

**Влияние нарингина на продолжительность жизни, стрессоустойчивость и плодовитость *Drosophila melanogaster***

Н.В. Земская<sup>1,2</sup>, Е.А. Лашманова<sup>3</sup>, Е.Н. Прошкина<sup>1</sup>, А.А. Москалев<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, e-mail: kukushonok90@yandex.ru

<sup>2</sup>Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет)

Флавоноиды – это активно изучаемая группа природных соединений, обладающая противораковыми [1], противовоспалительными [2], антидиабетическими [3], нейропротекторными [4] и кардиопротекторными [5] свойствами. В природе флавоноиды зачастую встречаются в виде гликозидов [6]. Однако большинство из них распадается до своих негликозилированных форм, называемых агликонами, в ходе своего метаболизма в кишечнике человека. Согласно литературным данным, агликаны и их гликозиды отличаются в степени проявления тех или иных биологических свойств [7].

Недавно было показано, что агликон нарингенин увеличивает продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* [8]. Целью данной работы было изучить влияние нарингина, являющегося гликозидной формой нарингенина и встречающегося в цитрусовых, на параметры продолжительности жизни *D. melanogaster* и ряд физиологических параметров (стрессоустойчивость, плодовитость, локомоторная активность).

**Материалы и методы**

В опытах использовали *D. melanogaster* линию дикого типа Canton-S. Нарингин растворяли в ДМСО и добавляли в дрожжевую пасту дрозофил в конечных концентрациях 0.3, 0.5, 1.0 мкМ. Контрольным особям добавляли идентичное количество чистого ДМСО.

*Анализ продолжительности жизни.* В экспериментах на продолжительность жизни (ПЖ) отбирали по 120-150 особей на каждый вариант эксперимента (по 30 особей в пробирке). Дрозофилы содержались на стандартной агаро-дрожжевой питательной среде при 25°C и 12-часовом режиме освещения. Нарингин добавляли в дрожжевую пасту дрозофил на протяжении всей жизни особей. Подсчет умерших особей проводили ежедневно кроме выходных. Эксперимент был проведен три раза. По полученным данным рассчитывали среднюю, медианную, минимальную и максимальную ПЖ а так же время 90% гибели особей. Самок и самцов анализировали отдельно.

*Анализ стрессоустойчивости.* Эксперименты проводили на 10-е сутки обработки нарингином. На каждый вариант опыта отбирали по 120-150 особей. Самок и самцов анализировали отдельно. Для оценки устойчивости к действию окислительного стресса дрозофил переносили в пробирки с фильтровальной бумагой, пропитанной раствором индуктора окислительного стресса 20 мМ параквата (Methyl Viologen, Sigma) в 5% сахарозе. Для оценки устойчивости к гипертермии мух содержали на стандартной агарно-дрожжевой питательной среде в термостате при 35°C. Для определения устойчивости к голоданию дрозофил помещали в пробирки с фильтровальной бумагой, смоченной водой.

*Анализ плодовитости.* Для оценки плодовитости раз в неделю по 3 самки и самца одного возраста переносили в пробирку со свежей средой, подкрашенной активированным углем. Через 24 часа инкубации производился подсчет отложенных яиц в расчете на самку. Для каждого варианта эксперимента отбиралось по 50 самок. Раз в месяц самцы заменялись на молодых.

## **Результаты**

### *Продолжительность жизни*

Нарингин в концентрации 0.3 мкМ в большинстве экспериментов увеличивал медианную продолжительность жизни самок на 4.8-6.9% ( $p < 0.05$ ), но не влиял на время 90%-ной смертности особей (Таблица 1). В концентрации 0.5 мкМ флавоноид увеличивал показатель 90%-ной смертности на 3.9-17.2% ( $p < 0.05$ ), но эффекты на медианную ПЖ были неоднозначными. В концентрации 1 мкМ нарингин не оказывал воспроизводимого влияния на показатели ПЖ самок дрозофил.

Добавление нарингина в концентрациях 0.3 и 0.5 мкМ не оказывало влияния на параметры ПЖ самцов. В концентрации 1 мкМ нарингин оказывал негативное действие, уменьшая медианную ПЖ самцов на 6.5-20% ( $p < 0.05$ ).

Таблица 1. Параметры продолжительности жизни особей *D. melanogaster* после воздействия нарингином

Вариант	Эксперимент	min	X±Δm	M	90%	max	N
Самцы							
1	Контроль	17	48.6±0.9	46	61	73	141
	0.3 мкМ	20	47.1±1.0	46	62	64	129
	0.5 мкМ	11	45.5±0.9	46*#	59	79	144
	1.0 мкМ	4	42.7±1.1	43***##	61	64	124
2	Контроль	19	45.6±0.9	50	58	59	138
	0.3 мкМ	16	46.5±0.9	50	58	58	133
	0.5 мкМ	12	44.5±0.9	46#	57	58	138
	1.0 мкМ	4	42.4±0.9	40*	57	59	141
3	Контроль	6	59.6±0.9	59	70	86	150
	0.3 мкМ	6	60.8±0.8	63	70	91	156
	0.5 мкМ	10	61.7±0.7	63**	70	80	165
	1.0 мкМ	8	57.9±0.9	62	69*	70	153
Самки							
1	Контроль	5	55.3±1.0	58	64	85	135
	0.3 мкМ	2	56.1±1.3	62*##	74**	84	137
	0.5 мкМ	5	57.4±1.2	61##	75**	85	129
	1.0 мкМ	9	59.8±1.3	62***###	78***	85	140
2	Контроль	4	54.0±1.1	57	64	80	142
	0.3 мкМ	5	53.4±0.8	54	64	72	141
	0.5 мкМ	8	52.7±0.9	53.5**###	62	79	150
	1.0 мкМ	3	53.7±1.0	57	65	79	138
3	Контроль	6	60.6±1.3	63	77	87	141
	0.3 мкМ	6	64.3±1.3	66*#	80	91	149
	0.5 мкМ	6	65.0±1.4	69***###	80*	90	148
	1.0 мкМ	6	62.9±1.1	64.5	77	84	150

Примечание: M – медианная продолжительность жизни (сут); X±Δm – средняя продолжительность жизни и ошибка среднего (сут); 90% – время 90%-й гибели популяции (сут); min и max – минимальная и максимальная продолжительность жизни в выборке (сут); N – количество особей в выборке. При сравнении времени 90% гибели особей использовали критерий Ванг-Аллисона, для медианной продолжительности жизни – критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона и Ванг-Алиссона. Различия достоверны с контролем # при p<0.05 и ## при p<0.01 для критерия Ванг-Аллисона; \* при p<0.05, \*\* при p<0.01 и \*\*\* при p<0.001 для остальных критериев.

### Стрессоустойчивость

В большинстве вариантов экспериментов нарингин не оказывал статистически значимых эффектов на устойчивость самцов и самок дрозофил к различным видам стресса (Таблица 2). У самок наблюдалось увеличение процента умерших особей на 24% ( $p < 0.01$ ) после 48 ч воздействия голоданием в варианте с 1 мкМ нарингина, у самцов - снижение на 6.6% ( $p < 0.001$ ) при концентрации флавоноида 0.3 мкМ. В экспериментах с тепловым шоком добавление нарингина в концентрации 0.5 мкМ приводило к снижению стрессоустойчивости самок на 26.9% ( $p < 0.01$ ). Однако при этой же концентрации наблюдалось увеличение данного показателя на 2.8% у самцов ( $p < 0.01$ ). Нарингин в концентрациях 0.3 мкМ и 0.5 мкМ снижал процент умерших самцом на 14.8% ( $p < 0.05$ ) и 21.5 % ( $p < 0.001$ ) соответственно. Не выявлено достоверного влияния нарингина в исследованных концентрациях на устойчивость самок к окислительному стрессу.

Таблица 2. Влияние флавоноидов на стрессоустойчивость *Drosophila melanogaster*

Стресс	Голодание		Тепловой шок		Окислительный стресс	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Контроль	89.3	48.4	98.3	38.7	57.6	39.5
1 $\mu\text{M}$	87.2	60.0**	98.1	42.0	52.1	41.0
0.5 $\mu\text{M}$	89.6	52.4	95.6***	49.1**	45.2*	44.6
0.3 $\mu\text{M}$	83.4***	41.5	97.4	34.5	49.1***	41.0

Примечание: В таблице представлен процент умерших самцов и самок через 48 часов после начала голодания (B) и окислительного стресса (A), и через 96 ч после начала теплового шока (C). Объединенные данные трех независимых экспериментов. Различия статистически значимы при \*\*\* -  $p < 0.001$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \* -  $p < 0.05$  по  $\phi$ -критерию Фишера.

### Плодовитость

Нарингин в течение всей жизни самок оказывал положительное действие на их плодовитость (Рис. 1). При этом наибольшие эффекты наблюдались к концу эксперимента (47 сут), когда было зафиксировано увеличение плодовитости на 150-260% по сравнению с контрольными особями.

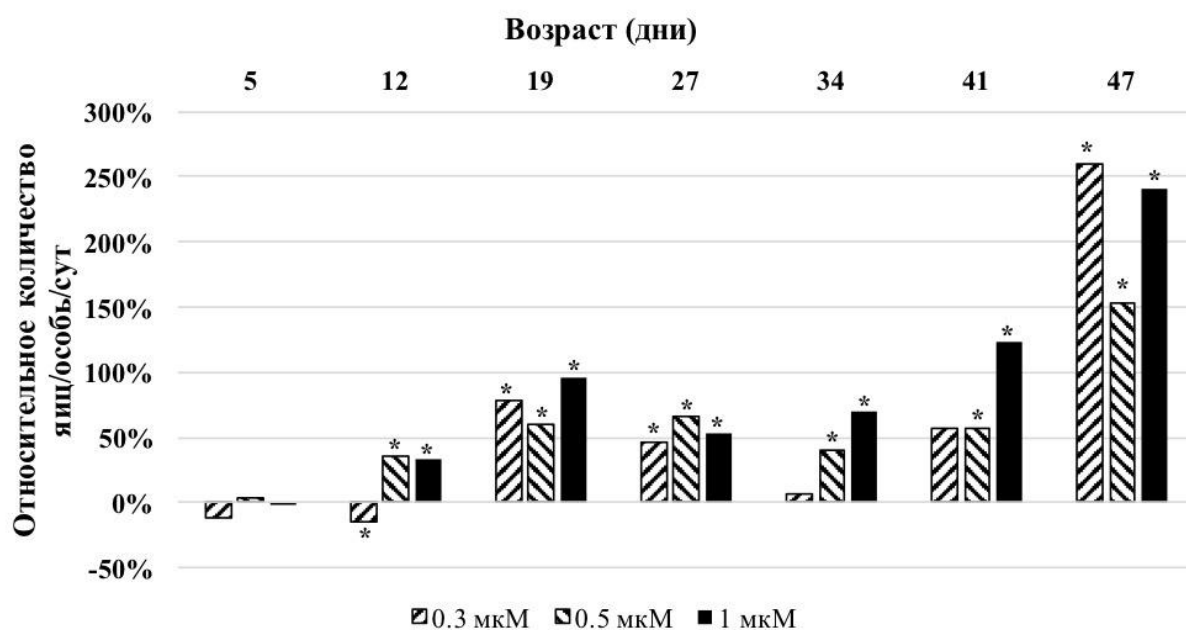


Рисунок 1. Относительное изменение плодовитости самок при добавлении нарингина. Обозначения: \* –  $p < 0.05$ , критерий Манна – Уитни.

### Заключение

Таким образом, нарингин в концентрациях 0.3 мкМ и 0.5 мкМ оказывал положительное действие на показатели ПЖ самок дрозофил и негативное - в концентрации 1 мкМ при добавлении самцам. Флавоноид снижал устойчивость самцов к окислительному стрессу, но не влиял на устойчивость самок. В экспериментах на тепловой шок и голодание в большинстве вариантов нарингин не оказывал достоверного влияния на стрессоустойчивость дрозофил. Нарингин оказывал положительное действие на плодовитость самок. Для выявления механизмов действия нарингина необходимо проведение экспериментов с трансгенными линиями.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность Лаборатории разработки инновационных лекарственных средств МФТИ в лице заведующего лабораторией Леонова Сергея Викторовича и заместителя заведующего лабораторией Марусич Елены Ивановны в предоставлении нарингина для исследования.

Исследование выполнено в рамках государственного задания по теме "Молекулярно-генетические механизмы старения, продолжительности жизни и стрессоустойчивости *Drosophila melanogaster*" № гос. регистрации АААА-А18-118011120004-5 и при поддержке «Коллекции лабораторных линий плодовых мушек *Drosophila*» Института биологии Коми НЦ УрО РАН (<https://ib.komisc.ru/add/drosophila/>).

## Список литературы

1. Seelinger G., Merfort I., Wolfle U., Schempp C.M. Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin // *Molecules*. 2008. Vol. 13. № 10. P. 2628-51.
2. Ahad A., Ganai A.A., Mujeeb M., Siddiqui W.A. Chrysin, an anti-inflammatory molecule, abrogates renal dysfunction in type 2 diabetic rats // *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014. Vol. 279. № 1. P. 1-7.
3. Vinayagam R., Xu B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review // *Nutr Metab (Lond)*. 2015. Vol. 12. P. 60.
4. Vauzour D., Vafeiadou K., Rodriguez-Mateos A., Rendeiro C., Spencer J.P. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects // *Genes Nutr*. 2008. Vol. 3. № 3-4. P. 115-26.
5. Zern T.L., Fernandez M.L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols // *J Nutr*. 2005. Vol. 135. № 10. P. 2291-4.
6. Kumar S., Pandey A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview // *ScientificWorldJournal*. 2013. Vol. 2013. P. 162750.
7. Xiao J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? // *Critical reviews in food science and nutrition*. 2017. Vol. 57. № 9. P. 1874-1905.
8. Chattopadhyay D., Sen S., Chatterjee R., Roy D., James J., Thirumurugan K. Context- and dose-dependent modulatory effects of naringenin on survival and development of *Drosophila melanogaster* // *Biogerontology*. 2016. Vol. 17. № 2. P. 383-93.