦДГ) для подальшого використання в біосинтетичних процесах та антиоксидантному захисті [35]. Жодних відмінностей в активності Г-6-ФДГ та NADP-залежної ІЦДГ не спостерігається в мух, вирощених на різних вуглеводах (табл.). Це може бути пов'язано з тим, що виникнення оксидативного стресу в особин, які споживали сахарозу, не супроводжується нестачею відновних еквівалентів у формі NADPH.

Загалом, одержані результати свідчать про те, що за споживання сахарози порівняно із споживанням еквімолярної суміші глюкози і фруктози в плодової мушки виникає помірний оксидативний стрес. Він виражений різною мірою у самців і самок. Дієта із сахарозою спричинює окисні пошкодження протеїнів у самців, але не впливає на модифікацію ліпідних молекул. У самок, навпаки, за споживання сахарози окисних пошкоджень зазнають молекули ліпідів, а не протеїнів. У захисті від оксидативного стресу в самок беруть участь як головні антиоксидантні ензими, так і компоненти антиоксидантної системи, які підтримують пул низькомолекулярних тіоловмісних антиоксидантів. Натомість, у самців не виявлено реакції з боку антиоксидантної системи на розвиток оксидативного стресу. Це дозволяє нам припустити, що оксидативний стрес у самців, які споживали сахарозу, є помірнішим, ніж у самок.

*Активність тіоредоксинредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та NADP-залежної ізоцитратдегідрогенази у дводенних мух D. melanogaster, які розвивалися на дієтах із сахарозою та ГФС*

Вуглевод	Глутатіонредуктазна активність ТР, мОд/мг протеїну	Активність Г-6-ФДГ, мОд/мг протеїну	Активність ІДГ, мОд/мг протеїну
<i>Самці</i>			
ГФС	7,90 ± 1,20	46,3 ± 3,8	172 ± 13
Сахароза	9,08 ± 1,70	45,2 ± 7,4	153 ± 12
<i>Самки</i>			
ГФС	5,31 ± 0,34 <sup>c</sup>	25,7 ± 2,4 <sup>c</sup>	101 ± 4 <sup>c</sup>
Сахароза	7,09 ± 0,52 <sup>b</sup>	25,3 ± 1,4 <sup>c</sup>	91,2 ± 5,8 <sup>c</sup>

Результати представлені як середнє арифметичне ± похибка середнього арифметичного,  $M \pm m$  ( $n = 5-10$ ). <sup>b</sup>Дані вірогідно відрізняються ( $P < 0,05$ ) від значень для особин тієї ж статі, яких утримували на дієтах з іншим вуглеводом; <sup>c</sup>вірогідно відрізняються ( $P < 0,05$ ) від відповідних значень в особин різних статей.

Стать визначає реакцію антиоксидантної системи на споживання глюкози і фруктози у вільній формі (ГФС) та у складі сахарози. Споживання сахарози або ГФС по-різному впливає на функціонування компонентів антиоксидантної системи самців і самок плодової мушки. Активність СОД за споживання дієт із різними вуглеводами не залежить від статі плодової мушки (рис. 2, А). Проте, активність каталази в самок, які споживали сахарозу чи ГФС на 38 та 70% відповідно є нижчою за величину цього показника в самців (рис. 2, Б). Одержані нами результати узгоджуються з даними Дж. Балларда зі співавт. [36], які показали, що самки *D. simulans* мали нижчу порівняно із самцями активність каталази, ймовірно, внаслідок вищої продукції пероксиду водню. Не виключено також, що самці мали стаціонарно вищий рівень експресії каталази, а тому були краще захищені від шкідливої дії пероксиду водню.

Вплив вмісту НМТ та активність Г-S-T не відрізняється в обох статей плодової мушки (дані не представлено). Проте самки, які утримувались на середовищі з ГФС, мають на 49% нижчу глутатіонредуктазну активність ТР, ніж самці (табл.). Як уже зазначалося вище, тіоредоксинредуктаза опосередковано причетна до захисту протеїнів від окислювальних пошкоджень. Можливо, нижча глутатіонредуктазна активність ТР поряд із нижчою активністю каталази є причиною підвищеного на 53% рівня КП у самок, які споживали ГФС, порівняно із самцями (рис. 1, А).

Активність NADP-продукуючих ензимів, Г-6-ФДГ та ІЦДГ визначаються статтю плодової мушки, і у самок приблизно вдвічі є нижчими, ніж у самців (табл.). Різниця статей в активності Г-6-ФДГ може бути зумовлена відмінностями рівня експресії цього ензиму в самців і самок. Зокрема, експресія Г-6-ФДГ залежить від кількості копій гену *Zw*, розташованого в Х-хромосомі [37] і вимагає участі в самців спеціального механізму для компенсування відсутності другої копії [38]. Не виключено, що різна експресія Г-6-ФДГ та ІЦДГ може бути пов'язана з різною кількістю ліпідів [39], яка є більшою в самок, незважаючи на однакову кількість жирових клітин у тілі обох статей плодової мушки [40]. Враховуючи дані Дж. Баррозо та співавт. [35], які виявили зниження і рівня мРНК Г-6-ФДГ та ІЦДГ, і

активності цих ензимів у печінці форелі, тоді як за тих самих умов у збагаченій ліпідами жировій тканині обидва параметри були незмінними, ми схиляємося до думки, що саме особливості функціонування жирового тіла самців і самок плодової мушки визначають статеві відмінності в активності Г-6-ФДГ і ІЦДГ. Нижча питома активність ензимів, які продукують NADPH, а також інших ензимів у самок також може бути частково пояснена вищою порівняно із самцями загальною концентрацією протеїнів (дані не представлені).

Варто зауважити, що нами було знайдено статеві відмінності у вмісті пероксидів ліпідів у самців і самок плодової мушки. Зокрема, вміст пероксидів ліпідів у самок, які споживали ГФС, є на 50% нижчим за цей показник у самців. Одержані результати узгоджуються з даними Ж. Буссероля та співавт. [41], які утримували самок та самців щурів на дієтах із сахарозою. Автори [41] з'ясували, що нижчий порівняно із самцями рівень окислених ліпідів у самок пов'язаний із наявністю та концентрацією статевих гормонів, зокрема естрадіолу. Не виключено, що статеві гормони самок дрозофіли також здатні захищати ліпіди від окислення, адже ортолог рецепторів естрогену в дрозофіли безпосередньо причетний до регуляції вуглеводного та ліпідного обмінів на личинковій стадії розвитку [42].

Підсумовуючи сказане вище, можна дійти висновку, що стаття особин плодової мушки визначає відповідь антиоксидантної системи на споживання ГФС і сахарози. Ймовірно, що ключове значення у формуванні такої відповіді має різниця базової активності антиоксидантних і пов'язаних з ними ензимів у самців і самок, яка може бути генетично зумовленою.

*Роботу було виконано згідно з держбюджетною темою «Вивчення механізмів пристосування організмів до несприятливих умов навколишнього середовища з метою розробки методів підвищення їх адаптаційного потенціалу» (державний реєстраційний номер — 0107U001367). Автори висловлюють подяку Д. Господарьову за підготування лінії мух та участь в обговоренні дизайну експериментів, а також Т. Назарчук і М. Никораку за активну допомогу в проведенні деяких експериментів.*

**УМЕРЕННЫЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ  
СТРЕСС У ПЛОДОВОЙ МУШКИ  
*Drosophila melanogaster*, ВЫЗВАННЫЙ  
ПРОДУКТАМИ РАСЩЕПЛЕНИЯ  
САХАРОЗЫ**

*Б. М. Ровенко, О. В. Луцк,*  
*А. В. Лозинский, О. И. Кубрак,*  
*В. И. Луцк*

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

Исследовано влияние 6%-й сахарозы и эквимольной смеси глюкозы и фруктозы в составе диеты личинок плодовой мушки *Drosophila melanogaster* на уровень окисленных протеинов и липидов, активности антиоксидантных и связанных с ними энзимов у взрослых насекомых. Показано, что выращивание личинок на диете с сахарозой приводит к развитию умеренного окислительного стресса у взрослых насекомых, который был по-разному выражен у обоих полов. У самцов окислительным повреждениям подвергались, в основном, молекулы протеинов, тогда как у самок – липидные молекулы. Об этом свидетельствует повышенное на 77% содержание карбонильных групп протеинов и пониженный на 40% уровень протеиновых SH-групп у самцов, которые потребляли сахарозу. У самок, которые потребляли сахарозу, содержание пероксидов липидов было на 44% выше, чем у особей, которые содержались на диете с эквимольной смесью глюкозы и фруктозы. Возникновение окислительного стресса у самок сопровождается повышением активности каталазы, супероксиддисмутазы и тиоредоксинредуктазы на 30, 15 и 34% соответственно. Полученные результаты дают основания полагать, что форма поступления глюкозы и фруктозы в организм плодовой мушки влияет на течение свободно-радикальных процессов.

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

**MILD OXIDATIVE STRESS IN  
FRUIT FLY *Drosophila melanogaster*  
CAUSED BY PRODUCTS OF SUCROSE  
SPLITTING**

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

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

**S u m m a r y**

The influence of 6% sucrose and equimolar mixture of glucose and fructose in larva diet on the level of oxidized proteins and lipids as well as the activity of antioxidant and associated enzymes in adult fruit fly *Drosophila melanogaster* was investigated. Larva growing on the diet with sucrose led to the mild oxidative stress development in adult insects, which was differently expressed in both sexes. In males mainly molecules of proteins were subjected to oxidative damages, whereas in females – lipid molecules. This is evidenced by 77% increased content of protein carbonyl groups and decreased (by 40%) level of protein SH-groups in males fed on sucrose. In females fed on sucrose the content of lipid peroxides was by 44% higher, than in individuals, hold on the diet with equimolar mixture of glucose and fructose. The oxidative stress in females was accompanied with increased activity of catalase, superoxide dismutase and thioredoxin reductase by 30, 15 and 34%, respectively. The obtained results suggest that uptake mode of glucose and fructose affects free radical processes in fruit flies.

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

1. *Basciano H., Federico L., Adeli K.* // Nutr. Metab. (Lond). – 2005. – 2, N 1. – P. 5.
2. *Moeller S. M., Fryhofer S. A., Osbahr A. J. 3rd et al.* // J. Am. Coll. Nutr. – 2009. – 28, N 6. – P. 619–626.
3. *Tappy L., Le K.-A.* // Physiol. Rev. – 2010. – 90, N 1. – P. 23–46.
4. *Le M. T., Frye R. F., Rivard C. J. et al.* // Metabolism. – 2012. – 61, N 5. – P. 641–651.



5. Schalkwijk C. G., Stehouwer C. D., van Hinsbergh V. W. // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2004. – **20**, N 5. – P. 369–382.
6. Johnson R. J., Sanchez-Lozada L. G., Nakagawa T. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – **21**, N 12. – P. 2036–2039.
7. Kil I. S., Lee J. H., Shin A. H., Park J. W. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – **37**, N 11. – P. 1765–1778.
8. Лозінська Л. М., Семчишин Г. М. // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 4. – С. 62–70.
9. Banks D. D., Hambly D. M., Scavezze J. L. et al. // *J. Pharm. Sci.* – 2009. – **98**, N 12. – P. 4501–4510.
10. Lushchak O. V., Kubrak O. I., Storey J. M. et al. // *Chemosphere.* – 2009. – **76**, N 7. – P. 932–937.
11. Lushchak O. V., Rovenko B. M., Gospodaryov D. V., Lushchak V. I. // *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* – 2011. – **160**, N 1. – P. 27–34.
12. Lenz A.-G., Costabel U., Shaltiel S., Levine R. L. // *Anal. Biochem.* – 1989. – **177**, N 2. – P. 419–425.
13. Hermes-Lima M., Willmore W. G., Storey K. B. // *Free Radical. Biol. Med.* – 1995. – **19**, N 3. – P. 271–280.
14. Elman G. L. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – **82**, N 1. – P. 70–77.
15. Brooks S. P. J. // *BioTechniques.* – 1992. – **13**. – P. 909–911.
16. Aebi H. // *Meth. Enzymol.* – 1984. – **105**. – P. 121–126.
17. Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
18. Lushchak V. I. // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2007. – **72**, N 8. – P. 809–827.
19. Stadtman E. R., Levine R. L. // *Amino Acids.* – 2003. – **25**. – P. 207–218.
20. Li B. W., Andrews K. W., Pehrsson P. R. // *J. Food Comp. Anal.* – 2002. – **15**, N 6. – P. 715–723.
21. Keller A. // *Curr. Biol.* – 2007. – **17**, N 3. – P. R77–R81.
22. Collins A. J., James P. S., Smith M. W. // *J. Physiol.* – 1989. – **419**. – P. 157–167.
23. Takeguchi T., Mori K., Takano S., Akagi M. // *Gastroenterol. Jpn.* – 1985. – **20**, N 1. – P. 20–27.
24. Ashford D. A., Smith W. A., Douglas A. E. // *J. Insect Physiol.* – 2000. – **46**, N 3. – P. 335–341.
25. Rains J. L., Jain S. K. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – **50**, N 5. – P. 567–575.
26. Dills W.L.Jr. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1993. – **58**, N 5 (Suppl.). – P. 779S–787S.
27. Meunier N., Belgacem Y. H., Martin J. R. // *J. Exp. Biol.* – 2007. – **210**, Pt. 8. – P. 1424–1434.
28. Hay N. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – **1813**, N 11. – P. 1965–1970.
29. Cabreiro F., Ackerman D., Doonan R. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – **51**, N 8. – P. 1575–1582.
30. Kanner J., German J. B., Kinsella J. E. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 1987. – **25**, N 4. – P. 317–364.
31. Kubrak O. I., Rovenko B. M., Husak V. V. et al. // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* – 2012. – **155**, N 2. – P. 325–332.
32. Echtay K. S., Pakay J. L., Esteves T. C., Brand M. D. // *Biofactors.* – 2005. – **24**, N 1–4. – P. 119–130.
33. Agianian B., Tucker P. A., Schouten A. et al. // *J. Mol. Biol.* – 2003. – **326**, N 1. – P. 151–165.
34. Missirlis F., Rahlfs S., Dimopoulos N. et al. // *Biol. Chem.* – 2003. – **384**, N 3. – P. 463–472.
35. Barroso J. B., Peragon J., Garcia-Salguero L. et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2001. – **33**, N 8. – P. 785–796.
36. Ballard J. W., Katewa S. D., Melvin R. G., Chan G. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2007. – **1114**. – P. 93–106.
37. Miyashita N. T. // *Genetics.* – 1990. – **125**, N 2. – P. 407–419.
38. Williamson J. H., Bentley M. M. // *Ibid.* – 1983. – **103**, N 4. – P. 649–658.
39. Wang M.-H., Harshman L. G., Nuzhdin S. V. // *Obesity Res.* – 2005. – **13**, N 11. – P. 1891–1897.
40. Johnson M. B., Butterworth F. M. // *J. Morphol.* – 1985. – **184**, N 1. – P. 51–59.
41. Busserolles J., Mazur A.J., Gueux E. et al. // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* – 2002. – **227**, N 9. – P. 837–842.
42. Tennessen J. M., Baker K. D., Lam G. et al. // *Cell Metab.* – 2011. – **13**, N 2. – P. 139–148.

Отримано 05.04.2012