

НАВРОЦЬКА В. В.[✉], **САПОТА Ю. Ю.***Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,**Україна, 61022, Харків, м. Свободи, 4, e-mail: valeriy.navrotskaya@ukr.net, artwinter27@gmail.com*[✉] *valeriya.navrotskaya@ukr.net, (050) 157-60-57*

АНАЛІЗ РОЛІ КІНУРЕНІНОВОГО МЕТАБОЛІЗМУ У КОНТРОЛІ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ДРОЗОФІЛИ ЗА ВПЛИВУ ДІЄТИ З ВИСОКИМ ВМІСТОМ ЦУКРУ

Мета. Аналіз життєздатності і тривалості життя дрозозфіли за генетичного і фармакологічного пригнічення триптофан-кінуренінового метаболізму під час утримання на стандартному поживному середовищі та на середовищі з підвищеною концентрацією цукру. **Методи.** Використано лінію дикого типу та лінію – носій мутації *vermilion*. Аналізували життєздатність (кількість нащадків і відсоток загиблих лялечок) і медіанну тривалість життя імаго. **Результати.** Дієта з високим вмістом цукру негативно позначається на життєздатності дрозозфіли, призводячи до підвищення загибелі особин на стадії лялечки і зниження тривалості життя самців; лінія дикого типу є більш чутливою до впливу цієї дієти у порівнянні з лінією – носієм мутації. Встановлено захисний ефект додавання берберину (інгібітора триптофандіоксигенази) до поживного середовища з підвищеним вмістом цукру – тривалість життя самців лінії дикого типу у цьому варіанті наближається до контрольного значення, а у самок перевищує його. **Висновки.** Зниження кількості кінуренінів в організмі дрозозфіли (шляхом генетичного або фармакологічного пригнічення перетворення триптофану у кінуренін) може сприяти ослабленню негативних наслідків дієти з високим вмістом цукру.

Ключові слова: дрозозфіла, життєздатність, тривалість життя, триптофан-кінуреніновий шлях метаболізму, дієта з високим вмістом цукру.

Нааявні літературні дані дозволяють припустити існування зв'язків між кінуреніновим метаболічним шляхом і формуванням інсулінорезистентності [1]. Встановлено підвищення рівня метаболітів такого шляху (кінуренінів) у плазмі за окресленого захворювання, виявлено кореляцію між порушенням регуляції цієї ланки обміну речовин із рівнем інсулінорезистентності [2]. Наукові дослідження робіт свідчать про те, що ряд метаболітів кінуреніну мають діабет-

тогенний ефект у ссавців [3, 4], а гіперглікемія посилює, перетворення триптофану за кінуреніновим шляхом, тому, безсумнівно, існує зв'язок між розвитком цукрового діабету II типу і балансом кінуренінів в організмі. Регуляція кінуренінового метаболізму фармакологічними агентами (інгібіторами ферментів, метаболітами цього шляху обміну) розглядається сьогодні як нова стратегія у терапії метаболічних розладів, у тому числі діабету [5].

За даними [6], дієта з високим вмістом цукру викликає у дрозозфіли інсулінорезистентність, гіперглікемію, підвищення рівня тригліцеридів та вільних жирних кислот, тобто ознаки цукрового діабету II типу, що дозволяє моделювати діабет на дрозозфілі. Особини, що розвиваються на середовищі з підвищеним вмістом цукру, мають знижену масу тіла, а також характеризуються затримкою розвитку. У відповідь на високий рівень цукрози у поживному середовищі у мух спостерігали підвищення рівня інсулін-подібних пептидів, але рівень циркулюючих цукрів при цьому не знижувався, у чому і полягає подібність з інсулінорезистентністю ссавців [6].

Мутації дрозозфіли, які інгібують триптофан-кінуреніновий шлях і знижують вміст кінуренінів в організмі (*white*, *vermilion* та ін.) є моделлю, яка дозволяє експериментально вивчати роль кінуренінів у розвитку інсулінорезистентності та її наслідків в організмі. Роботи, у тому числі і проведені на кафедрі генетики і цитології ХНУ, показали, що зниження інтенсивності кінуренінового шляху обміну триптофану може ослаблювати негативні наслідки дієти з високим вмістом цукру у дрозозфіли [7, 8]. Пропонована робота є продовженням досліджень у цьому напрямку.

Метою роботи було дослідження життєздатності і тривалості життя дрозозфіли за генетичного (введення у генотип мутації *vermilion*, яка порушує синтез ферменту триптофандіоксигенази, першого ферменту на шляху перетво-

рення триптофану у кінуреніні, що призводить до відсутності кінуренінів) і фармакологічного (додавання до поживного середовища берберину – інгібітора триптофандиоксигенази) пригнічення триптофан-кінуренінового метаболізму під час утримання на стандартному поживному середовищі та на середовищі з підвищеною концентрацією цукру.

Матеріали і методи

Використано дві лінії з колекції кафедри генетики та цитології біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна: лінію дикого типу *Oregon-R* (*Or*), мутантну лінію *vermilion* (*v*). Мутація *vermilion* шляхом насичуючих схрещувань була переведена на генетичний фон лінії *Or*; у результатах досліджень вона позначається *v(Or)*. Отже, лінії *Or* і *v(Or)* відрізняються лише наявністю мутантного гена *vermilion*.

Для вирощування мух у частині дослідів використовувалося стандартне цукрово-дріжджове середовище (на 100 мл води – 1 г агар-агару, 15 г дріжджів, 5 г цукру, 5 г манної крупи). Його розливали у пробірки, зверху поміщали суспензію дріжджів. У другій частині дослідів використовували середовище з підвищеним вмістом цукру; концентрація цукру при цьому складала 0,67 М (проти 0,15 М у стандартному середовищі); вміст інших компонентів був такий самий, як у стандартному середовищі. Стандартне середовище позначене STM, середовище з підвищеним вмістом цукру – HSD (high sugar diet). У низці дослідів до поживного середовища додавали берберин (Sigma Aldrich Chemical Co, USA) у дозі 1 мМ. Берберин є алкалоїдом з *Berberis aristata*, барбарису остистого. Екстракти з пагонів барбарису (головним компонентом яких є берберин) мають широкий спектр терапевтичних властивостей, у тому числі протизапальні, антиканцерогенні, стимулятори імунітету [9]; також відомо, що берберин є одним із найбільш потужних інгібіторів триптофандиоксигенази [10]. Таким чином, за допомогою берберину можна фармакологічно пригнічувати кінуреніновий шлях.

Життєздатність визначали за кількістю нащадків, отриманих від двох батьківських пар. Для цього підраховували кількість пупаріїв у пробірках. При цьому також оцінювали загибель на стадії лялечки – за відсотком пупаріїв, з яких не вийшли мухи, від загальної кількості пупаріїв. Отримані показники аналізували у 10–

15 повторностях. Перевірку розподілу даних проводили, використовуючи критерій Шапіро-Уїлка. Оскільки розподіл відповідав нормальному закону, для порівняння груп використовували параметричний метод; значущість відмінностей оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Для оцінки тривалості життя одноденних дорослих мух збирали і регулярно пересажували на свіже середовище кожні 3–4 дні. Кількість загиблих мух записували у момент пересадки. В кожній експериментальній групі було досліджено близько ста мух. Розраховували медіанну тривалість життя самок та самців – точковий параметр тривалості життя; для розрахунків статистичної значущості відмінностей за цим показником використовували медіанний тест. У роботі прийнятий рівень значущості $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Утримання лінії дикого типу і носія мутації на середовищі з високим вмістом цукру не призвело до зниження кількості нащадків. Значення показника «кількість лялечок» значуще не відрізняються у контролі та досліді в межах тієї самої лінії. Введення гена *vermilion* до генотипу лінії дикого типу призвело до зростання життєздатності особин – кількість отриманих нащадків у лінії *v(Or)* вища на 27 %, ніж у лінії дикого типу, а відсоток загиблих лялечок нижчі на 37 %; відмінності статистично значущі.

Однак відсоток загиблих лялечок зростає за розведення цих ліній на середовищі з високим вмістом цукру: на 100 % у лінії дикого типу і на 62 % у лінії – носія мутації *vermilion* (ця відмінність між реакцією двох ліній є статистично значущою). Таким чином, дієта з високим вмістом цукру негативно позначається на життєздатності дрозозфіли, призводячи до підвищення загибелі особин на стадії лялечки; це характерно для обох використаних ліній: і лінії дикого типу, і лінії з порушеним триптофан-кінуреніновим метаболізмом (хоча для останньої – в меншій мірі).

В одному з варіантів дослідів лінію дикого типу *Or* утримували на середовищі з високою концентрацією цукру за одночасного додавання до поживного середовища берберину – інгібітора триптофандиоксигенази, тобто здійснюючи фармакологічне інгібування перетворення триптофану у кінуренін. Як видно з даних таблиці, показники кількості нащадків і % загиблих лялечок значуще не відрізняються за порівняння варіантів *Or*, HSD і *Or*, HSD+берберин. Підви-

щений рівень % загиблих лялечок під час розвитку на середовищі з високою концентрацією цукру зберігається і у варіанті із застосуванням берберину. Отже, додавання до поживного середовища цієї сполуки не змінює реакцію лінії на пошкоджуючий вплив високої концентрації цукру.

Найбільші відмінності у значеннях медіанної тривалості життя встановлені у ході порівняння показника у лінії дикого типу і мутантної у варіанті з розведенням мух на стандартному середовищі (рис. 1). У лінії *v(Or)* значення цього показника вищі на 20 % для самок і 15 % для самців. Збільшення тривалості життя особин *vermilion*, у порівнянні з мухами дикого типу, узгоджується з даними, отриманими раніше [11]. Оскільки триптофан є вихідним субстратом біосинтезу мелатоніну, можна припустити, що зниження перетворення триптофану по кінуреніновому шляху може призводити до збільшення вмісту мелатоніну, який, як відомо, збільшує тривалість життя у двокрилих. З огляду на нейротоксичні властивості деяких кінуренінів та їх здатність індукувати накопичення вільних радикалів, можна припускати, що більший їх вміст в організмі може сприяти процесам старіння, а зниження – протидіяти йому [12].

Дієта з підвищеним вмістом цукру спричинила зниження тривалості життя самців обох ліній: для лінії дикого типу – на 21 %, для лінії – носія мутації – лише на 7 % (у порівнянні із значеннями медіанної тривалості життя імаго, отриманими на стандартному середовищі). Ці результати узгоджуються з даними, одержаними раніше, про те, що зниження інтенсивності кінуренінового шляху (внаслідок генетичного його пригнічення у мутантів *white*, *vermilion*) може ослаблювати негативні наслідки дієти з високим

вмістом цукру у дрозофіли, наприклад, затримку розвитку [7, 8].

Позитивний вплив мутації *vermilion* на тривалість життя зберігається і під час вирощування мух на середовищі з підвищеним вмістом цукру: носії мутації характеризуються більшими значеннями показника, ніж мухи лінії дикого типу, і у цьому варіанті досліджу (це характерно для самців).

Встановлено також вплив фармакологічного пригнічення триптофан-кінуренінового метаболізму у лінії дикого типу (рис. 2) на тривалість життя імаго дрозофіли. Виявлено захисний ефект додавання берберину до поживного середовища з підвищеним вмістом цукру: тривалість життя самців лінії *Or* у цьому варіанті наближається до контрольного значення, а у самок навіть перевищує його.

Захисний ефект берберину встановлено раніше і щодо сповільнення темпу старіння за підвищеної температури утримання мух [13]. Про позитивний ефект берберину стосовно зниження проявів цукрового діабету II типу повідомлялося раніше [14], як і щодо корекції інших патологічних станів; при цьому багато авторів пов'язують лікарський потенціал цього препарату в т. ч. із пригніченням кінуренінового шляху [10].

Протекторний ефект берберину може бути пов'язаний і з його антиоксидантною дією [15]. Альтернативним механізмом ефектів берберину, що ми спостерігаємо, може бути берберин-асоційоване пригнічення триптофан-кінуренінового метаболізму, на користь чого свідчать відмінності у реакції мух мутантної лінії у порівнянні з мухами дикого типу: у варіанті із лінією *vermilion* берберин мав менший за силою захисний ефект [13].

Таблиця. Кількість нащадків і % загиблих лялечок у лініях *Oregon-R* і *vermilion(Or)* за утримання на стандартному середовищі і на середовищі з високим вмістом цукру (середні значення та їх помилки)

Лінія, варіант досліджу	Кількість нащадків	% загиблих лялечок
<i>Or</i> , STM	116,7±5,0	6,1±0,5
<i>Or</i> , HSD	115,5±4,3	12,2±0,9
<i>Or</i> , HSD+берберин	116,9±4,0	14,0±1,0
<i>v(Or)</i> , STM	148,2±7,8	3,9±0,4
<i>v(Or)</i> , HSD	143,3±6,2	6,3±0,5

Примітки: STM – стандартне поживне середовище, HSD – поживне середовище з підвищеним вмістом цукру.

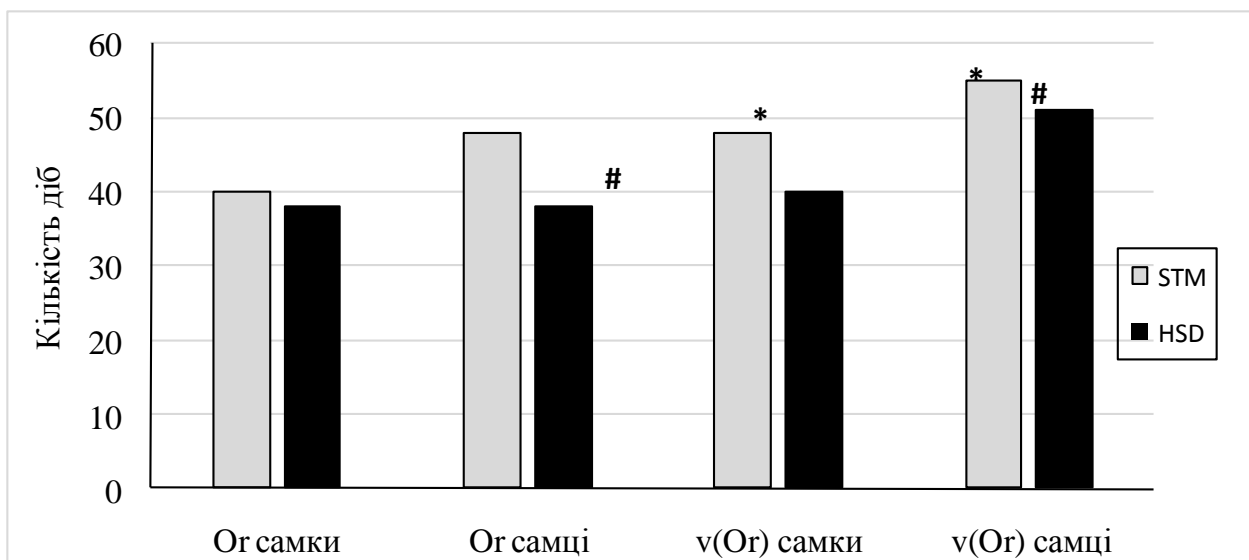


Рис. 1. Медіанна тривалість життя імаго самців і самок ліній *Or* і *v(Or)*, отриманих на стандартному середовищі і на середовищі з високим вмістом цукру. * – статистично значуще у порівнянні з лінією *Or*; # – статистично значуще у порівнянні з варіантом STM.

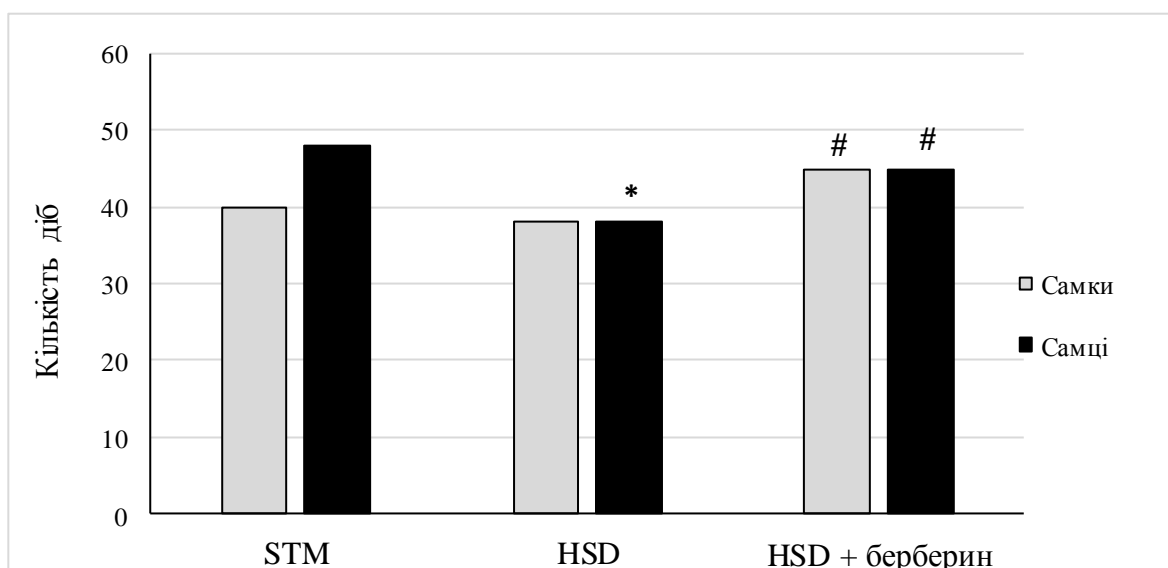


Рис. 2. Медіанна тривалість життя імаго самців і самок лінії *Or*, отриманих на стандартному середовищі і на середовищі з високим вмістом цукру (без і з додаванням берберину). * – статистично значуще у порівнянні з варіантом STM; # – статистично значуще у порівнянні з варіантом HSD.

Висновки

На сьогодні встановлено, що зниження кількості кінуренинів в організмі дрософіли (шляхом генетичного або фармакологічного пригнічення перетворення триптофану у кінуренин)

може сприяти ослабленню негативних наслідків дієти з високим вмістом цукру, призводячи до підвищення життєздатності дрософіли і подовження тривалості життя.

References

1. Oxenkrug G. Insulin resistance and dysregulation of tryptophan–kynurenine and kynurenine–nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways. *Mol Neurobiol.* 2013. Vol. 48. P. 294–301. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8497-4>.
2. Oxenkrug G.F. Increased plasma levels of xanthurenic and kynurenic acids in type 2 diabetes. *Mol. Neurobiol.* 2015. Vol. 52 (2). P. 805–810. doi: 10.1007/s12035-015-9232-0.

3. Meiramov G.G., Andreeva A.P., Konert K.D. Investigation of diabetogenic action of xanthurenic acid. *Biull Eksp Biol Med.* 1997. Vol. 123 (6). P. 669–672. [in Russian] / Мейрамов Г.Г., Андреева А.П., Конерт К.Д. К исследованию диабетогенного действия кантуреновой кислоты. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 1997. Т. 123 (6). С. 669–672.
4. Oxenkrug G.F., Turski W.A., Zgrajka W., Weinstock J.V., Summergrad P. Tryptophan-kynurenine metabolism and insulin resistance in hepatitis C patients. *Hepat. Res. Treat.* 2013. ID 149247. doi: 10.1155/2013/149247.
5. Liu J.J., Movassat J., Portha B. Emerging role for kynurenines in metabolic pathologies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2019. Vol. 22 (1). P. 82–90. doi: 10.1097/MCO.0000000000000529.
6. Musselman L.P., Fink J.L., Narzinski K., Ramachandran P.V., Hathiramani S.S., Cagan R.L., Baranski T.J. A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* 2011. Vol. 4. P. 842–849. doi: 10.1242/dmm.007948.
7. Navrotskaya V., Oxenkrug G., Vorobyova L., Summergrad P. Attenuation of high sucrose diet-induced insulin resistance in ABC transporter deficient *white* mutant of *Drosophila melanogaster*. *Integr. Obesity Diabetes.* 2016. Vol. 2 (2). P. 187–190.
8. Navrotskaya V., Oxenkrug G., Vorobyova L., Summergrad P. Attenuation of high sucrose diet-induced insulin resistance in tryptophan 2,3-dioxygenase deficient *Drosophila melanogaster vermilion* mutants. *Integr. Obesity Diabetes.* 2015. Vol. 1 (4). P. 93–95. doi: 10.15761/iob.1000120.
9. Das S., Das M.K., Mazumder P.M. Cytotoxic activity of methanolic extract of *Berberis aristata* DC on colon cancer. *Global Journal of Pharmacology.* 2009. Vol. 3 (3). P. 137–140.
10. Yu C.J., Zheng M.F., Kuang C.X., Huang W.D., Yang Q. Oren-gedoku-to and its constituents with therapeutic potential in Alzheimer's disease inhibit indoleamine 2, 3-dioxygenase activity *in vitro*. *J. Alzheimers Dis.* 2010. Vol. 22, No. 1. P. 257–266. doi: 10.3233/JAD-2010-100684.
11. Oxenkrug G. F. The extended life span of *Drosophila melanogaster* eye-color (*white* and *vermilion*) mutants with impaired formation of kynurenine. *J. Neural. Transm.* 2010. Vol. 117. P. 23–26.
12. Ocampo J.R., Huitrón R.L., González-Esquivel D., Ugalde-Muñiz P., Jiménez-Anguiano A., Pineda B., Pedraza-Chaverri J., Ríos C., Pérez de la Cruz V. Kynurenines with neuroactive and redox properties: relevance to aging and brain diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2014. Vol. 2014. Article ID 646909. doi: 10.1155/2014/646909.
13. Navrotskaya V., Oxenkrug G., Vorobyova L.I., Summergrad P. Berberine attenuated aging-accelerating effect of high temperature in drosophila model. *Amer. J. Plant Sci.* 2014. No. 5. P. 275–278. doi: 10.4236/ajps.2014.53037.
14. Jun Yin, Jianping Ye, Weiping Jia Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2012. Vol. 2 (4). P. 327–334. doi: 10.1016/j.apsb.2012.06.003.
15. Ji H.F., Shen L. Berberine, a potential multipotent natural product to combat Alzheimer's disease. *Molecules.* 2011. Vol. 16. P. 6732–6740. doi: 10.3390/molecules16086732.

NAVROTSKAYA V.V., SAPOTA Yu.Yu.

V.N. Karazin Kharkiv National University,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 4, e-mail: valeriya.navrotskaya@ukr.net, artwinter27@gmail.com

ANALYSIS OF THE ROLE OF KYNURENINE METABOLISM IN DROSOPHILA VIABILITY CONTROL AT THE HIGH SUGAR DIET INFLUENCE

Aim. To analyze viability and life span of drosophila at genetic and pharmacological inhibition of tryptophan-kynurenine metabolism, when cultivating on the standard nutritive medium and at a high sugar diet. **Methods.** Wild type stock and the stock with *vermilion* mutation have been used. Viability (number of individuals, mortality at the pupal stage) and median life span of imagoes have been determined. **Results.** High sugar diet has been found to negatively affect the viability of drosophila, leading to increased mortality at the pupal stage and decrease of males' life span; wild-type stock is less resistant to the influence of such diet as compared with mutant stock. Berberine (an inhibitor of tryptophan dioxygenase) when added to the high sugar nutritive medium reduces the negative effect of a high sugar diet on life span of the wild-type stock: males' life span reaches control values and in females life span is even more than in the control. **Conclusions.** Decrease of kynurenines content in the flies organisms (both at the genetic and pharmacological inhibition of tryptophan-kynurenine metabolism) may attenuate negative influence of the high sugar diet.

Keywords: drosophila, viability, life span, kynurenine pathway of tryptophan metabolism, high sugar diet.