УДК 575.224.6 : 57.017.6

ДИЛУДИН И ЦЕРЕБРОКРАСТ КАК БИОПРОТЕКТОРЫ В МОДЕЛЬНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ *IN VIVO*

© Н. В. Савина[1], Н. В. Никитченко[1], О. В. Даливеля[1], Т. Д. Кужир[1], Э. Бисениекс[2], Г. Дубурс[2], Р. И. Гончарова[1]

[1] ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь
[2] Латвийский институт органического синтеза, г. Рига, Латвия

❀ **Изучено влияние двух производных 1,4-дигидропиридина — дилудина и цереброкраста — на развитие дрозофилы и мутабильность половых клеток. Выявлен диапазон доз, в котором препараты проявляют биостимулирующие эффекты, повышая на 50–80 % выживаемость особей, и защитное действие против алкилирующего агента этилметансульфоната, снижая уровень индуцированных мутаций на 30–50 %. Рассматриваются закономерности и возможные механизмы биопротекторного действия этих препаратов.**

❀ **Ключевые слова:** биопротектор; антимутаген; производные 1,4-дигидропиридина; выживаемость; развитие; продолжительность жизни; повреждения хромосом; мутация; дрозофила.

Поступила в редакцию 31.03.2009
Принята к публикации 29.06.2009

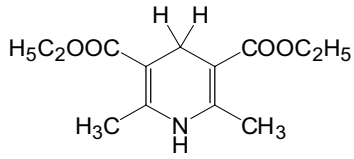
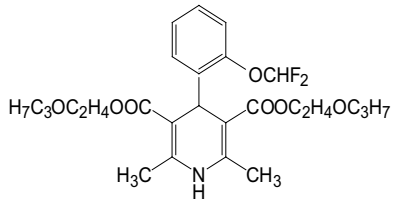
ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение окружающей среды химическими и физическими факторами представляет собой серьезную эколого-генетическую угрозу, так как приводит к усилению мутационного процесса, уменьшению биоразнообразия, неблагоприятным последствиям для здоровья и продолжительности жизни человека. Поэтому по-прежнему актуальна разработка различных направлений генетической безопасности, включая скрининг генотоксикантов и выявление средств, поддерживающих стабильность генома, способствующих его нормальному функционированию и повышению устойчивости к генотоксическому воздействию (Гончарова, 2005). Наиболее перспективными в этом плане являются природные и синтетические антиоксиданты. Так, обнаружение у ряда синтетических производных 1,4-дигидропиридина (1,4-ДГП) антимутагенной, хемо- и радиопротекторной, геропротекторной, иммуно- и нейромодулирующей, противоопухолевой и противовоспалительной активности (Кужир, 1999; Goncharova et al., 2001; Гончарова и др., 2002; Goncharova et al., 2002; Иванов и др., 2004; Ryabokon et al., 2005; Эмануэль и др., 1985; Kluša, 1995; Briede et al., 1999; Вартанян и др., 2004; Klegeris et al., 2002) позволяет рассматривать эту группу соединений в качестве эффективных биопротекторов (Duburs et al., 2008). Однако многолетний опыт собственных исследований в области антимутагенеза и многочисленные данные литературы указывают на зависимость характера и эффективности действия антимутагенов/антиоксидантов от условий их применения, в том числе от природы и свойств генотоксиканта, используемой тест-системы, стадии клеточного цикла или гаметогенеза (Waters et al., 1996; Кужир, 1999). Наиболее интригующие изменения, вплоть до полной инверсии положительных эффектов, наблюдаются при варьировании концентраций антиоксидантов. Эта проблема детально изучалась Е. Б. Бурлаковой, в результате чего сформулирована гипотеза о полимодальной зависимости биологических эффектов антиоксидантов от дозы в связи со сменой механизмов действия при переходе от одного диапазона концентраций к другому (Бурлакова, 1998). Известно, что при высоких концентрациях или в присутствии катионов металлов антиоксиданты, в том числе производные 1,4-ДГП, способствуют продукции активных форм кислорода **(АФК)** (Тирзит и др., 1992). Список таких работ пополняется с каждым годом (Sakihama et al., 2002; Beltz et al., 2006; Simić et al., 2007). Изучение антиоксидантов в широком диапазоне доз, как правило, демонстрирует прооксидантный потенциал при более высоких и антиоксидантную активность при низких концентрациях.

АФК, образующиеся в процессе жизнедеятельности, участвуют в регуляции физиологических функций организма в норме, но при повышенных концентрациях, вызывающих окислительный стресс, обуславливают старение и развитие различных патологических процессов (неопластическую трансформацию, нейродегенерацию, атеросклероз, и др.). Окислительно-восстановительный потенциал клетки контролируется генной сетью редокс-регуляции, которая

Таблица 1

Структура и некоторые свойства изученных производных 1,4-ДГП

Название	Формула	М. м.	Растворимость	АО (АР) активность	Токсичность	
					in vivo LD_{50}, мг/кг	*in vitro* IC_{50}, мкМ
Дилудин*, Диэтон** CAS: 1149-23-1		253.3	Плохо растворим в воде, растворим в этиловом спирте, твине-80	$V_0/V = 2,9$ $E_п$, В = 0,93; $E_{1/2}$, В = 0,90	р. о. 32000	45,32 ± 2,27
Цереброкраст CAS: 108863-62-3		511,56	Плохо растворим в воде, растворим в этиловом спирте, твине-80	Предотвращает образование свободных радикалов	i. p. 450 р. о. 730	40,32 ± 3,26

АО — антиоксидантная, АР — антирадикальная активность; АО активность определяли по уменьшению скорости потребления кислорода эмульсией линетола (V_0/V); электронодонорную активность определяли по потенциалам электроокисления ($E_п$, В; $E_{1/2}$, В) при вольтамперометрии на платиновом электроде в растворе ацетонитрила; i. p. — внутрибрюшинное введение; р. о. — введение per os. АО активность цереброкраста не изучалась, однако по данным Климавичуса с соавторами (Klimaviciusa et al., 2007), этот препарат предотвращает образование АФК в первичной культуре гранулированных клеток мозжечка. LD_{50} — полулетальная доза; IC_{50} — доза, ингибирующая рост клеток на 50 %.
* — препарат для сельского хозяйства; ** — медицинский препарат.

обеспечивает гомеостаз, поддерживая баланс между образованием АФК, внутриклеточных оксидантов и антиоксидантов (Степаненко, 2004). Известно о способности экзогенных антиоксидантов в физиологическом диапазоне концентраций влиять на экспрессию генов антиоксидантной защиты, детоксикации ксенобиотиков, а также на сигнальные молекулы, запускающие клеточный ответ на повреждения ДНК (Misiewicz et al., 2004; Bertram, 2003). Можно предполагать, что при определенных условиях, в том числе при низких концентрациях, антиоксиданты могут служить сигналом (либо генерировать такой сигнал) для инициации защитных реакций. Это предположение требует уточнения механизмов действия антиоксидантов, особенно в области низких доз. Уже продемонстрированы новые пути передачи генопротекторного сигнала, формируемого экзогенными антиоксидантами в пикомолярных концентрациях (10^{-9}–10^{-11}М). Показано, что генопротекторный эффект 2-хлораденозина реализуется через активацию рецепторов аденозина (Wu et al., 2004), тогда как действие изопентенил дифосфата зависит от метаболизма мевалоната, необходимого для синтеза изопреноидов (Ling et al., 2004). Кроме выяснения фундаментальных аспектов, изучение проблемы низких и сверхнизких доз биологически активных веществ открывает новые возможности использования этих соединений на практике (Гуревич, 2001; Бурлакова и др., 2003).

Одной из важнейших функций антиоксидантов является защита генома и стимуляция процессов, повышающих жизнеспособность клеток и организма, что может оказать влияние на продолжительность и качество жизни. В данной работе исследовано влияние производных 1,4-ДГП дилудина и цереброкраста в широком диапазоне доз на онтогенез дрозофилы и индукцию мутационных событий в половых клетках модельным мутагеном — монофункциональным алкилирующим агентом этилметансульфонатом **(ЭМС)**.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические соединения. В качестве модификаторов исследованы два соединения дигидропиридинового ряда, синтезированные в лаборатории мембраноактивных соединений и β-дикетонов Латвийского института органического синтеза, — дилудин и цереброкраст. Химическая структура и некоторые свойства изучаемых соединений представлены в таблице 1.

Дилудин (диэтон) — 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-1,4-дигидропиридин — обладает высокой антиоксидантной активностью и низкой токсичностью *in vivo* (Duburs et al., 2008); под названием «дилудин» применялся в качестве стимулятора роста и стабилизатора кормов (Вальдман и др., 1977), а под названием «диэтон» входит в состав мази для местной защиты кожи при радиотерапии рака (Ivanov et al., 1990) и крема против ультрафиолетового поражения кожи. Цереброкраст (пропоксиэтиловый эфир 4-(2-дифторметоксифенил)-2,6-диметил-3,5-

дикарбоновой кислоты) относится к производным 1,4-ДГП нового поколения. Благодаря наличию в структуре «крипто» аминокислотных компонентов (β-аланина, NMDA), а также аналога дигидроникотинамида, формирующего дигидропиридиновый остов, это соединение рассматривается как пептидомиметик. Цереброкраст не является антагонистом кальция в нервной ткани (Kluša, 1995; Duburs et al., 2008), тем не менее, по данным Бриеде с соавторами, при низкой концентрации (10^{-6} М) он снижает внутриклеточное содержание Ca^{2+} в тромбоцитах на 9 %, а после их стимуляции тромбином — на 55 %; кроме того, он уменьшает гиперкальциемию на фоне диабета, вызванного стрептозотоцином у крыс (Briede et al., 2002; Briede et al., 2007). Оба соединения (цереброкраст и диэтон) по их сродству к рецепторам глюкокортикоидных гормонов отнесены к одной и той же группе производных 1,4-ДГП, проявляющих умеренный антагонизм по отношению к ионам кальция, при этом IC_{50} составляет $40{,}7 \pm 3{,}26$ и $45{,}32 \pm 2{,}27$ мкМ соответственно, на порядок превышая этот показатель у типичных ингибиторов кальциевых каналов нифедипина и форидона (Vaitkuvienė et al., 2006).

Для индукции мутационных событий применяли алкилирующий агент ЭМС (CAS № 62-50-0). Молекулярная доза мутагена, определяемая как количество этилирований на сперматозоид или нуклеотид (Aaron, Lee, 1978), обусловлена концентрацией мутагена и длительностью обработки. Для кормления взрослых самцов согласно рекомендациям Левиса и Бейкера (Lewis, Bacher, 1968) использованы концентрации 25 мМ и 12,5 мМ, не токсичные для половых клеток.

Линии дрозофилы. В большинстве экспериментов использована линия *Drosophila melanogaster* дикого типа, *Berlin wild*, а при исследовании влияния изучаемых соединений на частоту ЭМС-индуцированных точковых мутаций — линия *Basc*, содержащая инверсии в Х-хромосоме, запирающие кроссинговер.

Способы обработки дрозофилы модификаторами. Для выявления более полного спектра биологической активности модификаторов изучен широкий диапазон доз: от 0,001 до 30 мМ для дилудина и от 0,1 до 30 мМ для цереброкраста. Действие каждой концентрации проверялось в 2–3 экспериментах. Поскольку оба соединения не растворимы в воде, необходимую для создания нужной концентрации навеску препаратов растворяли в нескольких каплях твина-80 или этилового спирта. Влияние препаратов на выживаемость дрозофилы и мутабильность половых клеток сравнивали с действием растворителя, используя в качестве контроля питательную среду с тем же количеством твина (К-твин) или спирта (К-спирт). Кроме того, использовали «чистый» контроль, т. е. питательную среду без добавления каких-либо химических веществ. При кратковременной обработке отмытых личинок препараты, растворенные в твине, добавляли в физиологический раствор или 1 %-ный раствор сахарозы. Для установления статистически значимых различий эффекты модификаторов сравнивали с действием твина, добавленного к физиологическому раствору или 1 %-ному раствору сахарозы.

Учет выживаемости дрозофилы при разных сроках воздействия препаратами. В ряде экспериментов необработанные самки линии *Berlin wild* откладывали яйца на питательную среду с препаратами, на которой в течение 9–10 дней происходило дальнейшее развитие мух от яйца до имаго. В ходе такой *длительной обработки* подсчитывали число отложенных и неразвившихся яиц, а также число вылупившихся потомков. Действие дилудина проверяли также *при кратковременной обработке* отмытых личинок. В этом случае мух выращивали на обычной питательной среде. По достижении личинками 2-суточного возраста их отмывали от питательной среды физиологическим раствором (0,7 % раствор NaCl), а затем переносили на чашки Петри с раствором дилудина в твине или спирте, разбавленном 1 %-м раствором сахарозы или физраствором до нужной концентрации. Личинок обрабатывали в течение 1 ч, затем их вторично отмывали и переносили во флаконы с обычной питательной средой (не более 10 личинок/флакон), позднее подсчитывали количество окуклившихся личинок, мертвых куколок и вылетевших имаго.

Токсичность препаратов оценивали по эмбриональной летальности (**ЭЛ** — процентное отношение неразвившихся за 48 ч яиц к отложенным); постэмбриональной летальности (**ПЭЛ** — процентное отношение разности между количеством живых личинок и имаго к числу живых личинок). Куколочную гибель определяли, подсчитывая количество окуклившихся личинок и мертвых куколок. Суммарную летальность **(СЛ)** потомков оценивали по процентному отношению погибших особей, а выживаемость — по отношению количества вылетевших имаго к числу отложенных яиц.

При изучении *влияния производных 1,4-ДГП на ЭМС-индуцированный мутагенез и кластогенез* самцов *Berlin wild*, обработанных препаратами на личиночной стадии развития, отбирали сразу после вылупления и в 1–2-суточном возрасте подвергали кормлению ЭМС. Затем их спаривали с виргинными самками той же линии или *Basc* (в соотношении 1:5) в индивидуальных культурах. В F_1 учитывали эмбриональную гибель, в том числе на поздних стадиях эмбриогенеза по частоте темных яиц (так называемые «поздние» летали, ПЛ), постэмбриональную и суммарную летальность потомков. Принцип расчета описан выше. Разница между экспериментами по изучению токсичности и генетической активности производных 1,4-ДГП заключалась в том, что в первой серии опытов учитывали смертность на разных стадиях развития обработанных антиоксидантами особей, тогда как во второй — обработке и антиоксидантами, и мутагеном подвергались родители, потомство которых развивалось на обычной питательной среде. При кормлении взрослых самцов ЭМС воздействовал на весь пул половых клеток, но мутационные события учитывали в сперматозоидах, для чего использовали первую односуточную посадку обработанных самцов с виргинными самками. В некоторых экспериментах потомство, полученное от скрещивания обработанных сам-

Таблица 2

Влияние дилудина (Д) на эмбриональную и постэмбриональную смертность дрозофилы при воздействии на полный цикл развития

№ опыта	Доза препарата	Количество яиц		Количество потомков	Летальность, %		
		отложенных	погибших		ЭЛ	ПЭЛ	СЛ
1	$К_{спонтанный}$	1709	47	1256	2,75	24,43	26,51
	Д 10 мМ	4135	68	598	1,64	85,30*	85,54*
	Д 5 мМ	2116	59	291	2,79	85,85*	86,25*
	Д 2,5 мМ	1996	67	565	3,36	70,71*	71,69*
	Д 1 мМ	3168	75	1914	2,37	38,12*	39,58*
2	$К_{спонтанный}$	948	58	763	6,12	14,27	19,51
	К-спирт	791	44	623	5,56	16,60	21,24
	Д 1 мМ	495	24	234	4,85	50,32*	52,73*
3	$К_{спонтанный}$	1325	—	1122	—	—	15,32
	К-твин	1323	—	1116	—	—	15,65
	Д 0,5 мМ	638	—	568	—	—	10,91*
	Д 0,1 мМ	736	—	637	—	—	13,45
4	$К_{спонтанный}$	1993	48	1718	2,41	11,63	13,71
	К-твин	2537	89	1849	3,51	24,47	27,12
	Д 0,5 мМ	917	44	769	4,80	11,91*	16,14*
	Д 0,1 мМ	1436	54	1077	3,76	22,07	25,00
	Д 0,01 мМ	1434	44	1242	3,07	10,65*	13,39*
Кохран-тест (z) для доз:			1 мМ		0,99	14,16**	12,25**
			0,5 мМ				7,10**
			0,1 мМ				1,93

* — достоверные различия по критерию $\chi 2$ между контролем (в эксперименте 2 — К-спирт; в экспериментах 3, 4 — К-твин) и вариантами обработки дилудином, растворенным либо в спирте, либо в твине ($P<0.01$); ** — достоверные различия по тесту Кохрана при $P < 0,01$.

цов дикого типа с самками *Basc*, использовано для отбора гетерозиготных самок и получения F_2. По отсутствию в культурах F_2 самцов дикого типа судили о возникновении рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций **(РСПЛМ)**, которые для подтверждения обязательно проверяли в F_3.

Использованные методы в деталях описаны ранее (Muñoz., Barnett, 1978; Wurgler et al., 1984; Savina et al., 2003; Савина, Кужир, 2003). Процент индуцированных мутаций или поправку Аббота, позволяющую оценить вклад мутагена независимо от спонтанного уровня мутаций, вычисляли согласно общепринятому методу (Muñoz, Barnett, 1978). Эффективность антимутагенного (антикластогенного) действия определяли по редукционному фактору **(РФ)**, показывающему, какая доля (%) мутационных событий редуцирована под влиянием модификатора (Кужир, 1999). Теоретически ожидаемые частоты точковых мутаций с учетом их возможной элиминации в результате гибели потомства F_1 рассчитывали по формуле $РЛ_{теоретическая} = (РЛ_{эмпирическая} /100 - СЛ) \times 100\ \%$, где РЛ — частота рецессивных летальных мутаций, а СЛ — суммарная летальность потомков F_1 (Савина, Кужир, 2003).

Статистический анализ проводили, пользуясь программным обеспечением Microsoft office (Excel 2000) и пакетом прикладных программ, разработанных специально для анализа подобных экспериментов ведущим научным сотрудником Института генетики и цитологии НАН Беларуси Б. Ю. Аношенко. Достоверность различий между частотами летальных событий определяли по критерию χ^2 и тесту Кохрана (при сравнении сопряженных выборок). Для построения кривых, отражающих дозовые зависимости, использованы средние величины из вариационного ряда средних значений, полученных в отдельных экспериментах, которые сравнивались между собой по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние дилудина на выживаемость дрозофилы. Изучено действие препарата в диапазоне концентраций от 0,001 до 10 мМ. Результаты исследования дилудина при его внесении в питательную среду представлены в таблице 2. Показано, что добавление не-

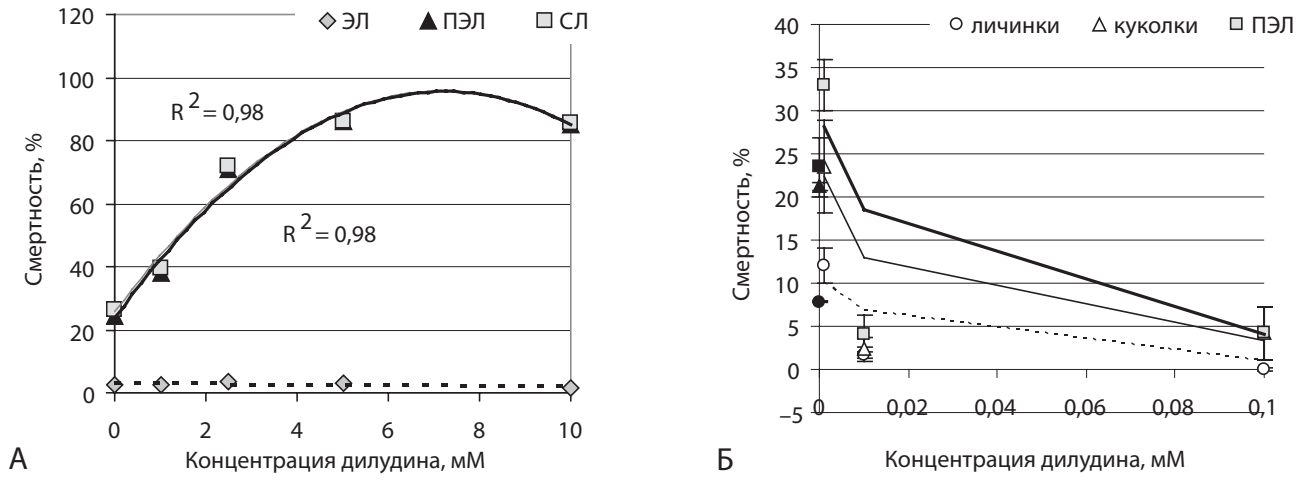


Рис. 1. Влияние дилудина на летальность особей в онтогенезе при внесении препарата в питательную среду (А) и кратковременной обработке отмытых личинок (Б)

растворенного препарата в концентрациях 1–10 мМ в питательную среду не оказывает влияния на развитие яиц (ЭЛ), но в полтора-три раза снижает выживаемость особей за счет токсического действия на постэмбриональные стадии развития (ПЭЛ). Подтвержден токсический эффект 1 мМ растворенного дилудина на личинок и куколок, тогда как при концентрации 0,5 мМ наблюдалось падение уровня гибели особей на 30–40 % по сравнению с действием твина.

Поскольку в этих экспериментах показано, что токсическое действие дилудина приурочено к постэмбриональным стадиям развития дрозофилы, провели серию экспериментов по изучению кратковременного действия дилудина на личинок (табл. 3). При этом способе обработки препарат исследован в диапазоне концентраций от 0,001 до 1 мМ. Характерно, что гибель личинок во время обработки не происходила. Тем не менее обнаружена токсичность дозы 1 мМ, при которой более чем в 3 раза снижалась выживаемость личинок в течение суток после обработки по сравнению с действием твина. Отметим, что повышенная гибель особей наблюдалась не только на стадии личинок, но и куколок, что свидетельствует о задержанном эффекте препарата. Показатели смертности личинок и куколок тесно коррелировали между собой ($r = 0,88$). При снижении концентрации дилудин не проявлял токсичность; более того, дозы 0,1 и 0,01 мМ повышали выживаемость особей на постэмбриональных стадиях развития. При обработке личинок препаратом в дозе 0,1 мМ гибель куколок по сравнению с контролем уменьшалась не менее чем на 50 %; при концентрации 0,01 мМ – почти в 3 раза или падала до 0.

Анализ зависимости эффекта дилудина от дозы показал следующее. При внесении в питательную среду препарат при всех исследованных концентрациях не влиял на развитие яиц. Токсический эффект зарегистрирован по отношению к постэмбриональным стадиям развития: в диапазоне доз от 1 до 10 мМ зависимость эффекта от дозы хорошо аппроксимируется полиномиальным уравнением (рис. 1 А); но в диапазоне концентраций от 1 до 5 мМ она близка линейной. При кратковременном воздействии на отмытых личинок дрозофилы дилудин в малых дозах снижал гибель особей (рис. 1 Б). Эти данные свидетельствуют о большей эффективности обработки отмытых личинок по сравнению с добавлением препарата в питательную среду и смещении позитивных эффектов в сторону низких доз (0,01–0,1 мМ).

Таким образом, дилудин в дозах свыше 1 мМ снижал выживаемость особей на постэмбриональных стадиях как при воздействии на весь цикл развития, так и при кратковременной обработке личинок. При меньших концентрациях дилудина в среде зарегистрирован стимулирующий эффект дозы 0,5 мМ и тенденция к повышению выживаемости особей при концентрации 0,1 мМ. В диапазоне малых доз, использованных для кратковременной обработки личинок растворами препарата, наиболее эффективными оказались дозы 0,01–0,1 мМ. Анализ всех имеющихся данных по выживаемости особей под влиянием дилудина в диапазоне концентраций от 0 до 1 мМ (рис. 2) указывает на полиномиальную зависимость эффекта от дозы, которая отражает профиль активности дилудина от повышения выживаемости в области концентраций 0,01–0,5 мМ до подавления развития дрозофилы при достижении концентрации 1 мМ.

Влияние дилудина на кластогенность ЭМС. В этих экспериментах модификатор воздействовал на личинок, а мутаген — на взрослых самцов. Учитывали частоту доминантных леталей в F_1, как описано в разделе Материа-

Таблица 3

Влияние дилудина (Д) на выживаемость особей при кратковременной обработке личинок

№ опыта	Доза препарата	Количество обработанных личинок	Гибель личинок, %	Гибель куколок, %	Выживаемость особей, %
5	1 % сахароза	48	8,33	9,09	83,33
	1 % сахароза + твин	52	7,69	20,83	73,08
	Д 1 мМ	49	20,41**	71,79**	22,44**
	Д 0,1 мМ	48	2,08	8,51**	89,58*
	Д 0,001 мМ	50	14,0	18,16	70,0
6	физраствор + твин	50	8,00	21,74	80,00
	Д 1 мМ	50	16,00	28,57*	24,00**
	Д 0,1 мМ	48	0**	4,17**	95,83**
	Д 0,01 мМ	50	0**	0**	100**
	Д 0,001 мМ	50	10,00	28,89*	64,00
7	1 % сахароза + твин	380	1,58	6,15	92,37
	Д 1 мМ	417	4,32**	17,04**	79,38**
	Д 0,01 мМ	411	1,70	2,48**	95,86*
Кохран-тест (z) для доз:		1 мМ	4,39**	3,67**	6,92**
		0,1 мМ	1,85	3,27**	3,71**
		0,01 мМ	0,60	3,69**	3,58**
		0,001 мМ	0,99	0,40	1,68

Выживаемость особей рассчитывали по процентному отношению количества вылетевших имаго к числу обработанных личинок. * — Достоверные различия между вариантами обработки дилудином и действием растворителя при P<0.05; ** — при P < 0,01.

Таблица 4

Влияние дилудина на частоту доминантных леталей, индуцированных ЭМС в сперматозоидах дрозофилы

Вариант обработки личинок	Количество отложенных яиц	Частота доминантных леталей, %			
		ЭЛ	ПЛ	ПЭЛ	СЛ
Кормление взрослых самцов 1%-м раствором сахарозы (контроль)					
К-твин	2363	4,70	1,02	8,71	13,00
Кормление взрослых самцов ЭМС (25мМ, 12ч)					
Твин	2289	**7,03**	**1,18**	**20,49**	**26,08**
Д 1мМ	2633	6,00	2,24	17,66*	22,60**
Д 0,5мМ	2723	4,96**	1,21	19,94	23,91
Д 0,1мМ	1890	4,60**	1,06	15,59**	19,49**
Кормление взрослых самцов ЭМС (12,5мМ, 24ч)					
Твин	2200	**18,01**	**8,14**	**18,51**	**33,77**
Д 0,01мМ	2237	20,74	7,69	15,17**	32,77

Твин — обработка личинок растворителем, разведенным в 1%-ом растворе сахарозы; Д — кратковременная обработка личинок раствором дилудина в твине. Достоверные отличия от действия ЭМС (выделено жирным шрифтом) по критерию $\chi 2$ при * — P < 0,05; ** — P < 0,01.

лы и методы. Из таблицы 4 видно, что препарат обладал антикластогенным действием, которое проявлялось по частоте эмбриональных (концентрации 0,5 и 0,1 мМ) и постэмбриональных леталей (концентрации 1, 0,1 и 0,01 мМ); последние более адекватно отражают генетическую компоненту этого теста за счет вклада разрывов и перестроек хромосом (Muňoz, Barnett, 1978). Анализ влияния дилудина на кластогенность ЭМС в диапазоне

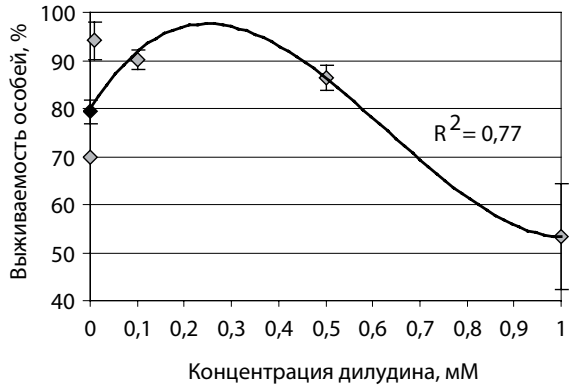


Рис. 2. Влияние дилудина на выживаемость особей в зависимости от дозы. Черный маркер соответствует контрольному значению

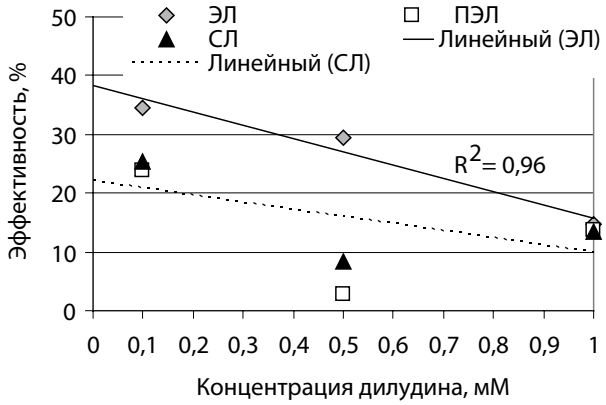


Рис. 3. Эффективность защитного действия дилудина в диапазоне доз от 0,1 до 1 мМ против кластогенности ЭМС

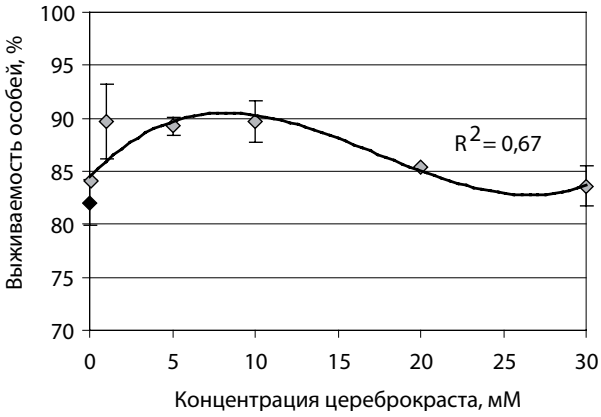


Рис. 4. Влияние цереброкраста на выживаемость особей в онтогенезе в зависимости от дозы. Черный маркер соответствует контрольному значению

доз 0,1–1мМ демонстрирует возрастание эффективности **(РФ)** при убывании дозы (рис. 3). Наиболее эффективной оказалась доза 0,1 мМ, которая снижала ЭЛ на 34,6 %, ПЭЛ на 23,9 % и СЛ на 25,3 %. Следовательно, дилудин при воздействии на личинок подавлял действие ЭМС, индуцирующего разрывы хромосом в половых клетках взрослых самцов. Антикластогенное действие дилудина стабильно проявлялось при дозе 0,1 мМ, эта же доза была эффективной при оценке влияния препарата на выживаемость и развитие дрозофилы.

Влияние цереброкраста на выживаемость дрозофилы. Изучено действие препарата в широком диапазоне концентраций. Результаты исследования при внесении цереброкраста **(ЦК)** в питательную среду представлены в таблице 5. Не обнаружено какого-либо влияния ЦК на эмбриональную стадию развития дрозофилы. Анализ данных по СЛ по тесту Кохрана свидетельствует, что цереброкраст либо нейтрален, либо снижает гибель особей по сравнению с контролем (твин). Положительный эффект формируется в основном за счет влияния на постэмбриональные стадии развития, при этом максимальное снижение смертности достигает 50 %.

Дальнейшее изучение влияния ЦК на выживаемость дрозофилы при концентрациях 20, 30 мМ и в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мМ (данные не показаны) подтвердило нейтральность высоких доз. Выявлено статистически значимое снижение летальности при меньших концентрациях препарата (χ^2 = 6,05*, 17,08**, 30,02**, 52,28** соответственно 0,1, 1, 5 и 10 мМ; *P < 0,05; **P < 0,01;). РФ, отражающий снижение СЛ по сравнению с действием твина, для вышеуказанных концентраций ЦК составлял 18,7, 29,4, 43,6 и 50,4 %. Следует отметить, что в этой серии экспериментов (см. также табл. 5) гибель особей под влиянием перечисленных доз модификатора падала до и ниже спонтанного уровня. Анализ влияния цереброкраста в диапазоне концентраций от 0,1 до 30 мМ на выживаемость дрозофилы (рис. 4) демонстрирует полиномиальную зависимость эффекта цереброкраста от дозы. Несмотря на некоторую вариабельность эффектов, цереброкраст в изученном диапазоне доз не оказывал токсического действия на эмбриональную и постэмбриональные стадии развития дрозофилы, а при концентрациях 1–10 мМ повышал выживаемость особей на 30–50 %.

Влияние цереброкраста на кластогенность и мутагенность ЭМС изучено при условиях, аналогичных исследованию дилудина. Проведена серия экспериментов по оценке эффекта цереброкраста на уровень доминантных леталей, индуцированных ЭМС в сперматозоидах самцов. Анализ результатов выявил неоднозначные эффекты доз 1, 5 и 10 мМ, однако доза 30 мМ оказывала стабильное защитное действие против ЭМС по всем показателям. Достоверность различий подтверждена по тесту Кохрана со следующими значениями: z = 3,50**, 2,40*, 7,75**, 3,88** (*P < 0,05; **P < 0,001) для ЭЛ, ПЛ, ПЭЛ и СЛ соответственно при максимальном РФ = 31 %.

Наиболее информативны эксперименты, позволившие в потомстве одних и тех же самцов определить мутационную

Таблица 5

Влияние цереброкраста (ЦК) на смертность дрозофилы при воздействии на полный цикл развития

№ опыта	Доза препарата	Количество яиц		Количество потомков	Летальность, %		
		отложенных	погибших		ЭЛ	ПЭЛ	СЛ
1	$К_{спонтанный}$	793	—	723	—	—	8,83
	К-твин	1317	—	1137	—	—	13,67
	1,0 мМ	1473	—	1373	—	—	6,79*
	5,0 мМ	1297	—	1179	—	—	9,10*
	10,0 мМ	1500	—	1391	—	—	7,27*
2	$К_{спонтанный}$	646	46	394	7,12	34,33	39,01
	К-твин	978	59	537	6,03	41,57	45,09
	1,0 мМ	870	56	664	6,44	18,43*	23,68*
	5,0 мМ	1296	64	672	4,94	45,45	48,15
	10,0 мМ	863	83	486	9,62	37,69	43,68
	30,0 мМ	555	36	343	6,49	33,91*	38,20*
3	$К_{спонтанный}$	891	53	776	5,95	7,40	12,91
	30,0 мМ	593	37	507	6,24	8,81	14,50
Кохран-тест (z) для доз:				1 мМ			11,31*
				5 мМ			0,90
				10 мМ			3,85*
				30 мМ			1,65
Достоверность различий между вариантами обработки цереброкрастом и соответствующим контролем (в частности, действием растворителя в экспериментах 1 и 2) подтверждена по критериям $\chi 2$ либо z при $P < 0,01$.							

нагрузку на первое и второе поколение. Для этого в F_1 учитывали доминантные летали, а в F_2 — рецессивные летальные мутации **(РСПЛМ)**. Данные таблицы 6 свидетельствуют в пользу антикластогенного эффекта всех изученных доз цереброкраста, что также подтверждено при анализе различий между процентом индуцированных мутаций во всех вариантах. «Чистый», не зависимый от вклада эндогенных повреждений эффект мутагена существенно снижался под влиянием препарата, причем наиболее эффективной оказалась доза 0,1 мМ, действие которой достоверно отличалось от действия остальных изученных доз.

Анализ частот РСПЛМ показывает, что профиль генетической активности цереброкраста в диапазоне исследованных доз изменяется от антимутагенной до комутагенной. Особый интерес представляют дозы 0,1 и 1 мМ, оказавшие генопротекторный эффект. Следует обратить внимание на достаточно высокий уровень гибели потомков F_1, что могло бы отразиться на результатах этого анализа за счет элиминации особей, половые клетки которых нагружены мутациями. Однако расчет теоретически ожидаемых частот мутаций, учитывающий возможный вклад этого процесса, подтвердил и даже расширил (до 5 мМ) диапазон концентраций, обладающих антимутагенным потенциалом (рис. 5 А). Характерна обратная зависимость эффекта от дозы в области от 0,1 до 10 мМ с одинаковыми коэффициентами корреляции $r = 0,97$ для эмпирических и теоретических частот РСПЛМ при максимальной эффективности защиты 36 и 52 % соответственно (рис. 5 Б).

Таким образом, действие цереброкраста на ЭМС-индуцированные доминантные летали и РСПЛМ неодинаково: антикластогенное действие характерно для всего диапазона изученных доз, тогда как антимутагенная активность проявляется при низких концентрациях с постепенным переходом к комутагенной (или потенцирующей) при высоких концентрациях. Тем не менее в обеих тест-системах наибольшая эффективность защиты половых клеток от ЭМС достигается при наименьших дозах цереброкраста.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установлена биологическая активность дилудина и цереброкраста по их влиянию на выживаемость особей на разных стадиях онтогенеза и чувствительность половых клеток дрозофилы к мутагенному воздействию. Выделены диапазоны доз, проявляющих биопротекторный эффект. Сравнение всей совокупности данных (табл. 7) показывает, что оба соединения не влияли на эмбриональную стадию развития насекомых, не выявлена также токсичность цереброкраста по отношению к развитию личинок и куколок, тогда как дилудин при концентрациях 1 мМ и выше существенно снижал их выживаемость.

Дилудин в дозах 0,001–0,1 мМ и цереброкраст в дозах 1–10 мМ эффективно повышали выживаемость особей на постэмбриональных стадиях развития. Эти результаты имеют практическое значение и могут быть использованы в дальнейшем при разработке способов повышения жизнеспособ-

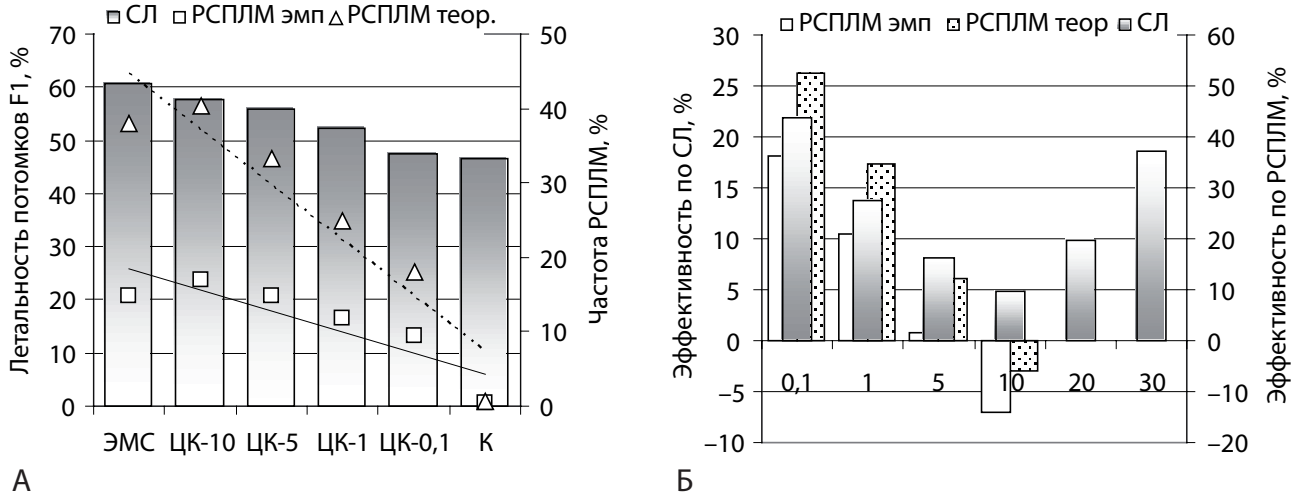


Рис. 5. Антикластогенный (по СЛ) и антимутагенный (по РСПЛМ) эффект цереброкраста (А) и эффективность его действия в зависимости от дозы (Б). Контурные квадратики соответствуют эмпирической частоте РСПЛМ; контурные треугольники — теоретически ожидаемой частоте РСПЛМ. По оси абсцисс — миллимолярная концентрация цереброкраста **(ЦК)**; ЭМС — уровень ЭМС-индуцированных мутационных событий, К — контроль

Таблица 6

Влияние цереброкраста (ЦК) на частоту ЭМС-индуцированных доминантных леталей и РСПЛМ в половых клетках дрозофилы

Вариант обработки личинок	Количество		СЛ, %	Индуцированные мутации, %	Проанализировано		Частота РСПЛМ, %
	яиц	потомков			самцов	хромосом	
Кормление взрослых самцов 1%-м раствором сахарозы (контроль)							
Твин	1969	1054	46,5		151	2749	0,40
Выращивание мух на среде с препаратом, растворенным в твине; кормление взрослых самцов ЭМС (12,5 мМ, 24 ч)							
Твин	1667	654	**60,8**	**26,71**	136	1414	**14,91**
ЦК-0,1 мМ	1248	656	47,4*	1,81*	74	1075	9,49*
ЦК-1 мМ	1017	484	52,4*	11,1*#	75	1206	11,77*
ЦК-5 мМ	2134	942	55,9*	17,54*#	145	1984	14,67
ЦК-10 мМ	2465	1040	57,8	21,18*#	131	2068	17,02
ЦК-20 мМ	1115	504	54,8*	15,56*#	75	931	22,99*
ЦК-30 мМ	1019	515	49,5*	5,59*#	74	891	27,83*

Процент индуцированных мутаций (или поправка Аббота) вычислялась по известной формуле: $[(M-K)/100-K]\times 100$, где M — частота мутаций в варианте с мутагеном; K — частота мутаций в контрольном варианте. * — Достоверные отличия от действия ЭМС (выделено жирным шрифтом) по критерию $\chi 2$ ($P<0,01$). # — Достоверные различия между эффектами дозы 0,1 мМ и остальных доз цереброкраста ($P<0,01$).

ности и устойчивости к неблагоприятным факторам среды полезных насекомых (например, в пчеловодстве и шелководстве). Они хорошо согласуются с низкой цитотоксичностью обоих препаратов *in vitro* (Vaitkuviene et al., 2006).

Необходимо отметить ранее установленное стимулирующее действие дилудина на рост и продуктивность многих сельскохозяйственных животных (Вальдман и др., 1977). Эти данные подтверждены в исследованиях, проводимых в Китае (Wu Xian-Jun et al., 2000; Zou Xiao-Ting et al., 2003; Yu Zu-Gong et al., 2005), где дилудин разрешен для применения и внедрен в производство. Показано, что дилудин предотвращает отрицательные последствия повышенного радиационного фона, вызванного аварией на Чернобыльской АЭС, для прудового карпа (Goncharova et al, 2002; Гончарова и др., 2008). Широкий спектр биопротекторной активности дилудина выявлен при использовании препарата в качестве кормовой добавки при выращивании прудового карпа в относительно чистых и загрязненных радионуклидами прудах. Дилудин улучшал репродуктивные показатели производителей, снижал уровень цитогенетических и морфологических нарушений у их потомков, повышал устойчивость молоди к некоторым заболеваниям, увеличивал выживаемость сеголеток и их массу. Ростостимулирующий эффект дилудина зарегистрирован в контрольных и загрязненных прудах по

Таблица 7

Сравнение биопротекторной активности двух производных 1,4-ДГП в исследованиях на дрозофиле

Активность	Дилудин	Цереброкраст
Токсичность для эбриональной стадии развития	Не обнаружена	Не обнаружена
Токсичность для постэмбриональных стадий развития дрозофилы	Дозы > 1 мМ токсичны	Не обнаружена
Влияние на выживаемость	Дозы 0,001–0,1 мМ увеличивают выживаемость особей на 50–80%	Дозы 1–10 мМ повышают выживаемость особей на 30–50%
Антикластогенный эффект	*Против ЭМС*	
	Проявляется при дозах 0,1–1 мМ, обратная зависимость от дозы; максимальный РФ = 35 %	Проявляется при дозах 0,1–30 мМ; полиномиальная зависимость от дозы; максимальный РФ = 25–35 %
Антимутагенный эффект	*Против спонтанных мутаций*	*Против ЭМС*
	РФ ≈ 60 % (Кужир, 1999)	Проявляется при дозах 0,1–1 (5 мМ); обратная зависимость от дозы; максимальный РФ = 36–52 %
Репарогенная активность	Стимулирует материнскую репарацию (Кужир, 1999)	Не изучена

увеличению среднесуточной относительной скорости роста молоди карпа, и наблюдался как после 23–29-дневного применения дилудина, так и через 2 месяца после прекращения его использования. Это свидетельствует о благоприятном последействии антимутагена и согласуется с данными о пролонгированных фармакологических эффектах производных 1,4-ДГП (Duburs et al., 2008). В модельных опытах с применением цереброкраста показано улучшение памяти, предотвращение нейродефицита, вызванного циклогексимидом, алкоголем, пре- и постнатальной гипоксией, старением (Kluša, 1995; Kluša et al., 1995). Показано, что цереброкраст снимает окислительный стресс, вызванный действием MPP^+ (1-метил-4-фенилпиридиния) на клетки мозжечка *in vitro* и уменьшает генерацию АФК (Klimavičiusa et al., 2007), что может обусловить его нейропротекторный эффект.

Дилудин и цереброкраст обладают также генопротекторным потенциалом. Нами установлена зависимость антимутагенной активности ряда производных 1,4-ДГП, включая дилудин, от их антиоксидантной и электронодонорной способности (Кужир, 1999), что хорошо объясняло значительное подавление спонтанной мутабильности половых клеток дрозофилы устранением одной из главных эндогенных причин мутагенеза — АФК. В рамках данного исследования дилудин снижал уровень повреждений хромосом, индуцированных алкилирующим агентом ЭМС. ЭМС относится к мутагенам прямого действия и вызывает разрывы и перестройки хромосом благодаря алкилированию N-7 гуанина с последующим ослаблением гликозидных связей, выпадением модифицированного основания и образованием АР-сайтов (Beranek, 1990; Vogel, Natarajan, 1995). Один из механизмов хемопротекторного эффекта производных 1,4-ДГП связан с модуляцией процессов репарации ДНК. С использованием линий *mei-9* показана способность некоторых производных 1,4-ДГП, включая дилудин, стимулировать материнскую репарацию первичных повреждений ДНК, индуцированных ЭМС в сперматозоидах (Кужир, 1999), а также влиять на репарацию ДНК у личинок дрозофилы (Даливеля и др., 2005). Поскольку фенотип *mei-9* оказался менее чувствительным к действию антимутагенов по сравнению с *mei-9*$^+$ в предыдущих экспериментах, можно предполагать, что наблюдаемый эффект дилудина против ЭМС опосредован влиянием на системы эксцизионной репарации ДНК, что не противоречит доминирующей роли АР-сайтов в формировании разрывов хромосом.

Генетическая активность цереброкраста ранее не изучалась. Нами обнаружено некоторое несоответствие действия препарата на частоту ЭМС-индуцированных хромосомных повреждений и РСПЛМ. Следует упомянуть, что механизмы становления этих событий различаются, и мутации, в том числе РСПЛМ, возникают преимущественно в результате алкилирования O^6 гуанина и ошибочного спаривания модифицированного основания с образованием транзиции GC→AT (Beranek, 1990). Частота ЭМС-индуцированных РСПЛМ зависит от функционирования систем эксцизионной репарации (Vogel, Natarajan, 1995). Не исключено влияние ферментов, осуществляющих репарацию неспаренных оснований или формирующих адаптивный ответ, который в половых клетках личинок дрозофилы может быть обусловлен индукцией глутатион-S-трансферазы (Кужир, 1999; Savina et al., 2003). Различия в аддуктах, ответственных за генные и хромосомные мутации, путей преобразования экспозиционной дозы мутагена в молекулярную, а также вовлечение различных ферментных систем в процесс становления этих мутационных событий, может сказываться и на чувствительности использованных тест-систем к действию модификаторов.

Наблюдаемые антикластогенные и антимутагенные эффекты цереброкраста в диапазоне малых доз согласу-

ются со стимулирующим влиянием этого препарата на постэмбриональные стадии развития дрозофилы, что в комплексе характеризует его биопротекторную активность *in vivo*. Однако в дозах выше 10 мМ отмечено увеличение частоты РСПЛМ, что отражает типичное для многих антиоксидантов изменение биологической активности при высоких дозах вследствие реализации прооксидантного потенциала. Тест-система, преимущественно улавливающая генные мутации, проявила большую чувствительность к комутагенному действию данного препарата.

Эффективность малых доз, характерная для обоих препаратов, подтверждает их способность запускать и оптимизировать защитные реакции, возможно, путем регуляции энергетического баланса, метаболизма NAD^+ и поли(ADP) рибозилирования (Кужир, 1999). На клетках человека *in vitro* с помощью молекулярно-биохимических методов получены доказательства в пользу способности одного из производных 1,4-ДГП, близкого по химической структуре к дилудину, модулировать уровень поли-ADP-рибозы (Ryabokon et al., 2008). Показано, что увеличение содержания этого функционально важного полимера происходит под влиянием препарата в диапазоне тех же доз (10^{-9}—10^{-6} М), которые повышали скорость и эффективность репарации ДНК после воздействия на клетки различных генотоксических факторов (Ryabokon et al., 2005).

В новейшей литературе появляется все больше данных, указывающих на связь нестабильности генома с развитием патологических состояний, снижающих качество и продолжительность жизни человека (Karanjawala, Lieber, 2004; Rattan, 2006; Chen et al., 2007; Schumacher et al., 2008). Накопление повреждений ДНК вызвано чрезмерным давлением на геном мутагенов окружающей среды и/или функциональной недостаточностью защитных, в том числе репарационных, систем организма. Существенный вклад дефектов репарации ДНК в нестабильность генома и патологию особенно ярко демонстрируется на примере редких наследственных заболеваний, объединенных в группу синдромов хромосомной нестабильности, которые характеризуются ломкостью и гиперчувствительностью хромосом к мутагенным факторам, иммунодефицитом, склонностью к канцерогенезу и ранней смертностью (Thompson, Schild, 2002; de Boer, Hoeijmakers, 2000; Bachrati, Hickson, 2003). Изучение генетических причин преждевременного старения, в том числе моделирование прогероидного состояния на животных, подтвердило роль репарации ДНК в старении (Gorbunova, Seluanov, 2005; Ju et al., 2006; Garinis, 2008; Swindell, 2007; Hinkal, Donehower, 2008). Некоторые авторы рассматривают гены репарации ДНК и сигнальные пути регуляции репарационного процесса в качестве возможных мишеней терапевтической коррекции продолжительности жизни.

Изучаемые нами производные 1,4-дигидропиридина являются аналогами дигидроникотинамида. В связи с этим очень интересны данные о вмешательстве предшественника NAD^+ — никотинамида в такие клеточные процессы, как синтез поли-(ADP-рибозо)полимеразы (PARP), функционирование митохондриальных мембран, транскрипционных факторов, каспаз и т. д. (Li et al., 2006). Обнаружено также, что состояние здоровья человека зависит от метаболизма NAD^+, проявляющего свои эффекты через PARP, моно-ADP-рибозилтрансферазы и сиртуины (Sauve, 2008). Последние (сиртуины Sir1—7) принадлежат к недавно открытому семейству ферментов, модифицирующих белки и влияющих на рост и дифференциацию клеток, апоптоз, репарацию ДНК, устойчивость к стрессу и другие жизненно важные функции, обеспечивающие анти-старение (Michan, Sinclair, 2007; Ghosh, 2008). Как уже упоминалось, производные 1,4-ДГП обладают антимутагенным и репарогенным потенциалом, а также способны изменять уровень поли-ADP-рибозы в клетках человека. Рассмотрение этих фактов в контексте цитируемых данных литературы делает вполне обоснованным предположение о влиянии изученных препаратов на качество и продолжительность жизни путем индукции сигнала, распространяющегося по генным сетям и мобилизующего клеточный ответ на генотоксический стресс и старение.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что оба препарата дигидропиридинового ряда при определенных условиях являются биопротекторами. Эффективность биопротекторного действия в определенном диапазоне доз увеличивается с уменьшением дозы. Повышение выживаемости, зарегистрированное при воздействии дилудина и цереброкраста на разные стадии онтогенеза дрозофилы, защита половых клеток имаго при обработке антимутагенами личиночной стадии развития, а также реализация биопротекторного потенциала в области малых доз может указывать на индуцибельный механизм их действия. Сопоставление наблюдаемых биопротекторных эффектов с данными современной литературы позволяет предполагать влияние изученных препаратов не только на стабильность генома, но и на продолжительность жизни. Кроме того, выявление диапазона доз, обладающих биопротекторной активностью *in vivo*, представляет полезную информацию для практических целей.

Литература

1. *Бурлакова Е. Б.,* 1998. Биоантиоксиданты вчера, сегодня, завтра ... // Биоантиоксидант: Тез. докл. V межд. конф., Москва, С. 1—2.
2. *Бурлакова Е. Б., Конрадов А. А., Мальцева Е. Л.,* 2003. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Хим. физика. Т. 22. С. 21—40.
3. *Вальдман А. П., Дубур Г. Я., Спруж Я. Я.,* 1977. Дилудин — новый антиоксидант — стабилизатор витаминов и стимулятор роста и продуктивности сельскохозяйственных животных // Извест. АН Латв. ССР. № 9. С. 43—61.
4. *Вартанян Л. П., Иванов Е. В., Вершинина С. Ф., Маркочев А. Б., Бисениекс Е. А., Горнаева Г. Ф., Пу-*

стовалов Т. В., Пономарева Т. В., 2004. Антинеопластический эффект глутапирона при хроническом гамма-облучении крыс // Радиац. Биол. Радиоэкология. Т. 44, № 2.С. 198–201.
5. *Гончарова Р. И.,* 2005. Теоретические и практические аспекты антимутагенезе // Молекулярная и прикладная генетика. Научные труды, Минск, Т. 1. С. 21–25.
6. *Гончарова Р. И., Даливеля О. В., Кужир Т. Д., Дубурс Г. Я., Улдрикис Я. Р.,* 2002. Кластогенность этилметансульфоната и диметилтерефталата в микроядерном тесте и пути ее модификации // Цитология и генетика. № 1. С. 14–25.
7. *Гончарова Р. И., Слуквин А. М., Дубурс Г. Я.* Дилудин, антимутаген 1,4-дигидропиридинового ряда — стимулятор роста и продуктивности прудового карпа // Международная конференция «Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб» Санкт-Петербург, 10–12 сентября 2008 г. Тезисы докладов, С. 55–56.
8. *Гуревич К. Г.* Закономерности и возможные механизмы действия сверхмалых доз биологически активных веществ // Вестн. Мос. ун-та. Сер. 2, Химия. 2001. Т. 2. № 2. С. 131–134.
9. *Даливеля О. В., Савина Н. В., Кужир Т. Д., Гончарова Р. И.,* 2005. Модуляция процессов репарации ДНК на примере действия производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты // Цитология и генетика. Т. 39, № 5. С. 62–72.
10. *Иванов Е. В., Пономарева Т. В., Меркушев Г. Н., Романович И. К., Дубур Г. Я., Бисениекс Э. А., Улдрикис Я. Р., Пойканс Я. Я.,* 2004. Радиомодифицирующие свойства производных 1,4-дигидропиридина и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10-декагидроакридин-1,8-диона // Радиац. Биол. Радиоэкология. Т. 44, № 5. С. 550–559.
11. *Кужир Т. Д.,* 1999. Антимутагены и химический мутагенез в системах высших эукариот. — Минск: Технология, 267 с.
12. *Савина Н. В., Кужир Т. Д.,* 2003. Влияние локуса yellow на чувствительность половых клеток дрозофилы к химическим мутагенам // Генетика. Т. 39, № 12. С. 1–10.
13. *Степаненко И. Л.,* 2004. Регуляция генных сетей стрессового ответа активными формами кислорода // Экологическая генетика. Т. II, № 1. С. 4–12.
14. *Тирзит Г. Д., Казуш Э. Я., Дубур Г. Я.,* 1992. Влияние производных 1,4-дигидропиридина на генерирование гидроксильного радикала // Химия гетероцикл. соед. № 4. С. 519–521.
15. *Эмануэль Н. М., Обухова Л. К., Дубур Г. Я., Тирзит Г. Д., Улдрикис Я. Р.,* 1985. Геропротекторная активность 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-1,4-дигидропиридина // Доклады АН СССР. Т. 284, № 5. С. 1271–1274.
16. *Aaron C. S., Lee W. R.,* 1978. Molecular dosimetry of the mutagen ethyl methanesulfonate in Drosophila melanogaster spermatozoa: linear relation of DNA alkylation per sperm cell (dose) to sex-linked recessive lethals // Mutat Res. Vol. 49, N 1. P. 27–44.
17. *Bachrati C. Z., Hickson I. D.,* 2003. RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging // Biochem. J. Vol. 374. Pt 3. P. 577–606.
18. *Beltz L. A., Bayer D. K., Moss A. L., Simet I. M.,* 2006. Mechanisms of cancer prevention by green and black tea polyphenols // Anticancer Agents Med. Chem. Vol. 6, N. 5. P. 389–406.
19. *Beranek D. T.,* 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents // Mutat. Res. Vol. 231. P. 11–30.
20. *Bertram B., Bollow U., Rajaee–Behbahani N., Bürkle A., Schmezer P.,* 2003. Induction of poly(ADP-ribosyl)ation and DNA damage in human peripheral lymphocytes after treatment with (-)-epigallocatechin-gallate // Mutat Res. Vol. 534, N 1–2. P. 77–84.
21. *Briede J., Daija D., Bisenieks E., Makarova N., Uldrikis J., Polkans J., Duburs G.,* 1999. Effects of some 1,4-dihydropyridine Ca antagonists on the blast transformation of rat spleen lymphocytes // Cell Biochem. Funct. Vol. 17, N 2. P. 97–105.
22. *Briede J., Heidemanis K., Dabina I., Duburs G.,* 2002. Effect of cerebrocrast on the function of human platelets and release of the arachidonic acid from plasma membrane // Cell Biochem. Funct. Vol. 20. P. 177–181.
23. *Briede J., Stivrina M., Stoldere Dz., Vigante B., Duburs G.,* 2007. Effect of cerebrocrast, a new long-acting compound on blood glucose and insulin levels in rats when administered before and after STZ-induced diabetes mellitus // Cell Biochem. Funct. Vol. 25, N. 6. P. 673–680.
24. *Chen J. H., Hales C. N., Ozanne S. E.,* 2007. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? // Nucleic Acids Res. Vol. 35, N 22. P. 7417–7428.
25. *De Boer J., Hoeijmakers J. H.,* 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes // Carcinogenesis. Vol. 21, N 3. P. 453–460.
26. *Duburs G., Vīgante B., Plotniece A., Krauze A., Sobolevs A., Briede J., Kluša V., Velēna A.,* 2008. Dihydropyridine derivatives as bioprotectors // Chemistry today. Vol. 26, N 2. P. 68–70.
27. *Garinis G. A.,* 2008 Nucleotide excision repair deficiencies and the somatotropic axis in aging // Hormones (Athens). Vol. 7, N. 1. P. 9–16.
28. *Ghosh H. S.,* 2008. The anti-aging, metabolism potential of SIRT1 // Curr Opin Investig Drugs. Vol. 9, N 10. P. 1095–1102.
29. *Goncharova R., Zabrejko S., Dalivelya O., Kuzhir T.,* 2001 Anticlastogenicity of two derivatives of 1,4-dihydroisonicotinic acid in mouse micronucleus test // Mutat. Res. Vol. 496. P. 129–135.
30. *Goncharova R, Slukvin A., Duburs G., Uldrikis J., Bisenieks E.,* 2002. Promising antimutagen for

improving reproductive indices of stripped fishes and the quality of their progeny // EAS Special Publication. N 31. P. 63–70.
31. *Gorbunova V., Seluanov A.,* 2005. Making ends meet in old age: DSB repair and aging // Mech Ageing Dev. Vol. 126, N 6–7. P. 621–628.
32. *Hinkal G., Donehower L. A.,* 2008. How does suppression of IGF-1 signaling by DNA damage affect aging and longevity? // Mech. Ageing Dev. Vol. 129, N 5. P. 243–253.
33. *Ivanov E. V., Ponomarjova T. V., Merkushev G. N., Dubur G. Ja., Bisenieks E. A., Dauvorte A. Z., Pilscik E. M.* 1990. Ein neuer Haut-Radioprotektor Diethon (experimentelle Untersuchung) // Radiobiol. Radiother. H. 1. S. 69–78.
34. *Ju Y. J., Lee K. H., Park J. E., Yi Y. S., Yun M. Y., Ham Y. H., Kim T. J., Choi H. M., Han G. J., Lee J. H., Lee J., Han J. S., Lee K. M., Park G. H.,* 2006. Decreased expression of DNA repair proteins Ku70 and Mre11 is associated with aging and may contribute to the cellular senescence // Exp Mol Med. Vol. 38, N 6. P. 686–693.
35. *Karanjawala Z. E., Lieber M. R.,* 2004. DNA damage and aging // Mech. Ageing Dev. Vol. 125, N 6. P. 405–416.
36. *Klegeris A., Liutkevičius E., Mikalauskiene G., Duburs G., McGeer P. L., Kluša V.,* 2002. Anti-inflammatory effects of cerebrocrast in a model of rat paw edema and on mononuclear THP-1 cells // Europ. J. Pharmac. Vol. 441. P. 203–208.
37. *Klimavičiusa L., Kluša V., Duburs G., Kaasik A., Kalda A., Zharkovsky A.,* 2007. Distinct effects of atypical 1,4-dihydropyridines on 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity // Cell Biochem Funct. Vol. 25, N 1. P. 15–21.
38. *Kluša V.,* 1995. Cerebrocrast. Neuroprotectant cognition enhancer // Drugs of the Future. Vol. 20, N 2. P. 135–138.
39. *Kluša V., Semenova T. D., Medvinskaya N. I., Fast A. E.,* 1995. Cerebrocrast (IOS-1212) normalizes disturbance of learning, attention, emotional behaviour and brain biogenic amine levels of prenatally hypoxized rats // Proc. Latvian Acad. Sci., Sect. B. 11/12. P. 156–161.
40. *Lewis E. B., Bacher F.,* 1968. Method of feeding ethyl methanesulfonate (EMS) to Drosophila males // Dros. Inf. Serv. V. 43. P. 193.
41. *Li F., Chong Z. Z., Maiese K.,* 2006. Cell Life versus cell longevity: the mysteries surrounding the NAD^+ precursor nicotinamide // Curr. Med. Chem. Vol. 13, N 8. P. 883–895.
42. *Ling S., Wu Y., Zheng J., Linden J. Holoshitz J.,* 2004. Genoprotective pathways. II. Attenuation of oxidative DNA damage by isopentenyl diphosphate // Mutat Res. Vol. 554, N 1–2. P. 33–43.
43. *Michan S., Sinclair D.,* 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function // Biochem J. Vol. 404, N 1. P. 1–13.
44. *Misiewicz I., Skupinska K., Kowalska E., Lubinski J., Kasprzyncka–Guttman T.* Sulforaphane-mediated induction of a phase 2 detoxifying enzyme NAD(P)H: quinone reductase and apoptosis in human lymphoblastoid cells // Acta Bichemica Polonica. 2004. Vol. 51, N 3. P. 711–721
45. *Muňoz E. R., Barnett B. M.,* 1978. Embryonic and post-embryonic lethals induced by diethyl sulfate in mature sperm of Drosophila melanogaster // Mutat. Res. Vol. 51, N 1. P. 37–44.
46. *Rattan S. I.,* 2006. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals // Free Radic. Res. Vol. 40, N 12. P. 1230–1238.
47. *Ryabokon N. I., Goncharova R. I., Duburs G., Rzeszowska-Wolny J.,* 2005. A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulates DNA repair in human cells *in vitro* // Mutat. Res. Vol. 587. P. 52–58.
48. *Ryabokon N. I., Goncharova R. I., Duburs G., Hancock R., Rzeszowska–Wolny J.* 2008. Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining // Mutat. Res. Vol. 637, N 1–2. P. 173–181.
49. *Sakihama Y., Cohen M. F., Grace S. C., Yamasaki H.,* 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants // Toxicology. Vol. 177, N. 1. P. 67–80.
50. *Sauve A. A.,* 2008. NAD^+ and vitamin B3: from metabolism to therapies // J. Pharmacol. Exp. Ther. Vol. 32, N 3. P. 883–893.
51. *Savina N., Dalivelya O., Kuzhir T.,* 2003. Adaptive response to alkylating agents in Drosophila sex linked recessive lethal assay // Mutat. Res. Vol. 535, N 2. P. 195–204.
52. *Simić A., Manojlović D., Segan D., Todorović M.,* 2007. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics // Molecules. Vol. 12, N 10. P. 2327–2340.
53. *Schumacher B., Garinis G. A., Hoeijmakers J. H.,* 2008. Age to survive: DNA damage and aging // Trends Genet. Vol. 24, N 2. P. 77–85.
54. *Swindell W. R.,* 2007. Gene expression profiling of long-lived dwarf mice: longevity-associated genes and relationships with diet, gender and aging // BMC Genomics. Vol. 8. P. 353.
55. *Thompson L. H., Schild D.,* 2002. Recombinational DNA repair and human disease // Mutat. Res. Vol. 509, N 1–2. P. 49–78.
56. *Vaitkuvienė A., Ulinskaitė A., Meškys R. Duburs G., Kluša V., Liutkevičius E.,* 2006. Study of the interaction of 1,4-dihydropyridine derivatives with glucocorticoid hormone receptors from the rat liver // Pharmacol. Rep. Vol. 58, N 4. P. 551–558.
57. *Vogel E. W., Natarajan A. T.,* 1995. DNA damage and repair in somatic and germ cells in vivo // Mutat. Res. Vol. 330. P. 183–208.

58. *Waters M. D., Stack H. F., Jackson M. A., Brockman H. E., De Flora S.,* 1996. Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data // Mutat. Res. Vol. 350, N 1. P. 109–129.
59. *Würgler F. E., Sobels F. H., Vogel E.* 1984. Drosophila as an assay system for detecting genetic changes // Handbook of Mutagenicity Test Procedures / Ed. B. G. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel. Amsterdam: Elsevier. P. 555–601.
60. *Wu Xian-Jun, Pang Xin-Wei, LI Cheng-Hui, Zhang Xi Ang-Zhai,* 2000.Effects of diludin on immunologic competence of chicks // Chinese Journal of Veterinary Science. Vol. 20, N 4. P. 386–389.
61. *Wu Y., Zheng J., Linden J., Holoshitz J.* 2004. Genoprotective pathways. Part I. Extracellular signaling through G(s) protein-coupled adenosine receptors prevents oxidative DNA damage // Mutat. Res. Vol. 546, N 1–2. P. 93–102.
62. *Yu Zu-Gong, Xia De-Quan, Wu Ting-Ting,* 2005. Effects of cysteamine hydrochloride and diludin on growth, hormone and physiobiochemical parameters levels in Oreochromis aureus // Journal of Nanjing Agricultural University. Vol.28, N 4. P. 96–99.
63. *Zou Xiao-Ting, Zhu Jing-Lan, Xu Zi-Rong, Wang Yi-Zhen,* 2003. Effects of dietary 1,4-dihydropyridine on fatty liver of laying hens // Journal of Zhejiang University.Vol. 29, N 6. P. 655–660.

Diludine and cerebrocrast as bioprotectors in the model test-systems *in vivo*

Savina N. V., Nikitchenko N. V., Dalivelya O. V., Bisenieks Egils, Gunars Duburs, Goncharova R. I.

❀ **SUMMARY: An influence of two 1,4-dihydropyridine derivatives (diludine and cerebrocrast) on *Drosophila* development and germ cell mutability was studied. It was revealed the concentration range, within which the compounds manifest their bio-stimulating effects increasing individual survival by 50–80 % as well as the protective action against the alkylating agent ethyl methanesulfonate reducing the level of induced mutations by 30–50 %. The pattern and presumable mechanisms of the bioprotective action of these compounds are considered.**

❀ **KEY WORDS:** a bioprotector; an antimutagen; derivatives of 1,4-dihydropyridine; survival; development; lifespan; chromosome breakage; mutation; *Drosophila*.

❀ Информация об авторах

Савина Наталья Викторовна — научный сотрудник.
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, лаборатория генетической безопасности.
220072, Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27.
E-mail: N.Savina@igc.bas-net.by

Никитченко Наталья Васильевна — младший научный сотрудник.
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, лаборатория генетической безопасности.
220072, Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27.
E-mail: N.Savina@igc.bas-net.by

Даливеля Ольга Вячеславовна — зав. кафедрой, к. б. н.
Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка, кафедра тифлопедагогики.
220080, Беларусь, г. Минск, ул. Советская, 18.
E-mail: Dalivelya@mail.ru

Бисениекс Эгилс — ассистент.
Латвийский институт органического синтеза, лаборатория мембраноактивных соединений и бетта-дикетонов.
LV1006, Латвия, г. Рига, ул. Айзкрауклес 21.
E-mail: egils.bisenieks@osi.lv

Дубурс Гунарс — зав. лабораторией, д. х. н., профессор.
Латвийский институт органического синтеза, лаборатория мембраноактивных соединений и β-дикетонов.
LV1006, Латвия, г. Рига, ул. Айзкрауклес 21.
E-mail: gduburs@osi.lv

Гончарова Роза Иосифовна — зав. лабораторией, д. б. н., профессор.
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, лаборатория генетической безопасности.
220072, Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27.
E-mail: R.Goncharova@igc.bas-net.by

Кужир Татьяна Дановна — д. б. н., главный научный сотрудник.
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, лаборатория генетической безопасности.
220072, Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27.
E-mail: T.Kuzhir@igc.bas-net.by

Savina Natalia Viktorovna — researcher.
National Academy of Sciences of Belarus Institute of Genetics and Cytology,
27, Akademicheskaya St., Minsk 220072, Republic of Belarus.
E-mail: N.Savina@igc.bas-net.by

Nikitchenko Natalia Vasilievna — junior research fellow.
National Academy of Sciences of Belarus Institute of Genetics and Cytology,
27, Akademicheskaya St., Minsk 220072, Republic of Belarus.
E-mail: N.Savina@igc.bas-net.by

Dalivelya Olga Vyacheslavovna — head of department.
Belarussian State Pedagogical University,
18, Sovetskaya street, Minsk 220050, Republic of Belarus.
E-mail: Dalivelya@mail.ru

Bisenieks Egils — assistent.
The Institute of Organic Synthesis,
Aizkraukles 21, LV-1006, Riga, Latvia.
E-mail: egils.bisenieks@osi.lv

Gunars Duburs — head of laboratory, professor.
The Institute of Organic Synthesis,
Aizkraukles 21, LV-1006, Riga, Latvia.
E-mail: gduburs@osi.lv

Goncharova Roza Iosifovna — head of laboratory, professor.
National Academy of Sciences of Belarus Institute of Genetics and Cytology,
27, Akademicheskaya St., Minsk 220072, Republic of Belarus.
E-mail: R.Goncharova@igc.bas-net.by

Kuzhir Tatiana Danovna — senior research fellow.
National Academy of Sciences of Belarus Institute of Genetics and Cytology,
27, Akademicheskaya St., Minsk 220072, Republic of Belarus.
E-mail: T.Kuzhir@igc.bas-net.by