Семанюк У.В.
кандидатка біологічних наук,
провідна фахівчиня навчально-наукової лабораторії;
Байляк М.М.
докторка біологічних наук, професорка,
Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника

ВПЛИВ СПОЖИВАННЯ ЧІЛІ НА ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Утворення активних форм кисню (АФК) є невід'ємним аспектом аеробного життя, оскільки АФК є побічними продуктами різних метаболічних шляхів та виробляються деякими специфічними ферментними системами під суворим контролем клітин. АФК трактуються як потенційно небезпечні агенти. Шкідливі ефекти АФК пов'язані з окислювальною модифікацією практично всіх клітинних компонентів. Водночас, АФК також використовуються як сигнальні молекули в різних клітинних процесах, включаючи диференціацію клітин і прогресування клітинного циклу, а також відповідь на позаклітинні стимули. Тому у клітинах за допомогою кількох антиоксидантних механізмів, як специфічних, так і неспецифічних, підтримується низький рівень АФК, достатній для виконання останніми сигнальних функцій. При дисбалансі між утворенням та елімінацією АФК на користь першого виникає оксидативний стрес, який веде до різноманітних порушень та захворювань. Для запобігання розвитку оксидативного стресу активно використовуються екзогенні антиоксиданти, зокрема рослинного походження. Основною роботою антиоксидантів є трансформація АФК у неактивні речовини. Природні харчові антиоксиданти (вітаміни А, С та, поліфеноли) зазвичай діють неспецифічно і активно допомагають клітинних ферментам антиоксидантного захисту (ферменти метаболізму глютатіону, каталаза тощо). Повідомляється, що спеції містять природні хімічні речовини (вітаміни, алкалоїди та флавоноїди), які можуть забезпечувати їхні антиоксидантні властивості [1]. У цій роботі ми дослідили вплив порошку з плодів перцю чілі (*Capsicum fructensces)*, що є поширеною кулінарною спецією, на показники оксидативного стресу у плодової мушки *Drosophila melanogaster*.

Матеріали та методи. У роботі використовували мух *D. melanogaster* лінії *Canton S*. Дорослих мух протягом 15 днів годували

експериментальним живильним середовищем наступного складу: 10% сахарози та 5% сухих дріжджів, 1,2% агару та 0,18% ніпагіну з додаванням різних концентрацій з плодів перцю чілі: 0,04%; 0,12%; 0,4% та 3%. По завершенню експерименту мухи заморожували у рідкому азоті та опісля визначали у них рівень маркерів оксидативного стресу – вміст карбонільних груп білків (маркер окислення білків), пероксидів ліпідів (маркер окислення ліпідів) та тіолових груп (маркер редокс-статусу), активність аконітази (чутливий до окислення фермент), та активність антиоксидантних ферментів: каталази та глютатіон-S-трансферази (GST). Експеримент проводили у чотирьох біологічних повторах.

Для визначення активності аконітази, каталази та GST, заморожені зразки гомогенізували у співвідношенні 1:10 (маса:об'єм) у холодному 50 мМ фосфатному буфері, pH 7,5, що містив 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ ФМСФ (інгібітор протеаз). Центрифугування гомогенатів проводили при 16000 g протягом 15 хв при 4°C у центрифузі Eppendorf 5415R (Німеччина). Для визначення використовували супернатант (надосадову рідину). Активності аконітази, каталази та GST визначали спектрофотометричними методами як описано раніше [2]. Одна одиниця активності аконітази, каталази та GST була визначена як кількість ферменту, що споживає 1 мкмоль субстрату або генерує 1 мкмоль продукту за хвилину. Активність виражали у міжнародних одиницях (або міліодиницях) на міліграм розчинного білка (МО/мг білка). Концентрацію білка вимірювали за методом Бредфорда за допомогою барвника кумасі яскраво-голубого G-250 із використанням сироваткового бичачого альбуміну як стандарту [2].

Для визначення вмісту пероксидів ліпідів (LOOH) мух гомогенізували 1:20 (маса/об'єм) у 95% холодному етанолі (4 °C), центрифугували (1000 g, 10 хв, 4 °C) та відбирали супернатант. Вміст LOOH визначали у зразках методом окисленням заліза пероксидами ліпідів у кислому середовищі та формуванням комплексу окисленого заліза з ксиленоловим оранжевим [3]. Вміст карбонільних груп у білках визначали супернатантах (підготовлених як для вимірювання активності ферментів) за взаємодією цих груп з динітрофенілгідразином як описано у Lushchak et al (2012). Вміст тіолових груп у білках та низькомолекулярних сполуках визначали за модифікованим методом Елмана [4].

Дані представлені як середнє значення ± похибка середнього. Статистичну різницю оцінювали за допомогою однофакторного аналізу ANOVA з подальшим множинними порівняннями за тестом Даннета у програмі Prism Graphpad 5 (GraphPad Software, Сан-Дієго, Каліфорнія, США).

Результати та обговорення. Ми виявили збільшення вмісту пероксидів ліпідів у тілі самців (рис. 1А), що споживали середовище з чілі, але не у самок (рис. 1 Б).

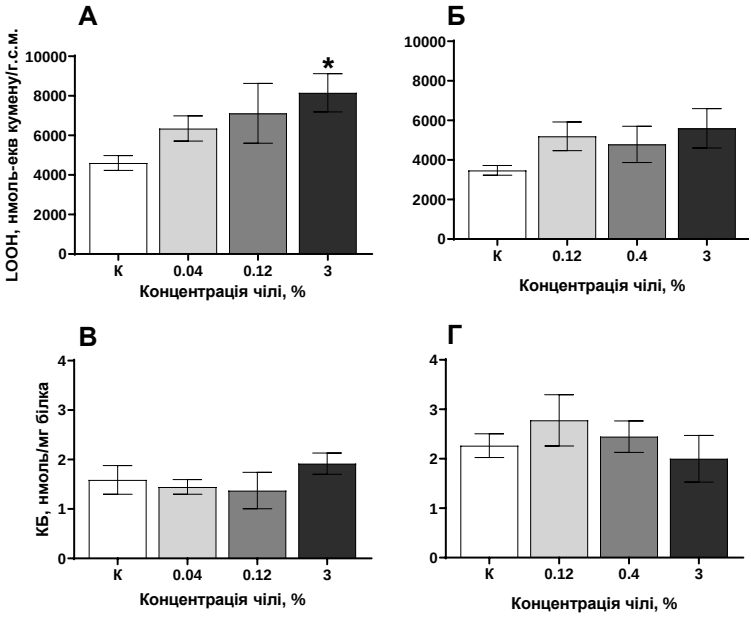

Рис. 1. Вміст пероксидів ліпідів (LOOH)та карбонільних груп білків (КБ) у плодової мушки на середовищі з чілі

* – вказує на суттєву різницю від контрольної групи з $P < 0,05$, n=4. А, В – самці; Б, Г – самки.

Утримування на середовищі з чілі не впливало на вміст карбонільних груп білків у обох статей (рис. 1В, Г). Вміст білкових та низькомолекулярних тіолів у обох статей не відрізнявся між дослідними та контрольними групами (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст білкових (PSH) та низькомолекулярних (LSH)тіолів у плодової мушки на середовищі з чілі

	Самці			
	Контроль	0.04%	0.12%	3%
PSH, μмоль/г.с.м	2.43 ± 0.29	2.19 ± 0.24	2.83 ± 0.55	2.76 ± 0.19
LSH, μмоль/г.с.м	1.06 ± 0.03	1.26 ± 0.18	1.08 ± 0.01	1.09 ± 0.07
	Самки			
	Контроль	0.12%	0.4%	3%
PSH, μмоль/г.с.м	2.88 ± 0.27	2.46 ± 0.12	3.30 ± 0.19	3.10 ± 0.9
LSH, μмоль/г.с.м	1.07 ± 0.03	1.17 ± 0.08	1.07 ± 0.04	1.16 ± 0.03

Результати представлені як середнє значення із 4 повторів на групу.

У самців активність аконітази (ферменту чутливого до окислення) залишалася незмінною (рис. 2А), а у самок – збільшувалась зі збільшення вмісту чілі у середовищі (рис. 2Б). У той же час, ми спостерігали зниження активності GST у самок, що споживали середовище з чілі (рис. 2Г).

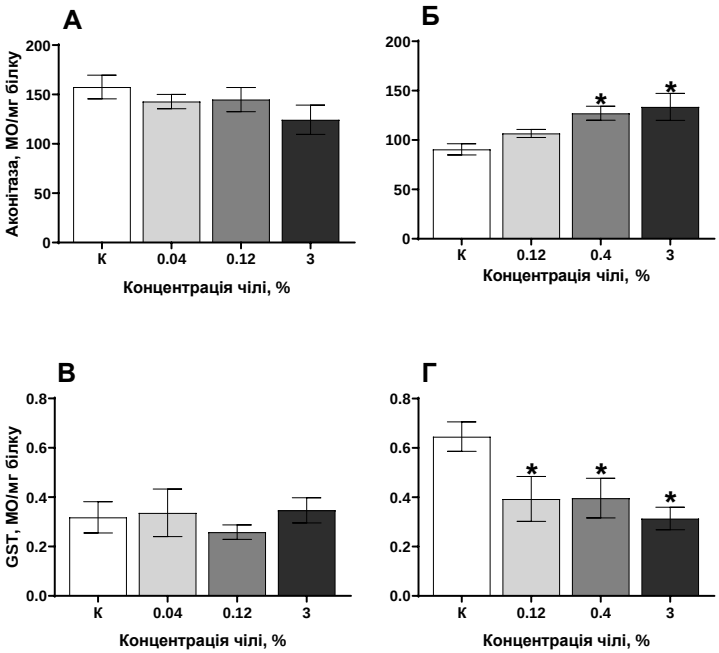

Рис. 2. Активність аконітази та глютатіон-S-трансферази (GST) у плодової мушки на середовищі з чілі

* – вказує на суттєву різницю від контрольної групи з $P < 0,05$, n=4. А, В – самці; Б, Г – самки.

Наше дослідження показує, що споживання чілі по різному впливає на розвиток окисних пошкоджень у самців та самок. Так, споживання чілі у самців, призводило до збільшення вмісту пероксидів ліпідів, що вказує на розвиток оксидативного стресу, що в кінцевому результаті скорочувало тривалість життя досліджуваних самців. Однак у самок, ми спостерігали збільшення активності аконітази, ферменту, що є індикатором оксидативного стресу. Збільшення активності аконітази та зниження активності глютатіон-S-трансферази разом вказує на те, що у

самок чілі проявляє антиоксидантні властивості та запобігає окисним пошкодженням біомолекул.

Висновки. Наші дані показують, що споживання перцю чілі посилює окисні процеси у самців, та навпаки проявляє антиоксидантну дію у самок, що вказує на існування статевих відмінностей у метаболізмі чілі.

Подяка. Дослідження було підтримано грантом від Національного фонду досліджень України (№ проєкту 2020.02/0118).

Список використаних джерел:

1. O. V. Lozinsky et al. S-nitrosoglutathione-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*: Delayed pupation and induced mild oxidative/nitrosative stress in eclosed flies, Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol., 2013, 164, 162–170.

2. O. M. Strilbytska et al. Anise hyssop *Agastache foeniculum* increases lifespan, stress resistance, and metabolism by affecting free radical processes in *Drosophila*, Front. Physiol., 2020, 11, 596729.

3. O. V. Lushchak et al. Balance between macronutrients affects life span and functional senescence in fruit fly *Drosophila melanogaster*, J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci., 2012, 67, 118–125.

4. M. M. Bayliak et al. Dietary alpha-ketoglutarate increases cold tolerance in *Drosophila melanogaster* and enhances protein pool and antioxidant defense in sex-specific manner, J. Therm. Biol., 2016, 60, 1–11.