

A. Dranitsina, Ph. D., K. Dvorshchenko, D. Sci., D. Grebinyk, Ph. D., L. Ostapchenko, D. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

EXPRESSION OF AQP8 GENE IN RAT DUODENAL WITH DIARRHEA UPON LONG-TERM GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA

The decreasing of Aqp8 gene's expression in rat duodenal villus and crypt epithelial cells against the background of intensification of free radical formation with diarrhea upon gastric hypoacidic conditions were shown. The level of above mentioned gene's expression both in villus and crypt epitheliocytes approached to the control value upon the treatment of hypoacidic rats with multiprobiotic Symbiter.

Key words: gastric hypoacidity, duodenal, diarrhea, gene expression, Aqp8, multiprobiotic.

УДК 577.126:577.121.6:577.2.04.

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, Україна

ВІКОВІ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ *DROSOPHILA* ПРИ УТРИМАННІ НА СЕРЕДОВИЩІ З АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТОМ

Досліджено деякі метаболічні показники та показники функціонального старіння у самців плодової мушки *D. melanogaster* w^{1118} при вирощуванні на середовищі з альфа-кетоглутаратом (АКГ). Харчовий АКГ підвищував вміст амінокислот та білка у 2-денних самців та триацилгліцеридів у 24-денних самців без впливу на антиоксидантну систему самців обох вікових груп. Також АКГ підвищував стійкість до теплового стресу в обох вікових групах, не впливав на стійкість до оксидантів і запобігав зниженню рухової активності самців старшого віку.

Ключові слова: амінокислоти, триацилгліцериди, тепловий стрес, локомоторна активність.

Вступ. Альфа-кетоглутарат (АКГ) є проміжним метаболітом циклу Кребса та реакцій амінування/трансамінування амінокислот. На даний час вивчається вплив АКГ як харчової добавки, яка проявляє багатосторонні позитивні ефекти на організм. На ссавцях показано, що додавання солей альфа-кетоглутарової кислоти до їжі стимулює обмінні процеси та відновлення організму при ушкодженнях шлунково-кишкового тракту, травмах м'язів та кісток [12; 26]. Встановлено, що стимулювання синтезу білка при станах білкового дефіциту зумовлене тим, що АКГ є джерелом для біосинтезу таких амінокислот, як пролін, глутамат, глутамін та аспартат [12; 17]. Окрім того, виявлена здатність АКГ стимулювати мітохондріальне дихання та окисне фосфорилування у печінці білих щурів [16]. 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 анти-віковий фактор [12; 22]. 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 та модулювати антиоксидантний захист у старих мишей [22]. Показана здатність екзогенного АКГ збільшувати тривалість життя нематоди *Caenorabditis elegans* за механізмом подібним до механізму калорійного обмеження [8].

У наших попередніх дослідженнях було знайдено, що вирощування плодової мушки *Drosophila melanogaster* на середовищі, яке містило АКГ, порізно впливало на амінокислотний обмін у молодих особин лінії Canton S [20]. З використанням іншої лінії мушок – w^{1118} , нами було показано, що харчовий АКГ викликає різні метаболічні зміни у молодих та середньо-вікових особин *D. melanogaster*, які відображаються на стійкості до стресів та плодючості. Так, вирощування на АКГ призводило до підвищення вмісту білка, зниження вмісту триацилгліцеридів та індукції оксидативного стресу у молодих самок w^{1118} , а в самок старшого віку АКГ спричиняв протилежні зміни [4]. У вказаному дослідженні були використані лише самки. Враховуючи, що раніше нами були виявлені метаболічні відмінності у молодих самців та самок плодової мушки лінії

Canton S за вирощування на АКГ [20], у даній роботі ми прагнули з'ясувати, чи будуть спостерігатися відмінності у впливі харчового АКГ на метаболізм самців *D. melanogaster* w^{1118} молодого та старшого віку. Також ми дослідили, чи тривале споживання їжі, збагаченої АКГ, може сповільнювати функціональне старіння самців w^{1118} . Як показники функціонального старіння були оцінені стійкість до низки стресорів та індукована рухова активність самців [10; 11].

Метою даної роботи було дослідити фізіолого-біохімічні особливості молодих (2-денних) та середньо-вікових (24-денних) самців *D. melanogaster* лінії w^{1118} за культивування на АКГ.

Матеріали і методи. У роботі використовували лінію w^{1118} *D. melanogaster*, отриману з Блюмінтонського Стокового Центру університету Індіани (США). Особливістю лінії є наявність білих очей через мутацію у гені white. Батьківську культуру мух утримували на дріжджово-м'ясному середовищі [20]. Експериментальні культури мух вирощували на середовищі, яке містило 5 % сухих пекарських дріжджів, 5 % сахарози, 1 % агару та 0,18 % ніпагіну (для інгібування росту цвілевих грибів). У дослідні середовища додатково вносили 10 мМ розчин натрієвої солі АКГ (кінцева концентрація) [20]. Культивування проводили при 25 °С, постійній вологості (50-60 %) та світловому режимі день:ніч – 16:8. Після вилуплення мух розділяли за статтю шляхом анестезування за допомогою вуглекислого газу. У подальших експериментах використовували лише самців, яких або переводили на свіжі середовища того самого складу для отримання 24-денних особин, або використовували для біохімічних та фізіологічних тестів. Заміну середовищ проводили кожного другого дня.

Визначення індукованої рухової активності базувалось на явищі негативного геотаксису у мух [10]. Для цього по 10 самців вносили у скляні пробірки, струшували їх на дно та фіксували кількість особин, які долали відстань 5 см догори за 20 с. У кожному з чотирьох незалежних повторів протестовано по 40 мух. Стійкість до теплового стресу визначали за часом впадання мух у теплову кому при 39, 40 та 41 °С. У кожному з трьох незалежних повторів було тестовано по 10–12 самців. Для визначення стійкості до голодування по 10 самців вносили у скляні пробірки, які містили 1,25 мл 1 % агару

та закривали ватними корками, щоб обмежити підсилення середовища. У кожному з чотирьох незалежних повторів було тестовано по 3 пробірки. Кількість загіблених мух фіксували кожні 24 годин. Для визначення стійкості до оксидантів самців переносили у пробірки, які містили утрамбовану смужку серветки, просочену розчином 5 % сахарози, що додатково містила 5 % пероксиду водню, 20 мМ менадіон або 10 мМ нітропрусид натрію (НПН) [10]. У кожному з трьох незалежних повторів було тестовано по дві пробірки з 10 самцями у кожній. Кількість живих мух підраховували через 48 годин від початку експозиції.

Масу однієї мухи визначали як середнє арифметичне маси десяти особин, зважених на торсійній вазі WTW 2 ("Techniprot", Польща). Вміст води визначали за різницею маси тіла мушок до і після висушування у сушильній шафі при 60 °С.

Приготування безклітинних екстрактів мух здійснювали як описано раніше [4]. Активність каталази визначали за швидкістю розкладання пероксиду водню при 240 нм, використовуючи коефіцієнт молярної абсорбції для H_2O_2 $39,4 M^{-1}cm^{-1}$ [1]. Для визначення SH-груп у низькомолекулярних сполуках, амінокислот, орнітину та кетокислот білки попередньо осаджували 10 % трихлороцтовою кислотою. Вміст SH-груп визначали за методом Елмана [9]. Вміст амінокислот визначали за їх взаємодією з нінгідрином з утворенням комплексу блакитного кольору з максимумом поглинання при 570 нм [18]. Сумарний вміст орнітину та проліну визначали за взаємодією з нінгідрином з утворенням комплексу рожево-червоного кольору при кислих значеннях рН з макси-

мумом поглинання при 512 нм [5]. Для визначення лише проліну, досліджуваний препарат обробляли нітритом натрію. Вміст вільного орнітину розраховували за різницею між загальним вмістом двох амінокислот та вмістом вільного проліну. Вміст кетокислот визначали за зв'язуванням 2,4-динітрофенілгідрозину з карбонільними групами кетокислот у лужному середовищі з утворенням 2,4-динітрофенілгідрозинів з максимумом поглинання при 420 нм [24]. Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартний розчин пірувату. Концентрацію протеїнів визначали за методом Бредфорд [6]. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін. Вміст сечовини, глюкози та триацилгліцеридів (ТАГ) визначали з використанням діагностичних наборів фірми "Corma" (Ломянки, Польща) згідно з інструкціями виробника. Визначення вмісту глікогену здійснювали непрямим методом з використанням антрону [7].

Дані представлено як середнє \pm похибка середнього ($M \pm m$). Статистичну обробку здійснювали за допомогою комп'ютерної програми „Mupova”, використовуючи критерій Стюдента.

Результати та обговорення. Вирощування на середовищі з 10 мМ АКГ (концентрація АКГ обрана на основі попередніх досліджень [4] не впливало на масу тіла, вміст води, вміст білка, сечовини, глюкози, глікогену, ТАГ та кетокислот у тілі 2-денних самців (табл. 1). Водночас, 2-денні самці, вирощені на АКГ, мали вищий вміст вільних амінокислот, і зокрема вищий вміст проліну (рис. 1) та орнітину (табл. 1), порівняно з контрольними особинами (рис. 1, табл. 1).

Таблиця 1. Маса тіла та вміст деяких метаболітів у тілі дводенних самців лінії w^{1118} , вирощених на середовищі з АКГ

Параметр	Середовище культивування		Кількість повторів
	Контроль	10 мМ АКГ	
Маса тіла, мг	0.753 \pm 0.023	0.706 \pm 0.015	5-8
Вміст води, %	74.9 \pm 2.6	79.7 \pm 2.5	4
Білок, мг/ мг с.м.	37.3 \pm 2.0	41.6 \pm 2.8	8
Глюкоза, мг/ г.с.м.	12,4 \pm 1,6	12,4 \pm 2,0	8
Глікоген, мг/ г.с.м.	4,82 \pm 0,51	3,32 \pm 1,11	4
ТАГ, мг/ г.с.м.	11,5 \pm 1,5	13,3 \pm 0,5	8
Кетокислоти, мкмоль-екв пірувату на г.с.м.	6.06 \pm 0.65	6.48 \pm 1.12	5
Сечовина, мг/ г.с.м.	0.78 \pm 0.06	0.9 \pm 0.06	3
Орнітин, мкмоль/ г.с.м.	2.89 \pm 0.28	3.94 \pm 0.27*	5-7

Примітки. * – відрізняється від відповідного значення у контролі з $P < 0,05$.

У 24-денних самців контрольної і дослідної груп спостерігалися вікові зміни у низці вказаних показників, зокрема у них знижувався вміст загального білка (табл. 2)

та зростав вміст вільних амінокислот, в тому числі проліну (рис. 1), а також глюкози та ТАГ (табл. 2), порівняно з такими показниками у 2-денних особин.

Таблиця 2. Вміст деяких метаболітів у тілі 24-денних самців лінії w^{1118} , вирощених на середовищі з АКГ.

Параметр	Середовище культивування		Кількість повторів
	Контроль	10 мМ АКГ	
Білок, мг/ г с.м.	33.4 \pm 0.34#	33.8 \pm 2.7#	5-6
Глюкоза, мг/ г.с.м.	19.4 \pm 0.6#	18.2 \pm 1.3#	4-6
ТАГ, мг/ г.с.м.	22.1 \pm 4.3#	41.9 \pm 11.0*#	4

Примітки. # – відрізняється від відповідного значення у дводенних особин та * – від відповідного значення у контролі з $P < 0,05$.

Ці результати добре узгоджуються з попередніми дослідженнями щодо вікових змін у метаболізмі плодової мушки [4; 11]. Додавання АКГ до їжі не впливало на вміст білка, глюкози та амінокислот, але підвищувало

вміст ТАГ у тілі 24-денних самців, порівняно з контрольними особинами (табл. 2). Отже, харчовий АКГ порізно впливав на вміст основних метаболітів у 2-денних та 24-денних самців.

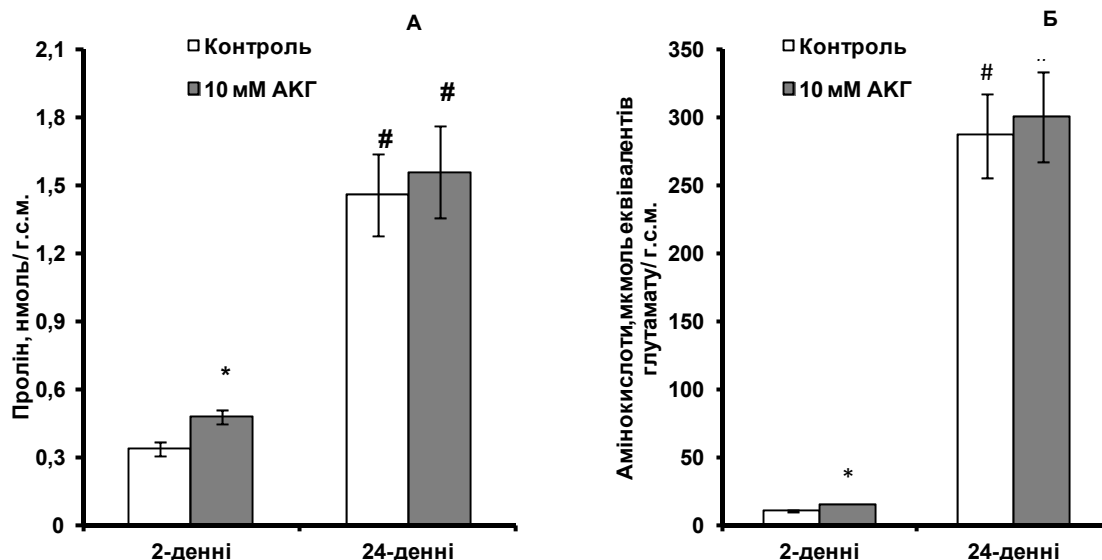


Рис. 1. Вміст проліну (А) та вільних амінокислот (Б) у 2- та 24-денних самців лінії w^{1118} , вирощених на середовищі з АКГ

Примітки. # – відрізняється від відповідного значення у дводенних особин та * – від відповідного значення у контролі з $P < 0,05$, $n=4-6$.

Метаболічні ефекти АКГ, виявлені у 2-денних самців w^{1118} , частково перекриваються з ефектами, отриманими раніше на самках w^{1118} [4]. Основна відмінність між статями простежується у вмісті загального білка та ТАГ: АКГ призводив до зростання загального білка та зниження ТАГ у 2-денних самок [4], проте у самців змін у даних показниках нами не виявлено (табл. 1). Щодо вмісту білка та амінокислот, то статеві відмінності у даних показниках також нами були знайдені раніше на лінії Canton S [20]. Водночас, наші результати на самцях лінії w^{1118} не узгоджуються з такими на самцях лінії Canton S, оскільки ми не спостерігали позитивного ефекту харчового АКГ на вміст білка у 24-денних самців w^{1118} , як це було виявлено для самців лінії Canton S. Також наші результати свідчать про те, що АКГ не модифікує катаболізм амінокислот, оскільки вміст сечовини у контрольних та дослідних самців w^{1118} був подібним (табл. 1). При амінуванні АКГ утворюється глутамат, який під дією пірролін-5-карбоксилази перетворюється до пірролін-5-карбоксилату, який є безпосереднім попередником проліну та орнітину [26]. Таким чином, зростання вмісту вільних амінокислот та зокрема вмісту проліну і орнітину у молодих самців за культивування на середовищі з АКГ може бути пов'язане із включенням екзогенного АКГ у амінокислотний обмін мушок. У свиней харчовий АКГ стимулює поглинання амінокислот кишечника [17]. Тому не виключено, що у наших експериментах збільшення рівня амінокислот також може бути зумовлене, принаймні частково, із стимуляцією адсорбції амінокислот із спожитого середовища у кишечника молодих самців. Відсутність змін у вмісті глюкози, глікогену та ТАГ у молодих самців, вирощених на АКГ, може вказувати на те, що АКГ не прискорює утилізацію даних метаболітів через цикл Кребса, на противагу попереднім дослідженням на ссавцях, в яких було показано прискорення окислення глюкози [13] та зниження вмісту жирів [12] при споживанні АКГ. Очевидно, у молодих особин АКГ значною мірою використовується для біосинтезу амінокислот, ніж у циклі Кребса.

АКГ також бере участь у реакціях трансамінування, які є джерелом не лише амінокислот, але й кетокислот, зокрема піровиноградної та щавлевооцтової. Також сам АКГ є кетокислотою. Тому ми визначили вміст кетокислот у 2-денних самців плодової мушки, проте відмінностей у даному показнику від між дослідними і контрольними самцями не було виявлено (табл. 1). Опосередковано

дані результати свідчать про те, що АКГ не накопичується у клітинах, а метаболізується у різних процесах.

На відміну від молодих особин, АКГ не викликав суттєвих метаболічних змін у 24-денних самців, окрім підвищення вмісту ТАГ (табл. 2). Зростання ТАГ у старшому віці нами також було показано раніше для самок лінії w^{1118} [4], і це зростання було значно вищим, ніж у самців у даному експерименті. Вищий вміст ТАГ у особин плодової мушки при довготривалому культивуванні на середовищі з АКГ, порівняно контрольними особинами, очевидно, пов'язаний з інгібуванням циклу Кребса, унаслідок чого ацетил-КоА перенаправляється на синтез жирних кислот. Інгібування циклу Кребса було показано раніше при надлишку АКГ у дріжджів [21]. Очевидно, потреби старших особин плодової мушки у АКГ є нижчими, ніж для молодих мух, тому старші самці зазнають впливу надлишкової кількості АКГ, який споживається з їжею.

У попередньому дослідженні 24-денні самки на середовищі з АКГ мали також вищий вміст амінокислот та білка [4], чого нами не знайдено у 24-денних самців (рис. 1, табл. 2). Таким чином, харчовий АКГ покращує амінокислотний/білковий обмін у самців молодого, але не старшого віку, хоча у самок даний ефект не залежить від віку. Такі відмінності, очевидно, пов'язані з різними метаболічними потребами самців та самок: для самок важливим є високий вміст білка для тривалого відкладання достатньої кількості яєць [2]. Ми припустили, що у самців старшого віку значна частина АКГ може використовуватися у циклі Кребса для отримання енергії з метою підтримання на належному рівні локомоторної активності, яка, як відомо, знижується з віком [11], а також АКГ може використовуватися для синтезу специфічних білків, оскільки відомо, що навіть при зниженні загального синтезу білка, синтез окремих білків може зростати [23]. Зокрема, АКГ як попередник проліну може використовуватися для синтезу колагену та формувати структуру крил плодової мушки [15].

Щоб перевірити, чи впливав АКГ на локомоторну активність, нами було визначено рухову індуковану активність самців. Як і очікувалось, 24-денні самці мали меншу рухову активність, ніж 2-денні особини (рис. 2A). Водночас, 24-денні самці, які утримувалися на середовищі з АКГ, мали приблизно на 30 % вищу індуковану рухову активність, порівняно з відповідними контрольними

ними самцями. Таким чином, харчовий АКГ частково запобігав втраті локомоторної активності самців.

Оскільки, у самців молодого віку АКГ не впливав, а у особин старшого віку призводив до зростання вмісту запасних ліпідів (триацигліцеридів), було досліджено, чи впливала ця метаболічна зміна на стійкість самців до голодування. Нами не виявлено суттєвих відмінностей у

стійкості до голодування між контрольними та експериментальними самцями обох вікових груп, лише динаміка загибелі 24-денних мух була дещо повільнішою, ніж для 2-денних (рис. 2Б). Таким чином, акумуляція ТАГ не надавала експериментальним самцям більшої резистентності до голодування. Очевидно, загибель самців за даних умов пов'язана з іншими процесами.

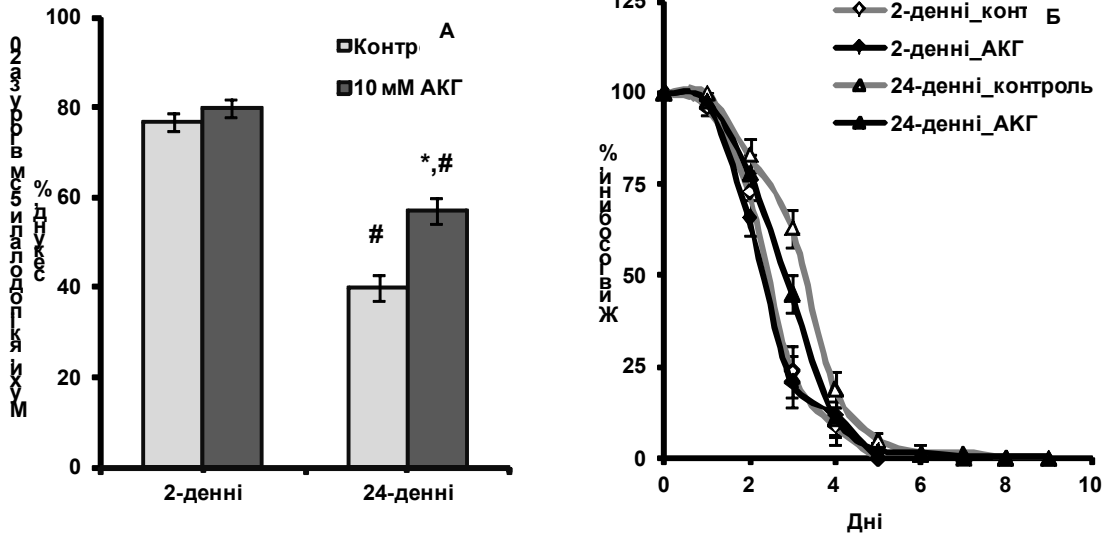


Рис. 2. Індукована рухова активність (А) та стійкість до голодування (Б) самців лінії *w¹¹¹⁸*, вирощених на середовищі з АКГ

Примітки. # – відрізняється від відповідного значення у дводенних особин та * – від відповідного значення у контролі з $P < 0,05$, $n=3-4$.

Окрім впливу на амінокислотний обмін, АКГ може модулювати антиоксидантний захист [22]. Тому ми дослідили деякі показники антиоксидантного захисту у самців, вирощених на середовищі з АКГ.

Активність каталази та вміст низькомолекулярних тіол-вмісних сполук не відрізнялись від контрольних значень як для 2-денних, так і 24-денних самців, вирощених на АКГ (рис. 3). При цьому, активність каталази у 24-денних самців була суттєво вищою, а вміст низькомолекулярних тіолів був нижчим, ніж у 2-денних особин. Каталаза – один з основних антиоксидантних ферментів, функцією якого є знешкодження пероксиду водню і акти-

вність якого зростає при підвищеній продукції активних форм кисню [19]. Серед низькомолекулярних тіолів до 90 % становить трипептид глутатіон, який є основним низькомолекулярним антиоксидантом у клітинах і зниження його вмісту є маркером розвитку оксидативного стресу [19]. З огляду на це, отримані результати свідчать про те, що 24-денні самці, на відміну від 2-денних особин, зазнавали впливу оксидативного стресу. При цьому, АКГ не підвищував потужність ендогенного антиоксидантного захисту. Разом з тим, відомо, що АКГ сам по собі має антиоксидантні властивості, зокрема може безпосередньо знешкоджувати пероксид водню [3].

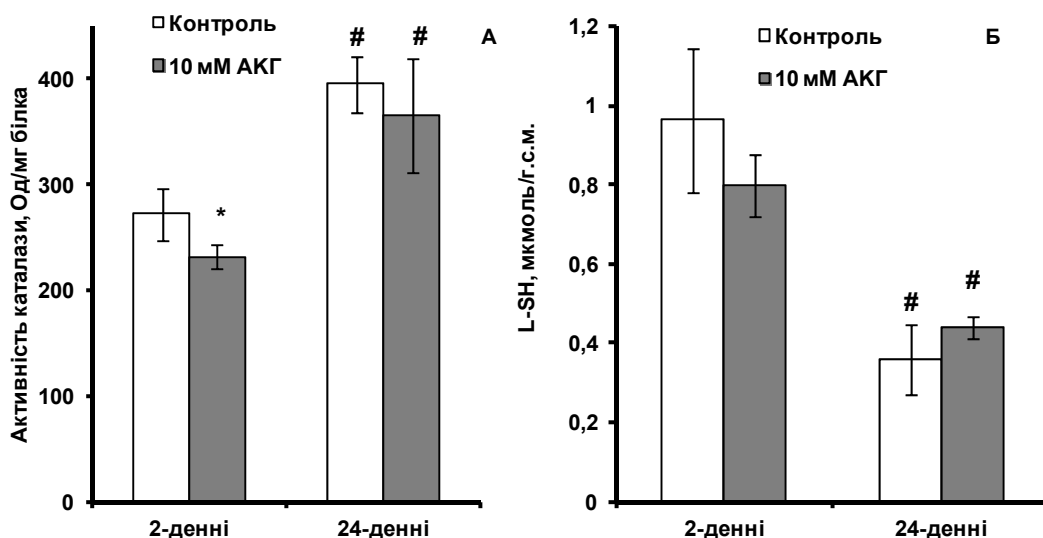


Рис. 3. Активність каталази (А) та вміст низькомолекулярних тіольних сполук (Б) у тілі самців лінії *w¹¹¹⁸*, вирощених на середовищі з АКГ

Примітки. # – відрізняється від відповідного значення у дводенних особин та * – від відповідного значення у контролі з $P < 0,05$, $n=4-8$.

Тому можна припустити, що АКГ може компенсувати частково зниження антиоксидантного захисту з віком та запобігати окисним пошкодженням. Щоб перевірити це припущення, ми визначили стійкість самців до низки стресорів, дія яких супроводжується розвитком оксидативного стресу.

Стійкість самців до теплового стресу знижувалась з віком та зі збільшенням температури обробки (рис. 4А). При цьому, 2-денні самці, вирощені на АКГ, впадали у теплову кому повільніше, ніж контрольні, при обробці температурою 41°C, тоді як 24-денні самці, які споживали їжу з АКГ, повільніше впадали у теплову кому при 40°C та 41°C. Разом з тим, АКГ не впливав на стійкість

самців до пероксиду водню, менадіону та НПН (рис. 1Б), які є добре відомими індукторами оксидативного стресу [3; 10]. Раніше нами було показано, що АКГ діє як антиоксидант при сумісній обробці з токсикантами [3]. Тому можна припустити, що у самців, вирощених на АКГ, спожитий АКГ швидко метаболізується і обробка мух токсикантами, після того як мухи припинили споживати АКГ, не дає очікуваного позитивного ефекту. Щодо теплового стресу, то нещодавно було показано, що АКГ може стимулювати синтез білків теплового стресу [25]. Припускаємо, що даний механізм може бути задіяний у підвищенні стійкості самців, вирощених на АКГ, до теплового стресу.

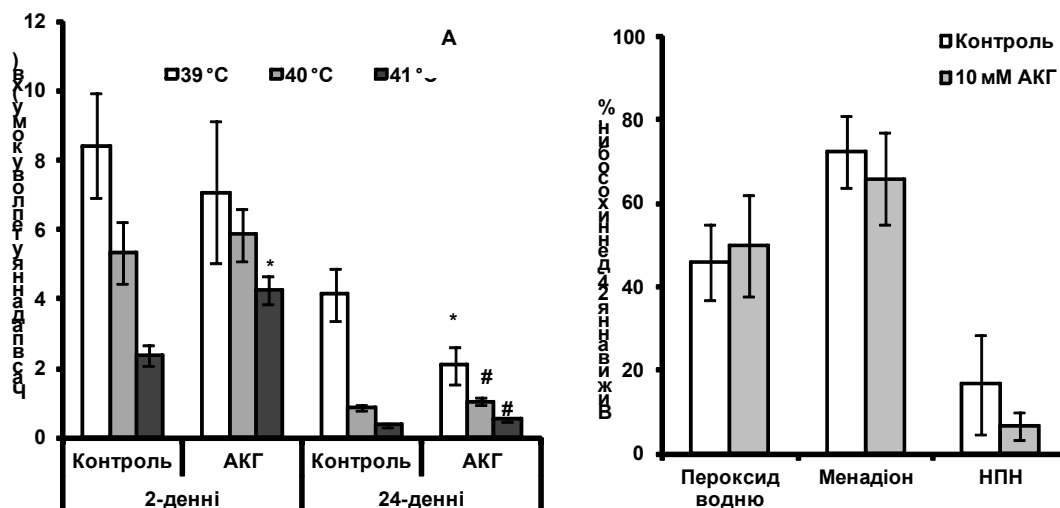


Рис. 4. Стійкість до теплового (А) та оксидативного (Б) стресів самців лінії w^{1118} , вирощених на середовищі з АКГ

– відрізняється від відповідного значення у дводенних особин, * від відповідного значення у контролі з $P < 0,05$, $n=3-4$.

Висновки: Вирощування *D. melanogaster* w^{1118} на середовищі з АКГ підвищує вміст амінокислот та білка у дводенних самців, але не впливає на ці показники у 24-денних самців. Дані результати є протилежними до таких, отриманих на самцях лінії Canton S. У 24-денних самців w^{1118} харчовий АКГ призводить до збільшення вмісту триацилгліцеридів, що проте це не підвищує виживання мух за умов голодування. Харчовий АКГ суттєво не впливав на антиоксидантну систему самців молодого та старшого віку, і відповідно відмінностей у стійкості до оксидантів між контрольними та експериментальними самцями теж не знайдено. Водночас, вирощування на АКГ підвищує стійкість до теплового стресу в обох вікових групах та рухову індуковану активність самців старшого віку. Це свідчить про те, що захисні ефекти АКГ можуть реалізуватися через синтез спеціальних захисних білків, що потребує подальшого дослідження. На додаток, виявлені відмінності між лініями та статтями вказують на те, що анти-вікові ефекти АКГ не є загальними, а залежать від багатьох факторів, зокрема від фізіологічного стану та особливостей метаболізму визначеного організму.

Подяка. Автори висловлюють подяку професору В.І. Луцаку 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. Aebi H. Catalase *in vitro* / H. Aebi // Meth. Enzymol., 1984. – Vol. 105. – P.121–126.

2. Protein and carbohydrate composition of larval food affects tolerance to thermal stress and desiccation in adult *Drosophila melanogaster* / L.H. Andersen, T.N. Kristensen, V. Loeschcke et al. // J. Insect. Physiol., 2010. – Vol. 56, N 4. – P. 336–340.

3. Assessment of antioxidant properties of alpha-keto acids *in vitro* and *in vivo* / M.M. Bayliak, M.P. Lylyk, O.M. Vytvytska et al. // Eur. Food Res. Technol., 2016. – Vol. 242, N 2. – P. 179–188.

4. Dietary alpha-ketoglutarate promotes higher protein and lower triacylglyceride levels and induces oxidative stress in larvae and young adults but not in middle-aged *Drosophila melanogaster* / M.M. Bayliak, M.P. Lylyk, H.V. Shmihel et al. // Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 2017 –Vol. 204. – P.28–39.

5. Bergman I. New spectrophotometric method for the determination of proline in tissue hydrolyzates / I. Bergman, R. Loxley // Anal. Chem., 1970. – Vol. 42. – P. 702–706.

6. 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.

7. Carroll N.V. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent / N.V. Carroll, R.W. Longley, J.H. Roe // J. Biol. Chem., 1956. – Vol. 220. – P. 583–593.

8. 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.

9. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys., 1959. – Vol. 82. – P. 70–77.

10. Lifespan extension and delay of age-related functional decline caused by *Rhodiola rosea* depends on dietary macronutrient balance / D.V. Gospodaryov, I.S. Yurkevych, O.V. Lushchak et al. // Longev. Healthspan, 2013. – Vol. 2, N 1. – P. 1–14, doi: 10.1186/2046-2395-2-5.

11. Grotewiel M.S. Functional senescence in *Drosophila melanogaster* / M.S. Grotewiel, I. Martin, P. Bhandari // Aging Res. – 2005. – Vol. 4. – P. 372–397.

12. 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.

13. *Intraduodenal* infusion of alpha-ketoglutarate decreases whole body energy expenditure in growing pigs / P. Junghans, M. Derno, S. Pierzynowski et al. // *Clin. Nutr.*, 2006. – Vol. 25, N 3. – P. 489–496.
14. *Kjellman V.* Addition of alphaketoglutarate to blood cardioplegia improves cardioprotection / V. Kjellman, K. Bjork, R. Ekroth // *Ann. Thorac. Surg.*, 1997. – Vol. 63. – P. 1625–1634.
15. *Kowalski S.* Courtship song in *Drosophila melanogaster*: a differential effect on male–female locomotor activity / S. Kowalski, T. Aubin, J.R. Martin Can // *J. Zool.*, 2004. – Vol. 82. – P. 1258–1266.
16. *Kurgalyuk N.M.* Effect of sodium α -ketoglutarate injected after the X-ray treatment on the respiration and oxidative phosphorylation of the liver's mitochondria / N.M. Kurgalyuk, O.V. Goryn // *Fiziol. Zh.*, 2000. – Vol. 46, N 5. – P. 63–70.
17. *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.
18. *Lee Y.* An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin / Y. Lee, T. Takahashi // *Anal. Biochem.*, 1966. – Vol. 14, Issue 1. – P. 71–77.
19. *Lushchak V.I.* Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification / V.I. Lushchak // *Chem. Biol. Interact.*, 2014. – Vol. 224. – P. 164–175.
20. *Gender* differences of amino acid metabolism in *Drosophila melanogaster* on alpha-ketoglutarate-supplemented food / M.P. Lylyk, O.M. Sorochnyńska, O.V. Maniukh et al. // *Visnyk of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series Problems of regulation of physiological functions*, 2016. – Vol. 2, N 21. – P. 31–36.
21. *The tricarboxylic acid cycle*, an ancient metabolic network with a novel twist / R.J. Mailloux R. Bïriault J. Lemire et al. // *PLoS ONE*, 2007. – Vol. 2, N 8, e690. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000690>.
22. *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.
23. *Salminen A.* 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.*, 2015. – Vol. 72, N 20. – P. 3897–3914.
24. *Schwimmer S.* Enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measure of pungency / S. Schwimmer, W.J. Weston // *J. AgricFood Chem.*, 1961. – Vol. 9. – P. 301–304.
25. *Effects* of dietary α -ketoglutarate supplementation on the antioxidant defense system and HSP 70 and HSP 90 gene expression of hybrid sturgeon *Acipenser schrenckii* ♀ Ч А. *baerii* ♂ exposed to ammonia-N stress / L. Wang, Q. Xu, C. Wang et al. // *Aquac. Res.*, 2016, doi:10.1111/are.13063.
26. *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.*, 2017. – Vol. 65, N 1. – P. 21–36.
6. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
7. Carroll NV, Longley RW, Roe JH. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J Biol Chem.* 1956;220:583–93.
8. Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, et al. The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature.* 2014;510(7505):397–401.
9. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82:70–7.
10. Gospodaryov DV, Yurkevych IS, Lushchak OV, Lushchak VI. Lifespan extension and delay of age-related functional decline caused by *Rhodiola rosea* depends on dietary macronutrient balance. *Longev Healthspan.* 2013;2(1):1–14. doi: 10.1186/2046-2395-2-5.
11. Grotewiel MS, Martin I, Bhandari P. Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. *Aging Res.* 2005;4:372–97.
12. Harrison AP, Pierzynowski SG. Biological effects of 2-oxoglutarate with particular emphasis on the regulation of protein, mineral and lipid absorption/metabolism, muscle performance, kidney function, bone formation and cancerogenesis, all viewed from a healthy ageing perspective state of the art-review article. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59(Suppl 1):91–106.
13. Junghans P, Derno M, Pierzynowski S, Hennig U, Eberhard R, Souffrant WB. Intraduodenal infusion of alpha-ketoglutarate decreases whole body energy expenditure in growing pigs. *Clin Nutr.* 2006;25(3):489–96.
14. Kjellman V, Bjork K, Ekroth R. Addition of alphaketoglutarate to blood cardioplegia improves cardioprotection. *Ann Thorac Surg.* 1997;63:1625–34.
15. Kowalski S, Aubin T, Martin Can JR. Courtship song in *Drosophila melanogaster*: a differential effect on male–female locomotor activity. *J Zool.* 2004;82:1258–66.
16. Kurgalyuk NM, Goryn OV. Effect of sodium α -ketoglutarate injected after the X-ray treatment on the respiration and oxidative phosphorylation of the liver's mitochondria. *Fiziol Zh.* 2000;46(5):63–70.
17. Lambert BD, Filip R, Stoll B, Junghans P, Derno M, Hennig U, et al. First-pass metabolism limits the intestinal absorption of enteral alpha-ketoglutarate in young pigs. *J Nutr.* 2006;136:2779–84.
18. Lee Y, Takahashi T. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin. *Anal. Biochem.* 1966;14(1):71–7.
19. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164–75.
20. Lylyk MP, Sorochnyńska OM, Maniukh OV, Bayliak MM. Gender differences of amino acid metabolism in *Drosophila melanogaster* on alpha-ketoglutarate-supplemented food. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Problems of physiological functions regulation.* 2016;2(21):31–6.
21. Mailloux RJ, Bïriault R, Lemire J, Singh R, Chïnier DR, Hamel RD, et al. The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS One.* 2007;2(8). e690. doi: 10.1371/journal.pone.0000690.
22. Niemiec T, Sikorska J, Harrison A, Szmïd M, Sawosz E, Wirth-Dzicïolowska E, et al. Alpha-ketoglutarate stabilizes redox homeostasis and improves arterial elasticity in aged mice. *J Physiol Pharmacol.* 2011;62(1):37–43.
23. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases are sensors of energy metabolism, oxygen availability, and iron homeostasis: potential role in the regulation of aging process. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(20):3897–914.
24. Schwimmer S, Weston WJ. Enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measure of pungency. *J AgricFood Chem.* 1961;9:301–4.
25. Wang L, Xu Q, Wang C, Li J, Chen D, Zhao Z, et al. Effects of dietary α -ketoglutarate supplementation on the antioxidant defense system and HSP 70 and HSP 90 gene expression of hybrid sturgeon *Acipenser schrenckii* ♀ Ч А. *baerii* ♂ exposed to ammonia-N stress. *Aquac Res.* 2016. doi: 10.1111/are.13063.
26. Zdzisinska B, Zurek A, Kandefer-Szerszec M. Alpha-ketoglutarate as a molecule with pleiotropic activity: well-known and novel possibilities of therapeutic use. *Arch. Immunol Ther Exp.* 2016;65(1):21–36.

Надійшла до редколегії 13.02.17

М. Лилик, асп., О. Сорочинская, асп., О. Манюх, асп., М. Байляк, канд. биол. наук, ГВУЗ "Прикарпатский национальный университет имени Васыля Стефаныка", Ивано-Франковск, Украина

ВОЗРАСТНЫЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ *DROSOPHILA* ПРИ СОДЕРЖАНИИ НА СРЕДЕ С АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТОМ

Исследованы некоторые метаболические показатели и показатели функционального старения у самцов плодовой мушки *D. melanogaster* ^{w¹¹¹⁸} за выращивание на среде с альфа-кетоглутаратом (АКГ). Пищевой АКГ повышал содержание аминокислот и белка в 2-дневных самцов и содержание триацилглицеридов в 24-дневных самцов без влияния на антиоксидантную систему самцов обеих возрастных групп. Также АКГ повышал устойчивость к тепловому стрессу в обеих возрастных группах, не влиял на устойчивость к оксидантам и предотвращал снижение двигательной активности самцов старшего возраста.

Ключевые слова: аминокислоты, триацилглицериды, тепловой стресс, локомоторная активность.

M. Lylyk, Ph. D. stud., O. Sorochnyńska, Ph. D. stud., O. Maniukh, Ph. D. stud., M. Bayliak, Ph. D., Vasyly Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

AGE-RELATED PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES *DROSOPHILA* GROWN ON ALPHA-KETOGLUTARATE

In the work, certain metabolic parameters and parameters of functional senescence were studied in the fruit fly *D. melanogaster* ^{w¹¹¹⁸} males fed with alpha-ketoglutarate (AKG). Dietary increased levels of amino acids and protein in 2-day-old males and levels of triacylglycerols in 24-day-old