

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

БАЙЛЯК МАРІЯ МИХАЙЛІВНА

УДК 577.12.121:579.222:57.042:57.017.6:57.017.3:577.24:591.1:615.32

**ПІДВИЩЕННЯ АДАПТАЦІЙНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ДРІЖДЖІВ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ТА ПЛОДОВОЇ МУШКИ *DROSOPHILA*
MELANOGASTER РОСЛИННИМИ ЕКСТРАКТАМИ, КЕТОКИСЛОТАМИ ТА
АРГІНІНОМ**

03.00.04 – біохімія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Чернівці – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії та біотехнології ДВНЗ “Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника”

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор
ЛУЩАК ВОЛОДИМИР ІВАНОВИЧ,
ДВНЗ “Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника”,
завідувач кафедри біохімії та біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
СТОЛЯР ОКСАНА БОРИСІВНА,
Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка,
професор кафедри хімії та методики її викладання

доктор біологічних наук, професор
ФЕДОРОВИЧ ДАРІЯ ВАСИЛІВНА,
Інститут біології клітини НАН України,
провідний науковий співробітник
відділу молекулярної генетики і біотехнології

доктор медичних наук, професор
ВАЙСЕРМАН ОЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ,
ДУ “Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова”
НАМН України, завідувач лабораторії епігенетики

Захист відбудеться “11” грудня 2019 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 76.051.05 Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича за адресою: 58012, м. Чернівці, вул. Лесі Українки, 25, ауд. 81.

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці Чернівецького національного університету імені Юрія Федоровича за адресою: 58012, м. Чернівці, вул. Лесі Українки, 23.

Автореферат розісланий “ ____ ” листопада 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук, доцент



Р.І. Беспалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Живі організми, включно з людиною, постійно зазнають впливу різноманітних стресових чинників. Неприятливі ефекти багатьох стресорів пов'язують з розвитком оксидативного стресу, тобто зі збільшенням стаціонарної концентрації активних форм кисню (АФК) та зростанням рівня окисних пошкоджень у клітинах (Lushchak, 2011; Sies, 2015). За фізіологічних умов АФК є невід'ємною складовою дихального метаболізму, а також продуктами деяких специфічних ензиматичних реакцій. Оскільки АФК мають високу реакційну здатність та можуть пошкоджувати практично всі біомолекули, клітини виробили складні механізми антиоксидантного захисту, спрямовані на уникнення і гальмування вільнорадикального окислення, а також на відновлення пошкоджених біомолекул (Halliwell and Gutteridge, 1989; Lushchak, 2011). Повної елімінації АФК не відбувається, оскільки за низьких концентрацій АФК діють як регулятори багатьох клітинних функцій; проте якщо їхній стаціонарний рівень зростає, клітини зазнають оксидативного стресу (Halliwell and Gutteridge, 1989; Lushchak, 2014, Sies, 2017). Згідно з вільнорадикальною теорією старіння з віком зростає як продукція АФК, так і знижується потужність антиоксидантного захисту (Harman, 1956, 2006). Відповідно до цього, пропонується, що використання екзогенних антиоксидантів може потенційно сповільнювати старіння організму та підвищувати стійкість до багатьох стресорів. Проте експериментальні дані не підтверджують достатньо надійно ефективність антиоксидантів – деякі антиоксиданти, навпаки, проявляють токсичність та скорочують тривалість життя (Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2014; Desjardins et al., 2017). Токсичність антиоксидантів пояснюється тим, що вони можуть проявляти прооксидантні властивості за певних умов (Akagawa et al., 2003; Halliwell, 2008; Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2014). Висловлена гіпотеза, що в основі сприятливих ефектів низьких концентрацій антиоксидантів лежить явище гормезису (Вайсерман, 2010; Pietsh et al., 2011). Ця гіпотеза стверджує, що антиоксиданти у низьких дозах можуть підвищувати рівень АФК у клітинах з одночасною стимуляцією захисних систем, що, своєю чергою, надає стійкості організму до дії інтенсивніших стресів та сповільнює темпи старіння, тоді як у високих концентраціях антиоксиданти призводять до посилення окисних процесів у клітинах і підвищують чутливість до стресорів (Calabrese et al., 2012; Ristow and Schmeisser, 2014).

Згідно з горметичною концепцією довголіття, застосування підходів, які підвищують опірність до стресів, потенційно може сповільнювати старіння організму (Ristow and Schmeisser, 2014; Vaiserman et al., 2016). Одним із напрямків таких досліджень є пошук природних речовин – стимуляторів захисних систем. На сьогодні наявні відомості про адаптогенні та/або геропротекторні властивості для кількох сотень низькомолекулярних природних речовин та їх синтетичних аналогів, проте для більшості з них механізми впливу, а також питання безпечності залишаються нез'ясованими. У своїй роботі ми зосередили увагу на вивченні захисних властивостей рослинних препаратів

фенольної природи (кверцетину та родіоли рожевої), а також альфа-кетоглутарату та аргініну, які є клітинними метаболітами. Спільною рисою цих чинників є те, що вони можуть впливати на окисно-відновні процеси у клітині: 1) рослинні феноли здатні проявляти антиоксидантні та прооксидантні властивості (Dai and Mumper, 2010); 2) альфа-кетоглутарат (АКГ) може потенційно знешкоджувати H_2O_2 , а з іншого боку, включаючись у цикл Кребса, впливати на інтенсивність мітохондріального дихання (Zdzisińska et al., 2017); 3) аргінін як субстрат NO-синтази може впливати на продукцію оксиду азоту (NO^*), який є вільним радикалом (Сибірна та ін., 2010). Нами було висунуте припущення, що вказані чинники можуть діяти як м'які стресори, які здатні підвищувати опірність до стресів та сповільнювати старіння через стимуляцію захисних систем чи корекцію метаболічних процесів. Оскільки ключову роль в індукції горметичної відповіді можуть відігравати АФК (Ristow and Schmeisser, 2014), у фокусі досліджень були прооксидантні та антиоксидантні властивості природних речовин. Як модельні об'єкти використані пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* та плодова мушка *Drosophila melanogaster*. Одноклітинні еукаріоти *S. cerevisiae* є визнаним модельним організмом у вивченні клітинного циклу, захисних систем та механізмів старіння на клітинному рівні (Lushchak, 2010; Longo et al., 2012). *D. melanogaster* – популярний об'єкт у генетичних дослідженнях, а останніми десятиліттями її стали використовувати в геронтологічних дослідженнях, для вивчення метаболічних порушень та оцінки негативних ефектів забруднювачів довкілля (Jones and Grotewiel, 2011; Kaun et al., 2012). З'ясування механізмів дії адаптогенів/геропротекторів на модельних організмах дозволяє детальніше охарактеризувати захисні системи цих організмів, а також критично оцінити потенційні корисні ефекти та ризики досліджуваних чинників для людського організму, хоча дані необхідно екстраполювати з обережністю.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Робота проводилась протягом 2007-2017 рр. на кафедрі біохімії та біотехнології ДВНЗ “Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника” та є частиною наступних наукових тематик кафедри: “Вивчення оксидативного стресу у тварин і мікроорганізмів з метою мінімізації його шкідливої дії” (№ держреєстрації 0106U002245; 2006-2008 рр.); “Вивчення механізмів пристосування організмів до несприятливих умов середовища з метою розробки методів підвищення їх адаптаційного потенціалу” (№0107U001367; 2007-2011 рр.); “Регуляція вільно-радикальних процесів при відповіді живих організмів на дію несприятливих чинників зовнішнього середовища” (№0109U001412; 2009-2011 рр.); “Фізіолого-біохімічні аспекти адаптацій живих організмів до несприятливих умов довкілля” (№0112U000061; 2012-2016 рр.); “Вивчення молекулярних механізмів адаптації живих організмів до несприятливих чинників і розробка способів підвищення адаптаційного потенціалу” (№0115U002304; 2015-2017 рр.). Робота також виконувалась в межах тем за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень: “Адаптивна відповідь дріжджів

Saccharomyces cerevisiae на дію карбонатного радикалу” (№0107U009805; 2007 р.); “Дослідження токсичності іонів заліза і міді у присутності карбонатів” (№0107U009804; 2007 р.). Окремі експерименти були проведені на кафедрі мікробіології факультету біохімії, біофізики і біотехнології Ягеллонського університету (м. Краків, Польща) в межах гранту від Фонду королеви Ядвіги (проект “Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* як модель вивчення ролі оксидативного стресу в старінні”, червень 2009 р.).

Мета та завдання дослідження. Мета роботи – оцінити здатність низки природних речовин фенольної природи та клітинних метаболітів, альфа-кетокислот та аргініну, підвищувати стійкість до стресів та продовжувати тривалість життя модельних організмів та з’ясувати роль антиоксидантних та прооксидантних властивостей досліджуваних речовин у реалізації цих ефектів.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

- 1) порівняти вміст фенольних речовин, антиоксидантні та прооксидантні властивості у водних екстрактів, отриманих з деяких лікарських рослин, зокрема тих, які зростають в Українських Карпатах (*Rhodiola rosea* L., *Rosa canina* L., *Hypericum perforatum* L., *Gentiana lutea* L.);
- 2) дослідити вплив водних екстрактів родіоли рожевої на стійкість до стресів, стан антиоксидантної системи та тривалість життя дріжджів *S. cerevisiae*;
- 3) визначити виживання дріжджів *S. cerevisiae* за дії оксидативного та теплового стресів після попередньої інкубації з кверцетином на з’ясувати механізми захисної дії кверцетину;
- 4) дослідити антиоксидантні властивості альфа-кетокислот (альфа-кетоглютарату, пірувату та оксалоацетату) *in vitro* та *in vivo*;
- 5) вивчити фізіолого-біохімічні особливості (стійкість до стресів, тривалість життя, показники прооксидантно-антиоксидантного статусу, вуглеводного та амінокислотного обміну) дріжджів *S. cerevisiae* за вирощування у середовищі з альфа-кетоглютаратом (АКГ);
- 6) дослідити здатність альфа-кетоглютарату послаблювати токсичну дію етанолу на плодову мушку *D. melanogaster*;
- 7) вивчити фізіолого-біохімічні особливості (динаміку розвитку, показники функціонального старіння, тривалість життя, показники прооксидантно-антиоксидантного статусу, вуглеводного та амінокислотного обміну) у *D. melanogaster* за вирощування на середовищі з АКГ;
- 8) вивчити вплив аргініну на розвиток, показники прооксидантно-антиоксидантного статусу та амінокислотного обміну, плодючість та тривалість життя *D. melanogaster*;
- 9) проаналізувати роль про-/антиоксидантних механізмів дії досліджуваних речовин у реалізації адаптогенних та геропротекторних ефектів.

Об’єкт дослідження – життєздатність та інтенсивність вільнорадикальних процесів у дріжджів *S. cerevisiae* та плодової мушки *D. melanogaster*.

Предмет дослідження – стрес-захисні та геропротекторні властивості природних чинників у модельних організмів за оцінкою показників

функціонального стану, інтенсивності вільнорадикальних реакцій, вуглеводного та білкового обміну; про- та антиоксидантні властивості природних речовин *in vitro* та *in vivo*.

Методи дослідження. У роботі використані *мікробіологічні* (культивування, створення стресових умов та оцінка життєздатності дріжджів), *фізіологічні* (вирощування та визначення тривалості життя плодової мушки, тести на локомоторну активність та стійкість комах до фізичних та хімічних стресорів), *біохімічні* (визначення концентрації метаболітів вуглеводного та амінокислотного обміну, активностей антиоксидантних та асоційованих з ними ферментів та ферментів обміну амінокислот, показників оксидативного стресу (рівень карбонільних груп у білках, α -дикарбонільних сполук, пероксидів ліпідів, низько- і високомолекулярних тіол-вмісних сполук); *фізико-хімічні методи* (полярографічне визначення інтенсивності дихання клітин дріжджів; флуоресцентне визначення продукції загального рівня АФК розчинами вуглеводів *in vitro*; спектрофотометричне визначення антиоксидантної активності природних речовин та їх здатності продукувати H_2O_2 *in vitro*) та методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено порівняльне визначення *in vitro* та *in vivo* антиоксидантних та прооксидантних властивостей водних екстрактів з лікарських рослин, які зростають на території України, зокрема в Українських Карпатах. Знайдено, що екстракти з вищою концентрацією фенольних речовин (*R. rosea* L., *R. canina* L.) ефективно знешкоджують вільні радикали та H_2O_2 *in vitro* та підвищують виживання клітин *S. cerevisiae* за низьких рН, проте проявляють вищу прооксидантну активність (за продукцією H_2O_2) за високих рН, ніж екстракти з меншим вмістом фенольних сполук (*H. perforatum* L., *G. lutea* L). Вперше показано, що водний екстракт з кореневища *R. rosea* проявляє адаптогенну та геропротекторну дію на дріжджі *S. cerevisiae* у залежний від концентрації спосіб, підвищуючи стійкість до низки стресорів та збільшуючи хронологічну тривалість життя культур дріжджів. Адаптогенна дія *R. rosea* не супроводжувалась активацією антиоксидантної системи, проте потребувала залучення транскрипційних факторів Msn2/4 та Yap1. Знайдено, що попередня обробка із біофлавоноїдом кверцетином у низьких концентраціях підвищувала виживання клітин та запобігала окисним пошкодженням білків у *S. cerevisiae* за дії різних стресів. Встановлено, що захисна дія кверцетину не пов'язана зі стимуляцією антиоксидантної системи дріжджів, проте потребує наявності транскрипційних регуляторів загальної стресової відповіді Msn2/Msn4 (але не білка Yap1) та нівелюється за застосування циклогексиміду, інгібітору біосинтезу протеїнів.

Показано, що природні альфа-кетокислоти (піруват, АКГ та оксалоацетат) здатні знешкоджувати H_2O_2 , та ОН *in vitro*. Вперше продемонстровано, що за сумісної обробки АКГ ефективно захищає клітини *S. cerevisiae* від стресу, який викликаний H_2O_2 , іонами Fe^{2+} та вуглеводами, а плодову мушку *D. melanogaster* – за впливу високих концентрацій H_2O_2 та етанолу. Знайдено, що захисні ефекти

АКГ за інкубації дріжджів з вуглеводами пов'язані з інтенсифікацією мітохондріального дихання і попередженням зниження вмісту загального протеїну, а у випадку вирощування плодової мушки на етанолі – із підвищенням потужності антиоксидантного захисту та активацією алкогольдегідрогенази.

Виявлено, що вирощування у середовищі з АКГ підвищує стійкість молодих культур *S. cerevisiae* до низки стресів (зокрема, заморожування-розморожування) та запобігає втраті проліферативного потенціалу клітинами у старих культурах. Показано, що ці ефекти АКГ супроводжувалися зростанням вмісту вільного проліну, зростанням активності глутаматдегідрогеназ та глутамінсинтази та активацією антиоксидантного захисту у молодих культурах дріжджів. Зумовлене АКГ підвищення життєздатності дріжджів у старих культурах було пов'язане зі зростанням концентрації загального протеїну і запасних вуглеводів, а також з посиленням антиоксидантного захисту, що запобігало акумуляції з віком окисно пошкоджених протеїнів.

Вперше проведено оцінку ефектів АКГ, доданого до їжі, у *D. melanogaster* і знайдено, що АКГ по-різному впливає на метаболічні процеси у мух молодого та старшого віку. Вирощування на середовищі з АКГ підвищує стійкість до стресів у молодих комах та викликає залежні від статі метаболічні зміни: у самок більш вираженими є зміни у вмісті метаболітів (збільшення вмісту проліну та загального протеїну, зниження вмісту триацилгліцеридів), тоді як у самців – активація антиоксидантного захисту (підвищення загальної антиоксидантної активності, активності каталази та вмісту низькомолекулярних тіолів). У старих мух АКГ викликає розвиток оксидативного стресу (зростання вмісту пероксидів ліпідів та низькомолекулярних тіолів, зниження активності каталази) та підвищення вмісту загального протеїну та триацилгліцеридів. Встановлено, що АКГ підвищує тривалість життя самок та сповільнює функціональне старіння (зниження рухової активності та стійкості до стресів) у мух обох статей. Водночас, у концентрації, яка підвищує тривалість життя, АКГ знижує плодючість самок.

Показано, що споживання аргініну пришвидшує розвиток личинок і метаболізм (зниження вмісту глюкози та триацилгліцеридів, зростання вмісту загального протеїну) у молодих імаго *D. melanogaster*. Водночас, вирощування на середовищі з аргініном призводить до розвитку оксидативного стресу у мух. Індукція оксидативного стресу може бути залучена у виявлені токсичні ефекти цієї амінокислоти за тривалого споживання (знижена плодючість самок та скорочена тривалість життя мух обох статей).

Практичне значення отриманих результатів. На основі отриманих результатів роботи можна рекомендувати проведення доклінічних досліджень на модельних ссавцях: геропротекторних властивостей *R. rosea* та АКГ; АКГ як антитоту за отруєнь етанолом та різними окисниками. Отримані дані щодо здатності екзогенного АКГ підвищувати стійкість пекарських дріжджів до промислових стресів (заморожування-розморожування, тепловий та оксидативний стреси, стрес за впливу чистих розчинів вуглеводів) дозволяють

рекомендувати використання АКГ як додаткового компоненту живильного середовища для забезпечення якості дріжджів в умовах промислового виробництва. Апробовані у роботі методики з визначення функціонального стану *S. cerevisiae* та *D. melanogaster* можна рекомендувати для використання у скринінгових дослідженнях стрес- та геропротекторних ефектів природних речовин на цих модельних об'єктах.

Результати роботи впроваджені у навчальний процес на кафедрі біохімії та біотехнології ДВНЗ “Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника”, а саме використовуються для підготовки лабораторних занять з великого практикуму з біохімії, лекцій і практичних занять з курсів “Біохімія дріжджів”, “Моделі біохімічних досліджень”, “Неферментативні процеси у біології”, “Інтеграція метаболізму” та “Біологічно активні природні речовини”. Апробовані в роботі методи з аналізу функціонального стану організмів, визначення хімічного складу та антиоксидантної активності рослинних екстрактів ввійшли до програм Карпатської літньої школи та Школи юного біохіміка, відповідно, які, починаючи з 2013 року, щорічно проводяться на кафедрі біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом проведені пошук та аналіз літератури за темою, підібрані методики та розроблені схеми експериментів, проведена статистична обробка та теоретичний аналіз результатів дослідження, сформульовані основні положення дисертації та здійснена підготовка 16 статей; у підготовці 7 інших рукописів дисертант брала участь частково (написання окремих фрагментів і як виконавець експериментів). Експерименти виконані дисертантом особисто або за безпосередньої участі.

Планування окремих етапів роботи, обговорення отриманих результатів та підготовка рукописів до публікації здійснювались спільно з науковим консультантом, професором Володимиром Луцаком. Написання розділу монографії та однієї статті здійснювалось спільно з д.б.н. Галиною Семчишин. Флуоресцентне дослідження визначення рівня АФК здійснено автором у лабораторії професора J. Miedzobrodzki (Ягеллонський університет, м. Краків, Польща) у рамках гранту від Фонду королеви Ядвіги. Співучасть закордонних партнерів, студентів та працівників кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету ім. Василя Стефаника висвітлена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення та висновки дисертаційної роботи були представлені на: III Україно-Польській Вейгелівській конференції “Microbiology on service for human” (Одеса, 2009); XII (Ужгород, 2009) і XIII (Ялта, 2013) з'їздах товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського; X (Одеса, 2010), XI (Київ, 2014) та XII (Тернопіль, 2019) Українському біохімічному конгресах; V, VII, IX та XII Міжнародній конференції молодих вчених “Молодь і поступ біології” (Львів, 2009, 2011, 2013 та 2016); V та VI конференції молодих вчених “Біорізноманіття. Екологія.

Адаптація. Еволюція” (Одеса, 2011, 2013); VIII конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, 2012); IV Міжнародній науковій конференції молодих вчених “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології” (Вінниця, 2016); V міжнародній конференції “Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології” (Київ, 2016); XX Європейській біоенергетичній конференції (Будапешт, Угорщина, 2018); науковому семінарі в Інституті біохімії О.В. Палладіна НАН України (Київ, 2019); звітно-наукових конференціях кафедри біохімії та біотехнології ДВНЗ «Прикарпатський національний університет ім. Василя Стефаника» (Івано-Франківськ, 2008–2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 48 робіт, з яких – 22 статті у фахових періодичних виданнях (з них 18 – у базі даних Scopus), 1 розділ монографії (індексується у Scopus) та 25 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з’їздів. Публікації за темою дисертації мають сумарний імпаکت-фактор 21,6 та отримали 138 цитувань у базі даних Scopus.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, трьох розділів результатів та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел (559 найменувань) та додатків. Робота викладена на 399 сторінках, з яких основний текст дисертації займає 285 сторінок. Робота містить 78 рисунків, 22 таблиці та 27 додатків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

В огляді літератури охарактеризоване старіння як біологічний феномен; наведені аргументи «за» і «проти» вільнорадикальної теорії старіння; розкрита роль гормезису і АФК у старінні; здійснене порівняння переваг та недоліків різних модельних організмів; охарактеризовано антиоксидантну систему та типи старіння у *S. cerevisiae*, а також особливості метаболізму та функціонального старіння *D. melanogaster*; розкриті уявлення про геропротектори; наведена характеристика антиоксидантних та прооксидантних властивостей рослинних фенолів; узагальнена доступна інформація про біологічні функції та механізми дії кверцетину, родіоли рожевої, АКГ та аргініну.

Матеріали та методи досліджень

Рослинна сировина: вміст фенольних речовин, про-/антиоксидантні властивості. У роботі використовувались плоди шипшини (*R. canina*) та трава звіробію (*H. perforatum*) від ПрАТ «Фармацевтична компанія «Віола» (Запоріжжя, Україна), кореневища родіоли рожевої (*R. rosea*) та тирличу жовтого (*G. lutea*), зібрані в Українських Карпатах. *R. rosea* та *G. lutea* є рідкісними видами у Україні, і тому, ймовірно, їх хімічний склад та фармакологічні властивості, досліджені не достатньо (Мещишен та ін., 2006; Грицик, 2007; Мосула та ін., 2014). Для експериментів готували водні рослинні екстракти шляхом півгодинної екстракції на киплячій водяній бані у співвідношенні 1:20 (г сухого матеріалу/мл). В отриманих екстрактах концентрацію фенольних речовин

визначали методом Фоліна-Чикольтеу (Singleton et al., 1999), а загальну антиоксидантну активність (ЗАА) – за знешкодженням катіон-радикалу ABTS⁺ (2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонату) (Erel, 2004) та H₂O₂ (Nourooz-Zadeh et al., 1994). Прооксидантні властивості екстрактів оцінювали за продукцією ними пероксиду гідрогену у 50 мМ калій-фосфатному буфері (КФБ) з різним значенням рН.

Схеми експериментів з використанням дріжджів *S. cerevisiae*. У роботі використали штами *S. cerevisiae*: YPH250 та похідні від нього штами, дефектні за різними ланками антиоксидантного захисту (наприклад, *Duap1*), надані доктором Й. Інуе (Київський університет, Японія), а також W303-1A та похідний від нього штам Wmsn2msn4, наданий доктором К. Кухлером (Віденський медичний університет, Австрія). У всіх експериментах дріжджі вирощували у живильному середовищі YPD, яке містило 2% глюкози, 2% пептону і 1% дріжджового екстракту, за умов аерації та 28 °С. Це середовище приймали як контрольне. Додатково у середовище вносили: 1) стерилізований водний екстракт з кореневища *R. rosea* – 2-50 мкл/мл середовища; 2) розчин динатрієвої солі альфа-кетоглутарату (АКГ) у концентраціях 100 мкм-10 мМ. У експериментах з преінкубацією з рослинними екстрактами, дріжджі вирощували у контрольному середовищі до досягнення експоненційної фази росту, переводили у свіже середовище з додаванням водних рослинних екстрактів або кверцетину та преінкубували протягом 2 год за 28 °С. Клітини дріжджів, які були попередньо проінкубовані з рослинними екстрактами або вирощені в експериментальних середовищах, піддавали впливу різних стресорів: пероксиду гідрогену, іонів перехідних металів, менадіону, оцтової кислоти, етанолу, вуглеводів, голодування, теплового стресу та заморожування-розморожування. До і після інкубації зі стресорами та за умов довготривалого вирощування в експериментальних середовищах визначали життєздатність дріжджів за фарбуванням метиленовим синім (Pand et al., 2007) та за здатністю утворювати колонії (Fabrizio and Longo, 2003). Метаболічну активність дріжджів визначали за здатністю відновлювати хлорид 2,3,5-трифенілтетразолію (Conconi et al., 2000). Респіраторні характеристики клітин визначали за допомогою кисневого електрода Кларка (Strathkelvin Instruments). Для визначення решти біохімічних показників, клітини дріжджів руйнували шляхом вібрації зі скляними кульками у середовищі гомогенізації, яке містило 50 мМ КФБ (рН 7,0) та 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ). Загальну неферментативну антиоксидантну активність супернатантів визначали за відновлення ABTS⁺ за 414 нм (Erel, 2004). Рівень α -дикарбонільних сполук (α -ДС) визначали за їх взаємодією з Т реагентом Жирара (Mitchel and Birnboim, 1977). Рівень карбонільних груп у білках (КБ) визначали за кількістю динітрофенілгідрозонів, які утворюються внаслідок взаємодії цих груп з 2,4-динітрофенілгідрозоном (Levine et al., 2000). Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали за ступенем інгібування реакції окислення кверцетину супероксид-аніоном за 406 нм (Семчишин та ін., 2005). Активність каталази (КФ 1.11.1.6)

визначали, реєструючи зміну поглинання світла H_2O_2 за 240 нм (Aebi, 1984). Активність аконітази (КФ 4.2.1.3) визначали за утворенням цис-аконітату з ізоцитрату (Hausladen and Fridovich, 1994). Активність глутамінсинтази (ГС, КФ 6.3.1.2) визначали колориметрично за кількістю утвореного фосфату внаслідок гідролізу АТФ у ході реакції синтезу глутаміну (Woolfolk et al., 1966). Активність NAD- і NADP-залежної глутаматдегідрогенази (ГДГ, КФ 1.4.1.2 і КФ 1.4.1.4) визначали, реєструючи окислення NAD(P)H за довжини хвилі 340 нм (Doherty, 1970). Активність глутатіонредуктази (ГР, КФ 1.6.4.2) визначали, реєструючи відповідно окислення NADPH за 340 нм (Lushchak et al., 2005). Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда (Bradford, 1976). Для визначення вмісту вільних амінокислот білки супернатанту осаджували додаванням 10%-ної трихлороцтової кислоти (ТХО). Загальний пул вільних амінокислот визначали за реакцією з нінгідрином (Lee and Takahashi, 1966) з використанням глутамінової кислоти як стандарту. Вміст проліну визначали за взаємодією з нінгідрином з утворенням комплексу рожево-червоного кольору за низьких рН (Bergman and Loxley, 1970). Рівень тіольних груп у низькомолекулярних сполуках та білках визначали неензиматичним методом Елмана (Ellman, 1959). Для визначення рівня низькомолекулярних тіолів (НМТ) високомолекулярні (ВМТ) тіоли осаджували 10%-ною ТХО. Вміст глюкози визначали глюкозооксидазним методом з використанням діагностичного набору Liquick Cor-GLUCOSE (P.Z. Cormay S.A., Польща). Вміст трегалози та глікогену визначали за кількістю вивільненої глюкози після розщеплення цих вуглеводів трегалазою та аміноглюкозидазою, відповідно (Parrou and Francosis, 1997). Для визначення здатності вуглеводів продукувати АФК *in vitro* розчини глюкози та фруктози інкубували в стерильних умовах у 50 мМ КФБ (рН 7,0) за 28 °С протягом 14 діб. Загальний рівень АФК у розчинах визначали за їх взаємодією з 2',7'-дихлорофлуоресцеїндацетатом з утворенням флуоресцентного дигідродихлорофлуоресцеїну (Abbot et al., 2009).

Схеми експериментів з використанням *D. melanogaster*. У роботі використали дві лінії *D. melanogaster*, Canton S та w^{1118} , отримані з Блумінгстонського центру університету Індіани (США). Мухи лінії Canton S – дикого типу, червоноокі, а лінії w^{1118} – білоокі через дефектність за геном *white*. Мух утримували за 25 °С, вологості 55-60% та регульованому фотоперіоді (12:12, день:ніч). Експериментальні культури вирощували на дріжджово-сахарозному середовищі наступного складу (на 100 мл): 5 г сухих пекарських дріжджів, 5 г сахарози, 1 г агару, та 1 мл 18%-го ніпагіну. Залежно від умов експерименту в середовище додатково вносили у різних концентраціях АКГ (як динатрієву сіль альфа-кетоглутарової кислоти), аргінін, етанол окремо та у суміші з АКГ. На приготуванні середовища мухи відкладали яйця, за розвитком яких вели моніторинг. По досягненню імаго дводенного віку їх розділяли за статтю з використанням анестезування CO_2 (або без анестезії) та використовували для фізіологічних тестів або для біохімічних аналізів. Кількість спожитої їжі визначали за кількістю спожитого разом з живильним середовищем харчового

барвника E133 (Lushchak et al., 2011). Індуковану рухову активність визначали за здатністю мух до негативного геотаксису (Jones and Grotewiel, 2011), реєструючи кількість комах у групі, які долали 5 см вгору за 20 секунд після струшування. Нетривалий тепловий або холододовий стрес викликає у мух температурну кому. Стійкість комах до холододового стресу оцінювали за реєстрацією часу відновлення з холододової коми (David et al., 1998), а стійкість до теплового стресу – за часом впадання у теплову кому. Стійкість до оксидативного стресу визначали, реєструючи загибель мух на середовищі з 5 % сахарозою, яке містило додатково H_2O_2 або суміш « H_2O_2 +АКГ». Плодючість оцінювали за кількістю яєць, які відклала одна самка протягом 24 год. Для визначення тривалості життя ~200 молодих мух поміщали у клітки об'ємом 1,5 л з отворами для пробірок із середовищем. Заміну середовищ і підрахунок мертвих мух здійснювали кожен 2-3 день.

Для біохімічних аналізів мух гомогенізували у співвідношенні 1:10 (маса/об'єм) в охолоджену 50 мМ КФБ (рН 7,0), який містив 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ ФМСФ, центрифугували та відбирали супернатанти. Загальну антиоксидантну активність, активності каталази, аконітази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, глютаматдегідрогенази, концентрації вільних амінокислот, проліну, протеїну та тіольних сполук визначали за методиками, які були описані вище для дріжджів. Активність алкогольдегідрогенази (АДГ, КФ 1.1.1.1) визначали, реєструючи відновлення NAD^+ за довжини хвилі 340 нм (Oudman et al., 1991). Нативний електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) проводили відповідно до (Davis, 1964). Смуги АДГ детектували на гелі відповідно до процедури, описаної Jacobson та співавторами (Jacobson et al., 1972) з використанням нітроголубого тетразолію. Концентрацію нітритів визначали за взаємодією їх з реактивом Гріса (Privat et al. 1997). Концентрацію пероксидів ліпідів визначали за окисненням пероксидами ліпідів іонів Fe^{2+} за низьких значень рН до Fe^{3+} , який утворює забарвлений комплекс з ксиленолом оранжевим (Hermes-Lima et al., 1995). Концентрацію глюкози та триацилгліцеридів (ТАГ) визначали з використанням діагностичних наборів «P.Z. Cormay S.A.» (Польща).

Статистичну обробку здійснювали за допомогою програми “Mynova”, використовуючи t-критерій Стюдента та однофакторний дисперсійний аналіз (тести Даннета та Стюдента-Ньюмена-Келса). Для порівняння параметрів за впливу двох змінних факторів використовували також двофакторний дисперсійний аналіз (Origin 8.5 SR1 software). Криві тривалості життя порівнювали за лог-ранк тестом (R version 3.2.4 software). Дані представлені як середні значення 3-10 незалежних визначень \pm похибка середнього, $M \pm m$.

Результати досліджень та їх обговорення

1. Стрес-протекторні властивості деяких лікарських трав та кверцетину

1.1. Антиоксидантні та прооксидантні властивості водних екстрактів лікарських рослин. У першій серії експериментів визначали вміст фенольних речовин та про-/антиоксидантні властивості водних екстрактів чотирьох

лікарських рослин. Найвищу концентрацію фенольних речовин виявлено у водних екстрактах з плодів *R. canina* (437 ± 172 мкг-екв галової кислоти/мл), а найнижчу – у екстрактах з кореня *G. lutea* (231 ± 31 мкг-екв галової кислоти/мл); екстракти *R. rosea* та *H. perforatum* зайняли проміжне положення, демонструючи на 20 та 47% нижчий вміст фенольних речовин, порівняно з *R. canina*. Найвищу антиоксидантну активність (за здатністю відновлювати $ABTS^{+}$ -радикал) демонстрували водні екстракти з плодів шипшини, а найнижчу – екстракти тирличу жовтого (рис. 1А).

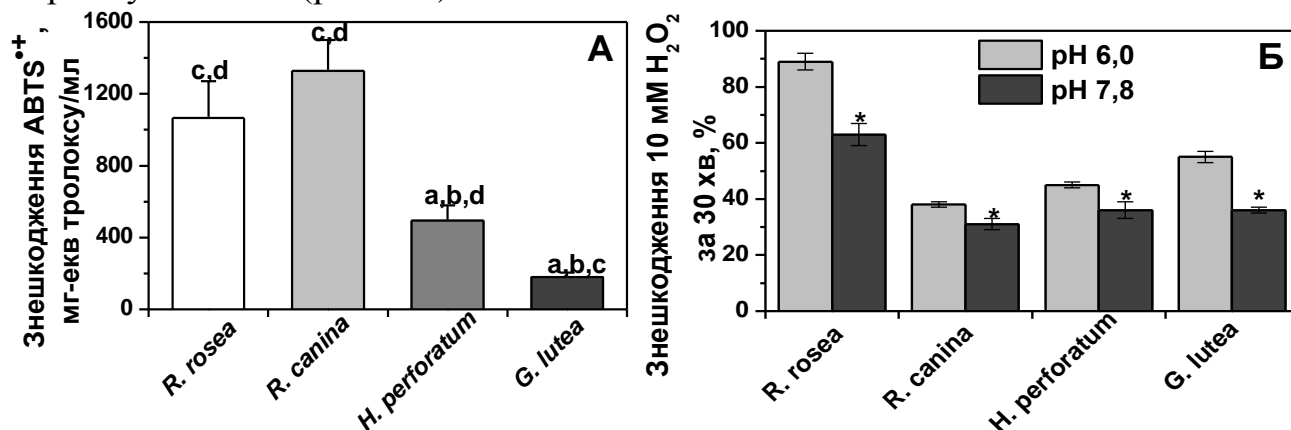


Рис. 1. Сумарна антиоксидантна активність у водних рослин за знешкодженням $ABTS^{+}$ (А) та H_2O_2 (Б). ^aВідмінне від значень для *R. rosea*, ^bвід значень для *R. canina*, ^cвід значень для *H. perforatum*, ^dвід значень для *G. lutea*, $P < 0,05$ за тестом Стьюдента-Ньюмена-Келса, $n = 5-6$.

Була знайдена позитивна кореляція між рівнем загальних фенолів та здатністю знешкоджувати $ABTS^{+}$ ($R^2 = 0,963$). Це свідчить про те, що антиоксидантна здатність рослинних екстрактів значною мірою залежить від вмісту у цих екстрактах фенольних речовин.

Оскільки рН середовища може впливати на автоокислення рослинних фенолів (Dai and Mumper, 2010), нами була протестована здатність наших екстрактів знешкоджувати та продукувати H_2O_2 за різних значень рН: знешкоджувальна активність рослинних екстрактів була суттєво вищою за рН 6,0, ніж за рН 7,8 (рис. 1Б). Продукція H_2O_2 була суттєво вищою за високих рН, ніж за низьких (рис. 2); окрім того, рослинні екстракти з вищим вмістом фенольних речовин продукували більше H_2O_2 .

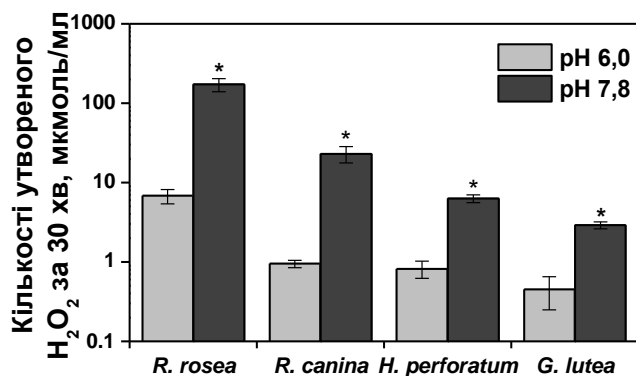


Рис. 2. Вплив рН середовища інкубації на здатність водних екстрактів рослин продукувати H_2O_2 (на мл екстракту). *Відмінне від відповідного значення за рН 6,0, $P < 0,05$ за тестом Стьюдента, $n = 5-6$.

Нижча антиоксидантна активність рослинних екстрактів за високих рН була підтверджена в експериментах *in vivo*: рослинні екстракти ефективно підвищували виживання дріжджів *S. cerevisiae* за обробки H_2O_2 у кислих середовищах, але не в лужних (дані не наведено).

Отримані результати показують, що рослинні препарати можуть проявляти як антиоксидантні, так і прооксидантні властивості, які значною мірою залежать від вмісту фенольних речовин у препаратах; у лужному середовищі прооксидантна активність рослинних препаратів посилюється. Оскільки екстракт родіоли рожевої проявляв найвищу прооксидантну активність, а з прооксидантними властивостями пов'язують захисну дію низьких концентрацій фенольних речовин, для подальших експериментів була обрана власне *R. rosea*.

1.2. Адаптогенний та геропротекторний вплив екстрактів *R. rosea* на *S. cerevisiae*. Для дослідження захисних властивостей *R. rosea* дріжджі *S. cerevisiae* вирощували (або преінкубували) у присутності водних екстрактів з кореневища цієї рослини. Екстракт *R. rosea* у залежний від концентрації спосіб підвищував стійкість до дії низки стресорів, зокрема до дії пероксиду гідрогену (рис. 3), та продовжував тривалість життя культур дріжджів (рис. 4).

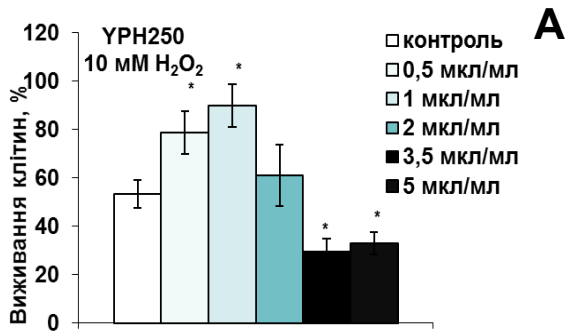


Рис. 3. Вживання клітин *S. cerevisiae* YRH250, відібраних у експоненційній фазі росту і яких піддавали дії H_2O_2 протягом 1 год після попередньої інкубації з водними екстрактами *R. rosea* протягом 2 год. *Відмінне від контрольного значення, $P < 0,05$ за тестом Даннета, $n = 4-6$.

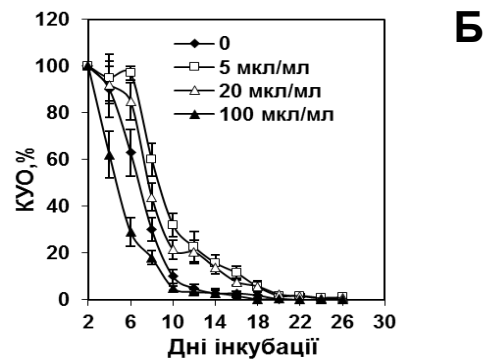


Рис. 4. Репродуктивна здатність (здатність утворювати колонії) *S. cerevisiae* YRH250 за довготривалого інкубування у дистильованій воді з додаванням екстракту *R. rosea* у різних концентраціях, $n = 4-6$. За 100% колонієутворювальних одиниць (KYU) приймали кількість KYU на 2-гу добу культивування.

У випадку стресу, який викликали H_2O_2 , преінкубація з низькими концентраціями екстракту *R. rosea* підвищувала виживання дріжджів (рис. 3), запобігала зниженню активності СОД і каталази та зростанню вмісту карбонільних груп у протеїнах за обробки цим оксидантом (рис. 5).

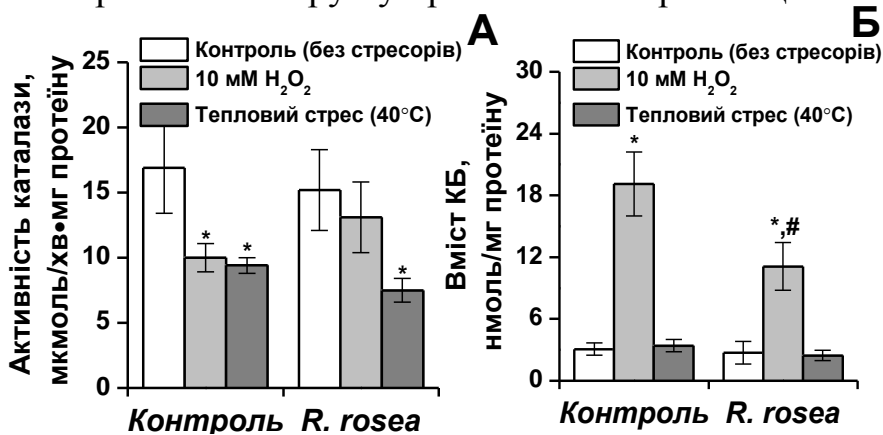


Рис. 5. Активність каталази (А) та рівень карбонільних груп (КБ) у протеїнах (Б) дріжджів *S. cerevisiae* YRH250, які були попередньо проінкубовані з водним екстрактом *R. rosea* (1 мкл/мл) протягом 2 год та піддані дії стресорів протягом 1 год. *Відмінне від значення без обробки стресорами, # від значення без екстракту *R. rosea*, $P < 0,05$, тест Стьюдента, $n = 4-6$.

За високих концентрацій екстракт *R. rosea* посилював чутливість *S. cerevisiae* до стресорів, що виражалось у зниженні виживання клітин (рис. 3) та інактивації антиоксидантних ферментів

під дією H_2O_2 , та призводив до скорочення тривалості життя дріжджів (рис. 4). Подібні ефекти *R. rosea* були знайдені на нематодах та плодовій мушці (Wiegant et al., 2009; Gospodaryov et al., 2013).

Стресову відповідь у дріжджів регулюють низка транскрипційних факторів, серед них протеїни Msn2/Msn4, які відповідальні за загальну стресову відповідь, та протеїн Yap1, який викликає адаптивну відповідь на дію H_2O_2 (Costa and Moradas-Ferreira; Semchyshyn, 2009). Захисні ефекти екстракту *R. rosea* не проявлялись у мутантних штамів дріжджів, дефектних за генами *MSN2*, *MSN4* і *YAP1*, які кодують відповідні регулятори стресової відповіді (табл. 1). Це свідчить про можливе залучення транскрипційних факторів Msn2/Msn4 і Yap1, а отже і змін в експресії генів, у реалізацію адаптогенних ефектів *R. rosea*.

Таблиця 1

Вживання (%) *S. cerevisiae*, попередньо проінкубованих з водними екстрактами *R. rosea* протягом 2 год, за дії 10 мМ H_2O_2 протягом 1 год

Штам	Концентрація водного екстракту <i>R. rosea</i> , мкл/мл середовища		
	0	1	5
$\Delta yap1$	39±6	32±7	30±6
$\Delta msn2\Delta msn4$	5±2	3±1	3±1

Примітка. *Відмінне від відповідного значення в контролі (без обробки екстрактом *R. rosea*), $P < 0,05$ за тестом Даннета, $n = 4-6$.

1.3. Захисна дія кверцетину у *S. cerevisiae* за впливу різних стресорів.

Кверцетин – рослинний флавоноїд з відомими антиоксидантними властивостями (Kelly, 2011). Попередня інкубація з кверцетином за низьких концентрацій (10 мкМ) підвищувала виживання *S. cerevisiae* за дії низки стресорів, зокрема H_2O_2 (рис. 6А), запобігала зростанню рівня окислених протеїнів у дріжджів за впливу H_2O_2 (рис. 6Б), але не посилювала потужність антиоксидантного захисту (рис. 6В). Відсутність транскрипційних регуляторів Msn2/Msn4, але не регулятора Yap1, та інгібування біосинтезу протеїнів циклогексимідом скасовували захисні ефекти кверцетину (рис. 6А, табл. 2).

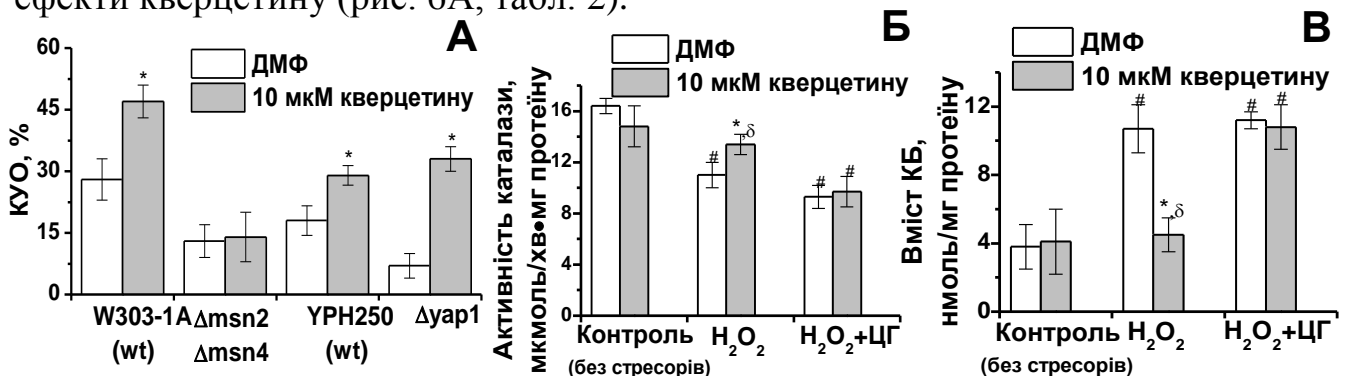


Рис. 6. Вплив H_2O_2 на виживання різних штамів *S. cerevisiae* (А), активність каталази (Б) та рівень карбонільних груп (КБ) у протеїнах (В) *S. cerevisiae* YPH250, яких преінкубували з кверцетином (10 мкмоль/л) протягом 2 год без та у присутності циклогексиміду (ЦГ). ДМФ (диметилформамід) – контроль для кверцетину. *Відмінне від відповідного значення без кверцетину (з ДМФ), #від відповідного контрольного значення (без стресорів), δ від відповідного значення у групі «10 мМ H_2O_2 +ЦГ», $P < 0,05$, $n = 5-6$.

Вплив інкубації з 10 мМ Н₂О₂ протягом 1 год на активність каталази та рівень КБ у клітинах *S. cerevisiae*, преінкубованих з кверцетином у відсутності чи присутності циклогексиміду (100 мкг/мл) протягом 2 год

Штам	Умови	Активність каталази, мкмоль•хв/мг протеїну		КБ, нмоль/мг протеїну	
		ДМФ	10 мкМ кверцетину	ДМФ	10 мкМ кверцетину
Дуар1	Контроль (без Н ₂ О ₂)	10,5±1,0	НВ	6,4±0,9	НВ
	10 мМ Н ₂ О ₂	7,1±0,7 [#]	11,4±0,7 ^{*,δ}	10,7±1,1 [#]	6,7±1,2 ^{*,δ}
	10 мМ Н ₂ О ₂ +ЦГ	НВ	5,2±1,7 [#]	10,7±1,1	11,8±2,0 [#]
Δmsn2Δmsn4	Контроль (без Н ₂ О ₂)	8,8±1,2	НВ	1,4±0,3	НВ
	10 мМ Н ₂ О ₂	0,32±0,08 [#]	0,31±0,03 [#]	5,9±1,5 [#]	4,1±1,2 [#]

Примітки. *Відмінне від відповідних контрольних значень (без кверцетину), [#]від відповідних значень клітин, не підданих дії стресорів, ^δвід відповідних значень групи “10 мМ Н₂О₂+ЦГ”, Р < 0,05 за тестом Стьюдента, n = 4-6. НВ – не визначали.

Таким чином, у клітинах дріжджів кверцетин діє не лише як антиоксидант, а модулює активність транскрипційних регуляторів Msn2/Msn4.

У підсумку, захисна дія водних рослинних екстрактів та кверцетину за впливу стресорів на *S. cerevisiae* має такі особливості (рис. 7): 1) рослинні екстракти діють як антиоксиданти у відносно високих концентраціях – за умов сумісної обробки зі стресорами, які індукують підвищення продукції АФК, та за низьких значень рН; 2) за зсуву рН до лужних значень посилюються прооксидантні властивості і захисна дія екстрактів знижується; 3) незначна прооксидантна активність рослинних препаратів може забезпечувати активацію транскрипційних факторів, які запускають загальну стресову відповідь.

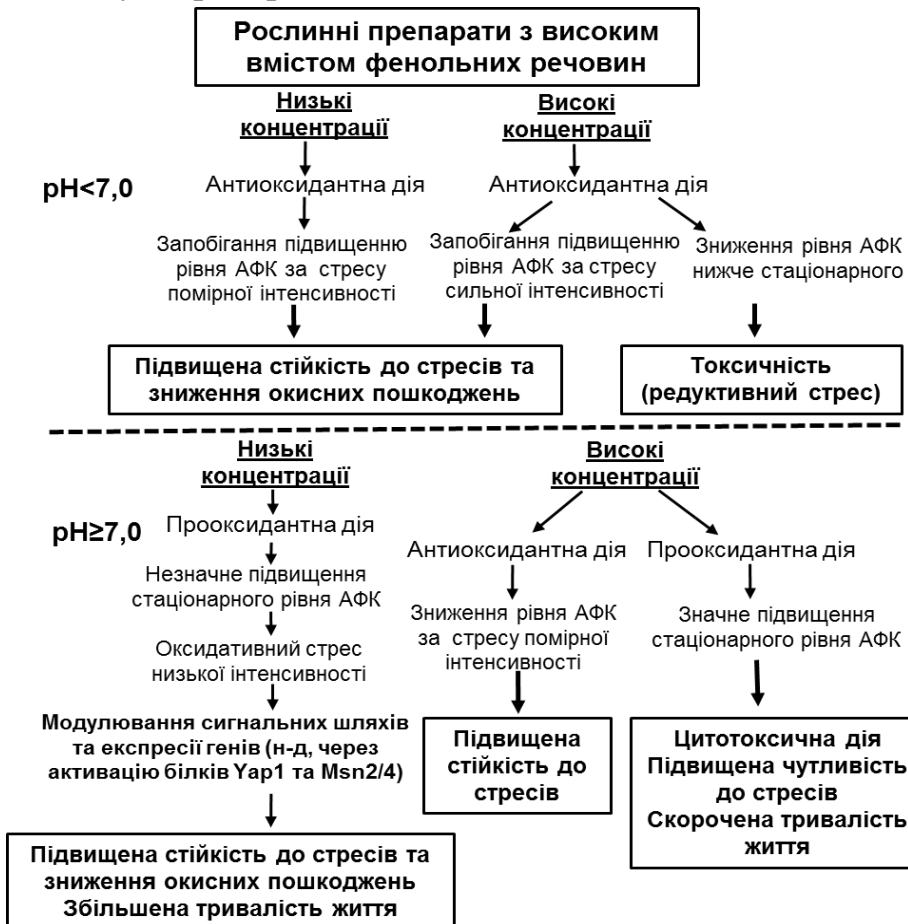


Рис. 7. Прооксидантні та антиоксидантні ефекти окремих фенольних сполук або рослинних екстрактів з високим вмістом фенольних речовин у дріжджів *S. cerevisiae* за різних значень рН середовища.

2. Вплив альфа-кетоглутарату на стійкість до стресів, тривалість життя та метаболічні процеси у *S. cerevisiae*.

2.1. Антиоксидантні властивості альфа-кетокислот. Окрім участі у енергетичному метаболізмі, інтермедіати ЦТК можуть мати інші важливі фізіологічні функції (Frezza, 2017). Ми зосередили увагу на вивченні властивостей альфа-кетоглутарату. Подібно до інших альфа-кетокислот, пірувату та оксалоацетату (ОА), АКГ демонстрував антиоксидантну активність *in vitro* та *in vivo*. За результатами чотирьох методів визначення антиоксидантної активності (відновлення Fe^{3+} , знешкодження катіон-радикалу $\text{ABTS}^{\bullet+}$, H_2O_2 та HO^\bullet), найбільш ефективно кетокислоти знешкоджували H_2O_2 (рис. 8). Водночас, АКГ виявився більш потужним знешкоджувачем H_2O_2 і HO^\bullet *in vitro*, ніж інші кетокислоти.

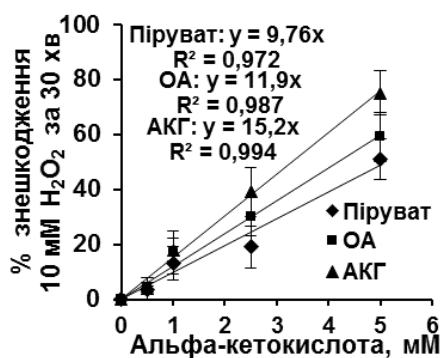


Рис. 8. Знешкодження H_2O_2 водними розчинами альфа-кетокислот, $n = 5$.

В експериментах *in vivo* кетокислоти суттєво послаблювали летальну дію H_2O_2 та іонів Fe^{2+} на *S. cerevisiae*, але не запобігали загибелі дріжджів за дії менадіону, сполуки, здатної генерувати $\text{O}_2^{\bullet-}$ (дані не наведені). Це свідчить про певну специфічність антиоксидантної дії альфа-кетокислот.

2.2. Стійкість до стресів у клітин *S. cerevisiae* за вирощування у присутності АКГ. У наступній серії експериментів було досліджено, як впливає на адаптаційну здатність дріжджів культивування у середовищі, яке було збагачене АКГ. Вирощування на середовищі з 10 мМ АКГ підвищувало стійкість *S. cerevisiae* YPH250 до дії H_2O_2 (рис. 9А) та заморожування-розморожування (рис. 9Б). Клітини штаму YPH250, які росли на середовищі з АКГ, не відрізнялись за вмістом трегалози, але мали вищий пул вільних амінокислот та проліну, ніж клітини у контрольних культурах (табл. 3). Вищий вміст вільних амінокислот у дріжджів, вирощених на АКГ, супроводжувався вищими активностями ензимів метаболізму амінокислот.

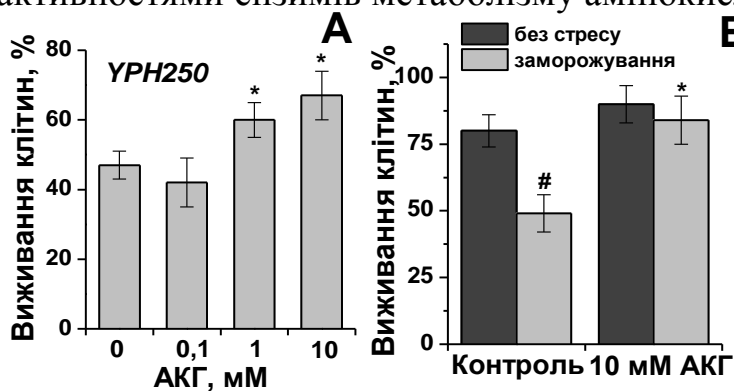


Рис. 9. Вживання *S. cerevisiae* YPH250, яких вирощували без або у присутності АКГ, а потім піддавали дії 10 мМ H_2O_2 протягом 30 хв (А) або 2-годинного заморожування (Б). *Відмінне від контрольних значень та #від значень клітин, яких не піддавали заморожуванню-розморожуванню, $P < 0,05$, $n = 5-6$.

Клітини дріжджів, вирощені на середовищі з 10 мМ АКГ, також мали вищі значення загальної метаболічної активності, загальної неензиматичної антиоксидантної активності, активності каталази та глутатіонредуктази та вищий

рівень низькомолекулярних тіолів, ніж клітини у контрольній культурі (табл. 3). Загалом, отримані результати свідчать про активацію синтезу амінокислот та антиоксидантного захисту у дріжджів за вирощування на середовищі з АКГ. Посилення антиоксидантного захисту може зумовлювати вищу стійкість дріжджів як до H_2O_2 , так і до заморожування-розморожування, оскільки процес розморожування супроводжується підвищеною продукцією АФК (Park et al., 1998). Вищий вміст амінокислот, зокрема проліну, теж може робити внесок у вищу стійкість до заморожування, оскільки такі амінокислоти як глютамат та пролін мають кріопротекторні властивості (Takagi and Shima 2015).

Таблиця 3

Деякі біохімічні показники у *S. cerevisiae* YPH250, вирощених протягом 18 год у контрольному середовищі та середовищі, яке містило 10 мМ АКГ

Параметр	Контроль	10 мМ АКГ
Трегалоза, мкг/10 ⁶ клітин	0,056±0,006	0,060±0,009
Вільні амінокислоти, мкмоль-екв глу/10 ⁶ кл.	24,3±1,2	32,3±1,3*
Пролін, мкмоль/10 ⁶ клітин	0,228±0,038	0,389±0,041*
Активність NAD-ГДГ, нмоль/хв×мг протеїну	96,0±4,4	117±11*
Активність NADP-ГДГ, нмоль/хв×мг протеїну	25,7±3,2	44,0±5,9*
Активність глютамінсинтази, нмоль/хв×мг протеїну	31,7±3,8	47,2±3,5*
Метаболічна активність, ОГ ₄₈₅ /10 ⁸ клітин	0,256±0,020	0,327±0,008*
ЗАА, мкмоль-екв тролоксу/ мг протеїну	3,72±0,22	4,44±0,2*
СОД, Од/мг протеїну	187±13	185±18
Каталаза, мкмоль/хв×мг протеїну	4,91±0,54	8,02±1,32*
КБ, нмоль/мг протеїну	1,89±0,23	1,48±0,48
Активність глютатіонредуктази, нмоль/хв×мг протеїну	25,3±3,9	85,0±17,1*
НМТ, нмоль/10 ⁸ клітин	20,3±1,8	32,7±1,9*

Примітка. *Відмінне від відповідних контрольних значень, P < 0,05 за тестом Стьюдента, n = 5-6.

2.3. Захисна дія АКГ за стресу під впливом вуглеводів. За відсутності інших поживних речовин моносахариди (глюкоза або фруктоза) навіть в оптимальних для росту *S. cerevisiae* концентраціях (2%) спричиняють швидку загибель клітин дріжджів (Granot et al. 2003). Однією з причин цього може бути те, що у водних розчинах вуглеводи можуть зазнавати автоокислення з утворенням АФК, що підтверджено нами визначенням продукції АФК у стерильних розчинах 100 мМ глюкози та фруктози за тривалого інкубування (дані не наведено). Як і очікувалось, життєздатність дріжджів суттєво знижувалася за інкубації в розчинах глюкози та фруктози, порівняно з контрольними умовами – інкубацією у дистильованій воді (рис. 10). Проте клітини дріжджів краще виживали за інкубації у розчинах глюкози або фруктози з одночасним додаванням АКГ, ніж у розчинах чистих вуглеводів. Інкубація в розчинах 2% глюкози або фруктози суттєво знижувала дихання дріжджів (рис.11). Це може пояснюватись як явищем катаболічної репресії за впливу

вуглеводів (Gancedo, 1998), так і порушенням роботи мітохондрій (Granot et al., 2003).

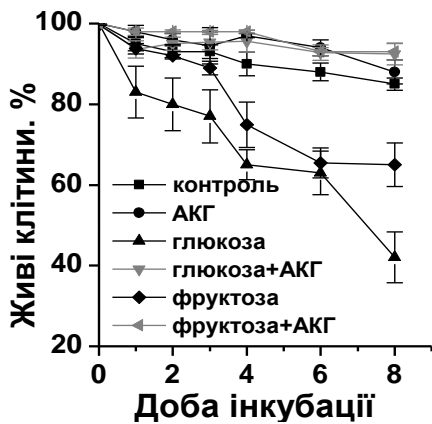


Рис. 10. Часова динаміка виживання дріжджів *S. cerevisiae* УРН250 за інкубації у дистильованій воді (контроль) або у водних розчинах 2% глюкози або 2% фруктози окремо або у комбінації з 10 мМ АКГ. n = 4-6.

За сумісної інкубації з вуглеводами та АКГ, клітини дріжджів споживали кисень значно інтенсивніше, що свідчить про те, що АКГ інтенсифікує мітохондріальне дихання (рис. 11).

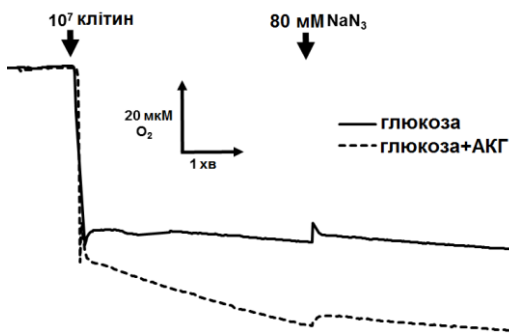


Рис. 11. Дихання клітин *S. cerevisiae* УРН250, проінкубованих протягом 3 днів у дистильованій воді з додаванням 2% глюкози або 2% глюкози + 10 мМ АКГ. Наведені дані типового експерименту.

На підтвердження цих результатів, активність аконітази була на ~50% нижчою в клітинах, інкубованих у розчинах 2% глюкози або 2% фруктози, порівняно з клітинами з контрольних умов (рис. 12А). Водночас, активність аконітази не відрізнялась від контрольних значень для клітин, інкубованих у розчинах, що містили вуглеводи разом з АКГ.

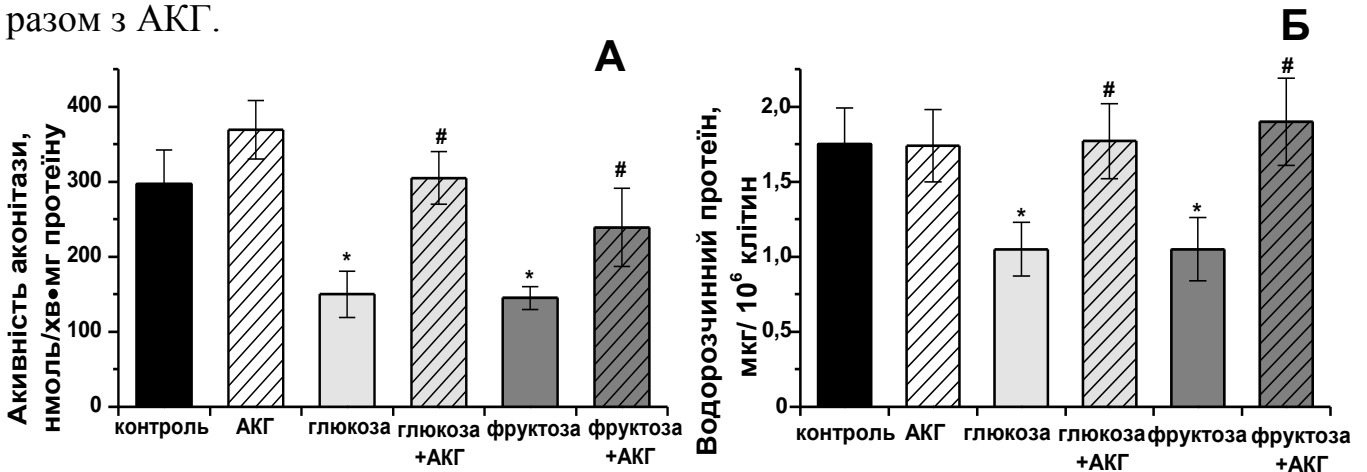


Рис. 12. Активність аконітази (А) та вміст водорозчинного протеїну (Б) у клітинах *S. cerevisiae* УРН250, інкубованих протягом 3 днів у дистильованій воді (контроль) або у воді з додаванням: 10 мМ АКГ, 2% глюкоза, 2% глюкоза + 10 мМ АКГ, 2% фруктоза, 2% фруктоза + 10 мМ АКГ. *Відмінне від відповідних контрольних значень, #від відповідних значень за інкубації на відповідному вуглеводі, P < 0,05, n = 4-8.

Індукована вуглеводами загибель дріжджів супроводжується деградацією білків (Granot et al., 2003). Клітини дріжджів, проінкубовані у дистильованій воді та в розчині 10 мМ АКГ, не відрізнялись за пулом вільних амінокислот та вмістом загального протеїну, але ці показники були суттєво нижчими в клітинах, які інкубували з вуглеводами (рис. 12Б). Інкубація дріжджів у розчинах, які містили вуглеводи та АКГ, зумовлювала нижчий рівень вільних амінокислот, але

вищий вміст протеїну, порівняно з інкубацією у розчинах чистих вуглеводів (рис. 12Б). Альфа-дикарбонільні сполуки разом з АФК є проміжними продуктами неферментативного глікозилювання/ автоокислення моносахаридів (Semchyshyn et al. 2011). Інкубація у розчинах моносахаридів зумовлювала зростання рівня α -дикарбонілів у клітинах дріжджів, і у випадку глюкози цей ефект не послаблювався додаванням АКГ (дані не наведені).

Отже, захисні ефекти екзогенного АКГ за токсичності під впливом вуглеводів, ймовірно, пов'язані з інтенсифікацією мітохондріального дихання, а також з стимуляцією білкового метаболізму.

2.4. Вплив АКГ на метаболічні процеси та виживання *S. cerevisiae* за умов тривалого культивування. Довготривале культивування у середовищі, яке містило АКГ, запобігало втраті проліферативного потенціалу клітинами у старих культурах (рис. 13А). Вміст водорозчинного протеїну, запасних вуглеводів (трегалози та глікогену), зростав у клітинах дріжджів протягом культивування на контрольному та АКГ-вмісному середовищах (рис. 13Б).

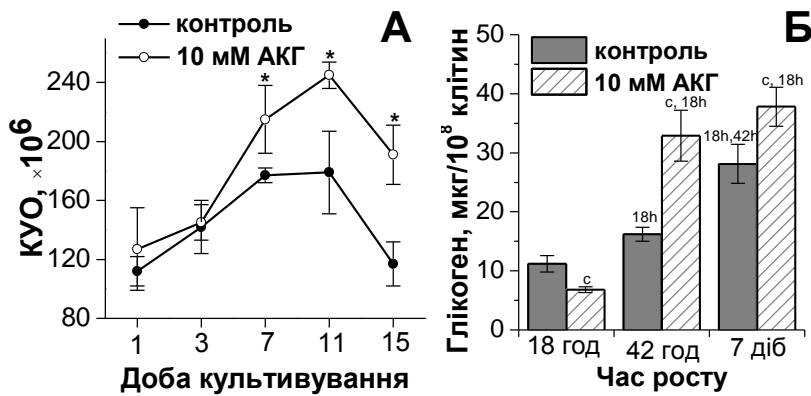


Рис. 13. Кількість репродуктивно активних клітин (КУО) (А) та вміст глікогену (Б) у клітинах *S. cerevisiae* YRH250 за вирощування без і у присутності 10 мМ АКГ. ^cВідмінне від відповідних контрольних значень, ^{18h}від відповідних значень на 18 год росту та ^{42h}на 42 год росту, P < 0,05, n = 5-7.

Водночас, культивування у середовищі з АКГ зумовлювало вищий рівень протеїну та запасних вуглеводів. Тривале культивування (7 діб) призводило до зростання вмісту низькомолекулярних тіолів та карбонільних груп у протеїнах (рис. 14). Ці зміни були більш виражені у контрольних культурах, ніж у культурах з АКГ.

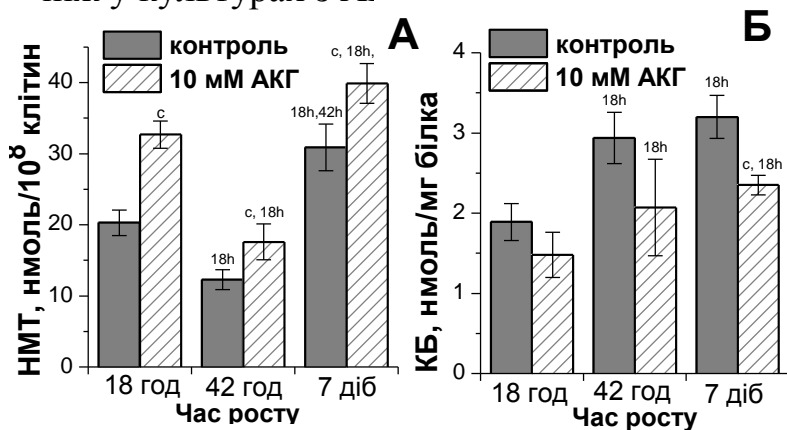


Рис. 14. Рівень низько-молекулярних тіолів (А) та карбонільних груп у протеїнах (Б) дріжджів *S. cerevisiae* YRH250 за вирощування без і з додаванням 10 мМ АКГ. Статистика, як на рис. 14, n = 5-7.

Вищий рівень загального протеїну і запасних вуглеводів, а також посилення антиоксидантного захисту в клітинах, вирощених у середовищі з АКГ варто розглядати як сприятливі зміни, що можуть сповільнювати старіння дріжджів.

3. Вплив альфа-кетоглютарату на стійкість до токсикантів, функціональне старіння, метаболізм та тривалість життя *D. melanogaster*

3.1. Альфа-кетоглутарат підвищує стійкість *D. melanogaster* до етанолу та оксидативного стресу. Щоб перевірити, чи може АКГ як антиоксидант захищати мух, визначили виживання дорослих мух лінії Canton S за впливу H_2O_2 , який додавали окремо та разом з АКГ. Утримування на середовищі лише з 1 М H_2O_2 знижувало виживання як самців, так і самок. Додавання АКГ послаблювало токсичні ефекти H_2O_2 у залежний від концентрації спосіб (дані не наведені). Отримані ефекти пояснюються власне антиоксидантною дією АКГ – безпосередньою реакцією з H_2O_2 з утворенням нетоксичних сполук. Розвиток оксидативного стресу є важливим механізмом ембріотоксичної дії етанолу у ссавців та плодової мушки (Logan-Garbisch et al., 2015). Тому було досліджено здатність АКГ послаблювати токсичність етанолу у *D. melanogaster*. Споживання середовища з 8%-ним етанолом сповільнювало заляльковування, а також зменшувало загальну кількість утворених лялечок у лінії w^{1118} (92 ± 4 до $62\pm 3\%$). Додавання до їжі АКГ у концентрації 10 мМ частково послаблювало токсичність етанолу, що відображалось у кращому виживанні комах (виживання зросло з $62\pm 3\%$ до $80\pm 6\%$).

У *D. melanogaster* понад 90% спожитого етанолу окислюється алкогольдегідрогеназою (АДГ) (Geer et al., 1993). Дорослі мухи, вирощені на етанолі та АКГ, мали вищу активність АДГ, порівняно з особинами, які споживали середовище лише з етанолом (рис. 15А). Встановлено, що АКГ у присутності етанолу призводить до перерозподілу конформаційних форм АДГ з формуванням більш активної форми АДГ5 (рис. 15Б).

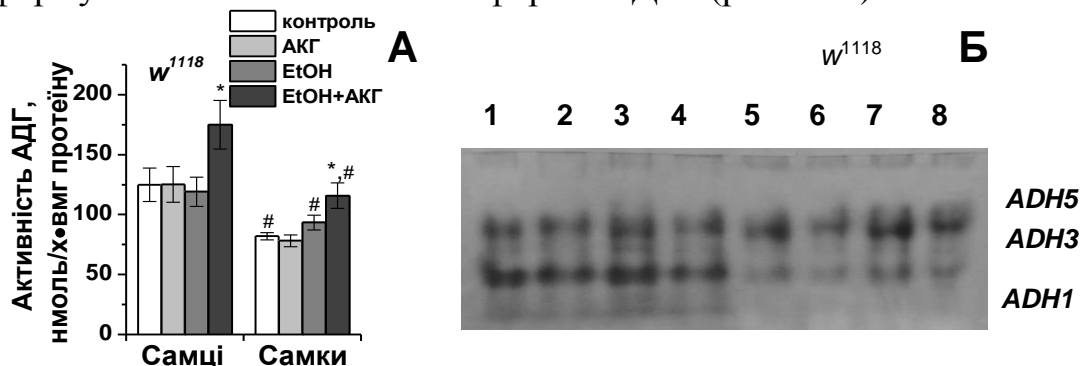


Рис. 15. Активність алкогольдегідрогенази (А) та електрофореграма форм АДГ (Б) у 2-денних мух *D. melanogaster*, вирощених на контрольному середовищі та середовищах, які містили 8% етанол або суміш “8% етанол + 10 мМ АКГ”. Позначення доріжок: 1 – самці, контроль, 2 – самка, контроль, 3 – самці, АКГ; 4 – самки, АКГ; 5 – самці, EtOH; 6 – самки, EtOH; 7 – самці, АКГ+EtOH; 8 – самки, АКГ + EtOH. *Відмінне від значень у відповідній контрольній групі за тестом Даннета, # від відповідних значень у самців за тестом Стьюдента, $P < 0,05$, $n = 4-5$.

Мухи, вирощені на середовищі з етанолом окремо або у суміші з АКГ, мали також вищий рівень триацилгліцеридів (ТАГ) (табл. 4), що можна розглядати як один із захисних механізмів проти токсичності етанолу (Geer et al., 1986). Вирощування на етанолі забезпечувало вищу активність каталази у самців та нижчий вміст високомолекулярних тіолів (ВМТ) у мух обох статей, тоді як додавання АКГ до середовища з етанолом зумовлювало вищий рівень низькомолекулярних тіолів (НМТ) у самок, порівняно з контрольними мухами

(табл. 4). Таким чином, захисна дія АКГ проти токсичності етанолу реалізується через стимуляцію активності АДГ, синтезу ТАГ та збільшення антиоксидантної потужності у тілі мух.

Таблиця 4

Деякі біохімічні показники у дводенних особин *D. melanogaster* w¹¹¹⁸, вирощених на контрольному середовищі та середовищах, які містили додатково 8% етанол або суміш “8% етанол + 10 мМ АКГ”

Умови	ТАГ, мг/г.с.м.		Активність каталази, мкмоль/хв×мг протеїну		ВМТ, мкмоль/г.с.м.		НМТ, мкмоль/г.с.м.	
	Самці	Самки	Самці	Самки	Самці	Самки	Самці	Самки
Контроль	НВ	5,20±0,45	0,83±0,07	0,98±0,06	5,33±0,12	5,6±0,62	0,96±0,18	0,74±0,10
EtOH	НВ	3,53±0,57	0,81±0,11	0,82±0,09	3,24±0,41*	2,8±0,33*	0,92±0,12	1,01±0,09
EtOH+АКГ	НВ	4,23±1,05	1,47±0,16*#	1,35±0,21*#	3,12±0,40*	4,24±0,46	0,97±0,04	1,61±0,30*#

Примітка. *Відмінне від значень у відповідній контрольній групі та #від відповідних значень у мух, вирощених на EtOH, тестом Стьюдента-Ньюмена-Келса, $P < 0,05$, $n = 4-7$. НВ – не визначали.

3.2. Ефекти АКГ у молодих мух: підвищена стійкість до холодового стресу, активація антиоксидантної системи та залежні від статі зміни вмісту основних метаболітів

3.2.1. Стійкість до холодового стресу. Для оцінки ефектів АКГ на стійкість до холодового стресу мухи лінії Canton S розвивались на середовищі, яке містило різні концентрації АКГ. Стійкість до холодового стресу визначали за часом відновлення з холодової коми (David et al., 1998), який модифікувався АКГ і залежав від його концентрації в середовищі (дані не наведені): мухи, вирощені за низьких (1 мМ) і високих концентрацій АКГ (20 мМ), не відрізнялись за стійкістю від контрольних мух. Водночас, помірні концентрації АКГ (5 і 10 мМ) знижували час виходу з холодової коми, що свідчить про вищу стійкість до холодового стресу.

3.2.2. Стан антиоксидантної системи та вміст деяких метаболітів у молодих мух, вирощених на АКГ. Для з'ясування механізмів захисної дії АКГ ми визначили низку показників про-/антиоксидантного статусу у 2-денних мух лінії Canton S, яких вирощували на середовищі з 10 мМ АКГ. Споживання їжі з АКГ не впливало на активність каталази у самок, але призводило до вищої активності цього ензиму у самців (дані не наведено). Самці і самки, вирощені на АКГ, мали вищий рівень НМТ (рис. 16А) та нижчий рівень пероксидів ліпідів (рис. 16Б), порівняно з контрольними особинами. Загалом, результати вказують на те, що АКГ підвищував потужність антиоксидантного захисту у молодих мух з більш вираженим ефектом у самців. Вирощування на середовищі з АКГ призводило до нижчого вмісту ТАГ у самців та самок, порівняно з контрольними комахами (рис. 16В). Водночас, АКГ не впливав на рівень загального протеїну та вільного проліну у самців, але зумовлював вищий вміст протеїну та проліну у самок (рис. 16Г). Загалом, як посилення антиоксидантного захисту, так і зростання синтезу амінокислот, зокрема проліну, можуть бути важливими

механізмами, за якими АКГ надавав вищу стійкість молодих мух до холодого стресу.

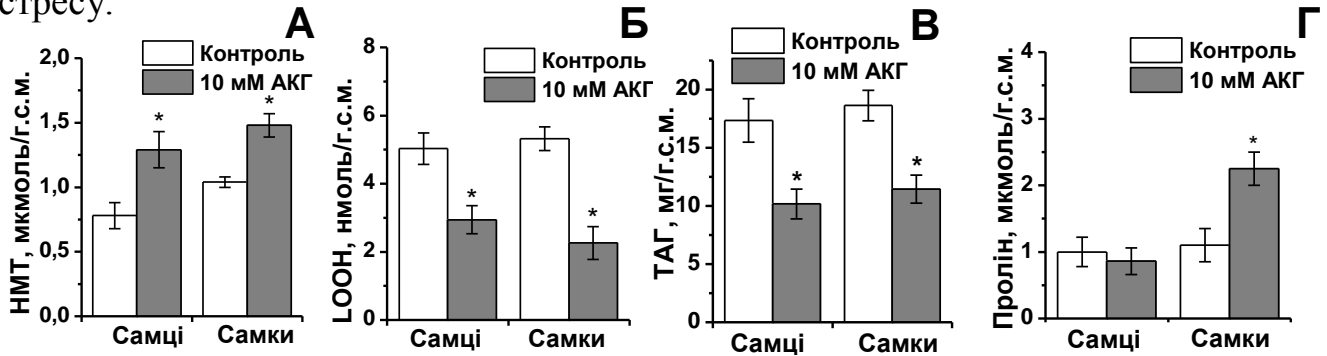


Рис. 16. Рівень низькомолекулярних тіолів (А), пероксидів ліпідів (Б), триацилгліцеридів (В) та проліну (Г) у 2-денних мух *D. melanogaster* Canton S, яких вирощували на контрольній середовищі та середовищі, яке містило 10 мМ АКГ. *Відмінне від відповідного значення контрольної групи, $P < 0,05$ за тестом Стьюдента, $n = 5-7$.

3.3. Харчовий АКГ сповільнює функціональне старіння та викликає різні метаболічні зміни у *D. melanogaster* w^{1118} молодого та середнього віку. На наступному етапі роботи ми задалися питанням, які зміни у *D. melanogaster* різного віку може викликати АКГ, доданий до їжі. Молоді (2-денні) імаго, вирощені на середовищі, що містило АКГ, демонстрували подібні до личинкових метаболічні зміни. Так, 2-денні самки на середовищі з АКГ мали вищу концентрацію загального протеїну, нижчий рівень ТАГ і глюкози, а також вищий вміст НМТ та пероксидів ліпідів (рис. 17), порівняно з контрольними особинами. Показники про-/антиоксидантного статусу свідчать про розвиток оксидативного стресу у молодих імаго, яких вирощували на АКГ. Водночас, у молодих самців метаболічні зміни були менше вираженими і проявлялись у вищому пулі амінокислот та нижчій активності каталази. Їжа з АКГ підвищувала концентрацію загального протеїну та викликала зміни в антиоксидантному статусі 24-денних самок w^{1118} , але не самців, проте підвищувала рівень ТАГ у мух обох статей (рис. 17).

Стійкість до стресів та локомоторна активність використовуються для оцінки функціонального старіння плодової мушки (Grotewiel et al. 2005). Склад середовища та вік мух впливали на індуковану рухову активність мух обох статей (рис. 17Е). Незалежно від складу живильного середовища, 24-денні мухи мали нижчу рухову активність, ніж молоді 2-денні мухи. Водночас, утримування на середовищі з АКГ підвищувало локомоторну активність у 24-денних мух обох статей, порівняно з контрольними особинами (рис. 17Е). Окрім того, з віком знижувалась стійкість мух до теплового (рис. 17С) та холодого (дані не наведено) стресів. Вирощування на середовищі з АКГ підвищувало стійкість до температурних стресів. Отже, АКГ може сповільнювати функціональне старіння у *D. melanogaster* w^{1118} . Взаємозв'язок між спричиненими АКГ метаболічними змінами та стійкістю до стресів простежується у молодих мух лінії w^{1118} , як це було виявлено для мух лінії Canton S.

Наші результати дозволяють припустити, що у молодих мух АКГ індукує м'який оксидативний стрес, який може активувати захисні системи, що

забезпечують підвищену стійкість мух до температурних стресів. Певний вклад у захист від холодового стресу може робити підвищений пул вільного проліну, відповідно до результатів попередніх досліджень, які показали його захисну роль у мух за низьких температур (Misener et al., 2001).

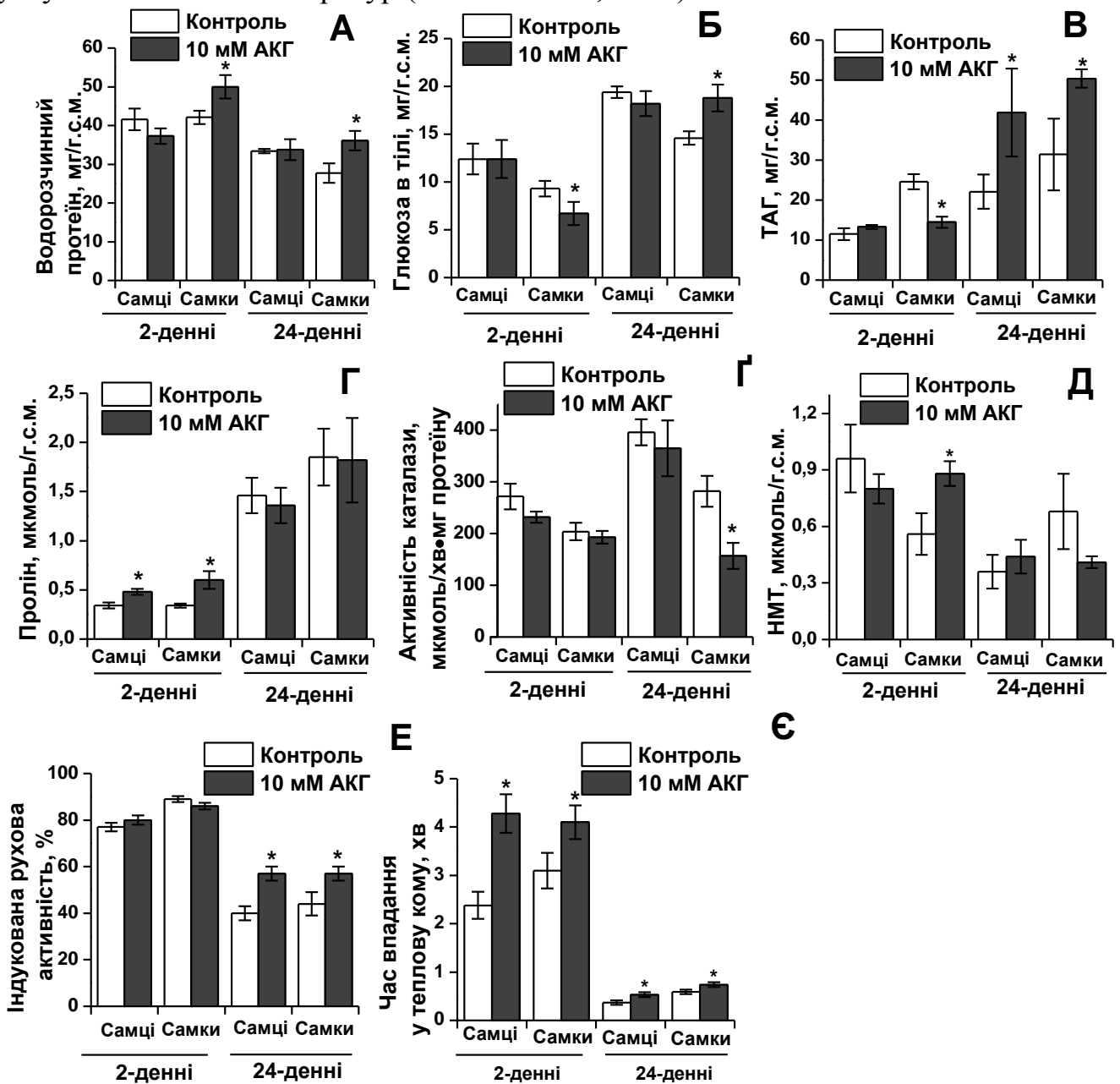


Рис. 17. Деякі метаболічні показники та показники про-/антиоксидантного стану (А-Д) та індукована рухова активність (Е), час впадання у теплову кому (Є) у 2-денних та 24-денних імаго *D. melanogaster w¹¹⁸*, яких утримували на контрольному середовищі чи середовищі з 10 мМ АКГ. *Відмінне від відповідних контрольних значень, P < 0,05 за тестом Стьюдента, n = 4-8.

3.4. Вплив АКГ на тривалість життя та функціональне старіння *D. melanogaster* лінії Canton S. Оскільки було знайдено, що АКГ може сповільнювати певні вікові зміни у плодової мушки, це спонукало нас з'ясувати, чи може АКГ продовжувати тривалість життя *D. melanogaster*. Разом з аналізом тривалості життя також була визначена плодючість самок, яких утримували на середовищі з АКГ, а також досліджена низка метаболічних показників,

локомоторна активність та стійкість до стресів у мух середнього віку (24 дні) та старих мух (40 днів) лінії Canton S. Вибір іншої лінії для дослідження був зумовлений потребою з'ясувати, чи були ефекти АКГ загальними чи залежними від особливостей лінії мух. Додавання АКГ у концентраціях 1, 5 і 10 мМ не впливало на середню та максимальну тривалість життя самців, за виключенням того, що 10 мМ АКГ збільшував максимальну тривалість життя самців. Споживання їжі, яка містила 20 мМ АКГ, скорочувало тривалість життя самців (рис. 18А). Самки на середовищах, які містили 1 і 5 мМ АКГ, не відрізнялись від контрольних самок за тривалістю життя (рис. 18Б). Водночас, самки на середовищі з 10 і 20 мМ АКГ мали вищі середню життя і максимальну тривалість життя відповідно, ніж контрольні самки.

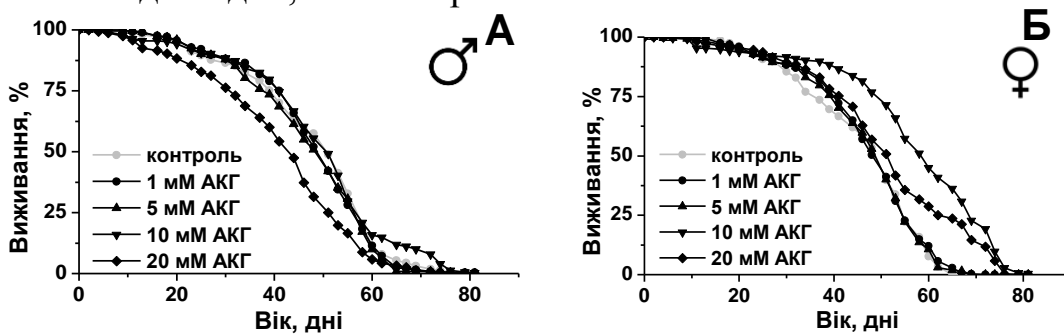


Рис. 18. Криві тривалості життя самців (А) та самок (Б) лінії Canton S, яких утримували на середовищах з різними концентраціями АКГ. Різницю між кривими виживання аналізували за лог-ранг тестом ($P \leq 0.05$) з 200-400 мух у кожній групі.

На відміну від лінії w^{1118} , утримування мух лінії Canton S на середовищі з АКГ не запобігало зниженню локомоторної активності з віком, але подібним чином підвищувало стійкість мух середнього віку до температурних стресів (рис. 19). Водночас захисний ефект АКГ втрачався у старих 40-денних мух.

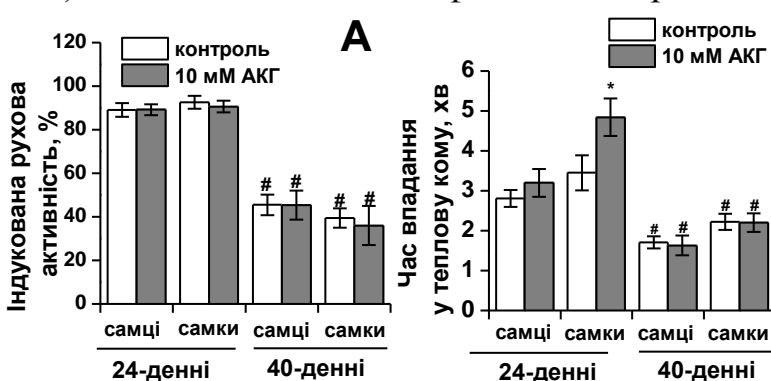


Рис. 19. Індукована рухова активність (А) та стійкість до теплового стресу (Б) у *D. melanogaster* Canton S, утримуваних на середовищі без та з 10 мМ АКГ. *Відмінне від відповідних контрольних значень, #від відповідних значень у 24-денних мух, $P < 0,05$. А – $M \pm m$ з трьох незалежних повторів (в одному повторі – 30-40 мух кожної статі). Б – $M \pm m$ з трьох повторів (по 10-12 мух на повтор).

Зниження плодючості з віком є іншим показником, який характеризує функціональне старіння дрозофіл (Grotewiel et al. 2005). За утримування на середовищі з АКГ самки Canton S мали нижчу плодючість, ніж контрольні самки (рис. 20). Подібні результати ми також отримали для лінії w^{1118} (дані не наведено), що вказує на загальність виявленого ефекту АКГ.

Щодо метаболічних показників, то 24-денні мухи лінії Canton S, утримувані на 10 мМ АКГ, не відрізнялись від контрольних мух за концентрацією вільних амінокислот (дані не наведено), проте мали вищі концентрації вільної глюкози

(рис. 21А) та водорозчинного протеїну (рис. 21Б). На додаток, 24-денні самки, які споживали їжу з АКГ, мали вищу концентрацію ТАГ (37,8±2,6 мг/г.с.м.), порівняно з контрольними (25,4±2,7 мг/г.с.м.). Можна припустити, що самки контрольної групи витрачають більше енергії і протеїну для відкладання яєць, тому, як результат, вони мають менше запасних ТАГ, порівняно з самками на середовищі з АКГ.

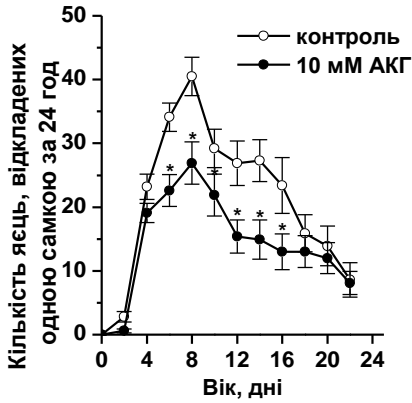


Рис. 20. Динаміка плодючості самок *D. melanogaster* Canton S, яких утримували на контрольному середовищі та середовищі з додаванням 10 мМ АКГ. *Відмінне від відповідних контрольних значень, $P < 0,05$ за тестом Ст'юдента. $M \pm m$ для значень отриманих для 20 самок на групу.

Споживання їжі з АКГ знижувало активність каталази в обох статей (рис. 21В), проте не впливало на рівень НМТ у самок (рис. 21Г), але підвищувало рівень НМТ у самців (рис. 21Г). Самки на середовищі з 10 мМ АКГ мали вищий рівень пероксидів ліпідів, ніж

контрольні (1372±104 нмоль /г.с.м. у дослідних самок проти 963±62 нмоль/г.с.м. у контрольних).

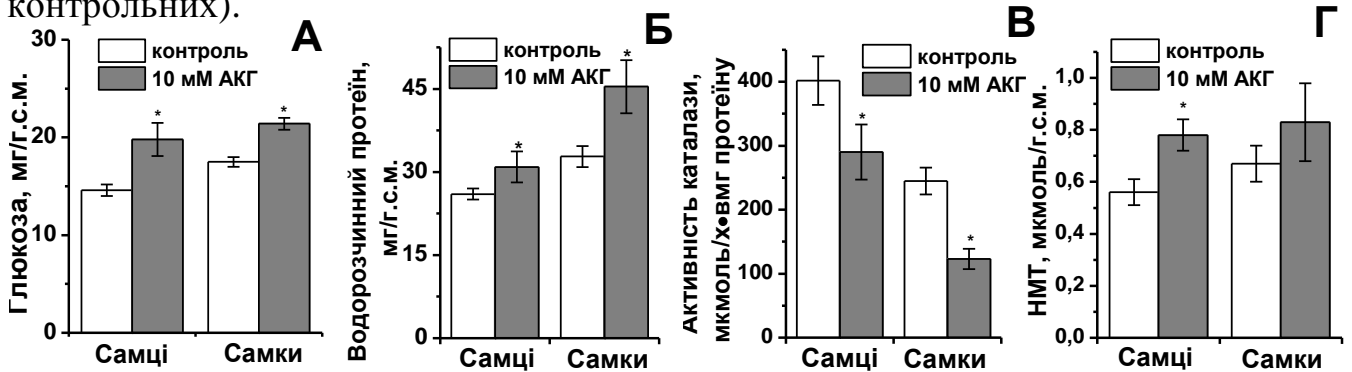


Рис. 21. Концентрації вільної глюкози (А) та водорозчинного протеїну (Б), активність каталази (В), вміст низькомолекулярних тіолів (Г) у 24-денних мух *D. melanogaster* Canton S, яких утримували на контрольному середовищі чи середовищі з 10 мМ АКГ. *Відмінне від відповідних контрольних значень, $P < 0,05$, $n = 4-8$.

Таким чином, довготривале споживання їжі, збагаченої АКГ, призводить до розвитку оксидативного стресу у мух Canton S обох статей. Оскільки збільшення середньої тривалості життя на середовищі з АКГ знайшли лише для самок, ми не можемо пов'язати оксидативний стрес з впливом АКГ на тривалість життя мух.

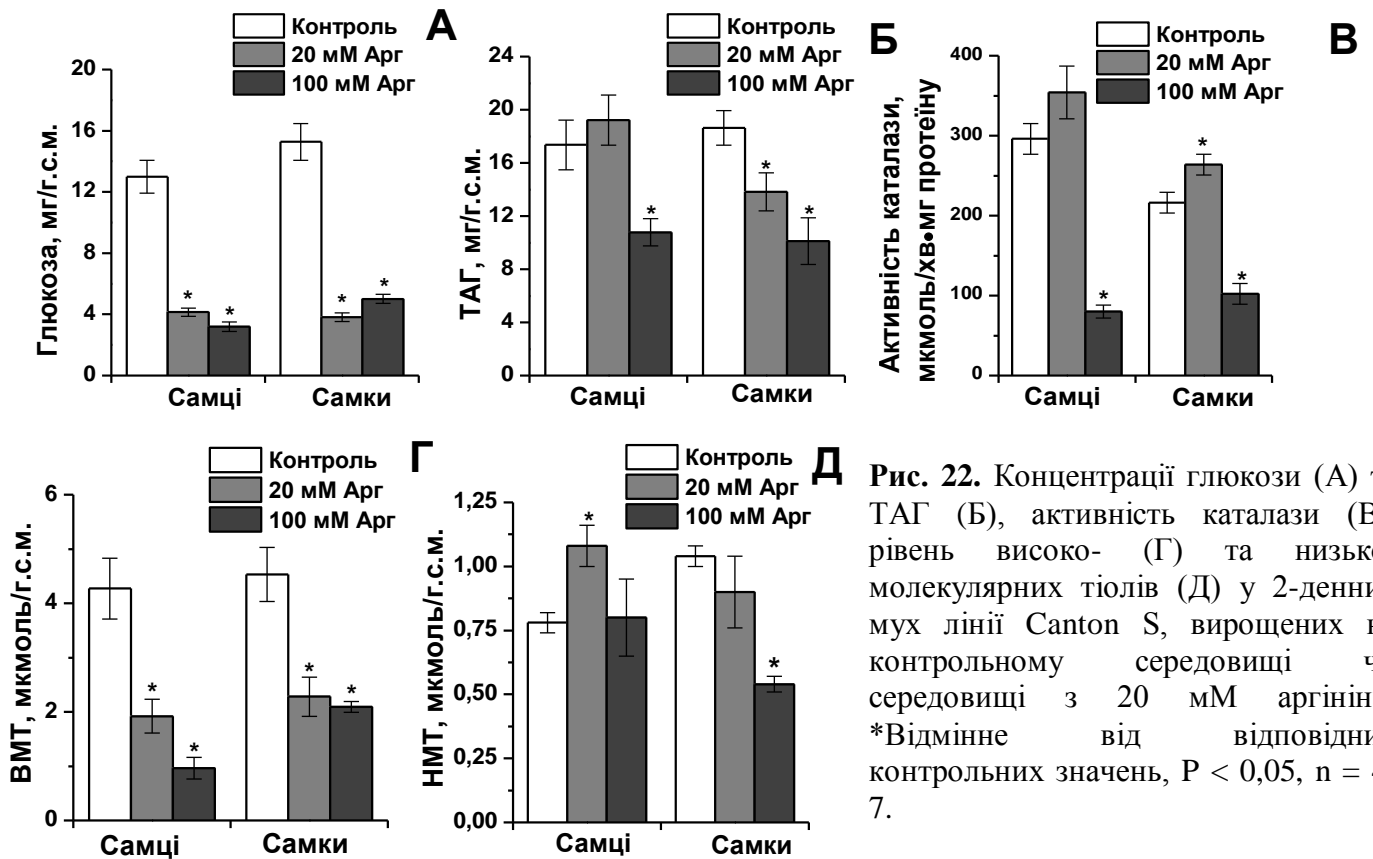
Включення екзогенного АКГ у дихальний та амінокислотний метаболізм зумовлює його захисні та геропротекторні ефекти. Узагальнюючи результати, отримані на плодовій мушці і пекарських дріжджах, можна дійти висновку, що низка метаболічних та фізіологічних ефектів АКГ у цих організмів залежали від: 1) генотипу і загального фізіологічного стану організмів: в організмів дикого типу (штам дріжджів YPH250, лінія мух Canton S) зміни були більш вираженими, ніж у мутантів (штами дріжджів, дефектні за компонентами антиоксидантного захисту, лінія мух w^{1118}); 2) статі мух; 3) віку – зміни відрізнялись у молодих і старих культурах дріжджів, молодих (2-денних) та середньовікових (24-денних) дорослих комах. Незважаючи на певні відмінності,

можна виділити наступні зміни, які спричиняє АКГ у досліджуваних організмів: 1) збільшення вмісту вільних амінокислот та загального протеїну; 2) розвиток оксидативного стресу та активація антиоксидантного захисту; 3) модифікація рівня запасних вуглеводів та ліпідів: зниження рівня ТАГ у молодих мух, але зростання рівня ТАГ у мух середнього віку; підвищення рівня запасних вуглеводів у клітинах дріжджів за тривалого культивування. Метаболічні зміни, спричинені АКГ в молодих культурах дріжджів та молодих комах можуть пояснювати підвищення стійкості цих організмів, до низки стресів (рис. 23).

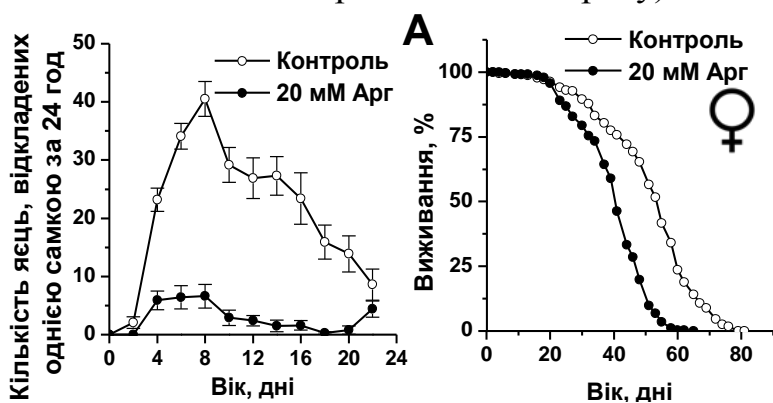
У дріжджів, яких культивували протягом тривалого часу у середовищі з додаванням АКГ, метаболічні зміни значною мірою були такі ж, які у дріжджів з молодих культур, а саме: збільшення рівня загального протеїну, а також посилення антиоксидантного захисту. На додаток до метаболічних змін, довготривале культивування у середовищі з АКГ запобігало втраті проліферативного потенціалу клітинами *S. cerevisiae* у старих культурах. Щодо плодової мушки, то утримування на середовищі з АКГ уповільнювало частково функціональне старіння та продовжувало тривалість життя комах. Аналіз виявлених метаболічних змін свідчить про те, що, найімовірніше, модуляція вікових змін у вмісті основних метаболітів, ніж антиоксидантного захисту, може лежати в основі здатності АКГ продовжувати тривалість життя *D. melanogaster*.

Водночас, отримані нами результати не дозволяють однозначно позиціонувати АКГ як геропротекторний засіб, оскільки: 1) АКГ знижував плодючість мух (а потенційні геропротектори не повинні знижувати плодючість); 2) уповільнення показників функціонального старіння мух (локомоторної активності та стійкості до стресів) за споживання АКГ не мало системного характеру, а залежало від лінії та статі мух.

4. Вплив L-аргініну на розвиток, метаболізм та тривалість життя *D. melanogaster*. Як і у ссавців, L-аргінін є умовно незамінною амінокислотою у дрогофіл, особливо потребу у цій амінокислоті мають личинкові стадії та молоді дорослі особини (Charman et al., 2013). Нами виявлено, що додавання аргініну до живильного середовища у залежний від концентрації амінокислоти спосіб впливало на метаболізм та лялькування *D. melanogaster* Canton S. Личинки лялькувалися швидше зі збільшенням концентрації аргініну до 20 мМ (дані не наведені). Личинки, вирощені на середовищі з 20 мМ аргініну, споживали більше їжі, мали більшу масу тіла і вищий вміст протеїну та нітритів (як стабільної окисленої форми $\cdot\text{NO}$, одного з продуктів метаболізму аргініну) (дані не наведені). Вищий рівень нітритів свідчить на користь використання аргініну NO-синтазою для синтезу $\cdot\text{NO}$, який відіграє важливу роль у розвитку личинок як регулятор синтезу гормону линьки (Cáceres et al., 2011). Дорослі молоді мухи, вирощені на 20 мМ аргініні, мали вищий вміст протеїну (дані не наведені), нижчий вміст глюкози та ТАГ, також вищу активність каталази (самки), вищий вміст НМТ (самці) та нижчий вміст ВМТ (рис. 22), що свідчить про розвиток у цих мух оксидативного стресу. Подібні зміни у організмі комах викликав АКГ, тому їх можна розглядати як потенційно корисні ефекти для молодих мух.



Споживання збагаченої аргініном їжі зменшувало плодючість самок та тривалість життя мух обох статей (рис. 23). Видається ймовірним, що як у випадку з АКГ, корисні ефекти аргініну проявляються за умов його короткотривалого споживання, а за дуже тривалого споживання аргініну фізіологічний стан організму може погіршуватись (ймовірно, через розвиток оксидативного/нітрозативного стресу).



У підсумку, результати, які були отримані на пекарських дріжджах та плодовій мушці свідчать про те, що досліджувані нами природні речовини можуть проявляти як антиоксидантні, так і прооксидантні властивості (рис. 24). Як антиоксиданти рослинні препарати та АКГ у помірних концентраціях можуть захищати живі організми від низки несприятливих чинників, дія яких супроводжується розвитком оксидативного стресу. Проте за надлишку природні антиоксиданти починають діяти як прооксидантні молекули, призводячи до небажаних наслідків для організму. За низьких концентрацій речовин їхні антиоксидантні властивості теж конкурують з

прооксидантними. Проте ця конкуренція може мати вигідні наслідки для організму. За помірних концентрацій речовини проявляють слабку прооксидантну активність і, відповідно, призводять до підвищення продукції АФК. Внаслідок незначного зростання рівня АФК розвивається оксидативний стрес низької інтенсивності, що викликає адаптивну відповідь в клітині, яка виражається в індукції захисних механізмів. Ми вважаємо, що саме цей механізм лежить в основі виявлених нами адаптогенних властивостей родіоли рожевої, кверцетину та АКГ.

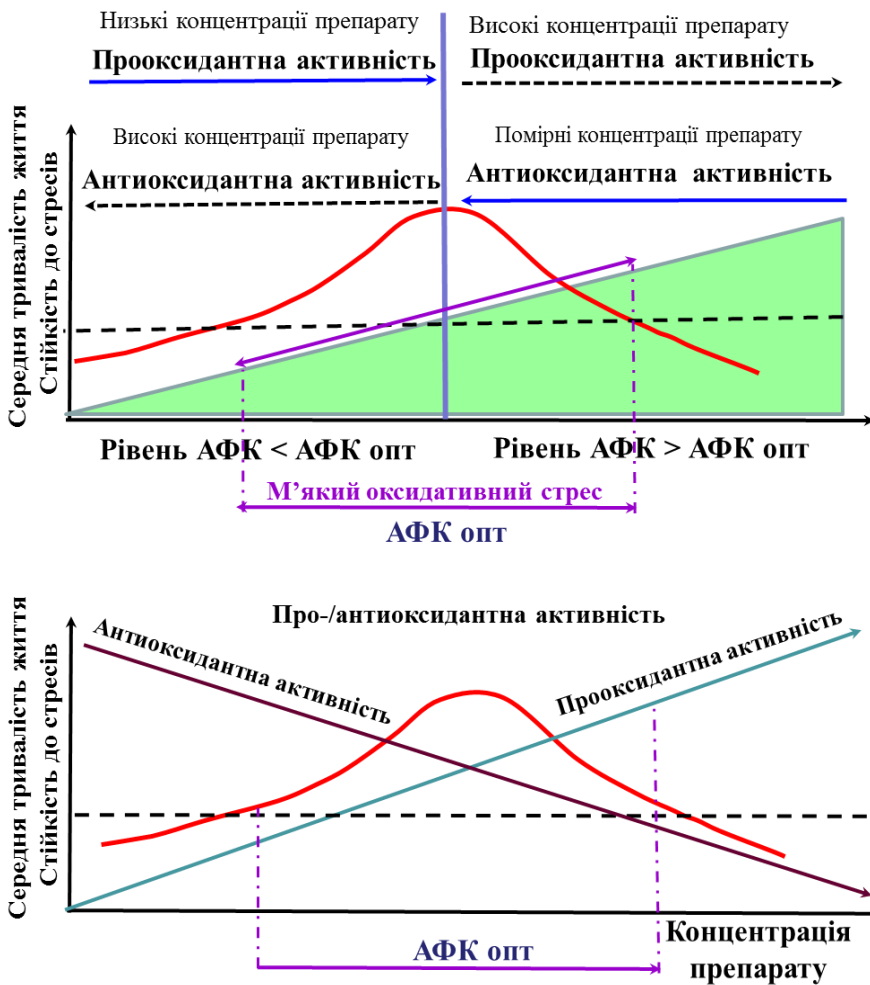


Рис. 24. Співвідношення між прооксидантними та антиоксидантними властивостями природних речовин впливає на стаціонарний рівень АФК у клітині, який, своєю чергою, визначає спрямованість біологічних ефектів. Незначне підвищення рівня АФК супроводжується розвитком м'якого оксидативного стресу, який запускає адаптивну відповідь, результатом якої є підвищена стійкість до стресів та збільшена тривалість життя. Якщо рівень АФК перевищує оптимальні межі, то проявляються токсичні ефекти природних речовин: скорочення тривалості життя і зниження опірності.

Якщо досліджувані речовини призводять до індукції оксидативного стресу середньої

інтенсивності (коли одночасно з зростанням потужності антиоксидантного захисту фіксується і збільшення окисних пошкоджень), то за їхнього довготривалого впливу може спостерігатися поступове виснаження захисних ресурсів та підвищення рівня пошкоджених молекул. Як наслідок, фізіологічний стан організмів може погіршуватись. Саме цим може пояснюватись знижена тривалість життя мух на середовищі з аргініном та високими концентраціями АКГ. Загалом, рослинні препарати видаються більш перспективними у плані досліджень як геропротектори, ніж відомі клітинні метаболіти.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення результатів дослідження захисних властивостей чинників рослинного походження (зокрема, кверцетину та

родіоли рожевої), а також клітинних метаболітів, альфа-кетоглютарату та аргініну. В експериментах *in vitro* та з використанням двох модельних організмів, дріжджів *S. cerevisiae* та плодової мушки *D. melanogaster*, виявлено, що досліджувані природні чинники можуть діяти як антиоксиданти, так і прооксиданти. Встановлено, що завдяки як антиоксидантним, так і прооксидантним властивостям природні речовини здатні як підвищувати адаптаційний потенціал та збільшувати тривалість життя модельних організмів, так і проявляти токсичні ефекти.

1. Порівняння антиоксидантних властивостей водних екстрактів з деяких лікарських рослин, які зростають на території України, зокрема в Українських Карпатах, показало, що екстракти з вищим вмістом фенольних речовин (*Rhodiola rosea* L., *Rosa canina* L.) ефективніше знешкоджують вільнорадикальні молекули та H_2O_2 *in vitro*, ніж такі ж з меншим вмістом фенольних сполук (*Hypericum perforatum* L., *Gentiana lutea* L.). За низьких рН водні рослинні екстракти ефективно захищають клітини дріжджів від оксидативного стресу під впливом пероксиду гідрогену. У лужному середовищі антиоксидантна активність рослинних екстрактів послаблюється, проте посилюється їхня прооксидантна активність (здатність продукувати H_2O_2) через автоокислення фенольних та інших редокс-активних речовин.

2. Попередня інкубація з водним екстрактом *R. rosea* підвищує стійкість клітин *S. cerevisiae*, відібраних в експоненційній фазі росту, до дії низки стресорів (іони перехідних металів, тепловий стрес, H_2O_2 , оцтова кислота) у залежний від концентрації екстракту спосіб. Преінкубація з екстрактом *R. rosea* низьких концентрацій підвищує виживання клітин, запобігає інактивації антиоксидантних ензимів, СОД і каталази, та зростанню рівня карбонільних груп у протеїнах, за обробки дріжджів H_2O_2 . Захисні ефекти екстракту *R. rosea* не проявляються у мутантів, дефектних за генами *MSN2/MSN4* і *YAP1*, що свідчить про залучення цих транскрипційних факторів в адаптогенну дію *R. rosea*. Подібно до впливу на стійкість до стресів, екстракт *R. rosea* у залежний від концентрації спосіб збільшує тривалість життя дріжджів у старих культурах. Геропротекторна дія екстракту реалізується без активації антиоксидантного захисту клітин.

3. Попередня інкубація з кверцетином у низьких концентраціях надає стійкості клітинам *S. cerevisiae* до впливу низки стресорів. Захисна дія кверцетину за впливу стресорів проявляється у підвищенні виживання клітин і зниженні рівня окисної модифікації протеїнів без змін активностей антиоксидантних ензимів, СОД та каталази, та вмісту низькомолекулярних тіолів. Відсутність транскрипційних регуляторів *Msn2/Msn4*, але не *Yap1*, та інгібування загального біосинтезу протеїну скасовує захисні ефекти кверцетину. Отже, активація певних адаптивних механізмів, відмінних від антиоксидантних, необхідна для прояву захисної дії кверцетину у *S. cerevisiae*.

4. Природні альфа-кетокислоти, зокрема піруват, оксалоацетат і альфа-кетоглютарат, проявляють антиоксиданту активність *in vitro* та *in vivo*. Альфа-

кетоглютарат ефективніше знешкоджує H_2O_2 та HO^\bullet *in vitro*, ніж інші кетокислоти. Додавання АКГ запобігає загибелі клітин дріжджів за інкубації в водних розчинах вуглеводів (глюкози або фруктози). Захисні ефекти екзогенного АКГ за цих умов супроводжуються інтенсифікацією мітохондріального дихання та запобіганням зниження вмісту загального протеїну, проте без змін активностей основних антиоксидантних ензимів.

5. Вирощування у середовищі з АКГ підвищує стійкість молодих культур *S. cerevisiae* до дії стресорів, зокрема H_2O_2 , теплового стресу та заморожування-розморожування. Показано, що механізми захисної дії АКГ у дріжджів пов'язані з: 1) використанням АКГ для синтезу кріопротекторних амінокислот, зокрема проліну; 2) зростанням метаболічної активності клітин та розвитком м'якого оксидативного стресу. У результаті відбувається збільшення потужності антиоксидантної системи дріжджів (зростання активностей каталази, глутатіонредуктази, вмісту низькомолекулярних тіолів) і, відповідно, підвищення опірності до впливу багатьох стресорів. Довготривале культивування у середовищі з АКГ запобігає втраті життєздатності клітинами *S. cerevisiae* у старих культурах. Це зумовлене АКГ підвищення життєздатності дріжджів супроводжується зростанням концентрації загального протеїну і запасних вуглеводів (глікогену і трегалози) а також посиленням антиоксидантного захисту та уповільненням акумуляції окислених протеїнів у старих клітинах.

6. У дорослих мух *D. melanogaster*, вирощених на середовищі з етанолом, спостерігається зниження вмісту високо- і низькомолекулярних тіол-вмісних сполук та зростання активності каталази, що свідчить про розвиток оксидативного стресу. Додавання альфа-кетоглютарату до етанол-вмісної їжі збільшує виживання дрозофіл на личинковій стадії, а у дорослих мух призводить до підвищення активності алкогольдегідрогенази та посилення антиоксидантного захисту. Вирощування на етанолі призводить до підвищеного вмісту триацилгліцеридів у тілі мух, і цей посилюється за додавання АКГ. Перетворення етанолу триацилгліцеридів варто розглядати як спосіб детоксикації етанолу у дорослих мух.

7. Вирощування на середовищі з альфа-кетоглютаратом призводить до підвищення стійкості до стресів у молодих дрозофіл. Личинки та молоді 2-денні імаго, вирощені на АКГ, мають вищий вміст вільних амінокислот та загального протеїну, нижчий рівень ТАГ, вищі загальну антиоксидантну активність, активність каталази та вміст низькомолекулярних тіолів. Ці зміни мають залежний від статі характер: у самок більш вираженими є зміни вмісту метаболітів, тоді як у самців переважає активація антиоксидантного захисту. Як зростання біосинтезу амінокислот, так і посилення антиоксидантного захисту можуть бути відповідальними за вищу стійкість мух до H_2O_2 , холодого та теплового стресів.

8. Додавання АКГ до їжі модулює тривалість життя *D. melanogaster*, проте ефект залежить від концентрації кетокислоти та статі мух. Виражена геропротекторна дія АКГ спостерігається у самок і супроводжується зниженою

плодючістю та покращеною стійкістю самок середнього віку до холодого та теплового стресів. Водночас, АКГ сповільнює поведінкове старіння лише у мух лінії *w¹¹¹⁸*, але не Canton S, та не надає мухам обох ліній стійкості до оксидативного стресу. Споживання їжі з АКГ підвищує концентрацію загального протеїну, глюкози та триацилгліцеридів та підвищує вміст пероксидів ліпідів з пригніченням антиоксидантного захисту у мух середнього віку. Більш вираженими ці зміни є у самок. Разом, результати свідчать про те, що, найімовірніше, модуляція вікових змін основного метаболізму, але не зміни в антиоксидантному захисті, лежать в основі геропротекторної дії АКГ на *D. melanogaster*.

9. Додавання аргініну визначених концентраціях до живильного середовища прискорює лялькування та зумовлює вищі концентрації вільних амінокислот, нітрит-іонів та протеїну у тілі личинок та молодих імаго. У молодих мух аргінін також призводить до зниження вмісту вільної глюкози та триацилгліцеридів, а також високо- і низькомолекулярних тіолів та активності каталази, що свідчить про розвиток оксидативного стресу, ймовірно як результат продукції $\cdot\text{NO}$. Водночас, довготривале споживання їжі, збагаченої аргініном, знижує плодючість самок та скорочує тривалість життя мух обох статей.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

- у виданнях, що входять до наукометричної бази Scopus

1. Lushchak OV, **Bayliak MM**, Korobova OV, Levine RL, Lushchak VI (2009) Buffer modulation of menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Rep* 14(5):214–220 (Особистий внесок: виконання частини експериментальної роботи, статистична обробка та аналіз отриманих даних). SJR: Q3 (Biochemistry)
2. **Bayliak MM**, Lushchak VI (2011) The golden root, *Rhodiola rosea*, prolongs lifespan but decreases oxidative stress resistance in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytomedicine* 18(14):1262–1268 (Особистий внесок: планування експерименту, постановка методик та виконання експериментальної частини роботи, статистична обробка та аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку). SJR: Q1 (Pharmaceutical Science/Complementary and Alternative Medicine)
3. Semchyshyn HM, **Bayliak MM**, Lushchak VI (2011) Starvation in yeast: biochemical aspects. In: TC Merkin (ed) *Biology of starvation in human and other organisms*, Nova Science Publishers, Inc, pp. 103–150 (Особистий внесок: разом зі співавторами здійснено аналіз даних літератури і підготовка рукопису до друку. У дисертацію увійшли підрозділи рукопису щодо особливостей кривих росту дріжджів на глюкозі та біохімічних особливостей клітин дріжджів на стаціонарній фазі росту).
4. **Bayliak MM**, Burdyliuk NI, Izers'ka LI, Lushchak VI (2014) Concentration-dependent effects of *Rhodiola rosea* on long-term survival and stress resistance of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of Yap 1 and Msn2/4 regulatory proteins. *Dose-Response* 11(1):93–109 (Особистий внесок: ідея роботи у співавторстві, планування та виконання частини експериментальної роботи, статистична обробка та аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку). SJR: Q2 (Health, Toxicology and Mutagenesis)

5. Semchyshyn HM, Miedzobrodzki J, **Bayliak MM**, Lozinska LM, Homza BV (2014) Fructose compared with glucose is more a potent glycooxidation agent *in vitro*, but not under carbohydrate-induced stress *in vivo*: potential role of antioxidant and antiglycation enzymes. *Carbohydr Res* 384:61–69 (*Особистий внесок: виконання частини експериментальної роботи, здійснення статистичної обробки даних. У дисертацію ввійшли результати, що стосуються здатності розчинів моносахаридів генерувати АФК in vitro*). SJR: Q3 (Biochemistry)
6. **Bayliak MM**, Shmihel HV, Lylyk MP, Vytvytska OM, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI (2015) Alpha-ketoglutarate attenuates toxic effects of sodium nitroprusside and hydrogen peroxide in *Drosophila melanogaster*. *Environ Toxicol Pharmacol* 40:650–659 (*Особистий внесок: ідея роботи, планування експерименту, участь у постановці методик, аналіз отриманих даних, участь у підготовці рукопису до друку. У дисертацію ввійшли результати, що стосуються здатності АКГ захищати дорослі плоди мухи від впливу пероксиду гідрогену*). SJR: Q2 (Toxicology)
7. **Bayliak MM**, Lylyk MP, Vytvytska OM, Lushchak VI (2016) Assessment of antioxidant properties of alpha-keto acids *in vitro* and *in vivo*. *Eur Food Res Technol* 242(2):179–188 (*Особистий внесок: ідея роботи, планування експерименту, участь у постановці методик, аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку*). SJR: Q2 (Biochemistry), Q1 (Food science)
8. **Bayliak MM**, Burdylyuk NI, Lushchak VI (2016) Quercetin increases stress resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* not only as an antioxidant. *Ann Microbiol* 66(2):569–576 (*Особистий внесок: ідея роботи, планування експерименту, участь у постановці методик, аналіз отриманих даних; підготовка рукопису до друку*). SJR: Q3 (Applied Microbiology and Biotechnology)
9. **Bayliak MM**, Lylyk MP, Shmihel HV, Sorochynska OM, Manyukh OV, Pierzynowski SG, Lushchak VI (2016) Dietary alpha-ketoglutarate increases cold tolerance in *Drosophila melanogaster* and enhances protein pool and antioxidant defense in sex-specific manner. *J Therm Biol* 60:1–11 (*Особистий внесок: ідея роботи у співавторстві, планування експерименту, участь у постановці методик, статистична обробка і аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку*). SJR: Q3 (Biochemistry)/Q1 (Agricultural and Biological Sciences (miscellaneous))
10. **Bayliak MM**, Burdyliuk NI, Lushchak VI (2016) Effects of pH on antioxidant and prooxidant properties of common medicinal herbs. *Open Life Sci* 11:298–307 (*Особистий внесок: ідея роботи, планування експерименту, постановка методик, статистична обробка і аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку*). SJR: Q3 (Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (miscellaneous))
11. **Bayliak MM**, Shmihel HV, Lylyk MP, Storey KB, Lushchak VI (2016) Alpha-ketoglutarate reduces ethanol toxicity in *Drosophila melanogaster* by enhancing alcohol dehydrogenase activity and antioxidant capacity. *Alcohol* 55:23–33 (*Особистий внесок: ідея роботи у співавторстві, планування експерименту, постановка методик, виконання частини експериментальної роботи, статистична обробка і аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку*). SJR: Q2 (Biochemistry)
12. **Bayliak MM**, Lylyk MP, Shmihel HV, Sorochynska OM, Semchyshyn OI, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI (2017) 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*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 204:23–33 (*Особистий внесок: ідея роботи у співавторстві, планування експерименту, виконання частини експериментальної роботи, статистична*

обробка і аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку). SJR: Q2 (Biochemistry)

13. **Bayliak MM**, Burdyliuk NI, Lushchak VI (2017) Growth on alpha-ketoglutarate increases oxidative stress resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Microbiol* 2017: article ID 5792192, 9 pages (Особистий внесок: ідея роботи, планування експерименту, постановка методик, статистична обробка і аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку). SJR: Q3 (Microbiology)
 14. **Bayliak MM**, Lylyk MP, Sorochynska OM (2017) Dietary alpha-ketoglutarate partially prevents age-related decline in locomotor activity and cold tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Biologia* 72(4):458–467 (Особистий внесок: ідея роботи, планування експерименту, статистична обробка і аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку). SJR: Q4 (Zoology)
 15. **Bayliak M**, Burdyliuk N (2017) Effects of long-term cultivation on medium with alpha-ketoglutarate supplementation on metabolic processes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Aging Res* 2017: article ID 8754879, 12 pages (Особистий внесок: ідея роботи, планування експерименту, постановка методик, виконання частини експериментальної роботи; статистична обробка і аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку). SJR: Q2 (Geriatrics and Gerontology)
 16. **Bayliak MM**, Lylyk MP, Maniukh OV, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI (2018) Dietary L-arginine accelerates pupation and promotes high protein levels but induces oxidative stress and reduces fecundity and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol B* 188(1):37–55 (Особистий внесок: ідея роботи, планування експерименту, статистична обробка і аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку). SJR: Q2 (Biochemistry)
 17. **Bayliak MM**, Hrynkiv OV, Knyhynytska RV, Lushchak VI (2018) Alpha-ketoglutarate enhances freeze–thaw tolerance and prevents carbohydrate-induced cell death of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 200(1):33–46 (Особистий внесок: ідея роботи, планування експерименту, статистична обробка і аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку). SJR: Q3 (Biochemistry/Microbiology)
 18. Lylyk MP, **Bayliak MM**, Shmihel HV, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI (2018) Effects of alpha-ketoglutarate on lifespan and functional aging of *Drosophila melanogaster* flies. *Ukr Biochem J* 90(6):49–61 (Особистий внесок: ідея роботи, планування експерименту, статистична обробка і аналіз отриманих даних, підготовка рукопису до друку). SJR: Q4 (Biochemistry)
 19. **Bayliak MM**, Abrat OB, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI (2019) Interplay between diet-induced obesity and oxidative stress: comparison between *Drosophila* and mammals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 228:18–28 (Особистий внесок: разом зі співавторами здійснено аналіз даних літератури і підготовку рукопису до друку). SJR: Q2 (Biochemistry)
- у фахових періодичних виданнях України
20. Лучків НЮ, Бурдилюк Ні, Ізерська ЛІ, **Байляк ММ** (2013) Оцінка антиоксидантних властивостей родіоли рожевої (*Rhodiola rosea* L.) та волошки карпатської (*Centaurea carpatica* porc.), зібраних в Українських Карпатах. Галицький лікарський вісник: Науково-практичний часопис 20(2):31–35 (Особистий внесок: ідея роботи, планування експерименту, постановка методик, статистична обробка і аналіз отриманих даних, участь у підготовці рукопису до друку).
 21. Лирик МП, Сорочинська ОМ, Манюх ОВ, **Байляк ММ** (2016) Статеві

особливості амінокислотного обміну у *Drosophila melanogaster* за споживання альфа-кетоглутарату. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій 21(2):31–36 (Особистий внесок: ідея та планування роботи, аналіз отриманих даних, участь у підготовці рукопису до друку).

22. **Bayliak MM** (2016) Effects of bicarbonate and alpha-ketoglutarate on sensitivity of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to hydrogen peroxide and iron ions. Біологічні студії 10(2):53–62
23. **Лилик М, Сорочинська ОМ, Манюх ОВ, Байляк ММ** (2017) Вікові фізіолого-біохімічні зміни *Drosophila* при утриманні на середовищі з альфа-кетоглутаратом. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 22(1):25–31 (Особистий внесок: ідея та планування роботи, аналіз отриманих даних, участь у підготовці рукопису до друку).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. **Глодан С, Кузюк Л, Шишка Р, Байляк М** (2009) Стійкість дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, вирощених у присутності препаратів родіоли рожевої, до дії перексиду водню. В: Тези доповідей V Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, 12-15 травня 2009, т. 1, с. 173–174
2. **Павликівський І, Бурак Н, Байляк М** (2009) Вплив препаратів родіоли рожевої на активності антиоксидантних ферментів *Saccharomyces cerevisiae*. В: Тези доповідей V Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, 12-15 травня 2009, т. 1, с. 62–63
3. **Байляк М** (2009) Вплив препаратів родіоли рожевої на тривалість життя дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. В: Тези доповідей XII з’їзду товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, Ужгород, 25-30 травня 2009, с. 359
4. **Bayliak M, Lushchak V** (2009) Extracts of *Rhodiola rosea* decrease oxidative stress resistance but prolong chronological lifespan of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Materials of 3rd Ukrainian-Polish Weigl Conference “Microbiology on Service for Human”, Odesa National Mechnykov University, Odesa, 14-17 September 2009, pp 72–73
5. **Байляк ММ, Лушчак ВІ** (2010) Тривалість життя та стійкість до оксидативного стресу дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* у присутності препаратів родіоли рожевої. В: Український біохімічний журнал 82(4), додаток 2) “Матеріали X Українського біохімічного з’їзду, Одеса, 13-17 вересня 2010”, с. 228–229
6. **Павликівський І, Глодан С, Шишка Р, Байляк М** (2011) Вплив водних препаратів родіоли рожевої на стійкість дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* до дії різних стресорів. В: Тези доповідей VII Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, 5-8 квітня 2011, т. 1, с. 267–268
7. **Hlodan S, Burak N, Bayliak M** (2011) Combined effect of medicinal plant extracts and pH of culture medium on viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Materials of V International Young Scientists conference “Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution”, Odesa, 13-17 June, 2011, pp 215–216

8. Pavlykivskij I, Burdyliuk N, Izerska L, **Bayliak M** (2011) Influence of *Rhodiola rosea* and quercetin on stress resistance of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Materials of V International Young Scientists conference “Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution”, Odesa, 13-17 June 2011, pp 227–228
9. Бурдилюк Н, Ізерська Л, Гришук Х, **Байляк М** (2012) Вплив родіоли рожевої на стійкість різних штамів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* до дії стресових чинників. В: Тези доповідей VIII Міжнародної конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери”, Харків, 20-23 листопада 2012, с. 160
10. Ізерська Л, Бурдилюк Н, **Байляк М** (2012) Особливості росту та метаболізму *Saccharomyces cerevisiae* при вирощуванні на середовищі з альфа-кетоглутаратом. В: Тези доповідей VIII Міжнародної конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери”, Харків, 20-23 листопада 2012, с. 44–45
11. Кришук З, Шмігель Г, **Байляк М** (2012) Вплив альфа-кетоглутарату на швидкість розвитку плодової мушки *Drosophila melanogaster*. В: Тези доповідей VIII Міжнародної конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери”, Харків, 20-23 листопада 2012, с. 115–116
12. Гришук Х, Софінська Я, **Байляк М** (2013) Особливості хімічного складу дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* при вирощуванні на середовищі з альфа-кетоглутаратом. В: Тези доповідей IX Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, 13-16 квітня 2013, с. 45–46
13. **Байляк ММ**, Ізерська ЛІ (2013) Біохімічні особливості *Saccharomyces cerevisiae*, вирощених на середовищі з альфа-кетоглутаратом. В: Тези доповідей XIII з’їзду товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, Ялта, 1-6 жовтня 2013, с. 64
14. Гришук ХІ, Бурдилюк НІ, **Байляк ММ** (2013) Вплив альфа-кетоглутарату на виживання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за дії пероксиду водню. Біохімічні особливості *Saccharomyces cerevisiae*, вирощених на середовищі з альфа-кетоглутаратом. В: Тези доповідей XIII з’їзду товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, Ялта, 1-6 жовтня 2013, с. 84
15. Hryshuk Kh, Burdyliuk N, Izerska L, **Bayliak M** (2013) Low concentrations of *Rhodiola rosea* aqueous extract demonstrate stress-protective and geroprotective effects on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Materials of VI International Young scientists’ conference “Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution”, Odesa, 13-17 May 2013, pp 250–251
16. Лушчак ВІ, **Байляк ММ** (2013) Пекарські дріжджі як модель для вивчення геропротекторного ефекту родіоли рожевої. В: Тези доповідей XIII з’їзду товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, Ялта, 1-6 жовтня 2013, с. 110
17. **Bayliak M**, Hryshuk H, Lushchak V (2014) Possible mechanisms of concentration-dependent effects of *Rhodiola rosea* on long-term survival and stress resistance of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Ukr Biochem J 86(5), suppl 1 “Materials of XI Ukrainian Biochemical congress, Kyiv, 6-10 October 2014”, pp 126–127
18. Lylyk M, Shmihel H, Kozachok O, **Bayliak M** (2014) Alpha-ketoglutarate modifies toxic action of sodium nitroprusside and ethanol on *Drosophila melanogaster*. In:

Biochem J 86(5), suppl 2 “Materials of XI Ukrainian Biochemical congress, Kyiv, 6-10 October 2014”, pp 249–250

19. Гриньків ОВ, Книгиницька РВ, **Байляк ММ** (2016) Вплив альфа-кетоглутарату на життєздатність та метаболічну активність дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за інкубації з фруктозою та глюкозою. В: Матеріали IV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів і молодих вчених “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології”, Вінниця, 12-14 квітня 2016, с. 288–289
20. Головчак М, Шмігель Г, **Байляк М** (2016) Вплив альфа-кетоглутарату на розвиток *Drosophila melanogaster* Canton S на середовищі з різними ксенобіотиками. В: Тези доповідей XII Міжнародної конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, 19-21 квітня 2016, с. 288–289
21. Семчишин О, Лилик М, **Байляк М** (2016) Вплив альфа-кетоглутарату на стійкість до холодового стресу у особин *Drosophila melanogaster* різного віку. В: Тезах доповідей XII Міжнародної конференції студентів і аспірантів „Молодь і поступ біології”, Львів, 19-21 квітня 2016, с. 52–53
22. Балан В, Шмігель Г, **Байляк М** (2016) Сумісний вплив альфа-кетоглутарату та етанолу на розвиток *Drosophila melanogaster* лінії Canton S. В: Матеріали V міжнародної конференції “Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології”, Київ, 12-14 травня 2016, с. 8
23. Лилик М, **Байляк М** (2016) Вплив альфа-кетоглутарату на загальну фізіологічну активність особин *Drosophila melanogaster* 24-денного віку. В: Матеріали V міжнародної конференції “Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології”, Київ, 12-14 травня 2016, с. 14
24. Gospodaryov D, Balatskiy V, **Bayliak M** (2018) Bioenergetic basis for the effects of arginine and alpha-ketoglutarate on lifespan. In: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. 1859 (Supplement “20th European Bioenergetics Conference”):e59.
25. **Байляк ММ** (2019) Геропротекторні властивості альфа-кетоглутарату у плодової мушки дрозофіли. В. Медична і клінічна хімія “Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня, 2019”. Т. 21, №3 (додаток). С. 60.

АНОТАЦІЯ

Байляк М.М. Підвищення адаптаційного потенціалу дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та плодової мушки *Drosophila melanogaster* рослинними екстрактами, кетокислотами та аргініном. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 “Біохімія” (091 – Біологія). Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Чернівці, 2019.

Дисертація присвячена вивченню стрес-захисних та геропротекторних властивостей чинників рослинного походження (кверцетину та родіоли рожевої), а також клітинних метаболітів, альфа-кетоглутарату та аргініну. В експериментах *in vitro* та з використанням модельних організмів, дріжджів *S. cerevisiae* та плодової мушки *D. melanogaster*, виявлено, що залежно від умов досліджувані природні чинники можуть діяти як антиоксиданти, так і прооксиданти. Знайдено, що антиоксидантна активність рослинних екстрактів була вищою за низьких рН, а

прооксидантна активність – за високих рН. Водний екстракт *R. rosea* у залежний від концентрації спосіб проявляв адаптогенну та геропротекторну дію на *S. cerevisiae*. Адаптогенна дія *R. rosea* потребувала наявності транскрипційних факторів Msn2/4 та Yap1, а захисна дія кверцетину – лише білків Msn2/Msn4. Екзогенний АКГ проявляв стрес-захисну та геропротекторну дію у *S. cerevisiae* та *D. melanogaster* через включення у амінокислотний метаболізм та стимуляцію антиоксидантного захисту. Показано, що аргінін, доданий до їжі, пришвидшував метаболізм та викликав оксидативний стрес у молодих *D. melanogaster*, проте знижував плодючість самок та скорочував тривалість життя мух.

Отже, завдяки про-/антиоксидантним властивостям природні речовини можуть як підвищувати адаптаційний потенціал та збільшувати тривалість життя організмів, так і проявляти токсичні ефекти.

Ключові слова: альфа-кетоглютарат; антиоксидантна активність; аргінін; кверцетин; метаболізм; оксидативний стрес; прооксидантна активність; тривалість життя; *Drosophila melanogaster*; *Rhodiola rosea*; *Saccharomyces cerevisiae*.

ANNOTATION

Bayliak M.M. Enhancement of the adaptive capacity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fruit fly *Drosophila melanogaster* by using plant extracts, keto acids, and arginine. – Manuscript.

Thesis for a scientific degree of doctor of biological sciences by specialty 03.00.04 “Biochemistry” (091 – Biology). – Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, Chernivtsi, 2019.

The dissertation is devoted to the study of stress-protective and geroprotective properties of plant derived substances (quercetin and *Rhodiola rosea* extracts), as well as cellular metabolites, alpha-ketoglutarate and arginine. The common feature of all the substances studied is their ability to affect redox processes. Therefore, we elucidated the role of antioxidant and prooxidant mechanisms of the substances in modulation of adaptive potential and lifespan of model organisms, yeast *Saccharomyces cerevisiae* and fruit fly *Drosophila melanogaster*.

Plant extracts with high levels of phenolic compounds (*Rhodiola rosea* L., *Rosa canina* L.) exhibited *in vitro* and *in vivo* the higher antioxidant activity at acidic pH and higher prooxidant activity in alkaline pH than the plant extracts with lower levels of phenols (*Hypericum perforatum* L., *Gentiana lutea* L.). The aqueous extract from *R. rosea* root showed adaptogenic and geroprotective effects in *S. cerevisiae* in a concentration-dependent manner. Yeast pre-treatment with *R. rosea* extract at low concentrations increased resistance of exponentially growing *S. cerevisiae* cells to a number of stressors. Stress-protective effects of *R. rosea* extract were cancelled in yeast mutants deficient for *MSN2*, *MSN4*, and *YAP1* genes. Similarly to stress resistance, *R. rosea* extract increased lifespan and reproductive ability of stationary phase yeast cells in a concentration-dependent manner. The ability of the bioflavonoid quercetin at low concentrations to increase the resistance of *S. cerevisiae* to various stresses was found to be associated with involvement of transcriptional regulators Msn2/Msn4.

The antioxidant properties of natural alpha-keto acids, such as pyruvate, alpha-ketoglutarate, and oxaloacetate, were compared. Alpha-ketoglutarate scavenged H₂O₂ and

HO[•] *in vitro* more efficiently, than other keto acids. *In vivo*, AKG effectively protected yeast *S. cerevisiae* from carbohydrate-induced cell death and fruit fly *D. melanogaster* from H₂O₂ and ethanol. The protective effects of AKG under yeast incubation with carbohydrates (glucose or fructose) were connected with the intensification of mitochondrial respiration and restoration of protein metabolism. Protective effects of AKG against ethanol toxicity in fruit flies were connected with the activation of antioxidant defense and alcohol dehydrogenase. Growth on AKG-supplemented medium increased resistance of *S. cerevisiae* cells to H₂O₂ and freezing-thawing. Protective mechanisms of AKG included: 1) the use of AKG for the biosynthesis of cryoprotective amino acids, such as proline; 2) the active inclusion of AKG in the Krebs cycle that led to the intensification of mitochondrial respiration followed by activation of the antioxidant system. Long-term cultivation in AKG-containing medium prevented the loss of proliferative potential by *S. cerevisiae* cells in old cultures. The increased yeast viability during prolonged cultivation with AKG was accompanied by the increased concentrations of total protein and storage carbohydrates, as well as with increase in antioxidant defense.

The rearing in AKG-containing medium increased stress resistance of young adult flies and caused different metabolic effects in young and middle-aged adults. Larvae and young 2-day-old adults, reared on AKG, had higher levels of free amino acids and total protein, and lower levels of triacylglycerides. In addition, AKG-reared flies undergone mild oxidative stress accompanied by stimulation of antioxidant defense, as compared to control flies. Both the synthesis of amino acids and the activation of antioxidant defense might be responsible for the higher resistance of young AKG-reared flies to H₂O₂, cold and heat stresses.

Dietary AKG increased lifespan and delayed functional senescence in *D. melanogaster*, but the effects depended on the concentration of AKG, sex and strain specificity of flies. The most expressed geroprotective effects of AKG were observed in females and they were accompanied by reduced fecundity and improved resistance of middle-aged females to cold and heat stresses. At the same time, the AKG slowed behavioral aging only in *w¹¹¹⁸* flies, but not in Canton S flies. Consumption of AKG-containing food increased the levels of total protein, glucose and TAG, and induced oxidative stress with inhibition of antioxidant defense in middle-aged flies. Collectively, the results suggest that the modulation of age-related metabolic changes rather than modulation of antioxidant defense could underlie the lifespan-prolonging effects of AKG.

Dietary arginine had beneficial effects on larval development and metabolism of young *D. melanogaster* adults. These effects included accelerated pupation and increased total amino acid and protein levels in larvae and flies. In adults, arginine also decreased glucose and triacylglyceride concentrations and induced oxidative stress. Long-term consumption of arginine-supplemented food decreased fecundity and lifespan of flies.

In general, *in vitro* experiments and experiments with model organisms, yeast *S. cerevisiae* and fruit fly *D. melanogaster*, showed that the studied natural substances can act as antioxidants or, on the contrary, stimulate the production of reactive oxygen species depending on the conditions. It was found, that due to their pro-/antioxidant properties, natural substances were able to increase adaptive potential and prolong lifespan of yeasts and fruit flies and as well as they can exhibit toxic effects.

Keywords: alpha-ketoglutarate; antioxidant activity; arginine; quercetin; metabolism; oxidative stress; prooxidant activity; lifespan; *Drosophila melanogaster*; *Rhodiola rosea*; *Saccharomyces cerevisiae*.

АННОТАЦИЯ

Байляк М.М. Повышение адаптационного потенциала дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и плодовой мушки *Drosophila melanogaster* растительными экстрактами, кетокислот и аргинином. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 “Биохимия” (091 – Биология). – Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича, Черновцы, 2019.

Диссертация посвящена изучению стресс-защитных и геропротекторных свойств веществ растительного происхождения (кверцетина и родиолы розовой), а также клеточных метаболитов, альфа-кетоглутарата и аргинина. В *экспериментах in vitro* и с использованием модельных организмов, дрожжей *S. cerevisiae* и плодовой мушки *D. melanogaster*, выявлено, что в зависимости от условий исследуемые природные вещества могут действовать как антиоксиданты, так и прооксиданты. Найдено, что антиоксидантная активность растительных экстрактами была выше при низких рН, а прооксидантная активность – при высоких рН. Водный препарат *R. rosea* в зависимый от концентрации способ проявлял адаптогенное и геропротекторное действие на *S. cerevisiae*. Адаптогенное действие *R. rosea* проявилось в присутствии транскрипционных факторов Msn2/4 и Yap1, а защитное действие кверцетина – только в присутствии белков Msn2 / Msn4. Экзогенный АКГ проявлял стресс-защитное и геропротекторное действие в *S. cerevisiae* и *D. melanogaster* за счет включения в аминокислотный метаболизм и стимуляцию антиоксидантной защиты. Показано, что аргинин, добавленный к пище, ускорял метаболизм и вызвал оксидативный стресс у молодых особей *D. melanogaster*, однако снижал плодовитость самок и сокращал продолжительность жизни мух.

Итак, благодаря про-/антиоксидантным свойствам природные вещества способны как повышать адаптационный потенциал и увеличивать продолжительность жизни организмов, так и проявлять токсические эффекты.

Ключевые слова: альфа-кетоглутарат; антиоксидантная активность; аргинин; кверцетин; метаболизм; оксидативный стресс; прооксидантная активность; продолжительность жизни; *Drosophila melanogaster*; *Rhodiola rosea*; *Saccharomyces cerevisiae*.