

Вплив обмеження харчування в період розвитку *Drosophila melanogaster* на активність ферментів системи антиоксидантного захисту

О. Г. Забуга, О. К. Коляда, В. М. Кухарський, А. І. Бажинова, О. М. Вайсерман

ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», Київ;
e-mail: narelem12@gmail.com

*Раніше ми продемонстрували, що 50%-ве зменшення вмісту харчових компонентів у поживному субстраті порівняно з контролем (100 %) призводить до збільшення на 11 % середньої тривалості життя самиць *Drosophila melanogaster*. Для вивчення біохімічних змін, які можуть виникати за таких умов, у представленому дослідженні ми визначили активність ферментів системи антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази (СОД) та каталази. Застосування обмеження харчування на стадії розвитку викликало вірогідне збільшення активності обох ферментів у самиць. Крім того, в особин обох статей, вихованих за умов вмісту 50 % харчових компонентів у поживному середовищі, виявили зниження рівня накопичення кінцевих продуктів глікозилювання. Результати дослідження дають змогу припустити, що зміни активності СОД і каталази можуть відігравати роль у спричиненому обмеженням харчування на стадії розвитку збільшенні тривалості життя дрозофіл.*
Ключові слова: *Drosophila melanogaster*; обмеження харчування; розвиток; супероксиддисмутаза; каталаза; кінцеві продукти глікозилювання; тривалість життя.

ВСТУП

Відомо, що за допомогою зміни дієтичних умов можна впливати на тривалість життя багатьох видів лабораторних тварин. Незважаючи на широкий спектр досліджень з цього приводу, механізми, які лежать в основі ефектів обмеження харчування, залишаються не з'ясованими [1, 2].

Нещодавно нами було показано, що обмеження харчування на стадії личинки *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) може призводити до збільшення тривалості життя імаго [3]. Важливою особливістю всіх наших досліджень є те, що ми застосовуємо не якісне (скорочення вмісту білка або інших речовин), а кількісне обмеження раціону, тобто пропорційно зменшуємо концентрацію усіх харчових компонентів у поживному середовищі на стадії розвитку плодових мушок. У результаті при вирощуванні личинок дрозофіли у субстраті, який містив білкові

та вуглеводні речовини у концентраціях 50 і 60 % порівняно зі стандартним поживним середовищем, ми виявили суттєве збільшення середньої тривалості життя самиць, а максимальної – у всіх особин чоловічої статі, які розвивались за умов будь-якого вмісту харчових компонентів у діапазоні 90-10 % порівняно зі 100%-м контролем. У самиць подібного ефекту зафіксовано не було [3].

Роль окиснення в ефектах, пов'язаних із впливом обмеження харчування на тривалість життя, досі майже не досліджувалась. Як відомо, ендогенні антиоксиданти, зокрема, ферменти супероксиддисмутази (СОД) та каталаза розкладають активні форми кисню у серії хімічних реакцій [4]. Система антиоксидантного захисту може відігравати важливу роль у збільшенні тривалості життя організму.

СОД каталізує розклад супероксиду на кисень і перекис водню, який потім розкла-

© О. Г. Забуга, О. К. Коляда, В. М. Кухарський, А. І. Бажинова, О. М. Вайсерман

дає другий фермент – каталаза – на воду та кисень. Механізм скоординованої дії обох ферментів забезпечує ефективний захист клітинних структур від окисного руйнування [5].

Було виявлено, що окремі «довгоживучі» штами *Drosophila* мають підвищений вміст антиоксидантних ферментів [6]. Зважаючи на це, деякі дослідження спрямовувалися на спроби збільшення тривалості життя за допомогою штучного підвищення активності антиоксидантних ферментів на генетичному рівні. Так, було показано, що трансгенні *D. melanogaster* із надекспресією Cu/ZnСОД, або СОД1 і каталази мали на 34 % більшу тривалість життя і затримку процесу старіння [7]. Водночас надекспресія СОД1 у рухових нейронах збільшує цей показник на 40 % [8], надекспресія мітохондріальної форми СОД – СОД2, або MnСОД, – лише деякою мірою подовжує життя плодових мушок, проте не уповільнює темп старіння [9].

КПГ утворюються внаслідок глікозилювання, тобто реакції приєднання вільних цукрів до протеїнів. У *D. melanogaster* вміст цих побічних речовин значно підвищується із віком. Так, молоді мушки у віці 10 діб містять на 44 % менше КПГ порівняно із 75-добовими [10]. І хоча було виявлено можливість істотно зменшити вміст побічних продуктів у тканинах «старіючих» дрозофіл додаванням до поживного середовища протягом онтогенезу комах аміногуанідину, це не впливало на їхню тривалість життя [10].

Мета нашої роботи – визначити активність двох антиоксидантних ферментів – СОД і каталази, а також кінцевих продуктів глікозилювання – КПГ (advanced glycation end-products, AGEs) у дорослих дрозофіл, яких на стадії личинки утримували за умов 50%-го обмеження харчування.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на аутбредній популяції *Oregon-R* виду *D. melanogaster*. Популяцію розведення мушок вирощували

у «повноцінному» поживному середовищі, тобто із нормальним співвідношенням усіх компонентів харчування: на 100 мл води – 4 г сахарози, 2,5 г сухих дріжджів, 4 г манної крупи, із додаванням 1 г агар-агару та 1 мл 10%-го спиртового розчину ніпагіну (для пригнічення росту цвілі). Всіх комах утримували за стандартних умов – у термостаті з температурою $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, при стабільній вологості та режимі освітлення 12 год світла / 12 год темряви за добу. Протягом 8 год після вильоту з лялечок, мушок розділяли на самиць і самців та до здійснення експериментальних маніпуляцій утримували окремо для запобігання схрещувань.

Личинок наступного покоління утримували у поживному середовищі, що містило 50 % харчових компонентів порівняно зі стандартним, але із нормальною кількістю агар-агару й ніпагіну. Розвиток комах відбувався у скляних банках об'ємом 200 мл (4 штуки на групу), за щільності популяції 200-250 личинок у кожній. Всіх мушок на стадії імаго переводили на 100%-й поживний субстрат та утримували за стандартних умов.

Визначення активності СОД, каталази та вмісту КПГ здійснювали в імаго у віці 15 і 20 діб. Ферментні екстракти готували гомогенізацією 5 дорослих мушок у 300 мл охолодженого льодом розчину із 0,05 моль/л фосфатного буфера (рН 7,4). Зразки центрифугували 10 хв при 4°C і у супернатанті вимірювали вміст загального білка за методикою Бредфорда [11].

Активність СОД визначали непрямим методом [12] за рівнем інгібування реакції супероксидзалежного окиснення кверцетину за наявності *N',N',N',N'*-тетраметилетилендіаміну. Екстракт мушок (5 мкл) із концентрацією 200 мкг/мл загального білка вносили у 150 мкл реакційної суміші, що містила 20 ммоль/л калій-фосфатний буфер (рН 10), 0,8 ммоль/л TEMED, 0,8 ммоль/л ЕДТА і 5 мкл вихідного розчину кверцетину (1,5 мг кверцетину у 10 мл диметилсульфоксиду). Розчин інкубували впродовж 20 хв при кім-

натній температурі. Паралельно готували контрольну суміш без додавання екстракту мушок. Концентрацію кверцетину визначали вимірюванням довжини хвилі за значенням 406 нм на початку та у кінці реакції за калібрувальною кривою. Активність СОД визначали як дебіт неокисненого кверцетину між експериментальними та контрольними показниками і нормували з урахуванням часу і вмісту загального білка в екстракті.

Активність каталази в екстрактах мушок визначали колориметричним методом. Екстракт інкубували із перекисом водню (H_2O_2) впродовж 1 хв при $37^\circ C$, після чого зупиняли реакцію додаванням розчину молібдату амонію $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O]$. Інтенсивність забарвлення жовтого комплексу вимірювали при довжині хвилі 405 нм на спектрофотометрі. Концентрацію перекису водню розраховували за калібрувальною кривою, і за рівнем його розкладання визначали активність ферменту, яку виражали в умовних одиницях [13].

Вміст КПП визначали за методикою, описаною Oudes та співавт. [10]. Заморожених мушок гомогенізували в 1 мл 0,2 моль/л фосфатного буфера (рН 7,4) із додаванням 10 ммоль/л ЕДТА. Очищений супернатант відокремлювали та переварювали 24 год при $37^\circ C$ у 10 мг/мл трипсину. Потім гомогенат розбавляли до оптичної щільності меншої ніж 0,05 при довжині хвилі 365 нм та вимірювали на флуоресцентному анізотропному спектрометрі, при $\lambda_{зб.} = 365$ нм та $\lambda_{ем.} = 440$ нм. Концентрацію КПП розраховували

за калібрувальною кривою, побудованою з використанням штучних КПП та нормували за вмістом загального білка. Застосовані довжини хвиль збурення та емісії демонстрували рівень накопичення КПП у тканинах організму [10].

Визначення всіх біохімічних параметрів здійснювали у п'яти повторах. Статистичне опрацювання отриманих результатів реалізоване у програмі Statistica 6.0. Рівень статистичної значущості визначали за методом χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Всі біохімічні параметри визначали у дорослих дрозофіл. У самців, вирощених із вмістом 50 % харчових компонентів у поживному середовищі, виявлено підвищення активності СОД на 15-ту і 20-ту доби життя, а також каталази у 15-добовому віці (табл. 1). У самиць вірогідної різниці в активності обох ферментів не зафіксовано в усіх вікових групах.

Варто зазначити, що окремі дослідження свідчать про відсутність позитивного впливу на темп старіння від підвищення активності ендогенних антиоксидантних систем. Так, було показано, що надекспресія СОД2 і каталази зменшувала рівень мітохондріального вивільнення активних форм кисню, підвищуючи таким чином стійкість до окисного стресу у дрозофіл, але їхня тривалість життя при цьому зменшувалася [5]. Продемонстровано, що збільшення цього показника, викликане низькокалорійним харчуванням, не залежить

Таблиця 1. Активність супероксиддисмутази (мкмоль/хв*мг) і каталази (мкмоль/хв*мг) у дрозофіл різного віку після розвитку у поживному середовищі із вмістом 50 % харчових компонентів ($M \pm m$)

| Показник | Самці | | Самиці | |
|---------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| | 100% | 50% | 100% | 50% |
| Супероксиддисмутаза | | | | |
| 15 діб | 0,105±0,012 | 0,140±0,006* | 0,097±0,012 | 0,075±0,005 |
| 20 діб | 0,090±0,010 | 0,146±0,014* | 0,120±0,009 | 0,286±0,148 |
| Каталаза | | | | |
| 15 діб | 0,574±0,037 | 0,773±0,068* | 0,508±0,040 | 0,369±0,040 |
| 20 діб | 1,127±0,195 | 0,797±0,072 | 0,688±0,167 | 0,568±0,083 |

Примітка. Тут і у табл. 2: * $P < 0,05$ порівняно з контролем

Таблиця 2. Вміст кінцевих продуктів глікозилювання (мг/мл) у *D. melanogaster* після розвитку у поживному середовищі із 50 % харчових компонентів (M±m)

| Показник | Самці | | Самиці | |
|---------------------------------|--------------|-------------|------------|-------------|
| | 100% | 50% | 100% | 50% |
| Кінцеві продукти глікозилювання | | | | |
| 15 діб | 63,24±5,11 | 68,95±9,79 | 15,86±1,85 | 10,82±2,07 |
| 20 діб | 100,45±13,66 | 58,14±9,18* | 22,89±2,69 | 12,79±1,42* |

від зниження вмісту СОД1. Разом із тим виявлено, що вона необхідна для подовження життя за умов обмеження концентрації білка у харчуванні, при якому наявна підвищена кількість цукру [4].

Окрім каталази та СОД ми досліджували рівень накопичення КППГ в імаго плодових мушок, вирощених із вмістом 50 % харчових компонентів у поживному середовищі. Вірогідне зменшення значення показника виявили у дрозоді обох статей віком 20 діб, яких утримували в умовах обмеження харчування на стадії розвитку (табл. 2).

Важливо зазначити, що Jacobson зі співавт. [14] запропонували використовувати рівень накопичення КППГ як біомаркер старіння у *Drosophila*. Показано, що штучне додавання цих речовин до поживного середовища плодових мушок провокує у них зниження активності ферментів антиоксидантного захисту, яке, у свою чергу, супроводжується прискоренням старіння [15].

Можна припустити, що виявлені у цій роботі зміни на біохімічному рівні (збільшення активності СОД і каталази та зменшення рівня накопичення КППГ у *D. melanogaster*, які розвивались за умов обмеження харчування) можуть відігравати роль у продемонстрованому нами раніше збільшенні тривалості життя. Оскільки ферменти системи антиоксидантного захисту є досить нестійкими сполуками, то після вилуплення з лялечок мушки у віці 15-20 діб не можуть мати молекули цих ферментів, які синтезуються впродовж преімагінального розвитку. Зважаючи на це, ми припускаємо, що такі зміни на біохімічному рівні пояснюються обмеженням харчування на стадії розвитку довгостроко-

вими епігенетичними модифікаціями (тобто, змінами активності генів, не пов'язаних зі змінами структури ДНК). Можливість подібних перебудов, викликаних стресами на етапі розвитку, продемонстрована у наших попередніх працях [16]. Надалі ми плануємо більш детальне вивчення механізмів, що опосередковують збільшення тривалості життя внаслідок обмеження харчування на стадії розвитку.

О. Г. Забуга, А. К. Коляда, В. М. Кухарський, А. І. Бажинова, А. М. Вайсерман

ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ ПИТАНИЯ В ПЕРИОД РАЗВИТИЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER* НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ

Ранее мы показали, что 50%-е уменьшение содержания пищевых компонентов в питательном субстрате по сравнению с контролем (100 %) способствует увеличению на 11 % средней продолжительности жизни самцов *Drosophila melanogaster*. Для изучения биохимических изменений, которые могут возникать в таких условиях, в данном исследовании мы определили активность ферментов системы антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Ограничение питания на стадии развития привело к достоверному увеличению активности обоих ферментов у самцов. Кроме того, у представителей обоих полов, выращенных в условиях 50%-го содержания пищевых компонентов в питательной среде, выявили снижение уровня накопления конечных продуктов гликозилирования. Результаты исследования позволяют предположить, что изменения активности СОД и каталазы могут играть роль в вызванном ограничением питания на стадии развития увеличении продолжительности жизни дрозодил. Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; ограничение питания; развитие; супероксиддисмутаза; каталаза; конечные продукты гликозилирования; продолжительность жизни.

O. G. Zabuga, A. K. Koliada, V. M. Kukharskyy,
A. I. Bazhynova, A. M. Vaiserman

THE EFFECT OF DIETARY RESTRICTION DURING DEVELOPMENT OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT SYSTEM ENZYMES

In the previous study we demonstrated that dietary restriction only at the development stage of *Drosophila melanogaster* may impact the life span of adult flies. It was important that we didn't use qualitative (restriction of proteins or other macro- or microelements) and not a calorie restriction as well, but quantitative dietary restriction that was the proportional reduction of all food components in the larval medium. In the situations when the larvae were reared in the medium types, that contained protein and carbohydrate components in concentrations of 90-10% of food components compared to the standard one (100%), the males were characterised with the significant increase in the maximum life span. The average life span was also increased, but only in those male individuals that developed in the medium types, that contained 50% and 60% of food components compared to controls. Such an effect we haven't detected in the female flies.

To study the biochemical changes associated with the physiological effects we have determined the activity of the antioxidant enzymes – superoxide dismutase (SOD) and catalase. In the male flies the 50% dietary restriction implemented during the development has led to the significant increase in a SOD and catalase activity. Also the flies of both sexes reared in the medium with the 50% of food components have been characterised with the reduction in the accumulation of glycation end products. According to these results, we suggest that the changes in the activity of antioxidant enzymes may play a role in the increase of the flies life span caused by the dietary restriction during the development.

Key words: *Drosophila melanogaster*; dietary restriction; development; superoxide dismutase; catalase; advanced glycation end products; life span.

State Institution "D.F. Chebotarev Institute of Gerontology NAMS of Ukraine", Kyiv;

REFERENCES

1. Ja WW, Carvalho GB, Zid BM, Mak EM, Brummel T, Benzera S. Water- and nutrient-dependent effects of dietary restriction on *Drosophila* lifespan. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106:18633-7.
2. Tatar M. The plate half-full: status of research on the mechanisms of dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. Exp Gerontol. 2011;46:363-8.
3. Vaiserman AM, Fedorenko EA, Koshel NM, Miehova LV, Pisaruk AV, Bazhynova AI, Koliada AK, Zabuga OG, Voytenko VP. The effect of components' restriction in diet during development stage on the life span of *Drosophila melanogaster*. Problemy starenija i dolgoletija. 2011;20(4):361-70. [In Russian]
4. Sun X, Komatsu T, Lim J, Laslo M, Yolitz J, Wang C, Poirier L, Alberico T, Zou S. Nutrient-dependent requirement for SOD1 in lifespan extension by protein restriction in *Drosophila melanogaster*. Aging Cell. 2012;11(5):783-93.
5. Bayne AC, Mockett RJ, Orr WC, Sohal RS. Enhanced catabolism of mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide and aging in transgenic *Drosophila*. Biochem J. 2005;391(2):277-84.
6. Hari R, Burde V, Arking R. Immunological confirmation of elevated levels of CuZn superoxide dismutase protein in an artificially selected long-lived strain of *Drosophila melanogaster*. Exp Gerontol. 1998;33(3):227-37.
7. Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. Science. 1994;263(5150):1128-30.
8. Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. Nat Genet. 1998;19(2):171-4.
9. Fleming JE, Reveillaud I, Niedzwiecki A. Role of oxidative stress in *Drosophila* aging. Mutat Res. 1992;275(3-6):267-79.
10. Oudes AJ, Herr CM, Olsen Y, Fleming JE. Age-dependent accumulation of advanced glycation end-products in adult *Drosophila melanogaster*. Mechanisms of Ageing and Development. 1998;100:221-9.
11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
12. Kostyuk VA, Potapovich AI. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. Biochem Int. 1989;19(5):1117-24.
13. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta. 1991;196(2-3):143-51.
14. Jacobson J, Lambert AJ, Portero-Otín M, Pamplona R, Magwere T, Miwa S, Driege Y, Brand MD, Partridge L. Biomarkers of aging in *Drosophila*. Aging Cell. 2010;9(4):466-77.
15. Tsakiri EN, Iliaki KK, Höhn A, Grimm S, Papassideri IS, Grune T, Trougakos IP. Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces life span in *Drosophila melanogaster*. Free Radic Biol Med. 2013;65:1155-63.
16. Vaiserman AM, Koshel NM, Litoshenko AY, Mozzhukhina TG, Voitenko VP. Effects of X-irradiation in early ontogenesis on the longevity and amount of the S1 nuclease-sensitive DNA sites in adult *Drosophila melanogaster*. Biogerontology. 2003;4:9-14.

Матеріал надійшов до редакції 15.05.2015.