

види бродіння, окислюють та розкладають органічні сполуки. Кожний тип бродіння спричиняється певною групою мікроорганізмів. Найчастіше в процесах бродіння мікроорганізми використовують вуглеводи, зокрема глюкозу. При всіх видах бродіння глюкоза спочатку піддається гліколізу з утворенням піровиноградної кислоти. Далі, в залежності від збудника бродіння, піровиноградна кислота залучається до тих чи інших реакцій, в результаті яких утворюються специфічні кінцеві продукти.

УЧАСТЬ БІЛКІВ NRF2 ТА KEAP1 У РЕГУЛЯЦІЇ МЕТАБОЛІЗМУ ТА СТІЙКОСТІ ПЛОДОВОЇ МУШКИ ДО СТРЕСІВ

Дем'янчук О.І., Сітко М.В.

ДВНЗ «Прикарпатський національний університет ім. Василя Стефаника»

Науковий керівник – Байляк М.М., кандидат біологічних наук,
доцент кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету
імені Василя Стефаника

Для уникнення токсичної дії стресорів у клітинах живих організмів виробились складні системи захисту. Однією з таких захисних систем є редокс-чутлива сигнальна система Nrf2-Keap1, яка включає в себе транскрипційний фактор Nrf2 та його репресорний білок Keap1. За нестресових умов білок Nrf2 зв'язується з білком Keap1 та піддається протеолітичній деградації. За дії токсичних речовин та оксидативного стресу білок Keap1 зазнає окислення і втрачає здатність зв'язуватися з Nrf2. Вільний транскрипційний фактор Nrf2 переміщується у ядро і активує експресію захисних генів. Зокрема, це гени, які кодують ферменти детоксикації ксенобіотиків (глутатіон-S-трансфераза) та синтезу низькомолекулярного антиоксиданту глутатіону. Окрім захисних білків, Nrf2 регулює експресію генів, залучених у енергетичний метаболізм, а також у роботу мітохондрій (Hayes and Dinkova-Kostova, 2014).

Система Nrf2-Keap1 виявилась консервативною у еволюційно віддалених видів (Pitoniak and Bohmann, 2015). Так, дослідження показують, що система Nrf2-Keap1 виконує у плодової мушки *Drosophila melanogaster* ті ж захисні функції, що і у ссавців (Pitoniak and Bohmann, 2015). Водночас, окремі роботи показали, що білки Nrf2 і Keap1 можуть брати участь у метаморфозі личинок (Deng and Kerppola, 2013) та впливати на ліпідний обмін у мух (Karim et al, 2015). Проте чітка роль білків Nrf2 і Keap1 у регуляції розвитку, стійкості до стресів, регуляції енергетичного обміну та редокс-гомеостазу у плодової мушки залишається до кінця нез'ясованою, що і стало об'єктом наших досліджень.

У роботі використовували *D. melanogaster* ліній y^1w^{67c23} (яку приймали за контрольну) та похідні від неї лінії – *keap1* (y^1w^{67c23} ; P{EPgy2}Keap1^{EY02632}) та *nrf2* (y^1w^{67c23} ; P{EPgy2}cnc^{EY08884}). Мух вирощували на дріжджово-сахарозному середовищі, слідкуючи за появою личинок та лялечок. Мух дводенного віку розділяли за статтю та використовували для фізіологічних тестів (стійкість до нітропрусиду натрію та голодування) та біохімічних аналізів (визначення вмісту основних метаболітів, показників оксидативного стресу та респіраторної активності мітохондрій).

У ході проведених досліджень встановлено, що личинки *D. melanogaster*, дефектних за білками Nrf2 так Keap1 лялькувалися повільніше, ніж личинки контрольної лінії. Це може пояснюватися тим, що за відсутності як білка Keap1, так і білка Nrf2, знижується синтез екдизону – гормону линьки, який відповідає за перетворення личинок в лялечки (Deng and Keppola, 2013). Експерименти по оцінці стійкості молодих імаго до нітропрусиду натрію (НПН), відомого судинорозширювального засобу, який у високих концентраціях проявляє токсичність, показали, що НПН призводив до зниження виживання мух і найстійкішими до НПН виявились самці та самки лінії *keap1*. Водночас самці лінії *nrf2* виявились більш чутливими до НПН, ніж особини контрольної лінії та лінії *keap1*. Динаміка загибелі самок лінії *nrf2* за впливу НПН була подібною до такої у самок контрольної лінії. Отримані результати підтверджують важливу роль білка Nrf2 у забезпеченні стійкості до токсикантів.

Для оцінки захисного потенціалу у мух досліджуваних ліній було визначено активність глутатіон-S-трансферази (GST), вміст пероксидів ліпідів та низькомолекулярних тіолів (табл. 1).

Таблиця 1 – Показники про-/антиоксидантного захисту у тілі дводенних особин *D. melanogaster* лінії у¹w^{67c23} (контроль) та похідних від неї ліній *keap1* та *nrf2*

	Самці			Самки		
	контроль	<i>keap1</i>	<i>nrf2</i>	контроль	<i>keap1</i>	<i>nrf2</i>
Активність глутатіон-S-трансферази, мОд/мг білка	133±16	249±45*	151±17	123±13	153±19	105±19
Вміст пероксидів ліпідів, ммоль-екв кумену/г.с.м.	4,94±1,76	1,18±0,53*	4,09±1,42	2,90±0,82	0,851±0,241*	3,73±1,11
Вміст низькомолекулярних тіолів, мкмоль/г.с.м.	0,619±0,092	0,741±0,116	1,02±0,11*	0,658±0,062	1,13±0,11* [#]	0,939±0,088*

Значення вірогідно відрізняється від відповідного значення контрольної лінії та #від відповідного значення у самців, P < 0,05 за тестом Стьюдента, n=5-8.

У самців лінії *keap1* активність GST була вищою, ніж у особин контрольної лінії. Водночас, у самців *nrf2* та самок обох мутантних ліній активність ферменту не відрізнялась від значень контрольної лінії. Вміст низькомолекулярних тіолів був вищим у самців лінії *nrf2* та самок ліній *keap1* та *nrf2*, порівняно з контрольною лінією. Вміст пероксидів ліпідів був суттєво нижчим у самців і самок лінії *keap1*, проте у мух обох статей лінії *nrf2* не відрізнявся від контрольних значень. Отримані результати свідчать про те, що за активації білка Nrf2 (лінія *keap1*) потужність антиоксидантного захисту підвищується, а рівень окисних пошкоджень біомолекул знижується. Проте відсутність білка Nrf2 (лінія *nrf2*) не підвищує рівень окисних пошкоджень ліпідів та, навпаки, збільшує вміст низькомолекулярних тіолів. Це може вказувати на активацію у плодової мушки компенсаторних механізмів за відсутності білка Nrf2. На наступному етапі роботи ми дослідили вплив інактивації генів Keap1 або Nrf2 на вміст деяких метаболітів та активність ферментів обміну вуглеводів у тілі дорослих мух. Конститутивна активація білка Nrf2 зумовлювала вищий вміст глюкози та нижчий вміст триацилгліцеридів в обох статей з одночасно вищою активністю деяких ферментів метаболізму вуглеводів (гексокінази та глікогенфосфорилази) у самців, але не у

самок (табл. 2). Відсутність білка Nrf2 не впливала на вміст вказаних метаболітів в обох статей, проте підвищувала вміст загального білка та активність гексокінази у самок та активність глікогенфосфорилази у самців. Вміст глікогену та ТАГ значною мірою визначає виживання мух за умов нестачі поживних речовин (Bayliak et al., 2019). Тому ми порівняли стійкість досліджуваних ліній до голодування. Самці та самки лінії дефектної за білком Keap1, виявилися більш стійкими до умов голодування, ніж мухи контрольної лінії, та гинули повільніше.

Деякими дослідженнями було показано, що система Keap1-Nrf2 регулює респіраторну активність мітохондрій, їх цілісність та біогенез (Holmström et al., 2013), тому нами визначено респіраторні характеристики мітохондрій, виділених з тіл мух досліджуваних ліній.

Таблиця 2 – Сира маса тіла, вміст деяких метаболітів та активність ферментів обміну вуглеводів у тілі дводенних особин *D. melanogaster* лінії y^1w^{67c23} (контроль) та похідних від неї ліній *keap1* та *nrf2*

	Самці			Самки		
	контроль	<i>keap1</i>	<i>nrf2</i>	контроль	<i>keap1</i>	<i>nrf2</i>
Маса тіла, мкг	617±75	689±59	628±18	1100±68	1171±65	1343±61
Водорозчинний білок, мг/г.с.м.	57,7±5,7	51,3±5,3	48,7±4,4	47,0±3,4	48,8±6,4	68,0±7,7* [#]
ТАГ, мг/г.с.м.	10,5±2,0	4,97±0,99*	9,74±1,7 7	12,4±2,1	6,77±1,10*	8,40±1,53
Глюкоза, мг/г.с.м.	6,39±1,16 8	11,2±2,0*	9,21±1,5 5	6,69±1,452	11,06±0,98*	7,01±1,35
Глікоген, мг/г.с.м.	4,18±0,74	5,46±1,07	4,38±0,9 4	3,94±0,62	7,06±0,89*	4,47±1,13
Активність гексокінази, мОд/мг білка	199±20	313±34*	232±26	182±13	240±26	289±29*
Активність глікоген-фосфорилази, мОд/мг білка	20,0±0,7	26,1±1,1*	29,2±3,2 *	24,6±1,3	23,6±1,7	22,4±1,7

*Значення вірогідно відрізняється від відповідного значення контрольної лінії та #від відповідного значення у самців, P <0,05 за тестом Стьюдента, n=7-8.

Дефекти за білками Nrf2 та Keap1 не впливали суттєво на дихальну активність мітохондрій самців (споживання кисню комплексами I-IV, показник дихального контролю та співвідношення ADP/O), проте зумовлювати зміни у показниках респіраторної активності мітохондрій самок. У самок дефектними за геном *keap1* достовірно нижчими були споживання кисню комплексом IV (цитохром-с-оксидаза), показник дихального контролю, який показує ступінь спряженості дихання та фосфорилування), та коефіцієнт ефективності окисного фосфорилування АДФ/[O]. НАДН-залежне (комплекс I) та сукцинат-залежне (комплекс II) споживання кисню мітохондріями, виділеними з самок дефектними за геном *nrf2*, теж демонстрували тенденцію до зниження, порівняно з такими показниками для мітохондрій самок контрольної лінії.

Загалом наші результати свідчать про те, що як відсутність, так і підвищена активація білка Nrf2 має вплив на розвиток, антиоксидантний захист та енергетичний метаболізм плодової мушки. Активація білка Nrf2 призводить до посилення антиоксидантного захисту та стійкості до ксенобіотиків у обох статей, проте по-різному впливає на енергетичний обмін у самців і самок.