

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КИНЕТИНА НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Д.В. Яковлева, Н.В. Земская, М.В. Шапошников, А.А. Москалев

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар
E-mail: dashka-konst@yandex.ru

Аннотация. В статье представлены результаты исследования эффектов 10 производных кинетина в трех разных концентрациях (1, 10 и 100 мкмоль/л) на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*. Установлено, что геропротекторные эффекты кинетина зависят от пола особи. У самцов наблюдали снижение, у самок – увеличение продолжительности жизни.

Ключевые слова: кинетин, продолжительность жизни, *Drosophila melanogaster*

Введение

Выявление соединений, увеличивающих стрессоустойчивость и продолжительность жизни (ПЖ) модельных организмов, является одной из актуальных проблем биogerонтологии (Moskalev, 2017). На сегодняшний день известно более 200 веществ с адаптогенной и геропротекторной активностью, среди которых имеются как синтетические, так и природные соединения (Geroprotectors.org: a new ..., 2015; The DrugAge ..., 2017).

Цитокинины – гормоны растений пуринового ряда, которые участвуют в регуляции процессов роста, развития и старения (Natural plant ..., 2018). Кроме того, установлено, что цитокинины оказывают защитное и геропротекторное действие на клетки и ткани животных (Plant Hormone ..., 2017). На фибробластах человека показано, что основной представитель цитокининов – кинетин – способен замедлять клеточное старение (Rattan, 1994). У нематоды *Caenorhabditis elegans* кинетин повышал устойчивость к окислительному стрессу, гипертермии и вызывал увеличение ПЖ (Natural plant ..., 2018). Однако на сегодняшний день недостаточно хорошо изучены эффекты и механизмы воздействия цитокининов на организм человека или животных. Исследования на хорошо изученном модельном объекте *Drosophila melanogaster* могут способствовать выяснению меха-

низмов действия цитокининов на продолжительность жизни и стрессоустойчивость организмов. Целью настоящего исследования было изучение влияния различных производных кинетина в концентрациях 1, 10 и 100 мкмоль/л на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*.

Материалы и методы

Экспериментальную работу проводили на лабораторной линии *Drosophila melanogaster* дикого типа *Canton-S* (Блумингтон, США). Мух содержали при постоянных условиях в климатической камере Binder, KBF720-ICH (Binder, Германия) с температурой 25 °С, 12-часовым циклом освещения и 60%-ной влажностью на стандартной питательной среде (1000 мл воды, 7 г агара, 8 г дрожжей, 30 г сахара, 30 г манной крупы, 3 мл пропионовой кислоты). Обработку веществами проводили на протяжении всей жизни имаго. В эксперименте использовали 10 производных кинетина (табл. 1). Все производные кинетина любезно предоставлены лабораторией дизайнера и синтеза биологически активных соединений (зав. лаб. С.Н. Михайлов) Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Поверхность питательной среды смазывали дрожжевой пастой с добавлением растворенных в диметилсульфоксиде (ДМСО, PanReac AppliChem, США) веществ. Контрольных животных содержали на дрожжевой пасте с добавлением ДМСО. Питательную среду меняли на свежую два раза в неделю.

Оценивали влияние кинетина на медианную и максимальную ПЖ (возраст смертности 90 % выборки), а также время удвоения интенсивности смертности (MRDT). Статистическую значимость различий по медианной и максимальной ПЖ оценивали с помощью логрангового критерия (Mantel, 1966) и метода Ванг-Аллисона (Statistical methods ..., 2004) соответственно. Анализ данных выполняли с помощью статистической среды R, версия 2.15.1 (The R Foundation) и онлайн-приложения OASIS 2 (2016).

Таблица 1

Производные кинетина, использованные в эксперименте

Номер производного	Химическая формула	Название (рациональная номенклатура)
№ 256	C ₁₀ H ₆ ClN ₅ O	6-фурфурил-2-хлор-аминопурин
№ 202	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₅	6-фурфурил-9-рибоза-аминопурин
№ 216	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	6-бензиламинопурин
№ 200	C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₄	6-бензил-9-рибоза-аминопурин
№ 330	C ₁₆ H ₁₇ N ₅ O ₄	6-фенил-9-рибоза-аминопурин
№ 379	C ₁₁ H ₉ N ₅	6-фенил-аминопурин
№ 220	C ₉ H ₇ N ₅	6-пропин-аминопурин
№ 206	C ₁₃ H ₁₅ N ₅ O ₄	6-пропин-9-рибоза-аминопурин
№ 222	C ₁₃ H ₁₃ N ₅	6-бензил-9-метил-аминопурин
№ 228	C ₁₅ H ₁₇ N ₅	6-бензил-9-изопропил-аминопурин

Результаты и обсуждение

Для выявления соединений с наиболее выраженными геропротекторными свойствами было исследовано влияние 10 различных производных кинетина в трех разных концентрациях (1, 10 и 100 мкмоль/л) на ПЖ самцов и самок *Drosophila melanogaster*. Результаты экспериментов представлены в табл. 2 и на рисунке. У самцов наблюдали преимущественно статистически значимые отрицательные эффекты на медианную (снижение до 31.1 %) и максимальную (снижение до 27.9 %) ПЖ. Только одно производное кинетина, № 330, в концентрации 1 мкмоль/л привело к достоверному увеличению как медианной (на 3.3 %), так и максимальной (на 8.8 %) ПЖ. У самок в большинстве вариантов опыта выявлены статистически значимые положительные эффекты на медианную (увеличение до 26.2 %) и мак-

симальную (увеличение до 10.8 %) ПЖ. Наибольший положительный эффект на медианную ПЖ самок дрозофил обнаружен при воздействии производного № 216 в концентрации 1 мкмоль/л (26.2 %) и производного № 202 в концентрации 100 мкмоль/л (21.3 %). У самок также наблюдали снижение MRDT, что свидетельствовало о положительном действии кинетина на показатели здоровья популяции и недостаточно выраженном эффекте на процессы старения.

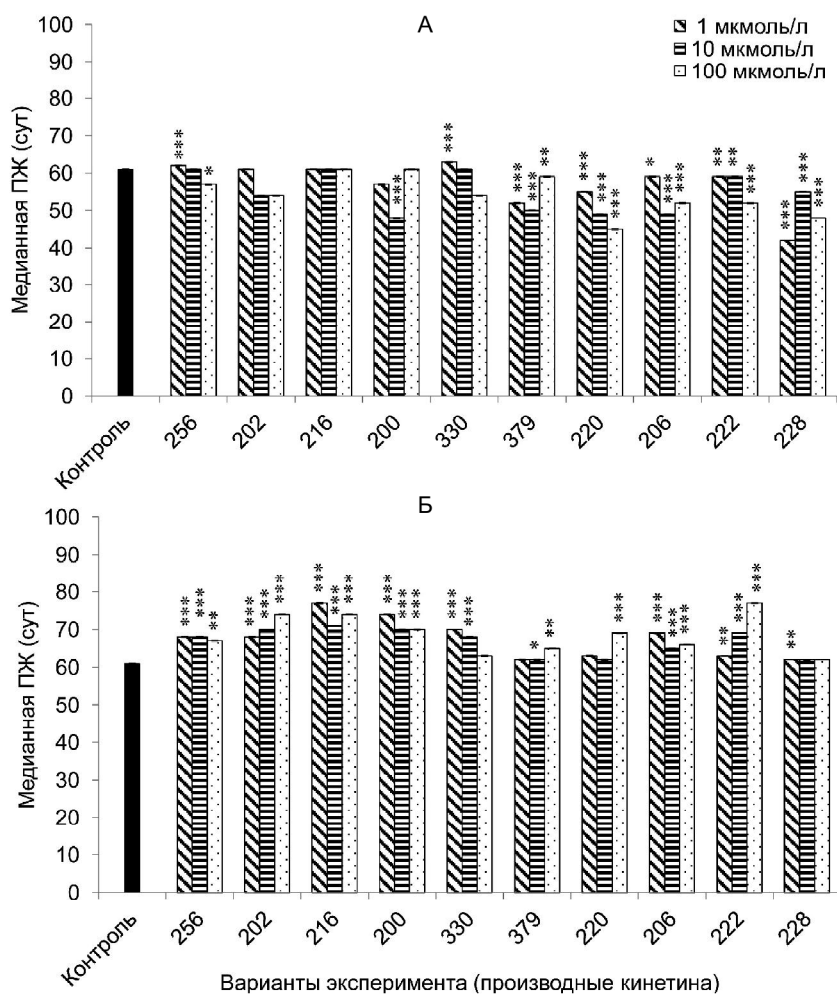
Полученные данные свидетельствуют о разнонаправленном эффекте влияния производных кинетина на самцов и самок дрозофил. Половые различия геропротекторных эффектов фармакологических вмешательств широко известны у различных модельных организмов, *Drosophila melanogaster* не является исключением (Austad, 2015; Tower, 2017). Механизмы полоспецифических эф-

Таблица 2

Влияние производных кинетина на показатели продолжительности жизни

Вариант	С(µМ)	Самцы				Самки			
		М (сут)	90% (сут)	MRDT (сут)	n	М (сут)	90% (сут)	MRDT (сут)	n
Контроль		61	68	6.5	138	61	74	6.6	122
256	1	62**	74	7.5	142	68***	81*	6.4	132
	10	61	68	5.9	141	68***	78	5.5	138
	100	57*	68	6.7	133	67**	74	4.7	137
202	1	61	68	4.8	139	68***	77	5.4	141
	10	54	67**	5.3	143	70***	81*	5.1	142
	100	54	67**	5.6	150	74***	81	4.6	138
216	1	61	74	5.9	139	77***	82***	5	141
	10	61	68	5.9	142	71***	81	5.5	133
	100	61	74	6.8	142	74***	82***	6.1	131
200	1	57	68	7	130	74***	82***	5.8	135
	10	48.5***	67**	7.9	130	70***	81*	6.7	134
	100	61	68	6.5	133	70***	81**	5.8	141
330	1	63***	74*	6	136	70***	82***	6.4	140
	10	61	71	6.7	131	68***	78	5.6	137
	100	54	68	6.6	135	63	77	8.2	135
379	1	52***	63***	5.6	136	62	77	7.3	135
	10	50***	66	6.5	131	62*	75	8.3	126
	100	59**	69	5.1	119	65**	77	6.3	139
220	1	55***	63*	5.7	140	63	77	6.9	138
	10	49***	65*	6.7	126	62	77	6.7	139
	100	45***	62*	7.7	141	69***	80**	6.9	136
206	1	59*	69	6.6	131	69***	80	6.7	140
	10	49***	60**	6.4	129	65***	77	5.6	144
	100	52***	63*	6	142	66***	77	6.4	141
222	1	59**	69	5.3	121	63**	77	7.2	141
	10	59**	65	4.9	129	69***	77	6.1	140
	100	52***	63*	5.4	128	77***	84***	6.6	139
228	1	42***	49***	4.9	135	62**	70	6.2	137
	10	55***	63**	5.7	137	62	73	6.4	137
	100	48***	58***	5.4	146	62	77	6.9	146

Примечание: С (µМ) – концентрация (мкмоль/л); М – медианная продолжительность жизни (ПЖ); 90% – возраст смертности 90% выборки (максимальная ПЖ); MRDT – время удвоения интенсивности смертности; n – объем выборки; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



Влияние производных кинетина (обозначены цифрами в соответствии с разделом «Материалы и методы») на медианную продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) дрозофил. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, логранговый критерий. Планки погрешностей означают ошибку медианной ПЖ.

эффектов геропротекторных вмешательств еще полностью не установлены, но на них могут оказывать влияние половые различия в экспрессии генов и половые гормоны (Austad, 2015; Tower, 2017). Для выяснения механизмов полспецифических эффектов производных кинетина требуются дополнительные исследования уровня потребления дрозофилами питательной среды и анализ активности генов, связанных со старением и стрессоустойчивостью.

Геропротекторные эффекты кинетина выявлены и на других объектах. Ранее на плодовой мушке *Zaprionus paravittiger* показано, что кинетин способен увеличивать медианную продолжительность жизни, максимальный эффект (24 %) был достигнут при концентрации исследуемого вещества 116.3 мкмоль/л (25 ppm). Токсический эффект кинетина проявлялся при концентрациях 2.91 и 14.5 ммоль/л (625 и 3125 ppm) (Sharma, 1995). В нашем исследовании производные кинетина оказывали максимальный положительный эффект на параметры ПЖ в сходных концентрациях – 1 и 100 мкмоль/л. Выявлена также зави-

симость эффекта от дозы. С увеличением концентрации эффект производных № 202, 379, 220 и 222 на медианную ПЖ усиливался, в то время как положительный эффект производных № 256, 216, 200, 330 и 206 характеризовался обратной зависимостью от дозы. Наблюдаемые различия в эффектах могут быть связаны с разной степенью токсичности и биологической активности исследуемых веществ.

У нематоды *Caenorhabditis elegans* предварительная обработка кинетином (200 мкмоль/л) повышала устойчивость к индуктору окислительного стресса юглону (500 мкмоль/л), гипертермии (35 °C в течение 90 мин.) и вызывала увеличение ПЖ (Natural plant ..., 2018). На фибробластах человека показано, что основным представителем цитокининов кинетин (в концентрации от 40 до 200 мкмоль/л) способен замедлять клеточное старение (Rattan, 1994).

К настоящему времени геропротекторные механизмы действия кинетина на животные организмы полностью не исследованы. Известно, что кинетин индуцировал клеточную антиоксидантную защиту за счет активации фермента каталазы (Sharma, 1997). Кинетин также снижал фертильность *Z. fruitflies*, что, согласно теории «отработанной сомы» Т. Кирквуда (Kirkwood, 1977), может вызывать увеличение продолжительности жизни и стрессоустойчивости организма за счет перераспределения энергетических ресурсов с процессов репродукции (Sharma, 1997).

Заключение

Таким образом, нами впервые получены данные о влиянии производных кинетина на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*. Геропротекторный эффект растительного гормона имел половые различия:

- 1) обнаружены отрицательные эффекты кинетина на продолжительность жизни самцов;
- 2) у самок большинство производных кинетина увеличивало продолжительность жизни, а некоторые производные (№ 202, 200, 216, 256) снижали время удвоения интенсивности смерти;
- 3) выявлен разнонаправленный концентрационный эффект некоторых производных кинетина, что может быть связано с их биологической активностью.

Для выявления механизмов концентрационных эффектов и половых различий геропротекторных свойств производных кинетина на продолжительность жизни и процессы старения *Drosophila melanogaster* необходимы дальнейшие исследования.

Исследования выполнены в рамках государственного задания по теме «Молекулярно-генетические механизмы старения, продолжительности жизни и стрессоустойчивости *Drosophila melanogaster*» № АААА-А18-118011120004-5 и по проекту комплексной программы УрО РАН № 18-7-4-23 «Комбинация факторов различной природы (пониженная температура, отсутствие освещения, ограничительная диета и воздействие геропротектора) для максимального увеличения продолжительности жизни особей рода *Drosophila*», № АААА-А18-118011120008-3.

ЛИТЕРАТУРА

- Austad, S. N. Sex Differences in Longevity and in Responses to Anti-Aging Interventions: A Mini-Review / S. N. Austad, A. Bartke // *Gerontology*. – 2015. – Vol. 62. – P. 40–46. – doi: 10.1159/000381472
- Geroprotectors.org: a new, structured and curated database of current therapeutic interventions in aging and age-related disease / A. Moskalev, E. Chernyagina, J. P. de Magalhaes, D. Barardo, H. Thoppil, M. Shaposhnikov, A. Budovsky, V. E. Fraifeld, A. Garazha, V. Tsvetkov, E. Bronovitsky, V. Bogomolov, A. Scerbacov, O. Kuryan, R. Gurinovich, L. C. Jellen, B. Kennedy, P. Mamoshina, E. Dobrovolskaya, A. Aliper, D. Kaminsky, A. Zhavoronkov // *Aging (Albany NY)*. – 2015. – Vol. 7. – P. 616–628. – doi: 10.18632/aging.100799
- Kirkwood, T. B. L. Evolution of ageing / T. B. L. Kirkwood // *Nature*. – 1977. – Vol. 270. – P. 301–304. – doi: 10.1038/270301a0
- Mantel, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration / N. Mantel // *Cancer Chemother Rep*. – 1966. – Vol. 50. – P. 163–170.
- Moskalev, A. A. Studying the geroprotective effects of inhibitors suppressing aging-associated signaling cascades in model organisms / A. A. Moskalev, M. Shaposhnikov, I. Solovov // *Medical news of North Caucasus*. – 2017. – Vol. 12, N 3. – P. 342–347. – doi: 10.14300/mnnc.2017.12090
- Natural plant hormones cytokinins increase stress resistance and longevity of *Caenorhabditis elegans* / A. Kadlecova, T. Jirsa, O. Novak, J. Kammenga, M. Strnad, J. Voller // *Biogerontology*. – 2018. – Vol. 19, N 2. – P. 109–120. – doi: 10.1007/s10522-017-9742-4
- OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research / S. K. Han, D. Lee, H. Lee, D. Kim, H. G. Son, J. S. Yang, S. V. Lee, S. Kim // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, N 35. – P. 56147–56152. – doi: 10.18632/oncotarget.11269
- Plant Hormone Cytokinins for Modulating Human Aging and Age-Related Diseases / J. Voller, B. Makova, A. Kadlecova, G. Gonzalez, M. Strnad. – 2017. – P. 311–335.
- Rattan, S. I. Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts / S. I. Rattan, B. F. Clark // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1994. – Vol. 201, N 2. – P. 665–672. – doi: 10.1006/bbrc.1994.1752
- Sharma, S. P. Plant growth hormone kinetin delays ageing, prolongs the lifespan and slows down development of the fruitfly *Zaprionus parvittiger* / S. P. Sharma, P. Kaur, S. I. Rattan // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1995. – Vol. 216, N 3. – P. 1067–1071.
- Sharma, S. P. Increased longevity of kinetin-fed *Zaprionus fruitflies* is accompanied by their reduced fecundity and enhanced catalase activity / S. P. Sharma, J. Kaur, S. I. Rattan // *Biochem Mol Biol Int*. – 1997. – Vol. 41, N 5. – P. 869–875.
- Statistical methods for testing effects on «maximum lifespan» / C. Wang, Q. Li, D. T. Redden, R. Weindruch, D. B. Allison // *Mech Ageing Dev*. – 2004. – Vol. 125, N 9. – P. 629–632. – doi: 10.1016/j.mad.2004.07.003
- The DrugAge database of aging-related drugs / D. Barardo, D. Thornton, H. Thoppil, M. Walsh, S. Sharifi, S. Ferreira, A. Anzic, M. Fernandes, P. Monteiro, T. Grum, R. Cordeiro, E.A. De-Souza, A. Budovsky, N. Araujo, J. Gruber, M. Petrascheck, V. E. Fraifeld, A. Zhavoronkov, A. Moskalev, J. P. de Magalhaes // *Aging Cell*. – 2017. – Vol. 16. – P. 594–597. – doi: 10.1111/accel.12585
- Tower, J. Sex-Specific Gene Expression and Life Span Regulation / J. Tower // *Trends Endocrinol Metab*. – 2017. – Vol. 28. – P. 735–747. – doi: 10.1016/j.tem.2017.07.002

EFFECTS OF KINETIN DERIVATIVES ON THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* LIFESPAN

D.V. Yakovleva, N.V. Zemskaya, M.V. Shaposhnikov, A.A. Moskalev

Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

Summary. The effects of 10 kinetin derivatives in three different concentrations (1, 10 and 100 μM) on the lifespan of *Drosophila melanogaster* are investigated. The geroprotective effects of kinetin derivatives depend on the sex of individuals. Statistically significant negative effects on the median (decrease by 31.1 %) and maximum (decrease by 27.9 %) lifespan are normally observed for males. Statistically significant positive effects on the median (increase by 13.5 %) and maximum (increase by 26.2 %) lifespan are revealed for females. The MRDT decrease which indicates a positive effect of kinetin on the population health is observed again for females. The sex differences in the geroprotective effects of genetic or pharmacological interventions are widely known on various model organisms. For both flies and mice, dietary restrictions and the decreasing activity of insulin/IGF1 and TOR signaling pathways predominantly increase the lifespan of females, while geroprotective effects from pharmacological interventions characterize males. The mechanisms of the sex-specific effects of geroprotective interventions are not fully investigated but they may be influenced by sex differences in gene expression and by sex hormones. To elucidate the mechanisms of the sex-specific effects of kinetin derivatives on *Drosophila*, there is a need in additional studies on their food consumption level and in the activity analysis of genes related to aging and stress resistance.

Key words: kinetin, lifespan, *Drosophila melanogaster*