

DOI: 10.26693/jmbs02.04.180

УДК 577.2.04.

Лилик М. П., Головчак М. В., Шмігель Г. В., Байляк М. М.

## ВПЛИВ АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТУ НА СТІЙКІСТЬ *Drosophila melanogaster* ДО РІЗНИХ ТОКСИКАНТІВ

ДВНЗ "Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника",  
Івано-Франківськ

marialylyk@ukr.net

Досліджено вплив альфа-кетоглутарату (АКГ), інтермедіату циклу Кребса, на розвиток та деякі фізіологічні показники *Drosophila melanogaster* за вирощування на середовищах, що містили ксенобіотики (2,4-дихлорфеноксицтову кислоту, гідропероксид кумену, біхромат калію та хлорид алюмінію). Найбільш токсичний вплив на розвиток личинок *D. melanogaster* проявляли 2,4-дихлорфеноксицтова кислота та біхромат калію, а найменш токсичним виявився гідропероксид кумену. Додавання до живильного середовища 10 мМ АКГ послаблювало токсичну дію досліджуваних ксенобіотиків, за винятком гідропероксид кумену, що проявлялося у пришвидшенні заляльковування та збільшенні загальної кількості утворених лялечок. Дводенні дорослі мухи, вирощені на середовищі з  $AlCl_3$  характеризувалися нижчою руховою індукованою активністю, ніж контрольні особини. Водночас, спостерігалось підвищення рухової активності до контрольних значень у мух, які були вирощені на середовищі з  $AlCl_3$  та АКГ. Отримані результати свідчать про захисну роль АКГ.

**Ключові слова:** альфа-кетоглутарат, *Drosophila melanogaster*, лялькування, хлорид алюмінію, індукована рухова активність.

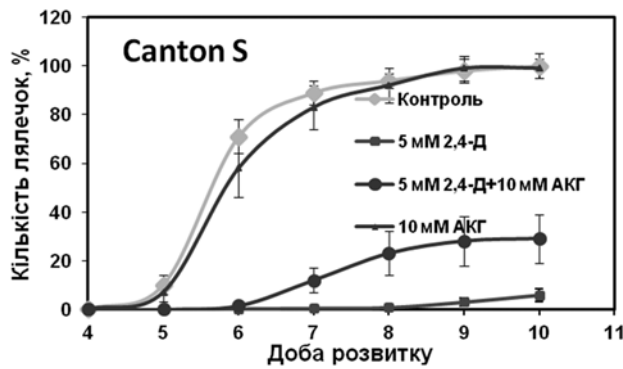
**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота є фрагментом НДР "Вивчення молекулярних механізмів адаптації живих організмів до несприятливих чинників і розробка способів підвищення адаптаційного потенціалу", № держ. реєстрації 0115U002304.

Вступ. Протягом останніх десятиріч плодова мушка *Drosophila melanogaster* стала популярним модельним об'єктом у токсикологічних дослідженнях. На *D. melanogaster* вивчається мутагенний, нейротоксичний і ембріотоксичний вплив різних ксенобіотиків (ртуті, свинцю, алюмінію, хрому, пестицидів тощо) та ведеться пошук речовин, які б ослаблювали чи повністю нівелювали ефекти токсикантів [3, 4, 13, 15, 17]. У попередніх наших роботах виявлено, що додавання до їжі альфа-кетоглутарату (АКГ) може послаблювати токсичну

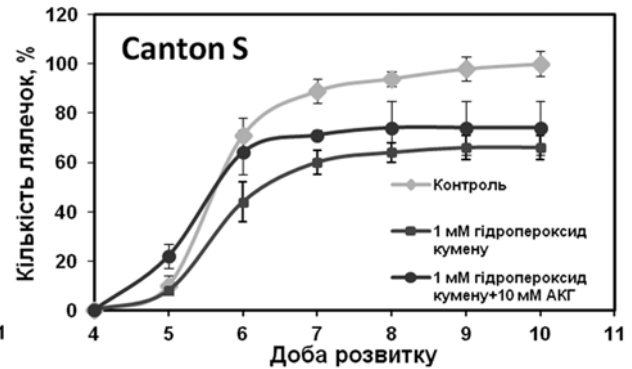
дію нітропрусиду натрію та етанолу на розвиток *D. melanogaster* [6, 7]. Альфа-кетоглутарат (АКГ) – важливий інтермедіат циклу Кребса, який бере участь в забезпеченні клітин енергією та в метаболізмі амінокислот, а також може діяти як антиоксидант [7, 8].

**Метою даної роботи** було дослідити здатність харчового альфа-кетоглутарату послаблювати токсичну дію на розвиток *D. melanogaster* деяких ксенобіотиків (хлориду алюмінію, біхромату калію, кумену гідропероксиду та 2,4-дихлорфеноксицтової кислоти), одним з механізмів впливу яких є розвиток оксидативного стресу.

**Об'єкт і методи дослідження.** У роботі використано мух *D. melanogaster* лінії Canton S, наданої Блумінгтонським центром стоків (Індіана, США). Експериментальні культури *D. melanogaster* вирощували на дріжджово-сахарозному середовищі, яке містило 5 % сухих пекарських дріжджів, 5% сахарози, 1% агару та 0,18% ніпагіну для запобігання росту цвілевих грибів (контрольне середовище). Залежно від умов експерименту у середовище додатково вносили 10 мМ АКГ (у формі натрієвої солі), 10 мМ  $AlCl_3$ , 1 мМ  $K_2Cr_2O_7$ , 1 мМ гідропероксид кумену або 5 мМ 2,4-дихлорфеноксицтової кислоти (2,4-Д) (дослідні середовища). У кожному банку вносили однакову кількість яєць (по 100 штук). Культивування проводили при 25 °С, постійній вологості та світловому режимі: день:ніч – 16:8. Динаміку лялькування визначали шляхом підрахунку кожного дня, починаючи з 4 доби розвитку, кількості залялькованих личинок до появи останньої лялечки. Кількість спожитої їжі визначали непрямим методом, який базується на визначенні кількості спожитого разом із живильним середовищем харчового барвника діамантового синього FD&C BlueN1, максимум поглинання якого знаходиться при 629 нм [2, 16]. Розділення дорослих мух за статями здійснювали шляхом легкого анастезування  $CO_2$ . Індуковану рухову активність визначали базуючись на явищі негативного геотаксису у мух – спрямоване піднімання (по стінці пробірки) мух угору після струшування на дно пробірки



**Рис 1.** Динаміка заляльковування *D. melanogaster* Canton S на дріжджово-сахарозному середовищі, яке містило додатково 5 мМ 2,4-Д, 10 мМ АКГ та їх суміш, n=4 (по 100 яєць у кожному повторі). За 100% приймали кількість внесених яєць



**Рис 2.** Динаміка заляльковування *D. melanogaster* Canton S на дріжджово-сахарозному середовищі, яке містило 1 мМ гідропероксиду кумену окремо та у суміші з 10 мМ АКГ, n=4-6 (по 100 яєць у кожному повторі). За 100% приймали кількість внесених яєць

[11]. У кожному повторі індуковану рухову активність визначали для 30 особин кожної статі. Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми "Mupova". Як статистичні показники брали середнє арифметичне  $\bar{x}$  (M) та похибку середнього арифметичного Sx або m. Порівняння середніх арифметичних проводили за допомогою критерію Даннета.

Результати досліджень та їх обговорення. Нами було досліджено розвиток *D. melanogaster* на середовищах, які містили додатково 5 мМ 2,4-Д, 10 мМ  $AlCl_3$ , 1 мМ  $K_2Cr_2O_7$  та 1 мМ гідропероксиду кумену окремо та у суміші з 10 мМ АКГ. Контрольне середовище не містило токсикантів та АКГ. Концентрації токсикантів були підібрані таким чином, щоб вони ефективно пригнічували розвиток личинок [13, 15]. Концентрація АКГ була взята на основі наших попередніх досліджень [6, 7].

Додавання лише АКГ до живильного середовища (рис. 1) не впливало на динаміку заляльковування личинок. Вирощування на середовищі з 5 мМ 2,4-Д суттєво знижувало як швидкість заляльковування, так і кількість утворених лялечок.

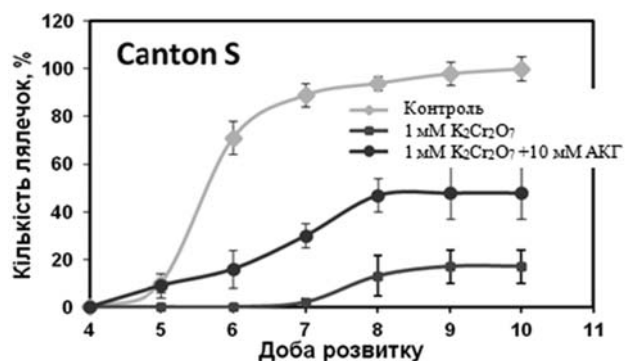
Личинки починали лялькуватися лише на 9 добу, тоді як у контролі – на 5-ту. Загальна кількість утворених лялечок на середовищі з 2,4-Д досягала лише 5% від кількості внесених яєць. Токсичність 2,4-Д, очевидно, пов'язана з індуцією сильного оксидативного стресу у тканинах личинок та пошкодженням білків та ліпідів, як це спостерігалось в інших організмів [5, 17]. За сумісного культивування на середовищі з 2,4-Д і АКГ токсична дія 2,4-Д проявлялась слабше: личинки починали лялькуватися на сьому добу і загальна кількість утворених лялечок досягала 35%.

За розвитку мух на середовищі з 1 мМ гідропероксиду кумену, який є сильним індуктором перок-

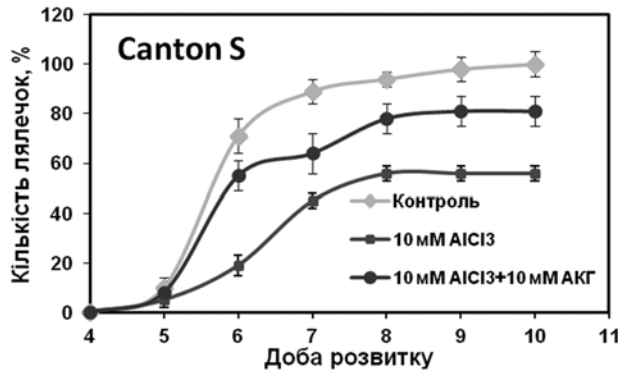
сидного окислення ліпідів [1], захисний ефект АКГ не спостерігався: відсоток утворених лялечок був подібним на середовищах, які містили гідропероксид кумену та суміш «гідропероксид кумену + АКГ» та нижчим на 30%, ніж на контрольному середовищі (рис. 2). Це свідчить про те, що захисні механізми АКГ можуть бути специфічними.

Біхромат калію (рис. 3) призводив до зниження швидкості заляльковування та кількості лялечок, порівняно з контролем: личинки починали лялькуватися на сьому добу, і загальна їхня кількість на десяту добу становила 15%. За додавання АКГ до середовища з даним ксенобіотиком спостерігалось як збільшення швидкості заляльковування, так і загальної кількості утворених лялечок – до 45%.

На середовищі з 10 мМ хлоридом алюмінію швидкість заляльковування та загальна кількість утворених лялечок була нижчою на 50%, ніж на контрольному середовищі (рис. 4). За додавання АКГ до їжі з 10 мМ  $AlCl_3$  відсоток залялькованих личинок зростав до 80%.



**Рис 3.** Динаміка заляльковування *D. melanogaster* Canton S на дріжджово-сахарозному середовищі, яке містило 1 мМ  $K_2Cr_2O_7$  окремо та у суміші з 10 мМ АКГ, n=4-5 (по 100 яєць у кожному повторі). За 100% приймали кількість внесених яєць

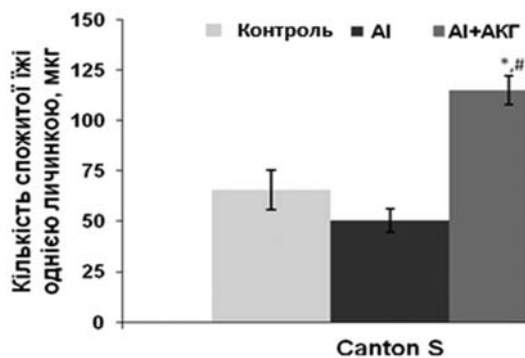


**Рис. 4.** Динаміка заляльковування *D. melanogaster* Canton S на дріжджово-сахарозному середовищі, яке містило 10 мМ AlCl<sub>3</sub> окремо та у суміші з 10 мМ АКГ, n=4-7 (по 100 яєць у кожному повторі). За 100% приймали кількість внесених яєць

Оскільки наявність токсикантів у середовищі може впливати на швидкість споживання їжі мухами [9, 10] ми визначили інтенсивність споживання їжі личинками III стадії розвитку, які розвивалися на контрольному середовищі та середовищах, які містили 10 мМ AlCl<sub>3</sub> окремо та у суміші з 10 мМ АКГ (рис. 5).

Наявність 10 мМ AlCl<sub>3</sub> у середовищі не впливала на споживання їжі личинками, проте, неочікувано, за одночасного додавання АКГ личинки споживали їжі значно більше, ніж контрольні особини та особини на алюміній-вмісному середовищі. Варто зауважити, що додавання лише АКГ до їжі не впливало на інтенсивність харчування личинок [7].

У дводенних мух, вирощених на контрольному та дослідних середовищах, які містили 10 мМ AlCl<sub>3</sub> окремо та у суміші з 10 мМ АКГ, визначили індуковану рухову активність, яка є показником загальної



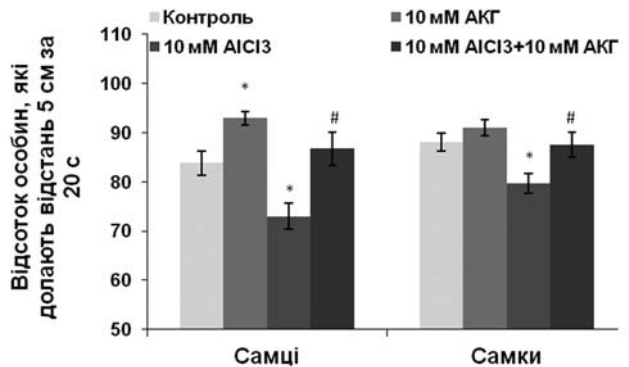
**Рис. 5.** Інтенсивність споживання їжі личинками *D. melanogaster* Canton S на контрольному середовищі та середовищах з 10 мМ AlCl<sub>3</sub> окремо та у суміші з 10 мМ АКГ, n=4 (кількість особин у кожному повторі становила 16-30). \*Значення достовірно відрізняється від контрольного значення та # від значення на "10 мМ AlCl<sub>3</sub>" з P < 0,05

фізіологічної активності мух [12]. Самці і самки, вирощені на середовищі з алюмінієм, мали суттєво нижчу локомоторну активність, ніж контрольні особини (рис. 6).

Відомо, що іони алюмінію можуть викликати порушення у нервовій системі мух [17]. Своєю чергою, порушення функціонування нервової системи може зумовлювати зниження локомоторної активності як показника нейром'язової активності мух. За сумісного впливу алюмінію хлориду та АКГ, рухова активність мух не відрізнялась від таких значень у контрольних мух, що свідчить про захисну дію АКГ.

**Висновки.** Встановлено, що за сумісного споживання АКГ послаблює токсичну дію низки ксенобіотиків (2,4-Д, AlCl<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) на розвиток *D. melanogaster* Canton S, що відображається у збільшенні швидкості заляльковування та загальної кількості утворених лялечок. Личинки на середовищі, яке містило AlCl<sub>3</sub> та АКГ споживали значно більше їжі, порівняно з личинками на контрольному та AlCl<sub>3</sub>-вмісному середовищі. Дводенні самці та самки, вирощені на середовищі з 10 мМ AlCl<sub>3</sub>, характеризувалися нижчою локомоторною активністю, порівняно з контрольними мухами. Водночас, спостерігалось підвищення рухової активності до контрольних значень у мух, які були вирощені на середовищі з AlCl<sub>3</sub> та АКГ. Отримані результати підтверджують ідею про захисну роль АКГ.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому планується дослідити детальніше біохімічні механізми захисної дії харчового АКГ у плодової мушки *D. melanogaster* за впливу ксенобіотиків, зокрема участь антиоксидантної системи, ферментів детоксикації ксенобіотиків та функціонування мітохондрій.



**Рис. 6.** Індукована рухова активність дводенних дорослих особин *D. melanogaster* Canton S, вирощених на середовищах з додаванням 10 мМ АКГ та 10 мМ AlCl<sub>3</sub> окремо та у суміші, n=4 (кількість особин у кожному повторі – 20-40). \*Значення достовірно відрізняється від контрольного значення та # від значення на "10 мМ AlCl<sub>3</sub>" з P < 0,05

## References

- Lushchak V, Bahniukova T, Luzhna L. Pokaznyky oksydatyvnoho stresu. 2. Peroksydy lipidiv. *Ukr biokhim zhurn.* 2006; 6: 113-20. [Ukrainian]
- Rovenko BM. Obmezhennia vmistu vuhlevodiv u diieti lychynok sprychyniuie oksydatyvnyi stres u doroslykh komakh *Drosophila melanogaster*. *Ukr. biokhim. zhurn.* 2013; 8 5(5): 61-72. [Ukrainian]
- Abnoos H, Fereidoni M, Mahdavi-shahri N, Haddad F, Jalal R. Developmental study of mercury effects on the fruit fly (*Drosophila melanogaster*). *Interdiscip Toxicology.* 2013; 6: 34-40. doi: 10.2478/intox-2013-0007.
- Amrani S, Rizki M, Creus A, Marcos R. Genotoxic Activity of Different Chromium Compounds in Larval Cells of *Drosophila melanogaster*, as Measured in the Wing Spot Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 1999; 34: 47-51. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2280(1999)34:1<47::AID-EM7>3.0.CO;2-B.
- Atamaniuk T, Kubrak O, Storey K, Lushchak V. Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): studies with goldfish gills. *Ecotoxicology.* 2013; 22: 1498-508. DOI: 10.1007/s10646-013-1136-z.
- Bayliak M, Shmihel H, Lylyk M, Storey KB, Lushchak VI. Alpha-ketoglutarate reduces ethanol toxicity in *Drosophila melanogaster* by enhancing alcohol dehydrogenase activity and antioxidant capacity. *Alcohol.* 2016; 55: 23-33. DOI: 10.1016/j.alcohol.2016.07.009.
- Bayliak M, Shmihel H, Lylyk M, Vytvytska OM, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Alpha-ketoglutarate attenuates toxic effects of sodium nitroprusside and hydrogen peroxide in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2015; 40: 650-9. DOI: 10.1016/j.etap.2015.08.016.
- 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: 91-106.
- Ihara S, Yoshikawa K, Touhara K. Chemosensory signals and their receptors in the olfactory neural system. *Neuroscience.* 2009; 254: 45-60. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.063.
- Jacob J. A study on food preference in *Drosophila*. *The Scientia Review.* 2009. e 234.
- Gospodaryov DV, Yurkevych IS, Jafari M, Lushchak VI, Lushchak OV. 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. <http://dx.doi.org/10.1186/2046-2395-2-12>. doi: 10.1186/2046-2395-2-5.
- Grotewiel MS, Martin I, Bhandari P, Cook-Wiens E. Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. *Ageing Res Rev.* 2005; 4 (3): 372-97. DOI: 10.1016/j.arr.2005.04.001.
- Kijak E, Rosato E, Knapczyk K, Pyza E. *Drosophila melanogaster* as a model system of aluminum toxicity and aging. *Insect Sci.* 2014; 21 (2): 189-202. DOI: 10.1111/1744-7917.12017.
- Lushchak OV, Kubrak OI, Nykorak MZ, Storey KB, Lushchak VI. The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: Possible protective role of glutathione. *Aquatic Toxicology.* 2008; 87: 108-14. DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.01.007.
- Perkhulyan NV, Rovenko BM, Zvarych TV, Lushchak OV, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Sodium chromate demonstrates some insulin-mimetic properties in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2015; 167: 74-80. DOI: 10.1016/j.cbpc.2014.08.007.
- Scorupa D, Dervisevendic A, Zwiener J, Fletcher SD. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell.* 2008; 7: 478-90. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00400.x.
- Wu Z, Du Y, Xue H, Wu Y, Zhou B. Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiology of Aging.* 2012 Jan; 33 (1): 199e1–199.e12. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.06.018.

УДК 577.2.04.

**ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТА НА УСТОЙЧИВОСТЬ  
*Drosophila melanogaster* К РАЗЛИЧНЫМ ТОКСИКАНТАМ  
Лилик М. П., Головач М. В., Шмигель Г. В. Байляк М. М.**

**Резюме.** Исследовано влияние альфа-кетоглутарата (АКГ), интермедиата цикла Кребса, на развитие и некоторые физиологические показатели *Drosophila melanogaster* за выращивания на средах, содержащих ксенобиотики (2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту, гидропероксид кумена, бихромат калия и хлорид алюминия). Наиболее токсическое воздействие на развитие личинок *D. melanogaster* проявили 2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота и бихромат калия, а наименее токсичным оказался гидропероксид кумена. Добавление в питательную среду 10 мМ АКГ ослабляло токсическое действие исследуемых ксенобиотиков, за исключением гидропероксида кумена, что проявлялось в ускорении окукливания и увеличении общего количества образованных куколок. Двухдневные взрослые мухи, выращенные на среде с  $AlCl_3$  характеризовались меньшей двигательной индуцированной активностью, чем контрольные особи. В то же время, наблюдалось повышение двигательной активности до контрольных значений в мух, которые были выращены на среде с  $AlCl_3$  и АКГ. Полученные результаты свидетельствуют о защитной роли АКГ.

**Ключевые слова:** альфа-кетоглутарат, *Drosophila melanogaster*, окукливание, хлорид алюминия, индуцированная двигательная активность.

UDC 577.2.04.

**Influence Of Alpha-Ketoglutarate On *Drosophila melanogaster* Resistance To Different Toxicants**

**Lyluk M. P., Golovchak M. V., Shmihel H. V., Bayliak M. M.**

**Abstract.** The fruit fly *Drosophila melanogaster*, a popular genetic model, has been used extensively in toxicological and nutritional research. Using *D. melanogaster* we have recently found the protective effects of alpha-ketoglutarate (AKG), an important intermediate of the Krebs cycle, against toxic effects of sodium nitroprusside and ethanol.

The aim of this work was to investigate the ability of dietary alpha-ketoglutarate to alleviate developmental toxicity of some xenobiotics such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), potassium dichromate, cumene hydroperoxide and aluminum chloride on *D. melanogaster*.

**Materials and methods.** *D. melanogaster* Canton S strain was used in all experiments. Flies were cultivated on yeast-sucrose medium containing 5% pressed yeast, 5% sucrose, 1% agar, and 0.18 % nipagin. This medium was denoted as the control. Experimental media contained additionally 10 mM AKG, 5 mM 2,4-D, 1 mM  $K_2Cr_2O_7$ , 1 mM cumene hydroperoxide, 10 mM  $AlCl_3$ , and combinations of the indicated xenobiotics with 10 mM AKG. About 100 eggs were put in each 100 ml glass bottle with 15 ml of the experimental diets. The dynamics of flies development on different experimental diets was assessed by counting the number of pupae formed once per day, starting from 96 hours after egg deposition. Food intake was measured by indirect methods using FD&C Blue No. 1 dye. Locomotor activity of adult flies was assessed by climbing activity assay.

**Results.** The pupation rate and total number of pupae formed were significantly lower on the food containing 5 mM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 10 mM  $AlCl_3$ , 1 mM  $K_2Cr_2O_7$  and 1 mM cumene hydroperoxide. Food supplementation with 10 mM AKG alleviated toxic effects of the xenobiotics added to food, except cumene hydroperoxide, and improved *D. melanogaster* development. The latter was characterized by accelerating pupation time and increase in total pupae formed. The presence of 10 mM  $AlCl_3$  in the food did not affect food intake by larvae, but larvae consumed more food, containing mixture "AKG and  $AlCl_3$ " as compared to control ones. Two-day-old flies reared on  $AlCl_3$ -supplemented food had lower climbing activity than control ones. At the same time, flies reared on food containing  $AlCl_3$  and AKG did not differ from the controls in climbing activity.

**Conclusions.** The obtained results indicate that supplementation of food with alpha-ketoglutarate alleviates developmental toxicity of certain xenobiotics and improves the physiological state of young *D. melanogaster* flies, reared on food containing these toxicants. The detailed mechanisms of protective effects of AKG are directions for future research.

**Key words:** alpha-ketoglutarate, *Drosophila melanogaster*, pupation, aluminum chloride, climbing activity.

Стаття надійшла 16.08.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування