

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

КАРАМАН ГАННА СЕРГІЇВНА



УДК 595.7:575.16/.17(043.3)

**ЗМІНИ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ, АСОЦІЙОВАНИХ З ТРИВАЛІСТЮ
ЖИТТЯ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*, В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД УМОВ
ПРЕІМАГІНАЛЬНОГО РОЗВИТКУ**

03.00.22 – молекулярна генетика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2024

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі загальної та медичної генетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, м. Київ

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович,
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка, професор кафедри біохімії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Телегєєв Геннадій Дмитрович,
Інститут молекулярної біології і
генетики НАН України, завідувач відділу
молекулярної генетики

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Пірко Ярослав Васильович,
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України», вчений секретар,
завідувач відділу популяційної генетики

Захист відбудеться «14» жовтня 2024 року об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького (Осиповського), 2а, тел. (044) 363 05 32, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького (Осиповського), 2а, та на офіційному сайті <http://ifbg.or.ua/uk/pidgotovka-kadriv/specializovana-vchena-rada>

Автореферат розісланий «___» вересня 2024 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради, к.б.н., доц.



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. У генетиці та геронтології завжди важливе місце займали дослідження процесів старіння та факторів, які впливають на тривалість життя організмів. Однак і сьогодні залишається багато нез'ясованих аспектів (Murabito et al., 2012). Вивчення цих процесів є важливим не тільки для фундаментальної науки, але й для прикладних галузей – у першу чергу для медицини. Розуміння механізмів старіння сприятиме розробці інноваційних стратегій для покращення здоров'я та якості життя людини (Tian et al., 2017).

Дослідження старіння та тривалості життя здебільшого фокусуються на процесах, пов'язаних із пізніми етапами життєвого циклу організмів. Проте сучасні дані вказують на наявність взаємозв'язку між ранніми та пізніми стадіями життєвого циклу. Одним із переконливих свідчень такого зв'язку є виразна кореляція між тривалістю гестації або ранніх стадій розвитку з тривалістю життя тварин різних видів, яка демонструє, що обидві ці фенотипові ознаки можуть регулюватись аналогічними біологічними механізмами (Phillippe, Phillippe, 2017). Існує гіпотеза про ініціацію старіння ще на ранній стадії онтогенезу організму (Silva-García, 2023), яка в основному базується на «онтогенетичній теорії старіння» (The Developmental Theory of Ageing), сформульованій Фредеріком Лінтсом. Згідно цієї теорії процес старіння є невід'ємною частиною онтогенетичного розвитку, що настає після завершення стадій росту та диференціації клітин (Lints, 1978).

Загальновідомо, що живі організми характеризуються високим ступенем пластичності на ранніх етапах онтогенезу (Wells, 2017), що дозволяє організмам пристосовуватись до мінливих умов навколишнього середовища (Bateson, 2015). При цьому відбувається так зване «програмування розвитку», яке полягає в тому, що вплив певного стимулу, застосованого в критичний або чутливий період онтогенезу, може спричиняти довготривалі та стійкі зміни в структурі чи функціях організму (Lucas, 1998). Вважається, що фактори навколишнього середовища на ранніх стадіях онтогенезу сприяють виникненню та закріпленню епігенетичних модифікацій, які в свою чергу впливають на експресію генів і фенотип (Feil, Fraga, 2012). Можна припустити, що фактори, які впливають на швидкість розвитку тварин, можуть формувати епігенетичний патерн генетичної активності, який визначатиме зміни темпу подальшого життя та тривалості життя. Такі впливи можуть бути охарактеризовані як епігенетичне програмування темпу життя (Vaiserman et al., 2018).

Drosophila melanogaster є модельним об'єктом, який широко використовується в дослідженнях найрізноманітніших біологічних процесів, включаючи процеси старіння (He, Jasper, 2015). У численних дослідженнях було продемонстровано, що тривалість життя *D. melanogaster* залежить від різноманітних факторів, таких як температура навколишнього середовища, особливості харчування, щільність популяції мух тощо. Проте, ці дослідження в основному фокусувалися на впливі різних чинників на стадії імаго або протягом усього життя комах. Дослідження, які б вивчали залежність тривалості життя дорослих комах від факторів, що модифікують темп розвитку на преімагінальних стадіях онтогенезу, не проводилися. З метою перевірки зазначеної вище гіпотези було проведено дослідження зв'язку тривалості

преімагінальних стадій розвитку з темпом старіння, тривалістю життя та експресією генів, асоційованих з тривалістю життя *D. melanogaster*.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота була виконана на кафедрі загальної та медичної генетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетних науково-дослідних тем №11БФ036-01 «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакції організму за умов розвитку різних патологій» (2011-2015 рр., № державної реєстрації 0111U004648) та № 16БФ036-01 «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (2016-2018 рр. № державної реєстрації 0116U002527).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було з'ясувати вплив умов утримання *D. melanogaster* на стадії преімагінального розвитку (температура, рН, щільність популяції, концентрація кисню) на тривалість життя імаго та рівень експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*, асоційованих з тривалістю життя.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні завдання:

1. З'ясувати вплив гіпоксії та гіпероксії під час преімагінального розвитку на тривалість розвитку і тривалість життя самців і самок імаго.
2. Визначити вплив рН поживного середовища у діапазоні від рН 5 до рН 9 під час преімагінального розвитку на тривалість розвитку і тривалість життя самців і самок імаго.
3. Встановити вплив температури у діапазоні від 20 °С до 30 °С під час преімагінального розвитку на тривалість розвитку і, окремо для самців і самок, масу тіла, тривалість життя імаго та рівень експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*.
4. Виявити вплив щільності популяції під час преімагінального розвитку на тривалість розвитку і, окремо для самців і самок, масу тіла, тривалість життя імаго та рівень експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*.

Об'єктом дослідження була тривалість життя *D. melanogaster*.

Предмет дослідження – рівень експресії генів, асоційованих з тривалістю життя у *D. melanogaster*, за різних умов преімагінального розвитку.

Методи досліджень. У роботі використовувались стандартні методи маніпуляцій з модельним об'єктом *D. melanogaster* (догляд та утримання, контроль експериментальних умов, зважування, розділення за статтю, знерухомлення, реєстрація померлих особин), молекулярно-генетичні методи (виділення РНК з гомогенату *D. melanogaster*, постановка реакції зворотної транскрипції для отримання кДНК, ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу) та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Проаналізовано вплив факторів навколишнього середовища (температури, щільності популяції, гіпоксії та гіпероксії, рівня рН поживного середовища) на преімагінальній стадії розвитку на показники життєздатності та тривалість життя самців і самок імаго *D. melanogaster*. Вперше з'ясовано асоціацію отриманих змін тривалості розвитку та життя з рівнем експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo* у самців і самок імаго *D. melanogaster*. Вперше показано ефект впливу гіпоксії та гіпероксії на преімагінальній стадії на тривалість

розвитку та життя самців і самок імаго *D. melanogaster*. Вперше визначено ефект впливу різного рівня рН буферизованого поживного середовища на личинковій стадії розвитку та тривалість розвитку та життя самців і самок імаго *D. melanogaster*. Отримані результати дозволили знайти «фізіологічні оптимуми» для різних чинників навколишнього середовища під час преімагінального розвитку, які обумовлюють максимальний потенціал довголіття комах.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати можуть слугувати підґрунтям подальших досліджень механізмів старіння у тварин та людини. Оскільки досліджені у роботі гени є високо консервативними, отримані дані можуть бути використані для прогнозування тривалості життя у людини і пошуку впливів на пренатальній стадії онтогенезу для потенційного збільшення тривалості життя та покращення здоров'я людини або для мінімізації потенційно негативних наслідків змін профілів експресії генів на ранніх стадіях онтогенезу.

Особистий внесок здобувача. Здобувач сумісно з науковим керівником приймав участь у розробці концепції дисертаційної роботи, формуванні мети і завдань досліджень, плануванні експерименту, аналізі та інтерпретації отриманих результатів та підготовці наукових публікацій. Автором особисто було виконано пошук та аналіз літературних даних для написання теоретичної частини дисертаційної роботи. Здобувач приймав участь у виконанні всіх експериментів по впливу факторів навколишнього середовища та догляді за мухами. Здобувач особисто проводив всю молекулярно-генетичну частину роботи, а саме: виділення РНК з гомогенату *D. melanogaster*, проведення реакції зворотної транскрипції для отримання кДНК, проведення ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу. Здобувачем особисто проведено статистичний аналіз отриманих результатів та сформульовано заключні висновки.

Автор висловлює слова глибокої та щирої вдячності Олександру Вайсерману та всім співробітникам лабораторії епігенетики Інституту геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України за допомогу у виконанні експериментів та плідну співпрацю.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались на вітчизняних конференціях: XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Україна, Львів, 2018), VI Міжнародна конференція «Дрозофіла в експериментальній генетиці» (Україна, Харків, 2018), XI Міжнародна конференція молодих вчених «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Україна, Київ, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи було опубліковано 8 друкованих праць, з них 5 статей у фахових наукових виданнях, серед яких одна стаття у виданні, що входить до міжнародної бази даних SCOPUS (Q1), та 3 тез наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, трьох розділів результатів експериментальних досліджень, узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатку. Роботу викладено на 141 сторінці стандартного друкованого тексту, проілюстровано 34 рисунками та 9 таблицями. Список використаної літератури охоплює 195 джерел.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота була виконана на модельному об'єкті – *Drosophila melanogaster* лінії дикого типу Oregon-R.

Загальні умови утримання в рамках експерименту та визначення тривалості життя. Протягом усього дослідження, якщо це не зазначено особливо, мушок на усіх стадіях розвитку утримували за стандартних умов: температурі 25 °С, відносній вологості 70 %, 12-годинних періодах чергування світла і темряви, із застосуванням стандартного поживного середовища, основу якого складає манна крупа, дріжджі та цукор (забезпечує необхідні поживні речовини для росту, розвитку та розмноження) (Ashburner, 1989). У рамках дослідження ефектів температури личинок і лялечок утримували за температур від 20 до 30 °С, а на стадії імаго – за стандартних умов. Усі маніпуляції з мушками – підрахунок кількості особин, розділення за статтю, зважування – виконувалися після знерухомлення мух.

В усіх експериментах середню тривалість розвитку від яйця до імаго визначали як проміжок від середньої точки періоду яйцекладіння до середньої точки періоду появи дорослих особин. На третю добу після вильоту із лялечок мушок знерухомлювали та розділяли за статтю. Готували по п'ять наборів самців і самок, 25 особин у кожному, поміщаючи мух у скляні пробірки, що містили по 3 мл поживного середовища. Три рази на тиждень дрозофіл переміщали у пробірки зі свіжим поживним середовищем, при цьому мертвих комах видаляли, підраховуючи їхню кількість. Вищезазначені маніпуляції повторювали до загибелі останньої особини. Після цього розраховували середню тривалість життя самців і самок дрозофіли. Показник максимальної тривалості життя визначали як середню тривалість життя 10 % комах, які найдовше прожили у кожній групі.

Умови утримання в рамках дослідження ефектів рН поживного середовища на личинковій стадії розвитку. Для відкладання яєць батьківські особини, які походили від однієї пари предків, поміщали у 0,5-літрові скляні банки з 50 мл поживного середовища у кожній (по три повтори на кожную групу), рН якого була 5, 6, 7, 8 та 9. По завершенні яйцекладки батьківські особини видаляли. Поживні середовища буферизували до рН 5, 6, 7, 8 або 9 шляхом змішування зі стоковим розчином фосфатного буферу (1 моль/л), що складався з 5 % одноосновного моногідрату фосфату натрію (рН 4.1-4.5) та 5 % двоосновного гептагідрату фосфату натрію (рН 8.7-9.3) («Thermo Fisher Scientific», США), до кінцевої концентрації 60 мМ. Для отримання необхідного значення рН змішували стокові розчини в різних співвідношеннях, а до точних значень рН доводили за допомогою HCl або NaOH.

Умови утримання в рамках дослідження ефектів концентрації O₂ на стадії преімагінального розвитку. Для відкладання яєць використовували батьківські особини віком 15 діб, які походили від однієї пари предків; після відкладання яєць мух видаляли. Через 1 добу після відкладення яєць банки з личинками розташовували в герметично закритих скляних камерах, в які подавали відповідну газову суміш зі швидкістю 2,5 см³/с. Одну групу дрозофіл утримували в умовах гіпоксії (O₂=10 %), другу – в умовах гіпероксії (O₂=40 %). Контрольна група розвивалася в умовах атмосферної концентрації кисню (O₂=21 %). Контроль вмісту

кисню здійснювали за допомогою магнітоелектричного газоаналізатора МІК-М. Експерименти проводили за постійної температури (25 ± 1) °С. Банки знаходились в камерах до моменту потемніння всіх лялечок і вильоту першої мухи, після чого вони виймалися з пристрою, і виліт інших розвинених мушок відбувався за стандартних умов.

Умови утримання в рамках дослідження ефектів щільності личинкової популяції. Для відкладання яєць батьківські особини, які походили від однієї пари предків, на 24 години розміщували у шести літрових скляних банках зі 100 мл поживного середовища у кожній. У трьох із цих банок було реалізовано нормальну щільність популяції личинок по 300–400 яєць на банку (НЩ; контрольна популяція), а в трьох інших банках – високу щільність (ВЩ), що складала >3000 яєць на банку.

Вилуплення імаго із личинок тривало близько однієї доби у НЩ-банках, і більше п'яти – у варіантах із ВЩ. В залежності від тривалості вилуплення, імаго розділяли на п'ять груп – ВЩ1, ВЩ2, ВЩ3, ВЩ4 і ВЩ5, де номер означає кількість днів до вильоту з лялечки.

Молекулярно-генетичні методи дослідження. Тотальну РНК виділяли, використовуючи комплект реагентів для виділення РНК/ДНК з клінічного матеріалу. Перед постановкою реакції зворотної транскрипції виділену суміш з нуклеїновими кислотами було оброблено ДНКазою I («Thermo Fisher Scientific», США). Синтез кДНК проводився шляхом зворотної транскрипції РНК за допомогою набору реагентів з використанням випадкових гексамерних праймерів. («Thermo Fisher Scientific», США). Аналіз рівня експресії генів проводився за допомогою кількісної ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу з використанням «Суміші для ПЛР з інтеркалюючим флуоресцентним барвником SYBR Green та референсним барвником ROX» («Ukrainian Genetic Technologies», Україна). В якості ендogenousного контролю та для розрахунку відносного рівня експресії був використаний ген «домашнього господарства» *Gapdh2*. Послідовності праймерів для ампліфікації генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* та *Gapdh2* були підібрані з використанням програми «Primer Express Software v3.0» («Applied Biosystems», США). Послідовності праймерів для генів *mTor* та *foxo* були взяті з роботи (Chattopadhyay et al., 2017). Ампліфікацію проводили на приладі 7500 Real-Time PCR Systems, («Applied Biosystems», США). Для розрахунку відносного рівня експресії було використано метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Статистична обробка отриманих результатів. Статистичний аналіз отриманих результатів виконували в програмі Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Статистичну значущість всіх показників життєздатності та рівнів відносної експресії генів визначали з використанням одно- та двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Нормальність розподілу значень розглянутих показників оцінювали за допомогою коефіцієнта асиметрії та ексцесу, графічних методів та критерію Шапіро-Уїлка. Множинні попарні порівняння для виявлення розбіжностей між групами виконували за допомогою апостеріорних тестів Tukey HSD та Dunn's test. Залежність між вагою комах після вилуплення з лялечок та їх середню тривалість життя визначено за допомогою лінійного регресійного аналізу. Варіаційна статистика для даних приведена у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка. Відмінності вважалися значущими при $p < 0,05$. Статистичний

аналіз отриманих даних по впливу температури на преімагінальній стадії розвитку на експресію генів був виконаний в середовищі програмування «Python» з використанням статистичних бібліотек numpy версії 1.26.1, statsmodels версії 0.14.1 та scipy версії 1.11.1. Візуалізації були створені за допомогою бібліотеки plotly версії 2.27.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив рН поживного середовища та концентрації кисню на преімагінальній стадії на тривалість преімагінального розвитку та життя імаго. Результати експериментального дослідження впливу рН поживного середовища на тривалість личинкового розвитку *D. melanogaster* виявили, що оптимальними умовами для найшвидшого розвитку є середовище з рН 5. Статистичний аналіз підтвердив наявність значущих розходжень у тривалості розвитку між рН 5 та іншими досліджуваними значеннями рН.

Криві виживання *D. melanogaster*, що розвивалися в умовах різних рН поживного середовища, демонструють суттєве підвищення тривалості життя самців і самок, що розвивались за рН 5 на преімагінальній стадії, у той час як для груп дрозофіл, що розвивалися при рН 6, 7, 8, та 9, криві виживання практично співпадають (рис. 1).

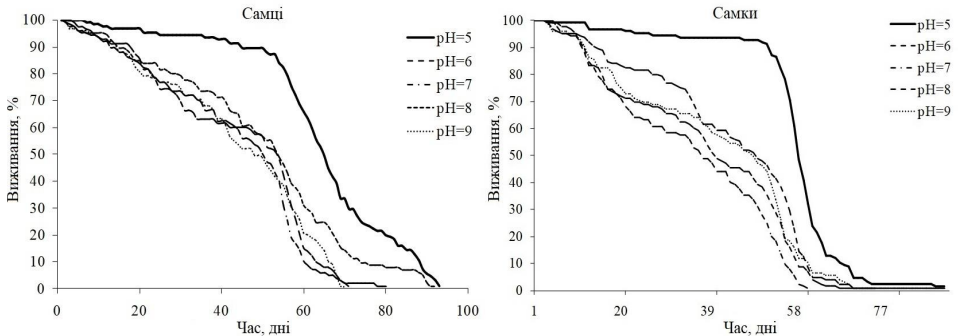


Рис. 1. Криві виживання самців і самок імаго *D. melanogaster*, розвиток яких проходив при різних рН поживного середовища

Однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з подальшим апостеріорним тестом Tukey's HSD підтвердив статистично достовірний ефект рН 5 на середню і максимальну тривалість життя ($p < 0,001$). Отримані результати вказують, що кисле середовище оптимально відповідає природним умовам розвитку цих організмів, тим самим забезпечуючи максимально повноцінний розвиток та подальше збільшення тривалості життя дорослих особин. Імовірно, високий рН їжі може сприяти розвитку дисбактеріозу, збільшуючи присутність патогенних бактерій у порівнянні з коменсальними бактеріями, що, в свою чергу, призводить до порушення гомеостазу кишечника та погіршення здоров'я. Враховуючи високу концентрацію кислот у природному харчовому субстраті *D. melanogaster* та потенційну користь мікроорганізмів, що виробляють кислоту, для здоров'я та розвитку, мухи віддають перевагу слабокислому раціону. Крім того, рН є важливим фактором, що модулює

смакові реакції на їжу, і підвищення тривалості життя на кислих дієтах може бути пов'язане з покращенням смакових якостей їжі та підвищенням її споживанням.

Дослідження впливу гіпероксії та гіпоксії на стадії преімагінального розвитку продемонструвало зростання тривалості розвитку приблизно на одну добу під впливом гіпоксичних умов. В умовах гіпероксії не було зареєстровано змін тривалості преімагінального розвитку.

Аналіз отриманих даних (рис. 2) показав, що у самців і самок, які розвивались за умов гіпероксії, крива виживання демонструє ліве зміщення, при порівнянні з контрольною групою ($O_2=21\%$), що засвідчує скорочення загальної тривалості життя цих особин. Водночас, для самців, що розвивались у гіпоксичних умовах, крива виживання наближена до контрольної ($O_2=21\%$), з окремим винятком у її кінцевій частині, де відзначається підвищення частки довгожителів. Проте, у гіпоксичних умовах, самки виявились менш життєздатними ніж самці, що проявляється у більш швидкому зниженні їхньої виживаності в порівнянні з контролем ($O_2=21\%$).

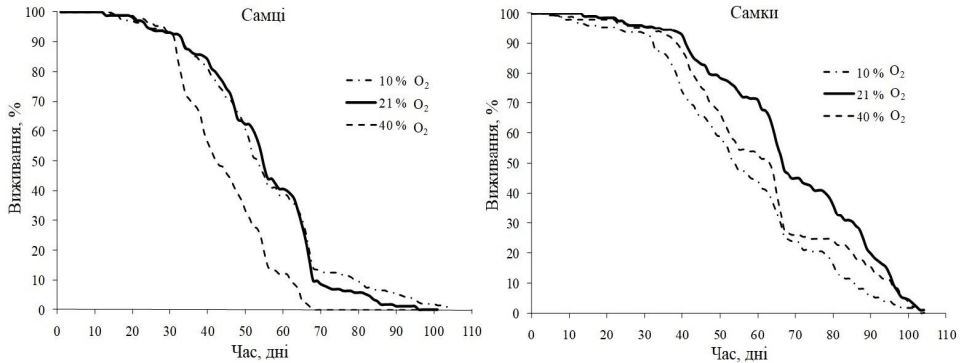


Рис. 2. Криві виживання самців і самок імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за різної концентрації кисню в навколишньому середовищі

Розрахунок середньої та максимальної тривалості життя *D. melanogaster* у різних експериментальних групах продемонстрував статистично достовірне зменшення цих показників в умовах гіпероксії: зменшення середньої тривалості життя склало 17 % у самців та 10 % у самок ($p<0,001$). Середня тривалість життя самців в умовах гіпоксії статистично значуще не змінилась, проте максимальна тривалість життя збільшилася на 11 % ($p<0,001$). У самок розвиток за умов гіпоксії спричинив зниження середньої тривалості життя на 18 % та максимальної тривалості життя на 8 % ($p<0,001$).

Отже, гіпероксія під час преімагінального розвитку чинила негативний вплив на тривалість життя і самців, і самок імаго, статистично достовірно зменшуючи її. Можна припустити, що за умов високої концентрації кисню в навколишньому середовищі проявляється токсична дія надлишкового O_2 , що призводить до оксидативного пошкодження мітохондріальних ферментів. Високий рівень атмосферного кисню може також впливати на активність ферментів антиоксидантного захисту та експресію генів і ферментів, залучених до відновлення

окисного пошкодження. Імовірно, внаслідок шкідливої дії вільнорадикальних процесів і неспроможності клітини ефективно активувати антиоксидантні механізми для запобігання або усунення цих пошкоджень, виникають значні порушення, що відображається на тривалості життя організму. Гіпоксія мала різний ефект на показники тривалості життя для різних статей: у самок такий вплив сприяє зменшенню як середньої, так і максимальної тривалості життя, а у самців максимальна тривалість життя статистично достовірно зросла в умовах гіпоксії, тоді як середня – не змінилась. Зниження тривалості життя може бути зумовлене уповільненням клітинного дихання, метаболічних процесів та синтезу АТФ внаслідок дефіциту кисню, а збільшення частки самців-довгожителів, можливо, відбулося за рахунок явища гормезису.

Вплив температури на личинковій стадії розвитку на показники життєздатності та експресію генів, асоційованих зі старінням, у самців і самок імаго. Отримані дані свідчать про суттєвий вплив температури навколишнього середовища на тривалість преімагінального розвитку дрозофіл. Розвиток уповільнився у 1,7 рази зі зниженням температури з 27,5 °С до 20,0 °С. Також було зафіксовано тенденцію до уповільнення тривалості розвитку із підвищенням температури з 27,5 °С до 30,0 °С.

В ході дослідження було виявлено нелінійну залежність між температурою, за якої відбувався розвиток мух *Drosophila*, та масою імаго при вилупленні. Оптимальна температура розвитку для досягнення максимальної маси тіла імаго складала 22,5 °С. Збільшення температури навколишнього середовища до 30,0 °С призвело до зниження маси тіла самців на 29 %, а самок на 30 %. Також було зафіксовано, що при температурі 20,0 °С маса самок була меншою, ніж при 22,5 °С, що підкреслює чутливість дрозофіл до зміни температурних режимів.

Моніторинг динаміки чисельності живих мушок *Drosophila* у групах, що розвивалися за різних температурних умов, виявив значні відмінності у кривих виживання як для самців, так і для самок (рис. 3).

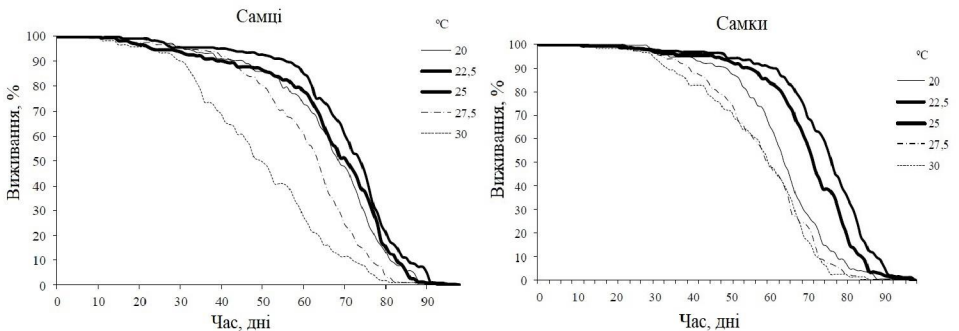


Рис. 3. Криві виживання самців та самок імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за різних температур навколишнього середовища

У групі самців особини, що розвивалися при температурі 30,0 °С, демонстрували найвищу швидкість смертності. У групі самок найвищий темп смертності спостерігався у особин, розвиток яких проходив за температури 30,0 та

27,5 °C. Криві виживання груп, що розвивалися при всіх інших температурах, були помітно зміщені вправо, вказуючи на послідовне збільшення загальної тривалості життя зі зниженням температури розвитку. Найдовше виживали особини обох статей, розвиток яких проходив при 22,5 °C.

Однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з подальшим застосуванням апостеріорного тесту Tukey's HSD продемонстрував статистично значущий вплив температури личинкової стадії розвитку на середню та максимальну тривалість життя самців та самок, $p < 0,001$.

Залежність показників тривалості життя від тривалості преімагінального розвитку за різних температурних умов має нелінійний характер. Встановлено існування температурного оптимуму при 22,5 °C, за якого спостерігається максимальна тривалість життя, що, ймовірно, пов'язано з оптимальними температурними умовами для активності ферментів, які сприяють повноцінному розвитку. Залежність між середньою тривалістю життя та масою тіла є практично лінійною: середня тривалість життя збільшується пропорційно до зростання маси тіла комах.

Рівень експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo* у самців і самок імаго, вирощених за умов різної температури на личинковій стадії розвитку. У комах, розвиток яких проходив за умов різної температури, було визначено рівень відносної експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*, які, згідно літературних даних, показали істотний вплив на тривалість життя як у плодової мушки, та в інших модельних об'єктах.

Результат дисперсійного аналізу показав, що у самців не виявлено статистично значущих температурно-залежних варіацій у рівні експресії гена *Hsp70*, тоді як у самок такі зміни були ідентифіковані (рис. 4).

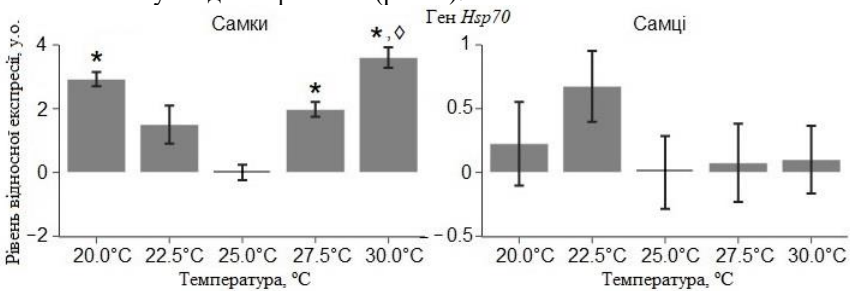


Рис. 4. Рівень відносної експресії гена *Hsp70* самців і самок *D. melanogaster*, преімагінальний розвиток яких проходив за різних температур навколишнього середовища. Представлено логарифм відношення рівня експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії за 25 °C.

* – $p < 0,05$ в порівнянні з контрольною групою, розвиток якої проходив при 25,0 °C (апостеріорний тест Tukey HSD); ◇ – $p < 0,05$ в порівнянні з групою 22,5 °C (апостеріорний тест Tukey HSD)

Згідно тесту TukeyHSD, у самок, личинковий розвиток яких проходив за 20 °C, рівень експресії гена *Hsp70* статистично достовірно підвищувався у 2,9 ($\pm 0,22$)

рази ($p=0,0003$), за температури $27,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ – у $1,98 (\pm 0,23)$ рази ($p=0,0096$) та за $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ – у $3,6 (\pm 0,32)$ рази ($p<0,001$).

Результати дисперсійного аналізу виявили відсутність статистично значущих змін у рівні експресії гена *InR* у самців, тоді як у самок вони були зафіксовані (рис. 5).

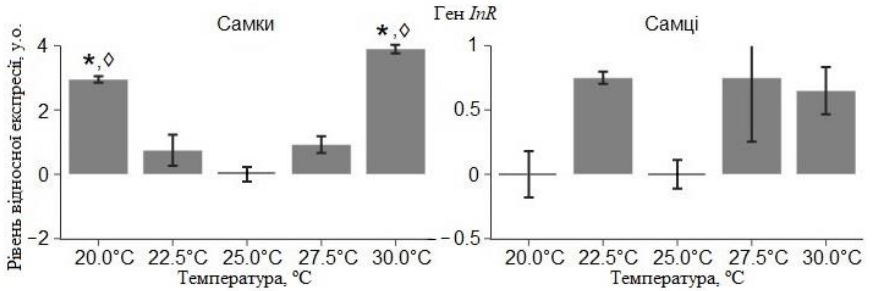


Рис. 5. Рівень відносної експресії гена *InR* самців і самок *D. melanogaster*, преімагінальний розвиток яких проходив за різних температур навколишнього середовища. Усі позначення як на рис. 4

Аналогічно, статистично значущі зміни рівня експресії гена *Sirt1* були відсутні у самців, тоді як у самок такі зміни були зареєстровані: згідно тесту TukeyHSD, у самок, личинковий розвиток яких проходив за $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ та $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, рівень експресії гена *Sirt1* статистично достовірно підвищився у $2,1 (\pm 0,04)$ рази ($p=0,0063$) та у $2,4 (\pm 0,09)$ рази ($p=0,0018$), відповідно (рис. 6).

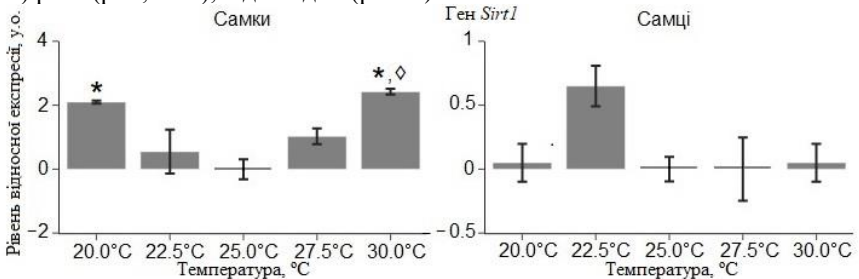


Рис. 6. Рівень відносної експресії гена *Sirt1* самців і самок *D. melanogaster*, преімагінальний розвиток яких проходив за різних температур навколишнього середовища. Усі позначення як на рис. 4

Результати дисперсійного аналізу виявили відсутність статистично значущих змін в експресії гена *mTor* у самців у відповідь на аналізований вплив. Водночас у самок було зареєстровано значущі зміни експресії цього гена (рис. 7). За даними тесту Tukey HSD, у самок, личинковий розвиток яких відбувався за температури $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, спостерігалось збільшення експресії гена *mTor* у $2,5 (\pm 0,11)$ рази ($p=0,0154$). Коли личинковий розвиток протікав при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, рівень експресії зріс у $2,7 (\pm 0,08)$ рази ($p=0,0101$).

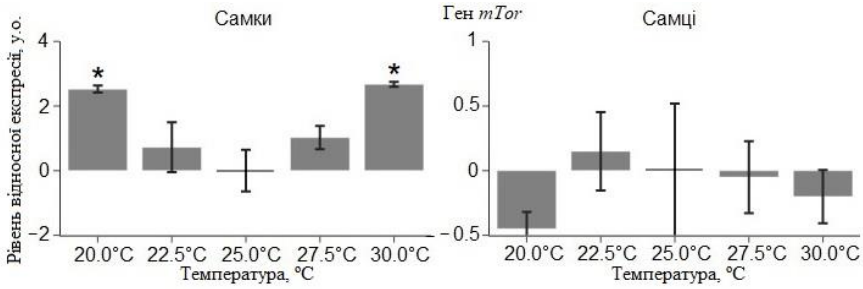


Рис. 7. Рівень відносної експресії гена *mTor* самців і самок *D. melanogaster*, преімагінальний розвиток яких проходив за різних температур навколишнього середовища. Усі позначення як на рис. 4

Аналіз результатів дисперсійного аналізу для гена *foxo* продемонстрував відсутність статистично значущих змін в експресії і у самців, і у самок у відповідь на зміну температури (рис. 8). Проте, у самок було зареєстровано межові показники значущості для температурних груп 20 °C та 30 °C ($p=0,06$ та $p=0,08$, відповідно).

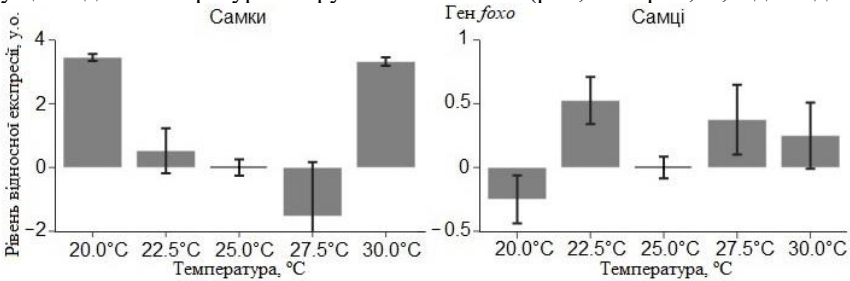


Рис. 8. Рівень відносної експресії гена *foxo* самців і самок *D. melanogaster*, преімагінальний розвиток яких проходив за різних температур навколишнього середовища. Усі позначення як на рис. 4

Таким чином, у самців всіх досліджених груп не зафіксовано змін у експресії жодного з аналізованих генів. Натомість, самки виявили зростання рівнів експресії всіх досліджених генів при відхиленні температури від загальноприйнятого фізіологічного оптимуму в 25 °C. Таке зростання було статистично значущим для всіх генів за одним винятком: для гена *foxo*, при відсутності статистично значущих змін у рівні експресії, були встановлені пороги, в сенсі статистичної значущості, значення. Отримані результати скоріше свідчать про генералізовану стресову реакцію, яка не була асоційована з подовженням тривалості життя, ніж про специфічну відповідь. Також, виявлена статеві відмінності у профілях експресії генів, а саме наявність достовірної зміни експресії аналізованих генів у самок і відсутність такої у самців імаго, свідчить про підвищення стресостійкості у самок. Це може бути пов'язане з їхнім більшим розміром, що потенційно забезпечує більші запаси поживних речовин, та з більшою кількістю копій генів, розташованих на X-хромосомі, у самок порівняно із самцями.

Вплив щільності популяції личинок на показники життєздатності та експресії генів, асоційованих зі старінням, у самців і самок імаго. Перетворення лялечок *D. melanogaster* на дорослих особин за нормальних умов триває близько доби. В нашому дослідженні продемонстровано, що за умов личинкового перенаселення темп росту личинок плодових мушок знижується і процес вилуплення розтягується. Якщо середня тривалість розвитку особин у групах з нормальною щільністю личинок (НЩ) становила 8 діб, то за високої щільності (ВЩ) вона продовжувалась від 8 до 12 діб. Ми розділили мух, які розвивались за високої щільності личинок, на 5 груп в залежності від тривалості розвитку: ВЩ1 – 8 діб, ВЩ2 – 9 діб, ВЩ3 – 10 діб, ВЩ4 – 11 діб та ВЩ5 – 12 діб.

Слід зазначити, що імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов підвищеної щільності, демонстрували суттєве зниження середньої маси тіла в порівнянні з контрольними особинами – приблизно на 20 %.

Личинковий розвиток за умови високої щільності суттєво вплинув на тривалість життя обох статей. Як середня, так і максимальна тривалість життя у групах ВЩ1 та ВЩ2 були значно збільшені у самців і самок порівняно з групою НЩ, а в інших групах ВЩ знижені – мінімальні значення демонструвала група ВЩ5 (рис. 9). Згідно двофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, вплив личинкової щільності на тривалість життя був статистично значущим (значення p на рівні від 0,0001 до 0,006).

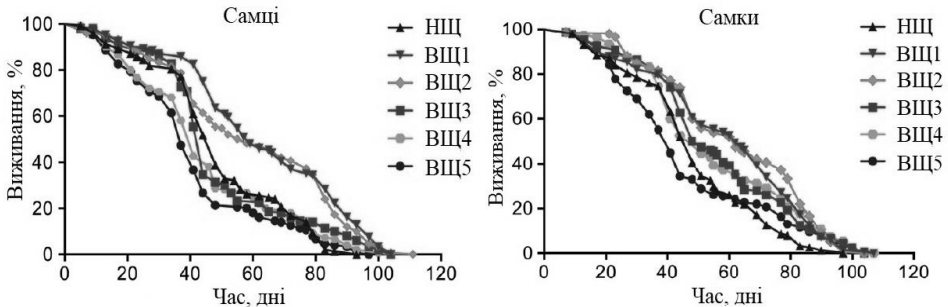


Рис. 9. Криві виживаності самців і самок *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної щільності популяції (НЩ) та високої щільності популяції (ВЩ1-5), визначення груп див. у тексті

Подовження періоду розвитку у групі особин ВЩ, зменшення маси тіла та тривалості життя можуть бути пов'язані з обмеженою доступністю поживного середовища через конкуренцію між личинками, підвищеною концентрацією токсичних продуктів метаболізму в середовищі, дефіцитом місця «заягання» або комплексним впливом всіх цих факторів, які є неминучим наслідком личинкового перенаселення. Збільшення тривалості життя в групах ВЩ1 та ВЩ2 можна пояснити тим, що ці групи "вигравали" зазначену вище конкуренцію.

Рівень експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo* у самців і самок імаго, розвиток яких проходив за умов різних щільностей популяції личинок. Отримані результати аналізу відносного рівня експресії гена *InR* показали

відсутність достовірних змін у самок, тоді як у самців такі зміни були зафіксовані (рис. 10). Згідно апостеріорного тесту попарних порівнянь, рівень відносної експресії гена у самців статистично достовірно підвищився в групах ВЦ3 у 3,02 ($\pm 0,33$) рази ($p < 0,05$) та ВЦ5 – у 3,97 ($\pm 0,94$) рази ($p < 0,01$) у порівнянні з контрольною групою НЦ.

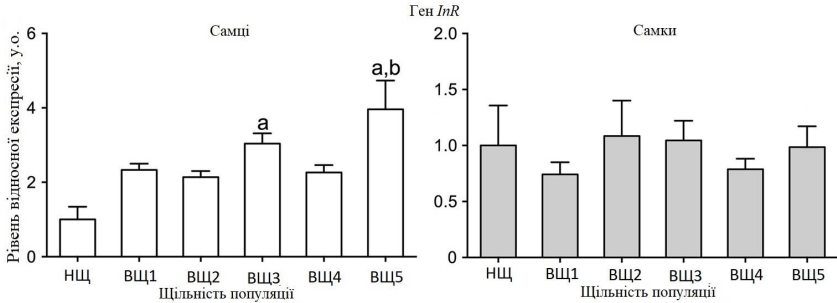


Рис. 10. Рівень відносної експресії гена *InR* самців і самок імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної (НЦ, контрольна група) та високої щільності (ВЦ1-ВЦ5) популяції. Представлено відношення рівня експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії у контрольній групі НЦ.

a – $p < 0,05$ в порівнянні з контрольною групою НЦ (апостеріорний тест Tukey HSD); b – $p < 0,05$ в порівнянні з групою ВЦ1 (апостеріорний тест Tukey HSD)

Результати аналізу відносного рівня експресії гена *Hsp70* демонструють наявність статистично значущої зміни у самців та відсутність значущої зміни у самок (рис. 11): для самців у попарному порівнянні з контрольною групою НЦ зафіксовано достовірне підвищення рівня експресії гена *Hsp70* у групі ВЦ5 у 2,7 ($\pm 0,45$) рази ($p = 0,01$).

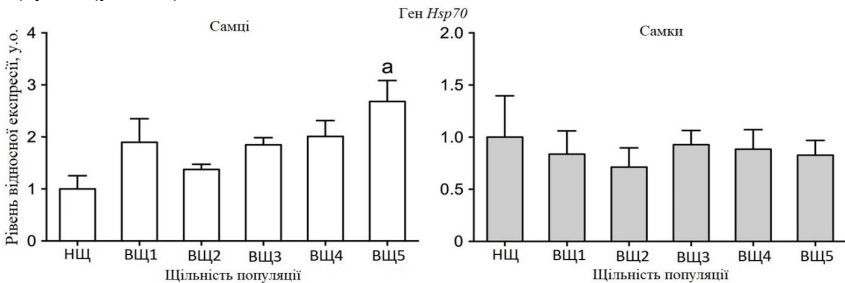


Рис. 11. Рівень відносної експресії гена *Hsp70* самців і самок *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної (НЦ, контрольна група) та високої щільності (ВЦ1-ВЦ5) популяції. Позначення як на рис. 10

Для гена *Sirt1* показано наявність статистично значущої зміни у самців майже всіх досліджуваних груп та відсутність значущих змін у самок (рис. 12).

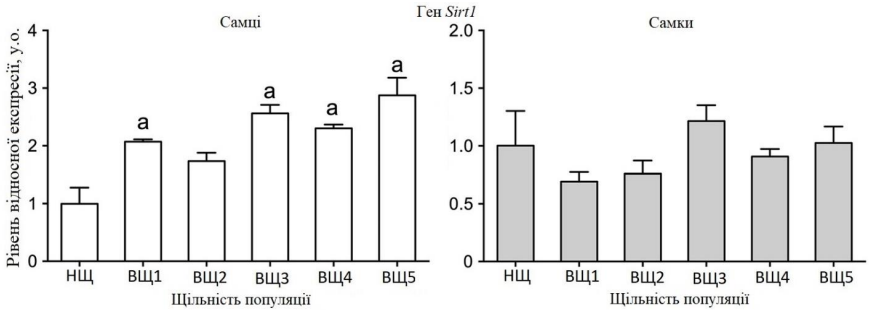


Рис. 12. Рівень відносної експресії гена *Sirt1* самців і самок *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної (НЦ, контрольна група) та високої щільності (ВЦ1-ВЦ5) популяції. Позначення як на рис. 10

Згідно апостеріорного тесту попарних порівнянь, рівень відносної експресії гена статистично достовірно підвищився в групах ВЦ1 у 2,06 ($\pm 0,05$) рази ($p=0,01$), ВЦ3 – у 2,56 ($\pm 0,17$) рази ($p<0,001$), ВЦ4 – у 2,3 ($\pm 0,07$) рази ($p<0,01$) та ВЦ5 – у 2,9 ($\pm 0,35$) рази ($p<0,001$) у порівнянні з контрольною групою НЦ.

Рівень експресії гена *mTor* також по різному реагує на щільність личинкової популяції у самців і самок (рис. 13). Дисперсійний аналіз не виявив статистично достовірної зміни рівня експресії гена *mTor* у самок, тоді як у самців такі зміни були зафіксовані. Згідно тесту Tukey HSD, рівень відносної експресії гена статистично достовірно підвищився в групах ВЦ3 у 3,2 ($\pm 0,56$) рази $p=0,01$, ВЦ4 у 4,8 ($\pm 0,29$) рази ($p<0,001$) та ВЦ5 у 6,04 ($\pm 0,9$) рази ($p<0,001$) у порівнянні з контрольною групою НЦ.

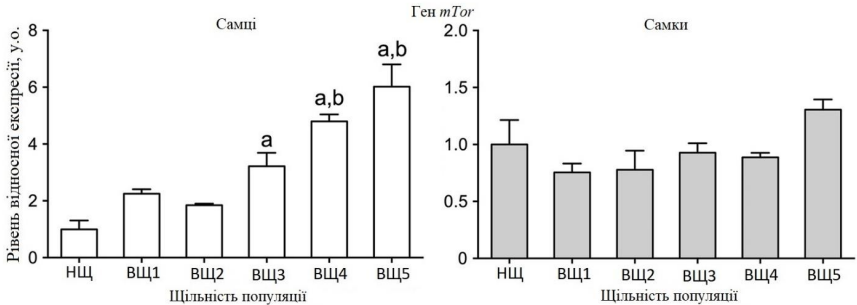


Рис. 13. Рівень відносної експресії гена *mTor* самців і самок *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної (НЦ, контрольна група) та високої щільності (ВЦ1-ВЦ5) популяції. Позначення як на рис. 10

Результати аналізу відносного рівня експресії гена *foxo* демонструють відсутність статистично значущої зміни у самок (рис. 14).

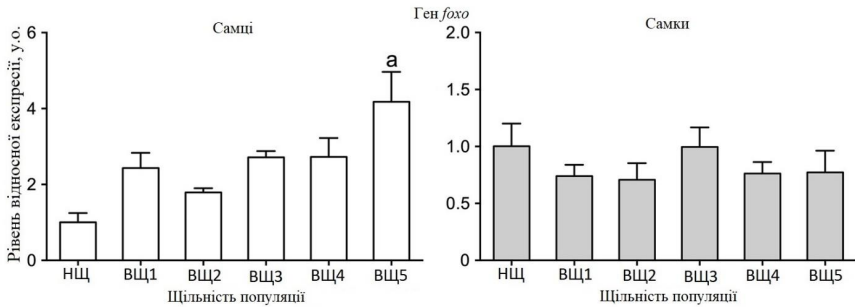


Рис. 14. Рівень відносної експресії гена *foxo* самців і самок *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної (НЩ, контрольна група) та високої щільності (ВЩ1-ВЩ5) популяції. Позначення як на рис. 10

У самців згідно дисперсійного тесту ANOVA зміна рівня експресії була статистично достовірною. У попарному порівнянні з контрольною групою зафіксовано достовірне підвищення рівня експресії у групі ВЩ5 у 4,14 ($\pm 0,87$) рази ($p < 0,001$).

Підсумовуючи отримані результати визначення відносного рівня експресії генів, можна відмітити, що у самок всіх аналізованих груп не спостерігалось зміни експресії по жодному з досліджуваних генів. В той самий час у самців спостерігалась зміна рівня експресії генів *InR*, *Hsp70*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo* у відповідь на вплив високої щільності личинкової популяції. Основний біологічний процес, згідно бази даних FlyBase, який об'єднує усі досліджувані в даній роботі гени, це «відповідь на стрес». Можна припустити, що основним способом зміни експресії усіх цих генів була неспецифічна, узагальнена відповідь на стрес, спричинена перенаселенням, а не специфічна реакція.

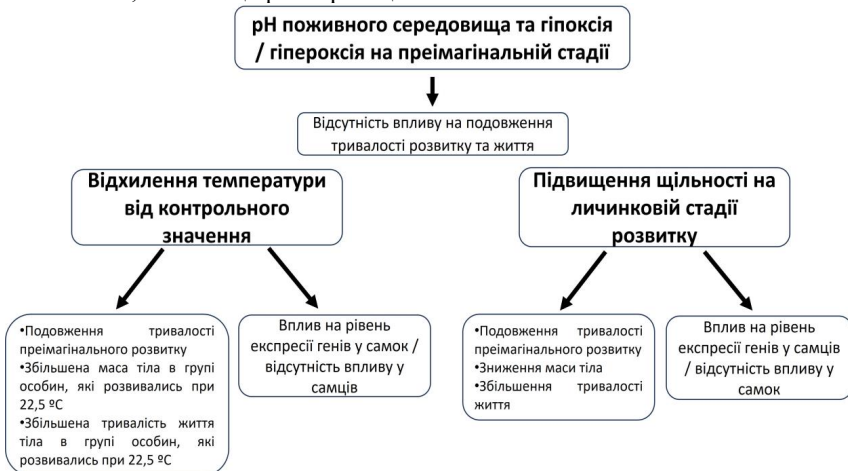


Рис. 15. Вплив умов преімагінального розвитку на тривалість життя і рівень експресії генів *D. melanogaster*

Отже, в нашій роботі ми продемонстрували (рис. 15), що лужне та більш нейтральне рН поживного середовища і гіпоксія та гіпероксія не вплинули суттєво на тривалість преімагінального розвитку, а також не привели до підвищення тривалості життя. Водночас, відхилення температури преімагінального розвитку від контрольного значення має вплив як на тривалість розвитку, так і на тривалість життя. При цьому температура впливає на рівень експресії досліджених генів у самок, але статистично достовірно не впливає на такий у самців. Натомість, було продемонстровано, що висока личинкова щільність, яка впливає на тривалість преімагінального розвитку та життя, має вплив і на експресію генів у самців, але не у самок.

ВИСНОВКИ

У ході виконання роботи з'ясовано вплив умов, за яких відбувається преімагінальний розвиток *Drosophila melanogaster* (концентрація кисню, рН середовища, температура та щільність популяції личинок), на тривалість життя та життєві показники імаго, а також на рівень експресії п'яти генів (*Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*), асоційованих з тривалістю життя.

1. Гіпоксичні (10 % кисню) та гіпероксичні (40 % кисню) умови впливають на тривалість життя статистично достовірно. Гіпероксія викликає зменшення середньої тривалості життя на 17 % у самців ($p < 0,001$) та на 10 % у самок ($p < 0,001$). За умов гіпоксії середня тривалість життя самців статистично достовірно не змінюється, тоді як у самок знижується на 18 % ($p < 0,001$).
2. Кисле поживне середовище (рН 5) на личинковій стадії розвитку статистично достовірно збільшує (у середньому на 47 %) середню тривалість життя самців і самок імаго *D. melanogaster* у порівнянні з особинами, личинки яких розвивалися за інших значень рН (рН 6, 7, 8 та 9). Значущих відмінностей у тривалості розвитку та життя в групах особин, розвиток яких проходив за рН 6, 7, 8 та 9, виявлено не було.
3. Зниження температури, за якої відбувається преімагінальний розвиток, від 30 °С до 22 °С призводить до достовірного уповільнення розвитку на декілька діб. Оптимальна температура для досягнення максимальної маси тіла імаго складає 22,5 °С, за цієї ж температури спостерігається достовірне підвищення як середньої, так і максимальної тривалості життя самців і самок.
4. Для п'яти проаналізованих генів зареєстровано підвищення у 2–3 рази рівня їхньої експресії у самок при відхиленні температури, за якої відбувається преімагінальний розвиток, від оптимальної – максимальний ефект спостерігався за температури 20 °С і 30 °С. Водночас, у самців статистично достовірних змін рівнів експресії досліджених генів не виявлено.
5. Підвищення щільності популяції до 3 тис. і більше личинок на 100 мл поживного середовища (проти норми у 300–400 личинок) призводить до збільшення тривалості преімагінального розвитку – за цим показником, який варіював від 8 до 12 діб, мух було розділено на 5 груп. Для самців і самок в усіх групах було зареєстровано зниження середньої маси тіла імаго, а у перших двох групах (тривалість розвитку 8 та 9 діб) – збільшення середньої тривалості життя на 23–29 %.

6. У самок мух, личинковий розвиток яких відбувався за високої щільності личинкової популяції, не спостерігались статистично достовірні зміни рівнів експресії п'яти досліджених генів. Але такі статистично достовірні зміни ($p < 0,01$) відбувались у самців. Найсуттєвіші зміни спостерігались у групі високої щільності із тривалістю преімагінального розвитку 12 діб: підвищення рівнів експресії у 3–4 рази для генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* та у 5–6 разів для генів *mTor* та *foxo*.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. **Караман ГС**, **Вайсерман ОМ**, Афанасьєва КС, Сиволоб АВ (2024) Вплив температури личинкової стадії розвитку на експресію генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo* у самців і самок *Drosophila melanogaster*. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка 96(1): 15–24. doi.org/10.17721/1728.2748.2024.96.15-23 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел по темі роботи; участь у постановці експерименту та утриманні і догляді за модельним об'єктом; виділення нуклеїнових кислот; постановка реакції зворотної транскрипції; постановка ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу; статистичний розрахунок отриманих результатів; участь у написанні статті та підготовці її до друку.*)
2. Lushchak OV, **Караман HS**, Kozeretska IA, Koliada AK, Zabuga OG, Pisaruk AV, Koshel NM, Mechova LV, Inomistova MV, Khranovska NM, Vaiserman AM (2019) Larval crowding results in hormesis-like effects on longevity in *Drosophila*: timing of eclosion as a model. Biogerontology 20(2): 191–201. doi.org/10.1007/s10522-018-9786-0 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел по темі роботи; участь у постановці експерименту та утриманні і догляді за модельним об'єктом; виділення нуклеїнових кислот; постановка реакції зворотної транскрипції; постановка ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу; участь у написанні статті та підготовці її до друку.*) (*Scopus/WoS. Q1*)
3. Писарук АВ, **Караман ГС**, Кошель НМ, Мехова ЛВ, Вайсерман ОМ, Козерецька ІА, Чака ОГ, Літовка ІГ, Левашов МІ (2018) Тривалість розвитку та життя *Drosophila melanogaster* за умов личинкового розвитку при гіпоксії та гіпероксії. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Сер Біологія 31: 51–58. doi.org/10.26565/2075-5457-2018-31-6 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел по темі роботи; участь у постановці експерименту та утриманні і догляді за модельним об'єктом; участь у написанні статті та підготовці її до друку.*)
4. **Караман ГС**, Вайсерман ОМ, Писарук АВ, Кошель НМ, Мехова ЛВ, Козерецька ІА (2018) Вплив температури на личинковій стадії розвитку на тривалість життя *Drosophila melanogaster*. Фактори експериментальної еволюції організмів 22: 51–55. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел по темі роботи; участь у постановці експерименту та утриманні і догляді за модельним об'єктом; участь у написанні статті та підготовці її до друку.*)
5. **Караман ГС**, Вайсерман ОМ, Коляда ОК, Забуга ОГ, Писарук АВ, Кошель НМ, Мехова ЛВ, Козерецька ІА (2017) Збільшення тривалості життя

Drosophila melanogaster за умов розвитку при підвищеній щільності личинкової популяції. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів 17(2): 167–173. doi.org/10.7124/visnyk.utgis.15.2.875 (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел по темі роботи; участь у постановці експерименту та утриманні і догляді за модельним об'єктом; участь у написанні статті та підготовці її до друку.)

Тези наукових конференцій:

1. **Караман Г**, Вайсерман О, Коляда О, Забуга О, Писарук А, Кошель Н, Мехова Л, Козерецька І (2018) Тривалість життя *D. melanogaster* за різної щільності личинкової популяції. XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»; 10-12 квітня 2018; Україна. Львів. С. 135-136.
2. **Караман ГС**, Писарук АВ, Кошель НМ, Мехова ЛВ, Забуга ОГ, Вайсерман ОМ, Козерецька ІА (2018) Вплив гіпоксії та гіпероксії на личинковій стадії розвитку на тривалість розвитку і життя *Drosophila melanogaster*. VI Міжнародна конференція «Дрозозфіла в експериментальній генетиці та біології»; 20-24 серпня 2018; Україна. Харків. С. 36-38.
3. **Karaman AS**, Zabuha OG, Inomistova MV, Kozeretska IA (2018) Larval temperature effects on the developmental time and lifespan of *Drosophila melanogaster*. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine»; 3-5 вересня 2018; Україна. Київ. С. 174.

АНОТАЦІЯ

Караман Г.С. Зміни рівня експресії генів, асоційованих з тривалістю життя у *Drosophila melanogaster*, в залежності від умов преімагінального розвитку. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка ННЦ «Інститут біології та медицини». – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2024.

Дисертаційна робота присвячена вивченню впливу різних факторів середовища на преімагінальній стадії онтогенезу на тривалість розвитку і життя та експресію генів, асоційованих з тривалістю життя у *Drosophila melanogaster*.

Метою дисертаційної роботи було з'ясувати вплив умов утримання *D. melanogaster* на стадії преімагінального розвитку (температура, рН, щільність популяції, концентрація кисню) на тривалість життя імаго та рівень експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*, асоційованих з тривалістю життя.

Було продемонстровано, що гіпоксичні (10 % кисню) та гіпероксичні (40 % кисню) умови впливають на тривалість життя статистично достовірно. Гіпероксія викликає зменшення середньої тривалості життя на 17 % у самців ($p < 0,001$) та на 10 % у самок ($p < 0,001$). За умов гіпоксії середня тривалість життя самців статистично достовірно не змінюється, тоді як у самок знижується на 18 % ($p < 0,001$).

Було показано, що кисле поживне середовище (рН 5) на личинковій стадії розвитку статистично достовірно збільшує (у середньому на 47%) середню тривалість життя самців і самок імаго *D. melanogaster* у порівнянні з особинами, личинки яких розвивалися за інших значень рН (рН 6, 7, 8 та 9). Значущих відмінностей у тривалості розвитку та життя в групах особин, розвиток яких проходив за рН 6, 7, 8 та 9, виявлено не було.

Було досліджено, що зниження температури, за якої відбувається преімагінальний розвиток, від 30 °С до 22 °С призводить до достовірного уповільнення розвитку на декілька діб. Оптимальна температура для досягнення максимальної маси тіла імаго складає 22,5 °С, за цієї ж температури спостерігається достовірне підвищення як середньої, так і максимальної тривалості життя самців і самок. Для п'яти проаналізованих генів зареєстровано підвищення у 2–3 рази рівня їхньої експресії у самок при відхиленні температури, за якої відбувається преімагінальний розвиток, від оптимальної – максимальний ефект спостерігався за температури 20 °С і 30 °С. Водночас у самців статистично достовірних змін рівнів експресії досліджених генів не виявлено.

Було виявлено, що підвищення щільності популяції до 3 тис. і більше личинок на 100 мл поживного середовища (проти норми у 300–400 личинок) призводить до збільшення тривалості преімагінального розвитку – за цим показником, який варіював від 8 до 12 діб, мух було розділено на 5 груп. Для самців і самок в усіх групах було зареєстровано зниження середньої маси тіла імаго, а у перших двох групах (тривалість розвитку 8 та 9 діб) – збільшення середньої тривалості життя на 23–29%. У самок мух, личинковий розвиток яких відбувався за високої щільності личинкової популяції, не спостерігались статистично достовірні зміни рівнів експресії п'яти досліджених генів. Але такі статистично достовірні зміни ($p < 0,01$) відбувались у самців. Найсуттєвіші зміни спостерігались у групі високої щільності із тривалістю преімагінального розвитку 12 діб: у 3–4 рази для генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* та у 5–6 разів для генів *mTor* та *foxo*.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, тривалість життя, преімагінальний розвиток, експресія генів.

SUMMARY

Karaman H.S. Changes in expression level of lifespan associated genes in *Drosophila melanogaster* depending on conditions of preimaginal development. – Manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Candidate of Biological Sciences in the specialty 03.00.22 – molecular genetics. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, NSC «Institute of Biology and Medicine». – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

The dissertation is devoted to studying the influence of various environmental factors at the preimaginal stage of ontogenesis on the duration of development, lifespan, and expression of genes associated with lifespan in *Drosophila melanogaster*.

The thesis aimed to find out the influence of the conditions of keeping *D. melanogaster* at the stage of pre-imaginal development (temperature, pH, population density, oxygen concentration) on the lifespan of the imago and the level of expression of *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* and *foxo* genes associated with lifespan.

Hypoxic (10 % oxygen) and hyperoxic (40 % oxygen) conditions have been shown to affect lifespan statistically significantly. Hyperoxia causes a 17 % reduction in average lifespan in males ($p < 0,001$) and 10 % in females ($p < 0,001$). In hypoxic conditions, the average lifespan of males does not change statistically significantly, while it decreases by 18 % in females ($p < 0,001$).

It was shown that an acidic nutrient environment (pH 5) at the larval stage of development significantly increases (generally by 47 %) the average lifespan of male and female *D. melanogaster* imagos compared to individuals whose larvae developed at other pH values (pH 6, 7, 8 and 9). There were no significant differences in the duration of development and life in the groups of individuals whose development took place at pH 6, 7, 8 and 9.

It was demonstrated that lowering the temperature at which preimaginal development takes place from 30 °C to 22 °C leads to reliable retardation of development for several days. The optimal temperature for reaching the maximum body weight of an adult is 22,5 °C, at the same temperature there is a significant increase in the average and maximum life span of males and females. For the five analyzed genes, a 2 to 3-fold increase in their expression level was recorded in females when the temperature at which preimaginal development takes place deviates from the optimum – the maximum effect was observed for temperatures of 20 °C and 30 °C. At the same time, statistically significant changes in the expression levels of the studied genes were not detected in males.

It was revealed that an increase in the population density to 3,000 or more larvae per 100 ml of nutrient medium (against the norm of 300–400 larvae) leads to an increase in the duration of preimaginal development – according to this indicator, which varied from 8 to 12 days, the flies were divided into 5 groups. For males and females in all groups, a decrease in the average body weight of the imago was recorded and in the first two groups (development duration of 8 and 9 days) – an increase in the average life span by 23–29 %. In female flies, whose larval development took place at high larval population density, no statistically significant changes in the expression levels of the five studied genes were observed. However, such statistically significant changes ($p < 0,01$) were observed in males. The most significant changes were observed in the high-density group with a duration of preimaginal development of 12 days: 3 to 4 times for the *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* genes, and 5 to 6 times for the *mTor* and *foxo* genes.

Key words: *Drosophila melanogaster*, lifespan, preimaginal development, gene expression.

Підписано до друку 09.09.24. Формат 60x90/16.

Ум. друк. арк. 0.9. Папір офсетний 80 г/м2. Друк - цифровий
Наклад 100 прим. Зам. №7.

Віддруковано з готових оригінал-макетів у ФОП Ченчик Д.М.

Свідоцтво про державну реєстрацію суб'єкта підприємницької діяльності – фізичної особи:

серія В00 № 290515 від 06.09.2004 року,

електронна пошта (E-mail): zakaz@druks.com.ua

