

Ю. Е. Рушкевич, Т. А. Дубилей, Н. М. Кошель,
С. А. Мигован, Т. В. Тушинская

Государственное учреждение "Институт геронтологии
им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины", 04114 Киев

ГЕРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ БЛОКАТОРА μ-ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НАЛТРЕКСОНА У САМОК *DROSOPHILA MELANOGASTER*

В опытах на самках плодовых мух *D. melanogaster* изучали влияние малых доз блокатора μ-опиоидных рецепторов налтрексона на выживаемость и продолжительность жизни (ПЖ), а также на показатели, характеризующие локомоцию, интенсивность метаболизма и адаптационные возможности у 38–40-суточных насекомых. Налтрексон добавляли в питательную среду до конечной концентрации 0,1 мкг/мл. Дрозофилы подопытной группы потребляли такой корм в течение 48 ч 1 раз в неделю, начиная с 5 сут имагинальной жизни до смерти. Потребление питательной среды, содержащей налтрексон, повышало выживаемость и увеличивало максимальную ПЖ дрозофил, а также снижало потребление кислорода и усиливало влияние агониста мю-опиоидных рецепторов на двигательную активность мух. Дрозофилы, которые содержались на среде с налтрексоном, оказались подвижнее, чем контрольные животные аналогичного возраста: тесты фото- и геотаксиса удавалось выполнить большему числу мух, потреблявших налтрексон, причем за меньшее время по сравнению с контролем. Продолжительность наркотического сна, вызванного парами диэтилового эфира у мух, потреблявших налтрексон, была меньше, а устойчивость к голоданию — выше по сравнению с соответствующим возрастным контролем. Вместе с тем, потребление налтрексона снижало резистентность насекомых к тепловому шоку. Полученные результаты свидетельствуют о том, что потребление налтрексона в малых дозах наряду с повышением выживаемости и увеличением ПЖ дрозофил вызывало снижение интенсивности метаболизма и ап-регуляцию эндогенной опиоидной активности, а также привело к замедлению процесса старения, о чем свидетельствует относительное сохранение локомоции и устойчивости насекомых к метаболическому и токсическому стрессу.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, налтрексон, продолжительность жизни, газообмен, двигательная активность, стресс.

Настоящее время характеризуется прогрессирующим старением населения и потому требует поиска геропротекторных средств, которые способствуют не только долголетию как таковому, но и сохранению высокого качества жизни. Таким образом, в решении основной проблемы геронтологии — увеличении продолжительности жизни (ПЖ) наиболее перспективным представляется поиск геропротекторов, замедляющих процесс старения и одновременно активирующих процесс витаукта (антистарения) [5].

Активация процесса витаукта проявляется, в частности в восстановлении адаптационных возможностей стареющего организма и коррекции ряда возрастных функциональных нарушений, как было ранее показано нами в опытах на старых крысах с хронической электрической стимуляцией гипоталамических зон награды [1]. Таким образом, в тех экспериментах была продемонстрирована возможность увеличения ПЖ наряду с улучшением ее качества.

Возрастные изменения различных видов обмена и функций в процессе старения формируются в результате нарушения взаимодействия трех основных регуляторных систем организма — нервной, эндокринной и иммунной [48]. Как известно, в качестве сигнальных молекул в этой межсистемной коммуникации участвуют гормоны, цитокины и нейромедиаторы. По нашему мнению, среди множества перечисленных регуляторных компонентов особую роль играют эндогенные опиоиды, поскольку они непосредственно связаны с функционированием системы награды и весьма важны для обеспечения жизнедеятельности стареющего организма. В пользу этого свидетельствуют результаты наших опытов по восстановлению опиоидной регуляции у старых животных путем хронического применения агонистов, а также малых доз блокаторов опиоидных рецепторов. Как оказалось, оба типа воздействий на организм старых мышей и мух дрозофил способны привести к повышению выживаемости и увеличению ПЖ. [2, 4, 15]. Вместе с тем, применение блокаторов опиоидных рецепторов в качестве геропротекторов представляется более предпочтительным. Судя по данным литературы, в основе их эффективности лежит ап-регуляция собственной системы эндогенных опиоидов [14, 32, 40, 51], тогда как применение агонистов ассоциируется с принципом "заместительной терапии", а также может представлять опасность в виде формирования наркотической зависимости. До сих пор оставались неизученными механизмы геропротекторного действия малых доз блокаторов опиоидных рецепторов, а также их влияние на качество жизни стареющего организма.

Целью настоящей работы было изучить показатели, характеризующие состояние мух *Drosophila melanogaster*, стареющих на фоне хронического потребления блокатора мю-опиоидных рецепторов налтрексона.

Материал и методы. Эксперименты проведены на самках аутбредной лабораторной популяции *D. melanogaster* линии *Oregon-R*. Разведение и содержание контрольной популяции мух проводили при 25 °С на стандартной питательной среде, содержащей сахар, манную крупу, дрожжи,

бензойную кислоту и агар-агар. На 3 сутки после вылета отсортированных под эфирным наркозом мух рассаживали по 25 особей в пробирки высотой 150 мм и диаметром 15 мм, содержащие по 2 мл корма. Пересадку на свежий корм осуществляли 3 раза в неделю, одновременно проводя подсчет погибших насекомых. Условия потребления налтрексона были аналогичны тем, которые в наших предыдущих экспериментах способствовали повышению выживаемости и увеличению ПЖ мух: дрозофилы потребляли корм с препаратом в концентрации 0,1 мкг/мл 1 раз в неделю на протяжении 48 часов, начиная с 5 суток имагинальной жизни до смерти [4]. После полного вымирания дрозофил рассчитывали среднюю и максимальную ПЖ (максимальную ПЖ определяли как среднюю ПЖ 10% последних оставшихся в живых особей).

Часть мух из контрольной и подопытной групп в возрасте 38–40 сут была изъята для исследования газообмена, двигательной активности, а также устойчивости к голоданию, тепловому шоку и парам диэтилового эфира. Все исследования проводили через 6 сут после последнего применения налтрексона. Дополнительным контролем служили молодые мухи в возрасте 6–7 сут.

Для оценки двигательной активности мух пробирки, в которых они находились, извлекали из термостата, слегка встряхивали и размещали в специальной установке с видеокамерой. При изучении положительного фототаксиса пробирки устанавливали горизонтально, при этом нижняя часть пробирок накрывалась черной шторкой длиной 5 см. В течение 4 мин регистрировали перемещение мух из затемненной в освещенную часть пробирки, учитывая количество насекомых, проявивших фототаксис, а также время их выхода на свет. При изучении отрицательного геотаксиса пробирки располагали вертикально при равномерном освещении. В течение 4 мин регистрировали перемещение мух вверх по стенке пробирки до отметки 5 см, учитывая количество насекомых, поднявшихся на данную высоту, а также время их подъема. При тестировании чувствительности к морфину мухам за 24 часа до исследования отрицательного геотаксиса в корм добавляли гидрохлорид морфина в концентрации 0,25 мг/мл.

Для изучения интенсивности газообмена мух рассаживали по 10–20 особей в пластиковые пробирки объемом 5 мл с небольшим количеством (10–20 мг) стандартного корма. Пробирки помещали в пластиковые шприцы объемом 100 мл (по 3 пробирки в каждый) и, плотно закрыв носик шприца, выдерживали 6 часов в термостате при 25 °С. После этого пробу воздуха из шприца вводили в газоспектрометр (*Gerb MIJNHARDT*, Нидерланды) для определения содержания кислорода и углекислого газа.

Для изучения устойчивости к голоданию мух рассаживали по 10 особей в стеклянные пробирки без корма и через 18 ч регистрировали количество погибших насекомых.

Для изучения устойчивости к парам диэтилового эфира 18–20 мух отсаживали в пластиковую пробирку объемом 5 мл. На дно пробирки помещали вату, смоченную эфиром (20 мкл). Пробирку плотно закры-

вали пробкой на 2 мин, после чего насекомых высыпали на лист бумаги и регистрировали продолжительность наркотического сна.

Для изучения устойчивости к тепловому шоку мух рассаживали по 10–12 особей в стеклянные пробирки без корма. Пробирки помещали на 25 мин в термостат при 38 °С. Через 24 ч после окончания теста производили подсчет погибших насекомых.

Статистическую значимость групповых различий средней и максимальной ПЖ, показателей газообмена, двигательной активности (время реакции), длительности наркотического сна, устойчивости к голоданию и тепловому шоку оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Достоверность различий выживаемости определяли по критерию Колмогорова — Смирнова, различий в количестве насекомых, проявивших реакции фото- и геотаксиса — по критерию хи-квадрат. Для оценки влияния морфина на двигательную активность мух использовали двухфакторный дисперсионный анализ (*two-way ANOVA*) с последующим сравнением исследуемых групп по методу *Tukey HSD test*.

Результаты и их обсуждение. Жизнеспособность дрозофил, периодически потреблявших налтрексон, оказалась лучше, чем контрольных мух: применение препарата повышало выживаемость и увеличивало максимальную ПЖ насекомых (рис. 1, табл. 1).

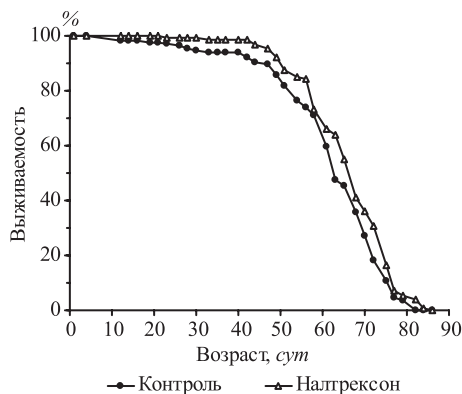


Рис. 1. Влияние налтрексона на выживаемость самок *D. melanogaster*.

Таблица 1

Влияние налтрексона на продолжительность жизни (ПЖ) самок *D. melanogaster*, сут ($M \pm m$)

Группа	Средняя ПЖ	Максимальная ПЖ
Контроль	62,2 ± 1,5 (166)	76,8 ± 0,3 (17)
Налтрексон	65,4 ± 1,8 (127)	78,8 ± 0,4*(13)

Примечания (здесь и в табл. 4): * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем, в скобках — количество особей в группе.

Для изучения геропротекторного действия налтрексона на следующем этапе работы исследовали его влияние на ряд показателей, харак-

теризующих состояние и адаптационные возможности 38–40-суточных дрозофил. Как известно, одной из важнейших характеристик функционального состояния мух является двигательная активность. С возрастом у дрозофил существенно снизились значения показателей, характеризующие локомоцию (табл. 2). В то же время, у мух, потреблявших налтрексон, значения этих показателей были лучше, чем у контрольных насекомых аналогичного возраста. Так, в группе мух, получавших препарат, количество животных, выполнивших тесты фототаксиса и геотаксиса, оказалось больше, чем в контроле. При этом промежуток времени, за который мухи, потреблявшие налтрексон, достигали финишной отметки в тесте на фототаксис, был меньше почти в 2 раза, а в тесте на геотаксис — более чем в 4 раза, чем у контрольных особей.

Таблица 2

Влияние налтрексона на возрастные изменения двигательной активности самок *D. melanogaster*, $M \pm m$

Показатель	6–7 сут	38–40 сут	
	контроль (100)	контроль (136)	налтрексон (150)
Фототаксис			
Количество вышедших в освещенную часть пробирки, %	100	17*	64*#
Продолжительность выхода первых 15 % мух, с	2,7 \pm 0,3	6,9 \pm 1,2*	3,5 \pm 0,7#
Геотаксис			
Количество поднявшихся до отметки 5 см, %	100	15*	25*#
Время подъема первых 15 % мух, с	5,5 \pm 0,4	120,7 \pm 19,3*	28,8 \pm 5,4*#

Примечания (здесь и в табл. 3): * — $P < 0,05$ по сравнению с 6–7-суточными контрольными мухами, # — $P < 0,05$ по сравнению с 38–40-суточными контрольными мухами, в скобках — количество особей в группе.

Адаптационные возможности организма можно оценить по результатам исследования его устойчивости к неблагоприятным влияниям окружающей среды. Для такой оценки мы использовали моделирование ряда экзогенных дестабилизирующих факторов: метаболического стресса, вызванного полным лишением пищи, химического стресса, вызванного токсическим действием паров диэтилового эфира, а также теплового стресса. Показано, что по сравнению с 6–7-суточными мухами (молодой контроль) у 38–40-суточных (старый контроль) снизилась устойчивость к голоданию, что проявилось в более высокой смертности, и устойчивость к парам диэтилового эфира, что проявилось в большей продолжительности наркотического сна (табл. 3). В то же время у 38–40-суточных дрозофил, потреблявших налтрексон, смертность в тесте на устойчивость к голоданию оказалась в 1,8 раза меньше по сравнению с соответствующим возрастным контролем, а продолжительность наркотического сна, вызванного парами диэтилового эфира, практически не отличалась от взрослого контроля. Таким образом, по-

требление налтрексона замедляло возрастные изменения двигательной активности, а также снижение устойчивости к голоданию и токсическому действию диэтилового эфира. Вместе с тем, дрозофилы, потреблявшие налтрексон, оказались менее устойчивыми к действию теплового шока, что проявилось в более высокой смертности по сравнению с контрольными мухами (см. табл. 3).

Таблица 3

Влияние налтрексона на смертность при голодании или тепловом шоке и длительность наркотического сна самок *D. melanogaster* разного возраста, $M \pm m$

Показатель	6–7 сут	38–40 сут	38–40 сут
	контроль	контроль	налтрексон
Смертность при голодании, %	11,2 ± 0,3 (100)	43,6 ± 3,5* (79)	24,4 ± 2,7*# (80)
Смертность при тепловом шоке, %	0,9 ± 0,9 (120)	26,1 ± 5,1* (97)	46,4 ± 7,2*# (93)
Длительность наркотического сна, с	520 ± 30 (20)	838 ± 31* (19)	503 ± 22# (18)

Принимая во внимание данные литературы о зависимости ПЖ дрозофил от интенсивности обменных процессов [34], мы исследовали влияние периодического потребления налтрексона на показатели газообмена. У дрозофил, получавших налтрексон, были обнаружены достоверное уменьшение скорости потребления кислорода и тенденция к уменьшению скорости выделения углекислого газа по сравнению с контрольными особями аналогичного возраста (табл. 4). Полученные данные свидетельствуют о снижении скорости обменных процессов у мух, потреблявших налтрексон.

Таблица 4

Влияние налтрексона на газообмен у самок *D. melanogaster*, $M \pm m$

Группа	CO ₂ , мл/(г·ч)	O ₂ , мл/(г·ч)	CO ₂ /O ₂
Контроль (112)	4,92 ± 0,27	5,78 ± 0,07	0,85 ± 0,04
Налтрексон (177)	4,52 ± 0,08	5,38 ± 0,13*	0,84 ± 0,02

Результаты настоящего исследования о влиянии налтрексона на выживаемость и ПЖ дрозофил в целом соответствуют полученным нами ранее [4]. Тогда было показано, что периодическое потребление дрозофилами и старыми мышами малых доз налтрексона увеличивало их выживаемость и среднюю ПЖ. По данным литературы, малые дозы налтрексона при хроническом применении у мышей и крыс вызывают ап-регуляцию эндогенной опиоидной активности [14, 36, 40], а у людей способствуют усилению стресс-резистентности, улучшению физического состояния, социального поведения и эмоционального статуса при терапии ряда заболеваний аутоиммунного, воспалительного и стрессорного генеза [8, 9, 13, 25, 45, 52]. Таким образом, ап-регуляция системы эндогенных опиоидов *a priori* представляется полезной для сохранения качества жизни стареющего организма. Известные данные литературы о влиянии на организм малых доз налтрексона в совокупности с результатами наших предыдущих исследований о благоприятном влиянии периодического потребления этого препарата на выживаемость и ПЖ старых мышей позволили

предположительно объяснить увеличение жизнеспособности таких животных с явлениями ап-регуляции эндогенной опиоидной активности [4]. В соответствии с данными литературы, действие налтрексона у насекомых такое же, как и у млекопитающих. Так, налтрексон блокирует вызванное морфином повышение порогов таких оборонительных реакций, как избегания боли у сверчков [53], активного оборонительного поведения у пчел [37], реакции страха у богомоллов [54], а также блокирует повышение локомоторной активности, вызванное морфином у тараканов [27].

Следует отметить, что действующие дозы налтрексона в опытах на насекомых соответствуют таковым у млекопитающих [37]. Примером сходного действия этого препарата на организм млекопитающих и насекомых являются также наши данные о благоприятном влиянии на жизнеспособность мух и мышей налтрексона в близких дозах (соответственно, 0,1 мг/кг и 0,15 мг/кг). На основании сказанного можно предположить, что увеличение выживаемости и ПЖ дрозофил, периодически потреблявших налтрексон, как в предыдущем [4], так и в данном исследовании было обусловлено опиоидной ап-регуляцией. Косвенным подтверждением такого предположения являются данные о влиянии морфина на двигательную активность дрозофил, предварительно потреблявших налтрексон (рис. 2). У этих насекомых отмечалось более выраженное по сравнению с контролем влияние морфина на показатели геотаксиса, что может свидетельствовать об увеличении чувствительности к морфину локомоторных механизмов вследствие роста числа и/или аффинитета μ -опиоидных рецепторов.

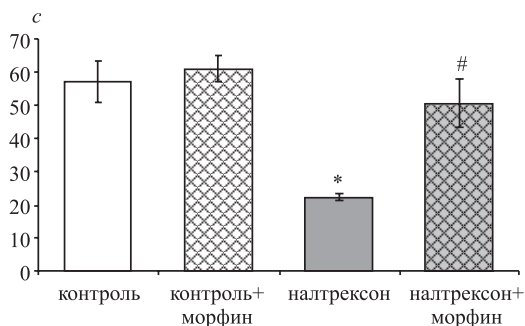


Рис. 2. Влияние морфина на скорость реакции геотаксиса у самок *D. melanogaster* в контроле и при потреблении налтрексона (в каждой группе по 30 мух); * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем, # — $P < 0,05$ по сравнению с налтрексоном.

Повышение жизнеспособности мух, потреблявших налтрексон, сопровождалось комплексом изменений, включавших в себя улучшение функционального состояния, изменение метаболизма и увеличение адаптационных возможностей. При изучении состояния как двигательной активности дрозофил обращает на себя внимание сходство ее возрастных изменений у млекопитающих (в частности, у крыс) и мух. Так, у крыс при старении снижается спонтанная и мотивированная двигательная актив-

ность [1, 3, 6]. То же самое происходит и у дрозофил. Показано, что у них уже на второй неделе жизни ослабевают гео- и фототаксис [44] и уменьшается расстояние, пройденное от точки отсчета [31]. Как известно, возрастное снижение двигательной активности, а также появление симптомов паркинсонизма у млекопитающих обусловлено ослаблением дофаминергической медиации [6]. По мнению ряда авторов, нарушения двигательной активности при экспериментальном паркинсонизме у дрозофил также обусловлены дефицитом дофамина, поскольку они исчезают при применении как его агонистов, так и *L-DOPA* [38]. На важную роль дофамина в осуществлении локомоции у дрозофил указывают данные о том, что у мутантов мух с дефицитом в мозге синтеза дофамина уменьшаются скорость передвижения, расстояние перемещения, ослабевают отрицательный геотаксис и положительный фототаксис, но эти изменения исправляются при помощи *L-DOPA* [41]. Также показано, что выраженность возрастных изменений дофаминмодулируемого поведения соответствовала снижению содержания дофамина в теле дрозофил, и были выявлены дегенеративные изменения в телах катехоламинергических клеток мозга старых мух [35]. Результаты нашего настоящего исследования о возрастных изменениях двигательной активности полностью согласуются с данными литературы. Так, в наших опытах у мух в возрасте 38–40 сут обнаружилось существенное снижение значений показателей фото- и геотаксиса, и данные литературы позволяют трактовать эти результаты как следствие возрастного угнетения дофаминмодулируемого поведения. Периодическое потребление налтрексона, вызвавшее ап-регуляцию эндогенной опиоидной активности, существенно ослабило выраженность возрастных изменений фото- и геотаксиса у дрозофил. Известно, что внутримозговое введение μ -опиоидных агонистов вызывает дофаминзависимое усиление локомоторной активности у грызунов [24, 28, 50]. Известно также сходство функционирования дофаминергических систем у грызунов и насекомых при формировании локомоторных проявлений в ответ на активацию опиоидных рецепторов агонистами, в частности морфином [7, 26, 53], а также сходство проявлений активации системы награды [10]. Таким образом, можно предположить, что сохранению локомоторной активности 38–40-суточных мух, потреблявших налтрексон, в наших экспериментах способствовала опиоидная ап-регуляция и, как следствие, рост функциональной активности дофаминергической системы.

Показано, что ПЖ дрозофил в значительной мере определяется интенсивностью метаболизма, о которой можно судить по скорости поглощения кислорода. Так, у дрозофил, потреблявших различные антиоксиданты, была обнаружена отрицательная корреляция между скоростью поглощения кислорода и средней ПЖ [34]. В наших опытах периодическое добавление в корм налтрексона также способствовало снижению потребления кислорода у дрозофил. Следует отметить, что аналогичное явление мы наблюдали у старых мышей через 9 мес потребления морфина по схеме, благоприятствующей выживаемости животных: $(6,0 \pm 0,2)$ л O_2 /(кг·ч) в контроле и $(5,1 \pm 0,3)$ л O_2 /(кг·ч) в опыте ($P < 0,05$) [2]. Снижение потребления кислорода в обоих случаях можно трактовать как феномен, затруд-

няющий образование активных форм кислорода и формирование возрастных деструктивных изменений, способствующих уменьшению ПЖ [16]. Схожесть изменений метаболизма (снижение потребления кислорода) при потреблении морфина и налтрексона позволяет предположить, что снижение интенсивности метаболизма у мух под влиянием налтрексона было обусловлено ап-регуляцией эндогенной опиоидной активности.

Возвращаясь к обсуждению благоприятного влияния налтрексона на двигательную активность 38–40-суточных дрозофил, следует привести известные данные о том, что у домашних мух снижение интенсивности метаболизма сопровождается увеличением ПЖ и ослабляет возрастное снижение активности полетов [46]. Таким образом, к замедлению типичных возрастных изменений моторики дрозофил в наших опытах могли быть причастны не только рост функциональной активности дофаминергической медиаторной системы, но и относительная сохранность дофаминергических нейронов в силу снижения интенсивности метаболизма.

В соответствии с данными литературы, устойчивость дрозофил к оксидативному стрессу при старении снижается в связи с ослаблением функций защитных систем клетки, в частности белков теплового шока и ферментов антиоксидантной защиты [16]. Результаты наших экспериментов свидетельствуют также о более высокой смертности от теплового шока 38–40-суточных контрольных мух по сравнению с молодыми. Оказалось также, что потребление налтрексона, которое способствовало снижению интенсивности метаболизма 38–40-суточных дрозофил в состоянии относительного покоя, не препятствовало развитию оксидативного стресса в условиях теплового шока. Более того, у мух, потреблявших налтрексон, выживаемость по окончании тепловой экспозиции оказалась ниже, чем у контрольных животных аналогичного возраста. Этому, возможно, способствовала "детренированность" систем антиоксидантной защиты вследствие хронического снижения потребления кислорода и недостаточного образования его активных форм, которые являются сигнальными молекулами митохондриального гормезиса и играют важную роль в устойчивости организма к оксидативному стрессу [42]. Однако следует отметить, что повторяющиеся и незначительные по силе стрессы, повышая устойчивость организма к сильному стрессу по механизму гормезиса, тем не менее, приводят к снижению ПЖ дрозофил [39].

Усилению влияния теплового шока на выживаемость мух, потреблявших налтрексон, также могли способствовать относительная сохранность дофаминергических структур вследствие замедления метаболизма и высокая дофаминергическая активность вследствие эндогенной опиоидной ап-регуляции. Известно, что тепловой стресс у дрозофил вызывает существенный рост содержания дофамина [22] и что окисление дофамина в нервных клетках приводит к образованию реактивных форм кислорода, которые помимо повреждающего действия индуцируют экспрессию μ -опиоидных рецепторов [30], т. е. способствуют эндогенной опиоидной ап-регуляции.

Вместе с тем, повышение активности дофаминергических систем у дрозофил, потреблявших налтрексон, могло благоприятствовать выжи-

ваемости животных в условиях полного голодания. Как известно, линейные мухи с относительно высоким содержанием дофамина хуже переносят тепловой шок, но лучше переживают голодание [19]. Аналогично при этих видах стресса ведут себя линейные самки дрозофил с высоким уровнем нейропептида коразонина, которому отводят роль гормона стресса [55]. По данным этих авторов, высокий уровень коразонина замедляет расход запасов триглицеридов и способствует выживаемости дрозофил при голодании. Известно также, что экспрессия μ -опиоидных рецепторов у дрозофил облегчает выделение коразонина из соответствующих нейроэндокринных клеток [43]. На основании приведенных данных можно предположить, что дрозофилы, потреблявшие налтрексон, вызвавший ап-регуляцию эндогенной опиоидной активности, имели преимущество в выживаемости при голодании, и это преимущество реализовалось при участии коразонина. Следует отметить, что масса тела контрольных дрозофил и мух, потреблявших налтрексон, существенно не различалась — соответственно, $(1,06 \pm 0,03)$ мг и $(1,09 \pm 0,03)$ мг.

Периодическое применение налтрексона также проявилось в уменьшении длительности наркотического сна 38–40-суточных дрозофил. Известно, что при старении у млекопитающих увеличивается продолжительность наркотического сна, вызванного введением этанола или диазепама, что предположительно обусловлено изменениями фармакокинетики либо возрастными сдвигами в точках приложения действия препаратов [20]. Увеличение продолжительности сна 38–40-суточных дрозофил, вызванного парами диэтилового эфира, показано в настоящей работе. Известны несколько возможных точек приложения действия диэтилового эфира у дрозофил. Так, предполагается, что мишенью для эфира могут быть натриевые каналы и кальцийсвязывающий белок эндоплазматического ретикулума — кальретикулин [18], причем чувствительность к эфиру в большей мере зависит от полиморфизма локуса, кодирующего натриевые каналы, чем от других причин (например, состояния мембран) [47]. Показано также, что эфирный наркоз более продолжителен у мух с нарушением функции гистамин-регулируемых хлорных каналов [23]. Продолжительность наркотического сна дрозофил, возможно, зависит от состояния гена *shaker*, кодирующего потенциалзависимые калиевые каналы, которые контролируют реполяризацию мембраны и освобождение медиаторов. Мутация *shaker* приводит к резкому сокращению сна и снижению чувствительности к действию наркоза [12]. Активность калиевых каналов в мозге дрозофил снижается также в результате мутации гена *sleepless*, что приводит к уменьшению продолжительности сна [29].

Следует отметить, что сон у дрозофил и млекопитающих имеет много общих черт: продолжительность сна зависит от циркадной и гомеостатической регуляции, связана с изменениями активности мозга, характеризуется изменениями экспрессии сотен генов, состоит из периодов устойчивого покоя, связанного с повышенным порогом возбуждения, и модулируется возбуждающими и снотворными препаратами [11]. Пробуждение дрозофил так же, как и позвоночных, осуществ-

вляется при участии дофамина [49], а снижение или рост активности *cAMP* и *CREB*, соответственно, замедляет или ускоряет пробуждение [21]. Известно также, что у дрозофил регуляция сна осуществляется при тесном взаимодействии двух центральных систем — нейрогуморальной (элементом которой является эпидермальный фактор роста) и нейромодулирующей дофаминергической системы. Показано, что активация первой системы увеличивает продолжительность сна, а активация второй способствует пробуждению [17]. Установлено, что при старении у крыс базальная тирозинкиназная активность рецептора эпидермального фактора роста существенно растет [33]. Аналогичное явление, а также возрастная недостаточность дофаминергической медиаторной системы у 38–40-суточных дрозофил могли бы способствовать увеличению продолжительности эфирного сна в наших экспериментах. Напротив, можно предположить, что ап-регуляция эндогенной опиоидной активности, вызванная периодическим применением налтрексона и способствующая увеличению активности *cAMP* и *CREB* и восстановлению дофаминергической медиации, ускоряла пробуждение дрозофил от эфирного наркотического сна.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что периодическое потребление налтрексона наряду с повышением выживаемости и увеличением ПЖ дрозофил замедляло такие проявления старения, как ухудшение локомоции, снижение жизнеспособности в условиях голодания и увеличение чувствительности к токсическому действию эфира. Приведенные результаты можно трактовать как качественные показатели улучшения функционального состояния и повышения адаптационных возможностей 38–40-суточных дрозофил, периодически потреблявших налтрексон. Вместе с тем, снижение их жизнеспособности в условиях теплового шока может свидетельствовать о неблагоприятном влиянии препарата на адаптацию к данному виду стресса. Основными механизмами геропротекторного действия налтрексона в наших опытах представляются ап-регуляция эндогенной опиоидной активности и сохранение дофаминергической регуляции. Также, учитывая роль дофамина как основного медиатора положительного подкрепления у дрозофил [10], можно предположить относительное сохранение функций системы награды у мух, потреблявших налтрексон. Это представляется важным компонентом геропротекторного действия этого препарата, поскольку поддержание функционального состояния системы положительного подкрепления у старых животных способствует повышению выживаемости и увеличению ПЖ [1].

Список использованной литературы

1. Безруков В. В., Дубилей Т. А., Рушкевич Ю. Е. Роль эмоциогенных зон гипоталамуса в геронтогенезе // Пробл. старения и долголетия. — 2008. — 17, № 2. — С. 115–128.
2. Дубилей Т. А., Рушкевич Ю. Е., Пишель И. Н. Влияние агониста опиоидных рецепторов на продолжительность жизни старых мышей // Пробл. старения и долголетия. — 2000. — 9, № 4. — С. 331–335.

3. Рушкевич Ю. Е., Дубилей Т. А. Адаптогенное действие хронической электрической стимуляции латеральной гипоталамической рбласти у старых крыс // Пробл. старения и долголетия. — 2006. — **15**, № 1. — С. 3–12.
4. Рушкевич Ю. Е., Кошель Н. М., Мигован С. А. и др. Влияние налтрексона на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* и старых мышей // Пробл. старения и долголетия. — 2013. — **22**, № 1. — С. 18–28.
5. Фролькис В. В. Геронтология: прогнозы и гипотезы // Журн. АМН Украины. — 1998. — **4**, № 3. — С. 434–448.
6. Фролькис В. В., Бурчинский С. Г., Рушкевич Ю. Е. Возрастные предпосылки развития паркинсонизма // Журн. невропатол. и психиатрии. — 1988. — № 9. — С. 137–145.
7. Becker A., Grecksch G., Kraus J. et al. Loss of locomotor sensitisation in response to morphine in D1 receptor deficient mice // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. — 2001. — **365**, № 5. — P. 562–568.
8. Bouvard M. P., Leboyer M., Launay J. M. Low-dose naltrexone effects on plasma chemistries and clinical symptoms in autism: a double-blind, placebo-controlled study // Psychiatry Res. — 1995. — **58**, № 3. — P. 191–201.
9. Brown N., Panksepp J. Low-dose naltrexone for disease prevention and quality of life // Med. Hypotheses. — 2009. — **72**, № 3. — P. 333–337.
10. Burke C. J., Huetteroth W., Oswald D. et al. Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila* // Nature. — 2012. — **492**, № 7429. — P. 433–437.
11. Cirelli C. Sleep disruption, oxidative stress, and aging: New insights from fruit flies // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — **103**, № 38. — P. 13901–13902.
12. Cirelli C., Bushey D., Hill S. et al. Reduced sleep in *Drosophila* Shaker mutants // Nature. — 2005. — **434**, № 7037. — P. 1087–1092.
13. Cree B. A., Kornyejeva E., Goodin D. S. Pilot trial of low-dose naltrexone and quality of life in multiple sclerosis // Ann. Neurol. — 2010. — **68**, № 2. — P. 145–150.
14. Diaz A., Pazos A., Flyrez J. et al. Regulation of mu-opioid receptors, G-protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in the rat brain after chronic opioid receptor antagonism // Neurosci. — 2002. — **112**, № 2. — P. 345–353.
15. Dubiley T. A., Rushkevich Y. E., Koshel N. M. et al. Life span extension in *Drosophila melanogaster* induced by morphine // Biogerontology. — 2011. — **12**, № 3. — P. 179–184.
16. Fleming J. E., Reveillaud I., Niedzwiecki A. Role of oxidative stress in *Drosophila* aging // Mutat. Res. — 1992. — **275**, № 3–6. — P. 267–279.
17. Foltenyi K., Andretic R., Newport J. W., Greenspan R. J. Neurohormonal and neuromodulatory control of sleep in *Drosophila* // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. — 2007. — **72**. — P. 565–571.
18. Gamo S., Dodo K., Matakatsu H., Tanaka Y. Molecular genetical analysis of *Drosophila* ether sensitive mutants // Toxicol. Lett. — 1998. — **100–101**. — P. 329–337.
19. Gruntenko N., Chentsova N. A., Bogomolova E. V. et al. The effect of mutations altering biogenic amine metabolism in *Drosophila* on viability and the response to environmental stresses // Arch. Insect. Biochem. Physiol. — 2004. — **55**, № 2. — P. 55–67.
20. Guthrie S., Cooper R. L., Thurman R., Linnoila M. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of ethanol, diazepam and pentobarbital in young and aged rats // Pharmacol. Toxicol. — 1987. — **61**, № 5. — P. 308–312.
21. Hendricks J. C. Invited review: Sleeping flies don't lie: the use of *Drosophila melanogaster* to study sleep and circadian rhythms // J. Appl. Physiol. — 2003. — **94**, № 4. — P. 1660–1672.

22. Hirashima A., Sukhanova M. Jh., Rauschenbach I. Yu. Biogenic amines in *Drosophila virilis* under stress conditions // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2000. — **64**, № 12. — P. 2625–2630.
23. Iovchev M., Kodrov P., Wolstenholme A. J. et al. Altered drug resistance and recovery from paralysis in *Drosophila melanogaster* with a deficient histamine-gated chloride channel // J. Neurogenet. — 2002. — **16**, № 4. — P. 249–261.
24. Johnson P. I., Napier T. C. Ventral pallidal injections of a mu antagonist block the development of behavioral sensitization to systemic morphine // Synapse. — 2000. — **38**, № 1. — P. 61–70.
25. Kariv R., Tiomny E., Grenshpon R. et al. Low-dose naltrexone for the treatment of irritable bowel syndrome: a pilot study // Dig. Dis. Sci. — 2006. — **51**, № 12. — P. 2128–2133.
26. Kaun K. R., Devineni A. V., Heberlein U. *Drosophila melanogaster* as a model to study drug addiction // Hum. Genet. — 2012. — **131**, № 6. — P. 959–975.
27. Kavaliers M., Guglick M. A., Hirst M. Opioid involvement in the control of feeding in an insect, the American cockroach // Life Sci. — 1987. — **40**, № 7. — P. 665–672.
28. Klitenick M. A., Kalivas P. W. Behavioral and neurochemical studies of opioid effects in the pedunculopontine nucleus and mediodorsal thalamus // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1994. — **269**, № 1. — P. 437–448.
29. Koh K., Joiner W. J., Wu M. N., Yue Z. Identification of SLEEPLESS, a sleep-promoting factor // Science. — 2008. — **321**, № 5887. — P. 372–376.
30. Langsdorf E. F., Chang S. L. Methamphetamine-mediated modulation of MOR expression in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line // Synapse. — 2011. — **65**, № 9. — P. 858–865.
31. Le Bourg E. Patterns of movement and ageing in *Drosophila melanogaster* // Arch. Gerontol. Geriatr. — 1983. — **2**, № 4. — P. 299–306.
32. Lesscher H. M., Bailey A., Burbach J. P. et al. Receptor-selective changes in mu-, delta- and kappa-opioid receptors after chronic naltrexone treatment in mice // Eur. J. Neurosci. — 2003. — **17**, № 5. — P. 1006–1012.
33. Malecka-Panas E., Relan N. K., Majumdar A. P. Increased activation of EGF-receptor tyrosine kinase by EGF and TGF-alpha in the colonic mucosa of aged rats // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. — 1996. — **51**, № 1. — P. B 60–65.
34. Miquel J., Fleming J., Economos A. C. Antioxidants, metabolic rate and aging in *Drosophila* // Arch. Gerontol. Geriatr. — 1982. — **1**, № 2. — P. 159–165.
35. Neckameyer W. S., Woodrome S., Holt B., Mayer A. Dopamine and senescence in *Drosophila melanogaster* // Neurobiol. Aging. — 2000. — **21**, № 1. — P. 145–152.
36. Neisewander J. L., Nonneman A. J., Rowlett J. K., Bardo M. T. Impaired supersensitivity to morphine following chronic naltrexone treatment in senescent rats // Neurobiol. Aging. — 1994. — **15**, № 1. — P. 91–97.
37. Núñez J., Maldonado H., Miralto A., Balderrama N. The stinging response of the honeybee: effects of morphine, naloxone and some opioid peptides // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1983. — **19**, № 16. — P. 921–924.
38. Pendleton R. G., Parvez F., Sayed M., Hillman R. J. Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster* // Pharmacol. Exp. Ther. — 2002. — **300**, № 1. — P. 91–96.
39. Pickering A. M., Vojtovich L., Tower J. A., Davies K. J. Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repeated stress // Free Radic. Biol. Med. — 2012. — **55**. — P. 109–118.
40. Rajashekara V., Patel C. N., Patel K. et al. Chronic opioid antagonist treatment dose-dependently regulates mu-opioid receptors and trafficking proteins in vivo // Pharmacol. Biochem. Behav. — 2003. — **75**, № 4. — P. 909–913.

41. *Riemensperger T., Isabel G., Coulom H.* et al. Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2011. — **108**, № 2. — P. 834–839.
42. *Ristow M., Schmeisser S.* Extending life span by increasing oxidative stress // *Free Radic. Biol. Med.* — 2011. — **51**, № 2. — P. 327–336.
43. *Sellami A., Isabel G., Veenstra J. A.* Expression of the mu opioid receptor in *Drosophila* and its effects on trehalose and glycogen when expressed by the AKH neuroendocrine cells // *Peptides.* — 2010. — **31**, № 7. — P. 1383–1389.
44. *Simon A. F., Liang D. T., Krantz D. E.* Differential decline in behavioral performance of *Drosophila melanogaster* with age // *Mech. Ageing Dev.* — 2006. — **127**, № 7. — P. 647–651.
45. *Smith J. P., Stock H., Bingaman S.* et al. Low-dose naltrexone therapy improves active Crohn's disease // *Am. J. Gastroenterol.* — 2007. — **102**, № 4. — P. 820–828.
46. *Sohal R. S., Runnels J. H.* Effect of experimentally-prolonged life span on flight performance of houseflies // *Exp. Gerontol.* — 1986. — **21**, № 6. — P. 509–514.
47. *Tanaka Y., Gamo S.* Sensitivity to diethylether anesthesia of fruit flies primarily depends on the genotypes of the sodium channel gene rather than the states of the membranes and the mechanisms might be different from heat-induced paralysis // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* — 2001. — **22**, № 1. — P. 39–53.
48. *Tosato M., Zamboni V., Ferrini A., Cesari M.* The aging process and potential interventions to extend life expectancy // *Clin. Interv. Aging.* — 2007. — **2**, № 3. — P. 401–412.
49. *Ueno T., Tomita J., Tanimoto H.* et al. Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila* // *Nat. Neurosci.* — 2012. — **15**, № 11. — P. 1516–1523.
50. *Vežina P., Kalivas P. W., Stewart J.* Sensitization occurs to the locomotor effects of morphine and the specific mu opioid receptor agonist, DAGO, administered repeatedly to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens // *Brain Res.* — 1987. — **417**, № 1. — P. 51–58.
51. *Yoburn B. C., Shah S., Chan K.* et al. Supersensitivity to opioid analgesics following chronic opioid antagonist treatment: relationship to receptor selectivity // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 1995. — **51**, № 2–3. — P. 535–539.
52. *Younger J., Mackey S.* Fibromyalgia symptoms are reduced by low-dose naltrexone: a pilot study // *Pain Med.* — 2009. — **10**, № 4. — P. 663–672.
53. *Zabala N. A., Gymez M. A.* Morphine analgesia, tolerance and addiction in the cricket *Pteronemobius sp. (Orthoptera, Insecta)* // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 1991. — **40**, № 4. — P. 887–891.
54. *Zabala N. A., Miralto A., Maldonado H.* et al. Opiate receptor in praying mantis: effect of morphine and naloxone // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 1984. — **20**, № 5. — P. 683–687.
55. *Zhao Y., Bretz C. A., Hawksworth S. A.* Corazonin neurons function in sexually dimorphic circuitry that shape behavioral responses to stress in *Drosophila* // *PLoS One.* — 2010. — **5**, № 2. — P. 9141.

Поступила 15.05.2013

**ГЕРОПРОТЕКТОРНИЙ ЕФЕКТ БЛОКАТОРА
 μ -ОПІОІДНИХ РЕЦЕПТОРІВ НАЛТРЕКСОНА
У САМИЦЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

**Ю. Є. Рушкевич, Т. О. Дубілей, Н. М. Кошель,
С. А. Мигован, Т. В. Тушинська**

Державна установа "Інститут геронтології
ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України", 04114 Київ

У дослідях на самицях плодових мух *D. melanogaster* вивчали вплив малих доз блокатора μ -опіоїдних рецепторів налтрексона на виживаність і тривалість життя (ТЖ), а також на показники, що характеризують локомоцію, інтенсивність метаболізму та адаптаційні можливості у 38–40-добових комах. Налтрексон додавали в живильне середовище до кінцевої концентрації 0,1 мкг/мл. Дрозофіли піддослідної групи споживали такий корм протягом 48 год 1 раз у тиждень, починаючи з 5 діб імагінального життя до смерті. Споживання живильного середовища з налтрексоном підвищувало виживаність і збільшувало максимальну ТЖ дрозофіл, а також знижувало споживання кисню й підсилювало вплив агоніста μ -опіоїдних рецепторів на рухову активність мух. Дрозофіли, які утримувалися на середовищі з налтрексоном, виявилися більш рухливими, ніж контрольні тварини аналогічного віку: тести фото- і геотаксиса вдавалося виконати більшому числу мух, що споживали налтрексон, причому за менший час у порівнянні з контролем. Тривалість наркотичного сну, викликаного парами диетилового ефіру у мух, що споживали налтрексон, була менше, а стійкість до голодування — вище у порівнянні з відповідним віковим контролем. Разом з тим, споживання налтрексона знижувало резистентність комах до теплового шоку. Отримані результати свідчать про те, що споживання налтрексона в малих дозах поряд із підвищенням виживаності й збільшенням ТЖ дрозофіл викликало зниження інтенсивності метаболізму й ап-регуляцію ендогенної опіоїдної активності, а також призвело до вповільнення процесу старіння, про що свідчить відносно збереження локомоції та стійкості комах до метаболіческого й токсичного стресу.

**GEROPROTECTIVE EFFECT OF THE BLOCKER OF
μ-OPIOID RECEPTORS NALTREXON IN FEMALE
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

**Yu. E. Rushkevich, T. A. Dubiley, N. M. Koshel, S. A. Migovan,
T. V. Tushinskaia**

State Institution "D. F. Chebotarev Institute of Gerontology
NAMS Ukraine", 04114 Kyiv

The effects of small doses of Naltrexon — μ-opioid receptors blocker — on the survival and life span (LS), as well as on the indices, which characterize locomotion, intensity of metabolism and adaptive capacities, were studied in 38–40-day-old female *D. melanogaster*. Naltrexon was added to nutrient medium to final concentration of 0.1 mcg/ml. Insects of experimental group consumed such feed during 48 h once a week, starting from day 5 of imaginable life till death.

The consumption of nutrient medium containing Naltrexon increase survival rate and increased maximal LS of flies. Also it decreased oxygen consumption and enhanced the effect of agonist of μ-opioid receptors on motor activity of flies. Flies on Naltrexon vs. control flies of the same age proved to be more mobile: more Naltrexon-fed flies managed to perform photo- and geotaxis tests within a shorter period of time compared to control flies. The duration of ether vapor-induced narcotic sleep of flies on Naltrexon was shorter, while stability to starvation — higher compared to related age control. At the same time, the intake of Naltrexon decreased resistance of insects to thermal shock. The results obtained suggest that the use of small doses of Naltrexon increased survival rate and LS of flies, as well as induced decrease of intensity of metabolism and up-regulation of the endogenous opioid activity. Another finding was a deceleration of the aging process demonstrated by relative maintenance of locomotion and stability of insects to metabolic and toxic stress.

Сведения об авторах

Ю. Е. Рушкевич — в.н.с. лаборатории физиологии, к.м.н.

Н. М. Кошель — в.н.с. лаборатории математического моделирования процессов старения, к.б.н.

Лаборатория эндокринологии

Т. А. Дубилей — зав. лаб., к.б.н. (dubiley@geront.kiev.ua)

С. А. Мигован — н.с.

Т. В. Тушинская — н.с.