

Анализ геропротекторного потенциала ретиноевой кислоты на модели *Drosophila melanogaster*

Н. С. Тимушева*, Н. Р. Пакшина*, Е. Н. Прошкина*,
А. А. Москалев**

* Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,
г. Сыктывкар

** Институт долголетия с клиникой восстановительной
и профилактической медицины Российского научного центра
хирургии имени академика Б. В. Петровского,
г. Москва

amoskalev@ib.komisc.ru
proshkina.e.n@ib.komisc.ru
uliasheva.n.s@ib.komisc.ru
pakshina.n.r@ib.komisc.ru

Аннотация

Ретиноевая кислота, производное витамина А, является важным компонентом сигнализации между клетками в организме. В то же время имеются противоречивые данные о ее влиянии на продолжительность жизни организма. В данной работе исследовано влияние ретиноевой кислоты на длительность жизни особей *Drosophila melanogaster* и их устойчивость к индуктору окислительного стресса параквату. Ретиноевая кислота в концентрациях 10 и 500 мкмоль/л оказала геропротекторный эффект на самок дрозофил, вызвав увеличение медианной продолжительности жизни и возраста 90 % смертности на 2–5 и 6 % соответственно. Но данное вещество не влияло на выживаемость самцов, так же как устойчивость к прооксиданту параквату особей обоих полов. Положительное действие ретиноевой кислоты на продолжительность жизни может быть обусловлено активацией генов репарации ДНК *mei-9* и *okr*.

Ключевые слова:

продолжительность жизни, стрессоустойчивость, ретиноевая кислота, *Drosophila melanogaster*

Введение

Старение – это биологический процесс, характеризующийся снижением функциональности организма и уменьшением его устойчивости к стрессовым факторам [1]. В результате этого организм теряет способность поддерживать гомеостаз, что делает его более восприимчивым к повреждениям и развитию возрастных заболеваний, что, в свою очередь, ухудшает общее состояние здоровья и еще больше ускоряет процессы старения. В то же время в настоящее время описан спектр препаратов, называемых геропротекторами, которые способствуют долголетию и замедляют связанные со старением изменения в организме [2]. Поиск новых препаратов, проявляющих

Analysis of the geroprotective potential of retinoic acid in the *Drosophila melanogaster* model

N. S. Timusheva*, N. R. Pakshina*, E. N. Proshkina*,
A. A. Moskalev**

* Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
yktvkar

** Institute of Longevity with a Clinic of Rehabilitation and Preventive Medicine, Russian Science Centre of Surgery named after Academician B. V. Petrovsky,
Moscow

amoskalev@ib.komisc.ru
proshkina.e.n@ib.komisc.ru
uliasheva.n.s@ib.komisc.ru
pakshina.n.r@ib.komisc.ru

Abstract

Retinoic acid, a derivative of vitamin A, is an important component of signaling between cells in an organism. At the same time, there are conflicting data on its effect on the lifespan of organisms. In this work, we have studied the effect of retinoic acid on the lifespan of *Drosophila melanogaster* and its resistance to the oxidative stress inducer named paraquat. Retinoic acid at the concentrations of 10 and 500 $\mu\text{mol/l}$ exerts a geroprotective effect on female *Drosophila*, increasing the median lifespan and the 90 % mortality age by 2–5 and 6 %, respectively. However, this substance has not affected the survival rate of males, as well as the resistance to the prooxidant paraquat of flies of both sexes. The positive effect of retinoic acid on the lifespan may be due to the activation of the DNA repair genes *mei-9* and *okr*.

Keywords:

lifespan, stress resistance, retinoic acid, *Drosophila melanogaster*

геропротекторные свойства, является перспективной задачей биологии, экологии и медицины.

Ретиноевая кислота, производное витамина А, является важным компонентом сигнализации между клетками в организме, включая развитие, дифференцировку клеток и старение. В основном она действует путем взаимодействия с рецепторами ретиноевой кислоты (RAR) и ретиноидными X-рецепторами (RXR). Они являются ДНК-связывающими регуляторами транскрипции, образуют гетеродимеры и связи с ДНК в специфических элементах ответа ретиноевой кислоты (RARE), которые вовлечены в разнообразные сигнальные клеточные пути [3, 4].

Дефицит ретиноевой кислоты и нарушение сигнализации рецепторов ретиноевой кислоты приводят к дегенеративным процессам, сопровождающим старение. Например, ретиноевая кислота необходима для регулирования синаптической пластичности, важной для обучения и памяти. Нарушение работы рецепторов этого вещества вызывает нейровоспаление, окислительный стресс, митохондриальную дисфункцию и нейродегенерацию, что может быть одной из причин снижения когнитивных способностей при старении и нейродегенеративных заболеваниях [5, 6]. Ретиноевая кислота важна для поддержания гомеостаза кишечного барьера и уравнивания иммунитета, которые представляют собой важнейшие детерминанты старения организма. Применение ретиноевой кислоты и воздействие на ее рецепторы рассматривают как перспективную стратегию для подавления роста злокачественных опухолей, стимуляции противоракового иммунитета и преодоления химиорезистентности [7]. Также в настоящее время расширяется спектр информации о роли данного соединения и его предшественника, витамина А, в здоровье сердечно-сосудистой системы, опорно-двигательного аппарата и поддержании нормального метаболизма [8, 9]. Кроме того, ретиноевая кислота и ее производные играют ключевую роль в обеспечении здоровья кожи и могут замедлять процессы старения, улучшая внешний вид и функциональные характеристики кожи [10]. В то же время в исследованиях на модельных животных показаны противоречивые данные о влиянии потребления этого вещества на длительность жизни организма [11, 12].

В данной работе мы исследовали влияние ретиноевой кислоты на продолжительность жизни (ПЖ) и устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к индуктору окислительного стресса параквату.

Материалы и методы

Линия *Drosophila melanogaster* и условия содержания.

Для всех представленных экспериментов использовали линию дикого типа *Canton-S* из Коллекции лабораторных линий плодовых мушек *Drosophila* (ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия).

Мух содержали при температуре +25° С, 12-часовом режиме освещения, в климатической камере Binder KBF720-ICH (Binder, Германия) на питательной среде (1 г на 1 л): агар-агар – 5,2, сухие дрожжи – 32,1, глюкоза – 136,9, кукурузная мука – 92 [13]. Для предотвращения роста простейших грибов и бактерий добавляли 10%-ный раствор метил-4-гидроксибензоата (Sigma-Aldrich, США) и 50%-ный раствор пропионовой кислоты (Sigma-Aldrich, США). Мух переносили на свежую среду два раза в неделю.

Обработка ретиноевой кислотой. На поверхность питательной среды наносили по 30 мкл на пробирку 0,2 % ДМСО (для контрольной группы) или раствор ретиноевой кислоты (R2625, Sigma-Aldrich, США) в 0,2 % ДМСО в концентрациях 0,1; 1; 10; 100 и 500 мкмоль/л.

Анализ продолжительности жизни. Самцов и самок дрозофил собирали в течение 24 ч после вылупления имаго, сортировали с использованием анестезии углекислым

газом и помещали в пробирки с ретиноевой кислотой или контрольным раствором. Количество погибших мух подсчитывали ежедневно. Далее рассчитывали параметры ПЖ (среднюю и медианную ПЖ, возраст 90 % смертности, время удвоения интенсивности смертности (MRDT)) и строили кривые выживания. Статистическую обработку проводили с помощью непараметрических критериев. Кривые выживаемости сравнивали с использованием критерия Колмогорова–Смирнова [14]. Критерии Мантеля–Кокса [15] и Гехана–Бреслоу–Вилкоксона [16] применяли для оценки статистических различий в медианной ПЖ. Метод Ванг–Аллисона использовали для оценки различий в возрасте 90 % смертности [17]. Статистический анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения STATISTICA, версия 6.1 (StatSoft, США) и R, версия 2.15.1 (The R Foundation). Для каждого экспериментального варианта анализировали 50–160 мух. Исследования проводили в четырех независимых биологических повторностях.

Обработка паракватом. Самцов и самок дрозофил сортировали с использованием анестезии углекислым газом и содержали в пробирках с ретиноевой кислотой или контрольным раствором до возраста 15 сут. Для оценки устойчивости к окислительному стрессу мух по одной помещали в стеклянные пробирки со средой, содержащей 2 % агара, 5 % сахарозы и 20 ммоль/л индуктора окислительного стресса параквата (метилвиологен дихлорид гидрат, 856177, Sigma-Aldrich, США). Далее проводили анализ с использованием DAM2 *Drosophila* Activity Monitor (Trikinetics, США). Данные о двигательной активности мух регистрировали каждые 30 мин. Воздействие параквата продолжалось до гибели всех животных. Мертвых мух идентифицировали по прекращению двигательной активности. Статистический анализ был аналогичен анализу ПЖ. Для каждого экспериментального варианта анализировали самцов и самок в количестве 32. Эксперименты проводили в трех независимых биологических повторностях.

ОТ-ПЦР в реальном времени. Анализ экспрессии генов проводили с использованием целых дрозофил в возрасте 15 сут в количестве 10 особей на каждый вариант эксперимента. РНК выделяли с помощью набора Aurum Total RNA mini kit (Bio-Rad, США). Концентрацию общей РНК определяли набором Quant-iT RNA Assay Kit (Invitrogen, США). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, США). Смесь для ОТ-ПЦР готовили с помощью набора qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия) с праймерами, указанными в табл. 1. Реакцию осуществляли на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) при следующих параметрах: один цикл при 95° С в течение 30 сек; 40 циклов при 95° С в течение 10 сек и 60° С в течение 30 сек. Уровни экспрессии целевых генов рассчитывали относительно экспрессии референтных генов (β -Tubulin, Rpl32, EF1 α) с помощью программного обеспечения CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, США) методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Статистический анализ эффектов исследуемых препаратов осуществляли с использованием U-критерия Манна–Уитни. Эксперимент проводили в двух независимых биологических повторностях, по три технических повторности в каждой.

Таблица 1
Table 1

Праймеры для проведения ПЦР
Primers for PCR

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>β-Tubulin</i>	GCAACTCCACTGCCATCC	CTGTCTCTCTCTCGAACT
<i>Rpl32</i>	GAAGCGCACCAAGCACTTCATC	CGCCATTGTGCGCAGCAGCTTAG
<i>EF1a</i>	AGGGCAAGAAGTAGTGGTTTGC	GCTGCTACTACTGCGTGTGTG
<i>D-Gadd45</i>	AAGTCGCGCACAGATACTCACG	TTTGTGGTTCGGCAGCTGGTC
<i>Rrp1</i>	AGGATGGTCTGCAGTTGATGACC	CGTTTGCAGCACTTGGTTTCTCTG
<i>mei-9</i>	TTCCGGCAATCTTGTGCTTGTG	TCCAGATAAACGCGCTCTCTTTC
<i>mus210</i>	AGAAGACGGTGCATTTGAGATTGC	ATGGGATGACAAGCGCCTTGATG
<i>Brca2</i>	CAACCGAAGCAAGGCAGGATTC	TCTGCCATAGTTCCTGGACCTTCC
<i>spn-B</i>	ATCACGCAATCCATCGAGGAC	TCCGGTGCAGAACATTAACCTG
<i>okr</i>	AGTCGGCCGAGAAGCATTTAC	GCAGCGCTTACACTTGAGCTTG
<i>Ku80</i>	AGCTTCAGAATGTCGCAACTACC	TCGTGAAATCGAAGAGCAGGAG
<i>Sod1</i>	TGCACGAGTTCGGTGACAACAC	TCCTTGCCATACGGATTGAAGTGC
<i>Prx5</i>	CCGATGAGTGAAAGTCCAAG	TTGCCGTTCTCCACCACCAG
<i>Hsp27</i>	ACTGGGTCGTCGTTATTTCG	CGCGCGACGTGACATTTGATTG
<i>Hsp68</i>	TGGGCACATTCGATCTACTGG	TAACGTGATCTTGGGCACTCC
<i>Atg1</i>	AGACTCTTCTCTGCAACTAGC	GCTTGAGATCAGCATGCACAATTC
<i>Atg5</i>	CTCGTCAAGCTCAACTCCAAGG	GTTGACCAATCCAGCCAAAGC
<i>Ire1</i>	GACAGTGAGGACAGCCGAATTATC	GCGATTGCGGATCTTGTGTATC

Подготовку образцов и анализ экспрессии генов проводили с использованием оборудования ЦКП «Молекулярная биология» (ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия).

Результаты и их обсуждение

Нами было изучено влияние ретиноевой кислоты в концентрациях 0,1–500 мкмоль/л на длительность жизни дрозophil линии дикого типа *Canton-S* в четырех независимых биологических повторностях. У особей обоих полов добавление в питательную среду этого вещества изменяло среднюю, медианную ПЖ и возраст 90 % смертности в пределах 2–9 % ($p < 0,05$) в сторону как увеличения, так и уменьшения этих параметров. Эффекты слабо воспроизводились между повторностями (табл. 2, 3). При совмещении полученных данных мы не наблюдали статистически значимых различий у самцов, но обнаружили положительное влияние ретиноевой кислоты в концентрациях 10 и 500 мкмоль/л на медианную ПЖ самок (2–5 %, $p < 0,05$) и возраст 90 % смертности (6 %, $p < 0,05$) (рис. 1).

В проведенных ранее исследованиях было показано, что ретиноевая кислота и ее производные могут оказывать благоприятное влияние на ПЖ модельных организмов. Например, потребление данного соединения в составе питательной среды продлевает жизнь нематод *Caenorhabditis elegans* за счет влияния на экспрессию генов, участвующих в процессах старения, в частности, генов коллагена [12]. Введение ретиноидов, инкапсулированных в наночастицы, мышам G93A с моделью бокового амиотрофического склероза приводило к улучшению двигательной активности, увеличению ПЖ и нейропротекции [18]. Но в другой работе с этими мышами длительный прием диетической добавки с ретиноевой кислотой, напротив, укорачивал жизнь [19].

Несмотря на описанные противоречивые данные, ретиноевую кислоту часто рассматривают как препарат, который может быть полезен при лечении связанных со старением заболеваний и даже синдромов преждевременного старения. В частности, транскриптомный анализ показал, что при болезни Альцгеймера нарушается регуляция многих генов, чувствительных к ретиноевой кислоте, и корепрессоров ее рецепторов [20]. Ретиноиды подавляют экспрессию хемокинов и нейровоспалительных цитокинов в микроглии и астроцитах, которые активируются при болезни Альцгеймера. Стимуляция рецепторов ретиноевой кислоты и ретиноидных X-рецепторов замедляет накопление амилоидных белков, снижает нейродегенерацию и тем самым предотвращает негативные изменения у мышей с моделью болезни Альцгеймера [5]. В то же время ретиноевая кислота снижала уровень прогерина через регуляцию транскрипции в фибробластах с фенотипом синдрома Хатчинсона-Гилфорда и плюрипотентных стволовых клетках. Ее применение нормализовало пролиферацию клеток (в фибробластах), дифференцировку клеток (в стволовых клетках) и активность белков ответа на повреждение ДНК [21, 22].

У дрозophil линии дикого типа положительный эффект ретиноевой кислоты оказался выражен в небольшой степени и больше всего проявлялся у самок при применении максимальной концентрации 500 мкмоль/л. Далее мы оценили влияние вещества в данной концентрации на выживаемость дрозophil при воздействии индуктора окислительного стресса параквата. Однако ни в одной из биологических повторностей мы не наблюдали статистически значимого влияния исследуемого вещества на устойчивость дрозophil к прооксиданту (табл. 4).

В ряде исследований показано, что ретиноевая кислота и связанные с ней рецепторы и белки играют важную роль в поддержании митохондриальной функции и защите от действия свободных радикалов, обеспечивая устойчивость к усиливающим окислительный стресс воздействиям. Например, у мышей, которых подвергали гипоксии или обработке липосахаридами, ретиноевая кислота ингибировала продукцию активных форм кислорода и малонового диальдегида, улучшала экспрессию транскрипционного фактора Nrf2 и антиоксидантный статус. В результате наблюдали снижение повреждений в тканях организма [23, 24]. При введении грызунам клеток меланомы последующее применение инкапсулированной липосомами ретиноевой кислоты снижало окислительный стресс и воспаление, улучшало липидный профиль почти до нормального уровня, а также увеличивало продолжительность жизни [25]. В модели церебральной ишемии ретиноевая кислота предотвращала активацию микроглии и астроцитов, снижала уровень провоспалительных цитокинов, предположительно, за счет антиоксидантных и противовоспалительных свойств [26]. Более того, в работе на фибробластах человека, подвергшихся воздействию УФ-излучения, ретиноевая кислота ингибировала экспрессию лигазы Hrd1, которая обеспечивает убикви-

Таблица 2
Влияние ретиноевой кислоты на параметры продолжительности жизни самцов *Drosophila melanogaster*

Table 2
The effect of retinoic acid on the lifespan parameters of male *Drosophila melanogaster*

Обработка	Концентрация, мкмоль/л	Повторность	X±SE	M	90%	MRDT	N
Отрицательный контроль	0	2	58,0±0,6	58	69	4,6	157
		3	52,6±1,0	55	60	4,9	58
		4	54,7±0,7	56	63	5,5	133
Контроль (0,2 % ДМСО)	0	1	55,2±0,8	59	66	5,1	155
		2	54,5±0,6	58	66	4,7	156
		3	52,8±1,1	55	62	4,6	50
		4	58,1±1,0	59	70	5,9	150
Ретиноевая кислота	0,1	1	56,2±0,7	59	66	5,0	156
		2	54,9±0,9	57	67	5,9	156
		3	53,9±0,9	55	61	4,1	59
		4	53,4±1,0 ***	56 ***	66	6,0	150
	1	1	56,7±0,7	59	66	5,2	154
		2	52,9±1,0	51	66	6,1	152
		3	54,5±1,2 *	59	66	5,0	58
		4	56,0±0,9 *	58 *	67	6,0	152
	10	1	57,5±0,7	59	67	5,3	155
		2	56,9±0,6	58 *	65	5,0	157
		3	52,6±1,2	54	62	5,8	56
		4	57,8±0,7	58	70	5,3	154
	100	1	58,8±0,8 ***	60 ***	70 ***	5,3	160
		2	53,9±0,8	52	65	6,0	157
		3	50,6±1,2	51	63	6,6	71
		4	53,7±0,8 ***	56 ***	64 *	5,5	159
500	1	60,5±0,6 ***	61 ***	68 ***	4,3	151	
	2	54,3±0,9	57	65	6,1	152	
	3	50,6±1,2	51	63	6,4	89	
	4	55,8±0,8 ***	56 **	67	5,9	152	

Условные обозначения. Здесь и в табл. 3: X±SE - средняя ПЖ (сут); M - медианная ПЖ (сут); 90 % - возраст 90 % смертности (сут); MRDT - время удвоения интенсивности смертности (сут); N - количество особей в выборке.

Примечание. * различия с контролем (0,2 % ДМСО) статистически значимы при p<0,05 (четвертый столбец - критерий Мантеля-Кокса, пятый - критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона, шестой столбец - метод Ванг-Аллисона); ** p<0,01; *** p<0,001.

Keys. Here and in Table 3: X±SE - average lifespan (days); M - median lifespan (days); 90 % - age of 90 % mortality (days); MRDT - doubling time of mortality intensity (days); N - number of individuals in the sample.

Note. * differences with the control (0.2 % DMSO) are statistically significant at p<0.05 (the fourth column is the Mantel-Cox test, the fifth column is the Gehan-Breslow-Wilcoxon test, the sixth column is the Wang-Allison method); ** p<0.01; *** p<0.001.

тирование и деградацию Nrf2. Следовательно, ретиноевая кислота может способствовать усилению выработки Nrf2 в стрессовых условиях через данный механизм [27].

В то же время положительные эффекты ретиноевой кислоты на устойчивость биологической системы к прооксидантным воздействиям, по-видимому, значительно зависят от применяемых доз и наблюдаются при относительно небольших концентрациях. Так, низкая концентрация ретиноевой кислоты - 10 нмоль/л, стимулировала в кардиомиоцитах экспрессию своих ядерных рецеп-

Таблица 3
Влияние ретиноевой кислоты на параметры продолжительности жизни самок *Drosophila melanogaster*

Table 3
The effect of retinoic acid on the lifespan parameters of female *Drosophila melanogaster*

Обработка	Концентрация, мкмоль/л	Повторность	X±SE	M	90%	MRDT	N
Отрицательный контроль	0	2	62,1±0,7	64	72	4,8	151
		3	56,9±1,3	59	67	4,6	55
		4	51,3±1,9	59	72	12,4	152
Контроль (0,2 % ДМСО)	0	1	62,0±1,0	66	74	5,8	152
		2	59,2±1,0	61	71	6,0	154
		3	57,1±1,2	62	69	4,7	57
		4	57,1±1,1	63	77	9,2	134
Ретиноевая кислота	0,1	1	63,0±1,1 **	66	80 ***	7,5	159
		2	59,2±1,0	62	72	6,5	156
		3	58,5±1,0	60	68	5,0	90
		4	58,0±1,4 *	62	73 ***	7,5	154
	1	1	59,8±1,1 *	62	74 **	6,8	157
		2	61,1±0,9	62	76	6,4	158
		3	60,5±1,0	62	71	5,2	86
		4	62,3±0,9	62	77	5,9	151
	10	1	63,7±1,1 *	66	73	6,6	156
		2	60,0±1,0	62	72	6,2	159
		3	62,2±1,3 *	66	72	5,0	79
		4	60,7±1,0	62	72 ***	5,9	154
	100	1	62,4±1,1 *	66	75	6,4	160
		2	61,0±0,9	63	75 *	6,2	157
		3	58,9±1,2	61	71	5,2	87
		4	58,4±1,3	62	71 ***	6,6	153
500	1	64,2±1,2 ***	67	80 ***	6,9	150	
	2	60,5±0,9	61	72	6,4	155	
	3	56,7±1,4	60	65	5,5	49	
	4	64,6±0,9	66 *	77	5,4	147	

торов и индуцировала защитные механизмы, которые справлялись с повреждениями и повышали выживаемость после лазерного облучения. Обработанные клетки также в меньшей степени вырабатывали активные формы кислорода и лучше поддерживали митохондриальный потенциал. Кардиомиоциты, обработанные фармакологической концентрацией ретиноевой кислоты 1 мкмоль/л, напротив, демонстрировали повышение уровня маркеров окислительного стресса и воспаления и имели такую же выживаемость, как в контрольной группе [28]. Более того, в исследовании на культуре раковых клеток человека было показано, что высокие дозы ретиноевой кислоты оказывают цитотоксическое действие за счет индукции выработки активных форм кислорода, подавления NRF2 и его генов-мишеней, а также повышения уровня апоптоза через митохондриальный механизм [29]. Возможно, мы не наблюдали положительное действие изучаемого препарата на устойчивость к прооксиданту параквату из-за выбора слишком высокой дозы.

Ретиноевая кислота является важным звеном в координации транскрипции генов и мультифункциональным эпигенетическим регулятором. Например, она может уси-

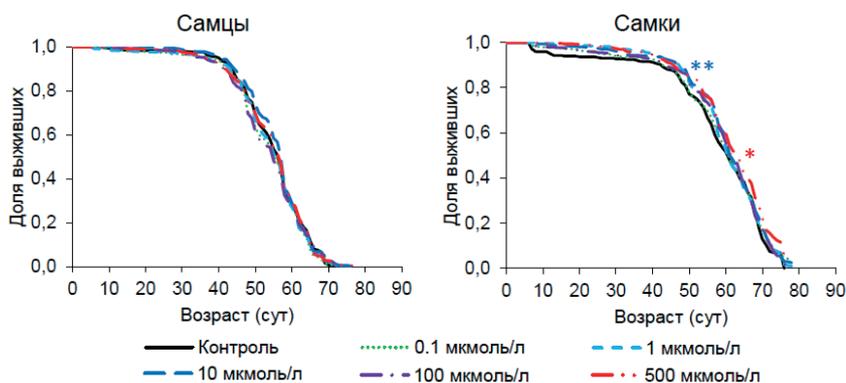


Рисунок 1. Кривые выживаемости особей *Drosophila melanogaster*, содержащихся на питательной среде с добавлением ретиноевой кислоты.

Условные обозначения. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (критерий Колмогорова-Смирнова).

Figure 1. Survival curves of *Drosophila melanogaster* individuals maintained in a nutrient medium supplemented with retinoic acid.

Keys. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Kolmogorov-Smirnov test).

Таблица 4

Влияние ретиноевой кислоты на выживаемость особей *Drosophila melanogaster* при воздействии индуктора окислительного стресса паракуата

Table 4

The effect of retinoic acid on the survival of *Drosophila melanogaster* individuals exposed to the oxidative stress inducer paraquat

Обработка	Пол	Повторность	X±SE	M	90%	N
Контроль (0,2 % ДМСО)	Самцы	1	53,5±2,3	52	69	32
		2	55,2±2,9	53	74	32
		3	49,4±2,1	51	63	32
	Самки	1	55,0±3,5	52	49	32
		2	72,3±3,4	73	95	32
		3	60,1±3,3	61	84	32
Ретиноевая кислота в концентрации 500 мкмоль/л	Самцы	1	53,7±2,7	51	75	32
		2	53,1±2,9	53	66	32
		3	55,8±2,0	55	69	32
	Самки	1	60,9±4,0	61	90	32
		2	70,3±4,5	78	96	31
		3	53,3±3,1	52	82	31

Примечание. X±SE - средняя выживаемость (сут); M - медианная выживаемость (сут); 90% - возраст 90 % смертности (сут); N - количество особей в выборке.

Keys. X±SE - average lifespan (days); M - median lifespan (days); 90% - age of 90% mortality (days); N - number of individuals in the sample.

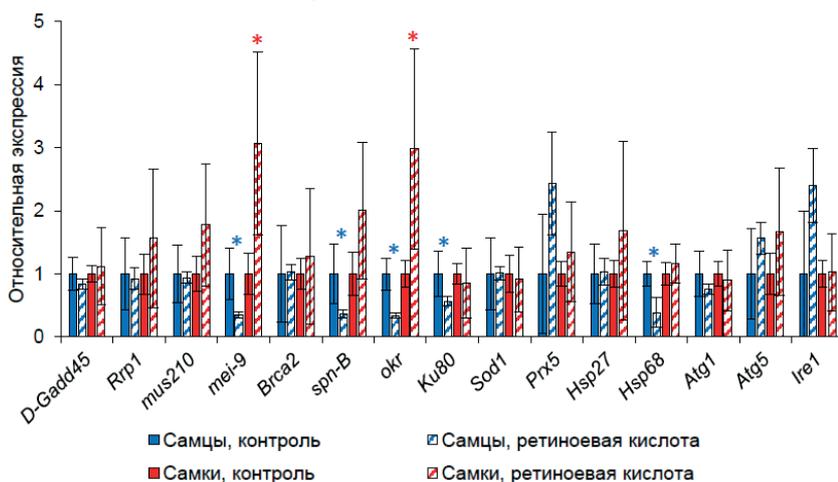


Рисунок 2. Влияние ретиноевой кислоты на экспрессию генов стресс-ответа и долгожительства у *Drosophila melanogaster*.

Условное обозначение. * $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни).

Figure 2. The effect of retinoic acid on the expression of stress response and longevity genes in *Drosophila melanogaster*.

Key. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-test).

ливать репрессивную структуру гетерохроматина, обеспечивая контроль над делением и дифференцировкой клеток и защиту генетического материала. Описанная активность определяет способность ретиноевой кислоты влиять на различные сигнальные пути, в том числе, связанные со старением, возраст-зависимыми заболеваниями и стрессоустойчивостью [3, 20, 30-32].

С целью выявления возможных молекулярно-генетических механизмов действия ретиноевой кислоты мы проанализировали транскрипционную активность генов, вовлеченных в ответ на стресс и регуляцию ПЖ организма: гена распознавания повреждений ДНК - *D-Gadd45* (гомолог *GADD45*); гена эксцизионной репарации оснований - *Rrp1* (гомолог *APE1*); генов эксцизионной репарации нуклеотидов - *mei-9* и *mus210* (гомологи *XPF*, *XPC*); генов репарации двухцепочечных разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации - *Brca2*, *spn-B*, *okr* (гомологи *BRCA2*, *XRCC3*, *RAD54*); гена репарации двухцепочечных разрывов ДНК путем негомолгичного воссоединения концов - *Ku80*; генов антиоксидантной защиты - *Sod1* и *Prx5*; генов белков теплового шока - *Hsp27* и *Hsp68*; генов аутофагии - *Atg1* и *Atg5*; гена ответа на стресс эндоплазматического ретикулума - *Ire1*.

У самцов дрозофилы исследуемые соединения в большинстве случаев приводили к снижению транскрипционной активности генов репарации ДНК и протеостаза (включая *mei-9*, *spn-B*, *okr*, *Ku80*, *Hsp68*) в 1,8-3,0 раза ($p < 0,05$). В то же время у самок ретиноевая кислота в концентрации 500 мкмоль/л повышала активность гена эксцизионной репарации нуклеотидов *mei-9* и гена гомологичной рекомбинации *okr* в 3,0 раза ($p < 0,05$) (рис. 2). Эти гены отвечают за механизмы репарации ДНК и могут быть связаны с долгожительством, усиливая работу клеточной защиты от повреждений и снижая нестабильности генома при старении [33-35]. Показано, что сверхэкспрессия гена *mei-9* приводит к увеличению медианной ПЖ у дрозофил [33].

Имеется несколько работ, где продемонстрировано влияние ретиноевой кислоты на экспрессию генов и белков, отвечающих за восстановление повреждений ДНК, в основном, на клеточ-

ных культурах. Например, обработка ретиноевой кислотой плюрипотентных эмбриональных клеток карциномы человека для индукции дифференциации повышала их выживаемость при воздействии УФ-излучения и увеличивала экспрессию генов эксцизионной репарации нуклеотидов, включая XPC и XPF [36]. Ретиноевая кислота приводила к повышению жизнеспособности клеток в коре головного мозга молодых и старых мышей, обработанных АФ. Она предотвращала и улучшала восстановление двуниевых разрывов ДНК, усиливала экспрессию протеинкиназы АТМ, регулировала сигнальные пути RAR $\alpha/\beta/\gamma$, PPAR β/δ и антиамилоидогенные белки на посттрансляционном уровне [37, 38].

В то же время ретиноевая кислота в высоких концентрациях является генотоксическим агентом. В проведенном нами ранее исследовании данное вещество оказывало радиосенсибилизирующее действие на дрозофил и повышало уровень повреждений ДНК [39]. В клетках пигментного эпителия сетчатки ретиноевая кислота увеличивала уровень активных форм кислорода, щелочно-лабильных участков в ДНК, одноцепочечных разрывов ДНК и приводила к гибели клеток [40]. В исследованиях на культурах клеток грызунов показано, что данному негативному действию препятствует активация белка RAD54 (ортолог *окр* дрозофилы) [41]. В нашей работе ретиноевая кислота могла также выступать в качестве генотоксического воздействия, которое приводило к активации генов репарации ДНК и вызывала увеличение ПЖ по механизму гормезиса.

Таким образом, мы изучили влияние ретиноевой кислоты на ПЖ и выживаемость особей *Drosophila melanogaster* при воздействии индуктора окислительного стресса параквата. Данное вещество в концентрациях 10 и 500 мкмоль/л оказало геропротекторный эффект на самок дрозофил, вызвав увеличение медианной ПЖ и возраста 90 % смертности на 2-5 и 6 % соответственно, но не влияло на устойчивость к прооксиданту параквату. Положительное действие ретиноевой кислоты на длительность жизни может быть обусловлено активацией генов репарации ДНК *mei-9* и *окр*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература / References

1. A synopsis on aging-theories, mechanisms and future prospects / J. P. da Costa, R. Vitorino, G. M. Silva [et al.] // Ageing Res Rev. – 2016. – Vol. 29. – P. 90–112.
2. Targeting aging mechanisms: pharmacological perspectives / A. Moskalev, Z. Guvatova, I. A. Lopes [et al.] // Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM. – 2022. – Vol. 33, № 4. – P. 266–280.
3. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases / B. C. Das, P. Thapa, R. Karki [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2014. – Vol. 22, № 2. – P. 673–683.

4. Rastinejad, F. Retinoic acid receptor structures: the journey from single domains to full-length complex / F. Rastinejad // Journal of Molecular Endocrinology. – 2022. – Vol. 69, № 4. – P. T25–T36.
5. Das, B. C. Potential therapeutic roles of retinoids for prevention of neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease / B. C. Das, S. Dasgupta, S. K. Ray // Neural Regeneration Research. – 2019. – Vol. 14, № 11. – P. 1880–1892.
6. Wotoszynowska-Fraser, M. U. Vitamin A and retinoic acid in cognition and cognitive disease / M. U. Wotoszynowska-Fraser, A. Kouchmeshky, P. McCaffery // Annual Review of Nutrition. – 2020. – Vol. 40. – P. 247–272.
7. Targeting the retinoic acid signaling pathway as a modern precision therapy against cancers / K. Lavudi, S. M. Nuguri, Z. Olverson [et al.] // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2023. – Vol. 11. – P. 1254612.
8. Olsen, T. Retinol, retinoic acid, and retinol-binding protein 4 are differentially associated with cardiovascular disease, type 2 diabetes, and obesity: An overview of human studies / T. Olsen, R. Blomhoff // Advances in Nutrition (Bethesda, Md.). – 2020. – Vol. 11, № 3. – P. 644–666.
9. The role of retinoic acid receptor-related orphan receptors in skeletal diseases / Y. Zhang, J. Ma, X. Bao [et al.] // Frontiers in Endocrinology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1302736.
10. Quan, T. Human skin aging and the anti-aging properties of retinol / T. Quan // Biomolecules. – 2023. – Vol. 13, № 11. – P. 1614.
11. Long-term dietary administration of valproic acid does not affect, while retinoic acid decreases, the lifespan of G93A mice, a model for amyotrophic lateral sclerosis / C. Crochemore, M. Virgili, B. Bonamassa [et al.] // Muscle & Nerve. – 2009. – Vol. 39, № 4. – P. 548–552.
12. Youthful and age-related matreotypes predict drugs promoting longevity / C. Statzer, E. Jongasma, S. X. Liu [et al.] // Aging Cell. – 2021. – Vol. 20, № 9. – P. e13441.
13. Xia, B. Transgenerational programming of longevity and reproduction by post-eclosion dietary manipulation in *Drosophila* / B. Xia, J. S. de Belle // Aging. – 2016. – Vol. 8, № 5. – P. 1115–1134.
14. Hilton, J. F. An algorithm for conducting exact Smirnov tests / J. F. Hilton, C. R. Mehta, N. R. Patel // Computational Statistics and Data Analysis. – 1994. – Vol. 17, № 4. – P. 351–361.
15. Mantel, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration / N. Mantel // Cancer Chemotherapy Reports. Part 1. – 1966. – Vol. 50, № 3. – P. 163–170.
16. Martinez, R. L. A pretest for choosing between logrank and Wilcoxon tests in the two-sample problem / R. L. Martinez, D. A. Naranjo // Metron. – 2012. – Vol. 68, № 2. – P. 111–125.
17. Statistical methods for testing effects on 'maximum lifespan' / C. Wang, Q. Li, D. Redden [et al.] // Mechanisms of Ageing and Development. – 2004. – Vol. 125, № 9. – P. 629–632.

18. Intravenously administered, retinoid activating nanoparticles increase lifespan and reduce neurodegeneration in the SOD1G93A mouse model of ALS / D. X. Medina, E. P. Chung, C. D. Teague [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 224.
19. Long-term dietary administration of valproic acid does not affect, while retinoic acid decreases, the lifespan of G93A mice, a model for amyotrophic lateral sclerosis / C. Crochemore, M. Virgili, B. Bonamassa [et al.] // *Muscle & Nerv.* – 2009. – Vol. 39, № 4. – P. 548–552.
20. Almaguer, J. The contribution of hippocampal all-trans retinoic acid (ATRA) deficiency to Alzheimer's disease: A narrative overview of ATRA-dependent gene expression in post-mortem hippocampal tissue / J. Almaguer, A. Hindle, J. J. Lawrence // *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. – 2023. – Vol. 12, № 11. – P. 1921.
21. All-trans retinoic acid and rapamycin normalize Hutchinson Gilford progeria fibroblast phenotype / C. Pellegrini, M. Columbaro, C. Capanni [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, № 30. – P. 29914–29928.
22. A High Throughput Phenotypic Screening reveals compounds that counteract premature osteogenic differentiation of HGPS iPS-derived mesenchymal stem cells / A. Lo Cicero, A. L. Jaskowiak, A. L. Egesipe [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 34798.
23. Retinoic acid protects against lipopolysaccharide-induced ferroptotic liver injury and iron disorders by regulating Nrf2/HO-1 and RAR β signaling / X. Lai, A. Wu, Y. Bing [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2023. – Vol. 205. – P. 202–213.
24. Retinoic acid reduces kidney injury by regulating oxidative stress, NRF-2, and apoptosis in hyperoxic mice / O. Kayalar, B. B. Bayrak, M. Yildirim [et al.] // *Cell Biochemistry and Function*. – 2024. – Vol. 42, № 6. – P. e4094.
25. Siddikuzzaman, V. M. Grace. Anti-metastatic study of liposome-encapsulated all trans retinoic acid (ATRA) in B16F10 melanoma cells-implanted C57BL/6 mice / V. M. Grace Siddikuzzaman // *Cancer Investigation*. – 2014. – Vol. 32, № 10. – P. 507–517.
26. CAR T-cell-mediated delivery of bispecific innate immune cell engagers for neuroblastoma / G. Pascual-Pasto, B. McIntyre, M. G. Hines [et al.] // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 7141.
27. ATRA protects skin fibroblasts against UV induced oxidative damage through inhibition of E3 ligase Hrd1 / X. Cheng, W. Qian, F. Chen [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2019. – Vol. 20, № 3. – P. 2294–2302.
28. The effect of all-trans retinoic acid on the mitochondrial function and survival of cardiomyoblasts exposed to local photodamage / S. Kurekova, Z. S. Tomaskova, N. Andelova [et al.] // *Cell Biology International*. – 2022. – Vol. 46, № 6. – P. 947–964.
29. All-trans-retinoic acid induces RARB-dependent apoptosis via ROS induction and enhances cisplatin sensitivity by NRF2 downregulation in cholangiocarcinoma cells / S. Butsri, V. Kukongviriyapan, L. Senggunprai [et al.] // *Oncology Letters*. – 2022. – Vol. 23, № 6. – P. 179.
30. Mechanism of retinoic acid-induced transcription: histone code, DNA oxidation and formation of chromatin loops / C. Zuchegna, F. Aceto, A. Bertoni [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42, № 17. – P. 11040–11055.
31. All-trans retinoic acid and rapamycin normalize Hutchinson Gilford progeria fibroblast phenotype / C. Pellegrini, M. Columbaro, C. Capanni [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, № 30. – P. 29914–29928.
32. Rossetti, S. Emerging cancer epigenetic mechanisms regulated by all-trans retinoic acid / S. Rossetti, N. Sacchi // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12, № 8. – P. 2275.
33. Lifespan and stress resistance in *Drosophila* with overexpressed DNA repair genes / M. Shaposhnikov, E. Proshkina, L. Shilova [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 15299.
34. Sekelsky, J. DNA repair in *Drosophila*: Mutagens, models, and missing genes / J. Sekelsky // *Genetics*. – 2017. – Vol. 205, № 2. – P. 471–490.
35. The *Drosophila melanogaster* DmRAD54 gene plays a crucial role in double-strand break repair after P-element excision and acts synergistically with Ku70 in the repair of X-ray damage / R. Kooistra, A. Pastink, J. B. Zonneveld [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 1999. – Vol. 19, № 9. – P. 6269–6275.
36. Nucleotide excision repair capacity increases during differentiation of human embryonic carcinoma cells into neurons and muscle cells / W. Li, W. Liu, A. Kakoki [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2019. – Vol. 294, № 15. – P. 5914–5922.
37. The vitamin A derivative all-trans retinoic acid repairs amyloid- β -induced double-strand breaks in neural cells and in the murine neocortex / E. Gruz-Gibelli, N. Chessel, C. Allieux [et al.] // *Neural Plasticity*. – 2016. – P. 3707406.
38. Neuroprotection against amyloid- β -induced DNA double-strand breaks is mediated by multiple retinoic acid-dependent pathways / J. Colas, N. Chessel, A. Ouared [et al.] // *Neural Plasticity*. – 2020. – P. 9369815.
39. Влияние селективных препаратов, модулирующих ответ на повреждение ДНК, на радиустойчивость *Drosophila melanogaster* / Н. С. Уляшева, Е. Н. Прошкина, М. В. Шапошников [и др.] // *Известия Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Серия «Экспериментальная биология и экология»*. – 2022. – № 4 (56). – С. 69–75.

Vliyanie selektivnykh preparatov, moduliruyushchih otvet na povrezhdenie DNK, na radioustojchivost *Drosophila melanogaster* [Effect of selective drugs that modulate the response to DNA damage on the radioresistance of *Drosophila melanogaster*] / N. S. Ulyasheva, E. N. Proshkina, M. V. Shaposhnikov [et al.] / *Proceedings of the Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Series "Experimental Biology and Ecology"* – 2022. – N. 4 (56). – P. 69–75.

40. Tokarz, P. All-trans retinoic acid modulates DNA damage response and the expression of the VEGF-A and MKI67 genes in ARPE-19 cells subjected to oxidative stress / P. Tokarz, A. W. Piastowska-Ciesielska [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2016. – Vol. 17, № 6. – P. 898.
41. Susceptibility to DNA damage caused by abrogation of Rad54 homolog B: A putative mechanism for chemically induced cleft palate / W. Qiao, P. Huang, X. Wang [et al.] // Toxicology. – 2021. – Vol. 456. – P. 152772.

Благодарность (госзадание)

Исследования выполнены в рамках государственного задания по теме «Генетические механизмы стрессоустойчивости и контроля продолжительности жизни для поиска новых мишеней для геропротекторных вмешательств на модели *Drosophila melanogaster*» (№ 125013101228-2).

Acknowledgements (state task)

The study was carried out within the framework of the state task on the topic "Geneticheskie mekhanizmy stressoustoichivosti i kontrolya prodolzhitelnosti zhizni dlya poiska novykh mishenei dlya geroprotekornykh vmeshatelstv na modeli *Drosophila melanogaster* [Genetic mechanisms of stress tolerance and life expectancy control for the search of new targets for geroprotective interventions on the *Drosophila melanogaster* model]" (№ 125013101228-2).

Информация об авторах:

Тимушева Наталия Сергеевна – младший научный сотрудник Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук; Scopus Author ID 57221866830, <https://orcid.org/0000-0002-3326-055X> (167000, Российская Федерация, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28; e-mail: uliasheva.n.s@ib.komisc.ru).

Пакшина Наталья Ришатовна – младший научный сотрудник Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук; Scopus Author ID 57222155424, <https://orcid.org/0000-0003-2076-0755> (167000, Российская Федерация, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28; e-mail: pakshina.n.r@ib.komisc.ru).

Прошкина Екатерина Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук; Scopus Author ID 56801009300, <https://orcid.org/0000-0003-4558-1796> (167000, Российская Федерация, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28; e-mail: proshkina.e.n@ib.komisc.ru).

Москалев Алексей Александрович – профессор, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, Институт долголетия с клиникой восстановительной и профилактической медицины Российского научного центра хирургии имени академика Б. В. Петровского; Scopus Author ID 7003730453, ORCID 0000-0002-3248-1633 (Российская Федерация, г. Москва; e-mail: amoskalev@list.ru).

About the authors:

Natalia S. Timusheva – Junior Researcher at the Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Scopus Author ID 57221866830, <https://orcid.org/0000-0002-3326-055X> (28 Kommunisticheskaya st., 167000 Syktyvkar, Komi Republic, Russian Federation; e-mail: uliasheva.n.s@ib.komisc.ru).

Natalia R. Pakshina – Junior Researcher at the Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Scopus Author ID 57222155424, <https://orcid.org/0000-0003-2076-0755> (28 Kommunisticheskaya st., 167000 Syktyvkar, Komi Republic, Russian Federation; e-mail: pakshina.n.r@ib.komisc.ru).

Ekaterina N. Proshkina – Candidate of Sciences (Biology), Senior Researcher at the Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Scopus Author ID 56801009300, <https://orcid.org/0000-0003-4558-1796> (28 Kommunisticheskaya st., 167000 Syktyvkar, Komi Republic, Russian Federation; e-mail: proshkina.e.n@ib.komisc.ru).

Alexey A. Moskalev – Professor, Doctor of Sciences (Biology), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Institute of Longevity with a Clinic of Rehabilitation and Preventive Medicine, Russian Science Centre of Surgery named after Academician B. V. Petrovsky; Scopus Author ID 7003730453; ORCID 0000-0002-3248-1633 (2 Abrikosovskiy per., Building 1, Moscow, 119435 Russian Federation; e-mail: amoskalev@list.ru).

Для цитирования:

Анализ геропротекторного потенциала ретиноевой кислоты на модели *Drosophila melanogaster* / Н. С. Тимушева, Н. Р. Пакшина, Е. Н. Прошкина [и др.] // Известия Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Серия «Экспериментальная биология и экология». – 2025. – № 7 (83). – С. 5–13.

For citation:

Analiz geroprotekturnogo potenciala retinoevoj kisloty na modeli *Drosophila melanogaster* [Analysis of the geroprotective potential of retinoic acid in the *Drosophila melanogaster* model] / N. S. Timusheva, N. R. Pakshina, E. N. Proshkina [et al.] // Proceedings of the Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Series “Experimental Biology and Ecology”. – 2025. – № 7 (83). – P. 5–13.

Дата поступления статьи: 26.08.2024

Прошла рецензирование: 12.09.2024

Принято решение о публикации: 01.10.2024

Received: 26.08.2024

Reviewed: 12.09.2024

Accepted: 01.10.2024