

СТАРЕНИЕ И ДОЛГОЛЕТИЕ, БОЛЕЗНИ ЗРЕЛОГО ВОЗРАСТА

УДК 575

© А. А. Москалев¹,
А. В. Кременцова²,
О. А. Малышева¹

¹ Институт биологии Коми НЦ
УрО РАН, Сыктывкар, Россия

² Институт биохимической фи-
зики им. Н. М. Эмануэля РАН,
Москва, Россия

✿ Изучено сочетанное действие светового режима (круглосуточных освещения или темноты) и антиоксиданта мелатонина на продолжительность жизни (ПЖ) особей дрозофилы лабораторной линии дикого типа (*Canton-S*), мутантов с нарушенной детоксификацией активных форм кислорода (*Sod*) и мутантов с дефектной эксцизионной репарацией ДНК (*mus210*). Показано, что содержание имаго дрозофил в условиях круглосуточного освещения приводит к снижению средней ПЖ и/или максимальной ПЖ по сравнению с проживанием в условиях круглосуточного затемнения. Добавление мелатонина в пищу мух оказывает геропротекторное действие, прежде всего, в условиях темноты. Отмеченные закономерности наиболее выражены у линии мух с мутацией фермента детоксикации свободных радикалов *Sod*. Эффекты выявляются у особей обоих полов. Анализ полученных результатов показал, что механизмы, обуславливающие влияние на продолжительность жизни освещения и мелатонина, различаются.

✿ **Ключевые слова:** продолжительность жизни; *Drosophila melanogaster*; световой режим; мелатонин

Поступила в редакцию 15.06.2008
Принята к публикации 25.09.2008

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ОСВЕЩЕНИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Искусственное продление светлой части суток приводит к увеличению скорости старения и к уменьшению продолжительности жизни (ПЖ) плодовой мушки *Drosophila melanogaster* и мышей (Москалев и др., 2006; Anisimov et al., 2004; Majercak, 2002.; Massie et al., 1991; Massie et al., 1993; Sekelsky et al., 2000). Однако механизмы этого явления изучены слабо.

В то же время известно, что процессы циркадной ритмичности позвоночных животных регулирует гормон эпифиза мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин), который, кроме того, оказывает выраженное антиоксидантное действие (Анисимов и др., 1997; Анисимов, 2003; Anisimov et al., 2006; Armstrong et al., 1991; Pieri et al., 1995). По-видимому, у млекопитающих он участвует в регуляции процессов старения. Например, длительное введение мелатонина старым мышам замедляет возрастзависимую инволюцию тимуса и дегенерацию желтого пятна (Sainz et al., 1995; Yi et al., 2005). Известно, что при старении организма млекопитающих наблюдается постепенное снижение биосинтеза мелатонина, что является следствием уменьшения адренергической иннервации и количества β -адренергических рецепторов на поверхности пинеалоцитов (Pappolla et al., 1997). В качестве антиоксиданта мелатонин подавляет образование окисленных (карбонилированных) форм белков и замедляет перекисное окисление липидов (Anisimov et al., 1997; Bonilla et al., 2006). Благодаря своим антиоксидантным свойствам мелатонин приводит к выраженному подавлению апоптоза. Например, он повышает экспрессию в нервной ткани генов Mn- и Cu, Zn-Sod, защищая нейроны от апоптоза, вызванного активными формами кислорода и накоплением Ca^{2+} . Мелатонин подавляет также апоптоз тимоцитов (Pappolla et al., 1997; Provinciali et al., 1996). В ряде экспериментов показано, что введение мелатонина замедляет процессы старения и продлевает жизнь модельным животным, например, мышам (Pierpaoli et al., 1994), крысам (Oakninbendahan et al., 1995) и дрозофилам (Bonilla et al., 2002; Coto-Montes et al., 1999).

В данной работе мы исходили из предположения, что определяющим фактором влияния светового режима на продолжительность жизни *D. melanogaster* является изменение уровня метаболизма (Sheeba et al., 2002), приводящее к интенсификации генерации свободных радикалов и повреждений ДНК. Для проверки этого предположения нами выбрана линия мух, характеризующаяся нарушением детоксификации активных форм кислорода (*Sod*) и линия мух, несущих мутацию гена, кодирующего фермент эксцизионной репарации ДНК (*mus210*). Было выдвинуто предположение, что действие антиоксиданта мелатонина будет более выражено проявляться у данных мутантов, особенно в условиях круглосуточного освещения. Таким образом, целью данной работы было изучение влияния мелатонина на продолжительность жизни дрозофил в зависимости от светового режима, пола и генотипа дрозофил.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Лабораторные линии дрозофилы:

- 1) линия дикого типа *Canton-S*;
- 2) линия *Sod^{nl}/+* — гетерозигота по мутации, приводящей к потере функции гена супероксиддисмутазы (*Sod*), участвующей в детоксикации O_2 -радикала. Гетерозиготы, несущие аллель *nl* (синоним — *n108*), сохраняют только 36,7 % нормальной активности фермента Cu, Zn-Sod (Phillips et al., 1995). Линия имеет генотип *Sod^{nl}red¹/TM3, Sb¹Ser¹*.
- 3) линия *mus210^{G1}/+* — гетерозигота по дефекту гена *mutagen-senshive 210* (аллель *G1*), кодирующего белок, связывающийся с поврежденным участком ДНК и участвующий в эксцизионной репарации нуклеотидов. Ген *mus210* гомологичен генам *XPC* (группы *C* пигментной ксеродермы) человека (Sekelsky et al., 2000). Данная линия имеет генотип *mus210^{G1}/CyO*.

Условия эксперимента. Культивирование мух различных линий проводилось в термостате при температуре 25 °C и 12-часовом освещении. Родительские особи исследуемых линий были помещены в баночки (100 мл) с дрожжевой питательной средой. После появления имаго в течение суток производили отбор необходимого количества особей, разделяя их по полу. Мух примерно по 50 штук помещали в баночки (100 мл) с питательной средой (25 мл). Общее количество баночек каждой линии было поделено на несколько групп. Одну часть особей помещали в условия освещения с интенсивностью 120–130 LX на протяжении 24 ч, остальная часть находилась в темноте на протяжении всей жизни. Для того, чтобы исключить различия сравниваемых групп по случайным причинам, условия круглосуточного освещения и затемнения воспроизводились одновременно в пределах одной термокомнаты. К сожалению, круглосуточное освещение было технически не возможно совместить со стандартным режимом: 12 часов свет, 12 часов темнота, поэтому последний не изучался. Половину всех имаго содержали на питательной среде, смазанной дрожжевой пастой, содержащей 100 мкг/мл мелатонина (Sigma-Aldrich). Мелатонин растворяли в этиловом спирте из расчета 1 мл спирта на 100 мл пасты. Контрольные мухи получали пасту с добавлением 1 мл спирта. Подсчет числа умерших мух проводили ежедневно (за исключением субботы и воскресенья). Выживших мух еженедельно перемещали на свежую среду.

Математическая обработка полученных результатов.

Для оценки достоверности различий продолжительности жизни в опыте и контроле применяли критерий Колмогорова-Смирнова. Для каждой кривой выживания были рассчитаны следующие характеристики распределения продолжительности жизни: средняя (СПЖ) и максимальная (МПЖ) продолжительность жизни, стандартное отклонение.

Все кривые выживаемости аппроксимировали функцией Гомпертца (Gompertz, 1825):

$$S(t) = \exp\left(-\frac{h_0}{\gamma}(e^{\gamma t} - 1)\right),$$

где $S(t)$ — выживаемость в возрасте t , h_0 и γ — параметры функции Гомпертца.

При этом интенсивность смертности $h(t) = -\frac{S'(t)}{S(t)}$ экспоненциально увеличивается с возрастом:

$$h(t) = h_0 e^{\gamma t}.$$

Величина $h(t)$ определяет вероятность того, что индивид, дожив до возраста t , умрет в некотором узком интервале возрастов $[t, t+\Delta t]$. При этом параметр определяет скорость вымирания популяции.

Параметры функции Гомпертца оценивали методом наименьших квадратов Ньютона-Гаусса. Для обработки полученных результатов использовали программы Winmodest, Matlab 7.5 и Statistica 6.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты обобщены в таблицах 1–2. Кривые выживаемости представлены на рисунках 1–2.

У мух линии дикого типа *Canton-S* кривые выживаемости в условиях темноты и постоянного освещения и у самок, и у самцов достоверно не различались. Тем не менее, максимальная продолжительность жизни мух в темноте увеличивалась по сравнению с продолжительностью жизни при постоянном освещении — у самцов на 6 %, а у самок — на 7,5 % (таб. 1–2). У мух линии с дефектом гена *Sod* продолжительность жизни в темноте достоверно возрастала ($p < 0,001$) и у самцов и у самок. Средняя ПЖ возросла на 10,7 % и 11,3 %, соответственно. Максимальная продолжительность жизни у мух данной линии при содержании в темноте у самок возросла на 19,1 %. У мух мутантной линии *mus210* кривые выживаемости при содержании на свету и в темноте достоверно различались ($p < 0,005$). В темноте самцы жили дольше в среднем на 7,3 % (максимально — на 10,2 %), однако у самок наблюдалось снижение средней продолжительности жизни в темноте (МПЖ — не изменялась). Таким образом, во всех исследованных нами когортах, за исключением самок линии *mus210*, круглосуточное освещение снижало продолжительность жизни мух. Эти результаты в целом согласуются с результатами, полученными нами в предыдущей работе (Москалев и др., 2006), и говорят об опасности избыточного освещения.

Было проведено сравнение продолжительности жизни дрозофил на свету и в темноте в присутствии мелатонина (табл. 1–2). У самцов и самок линии *Canton-S* кривые выживаемости мух, содержащихся в темноте в присутствии мелатонина, достоверно отличались ($p < 0,001$) от кривых выживаемости мух, содержащихся в условиях круглосуточного освещения при добавлении мелатонина.

Таблица 1

Параметры продолжительности жизни самцов дрозофил при различных режимах освещения в присутствии и в отсутствии мелатонина

Линия	Без освещения (0 ч)						Освещение (24 ч)					
	$\bar{x} \pm \Delta m$	МПЖ	Σ	γ	h_0	N	$\bar{x} \pm \Delta m$	МПЖ	σ	γ	h_0	N
Без мелатонина												
<i>Canton-S</i>	58,6 ± 0,9	79	13,0	0,0858	0,0004	190	57,1 ± 0,9	74	13,8	0,0839	0,0005	205
<i>Sod</i>	54,2 ± 1,0	67	14,5	0,0852	0,0005	223	48,4 ± 1,0	68	13,0	0,0885	0,0009	154
<i>mus210</i>	28,1 ± 0,8	44	9,3	0,1188	0,0033	147	30,3 ± 0,9	49	10,2	0,1208	0,0025	141
С мелатонином												
<i>Canton-S</i>	52,2 ± 1,3	84	17,9	0,0569	0,0022	184	59,5 ± 1,0	78	16,4	0,0839	0,0005	242
<i>Sod</i>	57,3 ± 1,2	76	15,8	0,0957	0,0002	180	47,0 ± 1,1	73	14,3	0,0771	0,0015	157
<i>mus210</i>	32,2 ± 1,0	57	11,1	0,0858	0,0043	128	30,6 ± 0,6	44	7,3	0,1792	0,0006	142

Обозначения: $\bar{x} \pm \Delta m$ — средняя продолжительность жизни и ошибка среднего; σ — стандартное отклонение; МПЖ — максимальная продолжительность жизни; α и R_0 — параметры уравнения Гомпертца; N — количество особей в выборке.

Таблица 2

Параметры продолжительности жизни самок дрозофил при различных режимах освещения в присутствии и в отсутствии мелатонина

Линия	Без освещения (0 ч)						Освещение (24 ч)					
	$\bar{x} \pm \Delta m$	МПЖ	σ	γ	h_0	N	$\bar{x} \pm \Delta m$	МПЖ	σ	γ	h_0	N
Без мелатонина												
<i>Canton-S</i>	60,3 ± 1,0	80	13,1	0,0951	0,0002	160	60,5 ± 0,8	74	12,2	0,1022	0,0001	219
<i>Sod</i>	53,8 ± 0,8	73	11,5	0,1157	0,0002	199	47,7 ± 0,8	59	10,2	0,1318	0,0002	161
<i>mus210</i>	49,3 ± 1,1	65	13,4	0,0809	0,0011	160	45,7 ± 0,9	65	12,9	0,0911	0,0011	202
С мелатонином												
<i>Canton-S</i>	65,4 ± 1,0	84	13,6	0,0884	0,0002	182	53,9 ± 0,9	74	10,8	0,1151	0,0002	138
<i>Sod</i>	57,5 ± 0,8	84	12,6	0,1122	0,0001	232	46,8 ± 0,8	67	9,9	0,1353	0,0002	164
<i>mus210</i>	49,1 ± 0,9	75	13,0	0,0863	0,0009	206	55,5 ± 0,9	75	12,8	0,0970	0,0003	199

Максимальная продолжительность жизни увеличилась на 7,1 % у самцов и на 11,9 % у самок. Средняя продолжительность жизни у самцов данной линии в темноте снижалась (на 12,3 %), но возрастала у самок (на 17,6 %). У мух линии *Sod* в темноте при добавлении в корм мелатонина выживаемость достоверно увеличилась ($p < 0,001$) по сравнению с содержанием обработанных мелатонином мух при круглосуточном освещении. Средняя ПЖ выросла на 18 % как у самцов, так и у самок. Максимальная продолжительность жизни у самцов увеличилась на 3,9 %, у самок — на 20,2 %. При аналогичном воздействии на мух линии *mus210* средняя и максимальная продолжительность жизни самцов в темноте повышалась на 7,3 % и 10,2 %, соответственно. У самок данной линии средняя продолжительность жизни на свету увеличилась (на 11,5 %), а максимальная — осталась прежней. Кривые выживаемости в рассматриваемых вариантах до-

стоверно различались ($p < 0,001$) как у самцов, так и у самок. Таким образом, в присутствии мелатонина продолжительность жизни мух при круглосуточном освещении изменялась в зависимости от их генотипа (линии) и пола.

Был проанализирован собственно эффект добавления в корм дрозофилам мелатонина. При содержании опытной и контрольной групп в условиях темноты добавление мелатонина привело к достоверному изменению продолжительности жизни линии дикого типа *Canton-S* как у самцов, так и у самок ($p < 0,005$). МПЖ увеличилась у обоих полов (на 6 % и 4,8 %, соответственно). СПЖ самцов данной линии при действии мелатонина снижалась (на 10,9 %), но увеличивалась у самок (на 7,8 %). У линии *Sod*, как и у предыдущей линии, при содержании мух в темноте мелатонин достоверно ($p < 0,001$) увеличивал продолжительность жизни как самцов, так и самок: СПЖ выросла на 5,4 % и 6,4 %, а максимальная — на 11,8 %

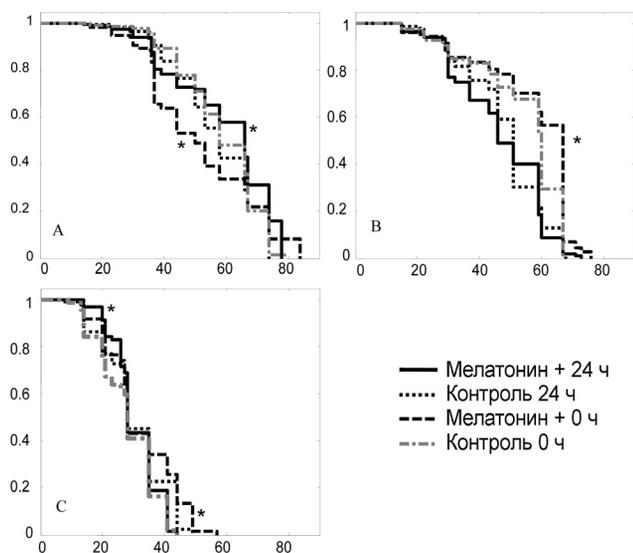


Рис. 1. Кривые выживаемости самцов линий *Canton-S* (A), *Sod* (B) и *mus210* (C) при различных режимах освещения в присутствии и в отсутствии мелатонина.

Обозначения: * — различия с контролем достоверны (по критерию Колмогорова-Смирнова). 0 и 24 ч — содержание в условиях круглосуточного затемнения или освещения, соответственно

и 13,1 %, соответственно. При содержании опытной и контрольной групп мух линии *mus210* в темноте, добавление в корм мелатонина достоверно ($p < 0,001$) увеличивало продолжительность жизни только самцов. Средняя ПЖ самцов увеличилась на 12,7 %, а у самок она не изменилась. Максимальная продолжительность жизни самцов увеличилась на 22,8 %, а самок — на 13,3 %.

При содержании опытной и контрольной групп в условиях круглосуточного освещения воздействие мелатонина привело к следующим эффектам. У самцов линии *Canton-S* при добавлении в корм мелатонина продолжительность жизни достоверно возростала ($p < 0,01$). Средняя ПЖ увеличивалась на 4 %, максимальная ПЖ — на 5,1 %. У самок добавление мелатонина в условиях круглосуточного освещения привело к достоверному ($p < 0,001$) уменьшению продолжительности жизни. Средняя ПЖ снизилась на 10,9 %, максимальная ПЖ не изменилась. У линии *Sod* при содержании в условиях круглосуточного освещения добавление мелатонина не привело к достоверному увеличению продолжительности жизни, СПЖ не изменялась. Однако МПЖ увеличилась на 6,8 % и 11,9 % у самцов и самок, соответственно. У мух линии *mus210* добавление в корм мелатонина привело к достоверному ($p < 0,001$) увеличению продолжительности жизни только самок. Средняя ПЖ увеличилась на 17,7 %, а максимальная ПЖ — на 13,3 %. Кривые выживаемости самцов также достоверно различаются ($p < 0,005$). Однако они пересекаются в области 50 % уровня смертности. В результате, продолжительность жизни коротко-

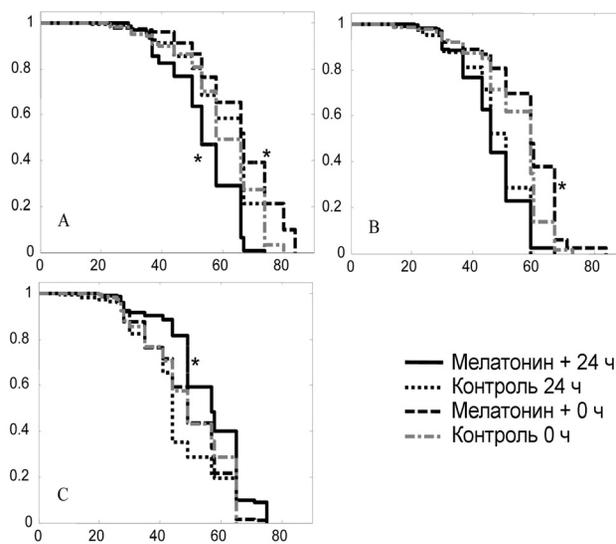


Рис. 2. Кривые выживаемости самок линий *Canton-S* (A), *Sod* (B) и *mus210* (C) при различных режимах освещения в присутствии и в отсутствии мелатонина.

Обозначения: * — различия с контролем достоверны (по критерию Колмогорова-Смирнова). 0 и 24 ч — содержание в условиях круглосуточного затемнения или освещения, соответственно

живущей субпопуляции мух увеличилась при добавлении мелатонина, а долгоживущей — уменьшилась. В итоге средняя продолжительность жизни самцов не изменилась, а максимальная — снизилась на 10,2 %.

Мы аппроксимировали все кривые выживания функцией Гомпертца. Полученные значения параметров аппроксимации приведены в таблицах 1–2. Известно, что между параметрами функции Гомпертца часто наблюдается корреляционная зависимость Стрелера-Милдвана (Strehler et al., 1960). Регрессионное уравнение для данной корреляции может быть записано в виде:

$$\ln(h_0) = \alpha - \beta \gamma,$$

где α и β — регрессионные параметры. Коэффициент корреляции между значениями параметров $\ln(h_0)$ и γ для популяции самцов оказался равен $k_{\text{корр}} = -0,25$ (корреляция недостоверна), а для самок $-k_{\text{корр}} = -0,64$ (корреляция достоверна, $p < 0,05$).

Мы предположили, что искусственное увеличение выборки экспериментальных данных может привести к увеличению коэффициентов корреляции между параметрами функции Гомпертца. Поэтому, на следующем этапе исследований, мы решили объединить экспериментальные данные, полученные в этой работе с экспериментальными данными, полученными в предыдущем исследовании на тех же линиях мух (Москалев и др., 2006). Такое объединение данных возможно потому, что, во-первых, обе популяции мух жили в одних и тех же условиях, в одной и той же лаборатории, во-вторых, в обоих экспериментах исследовались одни и те же линии мух и, в-третьих, было показано

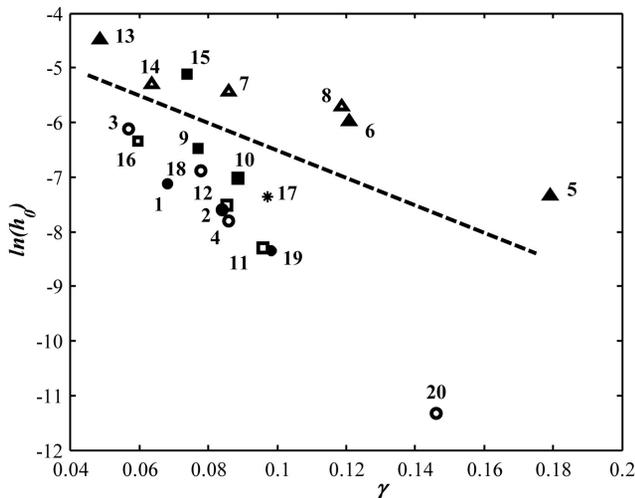


Рис. 3. Корреляция Стрелера-Милдвана параметров функции Гомпертца у самцов дрозофил. Маркерами обозначены параметры функции Гомпертца для различных линий: «круг» — *Canton-S*, «звездочка» — *Canton-S* при освещении 12 ч день/ 12 ч ночь, «квадрат» — *Sod*, «треугольник» — *mus210*; «темный» и «светлый» маркер — освещение 0 и 24 ч, соответственно. Варианты: № 1, 3, 5, 7, 9, 11 — в корм добавляли мелатонин, остальные — без мелатонина

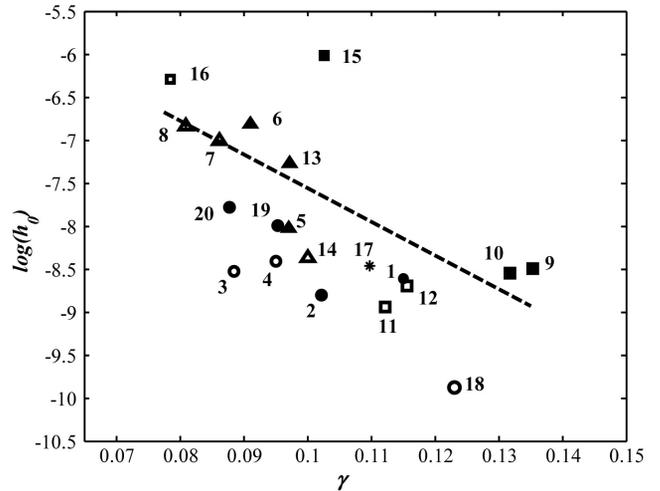


Рис. 4. Корреляция Стрелера-Милдвана параметров функции Гомпертца у самок дрозофил. Маркерами обозначены параметры функции Гомпертца для различных линий: «круг» — *Canton-S*, «звездочка» — *Canton-S* при освещении 12 ч день/ 12 ч ночь, «квадрат» — *Sod*, «треугольник» — *mus210*; «темный» и «светлый» маркер — освещение 0 и 24 ч, соответственно. Варианты: № 1, 3, 5, 7, 9, 11 — в корм добавляли мелатонин, остальные — без мелатонина

(Кременцова, 2004), что параметры функции Гомпертца различных популяций одного и того же вида животных лежат на одной и той же корреляционной прямой. Такое увеличение выборки экспериментальных данных привело к увеличению значений коэффициентов корреляции между параметрами функции Гомпертца. Для самцов оно соответствовало $k_{\text{когг}} = -0,514$ (корреляция достоверна, $p = 0,021$), а для самок — $k_{\text{когг}} = -0,637$ (корреляция достоверна, $p = 0,003$) (рис. 3–4). Это позволило определить значения регрессионных параметров корреляции Стрелера-Милдвана: $\alpha = -4,648$, $\beta = -24,65$ для самцов и $\alpha = -3,970$, $\beta = -39,28$ для самок. Биологическая интерпретация корреляции Стрелера-Милдвана обсуждается в следующем разделе.

Наблюдалась положительная корреляционная зависимость между выборочными значениями СПЖ и стандартным отклонением (рис. 5). Коэффициент корреляции между этими величинами равен $k_{\text{когг}} = 0,5527$ для популяции самок и $k_{\text{когг}} = 0,8420$ для популяции самцов. Выявлено, что чем больше средняя ПЖ, тем популяция более гетерогенна по этому показателю. В то же время, мелатонин не уменьшал гетерогенность популяции по продолжительности жизни.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа является логическим продолжением целого ряда экспериментов по изучению влияния различных режимов освещения на ПЖ *D. melanogaster*

(Majercak, 2002; Massie et al., 1991; Massie et al., 1993; Sheeba et al., 2000). Её существенным отличием является то, что исследовалась продолжительность жизни не только мух линии дикого типа, но и мух определенных мутантных генотипов. Это позволило связать данную интегральную характеристику организма с генетическими механизмами её регуляции при различных режимах освещения.

В предыдущих работах предполагалось (Sheeba et al., 2002), что в условиях постоянного освещения организм более активен и обладает повышенным уровнем метаболизма, по сравнению с постоянным нахождением в темноте. Высокий уровень метаболизма сопровождается образованием побочных продуктов — активных форм кислорода, которые ускоряют старение, вызывая, в том числе, повреждение молекулы ДНК (Le Bourg, 2001). Действительно, у мутантов по ключевым генам, регулирующим циркадианные ритмы у дрозофил и млекопитающих, наблюдается повышенный уровень оксидативных повреждений, а продолжительность жизни снижается (Hardeland et al., 2003). В этой связи интересно сравнить эффекты влияния различных режимов освещения у линий с низкой способностью детоксицировать свободные радикалы. Из трех исследованных нами линий наибольшие различия по продолжительности жизни в условиях темноты и круглосуточного освещения характеризуют линию *Sod*, имеющую нарушение активности супероксиддисмутазы (рис. 1–2). Таким образом, снижение продолжительности жизни в условиях постоянного освеще-

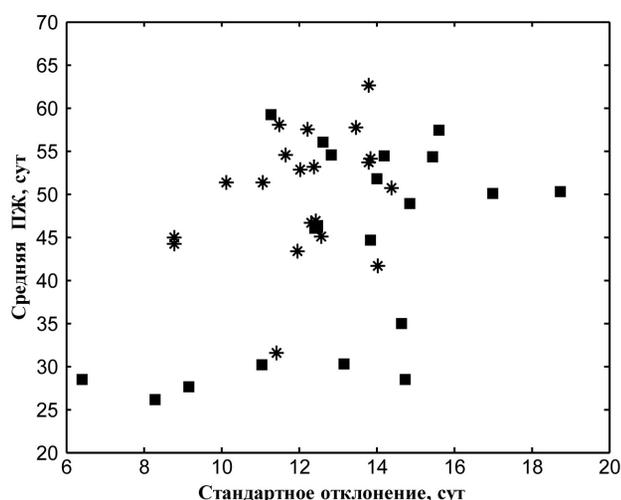


Рис. 5. Соотношение между средней ПЖ (сут) и стандартным отклонением ПЖ у самцов и самок.
Обозначения: * — самки, ■ — самцы

ния напрямую связано с образованием дополнительного количества активных форм кислорода.

Мелатонин обладает выраженным антиоксидантным действием. Так, например, он увеличивает продолжительность жизни *D. melanogaster*, подавляя действие индуктора свободных радикалов — параквата (Bonilla et al., 2006). Мелатонин не только служит перехватчиком гидроксильных радикалов, но и снижает их выработку, влияя на метаболизм и подавляя Ca²⁺- и NO-зависимые стресс-реакции в клетке (Hardeland, 2005). Однако данные о влиянии мелатонина на продолжительность жизни *D. melanogaster*, полученные ранее другими авторами, являются противоречивыми: в ряде работ не удалось наблюдать однозначного геропротекторного действия мелатонина (Anisimov et al., 1997; Izmaylov et al., 1999), тогда как в других работах он присутствует (Bonilla et al., 2002). В некоторых экспериментах на мышах также не было обнаружено мелатонин-зависимого продления жизни (Anisimov et al., 2003). Вполне вероятно, что столь противоречивый эффект мог быть обусловлен методическими различиями экспериментов (Anisimov, 2003). Там, где геропротекторный эффект отсутствовал, мелатонин добавляли в корм дрозофилам на стадиях развития. Геропротекторный же эффект выявляли при кормлении мелатонином только взрослых мух (имаго).

В нашем эксперименте (рис. 1–2) мелатонин добавляли только на стадии имаго, что привело к увеличению различных характеристик продолжительности жизни у всех исследованных линий как в условиях круглосуточного затемнения, так и при постоянном освещении. Наибольший геропротекторный эффект мелатонина обнаружен у мутантных линий (*Sod* и *mus210*). Мухи линии *Sod* обладают низкой способностью противостоять оксидативному стрессу. Они неспособны в полной мере детоксифицировать свободные радикалы, поскольку

активность фермента Cu/Zn Sod у них составляет только 36,7 % от нормальной (Phillips et al., 1995). Добавление антиоксиданта мелатонина способствовало, по-видимому, более эффективному (на фоне нарушения собственной системы детоксификации) удалению свободных радикалов, и тем самым, увеличению продолжительности жизни.

Как известно, нуклеотиды ДНК могут повреждаться, в том числе, под действием окислительного стресса. Поэтому мухи мутантной линии *mus210*, характеризующиеся пониженной активностью эксцизионной репарации нуклеотидов, накапливают с возрастом окисленные основания ДНК и особи быстрее стареют. Действительно, их максимальная ПЖ по сравнению с линией дикого типа (в условиях затемнения) в данном эксперименте у самцов и самок ниже на 44,3 % и 18,8 %, соответственно. Однако в присутствии мелатонина (в таких же условиях круглосуточного затемнения) разрыв в максимальной ПЖ сокращается и составляет 32,1 % и 10,7 % у самцов и самок, соответственно.

Мы предположили, что добавление в корм дрозофил мелатонина приведет к уменьшению различий продолжительности жизни на свету и в темноте, прежде всего, у линий дрозофил с нарушенной активностью супероксиддисмутазы и фермента эксцизионной репарации ДНК. Однако у всех исследованных линий значения средней и максимальной ПЖ в темноте без мелатонина имели существенное отличие (в пределах 8–13 % и, зачастую, разнонаправленное) от значений ПЖ, наблюдаемых в присутствии мелатонина при круглосуточном освещении (табл. 1–2). По-видимому, мелатонин и освещение обуславливают продолжительность жизни дрозофил независимым друг от друга образом.

В этой связи хотелось бы отметить разнонаправленное действие мелатонина на самцов линии *mus210*. При круглосуточном освещении и, следовательно, в условиях повышенного образования активных форм кислорода, в субпопуляции мух с продолжительностью жизни меньше средней, мелатонин показал себя как эффективный геропротектор, в то время как у долгоживущей части популяции мелатонин несколько сократил продолжительность жизни. Такое неоднозначное действие антиоксидантов описано в литературе (Ogg et al., 2003).

Известно, что при нормальных физиологических условиях продолжительность жизни варьирует (De Haan et al., 1998; Izmaylov et al., 2003; Schelettwein-Gsell, 1970). Тем не менее, между параметрами функции Гомпертца существует выраженная корреляционная зависимость (Измайлов и др., 1999). Известно, что наличие связи между параметрами функции Гомпертца эквивалентно наличию точки пересечения кривых интенсивности смертности (Hirsch, 1995). Причем абсцисса этой точки равна регрессионному параметру β, то есть значению этого параметра можно приписать смысл «ха-

ракторной продолжительности жизни» данной популяции. На рис. 3 приведена корреляция Стрелера-Милдвана для самцов исследуемых линий. Каждая точка на этой параметрической плоскости отражает конкретную кривую выживаемости. Видно, что значения параметров функции Гомпертца аппроксимируются регрессионной прямой. Эта зависимость обычно наблюдается при «нормальных» физиологических условиях. Параметры функции Гомпертца мух линии *mus210* наиболее сильно отклоняются от регрессионной прямой, однако они неплохо ложатся на некую другую линию, угол наклона которой будет значительно меньше (рис. 3), что может говорить о значительных отклонениях от «физиологической» нормы у мух данной линии по сравнению с линией дикого типа. Данное явление можно объяснить, исходя из предположения о решающей роли в старении повреждений оснований ДНК, восстановление которых у данной линии нарушено. Величина угла наклона регрессионной прямой определяется параметром. Уменьшение угла наклона зависимости у самцов линии *mus210* также говорит о снижении «характерного времени жизни» данной популяции. Продолжительность жизни когорт *mus210* в эксперименте оказалась ниже, чем продолжительность жизни когорт дикого типа. Корреляция Стрелера-Милдвана была впервые описана как следствие модели старения, в которой вводилось понятие жизнеспособности (vitality), определяющей способность организма противостоять неблагоприятным внешним воздействиям и линейно снижающейся с возрастом (Strehle et al., 1960). Скорость её снижения определяется величиной $\frac{1}{\beta}$. Таким образом, уменьшение значения параметра β у линии *mus210* говорит об увеличении скорости потери жизнеспособности у мух, то есть об увеличении скорости их старения. Данный вывод согласуется с известными биологическими особенностями этой линии — нарушение эксцизионной репарации ДНК приводит к накоплению ошибок и к преждевременному старению. Однако следует отметить, что в популяции самок линии *mus-210* подобного явления не наблюдалось. Параметры функции Гомпертца близки к регрессионной прямой (рис. 4). Это, возможно, говорит о половом диморфизме по продолжительности жизни у мух данной линии. Параметры функции Гомпертца мух линии дикого типа *Canton-S* также близки к регрессионной прямой. Наибольшие отклонения наблюдались у мух линии *Sod* (точки № 9, 10 и 15). Данные три когорты содержались в режиме круглосуточного освещения, что явилось, по-видимому, для них очень сильным стрессовым воздействием. В то же время, при данном режиме освещения мелатонин не увеличил продолжительность жизни мух линии *Sod*. Возможно, это свидетельствует о том, что механизмы действия мелатонина и освещения, обуславливающие продолжительность жизни дрозофил, независимы друг от друга.

Согласно полученным данным, можно говорить о тенденции модифицирующего влияния пола мух на эффект воздействия мелатонина на продолжительность жизни мух. Ранее в работе Д. М. Измайлова и Л. К. Обуховой (1999) при изучении влияния мелатонина на ПЖ мух линии *Canton-S* наблюдался половой диморфизм по этому показателю. В их работе в серии из 5 экспериментов у самок наблюдалось достоверное увеличение ПЖ во всех экспериментах, в то время как у самцов эффект был разнонаправленным: мелатонин увеличивал, уменьшал, либо вовсе не действовал на ПЖ мух. В работе В. Н. Анисимова и коллег (Анисимов и др., 1997) на *D. melanogaster* линии ВЭС мелатонин не оказывал статистически значимого воздействия, но кривые выживаемости обработанных мелатонином самцов и самок отличались от контроля в разновекторных направлениях. Вероятно, световой режим через изменение температуры тела, физической активности, уровня потребления O_2 влияет на уровень метаболизма. В то же время, механизмы регуляции метаболизма у разных полов различаются, что может обуславливать наблюдаемую тенденцию полового диморфизма реакции на мелатонин при разных режимах освещения.

Таким образом, содержание имаго дрозофил в условиях круглосуточного освещения приводит к снижению средней ПЖ и/или максимальной ПЖ по сравнению с содержанием в условиях круглосуточного затемнения. Мелатонин оказывает геропротекторное действие, прежде всего, в условиях темноты. Наиболее значимые отличия отмечены у линии с мутацией фермента детоксикации свободных радикалов *Sod*. Данные эффекты отмечены у особей обоих полов. Анализ полученных результатов показал, что механизмы, обуславливающие влияние на продолжительность жизни освещения и мелатонина различаются.

Литература

1. Анисимов В. Н., Мыльников С. В., Опарина Т. И., Хавинсон В. Х., 1997. Влияние мелатонина и эпителиомина на продолжительность жизни и перекисное окисление липидов у *Drosophila melanogaster* // Доклады АН. Т. 352. №5. С. 704–707.
2. Анисимов В. Н., 2003. Молекулярные и физиологические механизмы старения. — СПб.: Наука, 468 с.
3. Измайлов Д. М., Обухова Л. К., 1999. Мелатонин, как геропротектор: эксперименты с *Drosophila melanogaster* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Т. 27. №2. С. 205–207.
4. Кременцова А. В., 2004. Сходство и различие в закономерности смертности людей и животных // Успехи геронтологии. Т. 15. С. 7–13.
5. Москалев А. А., Шосталь О. А., Зайнуллин В. Г., 2006. Генетические аспекты влияния различных режимов освещения на продолжительность жизни дрозофилы // Успехи геронтологии. Т. 18. С. 55–58.

6. Anisimov V. N., 2003. Effects of exogenous melatonin — a review // *Toxicol. Pathol.* Vol. 31. N 6. P. 589–603.
7. 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. N 2. P. 81–91.
8. Anisimov V. N., Alimova I. N., Baturin D. A. et al., 2003. Dose-dependent effect of melatonin on life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice // *Exp. Gerontol.* Vol. 38. N 4. P. 449–461.
9. Anisimov V. N., Baturin D. A., Popovich I. G., Zabezhinski M. A., Manton K. G., Semenchenko A. V., Yashin A. I., 2004. Effect of exposure to light-at-night on life span and spontaneous carcinogenesis in female CBA mice // *Int. J. Cancer.* Vol. 111. P. 475–479.
10. Anisimov V. N., Popovich I. G., Zabezhinski M. A. et al., 2006. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen // *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1757. N 5–6. P. 573–589.
11. Armstrong S. M., Redman J. R., 1991. Melatonin: a chronobiotic with anti-aging properties? // *Hypotheses.* Vol. 34. P. 300–309.
12. Bonilla E., Medina-Leendertz S., Diaz S., 2002. Extension of life span and stress resistance of *Drosophila melanogaster* by long-term supplementation with melatonin // *Experimental Gerontology.* Vol. 37. P. 629–638.
13. Bonilla E., Medina-Leendertz S., Villalobos V. et al., 2006. Paraquat-induced oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: effects of melatonin, glutathione, serotonin, minocycline, lipoic acid and ascorbic acid // *Neurochem Res.* Vol. 31. N 12. P. 1425–1432.
14. Coto-Montes A., Hardeland R., 1999. Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: antagonization of damage induced by the inhibition of catalase. // *J. Pineal Res.* Vol. 27. N 3. P. 154–158.
15. De Haan G., Gelman R., Watson A. et al., 1998. A Putative Gene Causes Variability in Lifespan Among Genotypically Identical Mice // *Nature Genetics.* Vol. 19. P. 114–116.
16. Gompertz B., 1825. On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new mode determining life contingencies // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Ser A.* V. 115. P. 513–585.
17. Hardeland R., 2005. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance // *Endocrine.* Vol. 27. P. 119–130.
18. Hardeland R., Coto-Montes A., Poeggeler B., 2003. Circadian rhythms, oxidative stress and antioxidative defense mechanisms // *Chronobiol. Int.* Vol. 20. P. 921–962.
19. Hirsch H. R., 1995. Do intersections of mortality-rate and survival functions have significance? // *Experimental Gerontology.* Vol. 30. N 2. P. 147–167.
20. Izmaylov D. M., Obukhova L. K., 1999. Geroprotector effectiveness of melatonin: investigation of lifespan of *Drosophila melanogaster*. // *Mechanisms of Ageing and Development.* Vol. 106. P. 233–240.
21. Izmaylov D. M., Obukhova L. K., 2003. Life span variations in 128 successive generations of *D. melanogaster*. I. Evidence that the phenomenon exists and analysis of the variations mode. // *Mech Ageing Dev.* Vol. 124. N 5. P. 589–97.
22. Le Bourg E., 2001. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster* // *FEBS Letters.* Vol. 498. P. 183–186.
23. Majercak J. M., 2002. The effects of light and temperature on the *Drosophila* circadian clock // *Dissertation Abstracts International.* Vol. 62. N 1. P. 98.
24. Massie H. R., Whitney S. J., 1991. Preliminary evidence for photochemical ageing in *Drosophila* // *Mech. Ageing Dev.* Vol. 58. N 1. P. 37–48.
25. Massie H. R., Aiello V. R., Williams T. R., 1993. Influence of photosensitizers and light on the life span of *Drosophila* // *Mech. Ageing Dev.* Vol. 68. N 1–3. P. 175–182.
26. Oakninbendahan S., Anis Y., Nir I., Zisapel N., 1995. Effects of long-term administration of melatonin and a putative antagonist on the aging rat. // *Neuroreport.* Vol. 6. P. 785–788.
27. Orr W. C., Sohal R. S., 2003. Does overexpression of Cu, Zn-SOD extend life span in *Drosophila melanogaster*? // *Experimental gerontology.* Vol. 38. P. 227–230.
28. Pappolla M. A., Sos M., Omar R. A. et al., 1997. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide // *J. Neurosci.* Vol. 17. N 5. P. 1683–1690.
29. Phillips J. P., Tainer J. A., Getzoff E. D. et al., 1995. Subunit-destabilizing mutations in *Drosophila* copper / zinc superoxide dismutase: Neuropathology and a model of dimer dysequilibrium // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 92. P. 8574–8578.
30. Pieri C., Moroni F., Marra M. et al., 1995. Melatonin is an efficient antioxidant. // *Arch. Gerontol. Geriatr.* Vol. 20. P. 159–165.
31. Pierpaoli W., Regelson W., 1994. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting in aging mice // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 91. P. 787–791.
32. Provinciali M., Di Stefano G., Bulian D. et al., 1996. Effect of melatonin and pineal grafting on thymocyte apoptosis in aging mice // *Mech. Ageing Dev.* Vol. 90. N 1. P. 1–19.
33. Sainz R. M., Mayo J. C., Uria H. et al., 1995. The pineal neurohormone melatonin prevents *in vivo* and *in vitro*

- apoptosis in thymocytes // J. Pineal. Res. Vol. 19. N 4. P. 178–188.
34. Schelettwein-Gsell D., 1970. Survival curves of an old age rat colony // Gerontologia. Vol. 16. P. 111–115
35. Sekelsky J. J., Hollis K. J., Eimerl A. I. et al., 2000. Nucleotide excision repair endonuclease genes in *Drosophila melanogaster* // Mutat. Res. Vol. 459. N 3. P. 219–228.
36. Sheeba V., Sharma V. K., Shubha K. et al., 2000 The effect of different light regimes on adult life span in *Drosophila melanogaster* is partly mediated through reproductive output // J. Biol. Rhythms. Vol. 15. N5. P. 380–392.
37. Sheeba V., Chandrashekar M. K., Joshi A., Sharma V. K., 2002. Developmental plasticity of the locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster* // J. Insect Physiol. Vol. 48. N1. P. 25–32.
38. Strehler B. L., Mildvan A. S., 1960. General theory of mortality aging // Science. Vol. 132. P. 14–21.
39. Yi C., Pan X., Yan H., Guo M., Pierpaoli W., 2005. Effects of melatonin in age-related macular degeneration // Ann N-Y Acad Sci. Vol. 1057. P. 384–392.
- Melatonin influence on *Drosophila melanogaster* life span at different light regimes**
- A. A. Moskalev, A. V. Kremontsova, O. A. Malysheva
- ✿ **SUMMARY:** It was investigated the combined effects of different light regimes (round-the-clock lighting or darkening) and antioxidant melatonin on *Drosophila melanogaster* life span of wild type strain *Canton-S*, mutant strain with defect of red-ox system (*Sod*) and mutant strain with disturbance of excision DNA repair (*mus210*). It was revealed, that maintenance of *Drosophila* imago at round-the-clock lighting leads to decrease of mean and/or maximum life span with compare to being at darkening. Adding of melatonin to *Drosophila* meal induces the geroprotector effects, mainly, in dark conditions. The effects mentioned above were most expressed in strain with mutation of *Sod*. All effects have revealed in both sexes. The data analysis has shown that mechanisms of different light regimes and melatonin influence on life span are rather different.
- ✿ **KEY WORDS:** life span; *Drosophila melanogaster*; light regime; melatonin

Информация об авторах:

Москалев Алексей Александрович, в. н. с., Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая д. 28. E-mail: amoskalev@list.ru.

Кременцова Анна Владимировна, научный сотрудник, Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, 119334, Москва ул. Косыгина, д.4

Малышева Ольга Андреевна, аспирант, Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая д. 28. E-mail: amoskalev@list.ru.