

На правах рукописи



ВОЙТЕНКОВ
Владислав Борисович

**ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА
НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ
И РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ У МЫШЕЙ**

14.00.53 – геронтология и гериатрия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург –2009



Работа выполнена в отделе канцерогенеза и онкогеронтологии
ФГУ НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова Росмедтехнологий

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Анисимов Владимир Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, доцент,
кандидат медицинских наук,
Чалисова Наталья Иосифовна

доктор медицинских наук
Евсюкова Елена Владимировна

Ведущая организация:

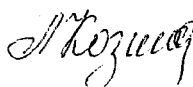
ГОУ ДПО ФАЗСР «Санкт-Петербургская медицинская академия
последипломного образования» Росздрава РФ

Защита диссертации состоится 29 04 2009 г.
в 13 00 часов на заседании диссертационного совета Д601.001.01
при Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии
СЗО РАМН по адресу: 197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке
Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО
РАМН (197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д.3).

Автореферат разослан «19» 03 2009 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент



Козина Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время происходит быстрое увеличение в популяции доли пожилых людей и рост связанной с возрастом патологии [Анисимов В.Н., 2003]. Именно поэтому поиск препаратов, обладающих способностью к замедлению процесса старения и повышению качества жизни пожилых, является одной из основных задач геронтологии и гериатрии.

В последние годы большое внимание уделялось изучению регуляторных пептидов – класса веществ, обладающих способностью к поддержанию стабильности функций организма в норме и патологии [Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н., 2003]. К этому классу относится и дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП), эндогенный нонапептид, открытый в 1976 г [Monnier M., Schoenenberger C.A., 1976] ДСИП является нейропептидом [Стрекалова Т.В., 1998], участвующим в большинстве межмедиаторных взаимодействий [Михалева И.И., 2003].

Многочисленные экспериментальные исследования позволили установить, что наиболее важными физиологическими эффектами ДСИП являются: регуляция процессов перекисного окисления липидов путем повышения выработки супероксиддисмутазы (СОД) и других ферментов антиокислительной защиты, стимуляция выработки гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и повышение сродства рецепторов к ней, продопаминаргическое действие, антистрессорная активность, выражающаяся в снижении летальности и клинических проявлений при различных типах стресса, иммуномодулирующее и антидиабетическое действия, мембраностабилизирующий эффект, противошоковое действие [Ульянинский Л.С. с соавт., 1992; Шандра А.А. с соавт., 1995; Сергутина А.В., Герштейн Л.М., 2000; Судаков К.В. с соавт., 2003; П.Е. Умрюхин с соавт., 2003].

Вещества с подобными эффектами часто обладают в силу своих свойств геропротекторной активностью [Анисимов В.Н., 2003]. При изучении активности геропротекторов важной является оценка различных параметров старения, а также физического и эмоционального состояния, отражающих общее состояние и качество жизни.

Сложное и разностороннее взаимодействие между процессами старения и канцерогенеза диктует необходимость изучения этих процессов в совокупности [Anisimov V.N., 1987]. Вещества, обладающие геропротекторной активностью, могут оказывать различное воздействие на канцерогенез: как усиливать, так и ослаблять его [Анисимов В.Н., 2003; Blask D.E. et al., 2004].

Действие ДСИП на спонтанный канцерогенез изучено недостаточно [Попович И.Г., 2003], в связи с чем представляется обоснованным его исследование. Данные о влиянии ДСИП на индуцируемый канцерогенез отсутствуют.

Таким образом, изучение возможного геро- и онкопротекторного действия ДСИП с использованием моделей оценки физической силы, интеллектуально-мнестических качеств, эмоционального состояния подопытных животных, канцерогенов различного механизма действия и разной органной специфичности является весьма актуальным направлением экспериментальной геронтологии.

Цель исследования. Изучить влияние дельта-сон индуцирующего пептида на продолжительность и качество жизни мышей, процессы перекисного окисления липидов, спонтанный и индуцированный канцерогенез.

Задачи исследования

1) Изучить влияние препарата пептида дельта-сна на продолжительность жизни мышей.

2) Изучить влияние препарата пептида дельта-сна на показатели локомоторной активности мышей в тесте «открытое поле» и тесте удержания на струне.

3) Изучить влияние препарата пептида дельта-сна на показатели эмоционального состояния и стресс-устойчивости мышей в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».

4) Изучить влияние препарата пептида дельта-сна на когнитивные показатели мышей в тесте «восьмилучевой радиальный лабиринт».

5) Изучить влияние препарата пептида дельта-сна на показатели активности ферментов антиоксидантной защиты у мышей в норме и в условиях светового стресса (постоянного освещения).

6) Изучить влияние препарата пептида дельта-сна на спонтанный канцерогенез у мышей.

7) Изучить влияние препарата пептида дельта-сна на канцерогенез легких, индуцируемых уретаном у мышей.

8) Изучить влияние препарата пептида дельта-сна на канцерогенез опухолей мягких тканей, индуцируемых бенз(а)пиреном у мышей.

Научная новизна. В работе впервые исследовано влияние препарата пептида дельта-сна на показатели поведения мышей в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт», «восьмилучевой радиальный лабиринт», продемонстрировано его анксиолитическое и стресс-протективное действие. Показано, что препарат пептида дельта-сна обладает геропротекторной активностью с продлением жизни последних 10% мышей на 16%. В работе доказано, что постоянное освещение даже небольшой длительности приводит к достоверным сдвигам перекисного окисления липидов в организме подопытных животных. Продemonстрировано антиоксидантное действие препарата пептида дельта-сна в условиях постоянного освещения. Показано, что препарат пептида дельта-сна оказывает достоверное

замедляющее действие на развитие спонтанных опухолей у мышей и канцерогенез легких.

В работе впервые изучено и проанализировано влияние препарата пептида дельта-сна на индуцируемый уретаном и бенз(а)пиреном канцерогенез. Показано, что введение препарата пептида дельта-сна не обладает проканцерогенным действием ни в одной из использованных моделей.

Научно-практическая значимость работы

Полученные результаты могут служить экспериментальным обоснованием для дальнейшего изучения геро- и онкопротекторного потенциала препарата пептида дельта-сна, разработки научно-обоснованных рекомендаций по применению препарата пептида дельта-сна в качестве геропротектора и с целью профилактики злокачественных новообразований.

Результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую работу отдела канцерогенеза и онкогеронтологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова.

Положения, выносимые на защиту

1) Введение препарата пептида дельта-сна в дозе 5 мкг/кг увеличивает среднюю продолжительность жизни последних 10% выживших мышей.

2) Препарат пептида дельта-сна оказывает достоверное стресс-протективное влияние на поведение мышей в условиях теста открытого поля, достоверное анксиолитическое и стресс-протективное действие у мышей в условиях теста «приподнятый крестообразный лабиринт».

3) Препарат пептида дельта-сна достоверным образом не изменяет когнитивные показатели мышей в тесте «восьмилучевой радиальный лабиринт».

4) Препарат пептида дельта-сна повышает активность супероксиддисмутазы мозга и общей антиокислительной активности печени в условиях постоянного освещения.

5) Препарат пептида дельта-сна оказывает достоверное замедляющее действие на время возникновения опухолей при спонтанном канцерогенезе у мышей.

6) Препарат пептида дельта-сна не оказывает проканцерогенного действия при канцерогенезе легких, индуцируемом уретаном, и при канцерогенезе мягких тканей, индуцируемом бенз(а)пиреном у мышей.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах по перечню ВАК Минобрнауки РФ.

Связь с планом НИР

Работа выполнялась в соответствии с научной тематикой отдела канцерогенеза и онкогеронтологии НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 131 странице, документирована 15 таблицами и иллюстрирована 23 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, изложения собственных результатов (5 глав), обсуждения полученных результатов, выводов и библиографического указателя, включающего 347 источников, в том числе 163 отечественных и 184 иностранных.

Апробация диссертации

Результаты работы были доложены и обсуждены на VI Европейском конгрессе Международной ассоциации геронтологии и гериатрии (Санкт-Петербург, 2007), III научно-практической геронтологической конференции с международным участием «Пушкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2007), V конференции молодых ученых России «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» (Москва, 2008), Конгрессе с международным участием «Пароксизмальный мозг. Мультидисциплинарный подход к проблеме» (Санкт-Петербург, 2008).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и исследуемые препараты

Препарат пептида дельта-сна «Дельтаран» (дельтараг-лиофилизированный, предоставлен фирмой «НТЦ КОМКОН») состоит из собственно пептида дельта-сна (нонапептид структуры Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu) и наполнителя – глицина. Препарат ампулированный каждая ампула содержит 0,003 мг пептида дельта-сна.

В эксперименте по изучению воздействия введения дельтарана на индуцированный уретаном и бенз(а)пиреном канцерогенез препарат вводили подкожно последовательными курсами по 5 дней в дозе 5 мкг/мышь в сутки ежемесячно в течение 1 недели, с началом через неделю после введения канцерогенов.

В эксперименте по изучению влияния дельтарана на интенсивности свободнорадикальных процессов в условиях нормального освещения и светового стресса дельтаран вводили подкожно однократным 5-ти дневным курсом в дозе 5 мкг/мышь в сутки.

В опытах использовали 260 самок мышей линии SHR, полученных из питомника «Рапполово» РАМН. Животные содержались по 10 особей в полипропиленовых клетках. Они получали стандартный лабораторный корм и водопроводную воду без ограничений. Основная группа животных содержалась при режиме освещения 12:12 часов и температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

В первой серии экспериментов мыши в течение всей жизни, начиная с трехмесячного возраста, получали препарат пептида дельта-сна «Дельтаран» по вышеописанной схеме, или физиологический раствор хлористого натрия подкожно по 0,1 мл 0,9% раствора.

Всех мышей ежемесячно взвешивали. Каждые 2 месяца, в те же сроки, что и взвешивание, производили определение количества потребляемого корма из расчета массы съеденного корма в граммах на одну мышшь и количества потребленной воды из расчета объема выпитой воды на одну мышшь. Каждые 3 месяца до достижения возраста 1 года исследовали двигательную активность мышей, их мышечную силу и утомляемость. В возрасте 21 месяца у последних выживших мышей была проведена заключительная оценка двигательной активности, мышечной силы и утомляемости. За животными наблюдали до их естественной гибели. После смерти регистрировали день гибели животного и рассчитывали среднюю продолжительность жизни мышей, возраст 90% смертности, максимальную продолжительность жизни, скорость старения популяции, а также время удвоения смертности (MRDT).

В возрасте 12 месяцев у мышей изучали эмоциональный фон и анксиолитическое действие дельтарана и плацебо с использованием методики приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) со сравнением показателей с молодыми 3-х месячными мышями. Группа 3-месячных животных состояла из 20 мышей-самок линии SHR, содержащихся в таких же условиях, как и 12-месячные мыши, получавшие дельтаран и физраствор.

В возрасте 12 месяцев проводили оценку рабочей памяти с использованием методики восьмилучевого радиального лабиринта (D.S. Olton, R.S. Samuelson, 1976) со сравнением показателей с группой 3-х месячных мышей.

Во второй серии экспериментов проведена оценка влияния дельтарана на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) у двух групп мышей-самок линии SHR в возрасте 3 месяца в условиях нормального и постоянного освещения в течение 7 дней. Оценивали влияние дельтарана на уровни железо-индуцированной хемиллюминесценции, общую антиоксидительную активность (ОАА) и уровни супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы головного мозга и печени.

В третьей и четвертой сериях экспериментов по оценке воздействия введения дельтарана на индуцированный уретаном и бенз(а)пиреном канцерогенез использовано 140 мышей-самок линии SHR в возрасте 2 мес. Условия содержания были аналогичны таковым у животных, использованных в первой серии экспериментов.

*Методика оценки двигательной активности мышей
в тесте «открытое поле»*

Животных по одному помещали в установку «открытое поле» (Hall C.S., 1934). В течение 10 минут наблюдали за перемещениями мыши, фиксируя количество пересеченных квадратов поля, число вертикальных стоек, число реакций груминга морды, тела и гениталий, количество актов дефекации. После каждой проверки пол открытого поля протирали с целью исключения ориентировочной реакции животного. Тестирование проводили в возрасте 6, 9, 12 и 18 месяцев в дневное время в интервале с 10 до 17 часов.

*Методика изучения мышечной силы
и физической утомляемости мышей*

Измерение мышечной силы и утомляемости проводили в возрасте 6, 9, 12 и 18 месяцев. Мышей подвешивали на струну, натянутую на высоте 75-80 см, так, чтобы они цеплялись передними лапами и висели на ней до момента утомления и падения. Время, через которое мыши переставали цепляться за струну и падали, фиксировалось как «время удержания». Через 20 минут мышей подвешивали второй раз и снова измеряли время удержания.

Методика приподнятого крестообразного лабиринта

Животное помещали в приподнятый крестообразный лабиринт (Буреш Я. и др., 1991) на центральную площадку головой к открытому рукаву и в течение 5 минут регистрировали время принятия решения, время пребывания животных в открытых и закрытых рукавах и на центральной площадке, количество переходов между рукавами, количество выходов на крайние оконечности открытых рукавов.

Методика восьмилучевого радиального лабиринта

Животных трех групп: получавших физраствор и дельтаран 12-месячных и группу 3-месячных мышей подвергали режиму депривации, при котором пища в течение 1 суток была недоступна. Сохранялся свободный доступ к воде. Через 1 сутки животных помещали в восьмилучевой радиальный лабиринт (Буреш Я. и др., 1991). Оценивали время пребывания в лабиринте с момента помещения корма до посещения мышью всех 8 лучей и количество ошибок.

Изучение влияния дельтарана на процессы перекисного окисления липидов в норме и в условиях постоянного освещения

Использовано 40 мышей-самок линии SHR разводки вивария НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова в возрасте 3 месяцев, которых рандомизированно разделили на 4 группы. Каждая группа мышей в течение 7 дней получала дельтаран или плацебо и содержалась при определенном световом режиме. Мышам одной группы в течение 5 дней подкожно вводили дельтаран по вышеописанной схеме, вторая группа получала физиологический раствор. Обе эти группы неделю находились в условиях нормального освещения. Третья и четвертая группы также получали по вышеуказанной схеме ДСИП или плацебо, соответственно, однако в течение 7 дней находились в условиях постоянного освещения (светового стресса). По прошествии срока 7 дней животных выводили из эксперимента. Для исследования брали образцы тканей мозга и печени мышей, определяли интенсивность хемиллюминесценции (реакция Фентона), общую антиокислительную активность, активность супероксиддисмутазы (с использованием НАДН и ЭДТА) и активность глутатионпероксидазы (с использованием реакции расщепления гидроперекиси третбутила).

Изучение влияния дельтарана на канцерогенез легких, индуцированный уретаном

70 трехмесячных мышей-самок линии SHR были рандомизированно разделены на 2 группы по 35 особей. Всем животным однократно внутрибрюшинно был введен уретан (НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова Росмедтехнологий), растворенный в изотоническом растворе хлористого натрия, в дозе 1 г/кг. Первая группа получала дельтаран подкожно 5-ти дневным курсом в дозе 5 мкг/мышь в сутки. Второй группе вводили по 0,1 мл 0,9% физиологического раствора подкожно в сутки в течение 5 дней. Обе группы получали курсы дельтарана и физиологического раствора ежемесячно в течение всего эксперимента.

Длительность эксперимента составила 32 недели, по истечении которых оставшиеся в живых животные были выведены из эксперимента. Всех павших и выведенных из эксперимента животных вскрывали. На аутопсии исследовали кожные покровы и внутренние органы.

Методика изучения влияния дельтарана на канцерогенез мягких тканей, индуцированный бенз(а)пиреном

70 трехмесячных мышей-самок линии SHR были рандомизированно разделены на 2 группы по 35 особей. Всем животным под кожу поясничной области вводили бенз(а)пирен (Fluka, Busch, Швейцария), растворенный в стерильном оливковом масле в дозе 2 мг/мышь в объеме 0,1 мл.

Первая группа получала дельтаран в вышеописанных дозировках и путях введения. Второй группе вводилось по 0, 1 мл 0,9% физиологического раствора подкожно в сутки в течение 5 дней ежемесячно в течение всего эксперимента.

Длительность эксперимента составила 32 недели, по истечении которых оставшиеся в живых животные были выведены из эксперимента. Всех павших или умерщвленных по завершении эксперимента животных вскрывали, проводилось патоморфологическое исследование.

Патоморфологическое исследование

Всех павших животных вскрывали. На аутопсии осматривали кожу и все внутренние органы.

Все олухоли, а также ткани и органы, подозрительные на наличие опухолевого роста, вырезали и фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. После рутинной гистологической обработки ткани заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5-7 мм окрашивали гематоксилином и эозином и изучали микроскопически. Использовали гистологическую классификацию опухолей, предложенную МАИР [Turusov V.S., Mohr S., 1990].

Статистическая обработка результатов исследования

При статистической обработке результатов использовали методы вариационной статистики с применением пакетов статистических программ STATGRAPH и STADIA. Рассчитывали параметры уравнения регрессии для кривых возрастной динамики веса тела. Достоверность различий оценивали по *t*-критериям Стьюдента [Гублер Е.А., 1978].

Основным методом статистической обработки результатов эксперимента по влиянию дельтарана на процессы перекисного окисления липидов в норме и в условиях светового стресса был двухфакторный дисперсионный анализ. На первом этапе проверяли равенство выборочных дисперсий по критерию Левина. После проведения дисперсионного анализа средние значения выборок сравнивали при помощи *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений [Гланц С., 1998].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние дельтара на массу тела, потребление корма и воды у мышей

Достоверных отличий по средней массе тела между мышами, получавшими дельтаран, и контрольными животными обнаружено не было.

До последнего месяца жизни введение дельтара на количество потребляемого мышами корма достоверно не влияло, в течение последнего месяца жизни мыши, получавшие дельтаран, потребляли достоверно большее количество корма, чем в возрасте 4 мес, а также больше, чем наиболее старые мыши группы контроля.

Потребление воды у последних 10% мышей в обеих группах было достоверно большим, чем в начале эксперимента.

Влияние дельтара на возрастную динамику двигательной горизонтальной и вертикальной активности и ориентировочной реакции у мышей

В группе мышей, получавших дельтаран, как и в группе контроля, горизонтальная активность, то есть число пересеченных квадратов, уменьшившись на 27% к возрасту 9 месяцев по сравнению с исходным уровнем, в дальнейшем не изменялась и оставалась таковой до конца жизни животных. Количество пересеченных квадратов последними 10% оставшихся в живых мышей, в возрасте 21 месяц, составляло в среднем 200 пересеченных квадратов на мышь, отличаясь от показателя для тех же мышей в возрасте 3 мес. всего на 12%. Последние оставшиеся в живых 10% мышей имели в целом более высокую горизонтальную активность, чем умершие ранее животные, которым вводили дельтаран, – в среднем на 17%.

Показатели вертикальной активности мышей, получавших дельтаран, уменьшившись к возрасту 15 месяцев на 50% по сравнению с возрастом 3 месяца, не изменялись на протяжении всей их дальнейшей жизни. По сравнению с группой контроля у мышей, получавших дельтаран, отмечалось существенное замедление возрастного уменьшения вертикальной активности - в возрасте 15 месяцев мыши, получавшие дельтаран, совершали на 74% больше стоек, чем животные группы контроля ($p < 0.01$) (Рис. 1).

Различие между группами по количеству вертикальных стоек было достоверным, начиная с возраста 12 мес, и оставалось таковым до смерти животных. Как и в случае с горизонтальной активностью, вертикальная активность последних оставшихся в живых мышей, получавших дельтаран, по достижении ими возраста 21 мес была несколько выше, чем у ранее умерших 15-месячных животных.

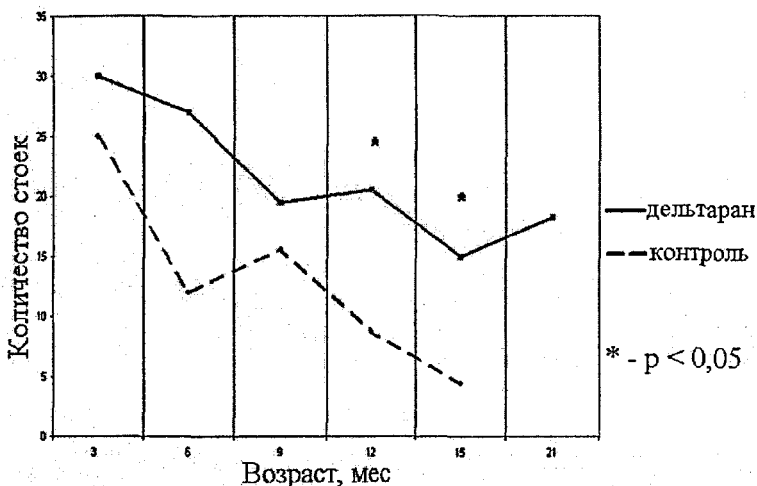


Рис. 1. Влияние дельтатарана на возрастную динамику вертикальной активности мышей.

Частота реакций груминга и актов дефекации в открытом поле у мышей, получавших дельтатаран, как и у мышей группы контроля оставалась более или менее неизменной в течение всей жизни животных.

Мыши, получавшие дельтатаран, имели на 15-17% лучшие показатели мышечной силы и утомляемости, чем мыши группы контроля, однако это различие ни в один временной период не было статистически достоверным.

Влияние дельтатарана на эмоциональный фон и стресс-устойчивость у мышей

При проведении теста в приподнятом крестообразном лабиринте у мышей, получавших дельтатаран, выявлены существенные отличия от групп контроля (табл. 1).

У группы 3-месячных мышей общее время, проведенное в темных участках лабиринта, составляло в среднем $223,2 \pm 11,1$ секунды, не отличаясь достоверно от $237,8 \pm 12,5$ секунд, которые в среднем в темных участках проводили 12-месячные мыши группы контроля. Получавшие дельтатаран животные пребывали в темных участках лабиринта на 42% меньше, чем мыши группы контроля ($p < 0,05$).

Таблица 1

Показатели поведения мышей в приподнятом крестообразном лабиринте

Группа животных	Возраст, (мес)	Время принятия решения (с)	Время в темных рукавах (с)	Время в светлых рукавах (с)	Количество переходов между рукавами	Кол-во выходов на отдаленные участки
3-х месячные	3	11,1±2,3	223,2±11,1	60,8±10,4	1,7±0,4	1
Контроль	12	16,7±2	237,8±12,5	45,6±11,2	1,8±0,3	1
Дельтаран	12	14,6±2,4	62,5±14,9*	122±14,5*	0,8±0,3*	9*

* - различие достоверно по сравнению с контролем 12-мес., $p < 0,05$.

Время пребывания в светлых участках лабиринта у получавших дельтаран мышей было на 63% большим, чем в группе контроля ($p < 0,05$).

Показателем стрессированности и двигательной активности в незнакомых условиях мышей является также количество переходов между светлыми и темными участками лабиринта. В группах 3-месячных мышей и 12-месячного контроля оно практически не отличалось. Мыши, получавшие дельтаран, совершали достоверно ($p < 0,05$) меньшее количество переходов между рукавами, за счет длительного нахождения на открытых участках лабиринта. В целом они совершали на 66% меньше переходов между рукавами.

Важным показателем является количество выходов животных на крайние участки открытых рукавов лабиринта. В группе, получавшей дельтаран, этот показатель был существенно большим, чем в группах 3-месячного контроля и 12-месячного контроля.

Влияние дельтарана на показатели рабочей памяти у мышей

3-месячные мыши проводили в лабиринте в среднем на 44% меньше времени, чем 12-месячные мыши группы контроля и получавшие дельтаран животные ($p < 0,05$). Животные группы, получавшей дельтаран, проводили в лабиринте в среднем на 4% меньше времени, чем мыши группы контроля. Это отличие достоверным не является.

Среднее количество ошибок на одну мышь во всех трех группах было сходным, наименьшим оно было в группе, получавшей дельтаран, и наибольшим – в группе 12-месячных контрольных мышей, однако различие достоверным не было.

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что применение дельтарана приводило к некоторому общему улучшению рабочей памяти

мышей по сравнению с контролем, однако это явление носило характер тенденции ($p > 0,05$).

Интересным является тот факт, что между молодыми 3-месячными мышами и взрослыми животными в возрасте 12 месяцев не наблюдалось достоверных отличий по показателям рабочей памяти.

Влияние дельтарана на окислительные процессы в норме и в условиях постоянного освещения у мышей

Световой стресс в группе контроля вызывал некоторое повышение активности СОД в печени (на 14%) и существенное снижение активности ГП в мозгу у мышей (на 60%) ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2

Показатели активности окислительных процессов в тканях мозга и печени мышей при нормальном освещении и в условиях светового стресса (постоянного освещения)

Орган	Головной мозг		Печень	
	12 ч. : 12 ч.	Постоянное освещение	12 ч. : 12 ч.	Постоянное освещение
<i>Группа</i>	Fe ²⁺ -индуцированная хемилюминесценция (10 у.е./мг белка)			
Контроль	38,94±1,08	48,64±0,68##	63,95±1,60	67,47±1,73
Дельтаран	47,57±1,36	44,78±0,82	54,47±4,51	52,75±3,44
	Общая антиокислительная активность (у.е./мг белка)			
Контроль	0,616±0,0211	0,631±0,019	0,393±0,012	0,362±0,018
Дельтаран	0,676±0,0093	0,625±0,018	0,343±0,019	0,446±0,012**
	Активность супероксиддисмутазы (у.е./ мг белка)			
Контроль	29,25±1,92	34,56±3,97	21,94±2,23	23,23±1,79
Дельтаран	31,19±2,00	40,18±1,60#	30,06±2,64	22,04±1,52#
	Активность глутатионпероксидазы (ммоль/мин/ мг белка)			
Контроль	0,108±0,022	0,146±0,011	0,815±0,238	0,339±0,091
Дельтаран	0,108±0,024	0,095±0,016	0,149±0,041	0,107±0,028*

* - по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

** - по сравнению с контролем, $p < 0,001$.

- по сравнению с условиями нормального освещения, $p < 0,05$.

- по сравнению с условиями нормального освещения, $p < 0,001$.

В группе контроля в условиях постоянного освещения достоверно ($p < 0.001$) увеличивалась железо-индуцированная хемилюминисценция в головном мозгу. Все остальные изменения в группе контроля при световом стрессе, весьма многочисленные, достоверными не являлись. Таким образом, можно констатировать, что световой стресс вызывал в условиях данного опыта повышение окислительной нагрузки на организм подопытных животных.

Введение дельтарана в условиях стандартного освещения достоверно не изменяло состояние свободнорадикальных систем в головном мозге и печени мышей. В условиях светового стресса в группе, получавшей дельтаран, наблюдалось достоверное увеличение общей антиокислительной активности в печени (на 19%), и снижение активности ГП в печени (на 70%) ($p < 0.05$) а также тенденция к повышению активности СОД в мозге (на 15%).

Таким образом, если в условиях стандартного освещения введение дельтарана не приводило к изменению показателей окислительной активности, то в условиях светового стресса препарат достоверно увеличивал общую антиокислительную активность в печени, активность СОД в печени и снижал активность ГП в мозге (табл. 2).

Влияние дельтарана на продолжительность жизни и спонтанный канцерогенез у мышей SHR

В группах контроля и дельтарана динамика выживаемости не отличалась вплоть до достижения мышами возраста 450 дней, когда количество животных в группе, получавшей дельтаран, в два раза превысило число доживших мышей группы контроля. Эта тенденция устойчиво сохранялась (Рис. 2). До возраста 500 дней в группе получавших дельтаран мышей дожило в 4 раза больше животных, чем в контроле ($p < 0.01$) (табл. 3).

Таблица 3

Влияние дельтарана на динамику выживаемости мышей-самок линии SHR

Группа животных	Количество мышей, доживших до возраста (дни)								
	150	200	365	400	450	500	550	600	640
Контроль	40	38	25	11	5	2	1	1	0
Дельтара н	39	37	24	13	10	8*	7*	6*	1

* $p < 0.01$ – различие по сравнению с группой контроля.

К 600 дням в группе дельтарана осталось в живых в шесть раз больше животных, чем в группе контроля. Дельтаран достоверно увеличивал время жизни последних 10% мышей.

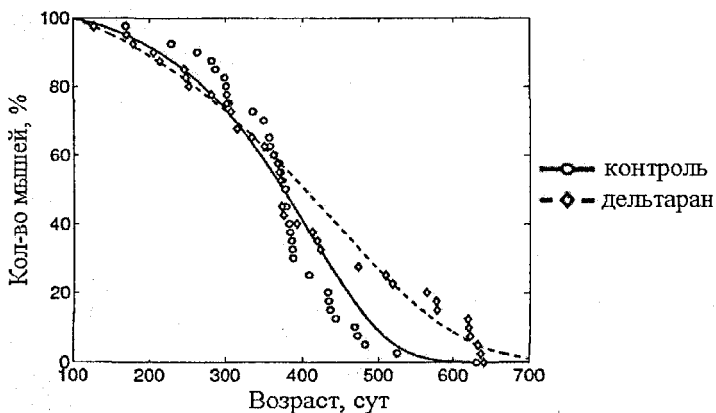


Рис. 2. Влияние дельтатрана на продолжительность жизни мышей-самок SHR.

Средняя продолжительность жизни мышей без опухолей в группе, получавшей дельтатран, была больше на 5% по сравнению с группой контроля ($p < 0.01$).

При изучении спонтанного канцерогенеза у мышей, получавших дельтатран и в группе контроля выявлено, что введение дельтатрана оказывало достоверное замедляющее воздействие на динамику возникновения опухолей (рис. 3).

У мышей, получавших дельтатран, опухоли появлялись позже в среднем на 102 ± 15 суток, чем в группе контроля. Это различие было статистически достоверно ($p < 0.01$).

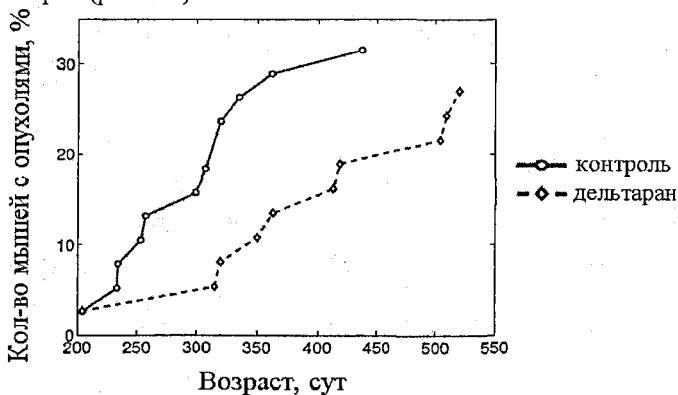


Рис. 3. Влияние дельтатрана на время появления новообразований у мышей-самок SHR.

Таблица 4

Влияние дельтарана на частоту и типы опухолей у мышей

Показатель	Контроль	Дельтаран
Количество мышей	40	40
Количество мышей с опухолями	12 (30%)	10 (25%)
Количество мышей со злокачественными опухолями	4	3
Общее количество опухолей	14	11
Общее количество злокачественных опухолей	4	3
Количество опухолей на одну мышь с опухолями	1,16	1,1
Средняя продолжительность жизни мышей с опухолями, дней	360 ± 21.8	409 ± 31.8
<i>Локализация и тип опухолей:</i>		
Молочная железа:	9	7
аденокарцинома	3	2
Количество мышей с метастазами		
Лейкоз	2	0
Аденокарцинома легких	1	1
Злокачественная лимфома	2	3

Аденокарциномы молочных желез в группе, получавшей дельтаран, возникали позже в среднем на 90 ± 13 суток и мыши с ними жили дольше на 12%, чем животные группы контроля (табл. 4).

Влияние дельтарана на развитие опухолей легких, индуцируемых уретаном, у мышей

Введение дельтарана сопровождалось тенденцией к уменьшению частоты и множественности опухолей как в общей группе мышей, так и среди мышей-опухоленосителей (табл. 5). Среднее число опухолей на 1 мышь в группе контроля составило $0,51 \pm 0,9$, у получавших дельтаран животных - $0,46 \pm 0,9$. Множественность опухолей у мышей группы контроля составила $2,71 \pm 0,6$, то есть в целом была небольшой. В группе получавших дельтаран животных множественность составляла $2,26 \pm 0,56$, то есть была меньшей, чем в группе контроля, на 17%.

Статистически достоверных отличий ни по одному показателю не наблюдалось. Проканцерогенного влияния введение дельтарана не оказывало.

Таблица 5

Влияние дельтарана на частоту, множественность и размеры опухолей легких, индуцированных уретаном, у мышей

Показатель	Уретан + физраствор	Уретан + дельтаран
Число животных	35	35
Число животных с опухолями, %	18 (51%)	17 (46%)
Среднее число опухолей на 1 мышь, $M \pm m$	0,46±0,9	0,51±0,9
Множественность опухолей в общей группе	2,71±0,6	2,26±0,56
Множественность среди мышей с опухолями	5,28±0,9	4,94±0,92
Число животных с опухолями крупного размера, (%)	3 (3,1 %)	2 (2,5 %)
Число животных с множественными опухолями, (%)	17 (94,4%)	14 (87,5%)

Влияние дельтарана на канцерогенез, индуцируемый бенз(а)пиреном, у мышей

Введение дельтарана не оказывало существенного эффекта на канцерогенез, индуцируемый БП у мышей. Однако отмечается отсутствие в группе мышей, получавших дельтаран, множественных метастазов, имевших место в группе контроля, а также некоторое изменение макроскопической картины опухолей в виде более редкого появления некротизации и изъязвления кожных покровов над опухолями. Достоверных отличий по показателям средней продолжительности жизни и средней продолжительности мышей с опухолями в данном эксперименте получить не удалось. Проканцерогенного влияния введение дельтарана не оказывало (табл. 6).

В результате проведенных исследований было установлено, что препарат пептида дельта-сна «дельтаран» оказывает геропротекторный и антистрессорный эффект. Кроме этого, наблюдается торможение спонтанного канцерогенеза. Дельтаран не оказывал стимулирующего влияния на индуцированный уретаном и бенз(а)пиреном канцерогенез у мышей.

Установлено, что дельтаран не оказывает существенного воздействия на массу тела мышей и не влияет на потребление ими корма и воды вплоть до последних месяцев жизни животных.

Масса тела животных в группе контроля и в группе, получавшей дельтаран, не отличались друг от друга, то есть мыши, которым вводили дельтаран, несмотря на большее потребление в конце жизни корма и воды, не весили больше мышцей контрольной группы. Таким образом, у мышей-долгожителей, получавших дельтаран, имело место увеличение аппетита и потребления корма и воды без существенного увеличения массы тела. Данная находка коррелирует с обнаруженным высоким уровнем горизонтальной и вертикальной активности этих животных. Можно предполагать, что у мышей-долгожителей, получавших дельтаран, наблюдалось определенной степени замедление старения функций организма, что, в конечном счете, и определило увеличение продолжительности их жизни.

Таблица 6

Влияние дельтарана на частоту, множественность и размеры опухолей мягких тканей, индуцированный бенз(а)пиреном у мышей, продолжительность жизни опухоленосителей

Показатель	БП + физраствор	БП + дельтаран
Число животных	35	35
Общее число животных с опухольми, (%)	28(80 %)	27 (77,1 %)
Число животных с метастазами, (%)	3 (8,6%)	2 (5,7%)
Средний размер опухоли, мм, $M \pm m$	27,3±1,4	29,3 ± 0,81
Время обнаружения первой опухоли, сут.	120	120
Число животных, доживших до конца опыта, (%)	3 (8,6 %)	2 (5,7 %)
Средняя продолжительность жизни животных, сут., $M \pm m$	202,3 ± 24,9	201,7 ± 5,8

В связи с этими результатами находится выявленный эффект дельтарана на горизонтальную активность животных в тесте «открытое поле». При отсутствии достоверных различий между группами на протяжении всей жизни животных, у мышей-долгожителей, получавших дельтаран, среднее количество пересеченных квадратов в конце жизни было выше, чем у ранее умерших получавших дельтаран мышей и животных группы контроля, соответствуя таковой у 6-7-ми месячных особей.

Обусловленное введением дельтарана увеличение количества вертикальных стоек у мышей наблюдалось на протяжении всего эксперимента. В группе, получавшей дельтаран, имело место замедление возрастного снижения этого показателя. Начиная с возраста 12 месяцев, различие между группами было достоверным. Старые мыши, получавшие дельтаран, в возрасте 15 месяцев совершали на 74% больше вертикальных

стоек, чем мыши группы контроля. Этим отражается их большая заинтересованность в окружающей среде и большая устойчивость к стрессующим мышья условиям открытого поля. По этому показателю группа последних 10% мышья, получавших дельтаран, отличалась как от аналогичных мышья группы контроля, так и от ранее умерших получавших дельтаран особей. Мыши-долгожители совершали больше стоек, соответствуя по этому показателю 9-месячным мышья своей группы.

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» установлено, что препарат пептида дельта-сна обладает достоверным анксиолитическим и, соответственно, стресс-протективным эффектом. Животные получавшей его группы проявляли значительно меньшую настороженность в лабиринте и значительно большее время исследовали открытые участки лабиринта.

Обращает на себя внимание то, что 12-месячные получавшие дельтаран мыши по показателю времени, проведенного в открытых участках лабиринта, существенно превосходили не только 12-месячных мышья контрольной группы, но и молодых 3-месячных мышья. Мыши контрольной группы были наименее активными в открытых участках лабиринта, предпочитая большую часть времени находиться в имитации норки. Получавшие же дельтаран мыши проявляли исследовательскую активность, превосходящую таковую у молодых 3-месячных мышья.

По показателю выходов на крайние участки лабиринта различие между группами также достоверно. Получавшие дельтаран мыши в 9 раз чаще осуществляли выходы на крайние оконечности светлых рукавов. Такое поведение животного расценивается как признак стресс-устойчивости [Dunn A.J. et al., 1987; Kinsley C.H. et al., 2006].

Таким образом, суммируя все полученные в приподнятом крестообразном лабиринте результаты, можно утверждать, что у мышья введение дельтарана сопровождалось выраженным анксиолитическим эффектом, что соответствует и антистрессорному эффекту [Тодоров И.Н., Тодоров Г.Н., 2003].

При оценке продолжительности жизни в группах выявлено, что последние 10% мышья, получавших дельтаран, жили дольше. До возраста 500 дней в группе дельтарана дожило в 4 раза больше животных, чем в контроле, к 600 дням в группе дельтарана осталось в живых в шесть раз больше животных, чем в группе контроля.

Дельтаран по результатам данного эксперимента может быть отнесен к геропротекторам II типа, увеличивающим длительность жизни долгоживущих особей [Emanuel N.M., Obukhova L.K., 1978].

Результаты исследования показателей горизонтальной и вертикальной активности мышья свидетельствуют о том, что у получавших дельтаран мышья, а особенно ее последних 10%, качество жизни превосходило таковое в контрольной группе. Мыши в возрасте 21 месяца, получавшие дельтаран, по ряду показателей биологического возраста соответствовали 6-9 месячным животным, то есть у них наблюдалось определенное замедление старения.

Нарушение режима освещения ведет к повышению окислительной нагрузки на организм. Можно предполагать, что подобное повышение окислительной нагрузки имеет следствием ускоренное старение. Дельтаран в условиях постоянного освещения проявил стресс-протективное действие, у получавших дельтаран мышей наблюдалось достоверное увеличение общей антиокислительной активности печени, тенденция к повышению активности СОД в мозге и снижение активности ГП в печени.

В нашей работе дельтаран не оказывал стимулирующего действия на спонтанный канцерогенез. Более того, введение препарата достоверно замедляло процесс возникновения опухолей.

Данные наших исследований свидетельствуют об отсутствии у дельтарана какого-либо действия на канцерогенез легких и мягких тканей, индуцируемый уретаном и бенз(а)пиреном.

ВЫВОДЫ

1. Препарат дельта-сон индуцирующего пептида дельтаран оказывает геропротекторное действие у мышей линии SHR, достоверно удлиняя продолжительность жизни последних 10% животных на 16%. Увеличивается также средняя продолжительность жизни мышей без новообразований – на 4,6%.
2. Применение дельтарана у мышей приводит к замедлению старения по показателям ориентировочной реакции у всей группы, у последних 10% животных имеет место выраженное замедление старения по показателям двигательной активности, ориентировочной реакции, потреблению воды и корма.
3. Применение дельтарана оказывает выраженный анксиолитический и антистрессорный эффект в модели приподнятого крестообразного лабиринта.
4. Применение дельтарана сопровождается достоверным антиокислительным эффектом на модели кратковременного светового стресса у мышей. Содержание мышей в условиях постоянного освещения сопровождается активацией ПОЛ и усилением свободно-радикальных процессов.
5. Дельтаран оказывал угнетающее действие на спонтанный канцерогенез у мышей линии SHR, увеличивая сроки первого появления опухолей и продлевая среднюю продолжительность жизни мышей с опухолями.
6. На моделях индуцируемого уретаном и бенз(а)пиреном канцерогенеза дельтаран не оказывал проканцерогенного действия.

Практические рекомендации

Полученные данные позволяют обосновать рекомендации при разработке схем применения дельтарана в гериатрической практике, особенно у долгожителей, а также в онкологической практике для профилактики онкологических заболеваний.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Влияние пептида дельта-сна на свободнорадикальные процессы в головном мозгу и печени мышей при различных световых режимах/ В.Б. Войтенков, И.Г. Попович, А.В. Арутюнян и др.//Успехи геронтол. – 2008. – Т. 21, № 1. – С. 53 -55.
2. *Войтенков В.Б.* Анксиолитический эффект введения препарата пептида дельта-сна/В.Б. Войтенков, И.Г. Попович, В.Н. Анисимов// Матер. конгресса с междунар. участием "Пароксизмальный мозг. Мультидисциплинарный подход к проблеме", СПб.: Изд-во СПб НИПНИ им. В.М. Бехтерева. – 2008. – С. 97 - 98.
3. *Войтенков В.Б.* Влияние дельтарана на возрастную динамику некоторых биомаркеров старения и поведенческих реакций у мышей// В.Б. Войтенков, В.Н. Анисимов//Тез. докл. Всеросс. конф. "Перспективы фундаментальной геронтологии". - СПб.: Изд-во "Коста", 2006. - С. 28.
4. *Войтенков В.Б.* Возрастная динамика поведенческих реакций у мышей и анксиолитические эффекты пептида дельта-сна/В.Б. Войтенков, И.Г. Попович//Вестн. СПбГМА им.И.И. Мечникова. - 2007, № 4. - С. 142 - 144.
5. *Войтенков В.Б.* Регуляция пептидом дельта-сна процессов перекисного окисления липидов в мозгу и печени мышей в условиях нормального и постоянного освещения/В.Б. Войтенков, И.Г. Попович// Тез. докл. III научно-практ. геронтологической конф. с международным участием "Пушковские чтения", СПб.: Изд-во "Спектр". – 2007. – С. 171.
6. *Войтенков В.Б.* Регуляция препаратом пептида дельта-сна окислительных процессов в мозгу и печени мышей линии SHR при различных режимах освещения. Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины // Тез. V конф. молодых ученых России с международным участием. - М.: Изд-во ММА им. И.М. Сеченова. – 2007. – С. 91 - 92.
7. *Voytenkov V.* Influence of preparation of delta-sleep inducing peptide "Deltaran" on age-related changes of some aging biomarkers and behavioral reactions in mice/V.Voytenkov, I. Popovich// Abstr. VI European Congress «Healthy and active ageing for all Europeans» International association of gerontology and geriatrics, 5-8 July, 2007. Adv. in Gerontology. – 2007. – Vol. 20, № 3 – P. 75.

**ВОЙТЕНКОВ Владислав Борисович ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА
НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ У МЫШЕЙ II**
Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.53. – СПб., 2009. – 22 с.

Подписано в печать 18.03.2009. Формат 60×84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ 42

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО «Принт – Экспресс»

197101, С.-Петербург, ул. Большая Монетная, 5 лит. А
