



© М. В. Шапошников^{1,2},
Л. А. Шилова¹, Е. Н. Плюснина^{1,2},
С. О. Володина¹, В. В. Володин¹,
А. А. Москалев^{1,2,3}

¹Институт биологии Коми НЦ
УрО РАН, Сыктывкар;

²Сыктывкарский государственный
университет, Сыктывкар;

³Московский физико-технический
институт государственный универ-
ситет, Долгопрудный

Выяснение молекулярных механизмов действия активных субстанций растительных адаптогенов является актуальным направлением исследований. В настоящей работе мы изучили влияние фитопрепаратов, содержащих фитоэкдистероиды (20-гидроксиэкдизон и инокостерон) *Serratula coronata* L. или стероидные гликозиды (диосцин и протодиосцин) *Trigonella foenum-graecum* L. на экспрессию генов стресс-ответа, стрессоустойчивость и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*. Показано, что фитопрепараты активируют механизмы антиоксидантной защиты (*Sod1*), но снижают уровень индукции генов репарации ДНК (*XPF* и *Rad51*) и апоптоза (*Hid*). В тоже время изученные фитопрепараты обладают умеренным адаптогенным и геропротекторным эффектом, связанным с активацией механизмов гормезиса.

✿ **Ключевые слова:** экдистероиды; стероидные гликозиды; растительные адаптогены; продолжительность жизни; стрессоустойчивость; гормезис; *Drosophila*.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФИТОЭКДИСТЕРОИДЫ И СТЕРОИДНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ РАСТЕНИЙ, НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое внимание уделяется созданию новых лекарственных препаратов, биологически активных добавок к пище и продуктов функционального питания, повышающих устойчивость организма к действию неблагоприятных факторов окружающей среды и обладающих свойством увеличивать продолжительность жизни. В этой связи большой теоретический и практический интерес представляют вещества природного происхождения, такие как полифенольные соединения, стероидные и тритерпеновые гликозиды, фитоэкдистероиды, большинство из которых, являясь продуктами специализированного обмена, играют роль защитных факторов для самих растений при действии различных повреждающих факторов биотической и абиотической природы (Володин, Матаев, 2011; Panossian et al., 1999). Несмотря на то, что растения, обладающие адаптогенным и геропротекторным действием, уже имеют свою историю применения в народной и научной медицине, изучение клеточных и молекулярных механизмов действия входящих в их состав активных субстанций остается актуальным направлением исследований. Предполагается, что присутствие вторичных метаболитов растений адаптогенной природы в качестве минорных компонентов пищи может индуцировать гормезис и вести к увеличению продолжительности жизни (Анисимов, 2003).

Ранее нами было показано, что геропротекторные и адаптогенные свойства веществ растительного происхождения, таких как лигнины и пектины, могут быть обусловлены не только их антиоксидантной активностью, но и способностью индуцировать гены стресс-ответа клетки (Белый с соавт., 2010; Shaposhnikov et al., 2014). Мы установили, что активация механизмов стрессоустойчивости клетки с помощью фармакологических препаратов, специфически ингибирующих PI3K, TOR, iNOS и NF-κB, также приводит к увеличению продолжительности жизни *D. melanogaster* (Danilov et al., 2013; Moskaev, Shaposhnikov, 2011; Moskaev, Shaposhnikov, 2010).

Цель настоящей работы заключалась в изучении механизмов действия растительных адаптогенов — экдистероидов и стероидных гликозидов, выделенных из некоторых видов растений, на продолжительность жизни и стрессоустойчивость *Drosophila melanogaster*. Предполагалось изучить влияние малых концентраций фитопрепаратов, содержащих фитоэкдистероиды (субстанция серпистен, представляющая собой смесь индивидуальных экдистероидов 20-гидроксиэкдизона и инокостерона из листьев растения *Serratula coronata* L.) и стероидные гликозиды растений (экстракт семян растения *Trigonella foenum-graecum* L., содержащий диосцин и протодиосцин), на экспрессию генов стресс-ответа клетки (гены белков теплового шока, репарации ДНК, антиоксидантной защиты, апоптоза, ответа на повреждение ДНК); оценить влияние фитопрепаратов, содержащих фитоэкдистероиды и гликозиды на стрессоустойчивость (паракават, голодание, гипертермия) и продолжительность жизни *D. melanogaster*.

Поступила в редакцию 18.07.2014
Принята к публикации 21.10.2014

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследований

В работе использовали лабораторную линию *D. melanogaster* дикого типа *Canton-S*, полученную из коллекции дрозофилиного Центра в Блумингтоне, Университета штата Индиана (Блумингтон, США).

Обработка фитопрепаратами

Фитопрепараты добавляли в состав стандартной сахарно-дрожжевой питательной среды (Ashburner, 1989). Концентрация серпистена составляла 0,2 и 1,0 мкМ. Содержание экстракта пажитника соответствовало концентрации протодиосцина — 0,9 и 4,6 мкг/мл и диосцина — 0,5 и 2,6 мкг/мл. Контрольных мух содержали на питательной среде без добавления фитопрепаратов.

Анализ продолжительности жизни

Контрольных и опытных мух содержали при температуре $25 \pm 0,5$ °С и искусственном режиме освещения 12 ч день: 12 ч ночь. В баночки объемом 120 мл, содержащие 20 мл среды рассаживали по 30 особей одного пола и возраста. Мух пересаживали на свежую среду 2 раза в неделю. Продолжительность жизни анализировали ежедневно, отдельно у самцов и самок. Функции дожития оценивали с помощью процедуры Каплана—Мейера и представляли в виде кривых дожития. Рассчитывали медианную и максимальную (как возраст гибели 90 % особей) продолжительность жизни. При статистической обработке результатов применяли непараметрические методы. Для сравнения функций дожития использовали модифицированный критерий Колмогорова—Смирнова. Критерий Мантеля—Кокса применяли при оценке достоверности различий по медианной продолжительности жизни. Для оценки статистической значимости различий максимальной продолжительности жизни использовали тест Ванг—Аллисона (Wang et al., 2004). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica, версия 6.1 и (StatSoft, USA) и статистической среды R, версия 2.15.1 (RCoreTeam, 2014).

Оценка стрессоустойчивости

Перед оценкой стрессоустойчивости (окислительный стресс, гипертермия, голодание) мух в течение 20 суток содержали на питательной среде с добавлением фитопрепаратов.

При окислительном стрессе мух содержали на фильтровальной бумаге, смоченной 5 % раствором сахарозы с добавлением параквата в концентрации 20 мМ. При голодании — на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой. При гипертермии мух содержали при $T = 35$ °С.

Мух подвергали воздействию стрессовых условий до полной гибели выборки. Количество выживших особей учитывали через каждые 12 часов. Оценивали процентную долю мух, выживших по истечении 24 ч (гипертермия) или 48 ч (окислительный стресс и голодание) стрессового воздействия. Каждый эксперимент проводили в двух независимых повторностях с использованием 100–120 особей. Для оценки статистической достоверности различий использовали ϕ -критерий Фишера.

Количественный анализ ПЦР «в реальном времени»

Для определения уровня экспрессии генов стресс-ответа дрозофил линии дикого типа *Canton-S* в течение 20 суток содержали на питательной среде с добавлением растворов серпистена и экстракта пажитника в различных концентрациях. По 10 имаго на вариант эксперимента помещали в раствор TRIzol Reagent (Invitrogen, USA) и гомогенизировали с использованием гомогенизатора SilentCrusher S (Heidolph, Germany). РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent (Invitrogen, USA) по инструкции изготовителя. Для контроля отсутствия примеси ДНК в полученных образцах РНК ставили ПЦР с праймерами гена β -*Tubulin* без проведения обратной транскрипции. Обратную транскрипцию для синтеза кДНК из полученной РНК проводили с помощью Oligo (dT)20 праймера (Invitrogen, USA) и обратной транскриптазы SuperScript III (Invitrogen) по инструкции изготовителя. Для ПЦР «в реальном времени» использовали реакционную смесь с красителем SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) и праймеров (табл. 1).

Таблица 1

Праймеры для количественной ПЦР в реальном времени

Ген	Праймер (5'–3')	
	Прямой	Обратный
<i>β-Tubulin</i>	GCAACTCCACTGCCATCC	CCTGCTCCTCCTCGAACT
<i>Sod1</i>	TGCACGAGTTCGGTGACAACAC	TCCTTGCCATACGGATTGAAGTGC
<i>Hsp70Aa</i>	TCCTCAGCGGAGACCAGA	CACGTTCCGCCCTCATACA
<i>GADD45</i>	GCAAACGCACAACCAAAC	GGCCATCAGGCAGAAGAG
<i>PARP-1</i>	CTGAGATAGAGGTTGCGTAC	CTCCTTGGCGAGATACTT
<i>Mei-9</i>	TCCTCAAGGCCTACAGCGATTC	TCCAGATAAACGCGCTCTCTTTC
<i>Spn-B</i>	AGATTGCTGCAGATGAGCAAAGCC	TTTATAACGCACGCCAGGAGAGGT
<i>Wrinkled/Hid</i>	GGAAGCGGATAAGGACAA	ATGCGGAGGACGAAGATGA

Реакцию проводили в амплификаторе CFX-96 (BioRad, USA), используя следующую программу: 1) денатурация при 95 °С в течение 10 мин, 2) денатурация при 95 °С в течение 15 с, 3) отжиг при 60 °С в течение 30 с, 4) элонгация при 60 °С в течение 30 с, 5) этапы 2–4 повторяли 50 раз. Экспрессию исследуемых генов нормализовали по гену «домашнего хозяйства» *β-Tubulin*, ПЦР для каждого гена-мишени и *β-Tubulin* проводили в отдельных пробирках. Для каждого варианта эксперимента делали по 4 измерения. По значениям пороговых циклов рассчитывали относительную экспрессию генов стресс-ответа с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001), где $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{опыт}) - \Delta Ct (\text{контроль})$, и каждое значение $\Delta Ct = Ct (\text{ген-мишень}) - Ct (\beta-Tubulin)$. На основании анализа результатов 3 повторностей эксперимента рассчитывали средние значения уровней экспрессии. Статистическую значимость отличий оценивали с помощью критерия Манна–Уитни.

Тест на уровень потребления пищи

Оценку влияния фитопрепаратов на уровень потребления пищи проводили с использованием в качестве трейсера флуоресцентного красителя флуоресцеина (Sigma-Aldrich, USA). Для проведения теста мух в возрасте 5–7 суток помещали на питательную среду, содержащую 50 мкМ флуоресцеина с добавлением фитопрепаратов или без. После кормления в течение 1 часа мух анестезировали и замораживали в жидком азоте на 10 мин. Замороженных мух встряхивали на вортексе для отделения голов. Тела мух гомогенизировали в гомогенизаторе Silent Crusher-S (Heidolph, Germany) в дистилляте, из расчета 5 особей на 1 мл пробы. Далее гомогенизат центрифугировали 2 минуты при 15 000 g, переносили 0,8 мл супернатанта в новый эппендорф, доводили объем до 1,5 мл и снова центрифугировали. Уровень флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре ФЛЮОРАТ-02 ПАНОРАМА (Люмэкс, Россия) при длине волны возбуждения — 494 нм, регистрации — 521 нм. Для каждого варианта эксперимента проводили измерения в 6 независимых повторностях. Уровень потребления пищи оценивали по средним значениям интенсивности флуоресценции. Для оценки статистической значимости отличий использовали t-критерий Стьюдента.

Анализ массы тела

После обработки фитопрепаратами в течение 20 суток самцов и самок взвешивали на аналитических лабораторных весах Mettler Toledo XP-A (Mettler Toledo, Switzerland). На основании измерения массы тела 10 мух рассчитывали среднюю массу тела одной особи. Эксперимент проводили в 3 повторностях. Статистическую значимость различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

Анализ плодовитости

Перед оценкой плодовитости мух содержали на питательной среде с добавлением фитопрепаратов в течение 20 суток. Далее мух рассаживали по 3 пары и подсчитывали число яиц, отложенных в течение суток. Данные представляли в виде среднего числа яиц за сутки на самку. Каждый эксперимент проводили в 3 повторностях с использованием 30 самок. Статистическую значимость различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия генов стресс-ответа

Исследовано влияние фитопрепаратов, содержащих фитоэкдистероиды и гликозиды, на уровень экспрессии генов обезвреживания свободных радикалов *Sod1*, ответа на тепловой шок *Hsp70Aa*, ответа на повреждение ДНК (*GADD45*, *PARP-1*), контроля эксцизионной репарации ДНК (*mei-9*), гомологичной рекомбинации (*Rad51*) и апоптоза (*Hid*). Результаты представлены на рисунке 1.

Показано, что обработка дрозофил серпистеном и экстрактом пажитника при двух изученных концентрациях привела к увеличению уровня экспрессии гена детоксикации свободных радикалов *Sod1* (в 1,2–2,5 раза) и снижению уровня экспрессии генов апоптоза *Hid* (в 1,4–8,7 раза) и эксцизионной репарации ДНК у самцов и самок, соответственно ($p < 0,05$). Активность гена *PARP-1* у самцов и самок изменилась в разных направлениях — у самцов происходила активация данного гена, а у самок — снижение экспрессии в 1,5–14,5 раз, ($p < 0,05$). Активность генов *Rad51*, *Hsp70* и *D-GADD45* в большинстве случаев статистически значимо не изменилась.

Таким образом, исследуемые фитопрепараты активируют механизмы антиоксидантной защиты, что может вести к уменьшению частоты возникновения повреждений ДНК и снижению уровня индукции систем репарации ДНК и клеточной гибели. В этой связи представляет интерес влияние серпистена и пажитника на стрессоустойчивость мух.

Стрессоустойчивость

Обработка серпистеном в концентрации 1 мкМ вызывает статистически значимое снижение адаптационных возможностей самцов дрозофил к гипертермии ($p < 0,05$) (рис. 2, А). Экстракт пажитника в наименьшей концентрации (протодиосцин — 0,9 мкг/мл, диосцин — 0,5 мкг/мл) повышает адаптационные возможности самцов дрозофил к тепловому шоку, что выражается в снижении смертности самцов через 24 ч стрессового воздействия ($p < 0,05$) (рис. 2, А).

У самок обработка серпистеном в концентрациях 0,2 и 1 мкМ вызывает снижение адаптационных воз-

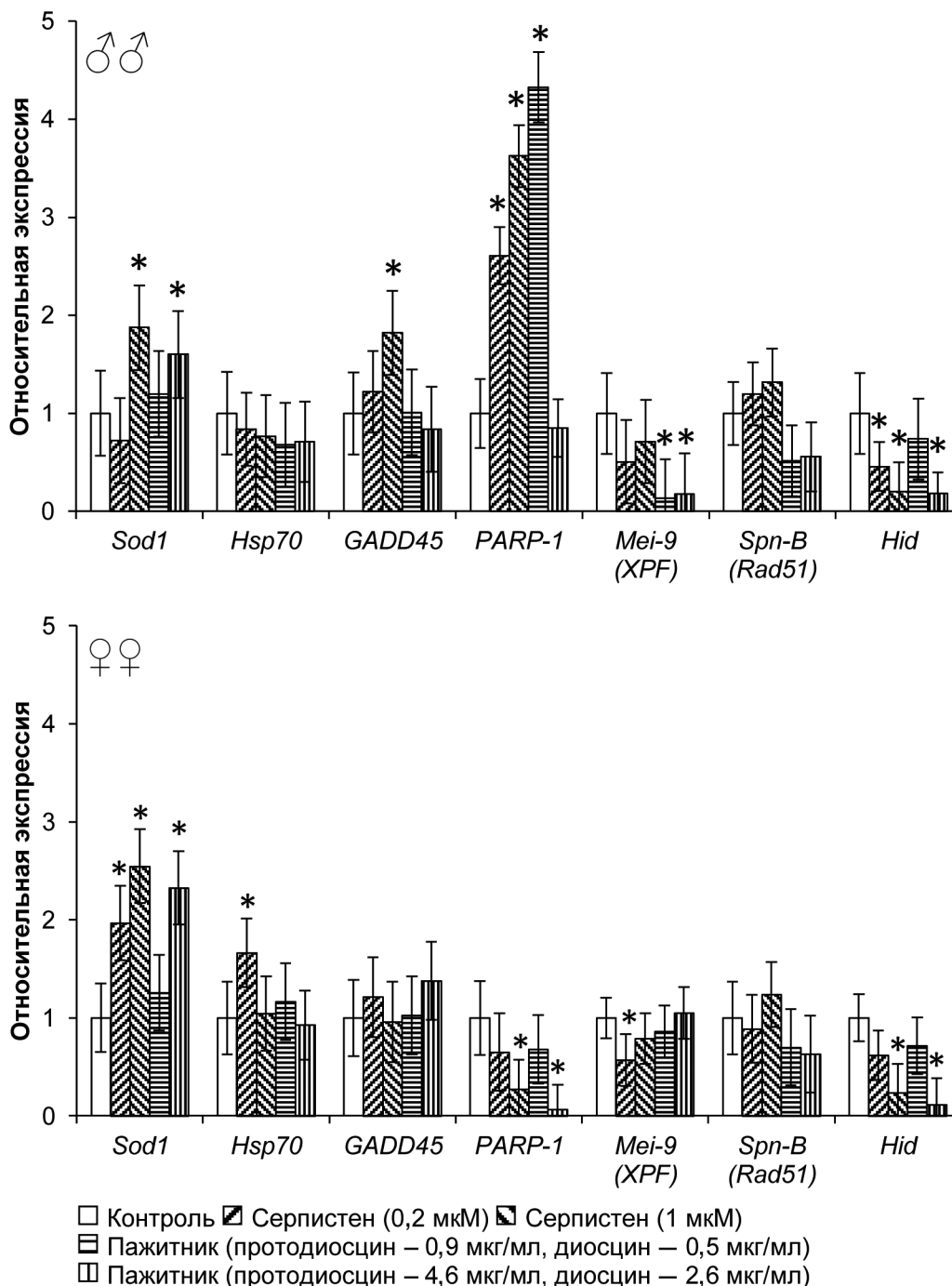


Рис. 1. Влияние фитопрепаратов на экспрессию генов стрессоустойчивости. Планками погрешностей показаны ошибки средней. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, критерий Манна–Уитни

возможностей самок дрозофил к гипертермии (рис. 2, D). Обработка пажитником не влияет на устойчивость самок к гипертермии.

Обработка серпистеном в концентрации 0,2 и 1 мкМ повышает устойчивость к окислительному стрессу у самок и самок дрозофил, соответственно (рис. 2, B и E). Пажитник не влияет на устойчивость самок и самок дрозофил к окислительному стрессу.

Обработка серпистеном в концентрации 0,2 мкМ и экстрактом пажитника в наибольшей концентрации вызывает статистически значимое ($p < 0,05$) снижение устойчивости самок к голоданию (рис. 2, C).

Экстракт пажитника в наибольшей исследованной концентрации (протодиосцин — 4,6 мкг/мл, диосцин — 2,6 мкг/мл) повышает адаптационные возможности самок дрозофил к голоданию (рис. 2, F).

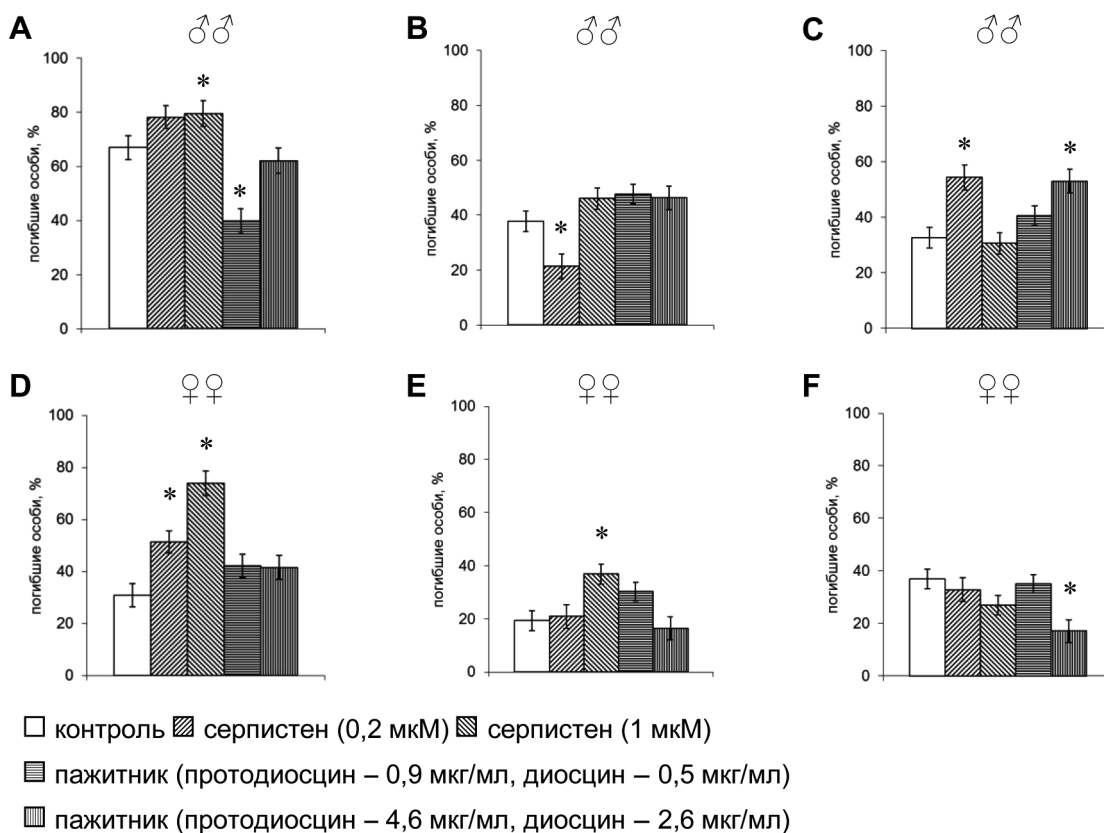


Рис. 2. Влияние фитопрепаратов на выживаемость имаго в стрессовых условиях; А, D — гипертермия в течение 24 ч; В, Е — окислительный стресс в течение 48 ч; С, F — голодание в течение 48 ч; * — $p < 0,05$, по сравнению с контролем, ϕ -критерий Фишера

Таким образом, нами установлено, что серпистен снижает устойчивость самцов и самок дрозофил к тепловому шоку, устойчивость самок к окислительному стрессу и устойчивость самцов к голоду. В то же время серпистен повышает устойчивость самцов к окислительному стрессу. Экстракт пажитника снижает устойчивость самцов дрозофил к голоданию, однако повышает устойчивость самцов к гипертермии и устойчивость самок к голоданию.

Продолжительность жизни

Показано, что в первой повторности эксперимента серпистен в концентрациях 0,2 и 1 мкМ приводит к статистически значимому ($p < 0,05$) увеличению максимальной продолжительности жизни самцов на 6%. У самок в первой повторности серпистен в концентрации 0,2 мкМ приводит к увеличению максимальной продолжительности жизни на 4% ($p < 0,05$). Однако во второй повторности эксперимента геропротекторный эффект серпистена не наблюдается ни у самцов, ни у самок (табл. 2, рис. 3).

Экстракт пажитника в первой повторности эксперимента, в обеих исследованных концентрациях, вызывает увеличение максимальной продолжительности жизни самцов на 4–6% ($p < 0,05$) (табл. 2, рис. 4). Во второй повторности эксперимента эффект пажитника на про-

должительность жизни самцов не выражен. У самок в первой повторности эксперимента экстракт пажитника в наименьшей из исследованных концентраций вызывает увеличение медианной продолжительности жизни на 6% ($p < 0,05$), а в наибольшей концентрации ведет к увеличению максимальной продолжительности жизни на 5% ($p < 0,05$). Во второй повторности эксперимента, в обеих исследованных концентрациях, экстракт пажитника вызывает увеличение медианной продолжительности жизни у самок на 7–12% ($p < 0,01$).

Таким образом, настойка пажитника обладает большим геропротекторным потенциалом в сравнении с серпистеном, при этом геропротекторный эффект пажитника более выражен при низких концентрациях у самок.

Влияние фитопрепаратов на уровень потребления пищи

Показано, что добавление 0,2 мкМ серпистена в состав питательной среды приводит к статистически значимому ($p < 0,005$) снижению уровня потребления пищи у самцов и самок на 50% (рис. 5). При добавлении в питательную среду 0,2 и 1 мкМ экстракта пажитника потребление пищи самцами снижается на 27 и 21% соответственно (рис. 5).

Таблица 2

Влияние фитопрепаратов на показатели продолжительности жизни

Обработка	Повт.	М	dM (%)	pM	90%	d90%	p90%	n
Самцы								
Контроль (серпистен)	1	52			65			202
Серпистен (0,2 мкМ)	1	52	0	0,163	69	+6,2	0,008	154
Серпистен (1 мкМ)	1	50	-3,8	0,974	69	+6,2	0,029	203
Контроль (серпистен)	2	54			66			138
Серпистен (0,2 мкМ)	2	53	-1,9	0,081	64	-3	0,277	140
Серпистен (1 мкМ)	2	53	-1,9	0,36	67	+1,5	0,052	134
Контроль (пажитник)	1	55			69			187
Пажитник (протодиосцин 0,9 мкг/мл, диосцин 0,5 мкг/мл)	1	58	+5,5	0,005	73	+5,8	0,009	208
Пажитник (протодиосцин 4,6 мкг/мл, диосцин 2,6 мкг/мл)	1	52	-5,5	0,185	72	+4,3	0,003	212
Контроль (пажитник)	2	54			66			138
Пажитник (протодиосцин 0,9 мкг/мл, диосцин 0,5 мкг/мл)	2	53	-1,9	0,003	62	-6,1	0,074	152
Пажитник (протодиосцин 4,6 мкг/мл, диосцин 2,6 мкг/мл)	2	53	-1,9	0,211	67	+1,5	0,318	143
Самки								
Контроль (серпистен)	1	66,5			76			206
Серпистен (0,2 мкМ)	1	67,5	+1,5	0,0004	79	+3,9	0,0015	204
Серпистен (1 мкМ)	1	65	-2,3	0,775	76	0	0,324	205
Контроль (серпистен)	2	60			71			110
Серпистен (0,2 мкМ)	2	61	+1,7	0,243	74	+4,2	0,152	122
Серпистен (1 мкМ)	2	58	-3,3	0,770	72	+1,4	0,466	119
Контроль (пажитник)	1	65			73			170
Пажитник (протодиосцин 0,9 мкг/мл, диосцин 0,5 мкг/мл)	1	69	+6,2	0,025	76	+4,1	0,121	190
Пажитник (протодиосцин 4,6 мкг/мл, диосцин 2,6 мкг/мл)	1	65,5	+0,8	0,139	77	+5,5	0,022	184
Контроль (пажитник)	2	60			71			110
Пажитник (протодиосцин 0,9 мкг/мл, диосцин 0,5 мкг/мл)	2	67	+11,7	0,0001	74	+4,2	0,787	118
Пажитник (протодиосцин 4,6 мкг/мл, диосцин 2,6 мкг/мл)	2	64	+6,7	0,008	71	0	0,519	124

Повт. — повторность эксперимента; М — медианная продолжительность жизни (сут); dM — различия для медианной продолжительности жизни по сравнению с контролем (%); pM — статистическая значимость различия для медианной продолжительности жизни по критерию Мантеля-Кокса; 90% — максимальная продолжительность жизни (возраст смертности 90 % выборки) (сут); d90 % — различия для максимальной продолжительности жизни по сравнению с контролем (%); p90 % — статистическая значимость различия для максимальной продолжительности жизни по критерию Ванг-Аллисона; n — величина выборки

В целом самцы характеризуются большей требовательностью к составу среды, а самки большим уровнем потребления пищи как с фитопрепаратами, так и без них.

Мы предположили, что мухи не успели адаптироваться к новому составу среды за время проведения теста (1 ч) вследствие чего наблюдалось снижение уровня пот-

ребления пищи. Поэтому мы провели оценку долгосрочных эффектов возможного ограничения потребления пищи на массу тела имаго и плодовитость.

Масса тела

При оценке эффекта серпистена и экстракта пажитника на массу тела имаго статистически значимых из-

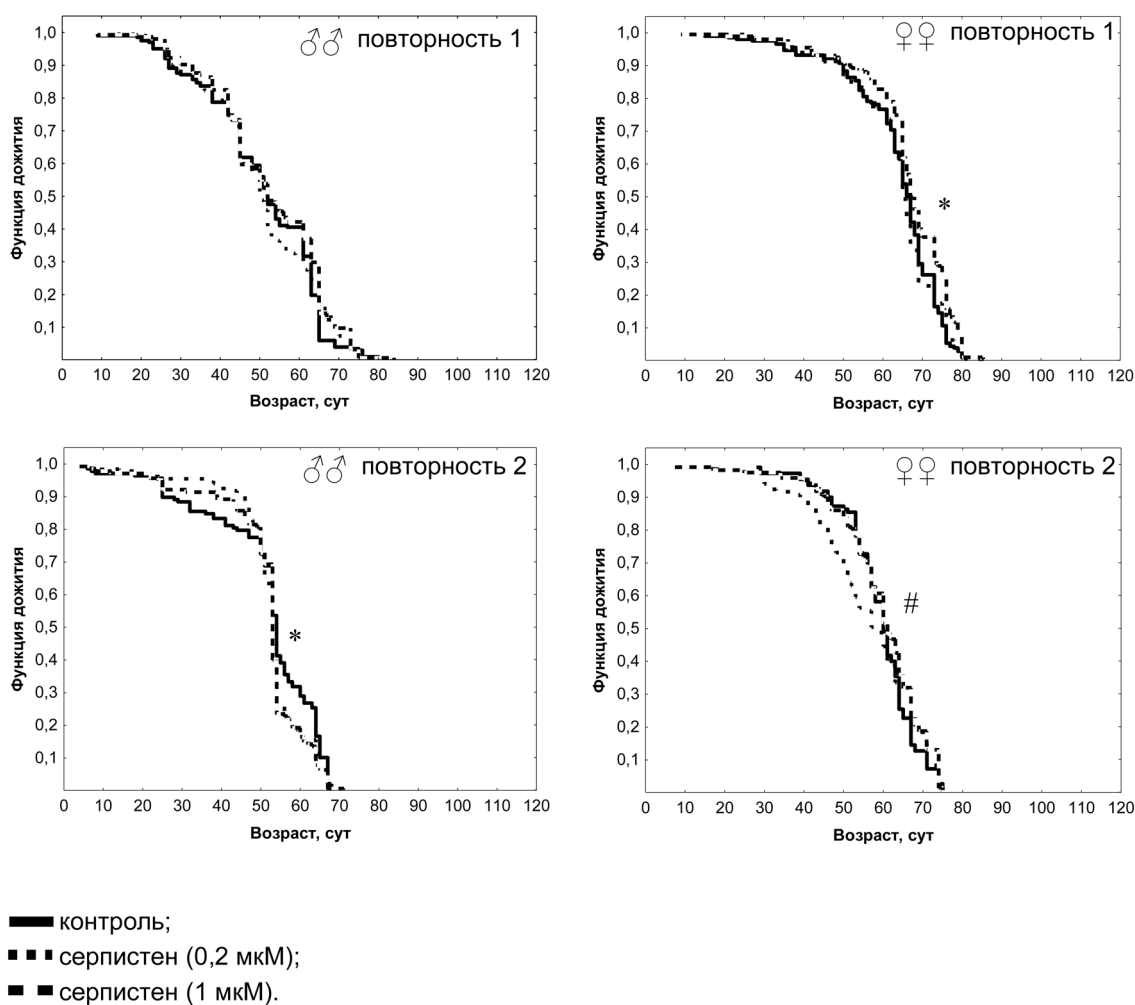


Рис. 3. Влияние серпистена на продолжительность жизни. * — $p < 0,05$, серпистен (0,2 мкМ) по сравнению с контролем, критерий Колмогорова–Смирнова; # — $p < 0,05$, серпистен (1 мкМ) по сравнению с контролем, критерий Колмогорова–Смирнова

менений не обнаружено ни у самцов ни у самок (рис. 6). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии признаков хронического ограничения потребления пищи у мух, содержащихся на питательной среде с добавлением фитопрепаратов.

Плодовитость

Обнаружено, что обработка серпистеном привела к статистически значимому увеличению яйцепродукции самок на 57–59 % относительно контроля ($p < 0,05$) (рис. 7). После обработки пажитником наблюдали увеличение яйцепродукции на 60–88 % ($p < 0,05$) (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Различные факторы окружающей среды как химической, так и физической природы способны существенно влиять на транскрипционный профиль клетки и изменять

уровень активности генов клеточного стресс-ответа, что находится в основе стресс-реакций на уровне целого организма (Moskalev et al., 2014). Все больше экспериментальных подтверждений получает точка зрения, согласно которой геропротекторные эффекты связаны со стимулирующей веществе-адаптогеном активности собственных систем защиты клетки от различного вида стрессов (Calabrese et al., 2008). Гормезис как следствие умеренного стресса, вызванного различными факторами, принимается как один из вероятных механизмов продления жизни (Le Bourg, 2009; Minois, 2000; Rattan, 2008). Гормезис обычно связывают с активацией белков теплового шока, ферментов антиоксидантной защиты, механизмов репарации ДНК, иммунного ответа и селекцией неустойчивых клеток (Amrit et al., 2010; Arking et al., 2000; Moskalev, 2007; Moskalev et al., 2009; Moskalev et al., 2011; Mylnikov et al., 2005; Tatar et al., 1997; Yang et al., 2007; Zhao et al., 2005).

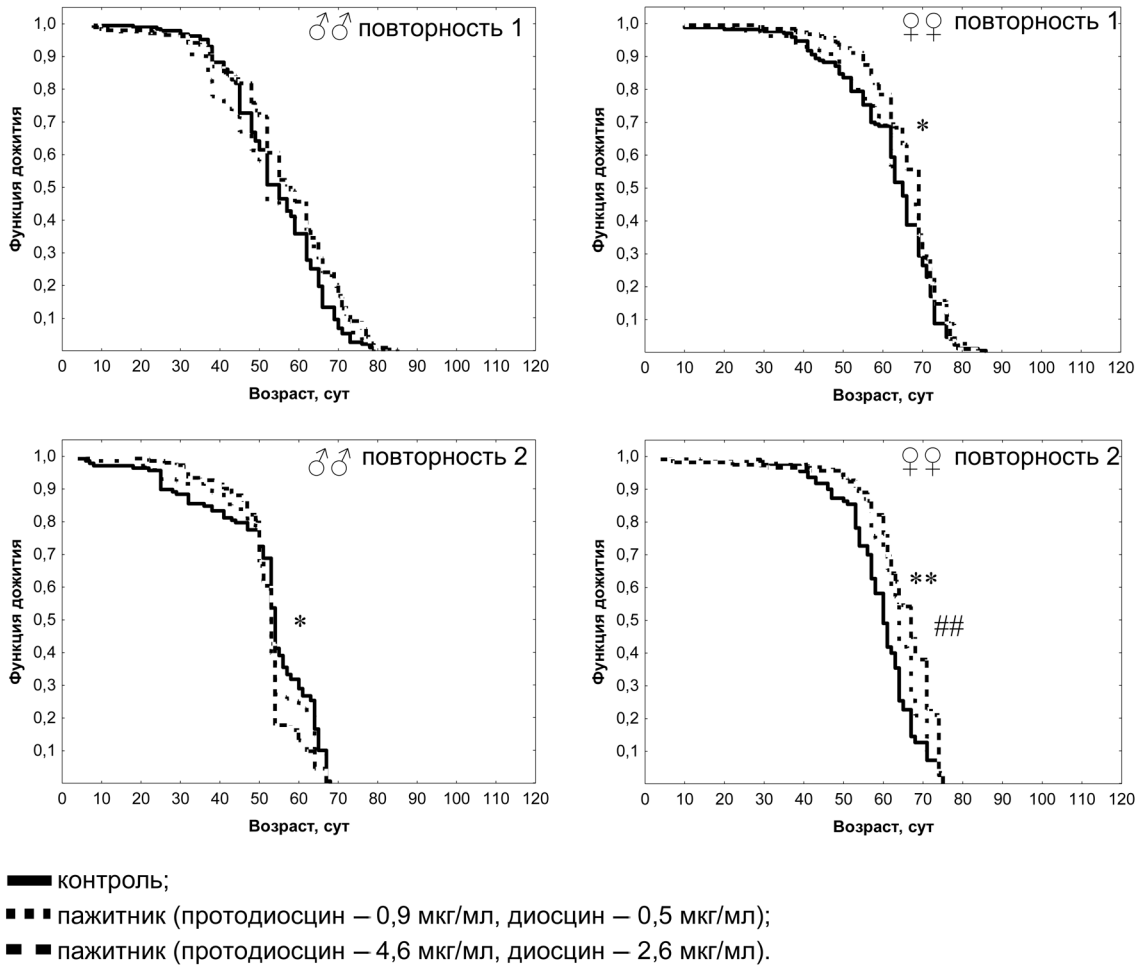


Рис. 4. Влияние экстракта пажитника на продолжительность жизни. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,001$, пажитник (протодиосцин — 0,9 мкг/мл, диосцин — 0,5 мкг/мл) по сравнению с контролем, критерий Колмогорова–Смирнова; # — $p < 0,05$, ## — $p < 0,001$, пажитник (протодиосцин — 4,6 мкг/мл, диосцин — 2,6 мкг/мл) по сравнению с контролем, критерий Колмогорова–Смирнова

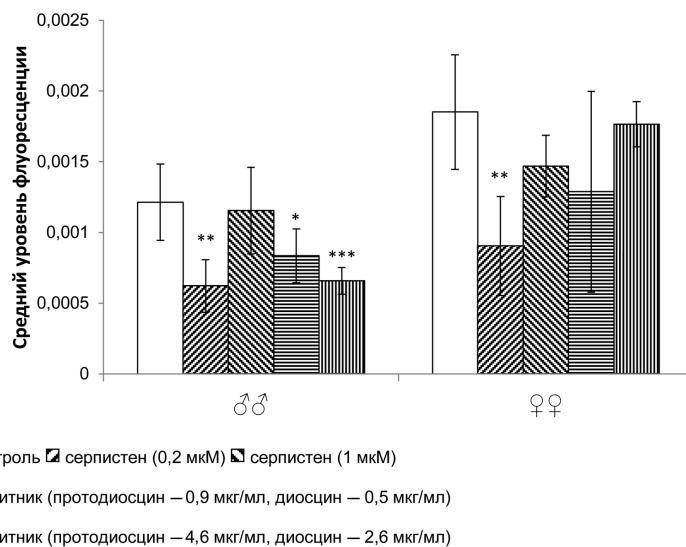


Рис. 5. Влияние фитопрепаратов на уровень потребления питательной среды. Планками погрешностей показано стандартное отклонение по выборке. *** — $p < 0,001$, ** — $p < 0,005$, * — $p < 0,05$, по сравнению с контролем, t-критерий Стьюдента

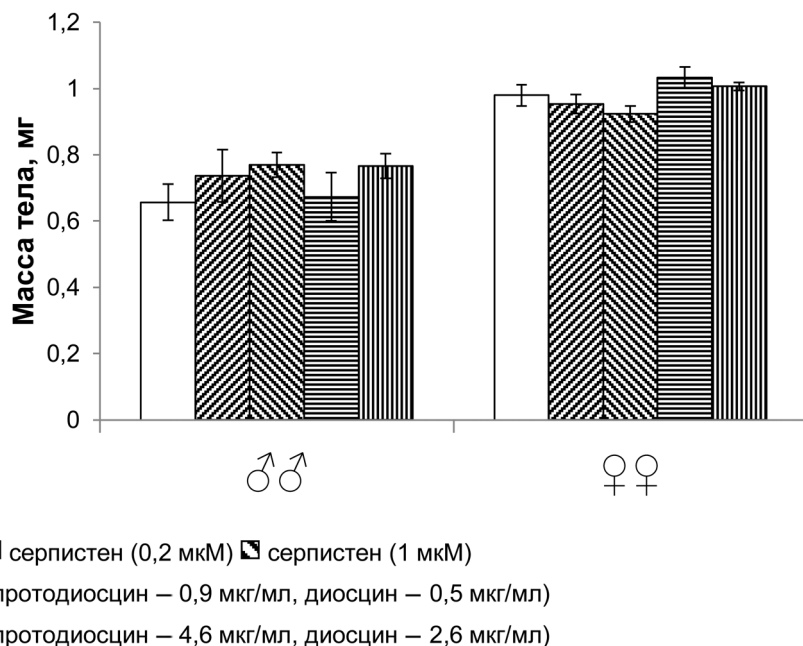


Рис. 6. Влияние фитопрепаратов на массу тела имаго. Планками погрешностей показана ошибка средней

Проведенный нами анализ уровня транскрипции генов стресс-ответа продемонстрировал, что исследуемые фитопрепараты активируют механизмы антиоксидантной защиты (*Sod1*). По видимому активация *Sod1* ведет к снижению уровня свободных радикалов, уменьшению частоты возникновения повреждений ДНК и снижению уровня индукции систем репарации ДНК (*XPF* и *Rad51*). Снижение уровня свободнорадикальных повреждений также уменьшает частоту программируемой клеточной гибели (*Hid*). О высокой антиоксидантной активности растительных препаратов свидетельствуют исследования и других авторов (Mylpnikov et al., 2005).

Кроме того, у дрозофил, обработанных разными концентрациями серпистена и экстракта пажитника, наблюдается увеличение стрессоустойчивости и продолжительности жизни. Однако эффект, обнаруженный нами на уровне целого организма (стрессоустойчивость и продолжительность жизни), выражен меньше, чем на молекулярном уровне (изменение уровня экспрессии генов).

Также мы установили, что умеренный адаптогенный и геропротекторный эффекты фитопрепаратов не связаны с ухудшением приспособленности (плодовитости) и не являются следствием снижения потребления пищи.

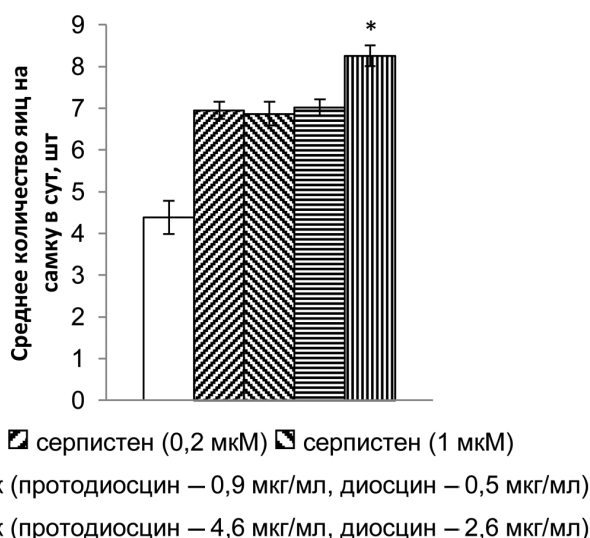


Рис. 7. Влияние экстрактов серпистена и пажитника на плодовитость. Планками погрешностей показана ошибка средней. * — $p < 0,005$, по сравнению с контролем, t-критерий Стьюдента

Ранее нами были выявлены антиоксидантные и геропротекторные свойства у лигнинов, выделенных из серпухи венценосной и родиолы розовой (Белый с соавт., 2010). Кроме того, нами было показано, что обработка имаго дрозофил пектинами приводит к активации экспрессии генов, вовлеченных в контроль репарации ДНК (*D-GADD45*, *mei-9*, *spn-B*), апоптоз (*hid*), ответ на тепловой шок (*hsp70Aa*), а также генов иммунного ответа (*Defensin*, *Drosomycin* и *Metchnikowin*) (Shaposhnikov et al., 2014). Все это подтверждает предположение, что продление жизни и повышении стрессоустойчивости фитопрепаратами происходит по механизму гормезиса.

Таким образом, полученные нами результаты демонстрируют, что фитопрепараты, содержащие фитостероиды и гликозиды, изменяют уровень экспрессии генов стресс-ответа клетки и активируют механизмы гормезиса. В тоже время изученные фитопрепараты обладают умеренным геропротекторным и адаптогенным эффектом.

Исследования поддержаны программой фундаментальных исследований УрО РАН № 12-П-4-1023.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В. Н. (2003) Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука.
2. Белый В. А., Печникова А. А., Кочева Л. С., с соавт. (2010) Лигнины родиолы розовой и серпухи венценосной: особенности химической структуры и антиоксидантные свойства. Успехи геронтологии. Т. 23:(2): С. 221–227.
3. Володин В. В., Матаев С. И. (2011) Экдистероидсодержащие растения — источники новых адаптогенов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова. Т. 7 (2): С. 52–59.
4. Amrit F. R., Boehnisch C. M., May R. C. (2010) Phenotypic covariance of longevity, immunity and stress resistance in the *Caenorhabditis* nematodes. PLoS ONE. V. 5 (4): P. e9978.
5. Arking R., Burde V., Graves K., et al. (2000) Forward and reverse selection for longevity in *Drosophila* is characterized by alteration of antioxidant gene expression and oxidative damage patterns. Exp. Gerontol. V. 35 (2): P. 167–185.
6. Ashburner M. (1989) *Drosophila*: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
7. Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., et al. (2008) Cellular stress response: a novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. Neurochem. Res. V. 33 (12): P. 2444–2471.
8. Danilov A., Shaposhnikov M., Plyusnina E., et al. (2013) Selective anticancer agents suppress aging in *Drosophila*. Oncotarget. V. 4 (9): P. 1527–1546.
9. Le Bourg E. (2009) Hormesis, aging and longevity. Biochim Biophys Acta. V. 1790 (10): P. 1030–1039.
10. Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. Methods. V. 25 (4): P. 402–408.
11. Minois N. (2000) Longevity and aging: beneficial effects of exposure to mild stress. Biogerontology. V. 1 (1): P. 15–29.
12. Moskalev A. (2007) Radiation-induced life span alteration of *Drosophila* lines with genotype differences. Biogerontology. V. 8 (5): P. 499–504.
13. Moskalev A., Shaposhnikov M. (2011) Pharmacological inhibition of NF- κ B prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*. Aging (Albany NY). V. 3 (4): P. 391–394.
14. Moskalev A., Shaposhnikov M., Snezhkina A., et al. (2014) Mining gene expression data for pollutants (dioxin, toluene, formaldehyde) and low dose of gamma irradiation. PLoS ONE. V. 9 (1): P. e86051.
15. Moskalev A., Shaposhnikov M., Turysheva E. (2009) Life span alteration after irradiation in *Drosophila melanogaster* strains with mutations of *Hsf* and *Hsps*. Biogerontology. V. 10 (1): P. 3–11.
16. Moskalev A. A., Plyusnina E. N., Shaposhnikov M. V. (2011) Radiation hormesis and radioadaptive response in *Drosophila melanogaster* flies with different genetic backgrounds: the role of cellular stress-resistance mechanisms. Biogerontology. V. 12 (3): P. 253–263.
17. Moskalev A. A., Shaposhnikov M. V. (2010) Pharmacological inhibition of phosphoinositide 3 and TOR kinases improves survival of *Drosophila melanogaster*. Rejuvenation Res. V. 13 (2–3): P. 246–247.
18. Mylnikov S. V., Kokko H. I., Karenlampi S. O., et al. (2005) Rubus fruit juices affect lipid peroxidation in a *Drosophila melanogaster* model *in vivo*. J. Agric. Food Chem. V. 53 (20): P. 7728–7733.
19. Panossian A., Wikman G., Wagner H. (1999) Plant adaptogens. III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. Phytomedicine. V. 6(4): P. 287–300.
20. Rattan S. I. (2008) Hormesis in aging. Ageing Res. Rev. V. 7 (1): P. 63–78.
21. RCoreTeam. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Cited 4.08.2014. URL: <http://www.R-project.org>.
22. Shaposhnikov M., Latkin D., Plyusnina E., et al. (2014) The effects of pectins on life span and stress resistance in *Drosophila melanogaster*. Biogerontology. V. 15 (2): P. 113–127.
23. Tatar M., Khazaeli A. A., Curtsinger J. W. (1997) Chaperoning extended life. Nature. V. 390 (6655): P. 30.
24. Wang C., Li Q., Redden D. T., et al. (2004) Statistical methods for testing effects on “maximum lifespan”. Mech. Ageing Dev. V. 125 (9): P. 629–632.

25. Yang P., He X. Q., Peng L., et al. (2007) The role of oxidative stress in hormesis induced by sodium arsenite in human embryo lung fibroblast (HELFL) cellular proliferation model. *Journal of toxicology and environmental health. Part A.* V. 70 (11): P. 976–983.
26. Zhao Y., Sun H., Lu J., et al. (2005) Lifespan extension and elevated *hsp* gene expression in *Drosophila* caused by histone deacetylase inhibitors. *J. Exp. Biol.* V. 208 (Pt 4): P. 697–705.

INFLUENCE OF PHYTOECDYSTEROIDS AND PLANTS STEROIDAL GLYCOSIDES ON THE LIFESPAN AND STRESS RESISTANCE OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Shaposhnikov M. V., Shilova L. A., Plyusnina E. N., Volodina S. O., Volodin V. V., Moskalev A. A.

✿ **SUMMARY: Background.** Elucidation of the molecular mechanisms of effects of the active substances of plant adaptogens is a topical area of researches. **Materials and methods.** We studied the effect of herbal substances containing phytoecdysteroids (20-hydroxyecdysone and inokosterone) of *Serratula coronata* L. or steroidal glycosides (dioscin and protodioscin) of *Trigonella foenum-graecum* L. on the expression level of stress response genes (genes of heat shock proteins, DNA repair, antioxidant defense and apoptosis), stressresistance (paraquat, starvation, hyperthermia) and lifespan of *Drosophila melanogaster*. **Results.** The studied herbal substances upregulated genes of antioxidant defense mechanisms (*Sod1*), but downregulated the DNA repair (*XPF* and *Rad51*) and apoptosis (*Hid*) genes. At the same time herbal substances induced weak adaptogenic and antiaging effects. **Conclusion.** Our results demonstrate that the herbal substances containing phytoecdysteroids and steroidal glycosides change the expression level of stress-response genes and activate mechanisms of hormesis.

✿ **KEY WORDS:** phytoecdysteroids; plants steroidal glycosides; adaptogens; lifespan; stress resistance; hormesis; *Drosophila*.

✿ **REFERENCES (TRANSLITERATED)**

- Amrit F.R., Boehnisch C.M., May R.C. (2010) Phenotypic covariance of longevity, immunity and stress resistance in the *Caenorhabditis* nematodes. *PLoS ONE.* V. 5 (4): P. e9978.
- Anisimov V.N. (2003) Мolekuliarnye i fiziologicheskie mehanizmy stareniya [Molecular and physiological mechanisms of aging]. St. Petersburg: Publishing house Nauka.
- Arking R., Burde V., Graves K., et al. (2000) Forward and reverse selection for longevity in *Drosophila* is characterized by alteration of antioxidant gene expression and oxidative damage patterns. *Exp. Gerontol.* V. 35 (2): P. 167–185.
- Ashburner M. (1989) *Drosophila: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Belyi V.A., Pechnikova A.A., Kocheva L.S., et al. (2010) Ligniny rodioly rozovoy i serpuhi vencenosnoy: osobennosti himicheskoy struktury i antioksidantnye svoystva [Lignins of *Rhodiola rosea* and *Serratula coronata*: peculiarities of chemical structure and antioxidant properties]. *Adv. Gerontol.* V. 23 (2): P. 221–227.
- Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., et al. (2008) Cellular stress response: a novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem. Res.* V. 33 (12): P. 2444–2471.
- Danilov A., Shaposhnikov M., Plyusnina E., et al. (2013) Selective anticancer agents suppress aging in *Drosophila*. *Oncotarget.* V. 4 (9): P. 1527–1546.
- Le Bourg E. (2009) Hormesis, aging and longevity. *Biochim Biophys Acta.* V. 1790 (10): P. 1030–1039.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods.* V. 25 (4): P. 402–408.
- Minois N. (2000) Longevity and aging: beneficial effects of exposure to mild stress. *Biogerontology.* V. 1 (1): P. 15–29.
- Moskalev A. (2007) Radiation-induced life span alteration of *Drosophila* lines with genotype differences. *Biogerontology.* V. 8 (5): P. 499–504.
- Moskalev A., Shaposhnikov M. (2011) Pharmacological inhibition of NF- κ B prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY).* V. 3 (4): P. 391–394.
- Moskalev A., Shaposhnikov M., Snezhkina A., et al. (2014) Mining gene expression data for pollutants (dioxin, toluene, formaldehyde) and low dose of gamma-irradiation. *PLoS ONE.* V. 9 (1): P. e86051.
- Moskalev A., Shaposhnikov M., Turysheva E. (2009) Life span alteration after irradiation in *Drosophila melanogaster* strains with mutations of *Hsf* and *Hsps*. *Biogerontology.* V. 10 (1): P. 3–11.
- Moskalev A.A., Plyusnina E.N., Shaposhnikov M.V. (2011) Radiation hormesis and radioadaptive response in *Drosophila melanogaster* flies with different genetic backgrounds: the role of cellular stress-resistance mechanisms. *Biogerontology.* V. 12 (3): P. 253–263.
- Moskalev A.A., Shaposhnikov M.V. (2010) Pharmacological inhibition of phosphoinositide 3 and TOR kinases improves survival of *Drosophila melanogaster*. *Rejuvenation Res.* V. 13 (2–3): P. 246–247.
- Mylnikov S.V., Kokko H.I., Karenlampi S.O., et al. (2005) Rubus fruit juices affect lipid peroxidation in a *Drosophila melanogaster* model *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.* V. 53 (20): P. 7728–7733.
- Panossian A., Wikman G., Wagner H. (1999) Plant adaptogens. III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. *Phytomedicine.* V. 6(4): P. 287–300.
- Rattan S.I. (2008) Hormesis in aging. *Ageing Res. Rev.* V. 7 (1): P. 63–78.

20. RCoreTeam. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Cited 4.08.2014. URL: <http://www.R-project.org>.
21. Shaposhnikov M., Latkin D., Plyusnina E., et al. (2014) The effects of pectins on life span and stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*. V. 15 (2): P. 113–127.
22. Tatar M., Khazaeni A. A., Curtsinger J. W. (1997) Chaperoning extended life. *Nature*. V. 390 (6655): P. 30.
23. Volodin V. V., Mataev S. I. (2011) Ekdisteroidsoderzhashchie rasteniya — istochniki novykh adaptogenov [Ecdysteroid containing plants — sources of new adaptogens]. *Yu. A. Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology*. V. 7 (2): P. 52–59.
24. Wang C., Li Q., Redden D. T., et al. (2004) Statistical methods for testing effects on «maximum lifespan». *Mech. Ageing Dev.* V. 125 (9): P. 629–632.
25. Yang P., He X. Q., Peng L., et al. (2007) The role of oxidative stress in hormesis induced by sodium arsenite in human embryo lung fibroblast (HELFL) cellular proliferation model. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*. V. 70 (11): P. 976–983.
26. Zhao Y., Sun H., Lu J., et al. (2005) Lifespan extension and elevated *hsp* gene expression in *Drosophila* caused by histone deacetylase inhibitors. *J. Exp. Biol.* V. 208 (Pt 4): P. 697–705.

✉ Информация об авторах

Шапошников Михаил Вячеславович — к. б. н., ведущий научный сотрудник, доцент, лаборатория молекулярной радиобиологии и геронтологии. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии Коми» научного центра Уральского отделения Российской академии наук. 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28. E-mail: mshaposhnikov@mail.ru.

Шилова Любовь Алексеевна — лаборант, лаборатория молекулярной радиобиологии и геронтологии. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии Коми» научного центра Уральского отделения Российской академии наук. 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28. E-mail: lyubov.schilova@yandex.ru.

Плюснина Екатерина Николаевна — к. б. н., научный сотрудник, лаборатория молекулярной радиобиологии и геронтологии. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии Коми» научного центра Уральского отделения Российской академии наук. 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28. E-mail: kateplus@mail.ru.

Володина Светлана Олеговна — к. б. н., старший научный сотрудник, лаборатория биотехнологии. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии Коми» научного центра Уральского отделения Российской академии наук. 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28. E-mail: volodina@ib.komisc.ru.

Володин Владимир Витальевич — д. б. н., зав. лабораторией, профессор, лаборатория биотехнологии. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии Коми» научного центра Уральского отделения Российской академии наук. 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28. E-mail: volodin@presidium.komisc.ru.

Москалев Алексей Александрович — д. б. н., заведующий, доцент, лаборатория молекулярной радиобиологии и геронтологии. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии Коми» научного центра Уральского отделения Российской академии наук. 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28. E-mail: amoskalev@list.ru.

Shaposhnikov Mikhail Vyacheslavovich — Leading Researcher, PhD, Associate Professor, Laboratory of Molecular Radiobiology and Gerontology. Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS, Syktyvkar, Russia. 167982, Syktyvkar, Kommunisticheskaya St., 28, Russia. E-mail: mshaposhnikov@mail.ru.

Shilova Lyubov' Alekseevna — assistant, Laboratory of Molecular Radiobiology and Gerontology. Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS, Syktyvkar, Russia. 167982, Syktyvkar, Kommunisticheskaya St., 28, Russia. E-mail: lyubov.schilova@yandex.ru.

Plyusnina Ekaterina Nikolaevna — Researcher, PhD, Laboratory of Molecular Radiobiology and Gerontology. Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS, Syktyvkar, Russia. 167982, Syktyvkar, Kommunisticheskaya St., 28, Russia. E-mail: kateplus@mail.ru.

Volodina Svetlana Olegovna — Head of Laboratory, Doctor of Biological Sciences, Professor, Laboratory of Biotechnology. Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS, Syktyvkar, Russia. 167982, Syktyvkar, Kommunisticheskaya St., 28, Russia. E-mail: volodina@ib.komisc.ru.

Volodin Vladimir Vital'yevich — Head of Laboratory, Doctor of Biological Sciences, Professor, Laboratory of Biotechnology. Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS, Syktyvkar, Russia. 167982, Syktyvkar, Kommunisticheskaya St., 28, Russia. E-mail: volodin@presidium.komisc.ru.

Moskalev Aleksey Aleksandrovich — Head. Laboratory, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Laboratory of Molecular Radiobiology and Gerontology. Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS, Syktyvkar, Russia. 167982, Syktyvkar, Kommunisticheskaya St., 28, Russia. E-mail: amoskalev@list.ru.