

ФРУКТОЗА ЯК ФАКТОР РОЗВИТКУ КАРБОНІЛЬНОГО І ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСІВ ТА ПРИСКОРЕНОГО СТАРІННЯ ДРІЖДЖІВ *Saccharomyces cerevisiae*

Л. М. ЛОЗІНСЬКА, Г. М. СЕМЧИШИН

*Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника,
Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: semchyshyn@pu.if.ua*

*Надмірне та тривале споживання фруктози може призводити до розвитку метаболічних порушень. Проте механізми, задіяні в цьому процесі, вивчені недостатньо. У роботі використано пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* як модель для порівняння впливу тривалого споживання глюкози та фруктози в різних концентраціях на деякі фізіолого-біохімічні показники евкаріотів. Показано, що в середовищі культивування, яке містило фруктозу, клітини дріжджів швидше ростуть, характеризуються вищою метаболічною активністю та внутрішньоклітинним вмістом глікогену і окислених протеїнів. Ці спостереження добре узгоджуються з даними про те, що *in vitro* фруктоза активніше, ніж глюкоза, вступає в реакцію глікації, продуктами якої є високореакційні α -дикарбонільні сполуки та активовані форми кисню. Отже, інтенсивність карбонільного та оксидативного стресів є вищою у клітинах дріжджів, які ростуть на фруктозі. Ця особливість може пояснювати прискорене старіння дріжджів, які використовують фруктозу як джерело карбону та енергії, порівняно з клітинами, які ростуть на глюкозі. Слід зауважити, що обмеження вуглеводів сповільнює ріст дріжджів, супроводжується низькою динамікою запасання глікогену та накопичення окислених протеїнів, а також не виявляє суттєвих відмінностей між показниками старіння, карбонільного та оксидативного стресів у клітинах, які ростуть на глюкозі і фруктозі.*

Ключові слова: Saccharomyces cerevisiae, глюкоза, фруктоза, глікоген, метаболічна активність, карбонільний стрес, оксидативний стрес, старіння.

В останні десятиліття значно зросло і продовжує зростати споживання харчової фруктози [1–3]. Більшість дієтологів переконані, що фруктоза є безпечнішою і кориснішою, ніж глюкоза. А отже, часто пропонують саме фруктозу, як заміник глюкози для різних категорій населення, особливо для людей, хворих на цукровий діабет. І дійсно, у порівнянні з глюкозою, фруктоза швидше включається в метаболізм, не потребує інсуліну для засвоєння та має низку інших переваг. Крім того, в модельних дослідженнях встановлено, що фруктоза, на відміну від глюкози, за умови короткотривалого споживання ефективніше захищає клітину від оксидативного стресу [4, 5]. Грунтуючись на одержаних результатах, дослідники пропонують застосовувати короткотривале включення фруктози в раціон пацієнтів з нейродегенеративними та раковими захворюваннями, атеросклерозом, гострими запальними процесами та іншими патологіями, пов'язаними з розвитком оксидативного стресу. Проте у згаданих вище роботах наголошується про небезпечність тривалого споживання фруктози, яке може при-

зводити до розвитку метаболічного синдрому, ожиріння, цукрового діабету, гіпертензії, хвороб нирок, серця, печінки тощо [4–8]. На жаль, механізми розвитку порушень, спричинених тривалим споживанням фруктози, залишаються вивченими недостатньо.

Глікація вважається однією з імовірних причин різноманітних ускладнень та швидкого старіння [9, 11]. Процес глікації, відомий також як реакція Майяра (Maillard reaction), є неензиматичним глікозилюванням, в якому карбонільні групи редуруючих вуглеводів взаємодіють з аміногрупами біомолекул (рис. 1). За участю глюкози і фруктози процес має назву глюкації і фруктації відповідно. Оскільки глюкоза є найпоширенішим внутрішньоклітинним та позаклітинним моносахаридом у живих організмах, переважна більшість досліджень у цій галузі присвячена процесу глюкації. Проте фруктоза є сильнішим відновником і активніше вступає в реакцію глікації, ніж глюкоза [12, 13].

Пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* є однією з найпопулярніших модельних систем для вивчення різноманітних захворювань

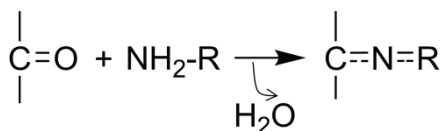


Рис. 1. Реакція глікації Майяра (Maillard reaction) або неензиматичне глікозилювання, відбувається за участю карбонільної групи редукованого вуглеводу та аміногрупою будь-якої молекули

і старіння вищих еукаріотів, зокрема людини [14–20]. З метою розширення уявлення про механізми розвитку метаболічних порушень, які може спричинити тривале споживання фруктози, а також для порівняння тривалого впливу глюкози і фруктози на деякі фізіолого-біохімічні показники еукаріотів як модель у представленій роботі використано дріжджі *S. cerevisiae*. Одержані результати вказують на вищий рівень маркерів карбонільного та оксидативного стресів у клітинах дріжджів, які росли на фруктозі. Зроблено припущення, що ріст на фруктозі призводить до розвитку цих стресів, і, як наслідок, пришвидшує старіння дріжджів, проте обмеження вуглеводів сповільнює процес.

Матеріали і методи

В дослідженнях використовували стандартний лабораторний штам *Saccharomyces cerevisiae* YPH250 (МАТa *trp1-Δ1 his3-Δ200 lys2-801 leu2-Δ1 ade2-101 ura3-52*), люб'язно наданий професором Yoshiharu Inoue (Київський університет, Японія). Штам YPH250 знаходиться в колекції Центру генетики дріжджів Каліфорнійського університету в Берклі (США).

У роботі використовували такі реактиви: дріжджовий екстракт, пептон (Fluka, Німеччина); альбумін сироватки бика, 2,4-динітрофенілгідразин, етилендіамінтетраацетат (EDTA), кумасі яскраво-синій G-250, глюкоза, фруктоза, 2,3,5-трифенілтетразолій хлорид, фенілметилсульфонілфторид, трихлороцтова кислота (Sigma Chemical Co, США). Решта реактивів – вітчизняного виробництва (класу чда і вище).

Дріжджі вирощували при 28 °С на шейкері (175 коливань за хвилину) в живильному середовищі, яке містило 2,0% пептону і 1,0% дріжджового екстракту та глюкозу або фруктозу в різних концентраціях. Початкова кількість клітин становила $0,3 \times 10^6$ кл/мл.

Криві росту досліджуваних культур виражали як зміну концентрації клітин в середовищі з часом.

Розрахунок часу подвоєння клітин та тривалість лаг-фази здійснювали за формулами [21]:

$$T = \frac{(t_2 - t_1) \cdot \lg 2}{\lg C_2 - \lg C_1}$$

та

$$L = t_2 - t_1 + \frac{T \cdot (\lg C_2 - \lg C_1)}{\lg 2}$$

де T – час подвоєння кількості клітин; $t_2 - t_1$ – час лінійного періоду експоненційної фази, год; C_1 і C_2 – кількість клітин, які відповідають часу t_1 і t_2 ; L – тривалість лаг-фази, год.

Для визначення метаболічної активності дріжджів використовували 2,3,5-трифенілтетразолій хлорид. Метаболічно активні клітини здатні відновлювати барвник до нерозчинного у воді формазану червоного кольору. Для екстракції формазану використовували етанол-ацетонову суміш (1 : 1). Оптичне поглинання барвника реєстрували при довжині хвилі 485 нм [22]. Результати представлені як $OG_{485}/10^8$ клітин.

Вміст карбонільних груп протеїнів визначали в безклітинних екстрактах, які одержували дезінтеграцією клітин на вортекс-міксері зі скляними кульками діаметром 450–500 мкм (Sigma Chemical Co, США) в середовищі гомогенізації, яке містило 50 мМ калій-фосфатного буфера (рН 7,0), 0,5 мМ EDTA, 1 мМ фенілметилсульфонілфториду. Скляні кульки і незруйновані рештки клітин осаджували при 13 000 g протягом 15 хв. Вміст карбонільних груп протеїнів визначали за кількістю динітрофенілгідразонів, які утворювались внаслідок взаємодії цих груп із 2,4-динітрофенілгідразином [23]. Концентрацію динітрофенілгідразонів визначали спектрофотометрично при 370 нм. Для розрахунків використовували коефіцієнт молярного поглинання динітрофенілгідразонів $22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Результати представлені в нмолях на мг протеїну.

Визначення внутрішньоклітинного вмісту глікогену та моносахаридів здійснювали антроновим методом [24, 25]. Для цього клітини (200×10^6) руйнували на вортекс-міксері зі скляними кульками у присутності 10%-ї трихлороцтової кислоти для осадження протеїнів. Скляні кульки і незруйновані

рештки клітин осаджували при 7 000 g протягом 12 хв. Для осадження глікогену до надосадової рідини додавали етанол, після чого суміш центрифугували. Супернатант використовували для визначення загального внутрішньоклітинного вмісту моносахаридів [25], а осад – для визначення вмісту глікогену. Глікоген з осаду гідролізували 30%-им КОН. До гідролізату або супернатанту додавали 0,2% антронового реагенту, розчиненого в концентрованій сірчаній кислоті, інкубували при 100 °С протягом 10 хв, охолоджували та визначали оптичне поглинання за довжини хвилі 620 нм. Концентрацію глікогену в осаді та загальний вміст моносахаридів у супернатанті виражали в мкг глюкози/ 2×10^8 клітин. Як стандарт використовували розчин глюкози.

Концентрацію протеїну у пробах визначали за його зв'язуванням із кумасі яскравосинім G-250, використовуючи як стандарт альбумін сироватки бика [26]. Дані представлено як середні значення 4–8 незалежних визначень \pm похибка середнього. Статистичну обробку здійснювали, використовуючи *t*-критерій Стьюдента.

Результати та обговорення

У наших попередніх дослідженнях було показано, що ріст дріжджів на фруктозі призводив до швидшої втрати репродуктивної здатності та загибелі клітин порівняно з ростом на глюкозі [27]. Оскільки ефект залежав також і від концентрації вуглеводів, ми дослідили ріст дріжджів у середовищах, які містили глюкозу або фруктозу в різних концентраціях (рис. 2). Прийнято вважати, що культивування пекарських дріжджів у присутності 0,5% глюкози (рис. 2, А), відображає умови «м'якого» голодування, або так званого обмеження калорій (moderate calorie restriction) [28–30], яке, як раніше було показано, збільшує тривалість життя дріжджів [31, 32]. Зазвичай для культивування пекарських дріжджів застосовують 2,0%-ну глюкозу (рис. 2, Б). Водночас присутність 4,0% глюкози в середовищі культивування (рис. 2, В) вважається такою, що зумовлює в пекарських дріжджів осмотичний шок [33, 34].

Аналіз основних параметрів росту, таких як тривалість лаг-фази та час подвоєння кількості клітин (табл. 1), вказує на прискорення росту культур дріжджів зі збільшенням концентрації моносахариду, незалежно від його типу. Під час вирощування дріжджів у присутності 2,0 та 4,0% вуглеводів культури,

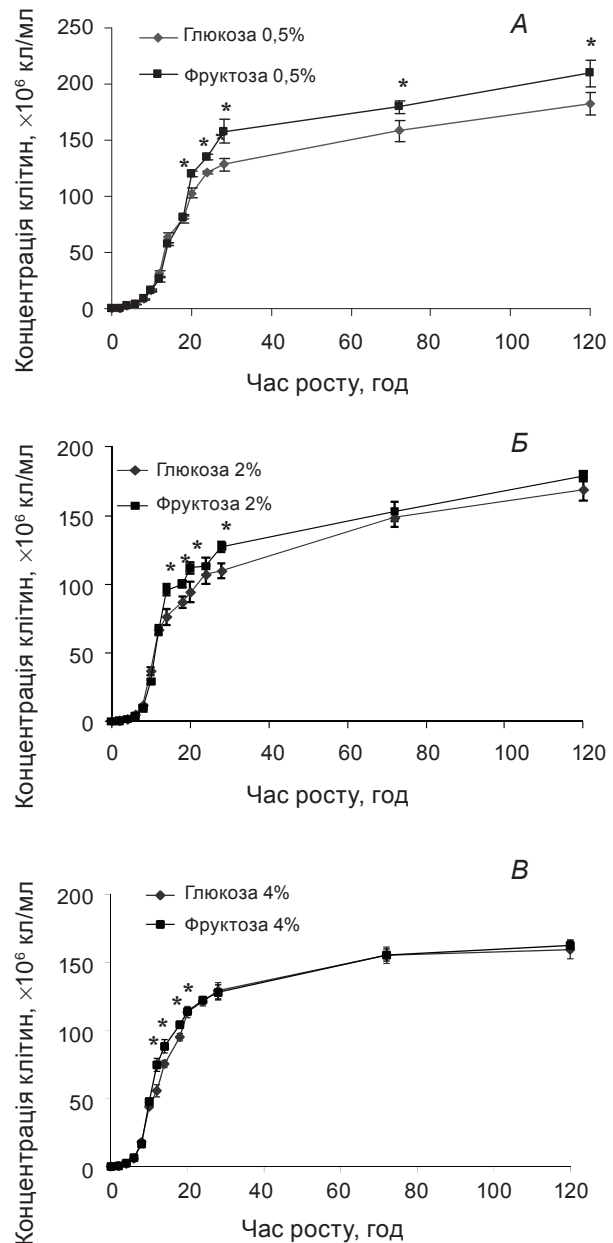


Рис. 2. Криві росту дріжджів *S. cerevisiae* у живильному середовищі з 0,5%-им (А), 2,0%-им (Б) та 4,0%-им (В) вмістом глюкози чи фруктози. *Вірогідно відмінне від відповідних значень, одержаних на глюкозі, $P < 0,05$, $n = 5$

які росли на фруктозі, знаходились у лаг-фазі довше, ніж ті, що росли на глюкозі. Проте тривалість лаг-фази була близькою у культурах, що росли за концентрації вуглеводів 0,5%. Якщо ж порівняти час подвоєння кількості клітин у досліджуваних культурах на експоненційній фазі росту, то можна зауважити, що клітини розмножуються швидше в середовищах, які містять фруктозу. Слід також

зазначити, що у стаціонарній фазі кількість клітин у культурах, які росли на 0,5%-й фруктозі, вірогідно вища, ніж кількість клітин у культурах, що росли на 0,5%-й глюкозі. Назагал, прискорений ріст клітин на фруктозі, який ми спостерігали в цьому дослідженні, узгоджується з нашими попередніми даними про швидшу втрату репродуктивної здатності та загибель клітин у культурах, які росли в середовищі із фруктозою як єдиним джерелом карбону, порівняно з ростом у присутності глюкози [27].

Раніше ми висловлювали припущення про розвиток карбонільного та оксидативного стресів у дріжджів внаслідок їхнього культивування у присутності вуглеводів у високих концентраціях [27]. Відомо, що внутрішньоклітинна концентрація вуглеводів, зокрема глікогену, залежить від фізіологічного стану мікроорганізмів [35–37]. Отже, на наступному етапі ми дослідили вплив джерела карбону у середовищі культивування на внутрішньоклітинний вміст глікогену (рис. 3, А) та моносахаридів (рис. 3, Б). З рис. 3, А видно, що вміст глікогену у клітинах зростає з часом культивування, а також зі збільшенням концентрації вуглеводу в середовищі культивування. Найвищим показник був на 5-ту добу культивування в середовищі з 4,0% моносахаридами. Так, порівняно з показником, одержаним на 14-ту годину росту, вміст глікогену зріс відповідно у 3 рази в умовах культивування в середовищі із глюкозою та у

4,6 рази у присутності фруктози. Порівняно з умовами «м'якого» обмеження калорій (0,5% глюкози або фруктози) вміст глікогену є вищим відповідно в 10 та 22 рази у клітинах, які ростуть в середовищах, що містять 4% глюкози або фруктози. Подібні тенденції спостерігаються і для внутрішньоклітинної концентрації моносахаридів (рис. 3, Б).

Слід зауважити, що раніше Guidi з колегами [38] спостерігали відмінність у відсотках використаної глюкози клітинами, які росли в середовищах із різною її концентрацією. Зокрема, наприкінці експоненційної фази, дріжджі, які росли на 20%-й глюкозі, використали тільки 9,9% від загальної її кількості. Проте зі зменшенням концентрації вуглеводу в середовищі культивування використання його клітинами збільшується. Клітини, які росли на 2,0- і 0,5%-й глюкозі, використали відповідно 35 та 70% від загальної її кількості [38]. Ця особливість може бути пов'язана з обмеженими можливостями клітин запасати вуглеводи. Слід зауважити, що в нашому дослідженні у присутності 2,0 та 4,0% вуглеводів у середовищі культивування внутрішньоклітинний вміст глікогену (рис. 3, А), і моносахаридів (рис. 3, Б) вище у клітинах, які росли на фруктозі.

Відомо, що глікоген – один з основних резервних вуглеводів у *S. cerevisiae* [36, 37]. Однією з переваг глікогену як запасної сполуки є те, що він не змінює внутрішньоклітинного осмотичного тиску [39, 40]. Його інтенсивне накопичення у клітині починається з вичер-

Таблиця 1. Параметри росту культур *S. cerevisiae* під час росту в середовищах із глюкозою або фруктозою в різних концентраціях ($M \pm m$, $n = 5$)

Параметри	Вміст вуглеводів					
	Глюкоза, %			Фруктоза, %		
	0,5	2,0	4,0	0,5	2,0	4,0
Тривалість лаг-фази, год	7,99±0,27	6,13±0,26 ⁺	4,80±0,12 ^{+#}	7,67±0,14*	7,48 ± 0,15*	5,15 ± 0,11 ^{*+#}
Час подвоєння кількості клітин, год	2,02±0,03	1,59±0,08 ⁺	1,38±0,07 ^{+#}	1,72±0,04*	1,42 ± 0,04 ^{*+}	1,23 ± 0,03 ^{*+#}
Кількість клітин × 10 ⁶ /мл:						
1 доба	128±5	110±5 ⁺	129±6 [#]	158± 11*	127±4 ^{*+}	128±6 ⁺
3 доба	158±9	148±7	155±6	179±6*	153±7 ⁺	155±5
5 доба	183±10	169±8	159±7 ⁺	210±12	179±4 ⁺	162±4 ⁺

*Вірогідно відмінне від відповідних значень на глюкозі з $P < 0,05$.

⁺Вірогідно відмінне від відповідних значень за вмісту вуглеводів у концентрації 0,5% з $P < 0,05$.

[#]Вірогідно відмінне від відповідних значень за вмісту вуглеводів у концентрації 2,0% з $P < 0,05$.

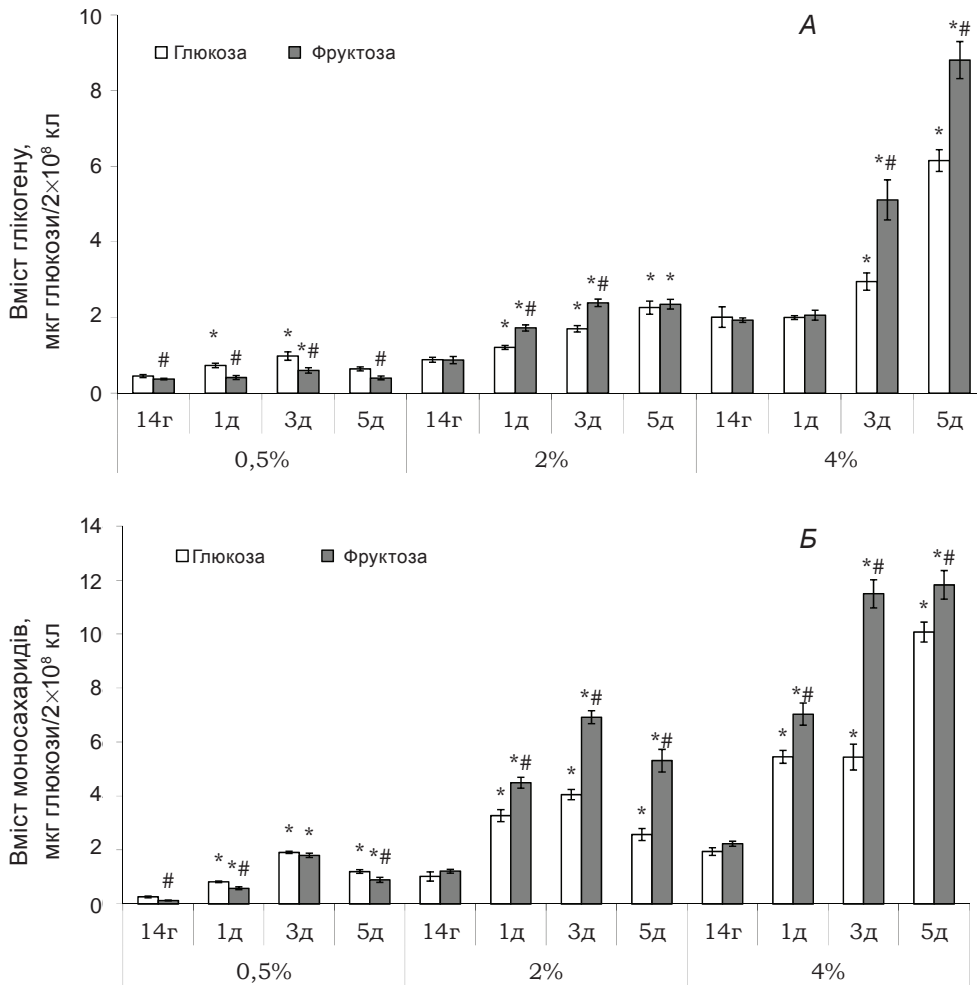


Рис. 3. Внутрішньоклітинний вміст глікогену (А) та моносахаридів (Б) у клітинах дріжджів в умовах росту на глюкозі чи фруктозі різних концентрацій. *Вірогідно відмінне від відповідних значень на 14-ту годину росту. #Вірогідно відмінне від відповідних значень, одержаних на глюкозі, $P < 0,05$, $n = 5$

панням вуглеводів у середовищі культивування [35]. У пізній стаціонарній фазі росту відбувається мобілізація депо глікогену [41]. Зазвичай швидкість використання полісахариду є значно нижчою, ніж швидкість його накопичення [42]. Відомо, що фруктоза є кращим промотором глікогенезу, ніж глюкоза [42]. Синтез і розпад глікогену контролюється шляхом ковалентної модифікації глікогенсинтази і глікогенфосфорилази. Зокрема, фруктозо-1-фосфат, який акумулюється під час метаболізму фруктози, інгібує глікогенфосфорилазу. При цьому також зростає концентрація глюкозо-6-фосфату, який, у свою чергу, активує глікогенсинтазу та інгібує глікогенфосфорилазу [42]. Назагал, структура глікогену у дріжджів схожа з такою у вищих еукаріотів [42], тому дріжджі часто застосовують як модель у вивченні ожиріння

багатоклітинних організмів [16]. Крім того, епідемію ожиріння, яка охоплює країни Заходу, пов'язують, у першу чергу, з надмірним споживанням саме фруктози [1–3].

Як відомо, пекарські дріжджі також застосовують як модель у вивченні старіння [15, 18–20, 43, 44]. Реакція глікації (неензиматичне глікозилювання, або реакція Майяра) вважається однією з імовірних причин швидкого старіння та розвитку метаболічних порушень [9–11]. На рис. 4 представлено хімізм реакції глікації. На першому етапі взаємодії редуруючих вуглеводів з аміногрупами будь-яких біомолекул утворюються основи Шиффа. Після чого ці лабільні сполуки перетворюються на так звані сполуки Амадори (Amadori compounds) або сполуки Гейнса (Heins compounds). Альдогексози, зокрема глюкоза, у процесі глікації утворюють продукти Амадори,

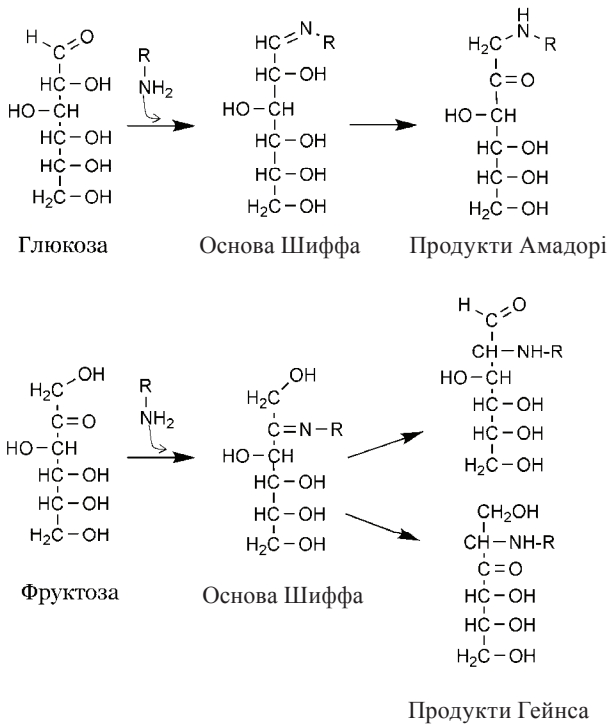


Рис. 4. Реакція глікації за участю глюкози (глюкація) та фруктози (фруктація). Альдогексози у процесі глікації утворюють продукти Амадорі, а кетогексози – продукти Гейнса

а кетогексози, наприклад фруктоза, – продукти Гейнса.

В обох випадках згадані вище продукти є лише проміжними сполуками у складному процесі, який має назву глікооксидації (glycoxidation). На рис. 5 показано наступну модифікацію продуктів Амадорі та Гейнса: утворення енедіолів, далі – алькоксильних радикалів, які за участю молекулярного кисню продукують α -дикарбонільні сполуки та активовані форми кисню (АФК). У свою чергу, обидві групи високореакційних сполук є основними факторами в розвитку карбонільного та оксидативного стресів [13]. У наших попередніх роботах було показано, що рівень α -дикарбонільних сполук та АФК залежить від часу культивування дріжджів, а також є вірогідно вищим у клітинах, які росли у середовищі із фруктозою [27]. Це дало можливість висловити припущення про те, що інтенсивність карбонільного та оксидативного стресів є вищою у клітинах, які культивували у присутності в середовищі фруктози, порівняно із клітинами, що росли в середовищі, яке містило глюкозу.

Концентрація карбонільних груп протеїнів вважається надійним маркером карбонільного

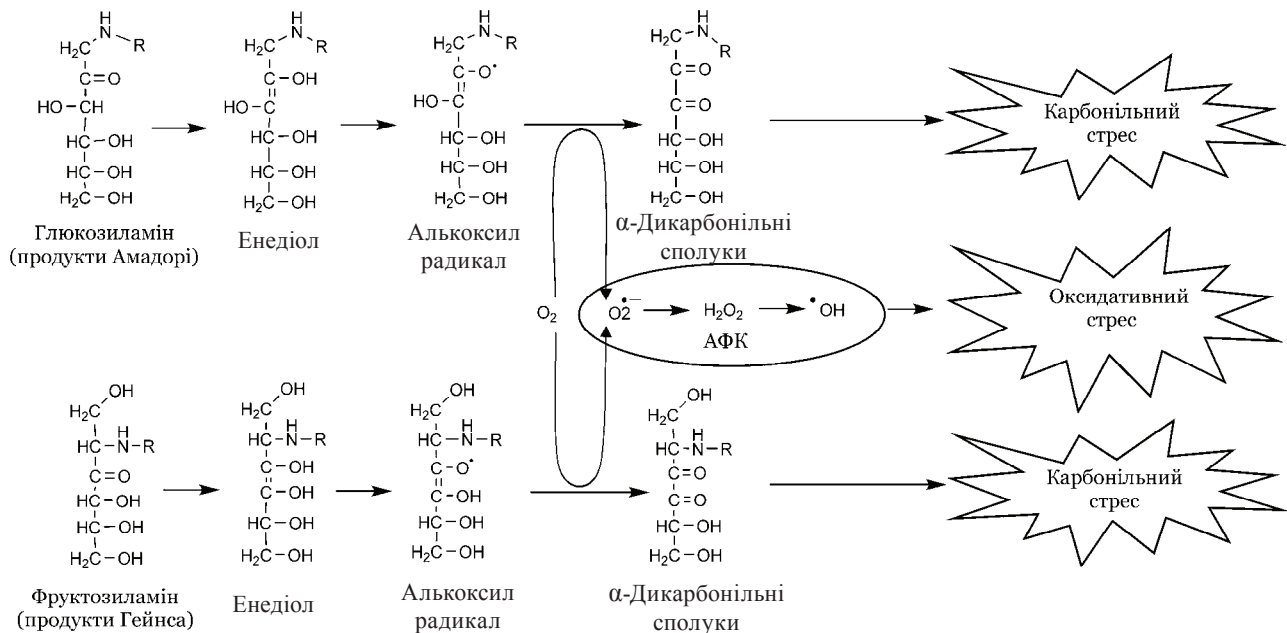


Рис. 5. Модифікація продуктів Амадорі та продуктів Гейнса з утворенням α -дикарбонільних сполук та активованих форм кисню (АФК), збільшення стаціонарних концентрацій яких призводить до розвитку карбонільного та оксидативного стресів

Таблиця 2. Концентрація карбонільних груп протеїнів (КП, нмоль/мг протеїну) у клітинах *S. cerevisiae*, вирощених на глюкозі або фруктозі в різних концентраціях ($M \pm m$, $n = 5$)

КП, нмоль/мг протеїну	Вміст вуглеводів					
	Глюкоза, %			Фруктоза, %		
	0,5	2,0	4,0	0,5	2,0	4,0
14 година	3,71±1,38	4,39±0,77	2,5±0,4 [#]	6,83±0,91*	4,96±0,66	5,46±0,80 ^{*#}
1 доба	6,04±0,40	8,09±0,95 [§]	3,74±0,99 [#]	6,23±0,40	10,7±0,5 ^{§**}	8,82±1,57 ^{*#}
3 доба	9,32±0,90 [§]	6,12±0,70 ⁺	4,81±0,6 ^{§+}	9,01±0,6 [§]	8,65±1,10 ^{§*}	6,58±0,37 [*]
5 доба	13,70±0,34 [§]	19,1±2,4 ^{§+}	13,2±4 [§]	15,08±0,30 ^{§*}	25,6±2,2 ^{§**}	22,0±1,6 ^{§**}

[§]Вірогідно відмінне від відповідних значень на 14-ту годину росту, $P < 0,05$.

*Вірогідно відмінне від відповідних значень на глюкозі, $P < 0,05$.

⁺Вірогідно відмінне від відповідних значень за вмісту вуглеводів у концентрації 0,5%, $P < 0,05$.

[#]Вірогідно відмінне від відповідних значень за вмісту вуглеводів у концентрації 2,0%, $P < 0,05$.

й оксидативного стресу, а також старіння [3, 14, 45–50]. У табл. 2 показано вміст карбонільних груп протеїнів у клітинах дріжджів, які росли на глюкозі та фруктозі в різних концентраціях. Як і очікувалось, концентрація карбонільних груп протеїнів збільшувалася з часом і досягала найвищих величин на 5-ту добу росту в усіх досліджуваних випадках, що свідчить про старіння культур. Цікаво, що у присутності 2,0 та 4,0% вуглеводів у середовищі культивування цей показник був, назагал, у 1,3–2,4 раза вищим у разі росту на фруктозі, що добре узгоджується з нашими попередніми даними [27].

Це спостереження також відповідає даним літератури про те, що *in vitro* фруктоза активніше, ніж глюкоза, вступає в реакцію глікації та продукує більше α -дикарбонільних сполук і гідроксильних радикалів [13]. Нещодавно в експериментах *in vivo* нами також було виявлено, що в клітинах дріжджів, які росли на фруктозі, рівень АФК та α -дикарбонільних сполук був вірогідно вищим порівняно з клітинами, які культивували на глюкозі [27]. Таким чином, інтенсивність карбонільного та оксидативного стресів є вищою у клітинах дріжджів, які росли на фруктозі, що може пояснювати швидке старіння дріжджів, які використовують фруктозу як джерело карбону та енергії. Це припущення підтверджується даними щодо загальної метаболічної активності клітин в умовах нашого експерименту (рис. 6). Як бачимо, протягом росту на 2,0%-их моносахаридах дріжджі, які споживають фруктозу, демонструють вищу метаболічну активність, ніж клітини, що ростуть на глюкозі. Представлені результати добре відповідають уявленням про те, що інтенсивність метаболізму, наза-

гал, визначає тривалість життя [32, 51]. Слід також зауважити, що інтенсивний обмін речовин може призводити до надмірного утворення АФК та продуктів глікації, що у свою чергу, прискорює старіння і знижує тривалість життя.

Ще один цікавий факт можна виявити, аналізуючи внутрішньоклітинну концентрацію глікогену (рис. 3, Б) та рівень окислених протеїнів у клітинах, вирощених в умовах обмеження вуглеводів (табл. 2). Досліджувані показники у клітинах, які росли на 0,5%-й фруктозі, є нижчими, ніж у клітинах, які були культивовані на 0,5%-й глюкозі. На додаток, нещодавно нами було показано, що в умовах «м'якого» голодування клітини втрачають життєздатність та здатність до розмноження з подібною швидкістю на 0,5%-й глюкозі та

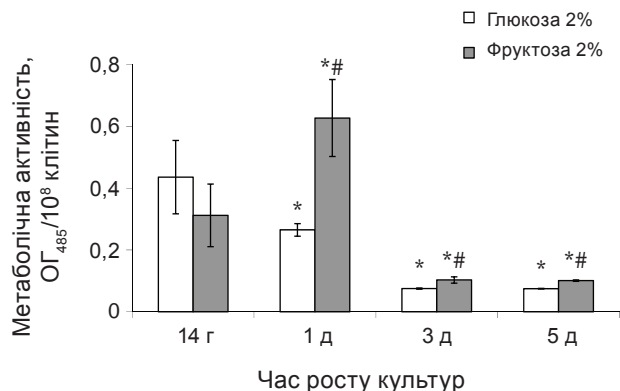


Рис. 6. Метаболічна активність *S. cerevisiae*, вирощених на 2,0%-й глюкозі чи 2,0%-й фруктозі. *Вірогідно відмінне від відповідних значень на 14-ту годину росту; #Вірогідно відмінне від відповідних значень, одержаних на глюкозі, з $P < 0,05$, $n = 4-8$

0,5%-й фруктозі. Причому ця швидкість була значно нижчою, ніж у культурах, які росли на середовищі з 2,0%-им та 4,0%-им вмістом вуглеводів [27].

Таким чином, порівнюючи особливості росту дріжджів *S. cerevisiae* за використання глюкози і фруктози як джерел карбону, можна зауважити: 1) у присутності фруктози клітини демонструють вищу метаболічну активність та прискорений ріст; 2) внутрішньоклітинна концентрація вуглеводів та окислених протеїнів є вищою у клітинах, які культивували на фруктозі; 3) зменшення концентрації вуглеводів у середовищі культивування супроводжується низькою динамікою запасання глікогену та накопичення окислених протеїнів. Отже, ріст на фруктозі призводить до розвитку карбонільного і оксидативного стресів, і, як наслідок, прискорює старіння дріжджів, проте обмеження вуглеводів сповільнює цей процес.

Автори щиро вдячні Dr. Inoue за люб'язно наданий штаб S. cerevisiae. Також висловлюють особливу подяку рецензентам за змістовні зауваження до рукопису і цікаву дискусію.

ФРУКТОЗА КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ КАРБОНИЛЬНОГО И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССОВ И УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

Л. М. Лозинская, Г. Н. Семчишин

Прикарпатский национальный университет имени Василя Стефаныка, Ивано-Франковск, Украина; e-mail: semchyshyn@pu.if.ua

Чрезмерное и длительное потребление фруктозы может провоцировать развитие метаболических нарушений. Однако механизмы, задействованные в этом процессе, изучены недостаточно. В работе использованы пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* как модель для сравнения влияния длительного потребления глюкозы и фруктозы в различных концентрациях на некоторые физиолого-биохимические показатели эукариотов. Показано, что в среде культивирования, содержащем фруктозу, клетки дрожжей растут быстрее, характеризуются высшей метаболической активностью и внутриклеточным содержанием гликогена и окисленных протеинов. Эти наблюдения хорошо согласуются с данными о более активном участии фруктозы, по сравнению с глюкозой, в реакции гликации *in vitro*, продуктами которой являются высокорекреацион-

ные α -дикарбонильные соединения и активированные формы кислорода. Таким образом, интенсивность карбонильного и окислительного стрессов выше в клетках дрожжей, растущих на фруктозе. Это может объяснить тот факт, что дрожжи, использовавшие фруктозу как источник углеводорода и энергии, старели быстрее клеток, росших на глюкозе. Следует отметить, что ограничение углеводов замедляет рост дрожжей, сопровождается низкой динамикой запасания гликогена и накопления окисленных протеинов, а также не выявляет существенных различий между показателями старения, карбонильного и окислительного стрессов в клетках, растущих на глюкозе и фруктозе.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, глюкоза, фруктоза, гликоген, метаболическая активность, карбонильный стресс, окислительный стресс, старение.

FRUCTOSE AS A FACTOR OF CARBONYL AND OXIDATIVE STRESS DEVELOPMENT AND ACCELERATED AGING IN THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae*

L. M. Lozinska, H. M. Semchyshyn

Vassyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine; e-mail: semchyshyn@pu.if.ua

S u m m a r y

Excessive and prolonged consumption of fructose may lead to the development of metabolic disorders. However, the mechanisms of disturbances are still discussed. In the present work, the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been used as a model to compare the effects of prolonged consumption of different concentrations of glucose and fructose on certain physiology-biochemical parameters of eukaryotes. It has been shown that the yeast growth, their metabolic activity, intracellular level of glycogen and oxidized proteins were higher in cells grown on fructose. The observation is consistent with the data on a higher *in vitro* ability of fructose than glucose to initiate glycation which products of which are highly reactive α -dicarbonyl compounds and activated oxygen forms. Thus the intensity of carbonyl and oxidative stress is higher in cells grown on fructose. This can explain a higher rate of aging of yeast consuming fructose as a source of carbon and energy as compared to cells growing on glucose. However, carbohydrate restriction used in this study ham-

pered the accumulation of glycogen and oxidized proteins and did not reveal any difference between markers of aging and carbonyl and oxidative stress in yeast grown on glucose and fructose.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, glucose, fructose, glycogen, metabolic activity, carbonyl and oxidative stress, aging.

1. Bray G. A., Nielsen S. J., Popkin B. M. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – **79**. – P. 537–543.
2. Lindqvist A., Baelemans A., Erlanson-Albertsson C. // *Regul. Pept.* – 2008. – **150**, N 1–3. – P. 26–32.
3. Yang K., Feng C., Lip H., Bruce W. R. et al. // *Chem. Biol. Interact.* – 2011. – doi:10.1016/j.cbi.2011.02.027.
4. Spasojević I., Mojović M., Blagojević D., Spasić S. D. et al. // *Carbohydr. Res.* – 2009. – **344**, N 1. – P. 80–84.
5. Spasojević I., Bajić A., Jovanović K., Spasić M. et al. // *Ibid.* – N 13. – P. 1676–1681.
6. Johnson R. J., Sanchez-Lozada L. G., Nakagawa T. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – **21**, N 12. – P. 2036–2039.
7. Sánchez-Lozada L. G., Mu W., Roncal C., Sautin Y. Y. et al. // *Eur. J. Nutr.* – 2010. – **49**, N 1. – P. 1–9.
8. van der Borgh K., Köhnke R., Göransson N., Deierborg T. et al. // *Regul. Pept.* – 2011. – **167**, N 1. – P. 26–30.
9. Monnier V. M., Sell D. R., Dai Z., Nemet I. et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – **1126**. – P. 81–88.
10. Moheimani F., Morgan P. E., van Reyk D. M., Davies M. J. // *Biochim. Biophys. Acta* – 2010. – **1802**. – P. 561–571.
11. Srikanth V., Maczurek A., Phan T., Steele M. et al. // *Neurobiol. Aging.* – 2011. – **32**, N 5. – P. 763–777.
12. Levi B., Werman M. J. // *J. Nutr. Biochem.* – 2001. – **12**, N 4. – P. 235–241.
13. Sakai M., Oimomi M., Kasuga M. // *Kobe J. Med. Sci.* – 2002. – **48**. – P. 125–136.
14. Lushchak V. I. // *Acta Biochim. Pol.* – 2006. – **53**, N 4. – P. 679–684.
15. Fontana L., Partridge L., Longo V. D. // *Science.* – 2010. – **328**, N 5976. – P. 321–326.
16. Rockenfeller P., Madeo F. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – **1803**. – P. 499–506.
17. Summers D. W., Cyr D. M. // *Methods.* – 2011. – **53**, N 3. – P. 226–231.
18. Semchyshyn H. // *Cent. Eur. J. Biol.* – 2009. – **4**, N 2. – P. 142–153.
19. Petranovic D., Tyo K., Vemuri G., Nielsen J. // *FEMS Yeast Res.* – 2010. – **10**. – P. 1046–1059.
20. Lushchak V. I. // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2011. – **153**. – P. 175–190.
21. Дюс Є. / Количественные проблемы биохимии. – М.: Мир, 1983. – 373 с.
22. Conconi A., Jager-Vottero P., Zhang X., Beard B. C. et al. // *Mutat. res.* – 2000. – **459**. – P. 55–64.
23. Lushchak V., Semchyshyn H., Lushchak O., Mandryk S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – **338**, N 4. – P. 1739–1744.
24. Yemm E. W., Willis A. J. // *Biochem J.* – 1954. – **57**, N 3. – P. 508–514.
25. Carroll N. V., Longley R. W., Roe J. H. // *J. Biol. Chem.* – 1956. – **220**. – P. 583–593.
26. Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
27. Semchyshyn H., Lozinska L., Miedzobrodzki J., Lushchak V. // *Carbohydr. Res.* – 2011. – **346**. – P. 933–938.
28. Sinclair D., Lin S., Guarente L. // *Science.* – 2006. – **312**. – P. 195–197.
29. Kaeberlein M., Powers R. W. // *Ageing Res. Rev.* – 2007. – **6**. – P. 128–140.
30. Wang J., Jiang J. C., Jazwinski S. M. // *Exp. Gerontol.* – 2010. – **45**. – P. 621–631.
31. Jiang J. C., Jaruga E. W. A., Repnevskaya M. V., Jazwinski S. M. // *FASEB J.* – 2000. – **14**. – P. 2135–2137.
32. Roux A.E., Leroux A., Alaamery M. A., Hoffmann C. S. et al. // *PLoS Genet.* – 2009. – **5**. – e1000408.
33. Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M., Prior B. A. // *Mol. Cell Biol.* – 1994. – **14**, N 6. – P. 4135–4144.
34. Sabire, O., Johnston, M. // *Ibid.* – 1995. – **15**, N 2. – P. 1564–1572.
35. Lillie S. H., Pringle J. R. // *J. Bacteriol.* – 1980. – **143**. – P. 1384–1394.
36. Parrou J. L., Teste M. A., François J. // *Microbiology* – 1997. – **143**. – P. 1891–1900.
37. Wilson W. A., Roach P. J., Montero M., Baroja-Fernández et al. // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2010. – **34**. – P. 952–985.
38. Guidi F., Magherini F., Gamberi T., Borro M. et al. // *Biochim. Biophys. Acta* – 2010. – **1804**. – P. 1516–1525.
39. Lushchak V. I., Bahnjukova T. V., Storey K. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1998. – **31**, N 8. – P. 1059–1067.
40. Sillje H. H., Paalman J. W., ter Schure E. G., Olsthoorn S. Q. et al. // *J. Bacteriol.* – 1999. – **181**. – P. 396–400.
41. Werner-Washburne M., Braun E., Johnston G. C., Singer R. A. // *Microbiol. Rev.* – 1993. – **57**. – P. 383–401.

42. *Mayes P.* // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1993. – **58**. – P. 754S–765S.
43. *Fabrizio P., Longo V. D.* // *Aging cell* – 2003. – **2**. – P. 73–81.
44. *Fabrizio P., Longo V. D.* // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – **371**. – P. 89–95.
45. *Луцак В. И.* // *Биохимия.* – 2001. – **66**, № 5. – С. 476–489.
46. *Lushchak V. I., Gospodaryov D. V.* // *Cell Biol. Int.* – 2005. – **29**, N 3. – P. 187–192.
47. *Grzelak A., Macierzyńska E., Bartosz G.* // *Exp. Gerontol.* – 2006. – **9**. – P. 813–818.
48. *Луцак В. И.* // *Биохимия* – 2007. – **72**, № 8. – С. 809–827.
49. *Луцак В. И.* // Там же. – 2010. – **75**, № 3. – С. 281–296.
50. *Lesgards J. F., Gauthier C., Iovanna J., Vidal N. et al.* // *Chem. Biol. Interact.* – 2011. – **190**, N 1. – P. 28–34.
51. *Van Raamsdonk J. M., Meng Y., Camp D., Yang W. et al.* // *Genetics.* – 2010. – **185**. – P. 559–571.

Отримано 27.04.2011