

## СТАРЕНИЕ И ДОЛГОЛЕТИЕ, БОЛЕЗНИ ЗРЕЛОГО ВОЗРАСТА

© С. В. Мыльников<sup>1</sup>,  
Т. И. Опарина<sup>2</sup>, В. В. Малинин<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет;

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН;

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

✳ **Проведен сравнительный анализ влияния шести синтетических пептидов, а также эпиталамина и мелатонина на параметры кривых выживания, и антиоксидантный статус тканей *D. melanogaster*. Выявлен значительный вклад генотипа и взаимодействия генотип — среда в изучаемые показатели. Показано, что механизмы влияния вилона и эпиталона на генерацию активных форм кислорода в митохондриях различаются.**

✳ **Ключевые слова:** пептиды, выживаемость, свободные радикалы

### ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС И ПАРАМЕТРЫ КРИВЫХ ВЫЖИВАНИЯ СЕЛЕКТИРУЕМЫХ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

#### ВВЕДЕНИЕ

Важнейшей задачей геронтологии является поиск эффективных геропротекторов. Одно из направлений такого поиска базируется на свободно-радикальной теории старения (Harman, 1982), из которой следует, что вещества — геропротекторы следует искать среди природных или синтетических антиоксидантов. В наших предыдущих работах изучены антиоксидантные и геропротекторные эффекты комплексного пептидного препарата эпифиза — эпиталамина и двух синтетических пептидов вилона® (Lys-Glu) и эпиталона® (Ala-Glu-Asp-Gly), синтезированных в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН (Anisimov et al., 1998; Хавинсон, Мыльников, 2000а, 2000б, 2000в). В настоящей работе представлены результаты сравнительного анализа влияния шести синтетических пептидов (вилона, кортагена, ливагена, простамакса, эпиталона), а также эпиталамина и мелатонина на параметры кривых выживания, содержание продуктов перекисного окисления липидов, активность каталазы, генерацию активных форм кислорода в субклеточных фракциях, а также на общую антирадикальную активность (АРАД) цитозоля *D. melanogaster*.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

##### **Линии *Drosophila melanogaster*, отселектированные на различия по репродуктивной функции**

Начиная с 1966 года группа под руководством проф. Л. З. Кайданова проводила селекцию родственных линий дрозофилы по репродуктивной функции (половой активности самцов). Отбор сопровождали тесным инбридингом — индивидуальными скрещиваниями в каждом поколении полных братьев и сестер. В процессе селекции неоднократно получали с помощью возвратного отбора серию линий, отличающихся по селективируемым признакам (ВА<sup>-</sup>, НА<sup>-</sup>, НА<sup>+</sup>). Такой отбор привел к приобретению низкоактивными линиями комплекса генетически контролируемых изменений, важнейшие из которых затронули нейроэндокринную систему мух, что стало предметом специальных исследований (Кайданов, 1979; Иовлева, Мыльников, 2007). К началу наших экспериментов возраст линий составил более 1000 поколений отбора.

В линиях, заложенных из природной популяции «Лерик» (Азербайджан), вели отбор по эмбриональной смертности, сопровождаемый тесным инбридингом. В итоге были получены контрастные инбредные линии: с высокой (линия ВЭС) и низкой эмбриональной смертностью (линия НЭС). Параллельно поддерживали без отбора в массовых культурах выборку мух из природной популяции Лерик. Было установлено, что линии ВЭС и Лерик характеризуются трехкратными различиями в численности жизнеспособного потомства, не отличаясь при этом по плодовитости, определяемой по числу отложенных яиц за

единицу времени (Мыльников и др., 1989). В линии ВЭС 81 % яиц останавливаются в развитии уже на ранних стадиях онтогенеза, то есть этой линии свойственна высокая частота ранних доминантных леталей (РДЛ), причем она возрастает от 65 % в первые сутки яйцекладки до 95 % на четвертые (Мыльников, 1991а, 1991б). По показателю поздних доминантных леталей различий между изученными линиями выявлено не было. Проведенный генетический анализ показал, что частота и динамика возникновения РДЛ в линии ВЭС полностью определяется генотипом самки. Кроме того, было обнаружено, что в линии ВЭС к 86-му поколению направленной селекции возникла система сбалансированных летальных мутаций, создающая перманентную гетерозиготность на небольшом участке второй хромосомы (Мыльников, 1991б).

### Характеристика пептидов

Пептидные препараты вилон (Lys-Glu)<sup>®</sup>, эпиталон (Ala-Glu-Asp-Gly)<sup>®</sup>, кортаген (Ala-Glu-Asp-Pro)<sup>®</sup>, ливаген (Lys-Glu-Asp-Ala)<sup>®</sup>, простамакс (Lys-Glu-Asp-Pro)<sup>®</sup> растворяли в физиологическом растворе. Их добавляли в питательную среду в количестве 0,00001 % от веса среды, воздействуя на личинок 2–3-го возраста. Таким образом, длительность воздействия не превышала 2-х суток. В контрольных группах в среду добавляли физиологический раствор. Имаго содержали на среде следующего состава: 100 г живых дрожжей, 10 г агар-агара, 30 г сахара, 30 г изюма и 30 г манной крупы на 1 л воды.

### Определение диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот

Суть метода состоит в том, что в ходе перекисного окисления высших ненасыщенных жирных кислот на стадии образования свободных радикалов возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением максимума в спектре поглощения при длине волны  $\lambda = 233$  нм, что соответствует содержанию конъюгированных гидроперекисей (КГП) (Стальная, 1977). Содержание КГП определяли в гомогенатах тканей имаго.

### Измерение активности каталазы

Инкубационная смесь содержала 0,1 мл 0,05 М буфера трис-НСI (рН 7,4), 1,8 мл дистиллированной воды (контроль) или 1,8 мл 10 мМ  $H_2O_2$  (опыт) и гомогенат тканей. Об активности каталазы судили по убыли перекиси водорода за 1 минуту и выражали в международных единицах (Leff et al., 1992). Активность каталазы определяли в гомогенатах тканей имаго.

### Измерение содержания активных форм кислорода в митохондриях и антирадикальной активности цитозоля

Нами был применен модифицированный метод выделения митохондриальной и цитозольной фракций из тканей млекопитающих (Mockett et al., 1999). Для выделения

субклеточных фракций 50 мг мух в возрасте 10 (молодые) и 25 (зрелые) суток гомогенизировали в 0,25 М сахарозе, приготовленной на 10 мМ Трис HCl буфере (рН 7,4). Гомогенат центрифугировали 3 минуты при 500 g для осаждения ядерной фракции, после чего осаждали митохондрии центрифугированием в течение 10 минут при 7000 g. Полученный после второго центрифугирования супернатант, содержащий микросомы и растворимую часть клеток, обозначали как «цитозоль». Препараты субклеточных фракций подвергали процедуре замораживания — оттаивания для высвобождения митохондриального матрикса. Полученные митохондрии суспензировали в 0,5 мл  $K^+$ -фосфатного буфера, рН 7,45, содержащего 60 мМ  $KH_2PO_4$  и 105 мМ KCl (концентрация белка 0,6–1 мг/мл). Критерием чистоты выделения митохондриальной фракции служила активность сукцинатдегидрогеназы, которая в наших экспериментах превышала таковую в цитозоле в 200–500 раз.

Генерацию АФК в митохондриальной фракции определяли методом измерения перекисной люминол-зависимой хемилюминисценции, который широко используется для исследования генерации АФК и других свободных радикалов (Владимиров с соавт., 1991). Хемилюминисценцию регистрировали на хемилюминометре “Emilite-1105” (Россия) при 37 °С в течение 2 мин в среде, содержащей 0,7 мл К-фосфатного буфера рН 7,45, 0,05 мл 0,1 М раствора люминола и 0,05 мл разведенной буфером 1:4 митохондриальной фракции. Реакцию инициировали введением в реакционную смесь 0,2 мл 2%-го раствора  $H_2O_2$  ( $E_{230} = 3,50$ ). АРАД цитозоля определяли с использованием стабильного радикала дифенилпикрилгидразила (ДФПГ). Раствор ДФПГ в этаноле ( $E_{517} = 0,70–0,75$ ) добавляли к 1,5 мл безбелкового экстракта цитозольной фракции, полученного после осаждения белков цитозоля фосфорно-вольфрамовой кислотой. После 10-ти минутной инкубации ДФПГ экстрагировали 4,0 мл толуола. Измерения вели на спектрофотометре “Beckman DU-65” при длине волны 517 нм.

Каждый экспериментальный вариант включал 3–4 повторности. Основным методом статистической обработки служил дисперсионный анализ. Для стабилизации внутривыборочных дисперсий в случае необходимости применяли логарифмирование исходных данных.

### Оценка параметров кривой выживания

Исходное количество имаго в течение первых шести часов после вылета подвергали эфирной наркотизации и размещали по индивидуальным стеклянным стаканчикам (от 5 до 10 виргинных самок и самцов в каждом). Культурам присваивали индивидуальные номера.

В дальнейшем регулярно производили визуальный подсчет умерших особей отдельно в каждом стаканчике, без эфирной наркотизации, после чего оставшихся в живых мух переносили на свежую среду, сохраняя при этом порядковый номер стаканчика. Объем каждой когорты составлял от 100 до 500 особей.

Рассчитывали следующие параметры:

медиану кривой выживания — как  $MT_{50}$  в уравнении кривой (далее  $MeПЖ$  — медианная продолжительность жизни)

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{((MT_{50} - X) \times HS)}}$$

где  $Y$  — процент живых особей когорты,  $X$  — возраст когорты,  $MT_{50}$  и  $HS$  — параметры уравнения регрессии.

Наклон кривой выживания — как  $HS$  — Hill Slope в том же уравнении (далее  $НКВЖ$ ).

Нетрудно заметить, что параметр  $MT_{50}$  является близким аналогом средней продолжительности жизни. При этом его вычисляют методом наименьших квадратов — соответственно, он является стандартным коэффициентом регрессии, и такие коэффициенты можно сравнивать с помощью  $F$ -критерия Фишера.

Параметр  $HS$  — статистически оценивает наклон кривой, а значит, косвенно оценивает максимальную продолжительность жизни. Поскольку данная кривая при увеличении возраста когорты асимптотически стремится к нулю, мы также предлагаем оценивать точку на оси  $X$ , которой соответствует значение функции (доля живых особей), равное 0,1 %. Этот возраст мы будем на-

зывать «ожидаемой максимальной продолжительностью жизни» (**ОМПЖ**). Визуальные результаты аппроксимации полученных нами ранее (Смирнова и др., 2000) экспериментальных данных, полученных на восьми линиях дрозофилы моделью доза — эффект представлены на рисунке 1. Коэффициенты детерминации регрессионной модели во всех случаях превышают 90 %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Влияние пептидных препаратов на параметры кривой выживания

Как следует из данных, представленных в таблице 1, в линии ВЭС не выявлено достоверного влияния гормона эпифиза мелатонина на  $MeПЖ$  мух линии ВЭС. Однако пептидный препарат эпифиза — эпиталамин увеличивает  $MeПЖ$  на 16 % и уменьшает  $НКВЖ$  на 20 %.

У самок линии  $VA^-$  (табл. 2) все изученные синтетические пептиды увеличивают  $MeПЖ$  от 40 до 55 %. Снижение  $НКВЖ$  на 20 % наблюдали только при включении в диету простамакса и эпиталамина. У самцов линии  $VA^-$  зафиксировано увеличение  $MeПЖ$  от 37 до 48 % под воздействием вилона, ливагена, простамакса и эпиталона.  $НКВЖ$  самцов этой линии уменьшается под воздействием кортагена и простамакса и увеличивается при действии ливагена.

В линии  $HA^-$  зафиксировано увеличение  $MeПЖ$  самок при действии вилона, ливагена, простамакса и эпиталона и эпиталамина. Три препарата: вилон, простамакс и эпиталамин увеличивают  $НКВЖ$ . У самцов этой линии увеличение  $MeПЖ$  наблюдали при воздействии кортагена, простамакса и эпиталамина. Увеличение  $НКВЖ$  зафиксировано при воздействии кортагена, ливагена, простамакса и эпиталамина.

У самок линии  $HA^+$  в пяти опытных вариантах из шести воздействие пептидными препаратами привело к снижению  $MeПЖ$ , в четырех случаях из шести увеличился  $НКВЖ$ . У самцов этой линии  $MeПЖ$  увеличивается под воздействием вилона и кортагена. Снижение  $НКВЖ$  зафиксировано только при воздействии вилона.

Таким образом, влияние пептидных препаратов на параметры кривой выживания зависит от пола, генетических и иных характеристик линии.

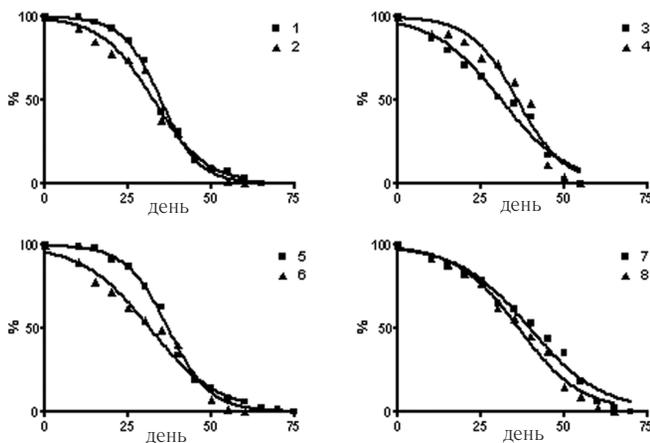


Рис. 1. Результаты аппроксимации кривых выживания регрессионной моделью. По оси  $Y$  — процент живых особей

Таблица 1

### Параметры кривых выживания линии ВЭС в разных вариантах опыта

Пол	Самки			Самцы			
	Вариант	$MeПЖ$ (сутки)	$НКВЖ$ (сутки <sup>-1</sup> )	$ОМПЖ$ (сутки)	$MeПЖ$ (сутки)	$НКВЖ$ (сутки <sup>-1</sup> )	$ОМПЖ$ (сутки)
контроль		23,8 ± 0,37	-0,05 ± 0,002	79,00	26,2 ± 0,74	-0,05 ± 0,003	87,9
мелатонин		22,8 ± 0,43	-0,05 ± 0,002	86,40	24,5 ± 0,67	-0,04 ± 0,003	87,2
эпиталамин		<b>27,6 ± 0,63</b>	<b>-0,04 ± 0,002</b>	98,90	24,7 ± 0,40	-0,05 ± 0,002	87,9

Примечание: жирным шрифтом выделены значения, отличающиеся от контрольного варианта,  $p < 0,01$

Таблица 2

Параметры кривых выживания в разных вариантах опыта

Вариант	Самки			Самцы		
	МеПЖ (сутки)	НКВЖ (сутки <sup>-1</sup> )	ОМПЖ (сутки)	МеПЖ (сутки)	НКВЖ (сутки <sup>-1</sup> )	ОМПЖ (сутки)
линия ВА <sup>-</sup>						
Контроль	26,3 ± 0,63	-0,044 ± 0,0026	94,6	20,8 ± 0,75	-0,041 ± 0,0029	93,4
Вилон	<b>39,0 ± 0,78</b>	-0,037 ± 0,0021	119,8	<b>30,9 ± 0,64</b>	-0,039 ± 0,0020	107,9
Кортаген	<b>38,6 ± 0,69</b>	-0,037 ± 0,0019	119,8	20,4 ± 1,13	<b>-0,027 ± 0,0020</b>	131,5
Ливаген	<b>36,8 ± 0,62</b>	-0,040 ± 0,0020	111,7	<b>23,6 ± 0,35</b>	<b>-0,063 ± 0,0030</b>	71,4
Простамакс	<b>40,8 ± 0,72</b>	<b>-0,035 ± 0,0017</b>	126,8	<b>28,4 ± 0,62</b>	<b>-0,033 ± 0,0015</b>	118,4
Эпиталон	<b>38,5 ± 0,48</b>	-0,039 ± 0,0015	114,8	<b>30,8 ± 0,70</b>	-0,040 ± 0,0023	105,2
Эпиталамин	<b>39,1 ± 0,51</b>	<b>-0,035 ± 0,0013</b>	123,8	22,9 ± 0,59	-0,041 ± 0,0022	95,8
линия НА <sup>-</sup>						
Контроль	19,3 ± 0,46	-0,054 ± 0,0029	75,5	20,5 ± 1,68	-0,044 ± 0,0089	89,6
Вилон	<b>21,1 ± 0,45</b>	-0,065 ± 0,0040	67,4	23,3 ± 1,26	-0,071 ± 0,0135	66,4
Кортаген	19,7 ± 0,44	<b>-0,070 ± 0,0045</b>	62,4	<b>28,0 ± 0,45</b>	<b>-0,187 ± 0,0303</b>	44,3
Ливаген	<b>24,9 ± 0,71</b>	-0,066 ± 0,0063	70,5	25,0 ± 0,63	<b>-0,110 ± 0,0157</b>	52,3
Простамакс	<b>26,8 ± 0,66</b>	<b>-0,086 ± 0,0097</b>	62,4	<b>27,2 ± 0,61</b>	<b>-0,166 ± 0,0336</b>	45,3
Эпиталон	<b>23,2 ± 0,72</b>	-0,069 ± 0,0071	66,4	25,9 ± 1,05	-0,097 ± 0,0207	57,4
Эпиталамин	<b>27,2 ± 0,45</b>	<b>-0,070 ± 0,0045</b>	70,5	<b>27,2 ± 0,49</b>	<b>-0,194 ± 0,0365</b>	43,3
линия НА <sup>+</sup>						
Контроль	28,2 ± 0,68	-0,044 ± 0,0027	96,6	17,7 ± 1,12	-0,042 ± 0,0048	88,6
Вилон	28,6 ± 0,71	-0,038 ± 0,0022	107,7	<b>25,0 ± 1,32</b>	<b>-0,025 ± 0,0021</b>	144
Кортаген	<b>26,0 ± 0,40</b>	<b>-0,073 ± 0,0042</b>	67,4	<b>24,2 ± 1,33</b>	-0,032 ± 0,0031	118,8
Ливаген	<b>25,8 ± 0,50</b>	<b>-0,064 ± 0,0040</b>	73,5	21,7 ± 1,62	-0,028 ± 0,0032	128,9
Простамакс	<b>21,1 ± 0,32</b>	<b>-0,081 ± 0,0042</b>	58,4	19,3 ± 0,96	-0,042 ± 0,0039	91,6
Эпиталон	<b>21,6 ± 0,59</b>	-0,058 ± 0,0041	74,5	17,2 ± 0,92	-0,048 ± 0,0049	80,5
Эпиталамин	<b>16,9 ± 0,36</b>	<b>-0,076 ± 0,0045</b>	56,4	17,1 ± 0,63	-0,049 ± 0,0035	78,5

Примечание: жирным шрифтом выделены значения, отличающиеся от контрольного варианта, p < 0,01

**Антиоксидантный статус тканей разных линий *D. melanogaster* при действии пептидов**

В таблице 3 представлены результаты изучения влияния различных препаратов на активность каталазы и содержание конъюгированных гидроперекисей в тканях мух разных линий.

Как следует из представленных данных, в линии ВЭС у самок, подвергнутых действию эпиталамина и мелатонина, наблюдали увеличение активности каталазы и снижение содержания КГП. У самцов этой линии не выявлено увеличения активности каталазы, но содержание КГП достоверно снижено в обоих опытных вариантах.

В линиях НА<sup>-</sup>, ВА<sup>-</sup>, НА<sup>+</sup> у самок отмечено увеличение (p < 0,001) активности каталазы по сравнению с контролем лишь в одном случае и в двух случаях отмечена тенденция к такому увеличению (p < 0,05). У самцов

тенденция к увеличению активности каталазы (p < 0,05) отмечена в четырех случаях.

Снижение содержания КГП у самок наблюдали практически всегда в линиях ВА<sup>-</sup> и НА<sup>+</sup>, и лишь в отдельных случаях у самцов всех трех линий. Таким образом, антиоксидантный эффект пептидов проявляется в снижении уровня свободных радикалов в тканях мух, при этом, как показано нами ранее, этот эффект является пролонгированным (Хавинсон В. Х., Мьельников С. В., 2000б).

**Влияние синтетических пептидов на генерацию активных форм кислорода в митохондриях и цитозоле**

Результаты измерения генерации АФК в митохондриях у молодых и зрелых мух линий НА<sup>-</sup> и НА<sup>+</sup> были обработаны методом трехфакторного дисперсионного анализа.

Таблица 3

Антиоксидантный статус тканей разных линий *D. melanogaster*

Вариант	Самки		Самцы	
	Удельная активность каталазы (мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мг б. мин)	КГП (нмоль/г ткани)	Удельная активность каталазы (мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мг б. мин)	КГП (нмоль/г ткани)
линия ВЭС				
Контроль	41,3 ± 1,46	0,976 ± 0,079	89,3 ± 1,94	0,584 ± 0,097
Мелатонин	<b>51,4 ± 1,58</b>	<b>0,462 ± 0,137</b>	87,8 ± 1,94	<b>0,426 ± 0,097</b>
Эпиталамин	<b>49,4 ± 1,76</b>	<b>0,416 ± 0,079</b>	95,5 ± 1,94*	<b>0,304 ± 0,079</b>
линия НА <sup>-</sup>				
Контроль	43,31 ± 1,100	1,469 ± 0,0145	49,28 ± 3,915	1,247 ± 0,0195
Эпиталон	42,57 ± 1,825	1,386 ± 0,0605	57,44 ± 2,890*	1,265 ± 0,0075
Вилон	37,40 ± 0,810	1,387 ± 0,1100	44,63 ± 3,440	1,043 ± 0,0075
Кортаген	46,21 ± 3,315	<b>1,278 ± 0,0250</b>	50,15 ± 3,680	<b>1,254 ± 0,0415</b>
Ливаген	51,51 ± 0,170 *	1,431 ± 0,0415	57,23 ± 1,495*	1,402 ± 0,0260*
Простамакс	42,04 ± 2,440	1,385 ± 0,0605	57,45 ± 0,760*	1,265 ± 0,0075
Эпиталамин	46,08 ± 1,220	1,290 ± 0,0050*	57,95 ± 0,865*	1,203 ± 0,0545
линия ВА <sup>-</sup>				
Контроль	51,33 ± 1,431	2,08 ± 0,02517	54,16 ± 7,633	1,66 ± 0,02000
Эпиталон	43,96 ± 1,525	<b>1,74 ± 0,02603</b>	54,55 ± 2,215	1,60 ± 0,008819
Вилон	61,21 ± 4,255	<b>1,51 ± 0,03844</b>	53,50 ± 2,508	<b>1,47 ± 0,008819</b>
Кортаген	50,20 ± 2,762	<b>1,89 ± 0,005773</b>	48,91 ± 2,153	1,61 ± 0,04333
Ливаген	43,29 ± 4,621	<b>1,47 ± 0,04041</b>	54,35 ± 1,325	1,59 ± 0,04041
Простамакс	46,33 ± 1,313	1,91 ± 0,023*	51,51 ± 2,144	1,58 ± 0,08963
Эпиталамин	44,77 ± 0,6512	<b>1,86 ± 0,06028</b>	54,12 ± 1,215	1,61 ± 0,05508
линия НА <sup>+</sup>				
Контроль	82,17 ± 1,641	2,040 ± 0,4025	101,08 ± 4,730	1,307 ± 0,0550
Эпиталон	98,95 ± 5,777	<b>1,019 ± 0,0050</b>	120,79 ± 12,545	1,044 ± 0,0145
Вилон	103,31 ± 6,624*	<b>1,485 ± 0,1020</b>	108,40 ± 0,30	1,193 ± 0,0850
Кортаген	<b>131,95 ± 7,655</b>	<b>1,089 ± 0,0165</b>	101,30 ± 10,661	1,003 ± 0,0195
Ливаген	95,10 ± 3,940	<b>1,182 ± 0,1075</b>	108,31 ± 3,550	1,275 ± 0,1070
Простамакс	95,76 ± 4,503	<b>0,840 ± 0,0315</b>	110,23 ± 6,764	<b>0,720 ± 0,0310</b>
Эпиталамин	93,84 ± 2,265	<b>1,206 ± 0,0385</b>	99,27 ± 2,775	0,969 ± 0,0510

Примечание: жирным шрифтом выделены значения, отличающиеся от контрольного варианта,  $p < 0,01$

Графики средних значений представлены на рисунке 2. Выявлены межполовые различия изучаемого показателя. В линии НА<sup>-</sup> уровень АФК у самцов выше по сравнению с самками на 6 %, а в линии НА<sup>+</sup> — на 13 %. Влияния эпиталона на генерацию АФК не выявлено, однако вилон снижает этот показатель на 6 % по сравнению с контролем. Обнаружено также возрастное увеличение генерации АФК. Генерация АФК в тканях мух обеих линий возрастает с возрастом на 5 % в обеих линиях. Достоверных взаимодействий факторов не выявлено.

Результаты измерения генерации АФК в цитозоле у молодых и зрелых мух линий НА<sup>-</sup> и НА<sup>+</sup> представлены на рисунке 3. Как следует из рисунка, с возрастом уровень АФК в цитозоле возрастает на 27 % в линии НА<sup>-</sup> и на 81 % в линии НА<sup>+</sup>.

Результаты измерения антирадикальной активности цитозоля у молодых и зрелых мух линий НА<sup>-</sup> и НА<sup>+</sup> представлены на рисунке 4. Изучение антирадикальной активности цитозоля выявило достоверное влияние фактора «возраст» в обеих линиях. В линии НА<sup>-</sup> этот показатель снижен у зрелых особей на 13 % по сравне-

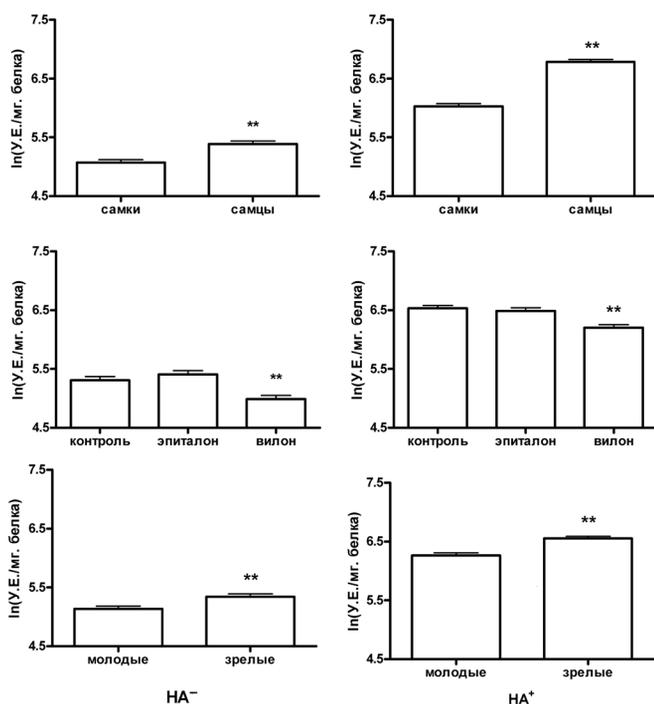


Рис. 2. Графики средних значений генерации АФК в митохондриях, построенные по результатам дисперсионного анализа

нию с молодыми. В линии  $NA^+$  такое снижение достигает 7 %.

В линии  $NA^-$  выявлено достоверное влияние фактора «препарат». Как следует из рисунка 3, применение вилона, но не эпиталона, увеличивает АРАД у мух этой линии.

### ОБСУЖДЕНИЕ

#### Классификация геропротекторов

В таблице 4 изученные препараты распределены в соответствии с классификацией геропротекторов, предложенной Эммануэлем и Обуховой (Emmanuel, Obukhova, 1978). В основу классификации положены изменения вида кривой выживания. Геропротекторы I типа увеличивают МеПЖ, но не изменяют НКВЖ. Геропротекторы II типа увеличивают МеПЖ и уменьшают НКВЖ, геропротекторы III типа увеличивают МеПЖ и НКВЖ. Как следует из таблицы, однозначно определить к какому типу геропротекторов относится препарат затруднительно. Так, например, вилон ведет себя как геропротектор первого типа у самок и самцов линии  $NA^-$  и самок линии  $NA^+$  он не проявляет геропротекторных свойств, а у самцов линии  $NA^+$  он ведет себя как геропротектор II типа. Возможно, геропротекторы следует классифицировать по вероятности и возрасту развития новообразований при их применении

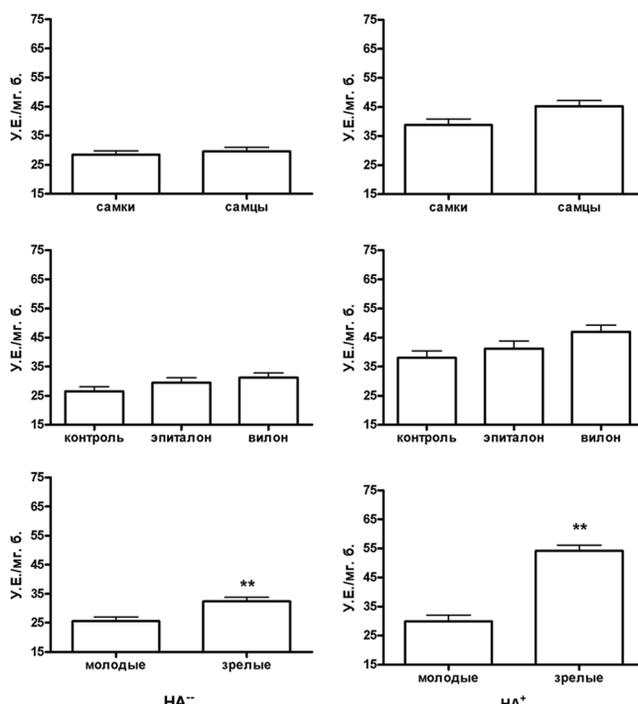


Рис. 3. Графики средних значений генерации АФК в цитозоле, построенные по результатам дисперсионного анализа

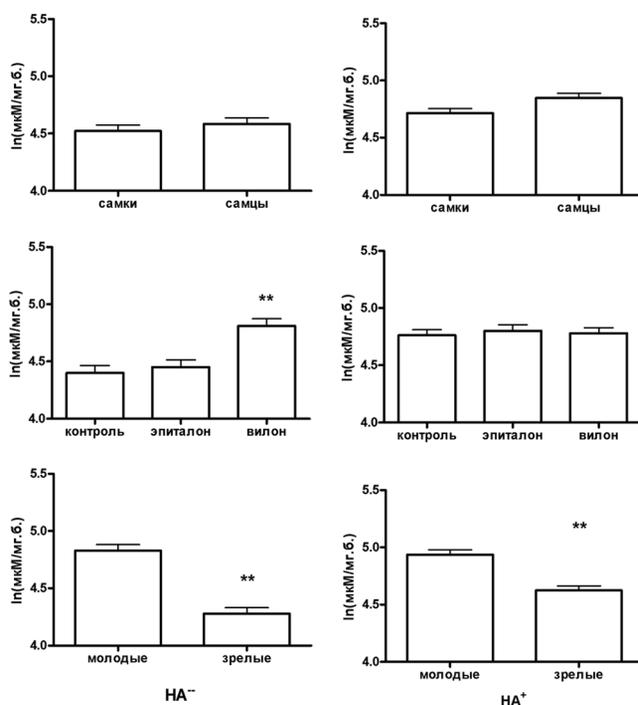


Рис. 4. Графики средних значений антирадикальной активности цитозоля, построенные по результатам дисперсионного анализа

(Анисимов, 2000) или по предлагаемому нами параметру «ожидаемая максимальная продолжительность жизни».

Таблица 4

## Классификация изученных препаратов как геропротекторов

Линия	Ba <sup>-</sup>					
Пол	Самки			Самцы		
Параметр	MeПЖ	HKBJ	Тип	MeПЖ	HKBJ	Тип
Вилон	+	0	I	+	0	I
Кортаген	+	0	I	0	—	IV
Ливаген	+	0	I	+	+	III
Простамакс	+	—	II	+	—	II
Эпиталон	+	0	I	+	0	I
Эпиталамин	+	—	II	0	0	
Линия	HA <sup>-</sup>					
Пол	Самки			Самцы		
Параметр	MeПЖ	HKBJ	Тип	MeПЖ	HKBJ	Тип
Вилон	+	0	I	0	0	
Кортаген	0	+		+	+	III
Ливаген	+	0	I	+	—	II
Простамакс	+	+	III	+	+	III
Эпиталон	+	0	I	0	0	
Эпиталамин	+	+	III	+	+	III
Линия	HA <sup>+</sup>					
Пол	Самки			Самцы		
Параметр	MeПЖ	HKBJ	Тип	MeПЖ	HKBJ	Тип
Вилон	0	0		+	—	II
Кортаген	—	+		+	0	I
Ливаген	—	+		0	0	
Простамакс	—	+		0	0	
Эпиталон	—	0		0	0	
Эпиталамин	—	+		0	0	

Обозначения в таблице:

— — достоверное уменьшение по сравнению с контролем; + — достоверное увеличение по сравнению с контролем; 0 — отсутствие достоверных различий.

### Антиоксидантные свойства пептидов

Сводные результаты дисперсионного анализа изменчивости уровня КГП, активности каталазы, генерации АФК и АРАД при действии пептидов представлены в таблице 5. Анализ показал, что для всех измеренных показателей достоверными являются межлинейные различия. Возраст влияет на три показателя из пяти, а именно на содержание АФК в митохондриях и цитозоле и антирадикальную активность цитозоля. Воздействие препаратами проявляется в изменении генерации АФК в митохондриях, АРАД цитозоля и содержания КГП. Для всех случаев, кроме активности каталазы, выявлено статистически значимое взаимодействие препарат—линия. Это вполне понятно, поскольку влияния изучаемых препаратов на активность каталазы не выявлено.

На рисунке 5 представлены результаты разложения общей изменчивости изученных показателей на компоненты. Анализ показал, что для всех измеренных показателей, кроме АРАД, преобладают межлинейные различия, а для определения АРАД основным фактором является возраст мух. Таким образом, снижение антирадикальной активности цитозоля с возрастом, по-видимому, закономерное явление.

На основании полученных данных можно заключить, что эффективность пептидного препарата, как антиоксиданта, существенно зависит от генотипа линии, в которой он применен, а значит, изученные препараты не являются универсальными и должны применяться исключительно по медицинским показаниям.

Таблица 5

Сводная таблица результатов дисперсионного анализа показателей антиоксидантного статуса тканей разных линий *D. melanogaster*

Фактор	АФК МТ	АФК ЦПЛ	АРАД	КАТ	КГП
Пол	***	***	—	***	***
Препарат	***	—	**	—	***
Возраст	***	***	***	—	—
Линия	***	***	***	***	***
Пол - лин	—	***	—	***	—
Преп - лин	***	**	**	—	***
Возр - лин	***	***	—	—	—

Обозначения в таблице:

\*\* — достоверное влияние фактора:  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$ ;

— — влияния фактора не выявлено.

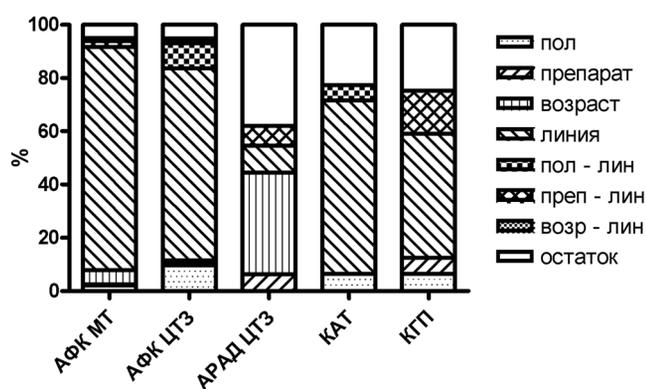


Рис. 5. Компоненты общей изменчивости показателей антиоксидантного статуса: Представлены только факторы, вклад которых статистически значим

### Генерация активных форм кислорода

Следует отметить, что уровень генерации АФК в митохондриях самцов во всех вариантах опытов был в среднем в 2 раза выше по сравнению с самками. Нельзя исключить, что наблюдаемые нами межполовые различия в уровне генерации АФК могут быть обусловлены неодинаковым уровнем активности ферментов электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. В литературе имеются данные о том, что в тканях млекопитающих имеется четко выраженный половой диморфизм в активности цитохром С оксидазы, обусловленный влиянием половых гормонов на экспрессию генов компонентов ЭТЦ (Migdadi et al., 1995a, b). Можно предположить наличие подобного механизма и у *D. melanogaster*.

Анализ влияния двух пептидов на изученные признаки показал, что достоверное снижение генерации АФК в митохондриях достигается только при воздействии вилона, но не эпیتالона. При этом уровень генерации АФК снижается как у молодых, так и у зрелых особей по сравнению с контролем. Соответственно, механизмы

влияния вилона и эпیتالона на антиоксидантный статус тканей принципиально различный. Отсутствие влияния эпیتالона на изучаемые признаки говорит о том, что выявленный нами ранее (Хавинсон, Мыльников, 2000в) геропротекторный эффект этого препарата обусловлен иными, нежели у вилона, механизмами.

При выяснении механизмов действия вилона на митохондрии дрозофил необходимо учитывать следующее. Как известно, причиной генерации АФК в митохондриях являются сбои в работе дыхательной цепи (Кольтовер, 1981). Мы подвергали воздействию препаратами личинок второго возраста. При наступлении стадии куколки личинка проходит метаморфоз, в ходе которого происходит практически полный лизис тканей, а органы имаго формируются из небольших по размеру имагинальных дисков. Изучаемые параметры изменились у взрослых мух, а промежуток между воздействием пептида и временем регистрации изучаемых эффектов составил 15–30 суток.

Более того, нами установлено, что аналогичный эффект (снижение содержания продуктов перекисного окисления липидов) может сохраняться как минимум 45 суток после воздействия пептида (Хавинсон, Мыльников, 2000б). Известно также, что применение веществ геропротекторов у дрозофилы эффективно лишь на стадии личинок, а воздействие на имаго эффекта не дает (Anisimov et al., 1997; Izmaylov, Obukhova, 1996, 1999; Obukhova et al., 1979).

По нашему мнению, такие эффекты можно объяснить только генетическими или эпигенетическими механизмами, которые могут реализоваться на любом уровне регуляции от транскрипционного до посттрансляционного. Происходящее в результате пролонгированное снижение генерации АФК в митохондриях или уровня КГП в тканях может снижать скорость старения.

Поддержано программой «Ведущие научные школы» НШ–197.2008.4.

## Литература

1. Анисимов В. Н., 2000. Средства профилактики преждевременного старения (геропротекторы) // Успехи геронтологии. Вып. 4. С. 55–74.
2. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И. и др., 1991. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Серия: биофизика. Т. 29. 249 с.
3. Иовлева О. В., Мыльников С. В., 2007. Последствия отбора в высокоинбредных линиях дрозофилы // Генетика. Т. 43. № 10. С. 1328–1340.
4. Кайданов Л. З., 1979. Анализ генетических последствий отбора и инбридинга // Журн. общ. биол. Т. 40. С. 834–850.
5. Кольтовер В. К., 1981. Надежность ферментативной защиты клетки от супероксидных радикалов и старение // Докл. АН СССР. Т. 256. № 1. С. 199–202.
6. Мыльников С. В., 1991. Формирование адаптивной генетической системы в инбредной линии *Drosophila melanogaster*, селективируемой на высокую эмбриональную смертность // Цитология и Генетика. Т. 25. № 4. С. 67–72.
7. Мыльников С. В., Кайданов Л. З., Бьемон К., 1989. Генетические последствия отбора в инбредных линиях *Drosophila melanogaster*. I. Формирование системы балансируемых летелей при селекции на различия по адаптивно важным признакам // Вестн. ЛГУ. Вып. 3. № 17. С. 111–117.
8. Мыльников С. В., 1991. Динамика эмбриональной смертности в инбредных линиях дрозофилы // Онтогенез. Т. 22. С. 93–95.
9. Смирнова А. Н., Вершинина Е. А., Мыльников С. В., 2000. Изучение вклада трех больших хромосом дрозофилы в детерминацию динамики смертности и интенсивности перекисного окисления липидов // Успехи геронтологии. Вып. 4. С. 50–54.
10. Стальная И. Д., 1977. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии. М.: Медицина. С. 63–64.
11. Хавинсон В. Х., Мыльников С. В., 2000а. Влияние тетрапептида эпифиза на состояние антиоксидантной защиты у *Drosophila melanogaster*. // Бюлл. эксп. биол. мед. Т. 129. № 4. С. 420–422.
12. Хавинсон В. Х., Мыльников С. В., 2000б. Влияние эпителина на возрастную динамику ПОЛ у *Drosophila melanogaster* // Бюлл. эксп. биол. мед. Т. 130. № 11. С. 585–588.
13. Хавинсон В. Х., Мыльников С. В., 2000в. Увеличение продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* при воздействии пептида эпифиза // Докл. Акад. Наук. Т. 373. № 5. С. 707–709.
14. Anisimov V. N., Mylnikov S. V., Oparina T. I., Khavinson V. K., 1997. Effect of melatonin and pineal peptide preparation epithalamin on life span and free radical oxidation in *Drosophila melanogaster* // Mech. Ageing Dev. Vol. 97. P. 81–91.
15. Anisimov V. N., Mylnikov S. V., Khavinson V. K., 1998. Pineal peptide preparation epithalamin increases the lifespan of fruit flies, mice and rats // Mech. Ageing Dev. Vol. 103. N 2. P. 123–132.
16. Emanuel N. M., Obukhova L. K., 1978. Types of experimental delay in aging patterns // Exper. Gerontology. Vol. 13. P. 25–29.
17. Harman D., 1982. The free-radical theory of ageing // Free radicals in biology. Vol. 5. P. 255–275.
18. Izmaylov D. M., Obukhova L. K., 1999. Geroprotector effectiveness of melatonin: investigation of lifespan of *Drosophila melanogaster* // Mech. Ageing Dev. Vol. 106. P. 233–240.
19. Izmaylov D. M., Obukhova L. K., 1996. Geroprotector efficiency depends on viability of control population: life span investigation in *D. Melanogaster* // Mech. Ageing Dev. Vol. 91. P. 155–164.
20. Leff J. A., Oppegard M. A., Curiel T. J. et al., 1992. Progressive increases in serum catalase activity in advancing human immunodeficiency virus infection // Free. Rad. Biol. Med. Vol. 13. N 2. P. 143–149.
21. Migdadi F., Gallant S., Brownie A. C., 1995a. Sex differences in cytochromes oxidase and P-45011 beta in the rat adrenal cortex // Mol. Cell Endocrinol. Vol. 112 N. 2. P. 185–194.
22. Migdadi F., Gallant S., Brownie A. C., 1995b. Sex differences in the steroidogenic and respiratory electron transport chains in the rat adrenal cortex // Endocr. Res. Vol. 21. N. 1–2. P. 109–114.
23. Mockett R. J., Orr W. C., Rahmandar J. J. et al., 1999. Overexpression of Mn-containing superoxide dismutase in transgenic *Drosophila melanogaster* // Arch. Biochem. Biophys. Vol. 371. N 2. P. 260–269.

**Effects of peptides on antioxidant status and survival curve parameters in inbred pre-selected lines in *Drosophila melanogaster***

S. V. Mylnikov, T. I. Oparina, V. V. Malinin

✿ **SUMMARY:** We performed comparative genetic analysis of a set of synthetic peptides effects on longevity and free-radical oxidation in *Drosophila melanogaster*. Strong genotype and gene-environmental interaction in determining traits value were evaluated. Mechanisms of vilon and epithalon effect on free oxygen species in mitochondria seemed to be different.

✿ **KEY WORDS:** peptides, survival curve, free radicals