D.S. de Ávila, M. Aschner:

PROTECTIVE EFFECTS OF DDW IN CAENORHABDITIS ELEGANS MODEL

Защитные эффекты лёгкой воды на примере экспериментов с C.elegans

Уважаемые организаторы данной встречи, я здесь, чтобы продемонстрировать некоторые результаты, которые мы получили в Вандербильтском университете, совместно работая с доктором Габором. Мы обнаружили некоторые эффекты анти-старения, которые может оказывать лёгкая вода. Итак… просто небольшой план моей речи. Я буду говорить о C. elegans, свободноживущей нематоде (круглый червь) как об объекте опытов; о токсичности марганца, который мы использовали для того чтобы спровоцировать старение, а затем осветим результаты и перейдём к дискуссии.

Итак, вводное слово о том, что такое C. elegans, как я буду его называть в течение рассказа. Это нематода очень маленького размера, она достигает миллиметра в длину во взрослом возрасте, имеет бесцветное тело, питается бактериями, её можно вырастить в водной или почвенной среде. C. elegans плодовит (примерно 300 особи за 1 помёт от 1 гермафродита) – это очень хорошо для тестирования токсичного воздействия и защитных механизмов антиоксидантов - имеет короткий жизненный срок (примерно 18 дней для дикой особи) и короткий репродуктивный цикл, что представлено здесь. Репродуктивный цикл составляет 3-5 дней, эмбриональное развитие длится 14 часов, после этого вылупляются личинки, которые быстро переходят в вид L2, L3, L4 и т.д., как показано на схеме, после этого личинки взрослеют (в особенности развивается репродуктивная система), достигают зрелости и имеют способность размножаться. После этого весь цикл повторяется. Что интересно в данном цикле: если особь находится на этапе личинки и подвергается голоданию (то есть, ей не хватает бактерий для питания), она превращается в так называемую дауэровскую личинку, чей срок жизни – около 3 месяцев, что примерно в 3 раза дольше средней продолжительности жизни C. elegans. Это очень интересная вещь, и многие исследователи наблюдают именно за дауэровскими личинками, т.к. подобные наблюдения могут дать нам ключ к разгадке секрета долголетия.

Итак, что ещё интересно: геном C. elegans от 60 до 80% гомологичен человеческому геному. Также представляет интерес лёгкость манипулирования генами. Гены легко вычленять из организма, а затем наблюдать, что происходит при их недостатке. Легко создавать трансгенные линии. К примеру, можно ввести протеин в промотор гена или в белковую ткань непосредственно – и увидеть под микроскопом частичную экспрессию белка. Лёгкость манипулирования генами привела к нахождению нескольких метаболических процессов в организме, и один из этих процессов – старение.

Итак, C. elegans – идеальный организм для выявления причин и молекулярных механизмов старения из-за короткого срока жизни и лёгкости манипулирования генами. Так же как и люди, C. elegans переживает нейродегенерацию, саркопению (потеря мышечной массы) и накопление липофуксина, связанные с возрастными изменениями.

Что мы видим на фото: 1 – молодая зрелая особь, мы видим изгибы тела, червь передвигается свободно в поисках еды. 2 - по мере старения полностью меняется структура тела. Червь всё ещё жив, но он больше не может передвигаться, не может найти новые источники пищи. 3 – это всё та же особь, очертания и положение тела такое же, как на 2 фото, но уже произошло накопление липофуксина – в точности как у людей в процессе старения.

Было найдено более 50 генов, связанных с данным процессом. И один из наилучшим образом изученных – ген DAF-16. DAF-16 - транскрипционный фактор с одноименным названием, необходимый в механизмах, замедляющих старение C. elegans. В нормальных условиях DAF-16 прикреплён к ядру и активирует транскрипцию антиоксидантов. DAF-16 принадлежит к процессу метаболического пути DAF-2 и инсулинообразных лиганд. Этот процесс контролирует формирование дауэровской личинки, произведение потомства, реакцию на стресс и продолжительность жизни. То есть, стимуляция DAF-16’ом белков-антиоксидантов приводит к продлению срока жизни.

С другой стороны, когда инсулинообразные лиганды проникают в рецептор DAF-2, это активирует фосфорилирование, включающее в себя такие киназы как AGE и AKT. Как следствие, они фосфорилируют DAF-16, он становится неактивным и не может более взаимодействовать с ядром для выделения антиоксидантов.

Как вы можете видеть здесь, на 2 схеме – здесь отмечена масса генов, но я хочу обратить ваше внимание на то, что отмечено квадратами – гены диких особей – блокирование DAF-16 приводит к значительному снижению срока жизни. И наоборот же, блокирование рецептора DAF-2 продлевает жизнь вдвое.

И что мне ещё хотелось бы заметить, DAF-16 – гомолог гена млекопитающих FOXO. А как известно, FOXO неразрывно связан с развитием опухолевых тканей. Повышение уровня FOXO ведёт к снижению роста опухоли.

В нашем опыте мы использовали токсичность марганца для снижения продолжительности жизни. Марганец – естественный металл, но увеличение его концентрации приводит к различным воздействиям на линии клеток, например, дисфункции митохондрии, понижение энергии, окислительный стресс, активация некротических и апоптотических процессов (это происходит, главным образом, в дофаминергических нейронах и вызывает дофаминергическую дегенерацию). Очень интересно отметить, что токсичность марганца напоминает симптомы болезни Паркинсона – появление дрожи. Поэтому марганец использовали для изучение паркинсонизма. Воздействие марганца на C. elegans повторяет эффекты на дофаминергическую систему млекопитающих. Проявляются общие симптомы отравления, дисфункции осморегуляции, изменения в структуре клеток, уменьшение размера тела. Черви, обработанные раствором в 35 мМоль хлорида марганца, были меньшего размера, чем необработанные особи. Также все они оставались на личиночном этапе – то есть, не развивались дальше, в отличие от необработанных червей. И, наконец, отравление марганцем провоцирует сокращение срока жизни. Поэтому мы используем марганец для опыта.

У нас была гипотеза, что лёгкая вода, о которой мы здесь и говорим, особенно в контексте исследований антираковых эффектов, имеет свойство замедлять старение C. elegans.

Мне бы хотелось рассказать, о системе дозирования, т.к. она отличается от системы, разработанной для млекопитающих. Итак, мы использовали синхронизированного C. elegans, находящегося на личиночной стадии развития L1 (они более подвержены изменениям в среде). Черви были подвержены 30-минутной обработке раствором хлорида марганца количеством в 35 мМоль . После этого черви подвергались обмыванию и 48-часовой обработке лёгкой водой. Концентрация лёгкой воды была разной: 120 ppm и 90 ppm.

Итак, некоторые результаты, которые мы получили. Сначала, мы проверили, как лёгкая вода будет влиять на жизненный срок – без обработки марганцем. Мы не обнаружили никаких существенных изменений. Как вы можете увидеть здесь… обычная вода – 150 ppm. Затем, 120 и 90 ppm… мы не увидели никакой разницы. Тем не менее, когда черви потребляли воду в течение 48 часов после обработки марганцем… контрольная группа отмечена квадратами, а подвергшиеся отравлению – треугольниками… мы видим, что группы, обработанные лёгкой водой после отравления, обрели способность противостоять последствиям отравления. Это был очень интересный результат, поэтому мы решили продолжать исследование и изучить молекулярный уровень, чтобы осознать механизм. Поэтому мы решили пронаблюдать за метаболическим процессом DAF-16, который уже вам хорошо известен. И что любопытного мы нашли: отравление марганцем провоцирует снижение уровня DAF-16 и приводит к снижению срока жизни. Лёгкая вода же сама по себе не меняет количество DAF-16 (и это может объяснить тот факт, что простое потребление воды не продлевает жизненный срок), однако она помогает организму противостоять процессу снижения уровня DAF-16 при отравлении марганцем. Это очень интересная находка. Мы также обнаружили, что лёгкая вода имеет способность восстанавливать содержание даунстримового белка супероксида дисмутаза и апстрим-белка AKT (белковую киназу серина/тионина), чей уровень изменяется при отравлении.

Пронаблюдав за апстримовым метаболическим процессом DAF-16, белком tAKT (киназа, участвующая в процессе фосфорилирования и затормаживания активности DAF-16), мы обнаружили, что отравление марганцем способствует повышению количества tAKT, но вода с концентрацией дейтерия количеством 90 ppm снижает повышенный уровень tAKT до обычного. Суммировав и проанализировав все полученные результаты, мы решили копнуть дальше и проверить, только ли на DAF-16 оказывается влияние лёгкой воды. Мы решили использовать для опыта червей с мутацией, не имеющих DAF-16 в организме, из-за этого более слабых и имеющих более короткий жизненный срок по сравнению с обыкновенными особями. Как вы можете видеть по схеме, марганец всё равно понижал продолжительность жизни, т.к. он оказывает влияние не только на метаболические процессы DAF-16. Но что удивительно – и в этом опыте лёгкая вода смогла предотвратить негативное воздействие марганца на организм. Этот результат доказывает, что не только DAF-16 участвует в процессах замедления старения, активированных лёгкой водой. Другие метаболические процессы так же замешаны в этом. Значит, это доказывает, что лёгкая вода имеет не единственный механизм воздействия.

Итак, последний график… сравнение продолжительности жизни червей с мутацией и обыкновенных особей. Черви с мутацией отмечены сплошными чёрными квадратиками, и вы видите насколько их срок жизни короче. Это просто график для иллюстрации наших наблюдений.

И наконец, некоторые выводы о проделанной работе.

- лёгкая вода замедляет старение особей C. elegans, обработанных марганцем

- этот эффект частично связан со способностью модулировать метаболический процесс DAF-16

- обработка лёгкой водой восполняла функционирование DAF-16 и стабилизировала уровни супероксида дисмутаза и AKT – это доказывает, что белки-антиоксиданты, модулируемые DAF-16’ом, так же подвергаются восстановлению

- повышенный уровень tAKT, вызванный марганцевым отравлением, понижается до нормального с помощью лёгкой воды. Это демонстрирует, что воздействию подвергается не только DAF-16 и производимые им белки

- использование в опытах особей с мутацией проиллюстрировало, что в процессе анти-старения участвуют и другие метаболические процессы, например, SKN-1 (гомологи этого белка у млекопитающих – белки NRF) тоже может принимать участие

Я хотела бы поблагодарить доктора Майла Ашнера, моего научного руководителя. Я здесь вместо него, т.к. он не смог приехать. А также доктора Габора. Мы начали исследование вместе около 9 или 10 месяцев назад, так что прошло не так много времени прежде чем мы получили данные результаты. Я бы хотела также поблагодарить Вандербильтский и Хидерабадский университеты. Спасибо.

- Спасибо. Какие-нибудь вопросы, комментарии?

- Вы изменяли концентрацию дейтерия в воде для обработки?

- Вы имеете в виду, именно во время обработки?

- Да. Может быть, от 120 до 90. После, к примеру, 8, 9, 10 дней.

- Ну, как видите, жизненный срок червей очень короткий. Всего лишь 18 дней. И если вы сравните его, скажем, со сроком жизни крыс… я имею в виду, пара дней – это много для них. Для червей. Жизнь всего лишь в 18 дней. Мы могли бы вести эксперимент подольше, но тогда черви перешли бы в зрелую репродуктивную стадию развития, начали бы приносить потомство, и это помешало бы проведению эксперимента.

- Ещё какие-нибудь вопросы или замечания?

- Вы тестировали реакцию ещё каких-либо молекул на марганец?

- С C.elegans – нет.

- Тогда не могли бы вы привести пример, когда компонент молекулы реагирует на марганец и лёгкую воду аналогично случаю с C.elegans?

- На самом деле, смысл не только непосредственно в самом марганце, мы ведь просто изучали его токсичность и воздействие на организм. Но в литературе, посвящённой C.elegans, есть примеры различных опытов с веществами, нацеленных на изучение продолжительности жизни…

- Но вы не проводили других тестов с марганцем?

- Нет, не проводили, но, возможно, это стоило бы сделать.