

БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

В.Х.Хавинсон, С.В.Мыльников*, Т.И.Опарина**, А.В.Арутюнян**

*Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН; *Кафедра генетики и селекции (зав. — чл.-кор. РАН С.Г.Инге-Вечтомов) Санкт-Петербургского государственного университета; **Институт акушерства и гинекологии им Д.О.Отта РАМН, Санкт-Петербург*

Изучали влияние эпителона (Ala-Glu-Asp-Gly) и вилона (Lys-Glu) на свободнорадикальные процессы в высокоинбридной линии НА⁺ *Drosophila melanogaster*. Установлено, что вилон снижает генерацию активных форм кислорода в митохондриях и увеличивает в цитозоле. Выявлены половые и возрастные различия в генерации активных форм кислорода и антирадикальной активности цитозоля.

Ключевые слова: активные формы кислорода, митохондрии, пептиды

Важнейшей задачей геронтологии является поиск эффективных геропротекторов. Одно из направлений такого поиска базируется на свободнорадикальной теории Хармана [10], из которой следует, что вещества-геропротекторы следует искать среди природных или синтетических антиоксидантов. В наших предыдущих работах изучены антиоксидантные и геропротекторные эффекты пептидных препаратов, синтезированных в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии. Установлено, что введение в питательную среду эпителона (Ala-Glu-Asp-Gly) повышает активность ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ) у *Drosophila melanogaster* [5]. Возможной причиной такого эффекта может быть увеличение генерации активных форм кислорода (АФК) в митохондриях. В этом случае активация ферментов АОЗ является компенсаторной индуцируемой реакцией. В настоящей работе представлены результаты сравнительного изучения влияния эпителона, а также дипептида вилона (Lys-Glu) на генерацию АФК в митохондриях и цитозоле, а также на общую антирадикальную активность (АРАД) цитозоля *D. melanogaster*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использована высокоинбридная линия НА⁺ *D. melanogaster*, отселектированная на высокую половую активность самцов [3]. К началу эксперимента линия насчитывала несколько сотен поколений инбридинга и отбора.

Эпителон и вилон, растворенные в физиологическом растворе, добавляли в питательную среду в количестве 0.00001% от массы среды, воздействуя на личинок 2-3-го возраста. Таким образом, длительность воздействия не превышала 2 сут. В контрольных группах в среду добавляли физиологический раствор. Имаго содержали на среде следующего состава: 100 г живых дрожжей, 10 г агар-агара, 30 г сахара, 30 г изюма и 30 г манной крупы на 1 л воды. Среду заменяли через день. Для выделения субклеточных фракций 50 мг мух в возрасте 10 (молодые) и 25 сут (зрелые) гомогенизировали в 0.25 М сахарозе, приготовленной на 10 мМ трис-HCl pH 7.4. Митохондриальную фракцию выделяли по общепринятой методике [14]. Гомогенат центрифугировали 3 мин при 500g для осаждения ядерной фракции, после чего осаждали митохондрии центрифугированием в течение 10 мин при 7000g. Полученный после второго центрифугирования супернатант, содержащий микросомы и растворимую часть

клеток, обозначали как “цитозоль”. Препараты субклеточных фракций подвергали процедуре замораживания—оттаивания для высвобождения митохондриального матрикса. Полученные митохондрии суспензировали в 0.5 мл К⁺-фосфатного буфера pH 7.45, содержащего 60 мМ КН₂РО₄ и 105 мМ KCl (концентрация белка 0.6-1 мг/мл). Критерием чистоты выделения митохондриальной фракции служила активность СДГ, которая в наших экспериментах превышала таковую в цитозоле в 200-500 раз.

Генерацию АФК в митохондриальной фракции определяли методом измерения перекисной люминолзависимой хемилюминесценции, который широко используется для исследования генерации АФК и других свободных радикалов [2, 9]. Хемилюминесценцию регистрировали на хемилюминометре “Emilite-1105” при 37°C в течение 2 мин в среде, содержащей 0.7 мл К-фосфатного буфера pH 7.45, 0.05 мл 0.1 М раствора люминола и 0.05 мл митохондриальной фракции, разведенной в соотношении 1:4. Реакцию инициировали введением в реакционную смесь 0.2 мл 2% раствора Н₂O₂ ($E_{230}=3.50$). АРАД цитозоля определяли с использованием стабильного радикала дифенилпикрилгидразила (ДФПГ). Раствор ДФПГ в этаноле ($E_{517}=0.70-0.75$) добавляли к 1.5 мл безбелкового экстракта цитозольной фракции, полученного после осаждения белков цитозоля фосфорно-вольфрамовой кислотой. После 10-минутной инкубации ДФПГ экстрагировали 4 мл толуола. Измерения вели на спектрофотометре “Beckman DU-65” при длине волн 517 нм [1].

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

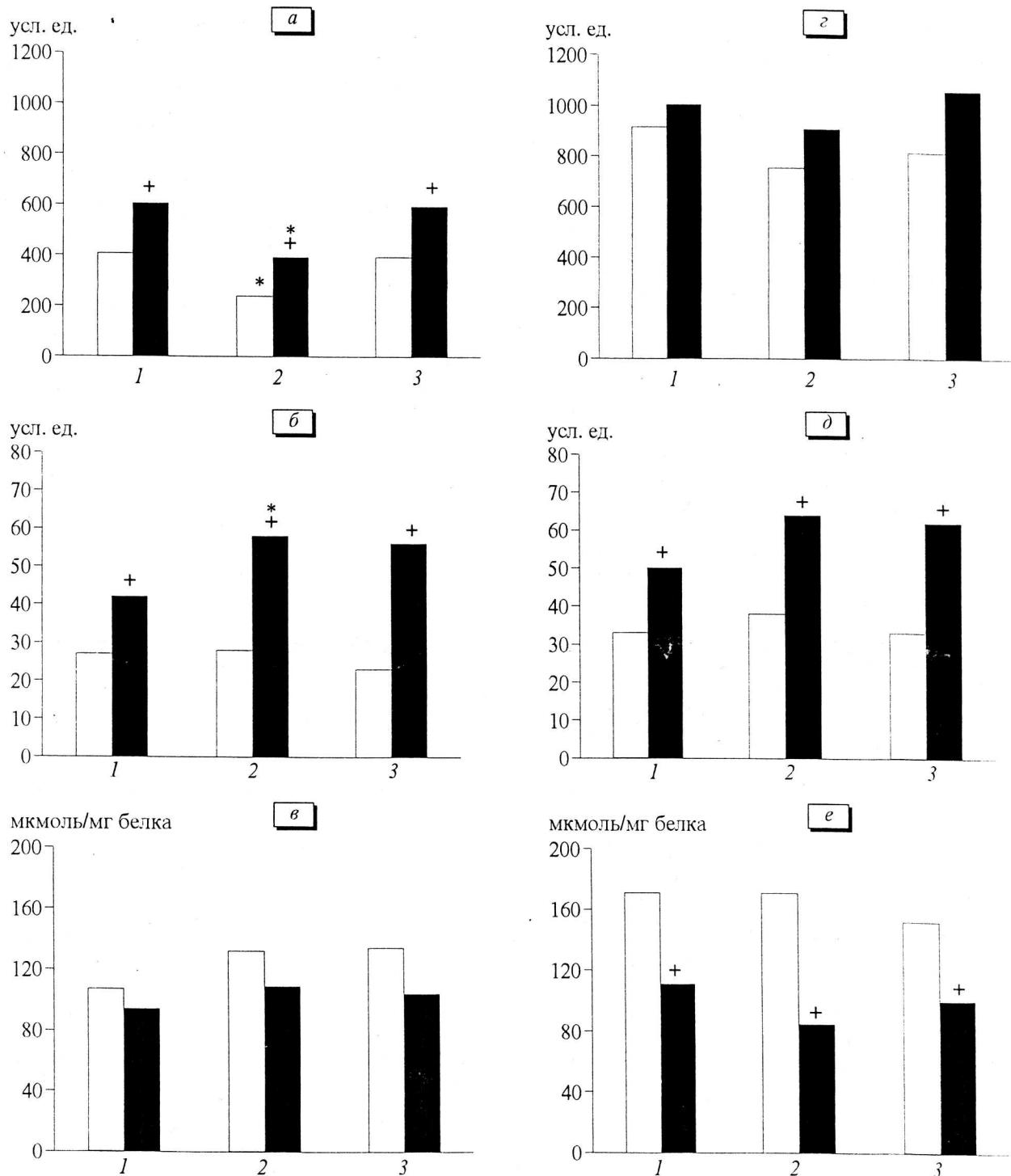
Обнаружена четкая возрастная динамика изучаемых признаков (рисунок). Так, у самок линии НА⁺ с возрастом генерация АФК в митохондриях увеличивается, у самцов же не выявлено достоверных различий между 10- и 25-дневными особями по изучаемому признаку. Однако генерация АФК в цитозоле 25-дневных самцов и самок достоверно выше, чем у 10-дневных особей. АРАД цитозоля у самок изученных возрастов не изменяется. В то же время АРАД цитозоля самцов с возрастом достоверно снижается. Эти результаты согласуются с нашими данными о том, что средняя продолжительность жизни самцов этой ли-

нии составляет 22 дня, а самок — 30 дней (т.е. возраст самок к моменту измерения был меньше средней продолжительности жизни, а возраст самцов превысил ее, и у них, очевидно, уже началось возрастное снижение активности системы АОЗ).

Следует отметить, что уровень генерации АФК в митохондриях самцов во всех вариантах опытов был в среднем в 2 раза выше, чем у самок. Ранее нами установлено, что активность каталазы у самцов данной линии в 1.3 раза выше такой у самок [5]. Такие межполовые различия в активности каталазы, вероятно, можно объяснить компенсаторным ответом фермента на увеличение генерации АФК у самцов. Нельзя также исключить, что наблюдавшие нами межполовые различия в уровне генерации АФК могут быть обусловлены неодинаковым уровнем активности ферментов электронно-транспортной цепи митохондрий. В литературе имеются данные о том, что в тканях млекопитающих имеется четко выраженный половой диморфизм в активности цитохрома с оксидазы, обусловленный влиянием половых гормонов на экспрессию генов компонентов электронно-транспортной цепи [13]. Можно предположить наличие подобного механизма и у *D. melanogaster*.

Анализ влияния пептидов на изученные признаки показал, что достоверное снижение генерации АФК в митохондриях достигается только у самок при воздействии вилона. При этом уровень генерации АФК снижается как у молодых, так и у зрелых особей по сравнению с контролем. В то же время образование АФК в цитозоле при воздействии вилона у молодых самок не изменилось, а у зрелых — увеличилось по сравнению с контролем. Таким образом, эффект вилона выражается в снижении содержания АФК в митохондриях молодых самок в 1.7 раза, у зрелых — в 1.5 раза, а содержание АФК в цитозоле зрелых самок увеличивается в 1.4 раза.

При выяснении механизмов действия вилона на митохондрии дрозофил необходимо учитывать следующее. Как известно, причиной генерации АФК в митохондриях являются сбои в работе дыхательной цепи [4]. Воздействию подвергали личинок 2-го возраста. При наступлении стадии куколки личинка проходит метаморфоз, в ходе которого происходит практически полный лизис тканей, а органы имаго формируются из небольших по размеру имагинальных дисков. Изучаемые параметры изменились у взрослых мух, а промежуток между воздействием пептида и временем регистрации изучаемых эффектов составил 15-30 сут. Более того, нами установлено, что аналогичный эффект (снижение содержания



Содержание активных форм кислорода в митохондриях (а, г) и цитозоле (б, д) и антирадикальная активность (в, е) в субклеточных фракциях *Drosophila melanogaster* линии НА⁺.

а-в — самки, г-е — самцы. Светлые столбики — молодые особи, темные — зрелые особи.

1 — контроль, 2 — вилон, 3 — эпителон.

$p < 0.05$: *по сравнению с контролем, +по сравнению с молодыми особями.

продуктов ПОЛ) может сохраняться как минимум 45 сут после воздействия пептида [6]. Известно также, что применение веществ-геропротекторов у дрозофилы эффективно лишь на стадии личи-

нок, а воздействие на имаго эффекта не дает [8,11,12,15], однако причина этого не ясна.

По нашему мнению, такие эффекты можно объяснить только генетическими или эпигенети-

ческими механизмами, которые могут реализоваться на любом уровне регуляции — от транскрипционного до посттрансляционного. Происходящее в результате уменьшение генерации АФК может снижать скорость старения.

Перспективной представляется гипотеза о вызываемой вилоном длительной модификации характера экспрессии генов, кодирующих белки митохондриальных мембран. Отсутствие влияния эпителона на изучаемые признаки говорит о том, что выявленный нами ранее [7] геропротекторный эффект этого препарата обусловлен иными, чем у вилона, механизмами.

Конкретный механизм влияния вилона на митохондриальную мембрану (прямой или опосредованный) предстоит выявить в дальнейших исследованиях. Однако весьма вероятно, что данный препарат окажется эффективным при лечении различных патологий, связанных с нарушением транспорта электронов в митохондриях (болезни Паркинсона, хорея Гентингтона и др.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации. СПб., 2000.
2. Гуляева Н.В., Степаничев М.Ю., Лазарева И.А., Онуфриев М.В. // Нейрохимия. 1995. Т. 12, Вып. 1. С. 37-41.
3. Кайданов Л.З., Мыльников С.В., Иовлева О.В. и др. // Генетика. 1994. Т. 30, № 8. С. 1085-1096.
4. Кольтовер В.К. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 256, № 1. С. 199-202.
5. Хавинсон В.Х., Мыльников С.В. // Бюл. экспер. биол. 2000. Т. 129, № 4. С. 420-422.
6. Хавинсон В.Х., Мыльников С.В. // Там же. Т. 130, № 11. С. 585-588.
7. Хавинсон В.Х., Мыльников С.В. // Докл. РАН. 2000. Т. 373, № 5. С. 707-709.
8. Anisimov V.N., Mylnikov S.V., Oparina T.I., Khavinson V.Kh. // Mech. Ageing Dev. 1997. Vol. 97. P. 81-91.
9. Betts W.H. // Handbook of methods for oxygen radical research / Ed. R.A.Greenwald. Boca Raton, 1985. P. 197-201.
10. Harman D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. Vol. 78. P. 7124-7128.
11. Izmaylov D.M., Obukhova L.K. // Mech. Ageing Dev. 1996. Vol. 91. P. 155-164.
12. Izmaylov D.M., Obukhova L.K. // Ibid. 1999. Vol. 106. P. 233-240.
13. Migdadi F., Gollant S., Brownie A.C. // Endocrinol. Res. 1995. Vol. 21. P. 109-114.
14. Mockett R.J., Orr W.C., Rahmandar J.J. // Arch. Biochem. Biophys. 1999. Vol. 371, N 2. P. 260-269.
15. Obukhova L.K., Nakaidze N.Sh., Serebryany A.M. et al. // Exp. Gerontol. 1979. Vol. 14. P. 335-342.

Получено 31.01.01