

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ЦЕНТР «ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНИ»
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КАРАМАН ГАННА СЕРГІЇВНА

УДК 595.7:575.16/.17(043.3)

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

03.00.22 – молекулярна генетика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Караман Г.С.

Науковий керівник: Сиволоб Андрій Володимирович, доктор біологічних
наук, професор

Київ – 2024

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*.

Вивчення механізмів старіння та факторів, що впливають на тривалість життя організмів, є одним із найважливіших завдань сучасної науки. Незважаючи на значний обсяг наукових даних, багато аспектів залишаються недостатньо дослідженими. Актуальність вивчення цих процесів полягає у можливості розробки інноваційних стратегій для покращення здоров'я та якості життя людини. Зокрема, важливим є розуміння взаємозв'язку між ранніми та пізніми стадіями життєвого циклу організмів, оскільки ці стадії можуть бути регульовані схожими біологічними механізмами. Дослідження показали, що різні фактори навколишнього середовища, що впливають на організм на ранніх етапах розвитку, можуть мати довготривалі наслідки для здоров'я та тривалості життя. Використання *Drosophila melanogaster* як модельного об'єкта дозволяє вивчити вплив цих факторів на тривалість життя та експресію генів, що може сприяти розробці нових підходів до продовження життя.

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.

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, **Karaman HS**, Kozheritska 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](https://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 «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології»; 20-24 серпня 2018; Україна. Харків. С. 36-38.
3. **Karaman AS**, Zabuha OG, Inomistova MV, Kozeretka 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.

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*.

Studying the mechanisms of aging and factors affecting the lifespan of organisms is one of the most important tasks of modern science. Despite the considerable amount of scientific data, many aspects remain insufficiently researched. The relevance of studying these processes lies in the possibility of developing innovative strategies to improve human health and quality of life. In particular, it is important to understand the relationship between the early and late stages of the life cycle of organisms, since similar biological mechanisms can regulate these stages. Research has shown that various environmental factors that affect the body in the early stages of development can have long-term consequences for health and life expectancy. The use of *Drosophila melanogaster* as a model allows for studying the influence of these factors on life span and gene expression, which may contribute to the development of new approaches to life extension.

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.

ЗМІСТ

| | |
|--|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ..... | 13 |
| ВСТУП..... | 14 |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ..... | 19 |
| 1.1. Старіння та тривалість життя..... | 19 |
| 1.1.1. Визначення терміну «старіння»..... | 19 |
| 1.1.2. Методи оцінки старіння..... | 20 |
| 1.1.3. Тривалість життя як основний показник старіння..... | 22 |
| 1.1.4. Онтогенетична теорія старіння..... | 23 |
| 1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> як модельний об'єкт для вивчення факторів впливу на тривалість життя..... | 26 |
| 1.2.1. Особливості розвитку <i>Drosophila melanogaster</i> | 26 |
| 1.2.2. Роль <i>Drosophila</i> в дослідженні старіння та тривалості життя..... | 27 |
| 1.2.3. Модельний об'єкт <i>Drosophila melanogaster</i> в дослідженнях факторів впливу на тривалість життя..... | 29 |
| 1.3. Різноманіття факторів, які впливають на тривалість життя <i>Drosophila</i> | 32 |
| 1.4. Генетичні фактори, які впливають на тривалість життя <i>Drosophila</i> | 37 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ..... | 43 |
| 2.1. Матеріали дослідження..... | 43 |
| 2.2. Умови утримання об'єкту дослідження..... | 43 |
| 2.2.1. Загальні умови утримання в рамках експерименту та маніпуляції з <i>Drosophila melanogaster</i> | 43 |
| 2.2.2. Умови утримання в рамках дослідження ефектів рН поживного середовища на личинковій стадії розвитку..... | 46 |
| 2.2.3. Умови утримання в рамках дослідження ефектів концентрації O ₂ на стадії преімагінального розвитку..... | 48 |
| 2.2.4. Умови утримання в рамках дослідження ефектів зміни температури на стадії преімагінального розвитку..... | 49 |

| | |
|---|----|
| 2.2.5. Умови утримання в рамках дослідження ефектів щільності личинкової популяції..... | 50 |
| 2.3. Молекулярно-генетичний аналіз..... | 52 |
| 2.3.1. Виділення тотальної РНК..... | 52 |
| 2.3.2. Синтез кДНК..... | 54 |
| 2.3.3. Проведення ампліфікації методом кількісної ПЛР у реальному часі..... | 56 |
| 2.3.4. Розрахунок рівня експресії генів..... | 63 |
| 2.4. Статистична обробка отриманих результатів..... | 64 |
| РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ рН ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ТА КОНЦЕНТРАЦІЇ КИСНЮ НА ПРЕІМАГІНАЛЬНІЙ СТАДІЇ НА ТРИВАЛІСТЬ ПРЕІМАГІНАЛЬНОГО РОЗВИТКУ ТА ЖИТТЯ ІМАГО..... | 66 |
| 3.1. Вплив рН поживного середовища на преімагінальній стадії на тривалість преімагінального розвитку та життя імаго..... | 66 |
| 3.2. Вплив гіпоксії та гіпероксії на преімагінальній стадії на тривалість преімагінального розвитку та життя імаго..... | 70 |
| РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА ЛИЧИНКОВІЙ СТАДІЇ РОЗВИТКУ НА ПОКАЗНИКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ, АСОЦІЙОВАНИХ ЗІ СТАРІННЯМ, У САМЦІВ І САМОК ІМАГО..... | 75 |
| 4.1. Зміна тривалості преімагінального розвитку та маси тіла самців і самок імаго, личинковий розвиток яких проходив за різних температур..... | 75 |
| 4.2. Зміна середньої та максимальної тривалості життя самців і самок імаго, личинковий розвиток яких проходив за різних температур..... | 77 |
| 4.3. Визначення рівня експресії генів <i>Hsp70</i> , <i>InR</i> , <i>Sirt1</i> , <i>mTor</i> та <i>foxo</i> у самців і самок імаго, вирощених за умов різної температури на личинковій стадії розвитку..... | 83 |

| | |
|---|-----|
| РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ЩІЛЬНОСТІ ПОПУЛЯЦІЇ ЛИЧИНОК НА ПОКАЗНИКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ, АСОЦІЙОВАНИХ ЗІ СТАРІННЯМ, У САМЦІВ І САМОК ІМАГО..... | 91 |
| 5.1. Залежність тривалості преімагінального розвитку та маси тіла самців і самок імаго від щільності популяції личинок..... | 91 |
| 5.2. Залежність середньої та максимальної тривалості життя самців і самок імаго від щільності популяції личинок..... | 92 |
| 5.3. Залежність репродуктивної активності самок від щільності популяції на личинковій стадії їхнього розвитку..... | 96 |
| 5.4. Визначення рівня експресії генів <i>Hsp70</i> , <i>InR</i> , <i>Sirt1</i> , <i>mTor</i> та <i>foxo</i> у самців і самок імаго, розвиток яких проходив за умов різних щільностей популяції личинок..... | 97 |
| УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ..... | 104 |
| ВИСНОВКИ..... | 119 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... | 121 |
| ДОДАТОК..... | 139 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

| | | |
|---------------|---|--|
| ПЦР | – | полімеразна ланцюгова реакція |
| дНТФ | – | суміш дезоксирибонуклеотид трифосфатів |
| <i>Hsp70</i> | – | heat shock protein 70 – ген білка теплового шоку 70 |
| <i>InR</i> | – | insulin/IGF tyrosine kinase receptor – ген інсулінового тирозинкіназного рецептору |
| <i>Sirt1</i> | – | silent information regulator protein – ген сіртуїн 1 |
| <i>mTor</i> | – | mechanistic target of rapamycin – ген мішені рапаміцину |
| <i>foxo</i> | – | Forkhead Box O – ген, що кодує фактор транскрипції <i>foxo</i> |
| <i>Gapdh2</i> | – | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase – гліцеральдегід фосфат дегідрогеназа |

ВСТУП

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 [1]. 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 [2].

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 [3]. Існує гіпотеза про ініціацію старіння ще на ранній стадії онтогенезу організму [4], 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 [5].

Загальновідомо, що живі організми характеризуються високим ступенем пластичності на ранніх етапах онтогенезу [6], що дозволяє організмам пристосовуватись до мінливих умов навколишнього середовища [7]. При цьому відбувається так зване «програмування розвитку», яке полягає в тому, що вплив певного стимулу, застосованого в критичний або чутливий період онтогенезу, може спричинити довготривалі та стійкі зміни в структурі чи функціях організму [8]. 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 [9]. 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 [10].

Drosophila melanogaster є модельним об'єктом, який широко використовується в дослідженнях найрізноманітніших біологічних процесів, включаючи процеси старіння [11]. 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*.

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 на 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.

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).

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 реакцій 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 ОлександрВайсерману 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, 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Старіння та тривалість життя

1.1.1. Визначення терміну «старіння»

Протягом останнього століття смертність через такі причини як голод, інфекційні захворювання та насильство було зведено до мінімуму, що значно збільшило тривалість життя людей у різних країнах світу і вважається важливим здобутком сучасної цивілізації – принаймні, це стосується розвинених країн. У Сполучених Штатах середня очікувана тривалість життя дитини, народженої на початку 20-го століття, становила 47,3 роки порівняно прогнозами очікуваної тривалості життя дитини, народженої в 2014 році, на рівні 78,9 років [12, 13]. Прогнозується, що в глобальному масштабі тривалість життя продовжуватиме зростати, і до 2030 року очікувана тривалість життя в багатьох країнах перевищить 85 років [14]. Цей прогрес призвів до того, що в розвинених країнах світу одними з переважаючих причин смерті на сьогоднішній час є хвороби, асоційовані з віком, такі як серцево-судинні захворювання, злоякісні новоутворення, хвороба Альцгеймера тощо [15]. Збільшення тривалості життя викликало значну цікавість до дослідження біологічного старіння і механізмів, що лежать в його основі, та до процесів, які можуть відтермінувати смерть шляхом затримки або запобігання ключових етапів старіння [16].

Не дивлячись на те, що існують види, які демонструють незначне старіння, зокрема, гідра, яка не має типових ознак старіння, характерних для інших організмів [17], а інші види, такі як молюски, живуть століттями [18] або навіть тисячоліттями, як коралові рифи [18], старіння, схоже, є універсальною властивістю у тваринному світі і принаймні для видів, які розмножуються статевим шляхом, вікове погіршення стану і смерть є неминучими.

Феномен старіння імовірно привернув увагу людей майже одразу після появи свідомості та мислення. Початкові спроби пояснення цього процесу переважно були релігійно обґрунтовані. Релігійна асоціація з безсмертям, імовірно, сприяла уявленню про старіння як про процес організованого занепаду, якого можна було б запобігти, якби можна було знайти правильний спосіб як це зробити. Це бачення залишається актуальним і сьогодні, але вже в контексті розуміння старіння як генетично програмованого процесу. Тобто генетична інформація в організмі визначає не лише його розвиток, але й загибель. І якщо в стародавні часи теологічна складова пояснення процесу старіння була зрозумілою для утримання людини на своєму місці, то сучасні вчені вимагають чогось більшого [19].

Значна частина плутанини щодо старіння пов'язана зі спробами дати йому визначення. Описи фенотипів старіння часто являють собою не стільки характеристику процесу, скільки перелік або накопичення часто не пов'язаних між собою фізіологічних змін у часі. Більшість визначень старіння підкреслюють стійке прогресуюче, незворотне зниження продуктивності організму [20]. Старіння – це процес, який характеризується функціональною втратою клітин, тканин та органів і супроводжується підвищенням сприйнятливості до багатьох захворювань, включаючи рак, нейродегенерацію, серцево-судинні захворювання та порушення метаболізму організму у ссавців. Він є фундаментальним та характерним для всіх багатоклітинних організмів, і є найбільш вивченим і зрозумілим в еволюційній лінії тварин. [21].

1.1.2. Методи оцінки старіння

Складність задачі дати визначення старінню може бути вирішена шляхом його вимірювання. Існує два різних методи, які можна використовувати для вимірювання старіння – це криві виживання та криві смертності [20].

Найпоширенішим методом вимірювання в дослідженнях старіння є криві виживання. Він базується на даних, отриманих за допомогою таблиць життя (від англ. life tables), що акумулюють інформацію про час або вік смерті кожної особини в аналізованій популяції. Фактично, ці таблиці фіксують тривалість життя кожної особини в досліджуваній групі, що являє собою проміжок часу між народженням і смертю організму. На основі цих даних будується крива виживання, яка ілюструє відсоток особин, що вижили, у залежності від часу.

Другий метод вимірювання старіння, менш поширений, але теж уживаний – це побудова кривих рівня смертності. Цей показник являється похідним від кривих виживання і розраховується як натуральний логарифм числа особин, що померли у визначений час, по відношенню до всіх особин в досліджуваній популяції.

Криві виживання і смертності кількісно характеризують процес старіння у тій чи іншій популяції. У дикій природі форма кривої виживання зазвичай показує приблизно безперервний спад або постійну втрату життя з часом через хижацтво, травми і хвороби (Рис. 1.1) [20].

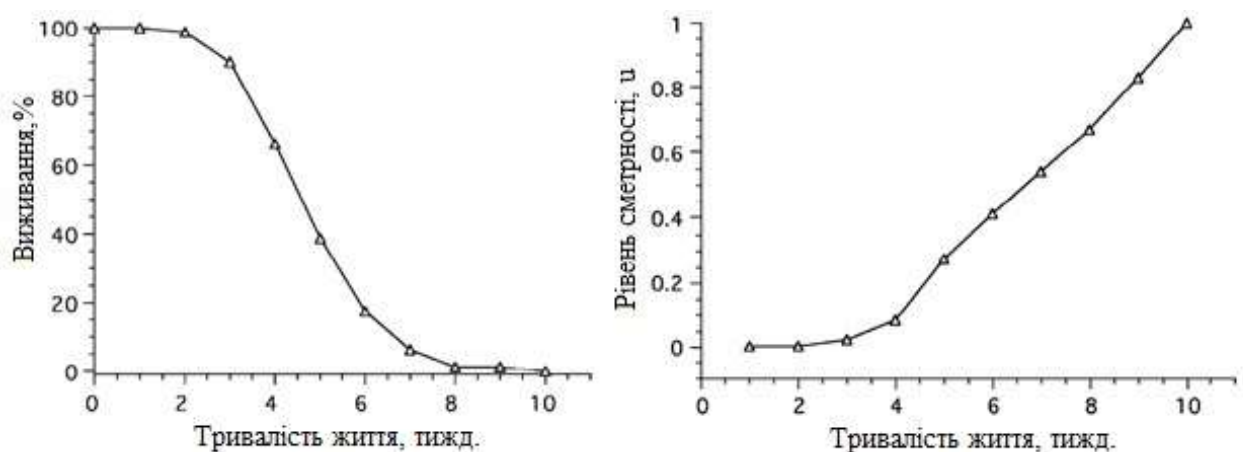


Рис. 1.1. Приклад кривих виживання та смертності, які ілюструють старіння в популяції *D. melanogaster* [20]

1.1.3. Тривалість життя як основний показник старіння

Немає сумнівів, що завдяки науково-технологічному прогресу та медицині тривалість людського життя збільшилася за останнє століття. Не дивлячись на те, що старіння, саме по собі, не можна зупинити або повернути назад, його можна сповільнити або відтермінувати шляхом збільшення тривалості життя. Тому одним з основних напрямків досліджень в сучасній біogerонтології є вивчення довголіття та пошук інтервенційних шляхів збільшення тривалості життя. Існує багато факторів, які впливають на тривалість людського життя, так само як і на тривалість життя інших організмів [22]. Але, згідно існуючих наукових знань, з якими погоджується більшість науковців, тривалість життя є біологічно обумовленою ознакою і постійне її збільшення практично неможливе. Тобто існує максимальна тривалість життя виду, яка генетично детермінована, що, в свою чергу, було еволюційно сформовано в умовах взаємодії з певним набором обмежень навколишнього середовища. Максимальна тривалість життя тісно переплітається з етапами життєвого циклу та параметрами життєздатності. Наприклад, у ссавців – більшість гризунів є короткоживучими видами, які характеризуються невеликими розмірами тіла, короткою тривалістю розвитку, швидким статевим дозріванням та високою плодючістю, а довго живучі види, такі як слони і люди, характеризуються протилежними параметрами [23]. Таким чином, тривалість життя, як окремий параметр, не може еволюціонувати незалежно від інших ознак життєвого шляху [16].

У тварин максимальна тривалість життя визначається як середня тривалість життя 10 % найдовше живучих особин цього виду. Слід зазначити, що максимальну тривалість життя слід відрізнити від середньої тривалості життя або очікуваної тривалості життя, які сильно залежать від умов навколишнього середовища і способу життя. Середня тривалість життя розраховується як середнє значення для даної досліджуваної групи або популяції. Очікувана тривалість життя визначається як середня кількість

років, що залишилися до кінця життя для групи або окремої особини. Також слід окремо відзначити, що довголіття і максимальна тривалість життя хоча і є схожими параметрами, але вони різняться. Довголіття – це здатність виживати після досягнення середнього віку смерті, характерного для певного виду. Це визначення включає в себе не лише індивідуальну здатність досягати старості, але й смертність на рівні популяції, що вимірюється в даному випадку середнім віком смерті в популяції [16, 24].

1.1.4. Онтогенетична теорія старіння

За останні пару століть вчені запропонували велику кількість теорій, за допомогою яких намагалися пояснити процес старіння. Всі вони, з однієї сторони, відрізняються одна від одної, з іншої – у складний спосіб взаємодіють одна з одною, але жодна з цих теорій не є повністю задовільною для пояснення такого складного процесу. На старіння впливає велика кількість факторів, більшість з яких добре відомі, але сам факт їх великої кількості ускладнює пошук підходів для визначення суті процесу [25].

Сучасні біологічні теорії старіння поділяються на дві основні категорії: теорії запрограмованого старіння та теорії пошкоджень або помилок. Теорії запрограмованого старіння припускають, що старіння відбувається за біологічним графіком, який, можливо, є продовженням того, що регулює ріст і розвиток у дитинстві. Це регулювання залежить від змін в експресії генів, які впливають на системи, що відповідають за підтримку, відновлення і захисні реакції. Теорії пошкодження або помилок підкреслюють, що причиною старіння є вплив навколишнього середовища на живі організми, який спричиняє кумулятивний деструктивний вплив на різних рівнях [26].

У 1963 році бельгійській генетик Фредерік Лінц, виходячи з експериментальних міркувань, і його колега Мюллер, аналізуючи механізми скорочення тривалості життя, звернули увагу на зв'язок між розвитком і тривалістю життя. Мюллер стверджував, що розвиток є безперервним

процесом, останньою стадією якого є старіння, або, іншими словами, що старіння є вбудованим наслідком диференціації. З цих позицій тривалість життя постає як епігенетично контрольована ознака, тобто ознака, експресія якої пов'язана з регуляцією функції генів та диференціюванням.

Фредерік Лінц вважається засновником онтогенетичної теорії старіння. У 70-80-х роках він з колегами провели серію досліджень, на модельному об'єкті *D. melanogaster*, в яких вчені маніпулювали умовами навколишнього середовища на преімагінаних стадіях, а саме температурою та щільністю личинок [27]. Вони виявили сильну негативну кореляцію між швидкістю росту та тривалістю життя. Пізніше такий самий зв'язок був підтверджений для *Tribolium castaneum* [28]. Однак Cohet [29] при дослідженні впливу температури личинкового розвитку на тривалість життя продемонстрував, що мухи, які розвивалися при 13 °С і мали дуже низьку швидкість росту, мали коротшу тривалість життя, ніж мухи з високою швидкістю росту, які розвивалися при 17 °С. Тому було вирішено дослідити це питання в ширшому діапазоні умов. Швидкістю росту маніпулювали, змінюючи як температуру розвитку, так і кількість дріжджів, доданих до поживного середовища личинок *D. melanogaster* [30]. Результат експерименту впливу широкого діапазону температур розвитку, а саме від 12 °С до 32,5 °С, продемонстрував відсутність стійкого послідовного зв'язку між швидкістю росту і тривалістю життя. Натомість було виявлено оптимальний діапазон температур і було показано, що тривалість життя різко зменшується по обидва боки цього діапазону [31]. Коли швидкість росту збільшували за рахунок зменшення кількості дріжджів в поживному середовищі личинок, спостерігалось те ж саме явище, тобто оптимальна швидкість росту, по обидва боки якої тривалість життя зменшувалася [32]. Тому загальноприйнята обернена залежність між тривалістю життя і швидкістю росту, швидше за все, обмежена відносно вузьким діапазоном умов навколишнього середовища.

Суть онтогенетичної теорії старіння в тому, що деякі механізми розвитку впливають на пострепродуктивне життя, спричиняючи те, що ми

називаємо старінням. Поява перших багатоклітинних еукаріотів, що розмножуються статевим шляхом, безсумнівно, вимагала програми розвитку, що включала б гени, які б керували динамічним перетворенням соми від зародка до репродуктивно компетентної дорослої особини. Такі гени мали б суворо зберігатися в кожному наступному виді через їхню абсолютну користь для виживання.

На відміну від розвитку, старіння не еволюціонувало, а було потенціалом тих самих генів розвитку, які були відібрані для виживання виду. Цей потенціал рідко реалізовувався, оскільки хижацтво, хвороби та інші зовнішні фактори є поширеними причинами смерті в природних популяціях, а вплив природного добору значно зменшується після досягнення репродуктивної зрілості [33]. Специфічні гени розвитку, відповідальні за фізичну і функціональну перебудову організму в міру його дорослішання, не можуть бути легко приглушені після цього. Таким чином, безпервні і неспрямовані соматичні зміни, що виникають внаслідок інерції розвитку після дозрівання, прогресивно збільшують внутрішній розлад і фізіологічний хаос у період після настання зрілості. Цей механізм не застосовується до нестатевозрілих тварин, які розмножуються один раз, а потім помирають після завершення програми розвитку. Він актуальний лише для ітеропарних тварин, життя яких продовжується після першої та наступних репродуктивних подій за межами статевої зрілості. Це обмеження ґрунтується на припущенні, що у хребетних, де напівпарність є відносно рідкісним явищем, а також у ітеропарних безхребетних, невизначена тривалість життя у зрілих тварин вимагає соматичного стазу, а не постійного соматичного ремоделювання, яке може погіршити пристосованість після завершення росту і розвитку. Оскільки експресія генів, що спричинена інерцією розвитку, не припиняється, продовження експресії після досягнення дорослого віку руйнує гомеостаз, послаблює захисні сили організму, спричиняє кволість, підвищує ризик вроджених захворювань і робить смерть неминучою. Таким чином, той самий процес, який необхідний для виживання

в репродуктивно компетентному молодому віці, стає тим, що гарантує фізичний і функціональний занепад у подальшому. Цей особливий приклад антагоністичної плейотропії пояснює, чому фундаментальні події, пов'язані зі старінням, включаючи втрату життєвих сил, поступово зростаючу кваліть і підвищений ризик розвитку вікових захворювань, є настільки схожими у метазооїдів протягом їхньої еволюційної історії [34].

1.2. *Drosophila melanogaster* як модельний об'єкт для вивчення факторів впливу на тривалість життя

1.2.1. Особливості розвитку *Drosophila melanogaster*

Drosophila класифікується як голометаболична комаха, що означає проходження на етапі розвитку через повний метаморфоз. Цей процес включає чотири чітко визначені стадії розвитку: яйце, личинка, лялечка і доросла особина або імаго. Кожна стадія морфологічно відмінна від інших, що означає повну трансформацію в структурі та зовнішньому вигляді комахи на кожному етапі.

Запліднені самки відкладають яйця на поверхню поживного середовища. Яйця приблизно 0,5 мм завдовжки, білі, овальні, злегка сплюснуті з боків. Яйцеклітина оточена внутрішньою дуже тонкою вітеліновою оболонкою і зовнішньою міцною позаклітинною оболонкою, яка називається хоріон. На передньому кінці хоріона, від його спинної поверхні, відходять дві маленькі нитки, які є продовженням хоріона. Це дихальні нитки або дихальця, що служать для газообміну і не дозволяють яйцю зануритись повністю в рідке поживне середовище. З яйця вилуплюється личинка через 22-24 години, яка схожа на крихітного черв'яка і називається личинкою першого віку. Вся личинкова стадія триває приблизно 4 – 5 діб, під час якої личинка живиться субстратом, росте і двічі линяє. Після останньої линьки, приблизно через 30 годин, личинка третього віку, яка є найбільшою з личинкових форм, виповзає на стінки ємності, в якій росте, і там

перетворюється на лялечку. Лялечка нерухома і на ранніх стадіях має жовтувато-білий колір. У процесі розвитку кутикула лялечки поступово темнішає та твердіє і перетворюється на пупарій. При цьому відбувається лізис більшості структур личинки, хоча деякі органи личинки зберігаються. Стадія лялечки триває приблизно 4 дні. На стадії лялечки відбувається метаморфоз, по закінченню якого, через апікальну частину пупарію вилуплюється імаго. Дорослі самці мух статеві активні вже через кілька годин після вилуплення, а у самок дозрілі яйця з'являються лише через два дні, і цикл починається знову [35].

1.2.2. Роль *Drosophila* в дослідженні старіння та тривалості життя

Drosophila melanogaster являється універсальним модельним організмом для вивчення різноманітних біологічних процесів, включаючи генетику, розвиток, навчання та поведінку, а як модельний організм для дослідження старіння і довголіття плодового мушку використовують вже понад 100 років.

Ймовірно, що перший кількісний звіт про тривалість життя дрозофіли та вплив генетичного фону на регуляцію тривалості життя в лабораторних умовах був зроблений Hyde в 1913 році, в якому було продемонстровано, що при схрещуванні ліній короткоживучих та довгоживучих мух гібриди першого покоління (F1) виявили суттєве збільшення тривалості життя, яке перевищило показники довгоживучої батьківської лінії. Окрім того, виявлено, що у деяких гібридів другого покоління (F2) тривалість життя була знижена до рівня короткоживучої лінії, що свідчило про прояв ефекту рецесивного генетичного навантаження [36]. В цьому дослідженні також було ідентифіковано статеві відмінності в показниках тривалості життя між особинами чоловічої та жіночої статі в батьківських лініях, тоді як інтербрідинг між самцями та самками F1 у популяції сприяв значному вирівнюванню тривалості життя між статями.

Loeb і Northrop у 1916 році вперше повідомили про використання дрозофіли як модельного організму для досліджень, пов'язаних зі старінням. Вони продемонстрували вплив температури та харчування на тривалість життя і дійшли висновку, що тривалість життя мух, як пойкилотермних організмів, залежить від температури навколишнього середовища [37]. Крім того, вони також вивчали вплив голоду та раціону, збагаченого на цукор, на тривалість життя мух, і також звернули увагу на відмінну тривалість життя у самців і самок [38].

Gonzalez зі співавторами в 1923 році вивчали вплив різних рецесивних мутацій, як гомозиготних, так і їх комбінацій, на тривалість життя. В результаті цієї роботи було встановлено, що окремі мутації, які впливають на колір очей мух або на морфологічні характеристики тіла, можуть впливати на тривалість життя. Було виявлено, що мутації можуть мати не тільки негативний, але й позитивний вплив на середню тривалість життя. Крім того, в цьому дослідженні вперше було продемонстровано, що окремі незчеплені зі статтю мутації можуть по-різному впливати на тривалість життя особин різної статі [39].

Більш систематична робота щодо старіння дрозофіли, яка встановила багато умов, що використовуються по сьогодні, була започаткована в 1921 році Pearl і Parker, які також продемонстрували, що довголіття у мух є спадковим [40, 41]. У статтях, опублікованих протягом 14 років, Pearl та співавтори описали основні харчові потреби дрозофіли для виживання та вплив повторної наркотизації ефіром, інбредної депресії, щільності проживання імаго і специфічних для кожної стадії життя температурних коливань на тривалість життя дорослих особин [42].

Взаємозв'язок між розмноженням і тривалістю життя мух був вперше досліджений Smith M. J. у 1958 році [43]. В дослідженні було продемонстровано, що самки позбавлені яєчників та незаймані живуть значно довше, ніж звичайні спаровані самки, з чого зроблено висновок, що відкладання яєць прискорює старіння самок. Також, було виявлено, що

тривалість життя можна значно збільшити, якщо відбирати самок мух із запізненням для розмноження [44].

1.2.3. Модельний об'єкт *Drosophila melanogaster* в дослідженні факторів впливу на тривалість життя

Останні десятиліття продемонстрували значне вдосконалення результатів в області генетичного аналізу старіння, причому більша увага приділялась інтерпретації молекулярних механізмів, шляхів і фізіологічних процесів, пов'язаних з довголіттям. Оскільки обмеження, пов'язані з генетикою людини, не дозволяють провести всебічний аналіз функціональних і механістичних аспектів генів-кандидатів, а також той факт, що основні біологічні процеси залишаються в значній мірі консервативними в різних організмах, використання модельних організмів для розшифровки різних аспектів феномену старіння і скринінгу модифікаторів стало основним підходом до вивчення глибинних процесів старіння. Основні модельні об'єкти, які використовуються в біogerонтологічних дослідженнях для з'ясування основних генетичних/клітинних шляхів старіння, – це дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, нематоди *Caenorhabditis elegans*, плодова або оцтова мушка *D. melanogaster*, гризуни та примати [45]. Дослідження всіх згаданих вище модельних організмів сприяли відкриттю ключових механізмів старіння у людини. Суттєве збереження цих механізмів протягом еволюції було підтверджено на всіх модельних організмах, які були протестовані до цього часу. Ряд подібностей, виявлених у механізмах регуляції старіння у всіх модельних організмах і у людини, змушує нас вважати, що ці механізми збереглися в ході еволюції від дріжджів до ссавців [36, 46, 186]. *Drosophila* – один з найкраще досліджених та проаналізованих багатоклітинних організмів, більш складний порівняно з *C. elegans* та дріжджами, але відмінний завдяки простоті генетичних та екологічних маніпуляцій. У дрозофіли старіння, очевидно, відбувається так само, як і у людини: криві

виживання і смертності у цих видів виглядають однаково, більше того, пік розмноження у обох видів зміщений на ранні періоди життя [21, 47].

Drosophila має велику кількість переваг для вивчення тривалості життя та старіння в порівнянні з іншими модельними об'єктами, а саме: коротка тривалість життя (50-70 днів), висока плодючість (самки досягають піку яйценосності між четвертим і сьомим днем після вилуплення з яйця і відкладають до 100 яєць на день), простота культивування, низькі витрати на утримання і можливість збереження і підтримання великих популяцій в лабораторних умовах.

Геном *Drosophila melanogaster* повністю секвенований і анотований та розподілений на чотирьох хромосомах, що робить мушку прийнятною системою для проведення широкомасштабних генетичних скринінгів. Крім того, відсутність мейотичної рекомбінації у самців мух [48] і наявність балансуєчих хромосом [49] дозволяють підтримувати популяції мух, що несуть гетерозиготні мутації, без постійного скринінгу на наявність цих мутацій. Цікаво, що більше 50 % генів дрозофіли мають гомологи у людини, а майже 75 % відомих генів людських хвороб мають функціональні гомологи у мухи [50]. Ця вражаюча схожість робить дрозофілу модельним організмом, який широко використовується для досліджень, пов'язаних з людиною, особливо в області вивчення старіння та довголіття.

Завдяки існуванню яскраво виражених морфологічних відмінностей на різних стадіях онтогенезу дрозофіли, легко відрізнити статевозрілих «старіючих» дорослих особин у популяції від особин, що розвиваються. Було запропоновано вважати, що ініціація дорослості у дрозофіли відбувається лише після того, як лялечка розривається і муха стає статевозрілою та здатною до розмноження. Це дає велику перевагу над іншими модельними системами, де часто важко точно визначити, коли організм досяг зрілості. Через те, що морфологічні характеристики та процеси розвитку дрозофіли ретельно вивчені та задокументовані, різноманітні екологічні та генетичні

втручання, що впливають на динаміку старіння та тривалість життя, можуть бути з легкістю реалізовані та проаналізовані [50].

Важливою особливістю дрозофіл є те, що доросла муха майже повністю складається з постмітотичних повністю диференційованих клітин. За винятком клітин статевих залоз і декількох клітин кишечника, інші клітини, як вважають, не продовжують ділитися. Таким чином, старіння у мухи може бути зведене до старіння набору постмітотичних клітин, які присутні з моменту появи імаго і до смерті. В інших організмах, наприклад у людини, багато систем органів, таких як шлунково-кишкова, покривна та кровеносна системи, формуються шляхом майже безперервного клітинного поділу. В інших органах, включаючи мозок і серце, нові нейрони або клітини міокарду з'являються рідко. Старіння може означати різні речі в кожному з цих двох випадків. Якщо дослідження старіння в першу чергу пов'язані зі спробою зрозуміти зміни, які відбуваються в клітинах і органах з плином часу, то такі організми, як дрозофіла, які майже повністю постмітотичні, що також свідчить про синхронізоване старіння, є чудовими модельними системами для таких досліджень [51].

Незважаючи на всі свої переваги, використання дрозофіли як модельного організму має кілька обмежень. *Drosophila melanogaster* має чіткі стадії розвитку, що надає перевагу при її використанні як модельного організму в біологічних дослідженнях, як було описано вище. Проте, ця характеристика може також виступати як обмеження, оскільки у ссавців розвиток проходить по іншому механізму, що ускладнює екстраполяцію даних. Також, між дрозофілою та ссавцями існують значні відмінності в будові організму. Крім того, у дрозофіли простіша і менш адаптивна імунна система, яка не регулює температуру тіла, що може впливати на ефективність і засвоюваність ліків, інгібіторів і геропротекторів у мух по-іншому, ніж у ссавців. Ще варто відмітити, що геном дрозофіли має меншу надлишковість і менше паралогічних генів, що зменшує її здатність імітувати регуляторну складність, притаманну ссавцям. Незважаючи на ці особливості, дрозофіла

все одно залишається цінним об'єктом завдяки швидкому репродуктивному циклу, збереженню основних сигнальних шляхів і загальній користі в дослідженнях старіння та довголіття [21].

1.3. Різноманіття факторів, які впливають на тривалість життя

Drosophila

Тривалість життя – це складна фенотипова ознака організму, яка формується і розвивається протягом онтогенезу в результаті взаємодії генетичних і середовищних факторів. Варіація прояву ознаки залежить від ряду факторів, таких як: спадкова або генетична мінливість, що виражається через спадкову складову даної ознаки; неспадкова або негенетична мінливість, що виникає у відповідь на зміну умов середовища протягом життя; стохастична мінливість в онтогенезі та пов'язана з нею стохастична мінливість експресії генів – особливості онтогенезу та випадкові флуктуації індивідуального розвитку, які зазвичай називають онтогенетичним шумом [52].

Температура. Температура відіграє одну з вирішальних ролей у біологічних системах, оскільки вона значно впливає на швидкість біохімічних реакцій, що лежать в основі всіх життєвих процесів. Цей вплив розповсюджується на системи різних масштабів, забезпечуючи температурі майже універсальне значення в біології [53].

У ізотропних умовах температура навколишнього середовища є ключовим фактором, що впливає на внутрішні біологічні процеси та реакції, на зовнішні фізичні стимули. Зокрема, зміна температури може визначати спроможність організмів адаптуватися, виживати та розмножуватися. Температура, як проста скалярна величина, забезпечує значні переваги для контролю в лабораторних умовах завдяки можливості точного вимірювання. Враховуючи її критичну роль у пристосованості організмів та значні

коливання в природних умовах, глибоке розуміння впливу температури на біологічні системи є надзвичайно важливим [54].

Понад століття тому Loeb і Northrop [38] першими показали, що тривалість життя плодової мухи негативно корелює з температурою. Подальші дані показали, що *D. melanogaster* живе довше при низькій, ніж при високій температурі [55]. Ці результати були підтверджені Leiser, який дійшов висновку, що температура має значний вплив на тривалість життя [56]. Температура визначає тривалість життя і в інших безхребетних. Багато уваги було приділено дослідженням за участю нематоди *C.elegans* [57]. Як підкреслюють Keil, не існує жодного виду безхребетних, для якого було б показано, що тривалість життя збільшується з підвищенням температури [58]. У свою чергу, використання деяких видів попелиць суперечить цьому загальному твердженню. Отримані результати показують, що підвищення температури призводить до подовження тривалості життя, що дозволяє припустити, що оптимальна температура і генотип можуть бути більш важливими у випадку деяких видів комах [59]. Ефекти на тривалість життя при маніпуляціях з температурою також були продемонстровані при використанні пойкилотермних хребетних риб [60]. Серед гомойотермних хребетних часто досліджували мишей, які теж продемонстрували збільшення тривалості життя за нижчих температур [61]. Довголіття в результаті зниження температури добре відоме як для ендотермних, так і для екзотермних видів, але механізм, що лежить в основі цієї зміни в старінні, все ще погано вивчений.

Харчування. Харчування відіграє важливу роль у формуванні метаболічного здоров'я та старіння [62]. Обмежене харчування без недоїдання є найбільш класичним і відтворюваним засобом затримки старіння і подовження тривалості життя [63, 64]. В основі ефекту збільшення тривалості життя за рахунок обмеження харчування лежить не лише калорійне обмеження, а також кількість і співвідношення основних компонентів поживного середовища *Drosophila* (дріжджі, цукри, незамінні

амінокислоти), стадія онтогенезу, на якій утримували особин за умов обмеженого харчування, та тривалість маніпуляції [65–68]. У дослідженнях, започаткованих Northrop на початку 20 століття, та подальше їх продовження у 1980-х роках, було виявлено зв'язок між тривалістю розвитку, швидкістю росту личинок (збільшенням ваги) і тривалістю життя шляхом варіації кількості дріжджів, доданих до поживного середовища. Автори виявили, що подовження личинкового періоду через недостатнє харчування личинок не призводить до збільшення тривалості життя імаго [69]. Також було продемонстровано, що збільшення розміру тіла імаго, що розвинулися з личинок, які утримувалися за низької температури, пов'язане з більшою кількістю споживання дріжджів порівняно з нормальною температурою. При обмеженні кількості дріжджів у кормі не спостерігалось збільшення розміру імаго. На противагу цьому, при високій щільності личинок спостерігалось зменшення розміру тіла дорослих особин за нормальної температури (25 °C) через недостатню кількість дріжджів у поживному середовищі на одну личинку [30]. Зі збільшенням кількості дріжджів у поживному середовищі спостерігалось збільшення розмірів і ваги дорослих особин, що, в свою чергу, супроводжувалося збільшенням кількості і розмірів клітин, незважаючи на те, що швидкість мітотичних поділів клітин залишалася постійною. Було показано, що тривалість життя імаго складним чином пов'язана з тривалістю розвитку, швидкістю росту личинок, розміром тіла та кількістю клітин. Всі ці показники, включаючи тривалість життя, зростали до певного порогу при збільшенні концентрації дріжджів у поживному середовищі, але потім, при подальшому збільшенні кількості дріжджів, вони зменшувалися [70]. Тривалість життя була найвищою в той момент, коли швидкість росту личинок, кількість і розмір клітин ще не досягли стадії плато, але наближалися до неї. Таким чином, збільшення швидкості біологічних процесів, пов'язаних з ростом і поділом клітин, досягаючи в певний момент плато, починає негативно впливати на тривалість життя. Максимальна швидкість розвитку і росту за рахунок надмірного харчування не гарантує

довгого життя. Ймовірно, це може бути пов'язано з надлишком вхідного білка та інших поживних речовин, що входять до складу дріжджів, тобто переїдання негативно впливає на тривалість життя [70].

Харчування в період розвитку впливає на тривалість життя віргінних мух, але не на тривалість життя вже спарених мух, і змінює схеми репродуктивних інвестицій у імаго, які залежать від середовища існування імаго [71]. Крім того, розведення харчового дріжджового екстракту протягом розвитку личинок подовжує тривалість життя імаго дрозофіли [72]. Також при обмеженні харчування, в якому було пропорційно зменшено всі поживні речовини, виявлено достовірне збільшення як максимальної, так і середньої тривалістю життя у самців, крім того було ідентифіковано значне підвищення рівня експресії гена *InR*, який асоційований зі старінням та тривалістю життя у *Drosophila* [73]. Також було показано, що тип харчування під час розвитку може регулювати тривалість життя імаго *Drosophila* у спосіб, який взаємодіє з раціоном дорослих особин. Важливо, що було продемонстровано, що дієта з низьким вмістом дріжджів подовжує тривалість здоров'я та життя самців дрозофіли в умовах збалансованого харчування у дорослому віці за рахунок харчового програмування, а також покращило стійкість до голодування і зменшило зниження здатності до лазіння з віком у імаго. Також було виявлено, що активність транскрипційного фактора FOXO (*dFOXO*) у дорослих самців дрозофіли підвищується за умов розвитку в умовах нестачі поживних речовин. Нокдаун *dFOXO* як повсюдний, так і специфічний для жирового тіла, може повністю скасувати ефект подовження тривалості життя личинок, які перебувають на дієті з низьким вмістом дріжджів. Зрештою, автори підсумували, що харчування під час розвитку для досягнення харчового програмування тривалості життя дорослих самців відбувається шляхом модуляції активності *dFOXO* у *Drosophila* [64].

Личинкова щільність. Умови розвитку часто є вирішальними факторами, що визначають особливості життєвого шляху дорослої особини, її індивідуальну фізичну форму, старіння та тривалість життя. Щільність

особин у популяції, ймовірно, коливається залежно від доступності їжі. Раптове збільшення трофічних ресурсів може призвести до сплеску розмноження і згодом призведе до підвищеної скупченості [74]. Це означає, що в природному середовищі розвиток в умовах перенаселення є поширеним явищем. Особливо це стосується видів з коротким життєвим циклом і високою репродуктивною здатністю, таких як більшість комах [74].

Для *Drosophila* добре відомо, що підвищена щільність личинок має значний вплив на різні ознаки життєвого циклу. Личинкова скупченість збільшує смертність, подовжує час розвитку, зменшує розмір тіла, збільшує кількість жирових запасів і стійкість до голодування, знижує плодючість, змінює терmostійкість і подовжує тривалість життя. Подібні ефекти високої щільності личинок були задокументовані і в інших видів. Вірогідно, що основною причиною спостережуваних ефектів може бути обмежена доступність їжі через конкуренцію за неї, підвищена концентрація продуктів життєдіяльності, дефіцит простору або поєднання всіх цих факторів [74]. Таким чином, скупченість можна розглядати як комплексний мультистрес. Наприклад, Botella et al. [75] і Henry et al. [74] виявили підвищену концентрацію продуктів метаболізму азоту, тобто сечової кислоти і сечовини, в середовищі з підвищеною щільністю личинок. У високих концентраціях ці речовини негативно впливають на розвиток і виживання [75]. Цікаво, що Henry et al. [74] показали, що невелика кількість сечовини в їжі личинок може сприяти підвищенню холодостійкості личинок, але знижує жаростійкість. Ці автори також виявили, що скупченість личинок впливає на профіль метаболізму. Личинки, вирощені за вищої щільності, мають підвищену кількість цукрів, поліолів (наприклад, арабітолу, галактитолу) та деяких кислот (наприклад, піпеколевої, фумарової), а також меншу кількість амінокислот [74].

Скупчення личинок може бути екологічним стресором, який викликає ефект загартовування і генерує перехресну толерантність до різних стресів [74, 76]. Підвищена щільність личинок може спричинити гормезис у

відповідь на стрес з потенційно сприятливим впливом на тривалість життя [77]. Численні дослідження показали, що личинки, які утримуються при високій щільності, більш толерантні до спеки або холоду [74, 76, 78–80], тоді як в інших дослідженнях повідомлялося про відсутність або навіть зниження термостійкості [80]. Ці розбіжності можуть відображати відмінності в експериментальній методології [74].

1.4. Генетичні фактори, які впливають на тривалість життя *Drosophila*

*Сигнальний шлях інсуліну/інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1) або IIS бере участь у регуляції різних фізіологічних процесів, включаючи ріст, розвиток, метаболізм, реакцію на стрес і репродукцію [81, 82]. Загалом в інсуліновій мережі *Drosophila* задіяні сотні білків [83]. Шлях активується, коли один із семи інсуліноподібних пептидів дрозофіли (Ipr1-Ipr7, також відомі як DILP1-DILP7) зв'язується з рецептором інсуліну (InR) на поверхні клітин-мішеней [84, 85]. Ця взаємодія стимулює тирозин-протеїнкіназну активність InR [86]. Після активації вони передають сигнал до фосфорилування серин/треонін-кіназою (Akt) та пригнічують активність транскрипційного фактора FOXO, який відповідає за регуляцію генів, що беруть участь у довголітті та стресостійкості, та є основним компонентом інсулінового сигнального каскаду, шляхом його цитоплазматичної локалізації за допомогою білків-шаперонів [87–89]. Мутант foxo, позбавлений сайтів фосфорилування Akt, залишається в ядрі і є конститутивно активним. Foxo безпосередньо контролює трансляційний регулятор 4E-BP та інсуліновий рецептор, забезпечуючи таким чином механізм зворотнього зв'язку. Це робить Foxo ключовим транскрипційним регулятором інсулінового шляху [90]. Мутації інсулінового тирозинкіназного рецептора сповільнюють старіння у *Drosophila* та *C. elegans* [81]. Показано, що зниження регуляції декількох компонентів шляху, які негативно впливають на активність Foxo, подовжує тривалість життя дрозофіли [91, 92]. Необхідно зазначити, що*

ретельний аналіз життєздатних нульових мутантів *Ilp1-Ilp7* показав, що більшість з них можуть діяти надлишково. Індивідуальний нокаут *Ilp2*, який має найвищу гомологію до людського інсуліну (IGF1, IGF2), призводить до подовження середньої тривалості життя дорослих на 9 % і 13 % для чоловіків і жінок відповідно [85]. Ці мутанти також демонструють підвищену стійкість до стресових факторів, таких як підвищена температура, ліпофільні токсини та реактивні форми кисню, а також мають знижену плодючість і підвищений вміст жиру в організмі. Також, часткова генетична абляція нейросекреторних Ilp-продукуючих клітин, які знаходяться в мозку і є основними виробниками Ilp2, Ilp3 та Ilp5 у дорослому організмі, призвела до збільшення середньої тривалості життя на 10,5 % у самців та на 18,5 % і 33,5 % у віргільних та спарених самок, відповідно [93]. Також, деякі мутації *InR*, *chico* та *14-3-3ε* також збільшують тривалість життя [84, 94–96]. Зокрема, трансгетерозиготні самки *InR⁰⁵⁵⁴⁵/InR^{E19}* продемонстрували подовження тривалості життя дорослих особин на 85 %, тоді як інші гомо- і трансгетерозиготні мутанти *InR* виявилися сильно або помірно короткоживучими [86]. Гетерозиготні самці та самки *chico* показали збільшення середньої тривалості життя дорослих особин на 13 % та 36 % відповідно. У той же час, вплив гомозиготної мутації *chico* на тривалість життя дорослих особин абсолютно різний у самців і самок: перші злегка короткоживучі, тоді як тривалість життя других подовжується на 48 % [95].

Аналогічно, тривалість життя *Drosophila* може бути подовжена шляхом посилення регуляції антагоністичних регуляторів шляху IIS. Так, надмірна експресія *Pten* або *Foxo* в жировому тілі голови або м'язах дорослих самців збільшувала середню тривалість життя мух [97, 98]. Крім того, подовження тривалості життя спостерігали за надмірної експресії *Foxo* в жировому тілі імаго самок, але не самців [99]. Цікаво, що надмірна експресія *Foxo* або *Pten* в інших тканинах, наприклад, у ЦНС або серці дорослих особин, не мала позитивного впливу на тривалість життя [97, 100]. Таким чином, роль *Foxo* може бути різною в залежності від тканини; в деяких випадках, як,

наприклад, в ЦНС або спинній судині, високий рівень *Foxo* не впливає на тривалість життя, але в жировому тілі або м'язах він призводить до подовження тривалості життя. Ймовірно, позитивний вплив *Foxo* на тривалість життя пов'язаний з підтримкою м'язової тканини або з активацією ліпаз і мобілізацією жиру в жировому тілі [101]. Крім того, подовження тривалості життя самок шляхом модуляції рівня експресії генів IIS шляху часто асоціюється зі зниженням або затримкою фертильності [84, 93, 95, 99]. Таким чином, можна зробити висновок, що шлях IIS виконує «пропоживну роль». Він активує/пригнічує синтез білка і проліферацію клітин через сигнальний шлях TOR у відповідь на наявність або відсутність харчування і, в той же час, пригнічує проліферацію клітин через *Foxo*, мобілізуючи запас жиру в жировій тканині через активність *Foxo* при голодуванні. Ефекти подовження тривалості життя при пригніченні сигнального шляху IIS можуть бути пов'язані з перерозподілом поживних речовин в умовах голодування, а також з уповільненням клітинних поділів зі зниженням синтезу білка [21].

Хоча найбільш вивченим шляхом контролю родини FOXO є інсулінова сигналізація, тепер зрозуміло, що численні стресові фактори можуть активувати *foxo* [102]. В умовах клітинного стресу активація сімейства FOXO та протеотоксичність через неправильно згорнуті або агреговані білки є поширеним явищем. Для боротьби з протеотоксичністю та для підтримки протеостазу клітини індукують білки теплового шоку Hsp, які поділяються на декілька родин з різними функціями щодо запобігання агрегації білків та сприяння правильному згортанню білків відповідно. У *D. melanogaster* та *C. elegans* транскрипційний фактор FOXO відіграє вирішальну роль у стрес-реакції, регулюючи експресію Hsp. У той час як у *C. elegans* *daf-16* специфічно регулює малі Hsp, у дрозофіли *foxo* впливає на експресію як малих Hsp, так і великих Hsp, таких як Hsp70. Це вказує на ширшу мережу транскрипційних мішеней у дрозофіли, що посилює клітинний захист від стресу та протеотоксичності за допомогою більш комплексної системи шаперонів [103].

Біохімічні та протекторні властивості білка теплового шоку 70 вказують на його потенційну роль як критично важливого фактору, що модулює тривалість життя організму. Накопичення Hsp70, що спостерігається в м'язах дрозофіли з віком і в скелетних м'язах старих щурів, вказує на тканинно-специфічний, селективний механізм накопичення, який потенційно сприяє подовженню тривалості життя [104]. Однак було виявлено, що гіперекспресія *Hsp70* негативно впливає на ріст і виживання за нормальних умов розвитку [105]. Було показано кореляцію між генетичними змінами в гені *Hsp70* та зниженням виживання в умовах теплового стресу [106], тоді як гіперекспресія *Hsp70* підвищує терmostійкість личинок дрозофіли [107]. Більше того, було показано, що вплив нелетального теплового шоку збільшує тривалість життя дорослих мух, причому більш виражені ефекти спостерігаються у штамів з додатковими копіями гена *Hsp70* [108, 109]. Ці дані підкреслюють значний вплив *Hsp70* на тривалість життя. Тим не менш, варто зазначити, що обробка тепловим шоком одночасно стимулює експресію інших білків теплового шоку. Це дозволяє припустити, що спостережувані біологічні ефекти можуть бути пов'язані як з ізольованою дією *Hsp70*, так і з його синергічною взаємодією з іншими білками теплового шоку [110].

Мішень сигнального шляху рапаміцину (mTOR) взаємопов'язана з IIS, координує відповіді клітинного росту на доступність поживних речовин та енергії [111–113]. Рапаміцин – це природна сполука з протигрибковою активністю, вперше була виділена з бактерій *Streptomyces hygroscopicus* [114]. Він специфічно інгібує активність Tor у комплексі TORC1, але не TORC2, у широкому спектрі організмів, включаючи дрозофілу [115]. Ця властивість рапаміцину відображена в назвах білка Tor і всього сигнального шляху. Центральним компонентом TOR-шляху є Ser/Thr-кіназа Tor, яка функціонує у складі двох різних мультибілкових комплексів: Tor комплекс 1 (TORC1) та Tor комплекс 2 (TORC2) [116, 117]. TORC1 складається з Tor, Lst8 і Raptor, тоді як TORC2 складається з Tor, Lst8, Rictor і Sin1 [118, 119]. Активність TORC1 регулюється різними висхідними сигналами, включаючи амінокислоти, але

не обмежуючись ними [118, 120], фактори росту через Akt-кіназу [121], сигналізацію через AMP-кіназу (AMPK) [122] та відповідь на стрес через регуляцію туберозного склеротичного комплексу (TSC) [123]. Припускають, що IIS здійснює свої ефекти частково через шлях mTOR. Було помічено, що у *Drosophila* системна надекспресія TSC1 і TSC2, антагоністів активності TOR, збільшує тривалість життя [124]. Аналогічно, експресія домінантної негативної форми TOR або мутація основного наступного ефектора цього шляху, S6-кінази (S6K), також збільшує тривалість життя [124]. Більше того, рапаміцин-опосередковане інгібування mTORC1 також збільшує тривалість життя [115]. Інгібування mTORC1 посилює такі процеси, як протеостаз, автофагія та функції стовбурових клітин [62]. Оскільки автофагічні процеси активуються у відповідь на пошкодження або порушення функціонування білків та/або органел, вони відіграють життєво важливу роль в усуненні пошкоджених макромолекул та/або органел, які сприяють інтенсифікації процесів старіння. Насправді, було продемонстровано, що пригнічення аутофагічних процесів позитивно впливає на тривалість життя [115].

Іншим важливим клітинним шляхом, що бере участь у стрес-реакції та впливає на тривалість життя, є шлях Jun-N-кінцевої кінази (JNK). Хоча він діє як незалежний шлях у клітині, в кінцевому підсумку він сходиться з тими ж молекулярними ефекторами, що і шлях IIS та mTOR. JNK в першу чергу антагонізує IIS і змушує FOXO локалізуватися в ядрі та активувати свої наступні генні мішені [125]. У сукупності стає все більш очевидним, що кілька шляхів діють синергічно в клітинах, що призводить до подовження тривалості життя без будь-яких негативних наслідків або витрат на фізичну форму [50].

У дрозофіли та інших видів існує безліч різних генів, білки яких важливі для підтримки структури хроматину та експресії генів. Набір різноманітних білків, включаючи гістонові деацетилази, важливий для контролю упаковки ДНК, а отже, і доступності гена до машинерії генної експресії [51]. Білок Sirt1 (Silent information regulator 1) – це НАД-залежна

гістондеацетилаза, яка приймає участь у визначенні тривалості життя. У *D. melanogaster* ген *Sirt1* локалізований на другій хромосомі і кодує єдиний анований транскрипт та транлюється в один поліпептид. Було продемонстровано, що надмірна експресія сиртуїнів збільшує тривалість життя у *S. cerevisiae*, *C. elegans* і *D. melanogaster* [126–128]. Харчове обмеження подовжує тривалість життя організмів – від дріжджів до ссавців [129], а попередні дослідження показали, що це подовження реалізується шляхом активації сиртуїнів у *S. cerevisiae*, *C. elegans* і *D. melanogaster* [128, 130, 131]. Однак деякі аспекти ролі сиртуїнів у старінні виявилися суперечливими. В одному дослідженні за умови стандартизації генетичного фону та використання належних контролів скасували очевидні ефекти асоціації надекспресії сиртуїнів з подовженою тривалістю життя як у *C. elegans*, так і у *D. melanogaster* [132]. В той же час в іншому дослідженні спостерігалось значне подовження тривалості життя при індукції експресії *Sirt1* від 2 до 5 разів, вищі рівні зменшували тривалість життя і могли індукувати клітинну токсичність, про що свідчить запуск кінази петлі негативного зворотного зв'язку JNK, *puckered (puc)* і гена відповіді на стрес при тепловому шоці, гомолога *DnaJ (DnaJ-H)* [133]. Цілеспрямоване нокдаун *Sirt1* у жировому тілі *Drosophila* порушує інсулінову сигналізацію та метаболічну рівновагу, що підкреслює ключову роль *Sirt1* у поєднанні вкладу харчування з загальною фізіологією організму та перспективами виживання [134]. Крім того, *Sirt1* демонструє функціональний взаємозв'язок з транскрипційним фактором FOXO, який опосередковує апоптичну загибель клітин через активацію шляхів JNK та FOXO, що свідчить про невід'ємну участь гена в регуляції як довголіття, так і апоптозу [135].

Перелічені гени були в центрі нашої уваги в цій роботі у наших спробах з'ясувати взаємозв'язок між рівнями їхньої експресії в залежності від умов преімагінального розвитку, тривалістю цього розвитку та тривалістю життя дрозофіли.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

Дисертаційна робота була виконана на модельному об'єкті – *Drosophila melanogaster*. Плодова або оцтова мушка, є одним з найвідоміших модельних організмів у геронтологічних дослідженнях, спрямованих на вивчення такого складного явища, як старіння. Переваги використання дрозофіли для аналізу процесів старіння у порівнянні з іншими модельними об'єктами включають: короткий життєвий цикл та відносно невелику тривалість життя; високий рівень плодючості; можливість легкої кількісної оцінки репродуктивного виходу; просте та економічне утримання; чіткі дієтичні вимоги; легкість створення великих популяцій; повністю секвенований та анотований геном; наявність близько 60 % генів, які гомологічні генам людини [20, 42, 51].

Лінія дикого типу *D. melanogaster* Oregon-R є однією з найбільш розповсюджених та часто використовуваних у біологічних та генетичних дослідженнях. Цю лінію вперше зібрано у природному середовищі у 1925 році Д. Е. Ленсфілдом у Роузбурзі, штат Орегон, США. Назва «Oregon-R» походить від місця її ізоляції — штату Орегон, де «R» символізує «red-eye» (червоні очі), характерні для особин дикого типу *Drosophila* (FlyBase ID: FBsn0000276).

2.2. Умови утримання об'єкту дослідження

2.2.1. Загальні умови утримання в рамках експерименту та маніпуляції з

Drosophila melanogaster

Протягом усього дослідження, якщо це не зазначено особливо, мушок 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) [136].

Приготування поживного середовища проводилось за наступною методикою:

1. Для отримання розчину агару, який надає середовищу необхідної консистенції, в 100 мл води розчиняли 1 г агар-агару і доводили до кипіння.
2. До отриманого розчину додавали 4 г цукру (сахароза – це субстрат для розвитку дріжджів та джерело енергії для дрозофіл) та 4 г манної крупи (джерело білка), перемішували і варили 15 хвилин, постійно помішуючи.
3. Отриманий розчин охолоджували до кімнатної температури.
4. До отриманого розчину додавали 2,5 г сухих дріжджів – основний поживний компонент середовища харчування дрозофіл, а також головне джерело вітамінів та амінокислот.
5. Отримане середовище охолоджували до кімнатної температури та витримували 24 години для запуску процесу бродіння.
6. Після 24 годин середовище розігрівали з метою досягнення рідкої консистенції.
7. Для пригнічення росту цвілевих грибів до середовища додавали 400 мкл пропіонової кислоти.
8. Тепле поживне середовище було розлите в лабораторний посуд необхідного об'єму і охолоджувалось при кімнатній температурі.
9. Охолоджені пробірки або банки з середовищем закривались пробками з натуральної стерильної бавовни і зберігались в холодильнику при постійній температурі 4 °C не більше 3-4 діб.

Усі маніпуляції з мушками, а саме: розділ за статтю, зважування, кількісний підрахунок, виконувалися після того, як їх знерухомлювали

шляхом. Для цього, в якості засобу для знерухомлення, було використано діетиловий ефір та спеціальне приладдя для знерухомлення мушок парами ефіру – ефіризатор або морилку. Це колба, яка являла собою подвійну ємність, в зовнішню частину якої вносили ватний тампон змочений речовиною, а у внутрішню – мух. Ємності сполучалися між собою таким чином, що мухи не могли контактувати фізично з зовнішньою колбою (фізичний контакт з ефіром неминуче призводить до загибелі мух), але пари ефіру були розповсюджені по всьому ефіризатору. Для знерухомлення мушок, їх пересипали з пробірок, де розводили культуру дрозофіл, у ефіризатор. Легко постукуючи по стінках пробірки з мушками, їх відганяли від корка у нижню частину пробірки, для запобігання неконтрольованого вильоту особин, після чого, швидко відкриваючи корок, пересипали дрозофіл у відкритий ефіризатор, який щільно закривали. Далі спостерігали за активністю мух, і як тільки вони переставали рухатись – зазвичай цей час складав приблизно 10 с (цей період також залежить від концентрації парів ефіру у морилці), їх висипали на аркуш білого паперу і проводили необхідні маніпуляції. В знерухомленому стані дрозофіли могли перебувати до 5 хв, якщо цього часу було замало для виконання дослідницького завдання, то мушок знерухомлювали повторно, використовуючи невелику дозу ефіру. При проведенні маніпуляцій у такий спосіб мухи залишалися неушкодженими, проте використання надмірно високої концентрації ефіру для подовження часу знерухомлення може призвести до їх загибелі.

Розділення за статевими ознаками. Розділення імаго дрозофіл за статтю за умов експерименту та для постановки схрещувань, зазвичай, проводиться шляхом аналізу зовнішніх проявів статевого диморфізму.

Спочатку аналізували зовнішні статеві органи, оскільки ця ознака добре візуалізується у мух різного віку, геніталії самців оточені великими, темними щетинками, які не спостерігаються у самок.

Потім аналізували постеріорну частину черевця у особин з затверділим хітиновим покривом. У самців ця частина черевця завжди темніша, ніж у самок, кінець черевця у самців більш заокруглений, ніж у самок, черевце самок формується більшою кількістю стернітів (стерніт – це черевна склеротизована частина сегментарного кільця).

В цілому, в межах однієї й тієї ж популяції, розмір особин теж можна вважати за ознаку статевого диморфізму. Самці в основному менші за самок, але краще утримуватися від використання цього параметра для визначення статі, щоб уникнути можливих помилкових висновків.

Масу тіла комах визначали на торсійних вагах. Для визначення середньої маси тіла (із точністю до 1 мг) дрозофіл розподілили у шість повторюваних наборів – по 25 самиць і 25 самців для кожного варіанту. Після зважування по 25 особин окремо кожної статі, мух поміщали у скляні пробірки довжиною 14 см і діаметром 1,5 см, що містили по 3 мл поживного середовища, для подальшого аналізу їхньої тривалості життя.

2.2.2. Умови утримання в рамках дослідження ефектів рН поживного середовища на личинковій стадії розвитку

На стадії преімагінального розвитку дрозофіл утримували за різного рівня рН поживного середовища. Для відкладання яєць батьківські особини, які походили від однієї пари предків, помістили у 0,5 літрові скляні банки з 50 мл поживного середовища у кожній (по три біологічні повтори на кожную групу), рН якого була 5, 6, 7, 8 та 9. У кожній із цих банок мала бути нормальна щільність популяції личинок, отже, для відкладання яєць в них помістили по 50 пар дрозофіл віком 10-12 діб на 2-3 години, щоб отримати достатню кількість яєць – ~300-400 у кожній банці. По завершенні яйцекладки батьківські особини були видалені із банок.

Поживні середовища буферизували до рН 5, 6, 7, 8 або 9 шляхом змішування зі стоковим розчином фосфатного буферу (1 моль/л), що складався з одноосновного моногідрату фосфату натрію та двоосновного гептагідрату фосфату натрію («Thermo Fisher Scientific», США), до кінцевої концентрації 60 мМ.

Значення рН 5 % одноосновного моногідрату фосфату натрію коливається в діапазоні 4.1-4.5, а 5 % двоосновного гептагідрату фосфату натрію – в діапазоні 8.7-9.3. Для отримання необхідного значення змішували стокові розчини одноосновного моногідрату фосфату натрію та двоосновного гептагідрату фосфату натрію в різних співвідношеннях. А до точних значень рН доводили за допомогою HCl та NaOH.

Протягом усього дослідження мушок утримували за нормальних умов: температурі 25 °С, відносній вологості 70 %, 12-годинних періодах чергування світла і темряви, із застосуванням стандартного поживного середовища.

У кожній групі середню тривалість розвитку від яйця до імаго визначали як проміжок від середньої точки періоду яйцекладіння до середньої точки періоду появи дорослих особин. Вилуплення тривало близько однієї доби. На третю добу після вильоту із лялечок мушок наркотизували ефіром та розділяли за статтю. Для визначення тривалості життя дрозофіл розподілили у п'ять повторюваних наборів – по 25 самиць і 25 самців для кожного варіанту окремо кожної статі (загалом було 125 особин кожної статі на групу), мух поміщали у скляні пробірки довжиною 14 см і діаметром 1,5 см, 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. Протягом експерименту трьох самців і п'ятьох самок було втрачено із технічних причин під час переміщення. 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.

2.2.3. Умови утримання в рамках дослідження ефектів концентрації O₂ на стадії преімагінального розвитку

На стадії розвитку (личинок і лялечок) утримували за різної концентрації O₂ в навколишньому середовищі. Для відкладання яєць батьківські особини віком 15 діб, які походили від однієї пари предків, помістили 0,5 літрові скляні банки (по три біологічні повтори на кожную групу) з 50 мл стандартного поживного середовища у кожній. Батьківські особини відкладали яйця протягом 2-3 годин, і при досягненні достатньої кількості яєць мух випускали з банки – ~300-400 у кожній банці.

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. Всі банки були розділені на групи в залежності від концентрації кисню в середовищі, яка була визначена умовами експерименту. Одну групу дрозофіл (група I) утримували в умовах гіпоксії (O₂=10 %), а іншу (група III) – гіпероксії (O₂=40 %). Контрольна група (група II) дрозофіл розвивалася в умовах атмосферного повітря (O₂=21 %). Банки закривали сітчастими кришками, які не створювали перешкод для газообміну. Подачу газової суміші здійснювали з балону, швидкість подачі регулювали ротаметром. Контроль вмісту кисню в герметичних камерах здійснювали за допомогою магнітоелектричного газоаналізатора МІК-М. Експерименти проводили при за постійної температури повітря (25 ± 1,0) °С. Банки знаходились в газоаналізаторі до моменту потемніння всіх лялечок, але до вильоту першої мухи, після чого вони виймались з пристрою, і виліт розвинених мушок відбувався за стандартних умов.

На стадії імаго всіх мушок утримували в умовах атмосферного повітря, температурі 25 °С, відносній вологості повітря 70 % і 12-годинних періодах чергування світла і темряви, на стандартному поживному середовищі.

У кожній групі середню тривалість розвитку від яйця до імаго визначали як проміжок від середнього часу періоду відкладання яєць до середнього часу періоду появи дорослих особин. Відкладання яєць тривало приблизно 2-3 години, отже, культура дрозофіл була синхронізована. Вилуплення імаго тривало близько доби. На третю добу імаго розділяли за статтю і розсаджували в окремі пробірки по 25 особин на кожну (10 повторів на групу) для проведення тесту на тривалість життя. Показник тривалості життя в групах визначали в десяти повторах (всього було 250 особин кожної статі на групу). Через день дрозофіл пересаджували в пробірки зі свіжим поживним середовищем, при цьому мертвих комах видаляли, підраховуючи їх кількість. Протягом експерименту під час пересадки 3 самці і 4 самки з технічних причин були втрачені. Такі маніпуляції повторювали до загибелі останньої особини. Після цього розраховували середню тривалість життя самок і самців дрозофіли. Показник максимальної тривалості життя визначали як середню тривалість життя 10 % мушок, які найдовше прожили в кожній групі.

2.2.4. Умови утримання в рамках дослідження ефектів зміни температури на стадії преімагінального розвитку

Личинки і лялечки дрозофіли на стадії розвитку утримували при різній температурі: 20,0; 22,5; 25,0; 27,5 і 30,0 °С. На стадії імаго мушок утримували за нормальних умов – температури 25 °С, 70 %-ї відносної вологості, 12-годинних періодів чергування світла і темряви, із застосуванням стандартного поживного середовища.

У кожній групі середню тривалість розвитку від яйця до імаго визначали як проміжок від середньої точки періоду яйцекладіння до

середньої точки періоду появи дорослих особин. Вилуплення тривало близько доби. На третю добу імаго розділяли за статтю і розсаджували в пробірки по 25 особин (10 повторів на групу) для тесту на тривалість життя. Показник тривалості життя в групах визначали в десяти повторах (всього було 250 особин кожної статі на групу). Через день дрозодфіл пересаджували в пробірки зі свіжим поживним середовищем, при цьому мертвих комах видаляли, підраховуючи їх кількість. Протягом експерименту 3 самці і 4 самки з технічних причин були втрачені під час пересаджування. Такі маніпуляції повторювали до загибелі останньої особини. Після цього розраховували показники середньої тривалості життя самок і самців дрозодфіли та максимальну тривалість життя, яку визначали як середню тривалість життя 10 % мух, які найдовше прожили в кожній групі.

2.2.5. Умови утримання в рамках дослідження ефектів щільності личинкової популяції

Для відкладання яєць батьківські особини, які походили від однієї пари предків, були розміщені у шести літрових скляних банках зі 100 мл поживного середовища у кожній. У трьох із цих банок була нормальна щільність популяції личинок (НЩ; контрольна популяція), і в трьох інших банках була висока щільність популяції личинок (ВЩ).

Достатня кількість яєць для популяції личинок НЩ складала близько 300-400 штук у кожній банці. Для отримання популяції НЩ в банки з поживним середовищем помістили 20 пар дрозодфіл віком 10-12 діб для відкладання яєць на ~24 години. Кількість яєць визначали шляхом розподілу площі яйцекладки на сектори та окремого підрахунку яєць у кожному секторі з використання збільшувального скла.

Популяція личинок ВЩ складала >3000 яєць на кожному банку, що у десять разів більша порівняно з контрольною. Для того щоб отримати таку

кількість яєць у банки для відкладання було поміщено по 200 пар мушок віком 10-12 діб на ~24 години.

По завершенні яйцекладіння батьківські особини були видалені із банок. Визначена кількість яєць для різних популяцій експерименту була обрана зважаючи на результати досліджень Miller і Thomas [137].

У кожній групі середню тривалість розвитку від яйця до імаго визначали як проміжок від середньої точки періоду яйцекладіння до середньої точки періоду появи дорослих особин. Вилуплення тривало близько однієї доби у НЩ-банках, і більше п'яти – у варіантах із ВЩ. Зважаючи на послідовність вильоту із яєць, імаго за порядком вилуплення відносили до різних груп, які позначили: ВЩ1, ВЩ2, ВЩ3, ВЩ4, ВЩ5, де номер означає послідовність вильоту після початку вилуплення. Невдовзі після вильоту із лялечок мушок наркотизували ефіром та розділяли за статевою ознакою.

Показник тривалості життя у групах НЩ, ВЩ1–ВЩ5 визначали у шести повторях (загалом було 145-150 особин кожної статі на групу). Два рази на тиждень дрозофіл переміщали у пробірки зі свіжим поживним середовищем, при цьому мертвих комах видаляли, підраховуючи їхню кількість. Протягом експерименту троє самців і п'ять самиць із технічних причин було втрачено під час переміщення. 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.

Для оцінювання репродуктивної активності дрозофіл, запліднених самиць 10-12-добового віку (представників груп НЩ і ВЩ1–ВЩ5) поодинокі поміщали в окремі пробірки (по 22-25 шт. на групу) та утримували за нормальних умов. Показник визначали шляхом підрахунку загальної кількості яєць, відкладених однією самицею за добу.

2.3. Молекулярно-генетичний аналіз

2.3.1. Виділення тотальної РНК

Тотальну РНК виділяли, використовуючи комплект реагентів для виділення РНК/ДНК з клінічного матеріалу.

Робота з РНК проводилась тільки в одноразових рукавичках, під час процесу виділення використовували одноразові наконечники для автоматичних дозаторів з аерозольним бар'єром, які змінювались при кожній маніпуляції, та стерильний одноразовий пластиковий посуд з маркуванням «вільне від ДНКаз та РНКаз». Знезараження використаних матеріалів з пластику (наконечники, пробірки) проводилось в окремому контейнері, який містив 1н розчин соляної кислоти.

Комплект реагентів для виділення РНК складав: лізуючий розчин, розчин для відмивання 1, розчин для відмивання 3, розчин для відмивання 4, сорбент та РНК-буфер.

*Матеріалом для виділення РНК був гомогенат мух *Drosophila melanogaster*.* Вік особин складав 10-14 діб. Для отримання матеріалу було відібрано необхідну кількість пробірок, які були промарковані відповідно умов експерименту та статі особин, оскільки самці і самки аналізувались окремо. В кожну пробірку вносили по 5 штук мух і занурювали в рідкий азот для заморожування тканин. Далі за допомогою маленького товкача в пробірці ретельно перетиралися частини тканин, в такий спосіб досягалась максимально гомогенізована консистенція матеріалу, що давало змогу збільшити ефективність виділення.

Виділення РНК: Лізуючий розчин та розчин для відмивки 1 зберігались при температурі від 2 до 8 °С, тому перед початком роботи розчини прогрівали при температурі від 60 до 65 °С до повного розчинення кристалів. В пробірки з отриманим гомогенатом вносили по 450 мкл лізуючого розчину. Щільно закриті проби ретельно перемішували на вортексі і центрифугували протягом 5 с при 5 тис.об/хв на мікроцентрифузі для видалення крапель з

внутрішньої поверхні кришки пробірки. Ретельно ресуспендували сорбент на вортексі. В кожну пробірку окремим наконечником додавали по 25 мкл ресуспендованого сорбенту. Перемішавши на вортексі, поставили в штатив на 1 хв., ще раз перемішали і залишили на 5 хв. Процентрифугували пробірки для осадження сорбенту при 10 тис. об/хв протягом 30 с на мікроцентрифузі. Видалили супернатант, використовуючи вакуумний відсмоктувач і окремий наконечник для кожної проби. Додавали в пробірки по 400 мкл розчину для відмивання 1. Перемішували на вортексі до повного ресуспендування сорбенту, центрифугували 30 с при 10 тис.об/хв на мікроцентрифузі. Видаляли супернатант, використовуючи вакуумний відсмоктувач і окремий наконечник для кожної проби. Далі додавали в пробірки по 500 мкл розчину для відмивання 3. Перемішували на вортексі до повного ресуспендування сорбенту, центрифугували 30 с при 10 тис.об/хв на мікроцентрифузі. Видаляли супернатант, використовуючи вакуумний відсмоктувач і окремий наконечник для кожної проби. Знову додавали в пробірки по 500 мкл розчину для відмивання 3. Перемішували на вортексі до повного ресуспендування сорбенту, центрифугували 30 с при 10 тис.об/хв на мікроцентрифузі. Видаляли супернатант, використовуючи вакуумний відсмоктувач і окремий наконечник для кожної проби. Додавали в пробірки по 400 мкл розчину для відмивання 4. Перемішували на вортексі до повного ресуспендування сорбенту, центрифугували 30 с при 10 тис.об/хв на мікроцентрифузі. Повністю видаляли супернатант з кожної пробірки окремим наконечником, використовуючи вакуумний відсмоктувач. Поміщали пробірки в термостат при температурі 60°C на 12-15 хв. для підсушування сорбенту. При цьому кришки пробірок були відкриті. Далі у пробірки додавали по 50 мкл РНК-буфера, використовуючи наконечник з аерозольним бар'єром, вільний від РНКаз. Перемішували на вортексі. Поміщали в термостат при температурі 60 °С на 2-3 хв. Перемішували на вортексі і центрифугували пробірки на максимальних обертах мікроцентрифуги (12-13 тис.об/хв) протягом 1 хв. Надосадова рідина містить очищені РНК і ДНК.

Перед постановкою реакції зворотної транскрипції виділену суміш з нуклеїновими кислотами було оброблено ДНКазою I («Thermo Fisher Scientific», США) для остаточного видалення домішок геномної ДНК, що забезпечить більш точні результати під час подальших експериментальних маніпуляцій. Для цього готували реакційну суміш, фінальний об'єм, якої складав 15 мкл і, яка містила:

- 5 мкг тотальної РНК (розчин нуклеїнових кислот відбирали дуже обережно, не захоплюючи сорбент, оскільки наявність сорбенту в ПЛР суміші може інгібувати реакцію);
- 1,5 мкл 10x буфера;
- 0,5 мкл інгібітора РНКазы RiboLock (40 од./мкл);
- 3 мкл ДНКазы I (1 од./мкл).

Пробірки з готовою реакційною сумішшю поміщали в ампліфікатор 2720 Thermal Cycler («Applied Biosystem», США) та інкубували протягом 60 хв при +37 °С. Потім проводили інактивацію ДНКазы I – додавали 1,5 мкл 50мМ ЕДТА та інкубували при +65 °С протягом 10 хв.

Реакцію зворотної транскрипції проводити одразу після отримання РНК-проби. Очищену РНК зберігали до 4 год за температури від 2 до 8 °С. Для тривалого зберігання препарату використовували температури не вище – 68 °С протягом року.

2.3.2. Синтез кДНК

Синтез кДНК проводився шляхом зворотної транскрипції РНК за допомогою набору реагентів («Thermo Fisher Scientific», США).

Комплект реагентів для синтезу кДНК на матриці РНК складав: RT-G-mix-1, RT-mix, ревертаза (MMlv), ДНК-буфер, випадкові гексамерні праймери.

Матеріал для синтезу кДНК: Перед проведенням реакції зворотної транскрипції якість виділення РНК та концентрацію перевіряли методом

спектрофотометрії. Всі вимірювання проводили на спектрофотометрі NanoDrop 1000 («Thermo Fisher Scientific», США). Показник якості виділення, а саме чистоти препарату РНК, визначається відношенням оптичної щільності, виміряної при $\lambda 260/\lambda 280$, який повинен знаходитись в діапазоні 1,7-2,0. Значення нижче 1,7 свідчить про присутність білків у розчині, тоді як значення вище 2,0 вказує на наявність домішок ДНК. В наших зразках РНК співвідношення $\lambda 260/\lambda 280$ становило 1,8-2,0, що свідчило про відносно високу чистоту екстрагованої РНК. Концентрацію доводили до 20-40 нг/мкл.

Проведення реакції зворотної транскрипції: Перед приготуванням загальної суміші для синтезу було попередньо розморожено всі складові набору на льоді. Приготування реакційної суміші відбувалось з розрахунку 12 реакцій на одну пробірку з RT-mix, згідно рекомендацій виробника. Для цього в пробірку с RT-mix вносили 5 мкл RT-G-mix-1, ретельно перемішували на вортексі, осаджували краплі з кришки пробірки короткочасним центрифугуванням.

До отриманого розчину додавали 6 мкл ревертази (MMIv), піпетували 5 разів, перемішували на вортексі. Осаджували краплі з кришки пробірки короткочасним центрифугуванням. Вносили в мікропробірки по 10 мкл готової реакційної суміші. Використовували наконечники з аерозольним бар'єром, додавали по 10 мкл РНК-проби в пробірки з реакційною сумішшю та по 1 мкл випадкових гексамерних праймерів. Обережно перемішували піпетуванням. Ставили пробірки в термоциклер Veriti 96-Well Thermal Cycler («Applied Biosystem», США) 37 ° C на 30 хв.

Отриману в результаті реакції зворотної транскрипції кДНК для подальшої постановки ПЛР розводили в 2 рази ДНК-буфером (до 20 мкл кДНК окремим наконечником з аерозольним бар'єром додавали 20 мкл ДНК-буфера, акуратно перемішували піпетуванням 10 разів).

Частину готового препарату кДНК використовували для проведення реакції ПЛР, частину зберігали при температурі не вище -16 °С протягом 1 тижня або при температурі не вище - 68 °С протягом року.

2.3.3. Проведення ампліфікації методом кількісної ПЛР у реальному часі

Для дослідження було відібрано 5 генів: *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*. Було показано, що всі ці гени зробили суттєвий внесок у регуляцію тривалості життя плодової мушки. Підбір генів для проведення дослідження експресії проводився за допомогою аналізу літературних даних та з використанням бази даних FlyBase (<https://flybase.org/>) – це онлайн біоінформатична база даних, яка містить в собі найбільш повну та найбільш вичерпну інформацію генетичних та молекулярних даних родини *Drosophilidae*. Ген «домашнього господарства» *Gapdh2* (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа) був використаний в якості ендogenous контролю та для розрахунку відносного рівня експресії. Послідовності праймерів для ампліфікації генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* та *Gapdh2* були підібрані з використанням програми «Primer Express Software v3.0» («Applied Biosystems», США). Основні вимоги до конструювання праймерів були наступними: оптимальна довжина; висока специфічність; мінімізований вміст гуанідину в послідовностях; температури плавлення кожного члена пари праймерів повинні бути однаковими. Аналіз специфічності і множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей підібраних праймерів був проведений з використанням бази даних BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) що розміщена на сайті Національного центру біотехнологічної інформації США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для полегшення відбору послідовностей олігонуклеотидних праймерів та пошуку оптимальних умов подальшої ПЛР було проведено віртуальну ПЛР з використанням біоінформатичного ресурсу Invitrogen Vector NTI Advance 10. Цей програмний пакет дозволяє

інтерактивно створювати, аналізувати та обмінюватися послідовностями ДНК/білків; розробляти праймери для експериментів ПЛР, клонування, секвенування або гібридизації; проводити електрофорез фрагментів у гелі та ПЦР у віртуальному середовищі тощо. Послідовності праймерів для генів *mTor* та *foxo* були взяті зі статті колег [138]. Перелік та послідовності всіх використаних праймерів вказані в таблиці 2.1. Зазначені пари олігонуклеотидних праймерів для генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* та *Gapdh2* були синтезовані за замовленням в компанії «Applied Biosystems» (США), а для генів *mTor* та *foxo*, в компанії «Ukrainian Genetic Technologies» (Україна).

Таблиця 2.1

Послідовності праймерів, які використовували для проведення ампліфікації методом ПЛР в режимі реального часу

| Ген | Прямий | Довжина амплікона |
|---------------|---|-------------------|
| <i>GapDH2</i> | Прямий – CGT TCA TGC CAC CAC CGC TA Зворотній – САА CGT ССА ТСА CGC CAC АА | 72 п.н. |
| <i>Hsp70</i> | Прямий – CTG GGC ACC ACC TAC TCC T Зворотній – GCG TTC CGA GTC TGT GAA A | 117 п.н. |
| <i>InR</i> | Прямий – CGG AAA ACG AAA CCC AAC T Зворотній – GGC AGA GTT TGC TGT TCC A | 186 п.н. |
| <i>Sirt1</i> | Прямий – GTC GGA САА CGA TGA TTG C Зворотній – АСТ GTC GCT CGC TCT CTG A | 152 п.н. |
| <i>dFoxO</i> | Прямий – TTC GCT TGC GGT TAA AAG CC Зворотній – GGG CCT САА ААG АТC АСТ GC | 112 п.н. |
| <i>dTOR</i> | Прямий – CAC CGA CTT CCA GAC GGA АА Зворотній – CAC TGG CAG AGG TTC TCG TT | 93 п.н. |

Перед проведенням ампліфікації методом кількісної ПЛР у реальному часі для зразків мух, які зазнали впливу умов навколишнього середовища на преімагінальній стадії розвитку, попередньо було експериментально підбрано оптимальні умови ПЛР та оцінено специфічність і ефективність ампліфікації на зразках мух, які розвивались та на стадії імаго утримувались за нормальних умов (концентрація кисню 21 %, температура 25 °С, відносна вологість повітря 70 %, 12-годинний період чергування світла і темряви, на стандартному поживному середовищі, без личинкового перенаселення).

Важливою умовою для успішної постановки ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу є підбір оптимальної температура відпалу праймерів для забезпечення найкращого співвідношення між ефективністю та специфічністю ампліфікації. Тому було протестовано різні температури відпалу в діапазоні від 56 до 60 °С. В результаті найбільш ефективно накопичення ПЛР- продукту для всіх 6-ти генів спостерігалось при 58 °С.

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).

Робота проводилась тільки в одноразових рукавичках, під час процесу підготовки реакційних сумішей використовували одноразові наконечники для автоматичних дозаторів з аерозольним бар'єром, які змінювались при кожній маніпуляції, та стерильний одноразовий пластиковий посуд.

Склад 5х суміші для ПЛР: 5U Taq-полімерази із гарячим стартом, активність якої заблокована антитілами; 5 mM дНТФ; 2,5 mM MgCl₂ у відповідному буферному розчині; інтеркалюючий барвник SYBR Green та інтеркалюючий барвник ROX – 500 мкл.

Перед приготуванням загальної суміші для ПЛР було попередньо розморожено всі складові набору на льоді та всі реактиви було ретельно перемішано.

Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила:

- 0,5 мкМ прямого праймера досліджуваного гена;
- 0,5 мкМ зворотного праймера досліджуваного гена;
- 0,5 мкМ прямого праймера гена ендogenous контролю;
- 0,5 мкМ зворотного праймера гена ендogenous контролю;
- Master Mix: 1U Taq полімерази із гарячим стартом, 1 мМ дНТФ, 0,5 мМ MgCl₂, інтеркалюючий барвник SYBR Green та інтеркалюючий барвник ROX - 100 мкл;
- H₂O вільна від нуклеаз.

Ампліфікацію проводили на приладі 7500 Real-Time PCR Systems, («Applied Biosystems», США). Реакції ампліфікації проводили за наступних температурних режимів:

- ініціююча денатурація при 95 °С – 5 хв;
- накопичення ампліфікаційного продукту протягом 50 циклів:
 - денатурація: 94 °С – 3 с,
 - відпал праймерів: 58 °С – 6 с,
- синтез: 72 °С – 27 с;
- фінальної полімеризації при 72 °С протягом 3 хв.

В якості негативного контролю використовували проби без кДНК-матриці. Кожну реакцію проводили у трьох повтореннях та кожен повтор в триплетах.

Специфічність ампліфікації полімеризації підтверджували наявністю одного піку на диференційних кривих плавлення ампліконів, отриманих при повільному нагріванні ампліконів від 60 °С до 90 °С з кроком у 0,5 °С. Аналіз кривих плавлення показав наявність цільового продукту (основний пік) і відсутність неспецифічних продуктів реакції для кожної використаної пари праймерів (рис. 2.1).

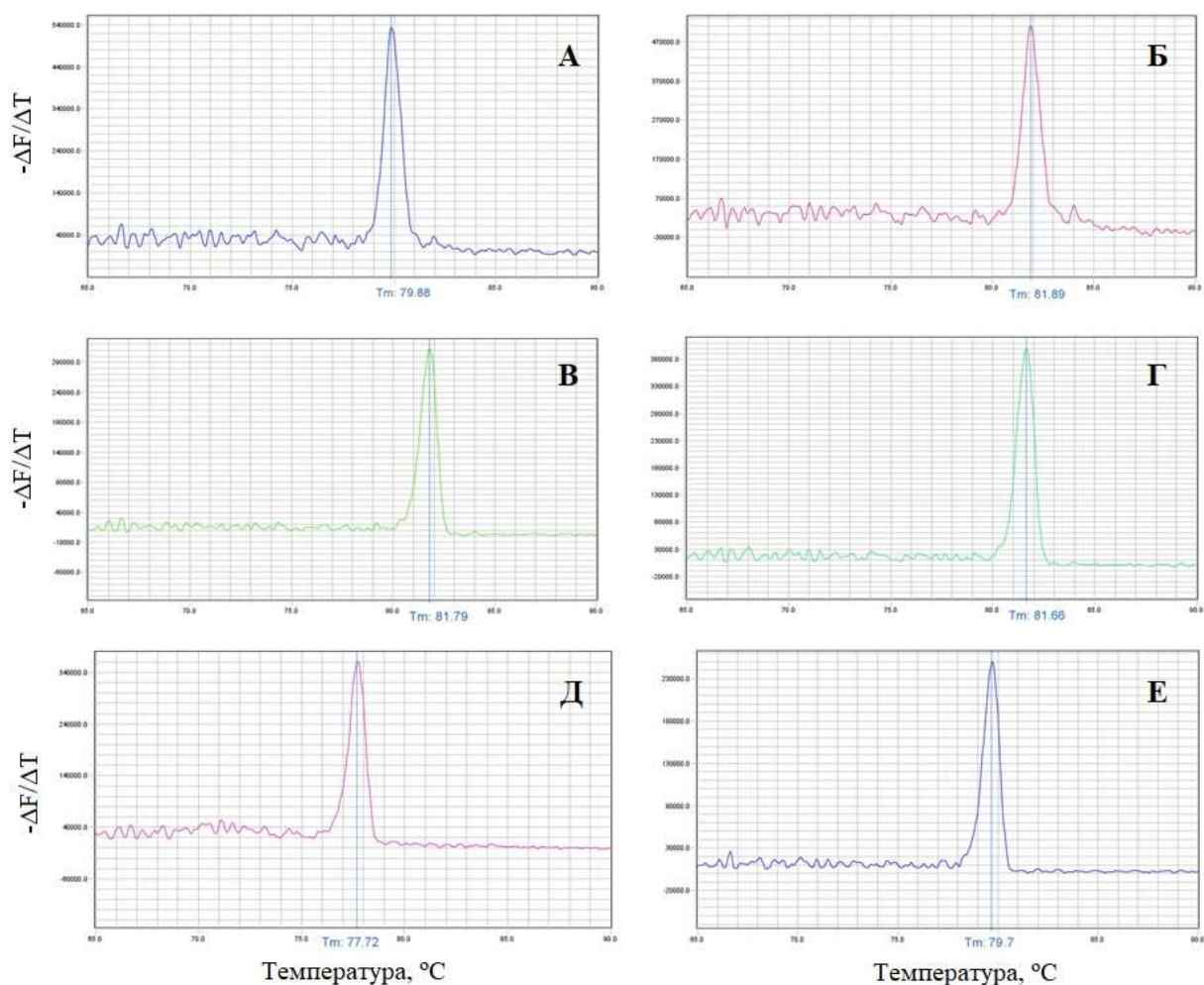


Рис. 2.1. Криві плавлення ампліконів, отримані після кількісної ПЛР в режимі реального для кожної з шести пар праймерів: А – *GapDH2*, Б – *Hsp70*, В – *InR*, Г – *Sirt1*, Д – *dFoxO*, Е – *dTOR*

Крім того, з метою додатково переконатись у специфічності, а також заради визначення ефективності ампліфікації, ми провели контрольну ампліфікацію з використанням матеріалу, отриманого з контрольних мух. Після закінчення ампліфікації відбирали аліквота ПЛР продуктів і аналізували за допомогою електрофорезу у безбуферній системі горизонтального гель-електрофорезу E-Gel™ Power Snap Electrophoresis System («Thermo Fisher Scientific», США) в готовому до використанням 2 % агарозному гелі E-Gel™ з барвником SYBR Safe («Thermo Fisher Scientific», США).

У кожен лунку вносили по 5 – 10 мкл зразка, 5 мкл маркера молекулярної маси ДНК (GeneRuler 100-bp DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, США) вносили в окрему лунку для визначення розміру фрагментів. Електрофоретичний аналіз проводили при напрузі 12 В/см протягом 20 хвилин. Після закінчення електрофорезу продукти ампліфікації детектували за допомогою вбудованої цифрової фотокамери в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 310 нм.

Специфічність підтверджується наявністю на електрофореграмі однієї смуги очікуваної довжини для кожного з продуктів ПЛР (рис. 2.2): *GapDH2* – 72 п.н., *Hsp70* – 117 п.н., *InR* – 186 п.н., *Sirt1* – 152 п.н., *dFoxO* – 112 п.н. та *dTOR* – 93 п.н.

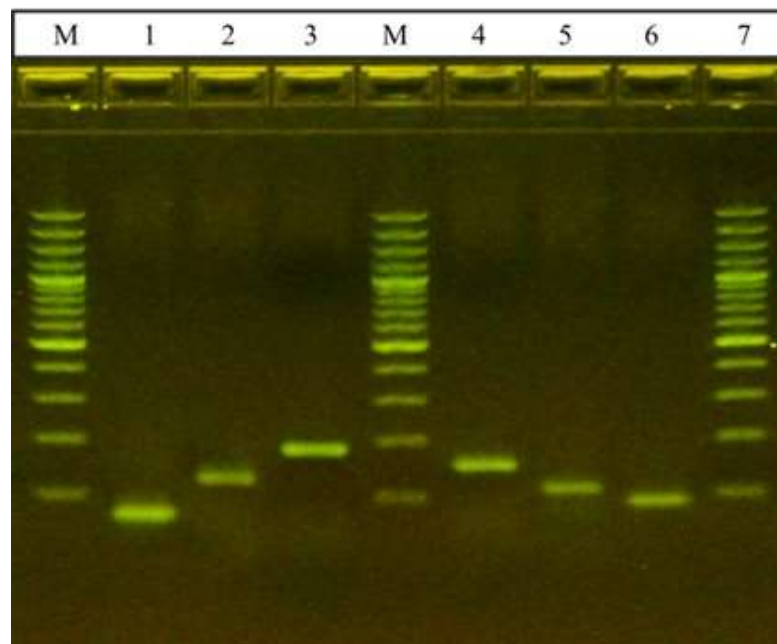


Рис. 2.2. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продуктів, отриманих за допомогою кожної з шести пар праймерів: М – маркер молекулярної маси (з кроком 100 п.н.); 1 – *GapDH2*, 2 – *Hsp70*, 3 – *InR*, 4 – *Sirt1*, 5 – *dFoxO*, 6 – *dTOR*

Після електрофорезу з нижнього ряду лунок агарозого геля відбирали 20 мкл очищених від вхідної кДНК та праймерів проби всіх шести

проаналізованих ампліконів, вимірювали їх концентрації на спектрофотометрі та, спираючись на концентрації кожного з ампліконів та їх довжину, розраховували кількість копій кожного вихідного зразка в одному мікролітрі отриманого розчину.

Після розрахунку кількості копій готували стандартні зразки, які містили 100 000, 10 000, 1000, 100 та 10 копій на реакційну суміш і проводили ПЛР у реальному часі, визначаючи номер порогового циклу для кожного розведення. У реакцію брали по 3 мкл кожного із стандартів. Ампліфікацію кожного з розведень проводили в триплетах. На основі отриманих даних будували стандартні криві (Рис. 2.3), які дозволяють оцінити ефективність ампліфікації.

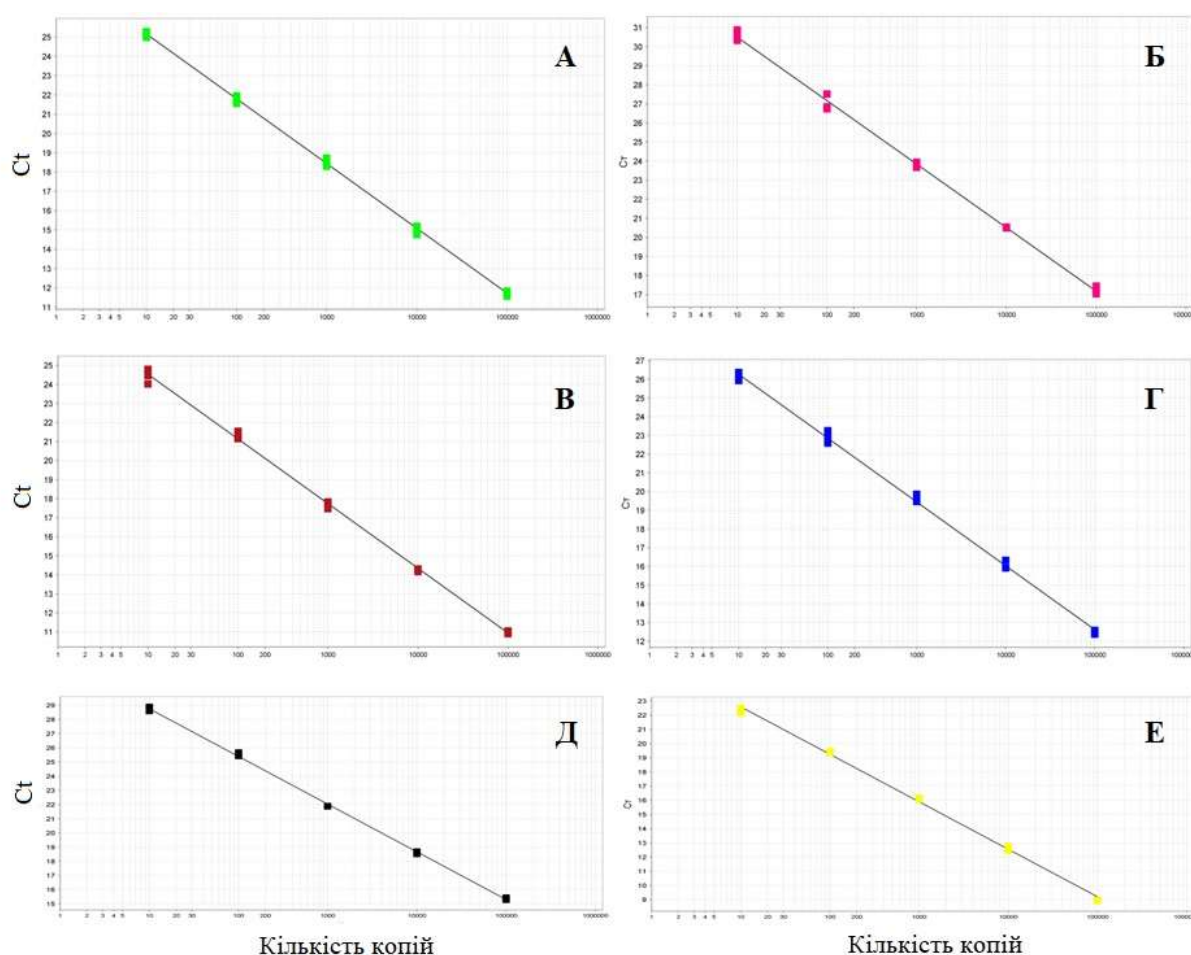


Рис. 2.3. Стандартні криві, отримані за допомогою кількісної ПЛР в режимі реального часу серії розведень ампліконів для кожної з шести пар праймерів: А – *GapDH2*, Б – *Hsp70*, В – *InR*, Г – *Sirt1*, Д – *dFoxO*, Е – *dTOR*

Отримані значення ефективності ампліфікації наведено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

**Показники, отримані при оцінці ефективності ампліфікації
методом ПЛР в режимі реального часу для кожної з шести пар
праймерів**

| Ген | Коефіцієнт кореляції (R2) | Y-інтерсепт | Нахил (Slope) | Ефективність ампліфікації (E) |
|---------------|------------------------------|-------------|------------------|----------------------------------|
| <i>GapDH2</i> | 0,999 | 28,521 | -3,358 | 0,98516 |
| <i>Hsp70</i> | 0,998 | 33,827 | -3,331 | 0,99627 |
| <i>InR</i> | 0,998 | 27,926 | -3,396 | 0,96983 |
| <i>Sirt1</i> | 0,998 | 29,673 | -3,411 | 0,96416 |
| <i>dFoxO</i> | 0,999 | 32,122 | -3,364 | 0,98262 |
| <i>dTOR</i> | 0,997 | 25,929 | -3,346 | 0,98993 |

Після того, як оптимальні умови ПЛР були підібрані, проводилось виділення РНК зі зразків мух, які зазнали впливу умов навколишнього середовища на преімагінальній стадії розвитку, постановка реакції зворотної транскрипції та постановка ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу для визначення рівня експресії обраних генів для дослідження.

2.3.4. Розрахунок рівня експресії генів

Для розрахунку рівня експресії було використано відносний кількісний аналіз, який визначає кількість ампліфікованого фрагмента гена-мішені відносно іншого зразка, який не зазнав аналізованого впливу. Оскільки експериментально було продемонстровано, що ефективність ПЛР для всіх аналізованих генів і гена ендогенного контролю знаходиться в межах 96-99 % і різниця між зразками складала менше 5 %, це дало право

використовувати метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$ для розрахунку [139]. Цей метод є зручним способом розрахунку відносних змін в експресії генів, отриманих в результаті аналізу кількісної ПЛР в реальному часі. Формула для розрахунку відносного рівня експресії генів (x):

$$x = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

де $\Delta Ct = Ct$ (досліджуваного гена) – Ct (гена ендogenous контролю), Ct – номер порогового циклу; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (досліджуваного зразка) – ΔCt (референсного зразка), референсний зразок – зразок, який не зазнав впливу досліджуваного фактора (контрольний зразок).

2.4. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичний аналіз отриманих результатів виконували в програмі Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Статистичну значущість всіх показників життєздатності та рівнів відносної експресії генів визначали з використанням одно- та двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Цей статистичний метод використовують для порівняння середніх значень трьох груп і більше та визначення наявності статистично значущих відмінностей між цими групами. Однофакторний дисперсійний аналіз оцінює вплив одного незалежного фактора на залежну змінну, аналізуючи варіації даних. Двофакторний дисперсійний аналіз оцінює вплив двох незалежних факторів на залежну змінну та надає можливість вивчення взаємодії між цими факторами. Нормальність розподілу значень розглянутих показників оцінювали за допомогою коефіцієнта асиметрії та ексцесу, графічних методів та критерію Шапіро-Уїлка. Дисперсійний аналіз ANOVA дозволяє визначити два показники, представлені у тексті: F -критерій (критерій Фішера) і значення p – відомий показник статистичної значущості. Критерій Фішера F є функцією двох параметрів – $F(a,b)$, де a – кількість ступенів свободи всередині групи, b – кількість ступенів свободи між групами (кількість

ступенів свободи – це кількість вільно варіюючих одиниць в складі чисельно обмеженої статистичної сукупності).

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 розрахунок 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. Отримані дані про відносну експресію генів були нормалізовані за допомогою логарифмічного перетворення. Відмінності вважалися значущими при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ рН ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ТА КОНЦЕНТРАЦІЇ КИСНЮ НА ПРЕІМАГІНАЛЬНІЙ СТАДІЇ НА ТРИВАЛІСТЬ ПРЕІМАГІНАЛЬНОГО РОЗВИТКУ ТА ЖИТТЯ ІМАГО

3.1. Вплив рН поживного середовища на преімагінальній стадії на тривалість преімагінального розвитку та життя імаго

Результати експериментального дослідження впливу рН поживного середовища на період личинкового розвитку *D. melanogaster* виявили, що оптимальними умовами для найшвидшого розвитку є середовище з рН 5 (рис. 3.1).

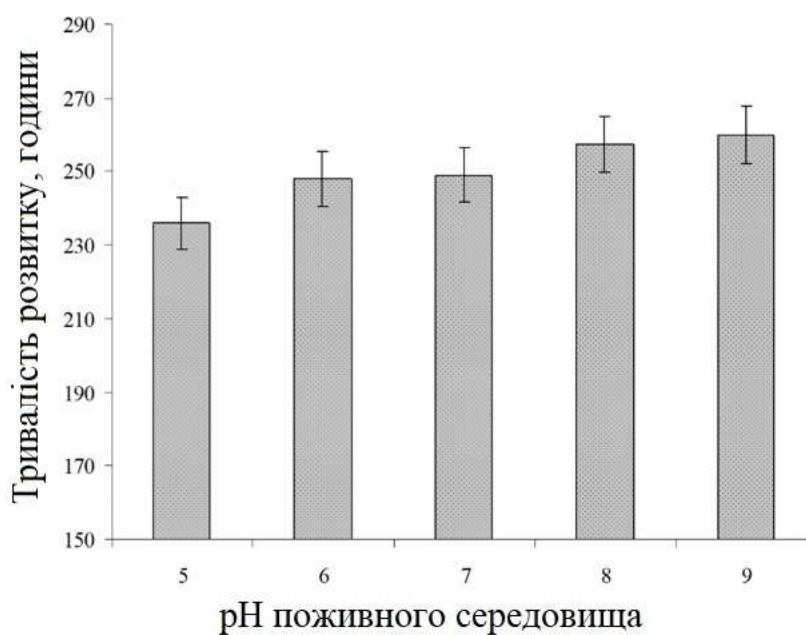


Рис. 3.1. Тривалість преімагінального розвитку *D. melanogaster* за різного рівня рН поживного середовища. Тут і на всіх рисунках далі дані представлені у вигляді середнього значення, похибка – стандартна

Статистичний аналіз підтвердив наявність значущих розходжень у тривалості розвитку між рН 5 та іншими досліджуваними значеннями рН. При цьому, періоди розвитку при рН 6, 7, 8 та 9 не показали значущих відмінностей у статистичному порівнянні, хоча і було зафіксовано тенденцію до збільшення тривалості розвитку з підвищенням рівня 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 (рис. 3.2 та 3.3).

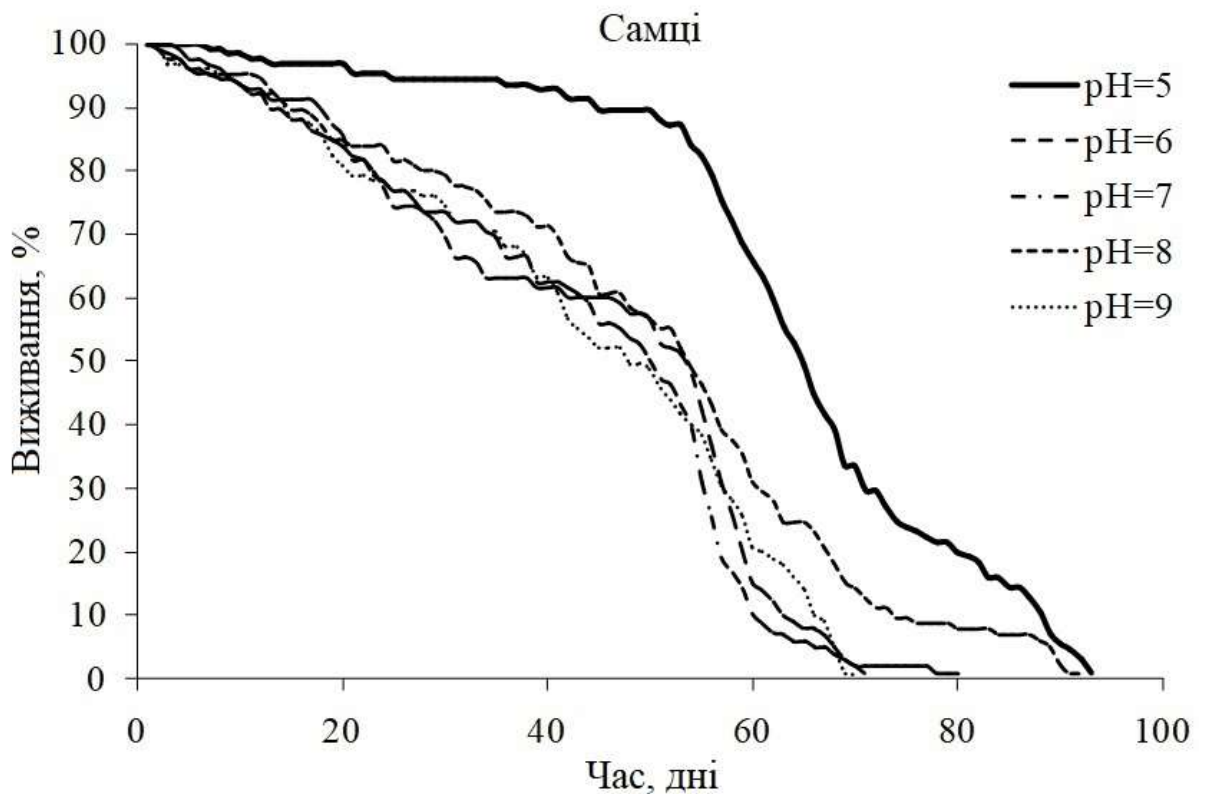


Рис. 3.2. Криві виживання самців імаго *D. melanogaster*, розвиток яких проходив при різних рН поживного середовища

Для самців, розвиток яких проходив у поживному середовищі з рН 5, крива виживання виявляється зміщеною вправо, що демонструє помітне подовженням тривалості життя цих особин (рис. 3.2). У той час як для груп дрозофіл, що розвивалися при рН 6, 7, 8, та 9, криві виживання практично

співпадають, що свідчить про мінімальний вплив рН на тривалість життя цих груп.

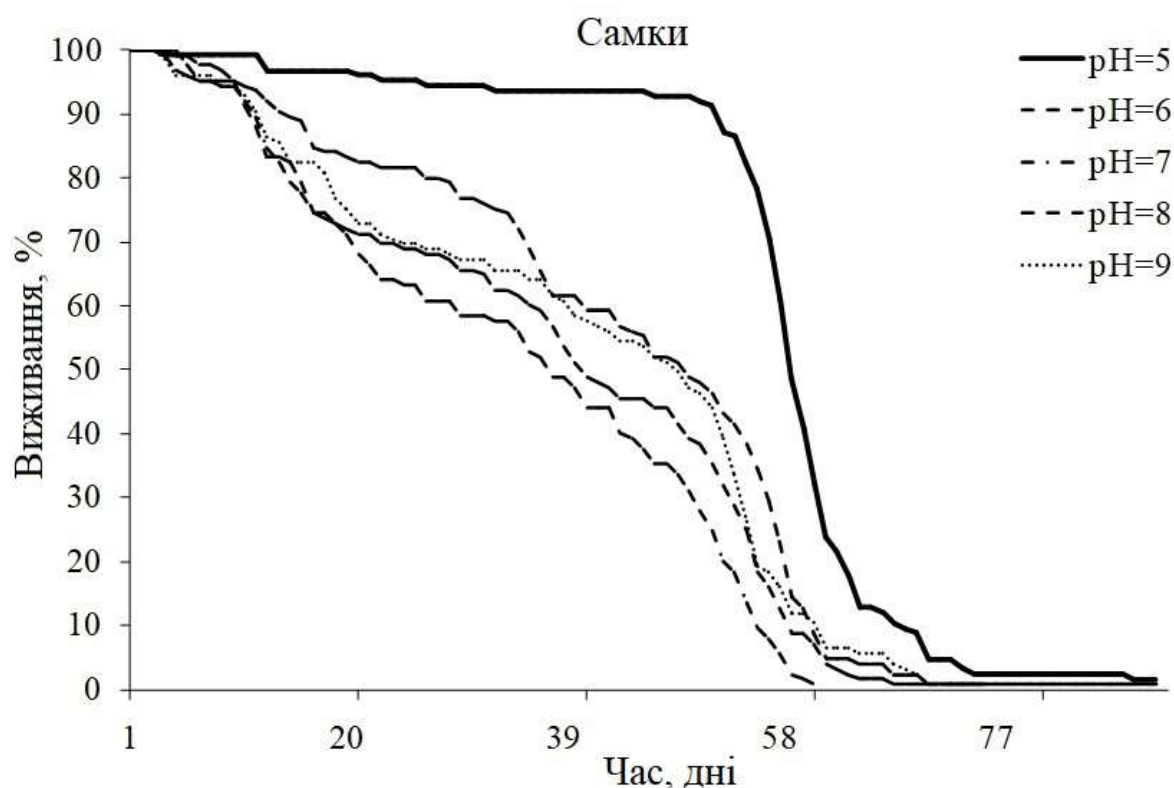


Рис. 3.3. Криві виживання самок *D. melanogaster* розвиток яких проходив при різних рН поживного середовища

Моніторинг кількісних змін виживання самок *D. melanogaster* продемонстрував значне зміщення вправо кривої виживання особин, розвиток яких проходив за рН 5, порівняно з іншими досліджуваними групами, що відображає підвищену тривалість життя. Водночас, криві виживання у групах дрозофіл, розвиток яких проходив за рівня рН 6, 7, 8 та 9, майже збігаються, що свідчить про відсутність суттєвого впливу рівня рН на тривалість життя цих особин (рис. 3.3).

Було виконано розрахунок середньої та максимальної тривалості життя самців і самок імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за різних рН поживного середовища, результат представлений в таблиці 3.1.

Однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з подальшим апостеріорним тестом Tukey's HSD для порівняння середніх значень цих параметрів у різних рН-групах для кожної статі окремо підтвердив статистично достовірний ефект рН 5 на середню тривалість життя: самців $F(5, 626)=36,2$; $p<0,001$ та самок $F(5, 613)=46,3$; $p<0,001$ *D. melanogaster*. Подібний статистично достовірний результат було отримано також при розрахунку максимальної тривалості життя: самців $F(4, 60)=66,9$; $p<0,001$ і самок $F(4, 60)=11,2$; $p<0,001$ *D. melanogaster*

Таблиця 3.1

**Середня (СТЖ) та максимальна (МТЖ) тривалість життя
D. melanogaster, розвиток яких на личинковій стадії проходив при різних
рН поживного середовища**

| Стать | Самці | | Самки | | |
|-------|-------|------------|------------|------------|------------|
| | рН | СТЖ, дні | МТЖ, дні | СТЖ, дні | МТЖ, дні |
| 5 | | 64,4±1,85 | 90,6±0,56 | 58,6±1,28 | 75,9±2,45 |
| 6 | | 43,3±1,90* | 67,0±0,91* | 38,2±1,90* | 63,2±1,35* |
| 7 | | 42,4±1,84* | 66,4±1,93* | 35,9±1,78* | 58,3±0,54* |
| 8 | | 48,7±2,21* | 83,9±2,12 | 43,7±1,84* | 66,6±2,36* |
| 9 | | 43,4±1,92* | 68,0±0,41* | 41,3±1,93* | 67,9±2,27* |

Примітка: * – $p<0,001$ у порівнянні з групою рН 5 (Tukey HSD апостеріорний тест)

Підсумовуючи отримані результати дослідження, можна стверджувати, що кисле поживне середовище личинкової стадії розвитку збільшує тривалість життя самців і самок імаго *D. melanogaster* у порівнянні з особинами, личинки яких розвивалися за нейтрального та лужного рН середовища. Ці результати вступають у протиріччя із прийнятою концепцією, згідно з якою подовження тривалості життя асоціюється з

уповільненням розвитку. В умовах кислого середовища розвиток дрозофіл відбувався швидше, однак це не призвело до скорочення тривалості життя, а, навпаки, сприяло її значному збільшенню. Подібна динаміка може бути обумовлена тим, що кисле середовище оптимально відповідає природним умовам розвитку цих організмів, тим самим забезпечуючи максимально повноцінний розвиток та подальше збільшення тривалості життя дорослих особин.

3.2. Вплив гіпоксії та гіпероксії на преімагінальній стадії на тривалість преімагінального розвитку та життя імаго

Результати проведеного дослідження впливу гіпероксії та гіпоксії на стадії розвитку *D. melanogaster* продемонстрували зростання тривалості розвитку приблизно на одну добу під впливом гіпоксичних умов. В умовах гіпероксії не було зареєстровано змін тривалості розвитку *Drosophila*.

Розрахунок середньої та максимальної тривалості життя та побудова кривих виживання для самців і самок імаго *D. melanogaster*, розвиток яких проходив в умовах різної концентрації кисню в навколишньому середовищі, продемонстрували значний вплив даного параметра на тривалість життя модельного організму (рис. 3.4 та 3.5; табл. 3.2).

Аналіз отриманих даних показав, що у самців, 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 (рис. 3.4). Водночас, для самців, що розвивалися у гіпоксичних умовах, крива виживання наближена до контрольної ($O_2=21\%$), з окремим винятком у її кінцевій частині, де відзначається підвищення частки довгожителів. Згідно Log-Rank Test, який дозволяє попарно порівнювати криві виживання, для самців була ідентифікована статистично достовірною різниця між наступними групами: групи III ($O_2=40\%$) з контрольною групою II ($O_2=21\%$) $p<0,001$ та групи I

($O_2=10\%$) з групою III ($O_2=40\%$) $p<0,001$. Результат порівняння вказує на статистично значуще зменшення тривалості життя в групі самців, розвиток яких проходив за умов гіпероксії при порівнянні з контрольною групою ($O_2=21\%$).

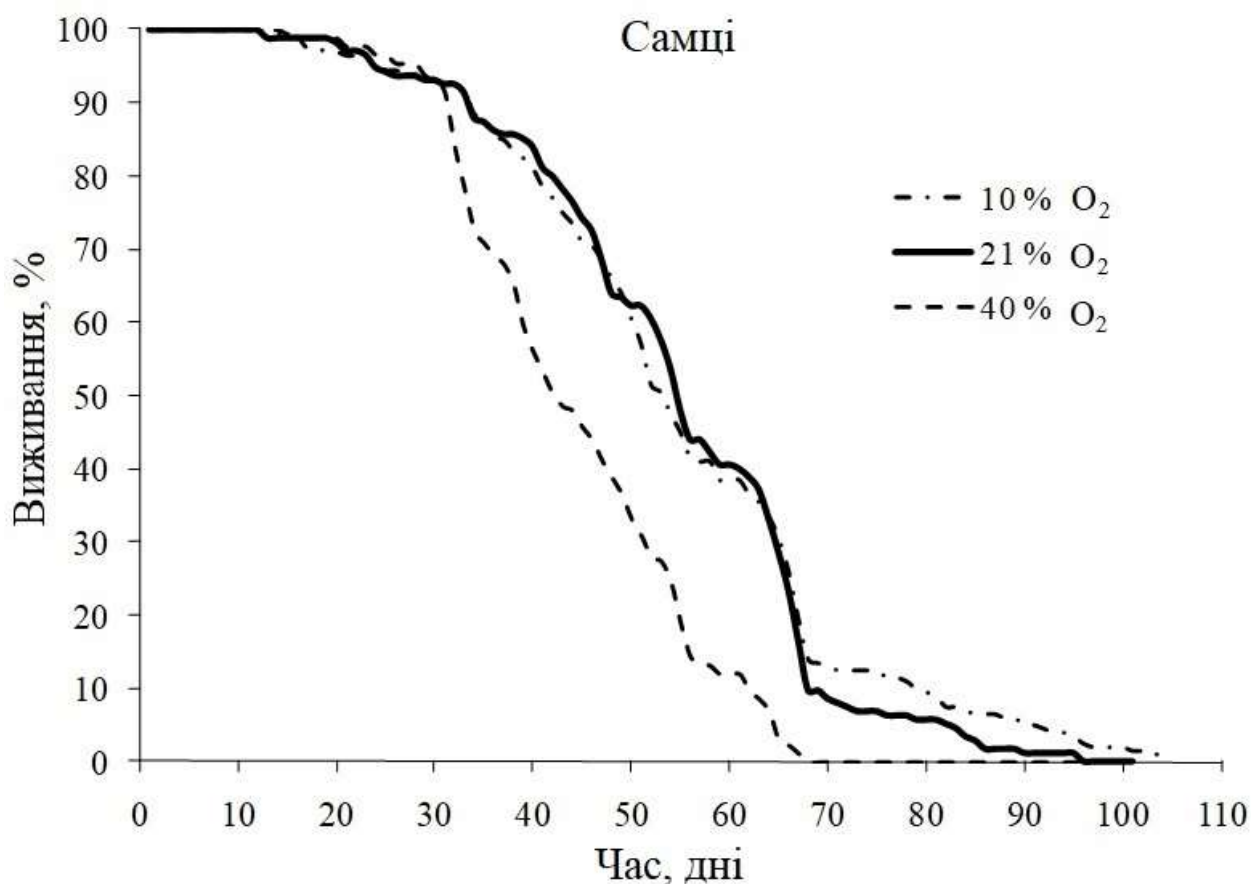


Рис. 3.4. Криві виживання самців імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за різної концентрації кисню в навколишньому середовищі

Аналіз отриманих даних серед самок показав, що крива виживання в умовах гіпероксії також показує ліве зміщення порівняно з контрольною групою ($O_2=21\%$), що свідчить про зниження тривалості їхнього життя (рис. 3.5). Проте, у гіпоксичних умовах, самки виявились менш життєздатними ніж самці, що проявляється у більш швидкому зниженні їхньої виживаності в порівнянні з контролем ($O_2=21\%$). Згідно Log-Rank Test для самок була ідентифікована статистично достовірною різниця між

наступними групами: групи I ($O_2=10\%$) з контрольною групою II ($O_2=21\%$) $p<0,001$; групи III ($O_2=40\%$) з контрольною групою II ($O_2=21\%$) $p<0,05$; групи I ($O_2=10\%$) з групою III ($O_2=40\%$) $p<0,05$. Результат порівняння вказує на статистично значуще зменшення тривалості життя в групі самок, розвиток яких проходив за умов і гіпероксії, і гіпоксії при порівнянні з контрольною групою ($O_2=21\%$).

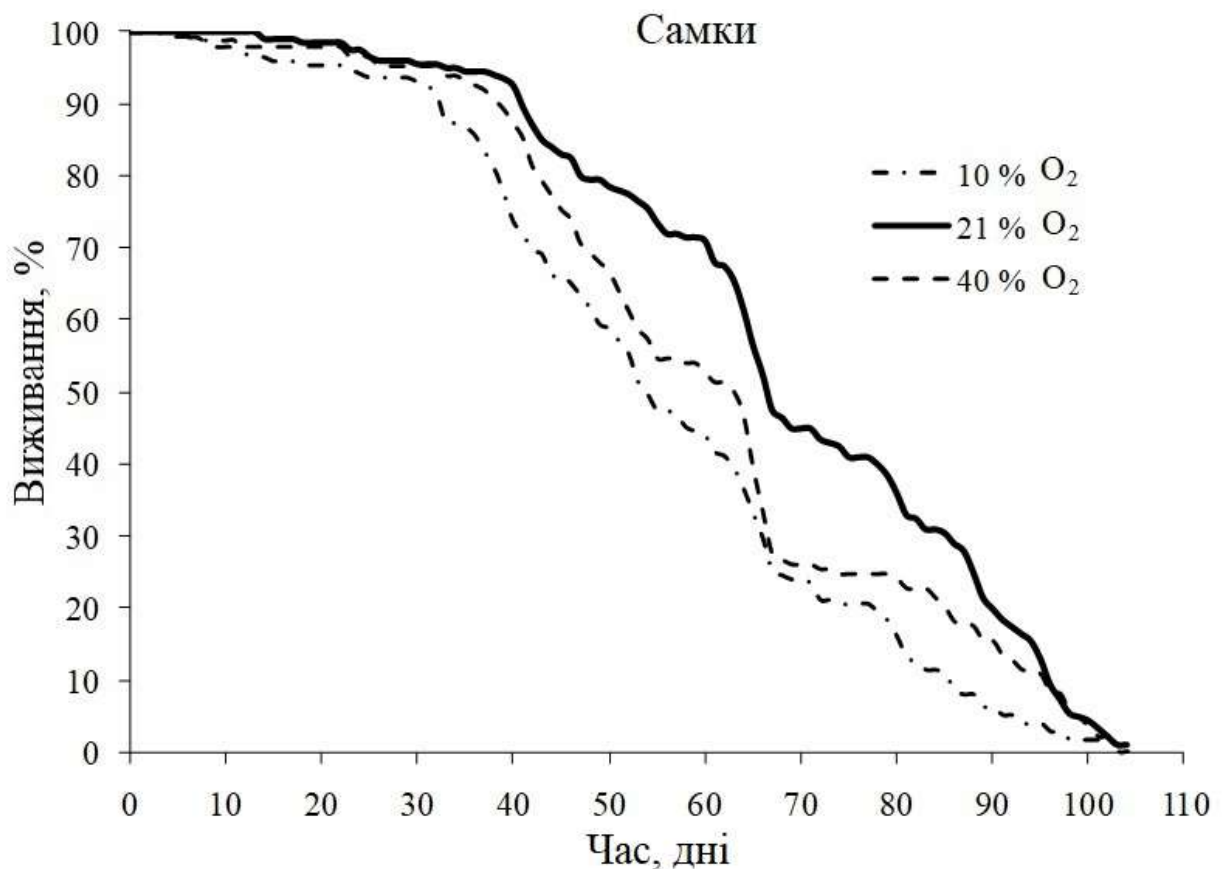


Рис. 3.5. Криві виживання самок імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за різної концентрації кисню в навколишньому середовищі

Розрахунок середньої та максимальної тривалості життя *D. melanogaster* у різних експериментальних групах (табл. 3.2) продемонстрував статистично достовірне зменшення цих показників в умовах гіпероксії: зменшення середньої тривалості життя склало 17 % у самців та 10 % у самок, а максимальної тривалості життя — 17 % у самців ($p<0,001$).

Було показано, що вплив гіпоксії мав різноспрямований ефект на показники тривалості життя у самців і самок. Середня тривалість життя самців в умовах гіпоксії не показало статистично значущих змін, тоді як 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 % ($p < 0,001$).

Таблиця 3.2

Середня (СТЖ) і максимальна (МТЖ) тривалість життя самців і самок імаго *D. melanogaster*, розвиток яких проходив за умови різної концентрації кисню в навколишньому середовищі

| Стать | Самці | | Самки | |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | СТЖ, дні | МТЖ, дні | СТЖ, дні | МТЖ, дні |
| Група I (O ₂ =10 %) | 61,18±1,26 (-1,1) | 96,05±1,80* (+11,2) | 63,22±1,5* (-18,3) | 99,00±1,49* (-8,2) |
| Група II (O ₂ =21 %) | 61,83±1,23 | 86,35±2,04 | 77,40±1,51 | 107,90±0,62 |
| Група III (O ₂ =40 %) | 51,46±0,89* (-16,8) | 71,75±0,41* (-16,9) | 69,86±1,7* (-9,7) | 105,95±0,75 (-1,8) |

Примітка: У дужках зазначені зміни відносно контролю (O₂=21 %) у відсотках; * – $p < 0,001$ при порівнянні з контрольною групою (Tukey HSD апостеріорний тест)

Підсумовуючи отримані результати, можна стверджувати, що концентрація кисню в навколишньому середовищі під час розвитку *D. melanogaster* має статистично значущий вплив на тривалість життя особин на стадії імаго. Гіпероксія на етапі розвитку чинила негативний вплив на тривалість життя і самців і самок імаго *Drosophila*, а саме статистично достовірно зменшуючи її. В той час як розвиток за умови гіпоксії мав різний

ефект впливу на показники тривалості життя для різних статей: у самок цей вплив сприяє виключно зменшенню як середньої, так і максимальної тривалості життя, а у самців максимальна тривалість життя статистично достовірно зростає в умовах гіпоксії.

Основні результати розділу були опубліковані:

1. 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
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 «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології»; 20-24 серпня 2018; Україна. Харків. С. 36-38.

РОЗДІЛ 4

**ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА ЛИЧИНКОВІЙ СТАДІЇ РОЗВИТКУ НА
ПОКАЗНИКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ,
АСОЦІЙОВАНИХ ЗІ СТАРІННЯМ, У САМЦІВ І САМОК ІМАГО**

4.1. Зміна тривалості преімагінального розвитку та маси тіла самців і самок імаго, личинковий розвиток яких проходив за різних температур

Отримані дані свідчать про суттєвий вплив температури навколишнього середовища на тривалість преімагінального розвитку дрозофіл (рис. 4.1).

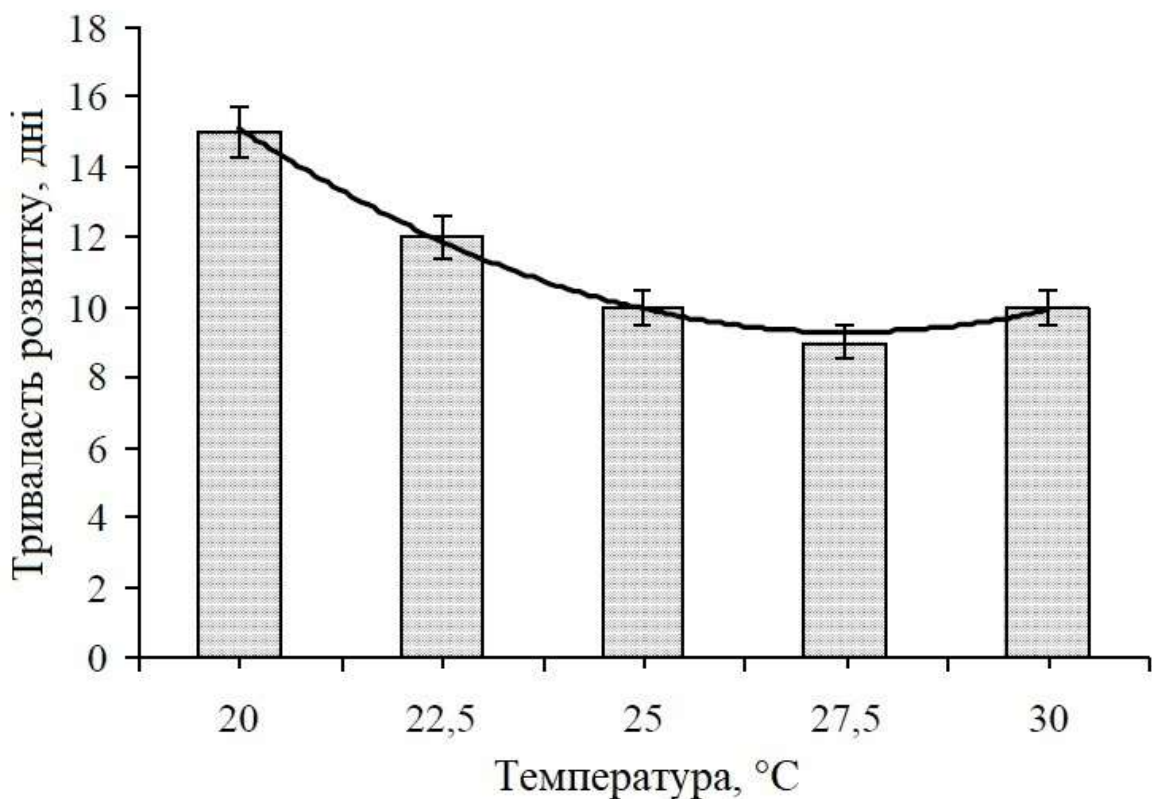


Рис. 4.1. Залежність тривалості преімагінального розвитку *D. melanogaster* від температури навколишнього середовища

Розвиток уповільнився у 1,7 рази зі зниженням температури з 27,5 °C до 20,0 °C. Також було зафіксовано тенденцію до уповільнення тривалості

розвитку із підвищенням температури з 27,5 °С до 30,0 °С. Це свідчить про нелінійну залежність між температурою навколишнього середовища та тривалістю розвитку.

В ході дослідження також було виявлено нелінійну залежність між температурою, за якої відбувався розвиток мух *Drosophila*, та масою імаго при вилупленні (рис. 4.2). Характер зміни маси тіла імаго в залежності від температури розвитку був майже однаковим як для самців, так і для самок.

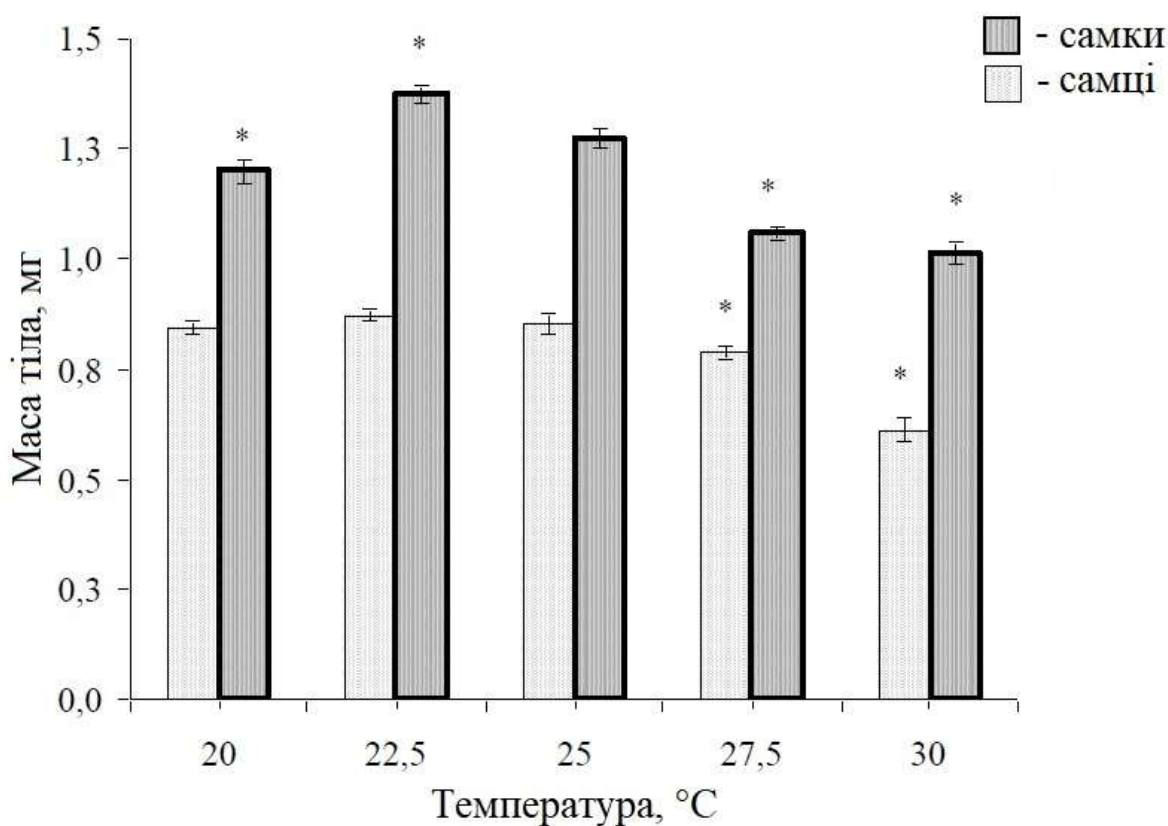


Рис. 4.2. Залежність середньої маси тіла самців і самок імаго *D. melanogaster* від температури навколишнього середовища.

Примітка: * – $p < 0,05$ при порівнянні з 25 °С (Tukey HSD апостеріорний тест)

Оптимальна температура розвитку для досягнення максимальної маси тіла імаго складала 22,5 °С. Збільшення температури навколишнього середовища до 30,0 °С негативно вплинуло на потенціал темпу розвитку, що

було продемонстровано значним зниженням маси, а саме: маса самців знижувалася 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.

З теоретичної точки зору, маса *Drosophila* повинна залежати від співвідношення між швидкістю росту та тривалістю розвитку за різних температурних умов. Збільшення швидкості росту та тривалості періоду розвитку зазвичай корелює зі збільшенням маси мухи. Однак, при температурі 20,0 °С спостерігалось збільшення тривалості розвитку та зменшення маси мух, що демонструє значне зниження швидкості росту, таку саму тенденцію демонстрували імаго дрозофіл, личинковий розвиток яких проходив при 30,0 °С.

4.2. Зміна середньої та максимальної тривалості життя самців і самок імаго, личинковий розвиток яких проходив за різних температур

Моніторинг динаміки чисельності живих мушок *Drosophila* у групах, що розвивалися за різних температурних умов, виявив значні відмінності у кривих виживання як для самців (рис. 4.3), так і для самок (рис. 4.4).

У групі самців, особини, що розвивалися при температурі 30,0 °С, демонстрували найвищу швидкість смертності. Криві виживання груп, що розвивалися при всіх інших температурах, були помітно зміщені вправо порівняно з кривою групи, личинковий розвиток якої проходив при 30,0 °С, вказуючи на послідовне збільшення загальної тривалості життя зі зниженням температури розвитку. Проте, ця тенденція порушувалася для групи, розвиток якої проходив при 20,0 °С, де особини вмирили раніше, ніж ті, що розвивалися при 25,0 і 22,5 °С, що свідчить про різноспрямований вплив температури розвитку на виживання.

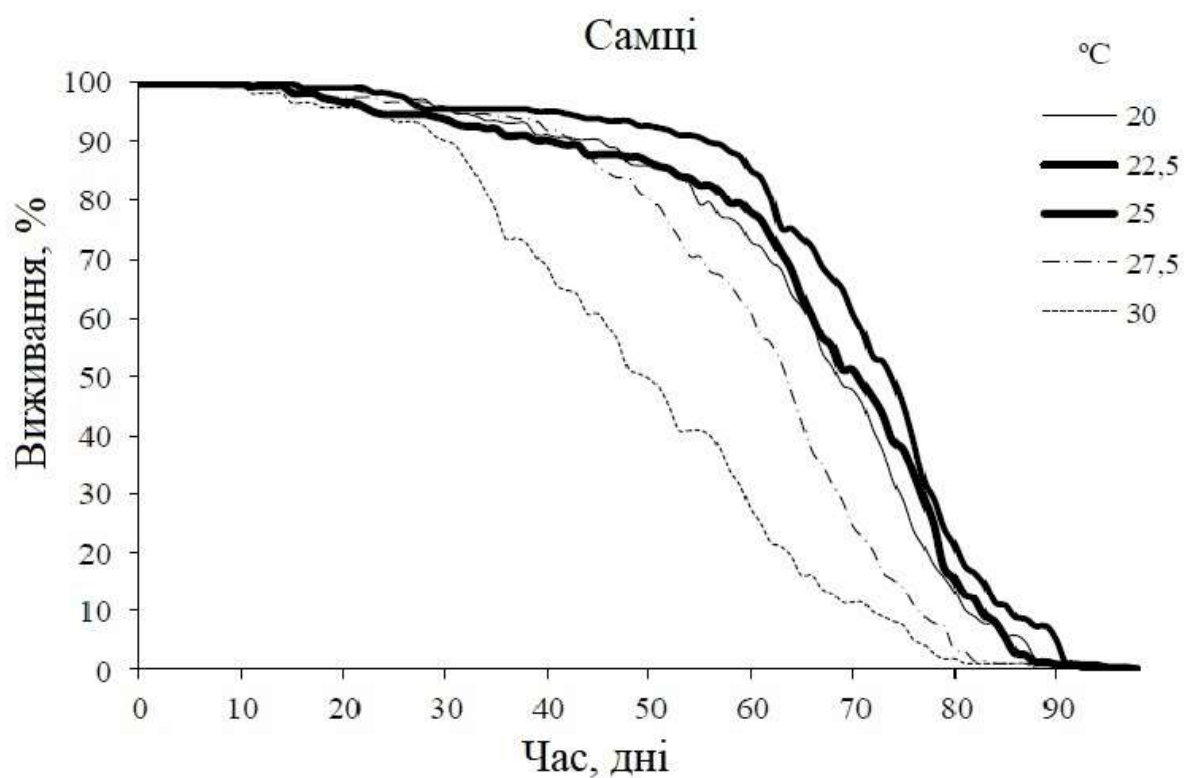


Рис. 4.3. Криві виживання самців імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за різних температур навколишнього середовища

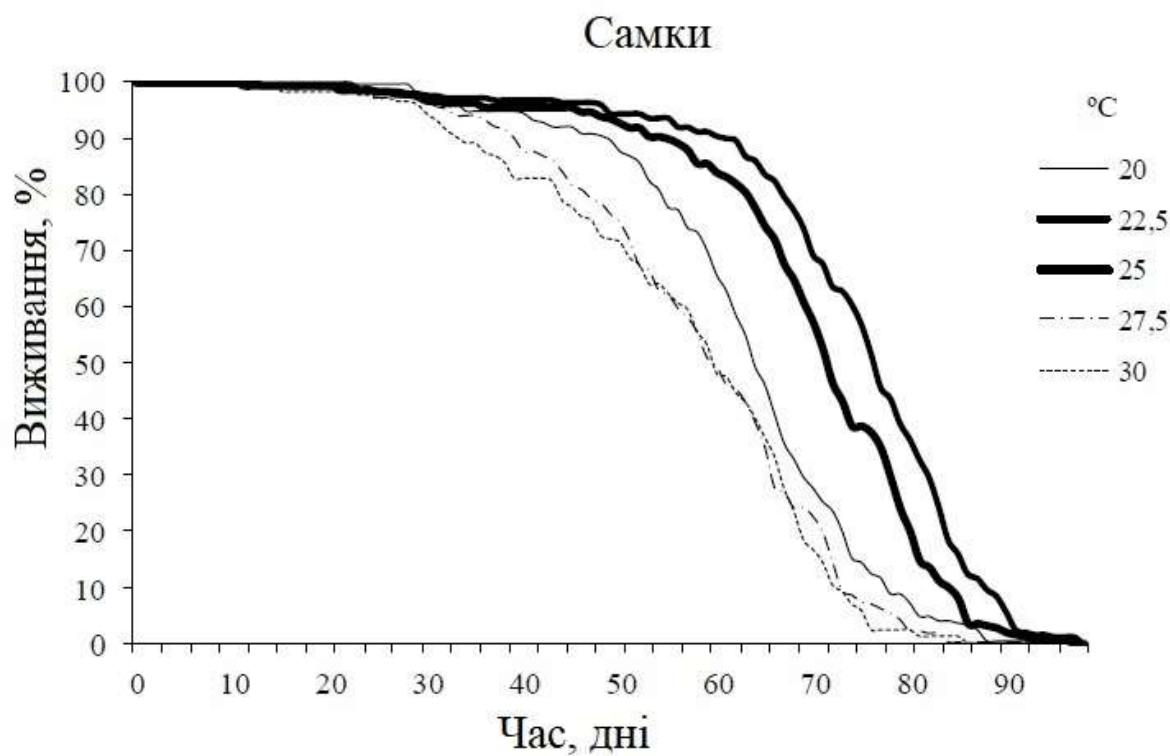


Рис. 4.4. Криві виживання самок імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за різних температур навколишнього середовища

У групі самок, найвищий темп смертності спостерігався у особин, розвиток яких проходив за температури 30,0 та 27,5 °С. Також аналіз отриманих даних виявив зростання загальної тривалості життя зі зниженням температури розвитку личинок у температурних групах 25,0 і 22,5 °С. Однак, ця тенденція була порушена при температурі 20,0 °С. Спостережуваний ефект зниженої життєздатності у групі особин, що розвивались при 20,0 °С, був проілюстрований для обох статей, що може бути обумовлено фактом неповноцінного розвитку.

Було виконано розрахунки середньої та максимальної тривалості життя *D. melanogaster* всіх аналізованих температурних груп (табл. 4.1.).

Таблиця 4.1

Середня (СТЖ) та максимальна (МТЖ) тривалість життя самців і самок імаго *Drosophila melanogaster*, вирощених за умов різної температури на личинковій стадії розвитку

| Стать | Самці | | Самки | |
|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | СТЖ, дні | МТЖ, дні | СТЖ, дні | МТЖ, дні |
| 20,0 | 66,1±0,96 (-1,1) | 87,7±0,73 (-0,8) | 63,4±0,81 (-9,9)* | 84,5±0,81 (-4,7)* |
| 22,5 | 71,0±0,91 (+6,3)* | 90,8±0,46 (+4,4)* | 74,6±0,89 (+6,0)* | 91,9±0,53 (+3,6)* |
| 25,0 | 66,8±1,07 | 87,0±0,55 | 70,4±0,85 | 88,7±0,82 |
| 27,5 | 61,0±0,90 (-8,7)* | 81,6±0,78 (-6,2)* | 58,3±0,88 (-17,2)* | 79,6±0,65 (-10,3)* |
| 30,0 | 50,2±1,43 (-14,0)* | 74,1±1,19 (-14,8)* | 57,3±1,10 (-18,6)* | 76,3±0,91 (-14,0)* |

Примітка: * – $p < 0,05$ при порівнянні з групою 25 °С (Tukey HSD апостеріорний тест)

Однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з подальшим застосуванням апостеріорного тесту Tukey's HSD для попарних порівнянь середніх значень показників тривалості життя у різних температурних групах для кожної статі окремо продемонстрував статистично значущий вплив температури личинкової стадії розвитку на середню тривалість життя самців: $F(4, 11)=42,96$; $p<0,001$ та самок: $F(4, 12)=70,30$; $p<0,001$. Аналогічно, значущі результати були отримані і для максимальної тривалості життя самців: $F(4, 95)=70,37$; $p<0,001$ та самок: $F(4, 95)=71,08$; $p<0,001$ дрозофіл.

Рисунки 4.5 та 4.6 ілюструють залежність показників тривалості життя від тривалості преімагінального розвитку за різних температурних умов. Наведені графіки підтверджують нелінійний характер цих залежностей.

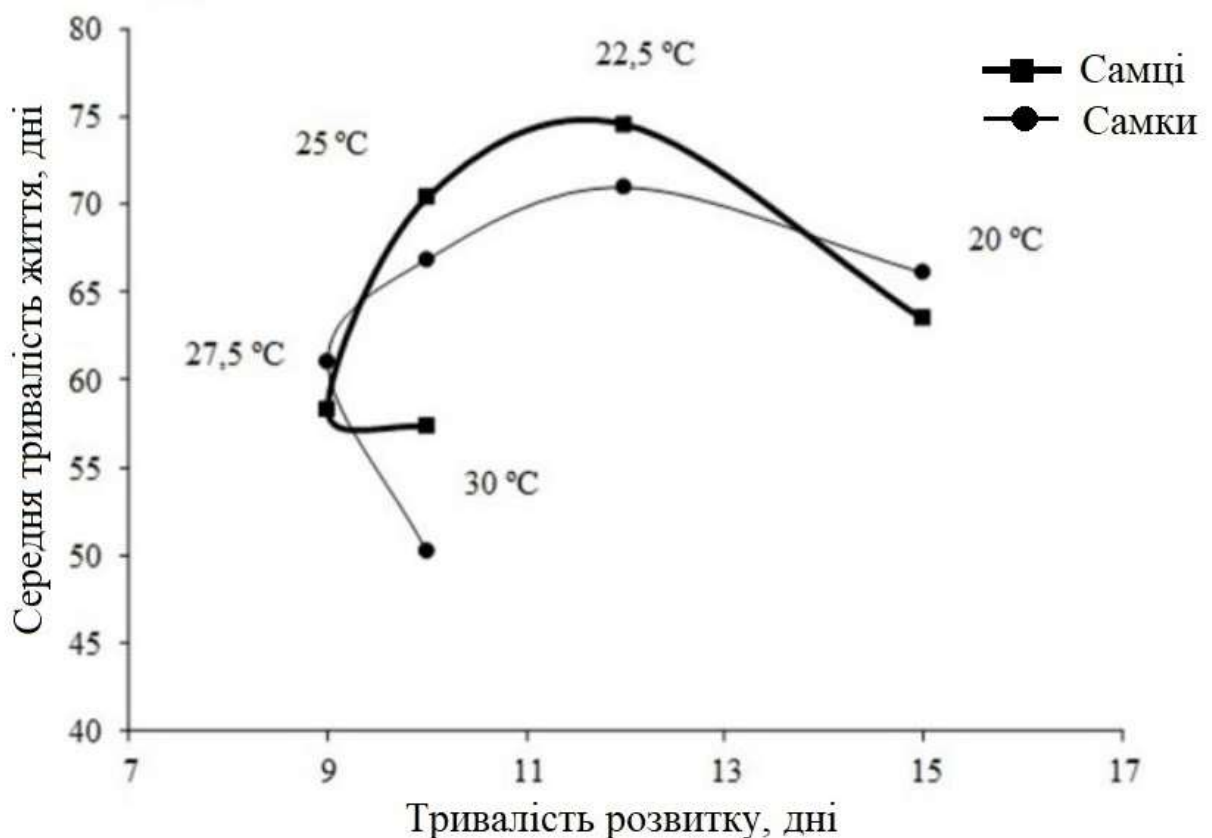


Рис. 4.5. Залежність середньої тривалості життя самців і самок імаго *D. melanogaster* від тривалості преімагінального розвитку за різних температур навколишнього середовища

Встановлено існування температурного оптимуму який складає $22,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, за якого спостерігається підвищення тривалості життя, хоча при температурі $30,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ спостерігалася тенденція до збільшення тривалості розвитку. За умови збільшення температури вище оптимуму, тривалість життя зменшується лінійно. Аналогічно зменшення тривалості життя спостерігається при зниженні температури розвитку до $20,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

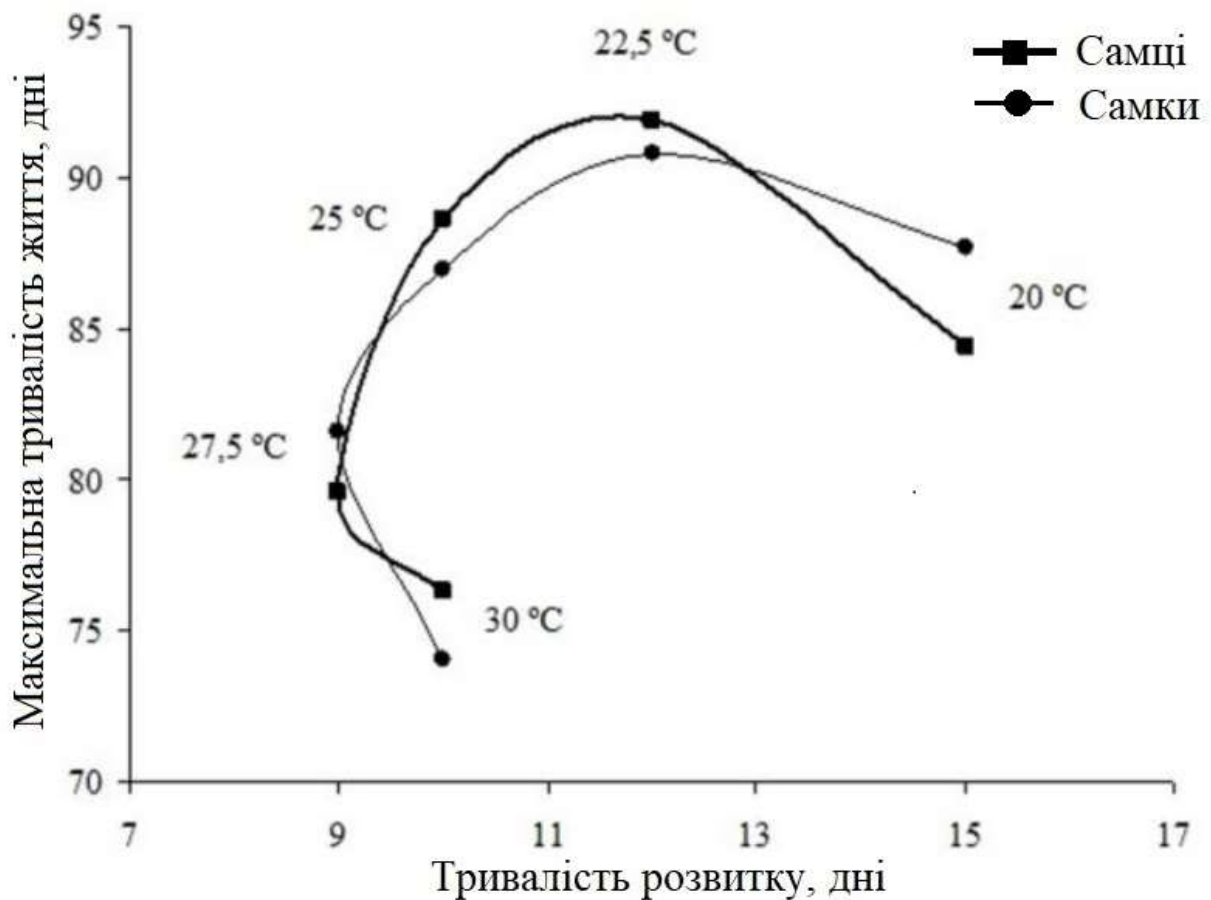


Рис. 4.6. Залежність максимальної тривалості життя самців і самок *D. melanogaster* від тривалості преімагінального розвитку за різних температур навколишнього середовища

Було досліджено кореляцію між середньою тривалістю життя та масою тіла самців і самок дрозофіл, що представлено на рисунках 4.7 та 4.8. Залежність між середньою тривалістю життя та масою тіла є практично

лінійною: середня тривалість життя збільшується пропорційно до зростання маси тіла комах.

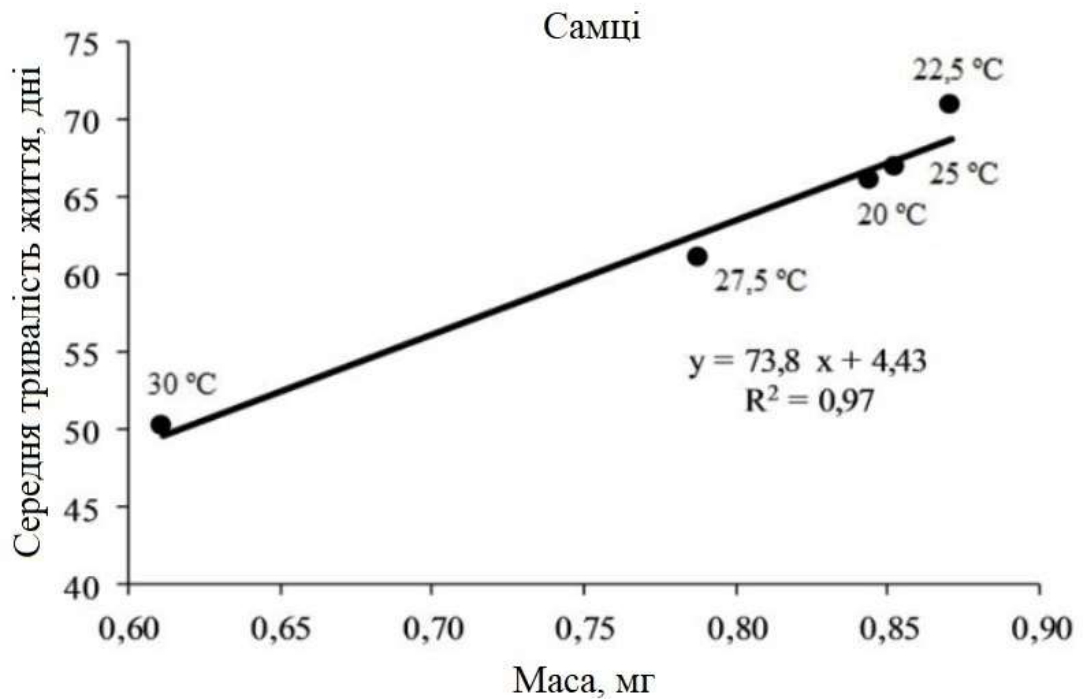


Рис. 4.7. Регресійна залежність між масою тіла та середньою тривалістю життя самців *D. melanogaster* після вилуплення з лялечок

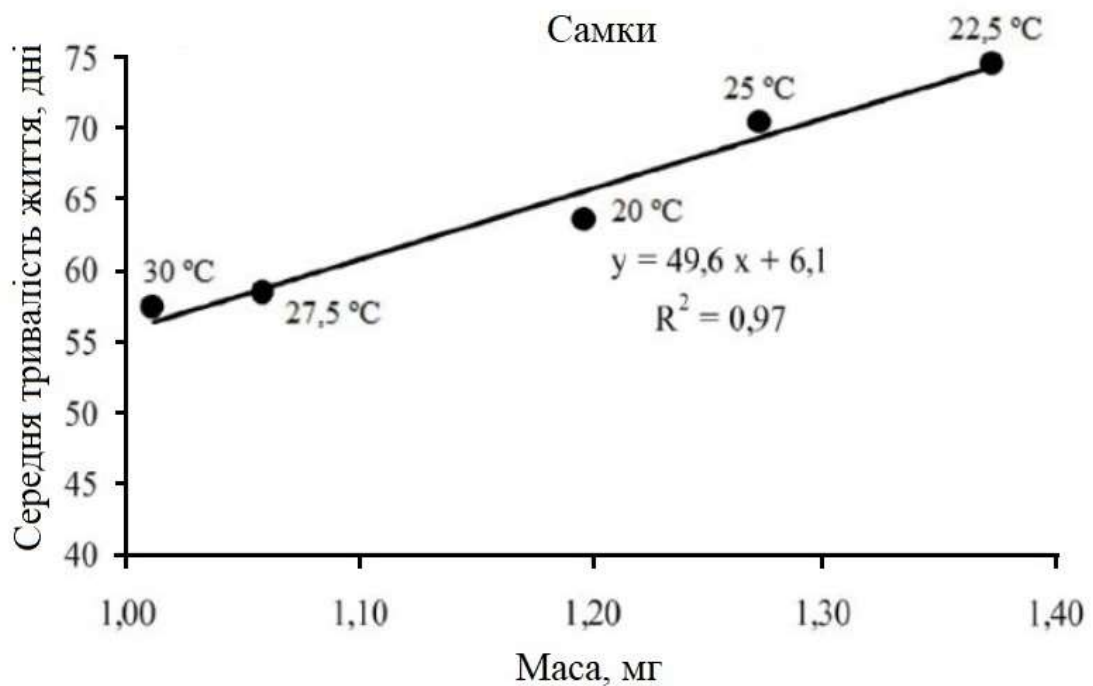


Рис. 4.8. Регресійна залежність між масою тіла та середньою тривалістю життя самок *D. melanogaster* після вилуплення з лялечок

Самці і самки імаго дрозофіл, які розвивалися при температурі 22,5 °С, мали максимальну масу тіла при вилупленні та найвищу тривалість життя як середню, так і максимальну, що, ймовірно, пов'язано з оптимальними температурними умовами для активності ферментів, які сприяють повноцінному розвитку. Теоретично, маса дрозофіл може залежати від балансу між швидкістю їхнього росту та тривалістю розвитку за різних температур. Збільшення швидкості росту та подовження періоду розвитку мають сприяти збільшенню маси мух. При 20,0 °С ріст мух сповільнювався більше, ніж збільшився період їхнього розвитку, що призвело до зменшення їх маси. І навпаки, при 30,0 °С, незважаючи на подовження періоду розвитку, маса мух зменшилася через значне уповільнення їхнього росту.

4.3. Визначення рівня 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 регуляцію тривалості життя та довголіття у плодової мушки та інших модельних об'єктах. Детальний опис цих генів та їх функцій представлений в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Перелік генів, відібраних для аналізу рівня експресії

| Назва гена | Назва білка | Основна функція білка | FlyBase ID |
|--------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------|
| <i>Hsp70</i> | Heat shock protein 70 | Шаперон, відповідь на стрес | FBgn0013275 |
| <i>mTor</i> | Target of rapamycin | Протеїнкіназа, відповідь на стрес | FBgn0021796 |

| | | | |
|--------------|--------------------------|--|-------------|
| <i>foxo</i> | Forkhead box O | Транскрипційний фактор, відповідь на стрес | FBgn0038197 |
| <i>InR</i> | Insulin-like receptor | Тирозинкіназний рецептор, зв'язування білків, відповідь на стрес | FBgn0283499 |
| <i>Sirt1</i> | Sirtuin 1 | Гістондеацетилаза, відповідь на стрес | FBgn0024291 |

Аналіз відносного рівня експресії обраних генів проводився для встановлення взаємозв'язку між ефектом впливу різної температури личинкової стадії розвитку на показники життєздатності дрозодів та довготривалими змінами в експресії генів.

Аналіз отриманих даних про відносний рівень експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*, які асоційовані з тривалістю життя в *D. melanogaster*, виявив диференційований вплив досліджуваного стимулу на експресію генів у самців та самок (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Показники статистичної значущості впливу температури розвитку на експресію генів у самців і самок імаго *Drosophila melanogaster* відповідно до one-way ANOVA тесту

| Назва гена | Самки | | Самці | |
|--------------|------------|--------------------|------------|--------------------|
| | F-критерій | <i>p</i> -значення | F-критерій | <i>p</i> -значення |
| <i>Hsp70</i> | 15,322285 | 0,000035 | 0,844794 | 0,51835 |
| <i>InR</i> | 35,356441 | 1,796375e-07 | 2,373333 | 0,098778 |
| <i>Sirt1</i> | 8,268449 | 0,000991 | 2,846386 | 0,061295 |
| <i>foxo</i> | 5,861191 | 0,004792 | 0,519448 | 0,722849 |
| <i>mTor</i> | 6,805302 | 0,002485 | 2,160969 | 0,123278 |

Результат дисперсійного аналізу (табл. 4.3) показав, що у самців не виявлено статистично значущих змін у рівні експресії гена *Hsp70* відповідно до зміни температури, тоді як у самок такі зміни були ідентифіковані (рис. 4.9).

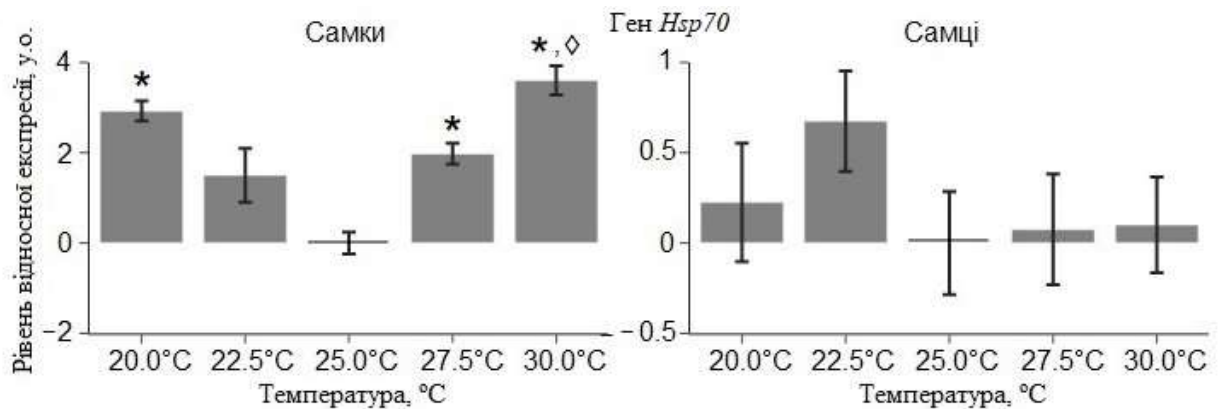


Рис. 4.9. Рівень відносної експресії гена *Hsp70* самців і самок *D. melanogaster*, розвиток яких проходив за різної температури навколишнього середовища. Представлено логарифм відношення рівня експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії за 25 °C.

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

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 °C – у 1,98 ($\pm 0,23$) рази ($p = 0,0096$) та за 30 °C – у 3,6 ($\pm 0,32$) рази ($p < 0,001$). Також було встановлено статистично достовірне збільшення експресії гену у групі особин, які розвивалися за температури 30 °C, у порівнянні з особинами, розвиток яких відбувався за температури 22,5 °C.

Результати дисперсійного аналізу, представлені в таблиці 4.3, виявили відсутність статистично значущих варіацій у рівні експресії гена *InR* у самців

у відповідь на температурні зміни, тоді як у самок було зафіксовано статистично значущі зміни у рівні експресії цього гену (рис. 4.10).

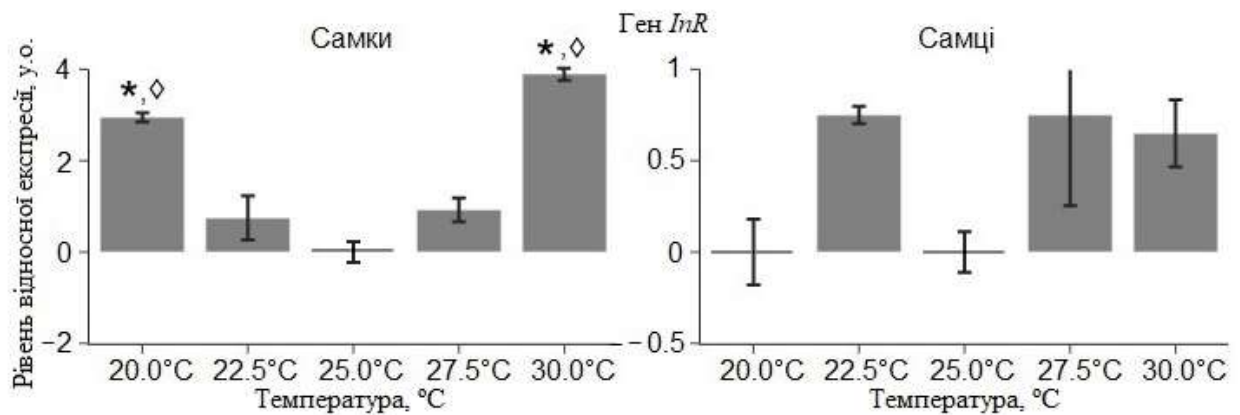


Рис. 4.10. Рівень відносної експресії гена *InR* самців і самок *D. melanogaster*, розвиток яких проходив за різної температури навколишнього середовища. Представлено логарифм відношення рівня експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії за 25 °С.

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

Згідно тесту TukeyHSD, у самок, личинковий розвиток яких проходив за 20 °С, рівень експресії гена *InR* статистично достовірно підвищився у 2,95 ($\pm 0,1$) рази ($p < 0,001$) та за 30 °С – у 3,9 ($\pm 0,14$) рази ($p < 0,001$) при порівнянні контролем (личинковий розвиток за 25 °С). Також було ідентифіковано достовірне збільшення експресії для груп особин розвиток, яких проходив за температури 20 та 30°C, порівняно з групою особин, розвиток яких проходив за 22,5°C.

Результат дисперсійного аналізу (табл. 4.3) показав відсутність статистично значущої зміни у рівні експресії гена *Sirt1* для самців у відповідь на вплив аналізованого ефекту, тоді як у самок такі зміни були зареєстровані (рис. 4.11).

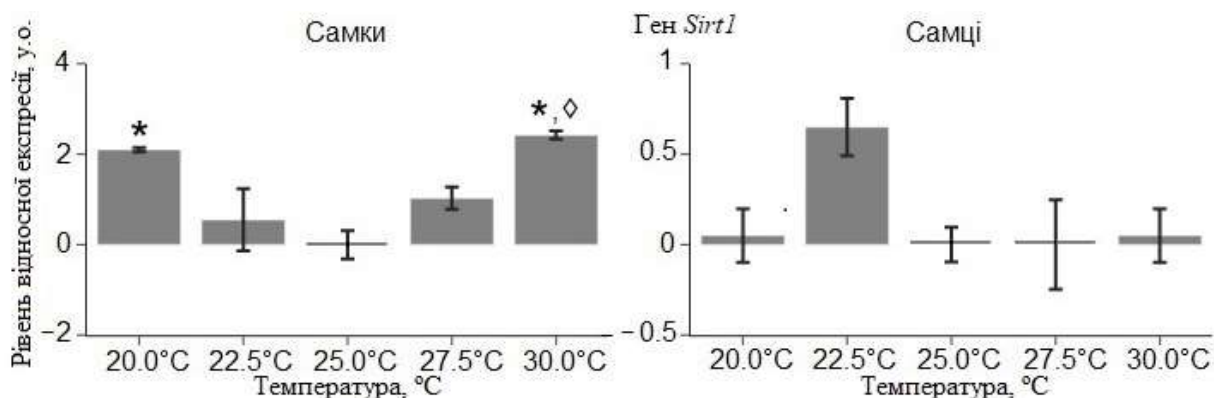


Рис. 4.11. Рівень відносної експресії гена *Sirt1* самців і самок *D. melanogaster*, розвиток яких проходив за різної температури навколишнього середовища. Представлено логарифм відношення рівня експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії за 25 °С.

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

Згідно тесту TukeyHSD, у самок, личинковий розвиток яких проходив за 20 °С та 30 °С, 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. При порівняння групи особин, личинковий розвиток яких проходив за 22,5 °С, з групою особин, личинковий розвиток яких проходив при 30 °С, також рівень експресії для гена достовірно збільшився.

Результати дисперсійного аналізу, представлені у таблиці 4.3, виявили відсутність статистично значущих змін в експресії гена *mTor* у самців у відповідь на аналізований вплив (рис. 4.12). Водночас у самок було зареєстровано значущі зміни експресії цього гена (рис. 4.12).

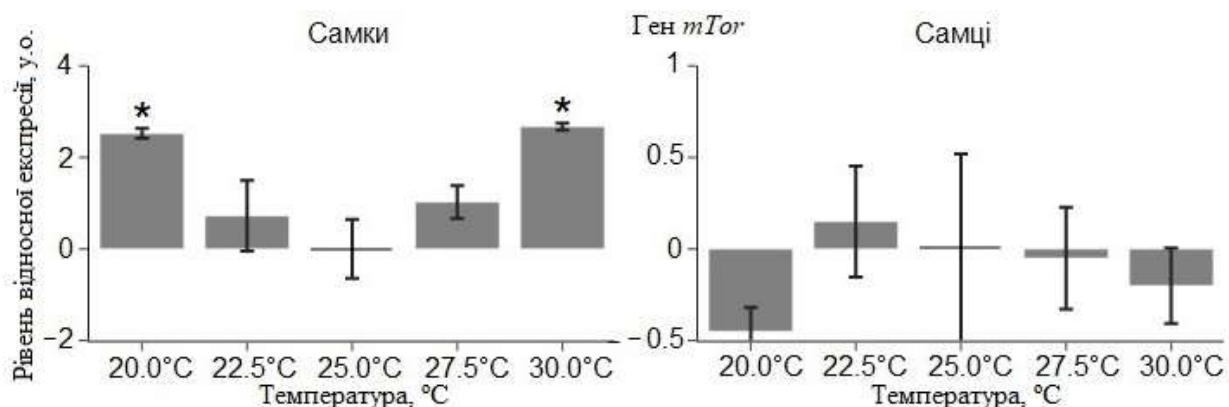


Рис. 4.12. Рівень відносної експресії гена *mTor* самців і самок *D. melanogaster*, розвиток яких проходив за різної температури навколишнього середовища. Представлено логарифм відношення рівня експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії за 25 °C.

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

За даними тесту Tukey HSD, у самок, личинковий розвиток яких відбувався за температури 20 °C, спостерігалось збільшення експресії гена *mTor* у 2,5 ($\pm 0,11$) рази, ($p = 0,0154$). Коли личинковий розвиток протікав при 30 °C, рівень експресії зріс у 2,7 ($\pm 0,08$) рази, ($p = 0,0101$).

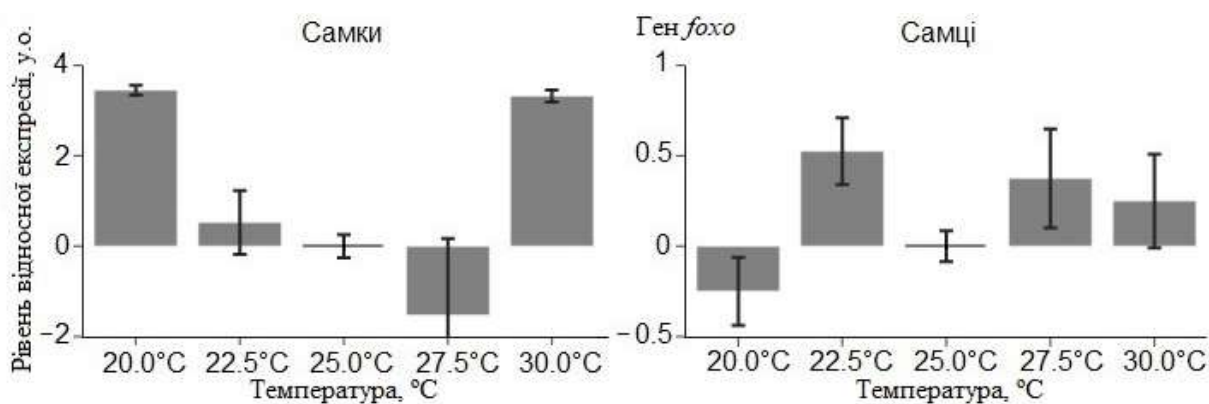


Рис. 4.13. Рівень відносної експресії гена *foxo* самців і самок *D. melanogaster*, розвиток яких проходив за різної температури навколишнього середовища. Представлено логарифм відношення рівня

експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії за 25 °C.

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

Аналіз результатів дисперсійного аналізу для гена *foxo* продемонстрував відсутність статистично значущих змін в експресії і у самців, і у самок у відповідь на вплив температури розвитку (табл. 4.3, рис. 4.13). Хоча було зареєстровано межові показники значущості для температурних груп 20 °C та 30 °C ($p=0,06$ та $p=0,08$, відповідно).

Підсумовуючи отримані дані щодо визначення відносного рівня експресії генів, слід зазначити, що у самців всіх досліджених груп не зафіксовано змін у експресії жодного з аналізованих генів. Натомість самки виявили варіабельність у рівнях експресії генів, яка була характерною для всіх досліджених генів та більш вираженою за температур, які значно відхилялися від фізіологічного оптимуму в 25 °C. Зокрема, в експериментальних групах самок, личинковий розвиток яких проходив за температур 20,0 °C та 30,0 °C, було зафіксовано значне та статистично достовірне зростання рівнів експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* та *mTor* порівняно з контрольною групою. Для гена *foxo*, при відсутності статистично значущих змін у рівні експресії, були встановлені порогові в сенсі статистичної значущості значення для аналогічних температурних умов.

Основні результати розділу опубліковані:

1. **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.

2. **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
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.

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ ЩІЛЬНОСТІ ПОПУЛЯЦІЇ ЛИЧИНОК НА ПОКАЗНИКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ, АСОЦІЙОВАНИХ ЗІ СТАРІННЯМ, У САМЦІВ І САМОК ІМАГО

5.1. Залежність тривалості преімагінального розвитку та маси тіла самців і самок імаго від щільності популяції личинок

Перетворення лялечок *D. melanogaster* у дорослих особин, що розвинулись із синхронно відкладених яєць за нормальних умов, без підвищеної личинкової щільності, триває близько доби. В нашому дослідженні продемонстровано, що за умов личинкового перенаселення (>3000 штук яєць на 100 мл поживного середовища), темп росту личинок плодкових мушок знижується, процес вилуплення розтягується і триває впродовж 5 днів, навіть враховуючи генетичну однорідність популяції. 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.

При цьому імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов підвищеної щільності, демонстрували суттєве зниження середньої маси тіла в порівнянні з контрольними особинами (рис. 5.1). Показник середньої маси тіла був значно нижчим у групі ВЩ1 (самці – $0,63 \pm 0,01$ мг, самки – $0,85 \pm 0,01$ мг), ніж у контрольній групі: (самці – $0,80 \pm 0,01$ мг, самки – $1,06 \pm 0,01$ мг). Загалом, в усіх дрозофіл середня маса тіла демонструє тенденцію до зменшення зі збільшенням тривалості розвитку. Згідно двофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, вплив високої личинкової щільності, статі та взаємодії були статистично значущими (вплив

щільності $F(5, 60)=384.9, p<0.0001$; стать: $F(1, 60)=1687, p<0.0001$; взаємодія: $F(5, 60)=15.4, p<0.0001$).

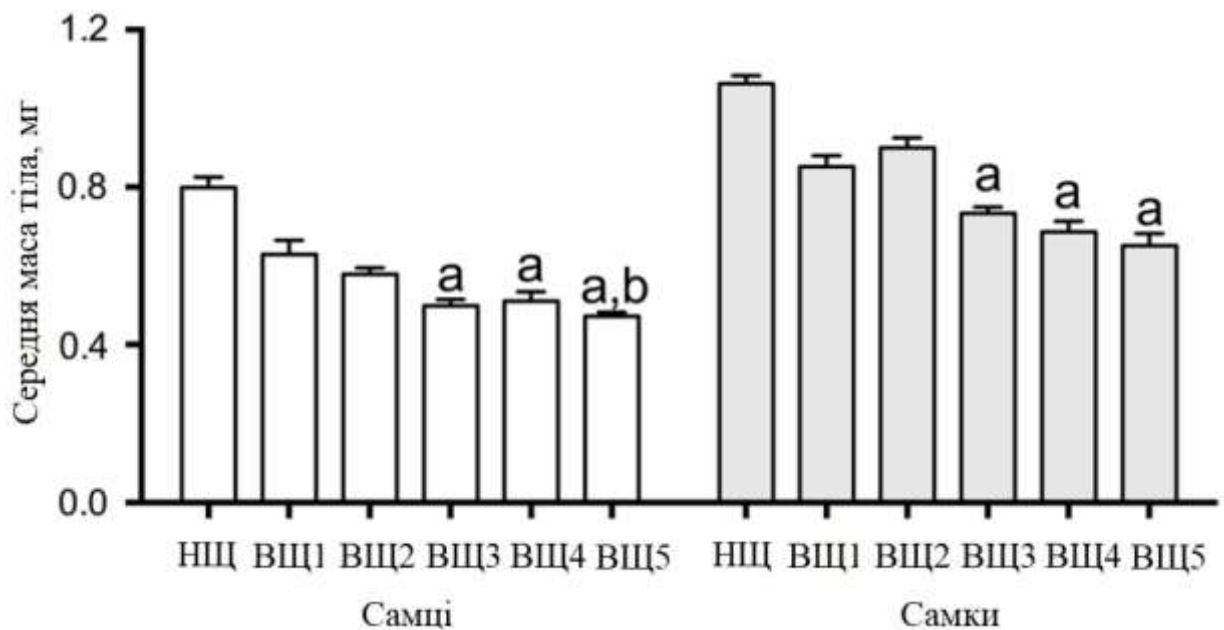


Рис. 5.1. Середня маса тіла самців і самок *D. melanogaster* личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної щільності популяції (НЦ) та високої щільності популяції (ВЦ1-5, визначення груп ВЦ див. у тексті).

Примітка: a – $p<0,01$ в порівнянні з контрольною групою НЦ (Dunn's multiple comparison test); b – $p<0,01$ в порівнянні з групою ВЦ1 (Dunn's multiple comparison test)

5.2. Залежність середньої та максимальної тривалості життя самців і самок імаго від щільності популяції личинок

Личинковий розвиток за умови високої щільності суттєво вплинув на тривалість життя обох статей. Водночас, варто зазначити, що залежність середньої тривалості життя та максимальної тривалості життя від тривалості розвитку була нелінійною (рис. 5.2 та 5.3).

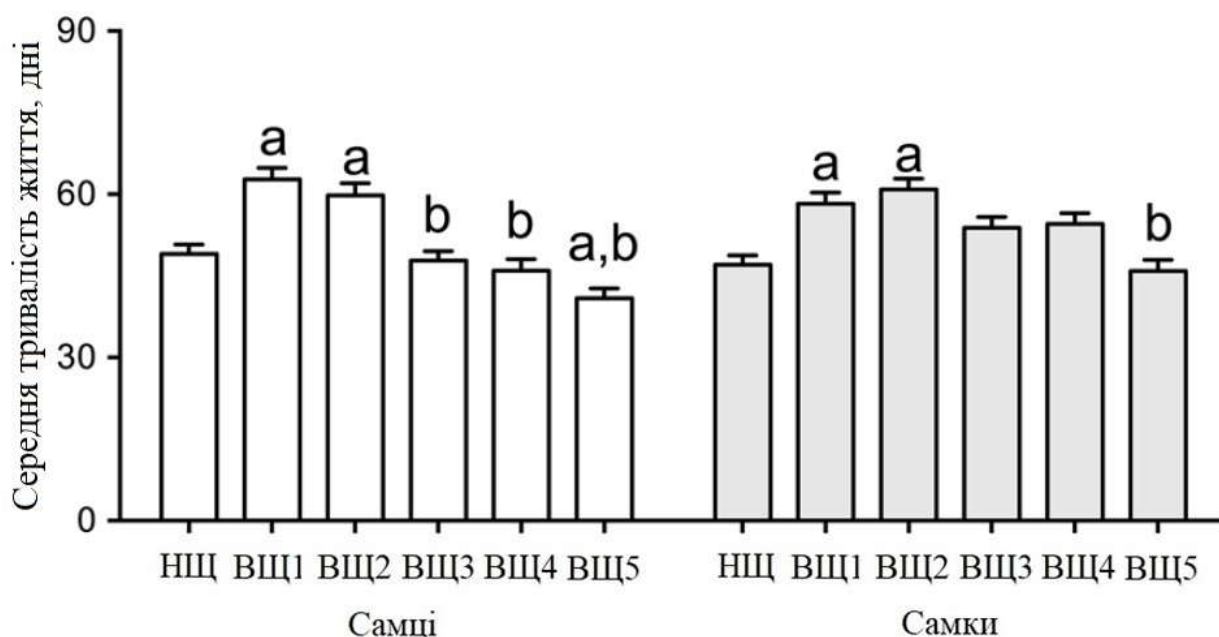


Рис. 5.2. Середня тривалість життя самців і самок імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної щільності популяції (НЦ) та високої щільності популяції (ВЦ1-5), визначення груп див. у тексті.

Примітка: a – $p < 0,01$ в порівнянні з контрольною групою НЦ (Dunn's multiple comparison test); b – $p < 0,01$ в порівнянні з групою ВЦ1 (Dunn's multiple comparison test)

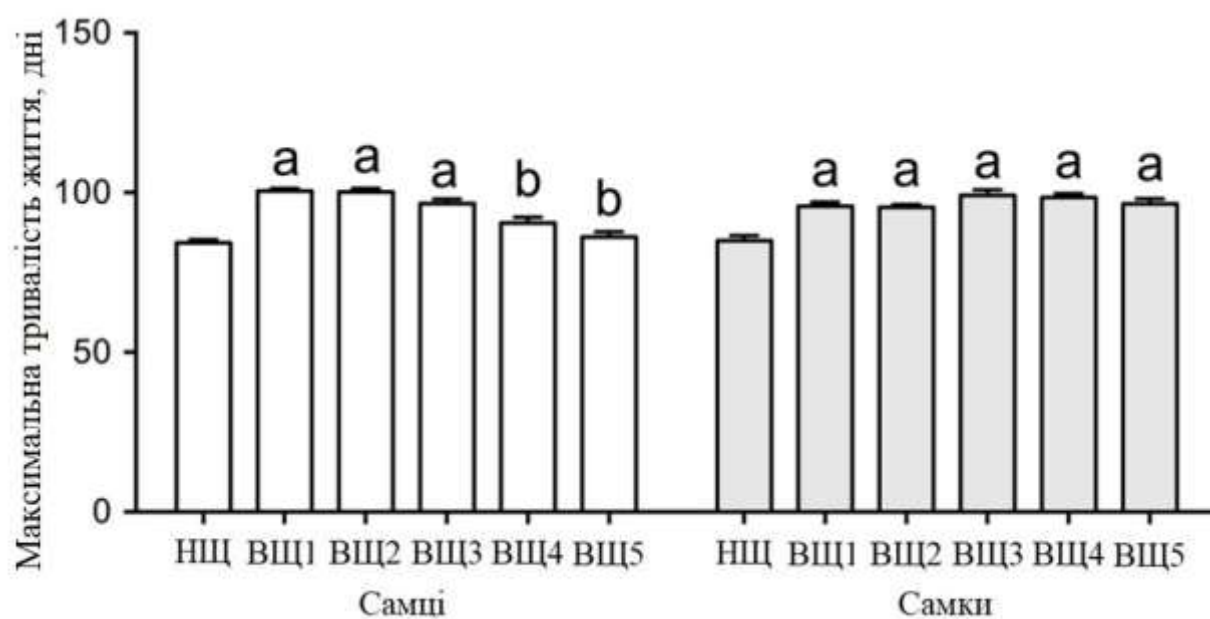


Рис. 5.3. Максимальна тривалість життя самців і самок імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної

щільності популяції (НЩ) та високої щільності популяції (ВЩ1-5), визначення груп див. у тексті.

Примітка: а – $p < 0,01$ в порівнянні з контрольною групою НЩ (Dunn's multiple comparison test); b – $p < 0,01$ в порівнянні з групою ВЩ1 (Dunn's multiple comparison test)

Як середня, так і максимальна тривалість життя у групах ВЩ1 та ВЩ2 були значно збільшені у самців і самок порівняно з групою НЩ, мінімальні значення демонструвала група ВЩ5 (табл. 5.1). У самців середня тривалість життя була збільшена на 24,0 % і 23,5 % в групах ВЩ1 і ВЩ2, відповідно. У самок відповідне збільшення показника середньої тривалості життя становили 23,8 % (група ВЩ1) і 29,3 % (група ВЩ2).

Таблиця 5.1

Зміни відносно контролю середньої (СТЖ) і максимальної (МТЖ) тривалості життя самців і самок імаго *D. melanogaster*, вирощених за умов високої (ВЩ1–ВЩ5) і нормальної (НЩ) щільності личинок

| Група | Самці | | Самиці | |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | СТЖ | МТЖ | СТЖ | МТЖ |
| НЩ | 48,07 ± 1,67 | 84,27 ± 0,98 | 47,07 ± 1,68 | 84,93 ± 1,59 |
| ВЩ1 | +24,0* | +19,3* | +23,8* | +12,7* |
| ВЩ2 | +23,5* | +18,9* | +29,3* | +12,3* |
| ВЩ3 | -7,1 | +14,6* | +14,4 | +16,7* |
| ВЩ4 | -5,4 | +7,4 | +15,9 | +16,0* |
| ВЩ5 | -19,1* | +1,8 | -2,51 | +13,6* |

Примітка: * – $p < 0,01$ (двофакторний ANOVA із подальшим Tukey's HSD test).

Для контрольної групи низької щільності (НЩ) представлено середню і максимальну тривалість життя у добах, для груп ВЩ – зміни відносно контролю у відсотках

Згідно двофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, вплив високої личинкової щільності складав: $F(5, 1779)=24,44$, $p<0,0001$, взаємодія між впливом личинкової щільності та статтю складала: $F(5, 1779)=3,3$, $p=0,006$, в той час вплив статі демонстрував межове значення: $F(1, 1779)=4,4$, $p=0,036$. Було виявлено, що максимальна тривалість життя у самців значно збільшена в групах ВЩ1-3, тоді як максимальна тривалість життя у самок була збільшена у всіх групах HD порівняно з групою НЩ. Результати двофакторного дисперсійного аналізу ANOVA для максимальної тривалості життя були такими: вплив високої личинкової щільності: $F(5,168)=31,25$, $p<0,0001$; стать: $F(1,168)=6.65$, $p = 0,01$; взаємодія: $F(5, 168)=11,07$, $p<0,0001$.

Криві виживання демонструють найбільшу тривалість життя в групах особин ВЩ1 та ВЩ2 як для самців, так і для самок дрозофіл (рис.5.4 та 5.5).

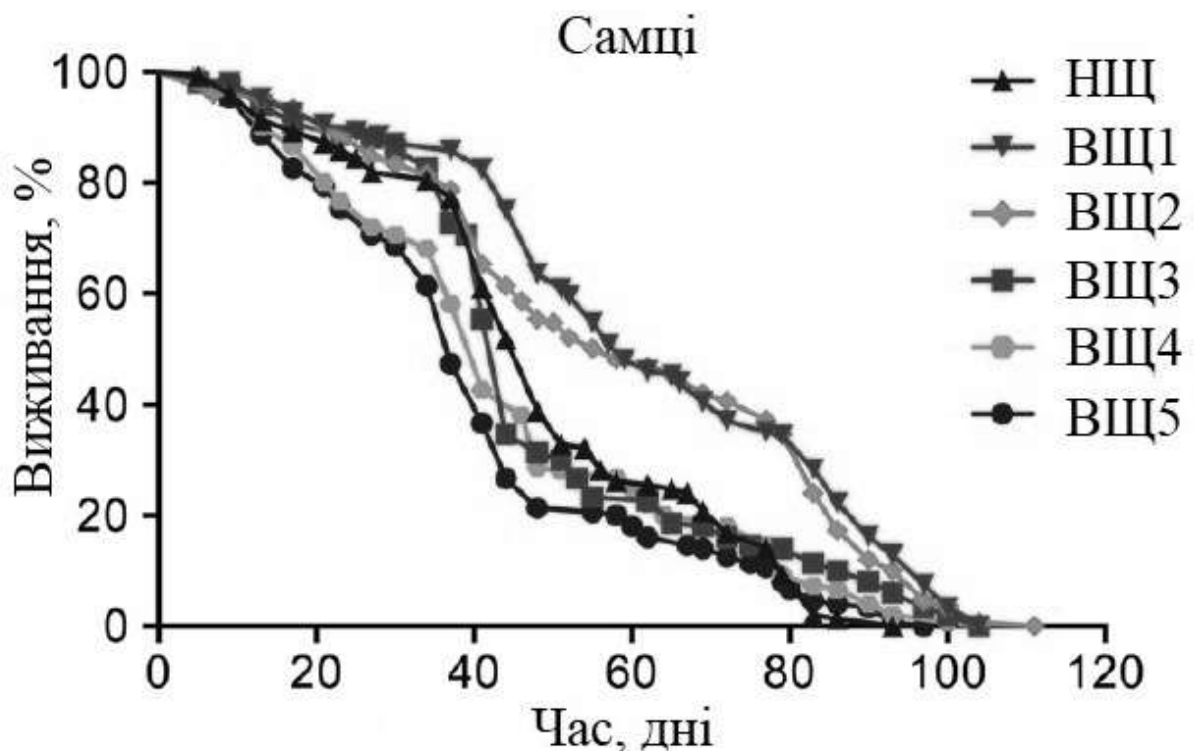


Рис. 5.4. Криві виживаності самців *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної щільності популяції (НЩ) та високої щільності популяції (ВЩ1-5), визначення груп див. у тексті

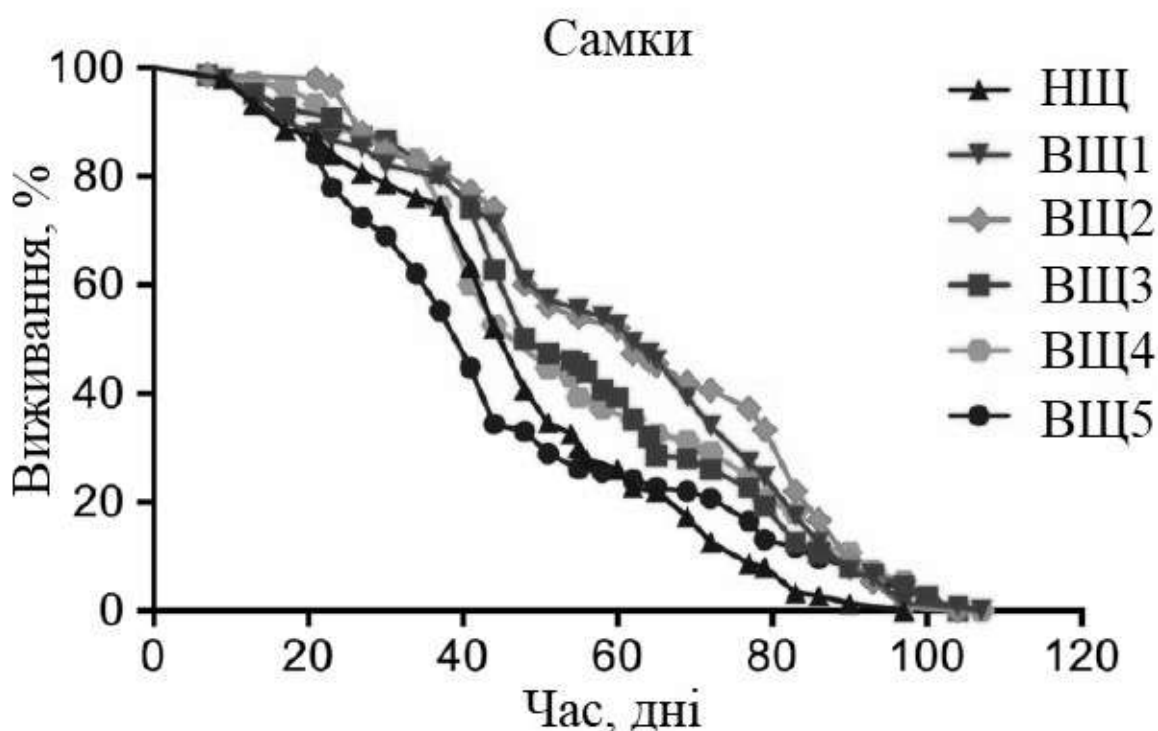


Рис. 5.5. Криві виживаності самок *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної щільності популяції (НЩ) та високої щільності популяції (ВЩ1-5), визначення груп див. у тексті

5.3. Залежність репродуктивної активності самок від щільності популяції на личинковій стадії їхнього розвитку

Репродуктивна активність самок представлена рівнем фекандильності, тобто середньої кількості відкладених самкою за добу. Цей показник мав тенденцію до зниження з кожним наступним днем вилуплення, що співпадає з тривалістю розвитку у груп ВЩ1-ВЩ5 (однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA: $F(5,134)=6.34$, $p<0.0001$). Рівень фекандильності групи НЩ (контроль) дорівнював $11,8 \pm 2,3$ і приблизно такі самі показники (9-12) ми можемо спостерігати для груп ВЩ2 та ВЩ3 (рис. 5.6). Найбільший показник середньої фертильності ми маємо у групі ВЩ1. Водночас, суттєве зменшення фертильності виявлено у варіантах ВЩ4 і ВЩ5.

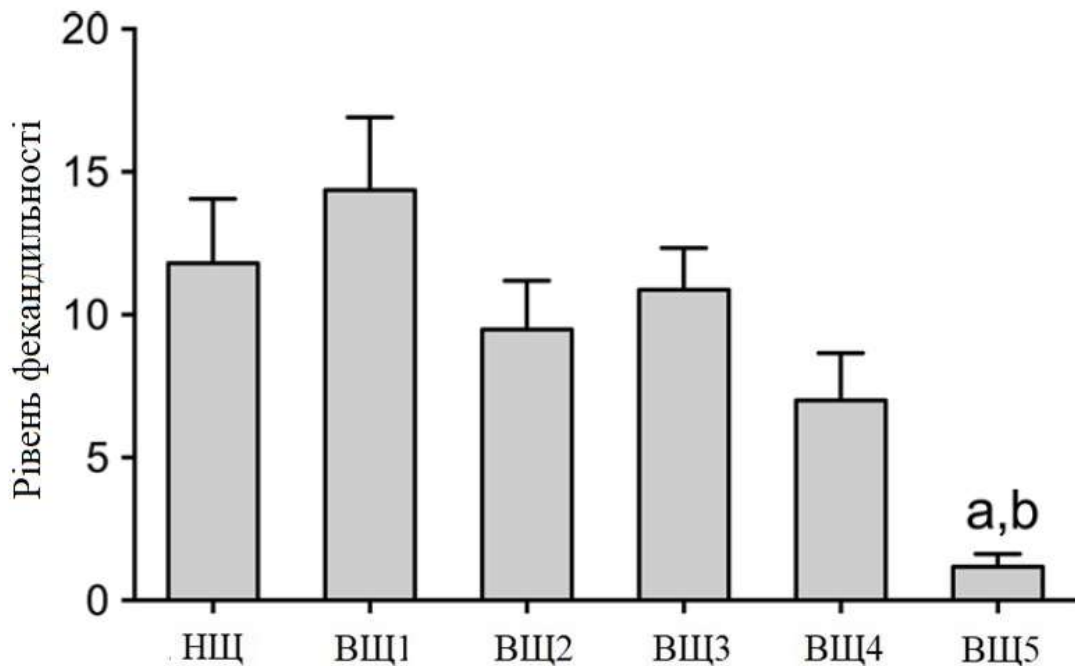


Рис. 5.6. Рівень фекандильності самок *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної щільності популяції (НЩ) та високої щільності популяції (ВЩ1-5).

Примітка: а – $p < 0,01$ в порівнянні з контрольною групою НЩ (Dunn's multiple comparison test); b – $p < 0,01$ в порівнянні з групою ВЩ1 (Dunn's multiple comparison test)

5.4. Визначення рівня експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo* у самців і самок імаго, розвиток яких проходив за умов різних щільностей популяції личинок

Було визначено рівень відносної експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*, які згідно літературних даних показали істотний вплив на регуляцію тривалості життя та довголіття у плодової мушки та інших модельних об'єктах. Детальний опис цих генів та їх функцій представлений в таблиці 4.2.

Аналіз відносного рівня експресії обраних генів проводився для встановлення взаємозв'язку між ефектом впливу високої личинкової

щільності на показники життєздатності дрозофіл та довготривалими змінами в експресії генів.

Отримані результати аналізу відносного рівня експресії гена *InR* показали різний вплив личинкової щільності на самців і самок (рис. 5.7).

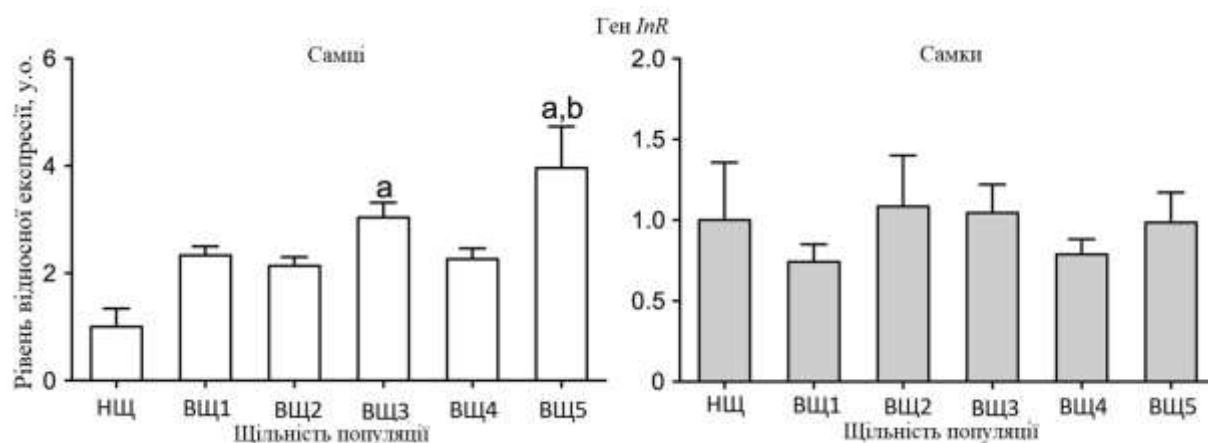


Рис. 5.7. Рівень відносної експресії гена *InR* самців і самок імаго *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної (НЩ, контрольна група) та високої щільності (ВЩ1-ВЩ5) популяції. Представлено відношення рівня експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії у контрольній групі НЩ.

Примітка: a – $p < 0,05$ в порівнянні з контрольною групою НЩ (Tukey HSD апостеріорний тест); b – $p < 0,05$ в порівнянні з групою ВЩ1 (Tukey HSD апостеріорний тест)

Дисперсійний аналіз (табл. 5.2) не виявив статистично достовірної зміни рівня експресії гена *InR* у самок, тоді як у самців такі зміни були зафіксовані. Згідно апостеріорного тесту попарних порівнянь рівень відносної експресії гена статистично достовірно підвищився в групах ВЩ3 у 3,02 ($\pm 0,33$) рази ($p < 0,05$) та ВЩ5 3,97 ($\pm 0,94$) рази ($p < 0,01$) у порівнянні з контрольною групою НЩ. Також спостерігалось підвищення у зразку ВЩ5 при порівнянні з групою НЩ1.

Таблиця 5.2

Показники статистичної значущості впливу личинкової щільності на експресію генів у самців і самок імаго *Drosophila melanogaster* відповідно до one-way ANOVA тесту

| Назва гена | Самці | | Самиці | |
|--------------|-------|---------|--------|---------|
| | F | p-level | F | p-level |
| <i>InR</i> | 6.65 | 0.001 | 0.38 | 0.85 |
| <i>Hsp70</i> | 3.60 | 0.02 | 0.18 | 0.97 |
| <i>Sirt1</i> | 11.93 | <0.001 | 1.42 | 0.26 |
| <i>mTor</i> | 21.20 | <0.001 | 2.47 | 0.07 |
| <i>foxo</i> | 6.05 | 0.002 | 0.72 | 0.61 |

Результати аналізу відносного рівня експресії гена *Hsp70* демонструють наявність статистично значущої зміни у самців всіх досліджуваних груп та відсутність значущих змін у самок (рис. 5.8).

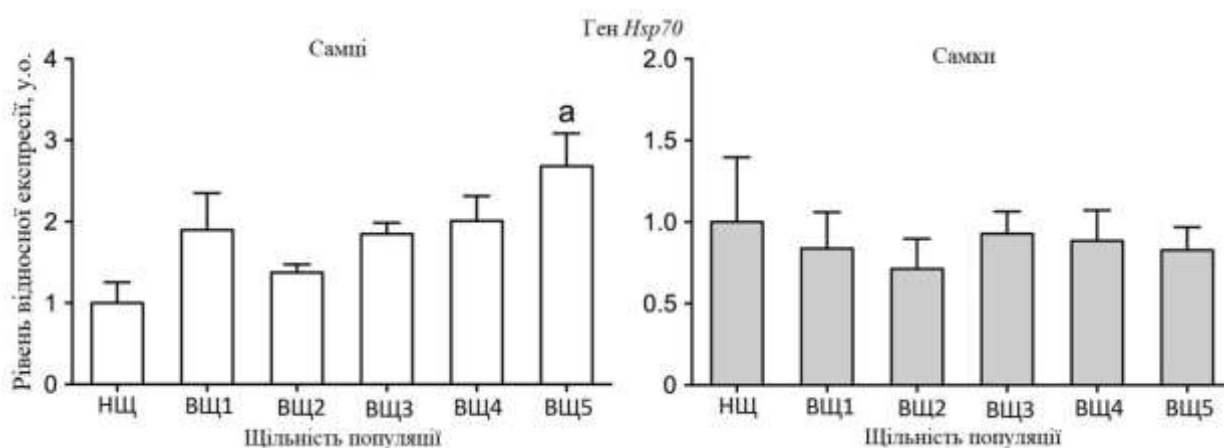


Рис. 5.8. Рівень відносної експресії гена *Hsp70* самців і самок *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної (НЦ, контрольна група) та високої щільності (ВЦ1-ВЦ5) популяції. Представлено відношення рівня експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії у контрольній групі НЦ.

Примітка: a – $p < 0,05$ в порівнянні з контрольною групою НЩ (Tukey HSD апостеріорний тест); b – $p < 0,05$ в порівнянні з групою ВЩ1 (Tukey HSD апостеріорний тест)

У самців згідно дисперсійного тесту ANOVA зміна рівня експресії гена *Hsp70* була статистично достовірною (табл. 5.2). У попарному порівнянні з контрольною групою НЩ зафіксовано достовірне підвищення рівня у групі ВЩ5 в $2,7 (\pm 0,45)$ рази ($p = 0,01$).

Результати аналізу відносного рівня експресії гена *Sirt1* демонструють наявність статистично значущої зміни у самців всіх досліджуваних груп та відсутність значущих змін у самок (рис. 5.9).

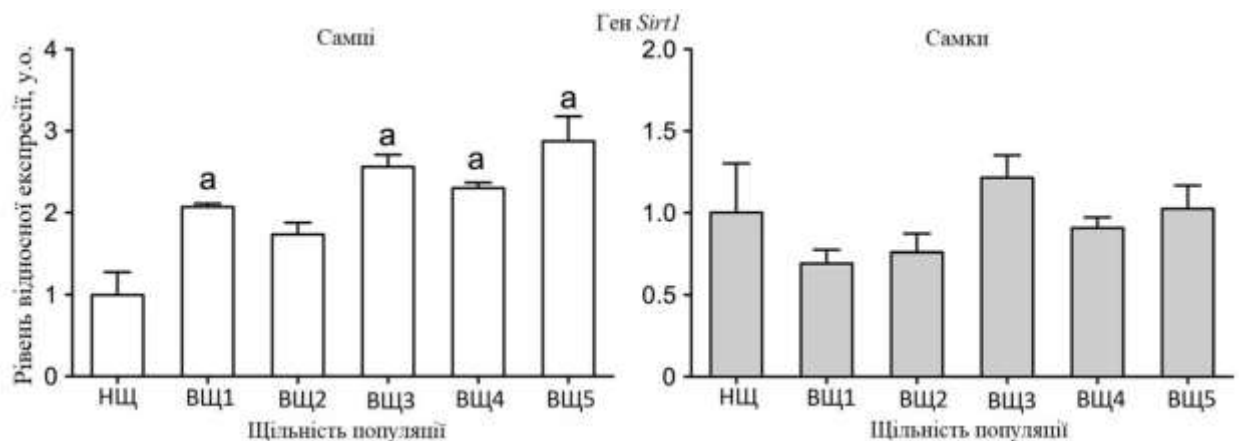


Рис. 5.9. Рівень відносної експресії гена *Sirt1* самців і самок *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної (НЩ, контрольна група) та високої щільності (ВЩ1-ВЩ5) популяції. Представлено відношення рівня експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії у контрольній групі НЩ.

Примітка: a – $p < 0,05$ в порівнянні з контрольною групою НЩ (Tukey HSD апостеріорний тест); b – $p < 0,05$ в порівнянні з групою ВЩ1 (Tukey HSD апостеріорний тест)

У самців згідно дисперсійного тесту ANOVA підвищення рівня експресії гена *Sirt1* було статистично достовірним (табл. 5.2). Згідно

апостеріорного тесту попарних порівнянь рівень відносної експресії гена статистично достовірно підвищився в групах ВЩ1 у 2,06 ($\pm 0,05$) рази ($p=0,01$), ВЩ3 2,56 ($\pm 0,17$) рази ($p<0,001$), ВЩ4 2,3 ($\pm 0,07$) рази ($p<0,01$) та ВЩ5 2,9 ($\pm 0,35$) рази ($p<0,001$) у порівнянні з контрольною групою НЩ.

Отримані результати аналізу відносного рівня експресії гена *mTor* показали різний вплив личинкової щільності на самців і самок (рис. 5.10).

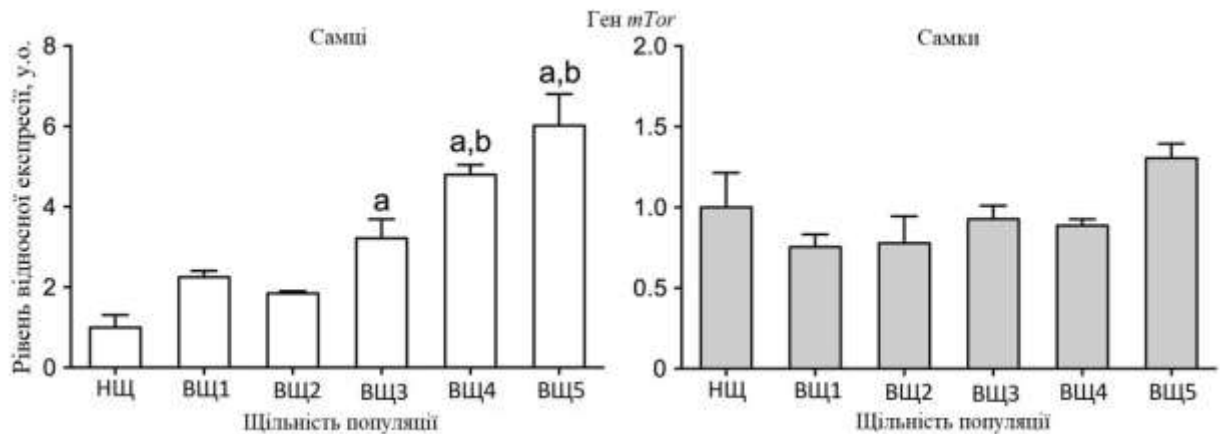


Рис. 5.10. Рівень відносної експресії гена *mTor* самців і самок *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної (НЩ, контрольна група) та високої щільності (ВЩ1-ВЩ5) популяції. Представлено відношення рівня експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії у контрольній групі НЩ.

Примітка: а – $p<0,05$ в порівнянні з контрольною групою НЩ (Tukey HSD апостеріорний тест); b – $p<0,05$ в порівнянні з групою ВЩ1 (Tukey HSD апостеріорний тест)

Дисперсійний аналіз (табл. 5.2) не виявив статистично достовірної зміни рівня експресії гена *mTor* у самок, тоді як у самців такі зміни були зафіксовані. Згідно апостеріорного тесту попарних порівнянь рівень відносної експресії гена статистично достовірно підвищився в групах ВЩ3 у 3,2 ($\pm 0,56$) рази $p=0,01$, ВЩ4 4,8 ($\pm 0,29$) рази ($p<0,001$) та ВЩ5 6,04 ($\pm 0,9$) рази ($p<0,001$) у порівнянні з контрольною групою НЩ. Також

спостерігалось підвищення у зразку ВЩ4 та ВЩ5 у порівнянні з групою НЩ1.

Результати аналізу відносного рівня експресії гена *foxo* демонструють відсутність статистично значущої зміни у самок всіх досліджуваних груп та її наявність у самців (рис. 5. 11).

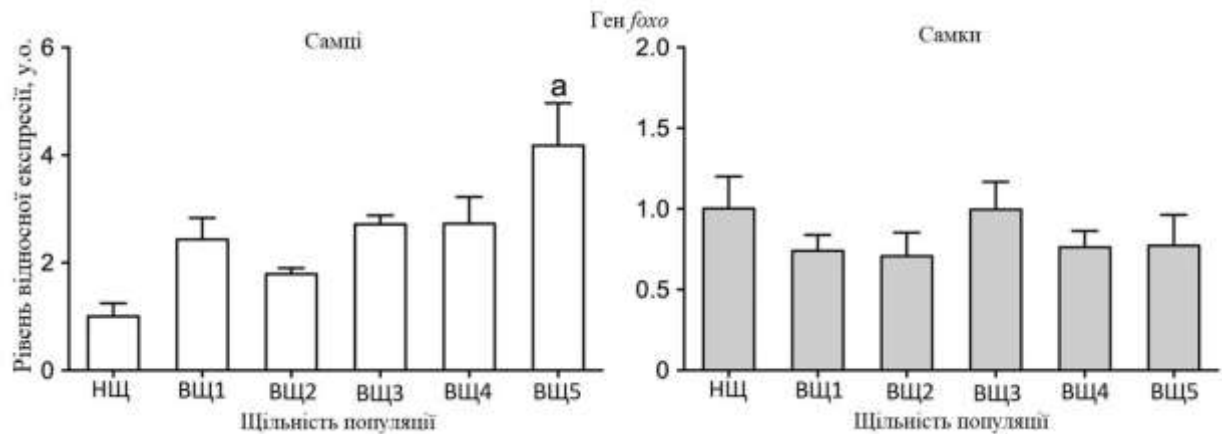


Рис. 5.11. Рівень відносної експресії гена *foxo* самців і самок *D. melanogaster*, личинковий розвиток яких проходив за умов нормальної (НЩ, контрольна група) та високої щільності (ВЩ1-ВЩ5) популяції. Представлено відношення рівня експресії, нормалізованого до рівня експресії референсного гена *GapDH2*, до рівня експресії у контрольній групі НЩ.

Примітка: a – $p < 0,05$ в порівнянні з контрольною групою НЩ (Tukey HSD апостеріорний тест); b – $p < 0,05$ в порівнянні з групою ВЩ1 (Tukey HSD апостеріорний тест)

Результати аналізу відносного рівня експресії гена *foxo* демонструють відсутність статистично значущої зміни у самок всіх досліджуваних груп. У самців згідно дисперсійного тесту ANOVA зміна рівня експресії була статистично достовірною (табл. 5.2). У попарному порівнянні з контрольною групою зафіксовано достовірне підвищення рівня 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 час як самці продемонстрували зміну рівня експресії генів *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo* у відповідь на вплив високої щільності личинкової популяції. Лише для гена *Hsp70* вплив досліджуваного ефекту мав межовий характер, а саме: показник статистичної значущості результату для цього гена складав $p=0.02$ (табл. 5.2), а межа статистичної достовірності складала $p<0.05$ в нашому дослідженні.

Основні результати розділу були опубліковані:

1. **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.
2. Lushchak OV, **Karaman 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. (Scopus/WoS. **Q1**)
3. **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.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Результати, отримані в експерименті з впливу рН поживного середовища на тривалість розвитку та життя дрозозфіл, продемонстрували, що найшвидший розвиток і найбільша виживаність була в групі особин, розвиток яких проходив за рН 5. Це могло бути пов'язане як з впливом рН на мікробне заселення поживного середовища, яке асоційоване з тривалістю життя, так із смаковими якостями поживного середовища, модульоване рівнем рН.

Харчове середовище відіграє важливу роль у формуванні мікробіому дрозозфіли, оскільки підтримання коменсальних бактерій кишківника дрозозфіл, залежить від їх постійного надходження з раціону [140]. Так, продемонстровано, що протеобактерії, а в першу чергу *Acetobacter*, домінують в кислому раціоні, а фімікути виявляються більш поширеними на середовищі рН 9. В кислому раціоні переважали *Enterococcus* і *Lactobacillus*, тоді як у їжі з рН 7 або 9 були переважно *Bacillus* [141]. Також в цьому дослідженні було продемонстровано, що кисла дієта підвищувала смакові реакції дрозозфіл, споживання їжі та збільшувала виживання порівняно з мухами, які харчувались за нейтральною чи лужною рН [141]. Можна припустити, що високий рН їжі може сприяти дисбактеріозу, збільшуючи присутність патогенних бактерій в порівнянні з коменсальними бактеріями, що врешті-решт змінює гомеостаз кишечника та погіршує здоров'я. Враховуючи велику кількість кислот у харчовому субстраті *D. melanogaster* за природних умов та потенційну користь мікробів, що виробляють кислоти, для здоров'я та розвитку мухи віддавали перевагу слабокислому раціону. Також, рН є важливим модулятором смакової реакції на їжу, і, що збільшення тривалості життя є на кислих дієтах, є результатом підвищення смакових якостей та прийому їжі.

Отримані результати суперечать концепції подовження тривалості життя при уповільненні розвитку. У кислому середовищі розвиток дрозозфіл

відбувався помітно швидше, проте тривалість життя не скорочувалася, а навпаки, значно збільшувалася. Це можна пояснити тим, що кисле середовище є оптимальним для розвитку дрозофіл, відповідаючи природним умовам їх розвитку. Тому, в цих умовах розвиток мух відбувається найбільш повноцінно і тривалість життя таких особин найвища. Враховуючи фундаментальний характер впливу харчування на життєздатність тварин, наші результати підкреслюють важливість врахування основних властивостей їжі в дослідженнях дрозофіли.

Результати дослідження впливу концентрації кисню в навколишньому середовищі на преімагінальній стадії розвитку показали, що тривалість розвитку дрозофіл збільшувалася в середньому на одну добу в умовах гіпоксії. Це можна пояснити тим, що дефіцит кисню уповільнює клітинне дихання та синтез енергії, необхідної для росту мушок. Вплив гіпоксії в даному випадку аналогічний зниженню температури навколишнього середовища, що також призводить до уповільнення метаболізму.

В умовах гіпероксії тривалість розвитку дрозофіл не змінювалася. Імовірно, за високої концентрації кисню в навколишньому середовищі не відбувається збільшення клітинного дихання, оскільки воно вже є максимальним при диханні атмосферним повітрям, або відображається токсична дія високої концентрації O_2 , що викликає оксидативне пошкодження мітохондріальних ферментів.

Відомо, що кисень відіграє головну роль у виробництві АТФ у аеробних організмів, окислюючи такі субстрати, як глюкоза і жирні кислоти. В той же час, в процесі тканинного дихання в мітохондріях, як побічний продукт, утворюються активні форми кисню, які можуть індукувати кумулятивні окислювальні пошкодження біомолекул. Вільно-радикальна теорія старіння постулює вирішальну роль цих процесів у розвитку вікових змін організму. Низкою експериментальних робіт на *Drosophila* було показано, що високий вміст кисню в середовищі істотно скорочує тривалість життя імаго [142, 143]. Виходячи з цієї концепції, гіпоксія повинна

продовжувати життя. Однак, результати нашого дослідження впливу гіпоксії на тривалість життя дрозофіл не продемонстрували збільшення середньої тривалості життя як для самців, так і для самок. Подібний результат був отриманий пізніше в дослідженні колег, які показали, що самці і самки імаго дрозофіл, які зазнали впливу гіпоксії на личинковій стадії розвитку, демонстрували знижену здатність переносити голодування і знижену тривалість життя [144]. Автори припустили, можливими медіаторами впливу гіпоксії личинок на метаболізм і виживання дорослих особин є зміни в інсуліновому та TOR сигнальних шляхах [144]. Показано, що на розміри імаго впливає рівень кисню в середовищі, де розвиваються личинки. Так, розвиток за умов гіпоксії призводить до зменшення розміру дорослої особини, зменшення середнього діаметру епітеліальних клітин черевної порожнини та меншу площу крил [145], а за умови гіпероксії розмір особин дещо збільшується, за умови підвищеної температури навколишнього середовища [146]. Можливо, що ці відмінності в розмірах тіла імаго можуть впливати на швидкість старіння через пов'язані з ними зміни в швидкості метаболізму. Рівень атмосферного кисню також може впливати на концентрацію ферментів антиоксидантного захисту [147] і на гени і ферменти, які беруть участь у відновленні окисного пошкодження. Нарешті, можливо, що окислювальний негативний ефект, пов'язаний з підвищеним вмістом кисню в атмосфері, в якій розвиваються личинки, є кумулятивним і спричиняє вплив на стадії імаго, зменшуючи тривалість життя дорослих особин. Хоча більшість тканин дорослих мух розвиваються з імагінальних дисків, деякі тканини формуються безпосередньо з ювенільних клітин [148], що дозволяє передбачити наявність механізмів передачі окисного пошкодження від личинок до дорослих особин дрозофіл.

Отримані дані дозволяють зробити висновок, що концентрація кисню в навколишньому середовищі на стадії розвитку дрозофіл достовірно впливає на їх тривалість життя на стадії імаго, що можна пояснити епігенетичними механізмами. Гіпероксія на стадії розвитку несприятливо впливає на

тривалість життя дрозофіл, мабуть, внаслідок шкідливої дії вільно-радикальних процесів та нездатністю клітини успішно активувати свої антиоксидантні механізми для запобігання або відновлення пошкоджень, що виникли в результаті [149]. Виявлено міжстатеві відмінності ефектів гіпоксії на стадії розвитку. Якщо у самок вона призводить тільки до негативних ефектів, то у самців розвиток в умовах гіпоксії може призводити до продовження життя, можливо за рахунок явища гормезису.

Результат дослідження впливу температури навколишнього середовища на тривалість розвитку ілюструє значне уповільнення розвитку при зниженні температури від 27,5 °С до 20 °С. Тобто найшвидше розвивались особини при 20 °С близько 9 діб та найдовше за 20 °С – 15 діб. Також спостерігалась тенденція до збільшення тривалості розвитку при 30 °С. Це явище можна пояснити добре відомою температурною залежністю активності ферментів, яка має дзвоноподібний профіль. Максимальна активність ключових ферментів, що визначають швидкість росту личинок дрозофіл, ймовірно, спостерігається в діапазоні температур 27,0–29,0 °С. Відхилення температури від цього оптимального діапазону в обидві сторони призводить до зниження активності ферментів і, відповідно, до збільшення часу розвитку дрозофіл. Також ми спостерігали збільшення ваги в групі особин самців і самок, розвиток яких проходив за 22,5 °С з подальшим її зменшенням як в стороні збільшення температури, так і в сторону зменшення. Найдовше виживали самці і самки, розвиток яких проходив за температури 22,5 °С.

Loeb і Northrop першими продемонстрували, що тривалість життя плодової мушки негативно корелює з температурою [38]. У дослідженнях Lints 1971 року було відмічено негативну кореляцію між температурою розвитку та розміром тіла [27], що також було підтверджено нашим дослідженням. Низькі температури можуть впливати на різноманітні біологічні процеси у *Drosophila*, зокрема, на метаболізм і розвиток мух. Подальші дослідження продемонстрували, що *D. melanogaster* живе довше за

низької температури [150]. Ці результати були підтверджені Leiser та ін., які дійшли висновку, що температура має значний вплив на тривалість життя [151] і в нашому експерименті було отримано подібний результат. Попередні дослідження припускали, що скорочення тривалості життя мух, вирощених при вищих температурах, може бути пов'язане з їхнім малим розміром тіла; і навпаки, велика маса тіла корелює зі збільшенням тривалості життя [152, 153], але це вже було спростовано подальшими дослідженнями. Варто відмітити, що Zwaan та ін. припускають, що розмір крил є кращим показником розміру тіла імаго, ніж маса тіла, оскільки більша варіабельність спостерігалася у масі тіла самок, що пов'язано з виробництвом яєць [150]. Цікаво, що в дослідженні Молюї та ін. було показано, що плодові мушки досягали найбільшої маси тіла за оптимальної температури 25°C, але збільшення тривалості життя було зареєстровано при вирощуванні їх за 20°C [154]. Що також було відзначено в попередніх дослідженнях, а саме відсутність позитивної кореляції між тривалістю життя і розміром тіла в різних температурних групах [150], що вступає в протиріччя з нашими результатами. Отримані результати в даній роботі свідчать про достовірний вплив температури на розвиток та життєздатність дрозофіл. При цьому спостерігається фізіологічний оптимум температури, за якого життєздатність є максимальною. Імовірно, що за оптимальної температури розвиток дрозофіл відбувається найбільш повноцінно, що забезпечує їхню найвищу життєздатність. Серед механізмів, які можуть сприяти подовженню тривалості життя при личинковому розвитку за низьких температур, може бути синтез білків теплового шоку [76] та антиоксидантних ферментів [155]; зміна розмірів тіла за рахунок модифікації темпу розвитку [156]; варіація кількості та розмірів субклітинних органел [70], а також сповільнення метаболічних процесів та зменшення енергетичних витрат [157]. Зміни, які відбуваються на етапах личинкового розвитку, можуть призвести до тривалого підвищення стійкості дорослих особин до впливу стресових чинників і, таким чином, впливати на їхню тривалість життя.

Загалом вважається, що низька температура знижує швидкість метаболізму, сповільнюючи таким чином швидкість пошкодження макромолекул (нуклеїнових кислот, білків, ліпідів) у клітинах, спричиненого активними формами кисню. Нещодавно проведені дослідження показали, що механізм подовження тривалості життя за допомогою низьких температур є активним генетичним процесом, а не пасивним термодинамічним, і залежить від генотипу. Крім того, ймовірний механізм подовження тривалості життя за допомогою низьких температур може працювати через молекулярні шляхи, що не перекриваються або частково перекриваються [158]. Варто відмітити, що у дрозофіли короточасний вплив низьких температур призводить до довготривалого збільшення тривалості життя та стресостійкості, що свідчить про те, що тривалість життя контролюється не короточасним зниженням метаболізму, а скоріше довготривалою фізіологічною адаптацією [159]. У рамках нашого дослідження було проведено аналіз експресії генів, асоційованих з тривалістю життя, і зафіксовано зростання рівня експресії генів *Hsp70*, *InR*, *mTor*, *Sirt1* та *foxo* у самок *Drosophila*, які розвивалися за температури 20°C і 30°C. Встановлено, що підвищення експресії генів *Hsp70*, *InR*, *mTor* та *Sirt1* є статистично значущим у порівнянні з контрольною групою (розвиток за температури 25 °C), в той час як для гена *foxo* статистично значущі відмінності не були зареєстровані, незважаючи на межові значення статистичних показників (значення *p* на рівні 0,06 – 0,08), що може свідчити про недостатній обсяг вибірки для адекватного статистичного аналізу. Підвищення експресії зазначених генів за критичних температур, які були задіяні в нашому експерименті, вказує на генералізовану неспецифічну реакцію на стрес, яка не була пов'язаною з підвищенням тривалості життя. Також в нашому дослідженні була виявлена статеві відмінність у профілях експресії генів, а саме наявність достовірної зміни експресії аналізованих генів у самок і відсутність такої у самців імаго *D. melanogaster*, що вступає в протиріччя з отриманими нами результатами з впливу личинкового перенесення на експресію генів. Загалом вважається, що

самки виявляють вищий рівень стійкості до різних видів стресу порівняно із самцями [160]. Зокрема, кілька досліджень зафіксували кращу стійкість самок до голодування [161, 162]. Однак, щодо стійкості до окислювального стресу отримані дещо суперечливі результати. Хоча деякі дослідження вказують на вищий рівень стійкості самок до окислювального стресу [163], інші, проведені на кількох штаммах, не виявили суттєвих розбіжностей [164]. Часткове підвищення стресостійкості у самок порівняно із самцями може бути пов'язане з їхнім більшим розміром (і більшою кількістю клітин), що потенційно забезпечує більші запаси поживних речовин. Крім того, ця різниця може бути, принаймні частково, пов'язана з більшою кількістю копій генів, розташованих на X-хромосомі, у самок порівняно із самцями [160].

Основні результати нашого дослідження з впливу високої личинкової щільності розвитку на показники життєздатності та тривалість життя продемонстрували продовження життя як у самців, так і у самок імаго мух, які вилупилися перші два дні (групи ВЦ1 і ВЦ2). В цілому, у групі особин ВЦ подовження періоду розвитку було пов'язане зі зменшенням маси тіла і плодючості самок, а також зі скороченням тривалості життя. Можливим поясненням подібної реакції може бути обмежена доступність поживного середовища через конкуренцію між личинками, підвищену концентрацію токсичних продуктів метаболізму в середовищі, дефіцит місця «залагання» або комплексний вплив всіх цих факторів, які є неминучим наслідком личинкового перенаселення [74]. Враховуючи все вищеописане, можна припустити, що особини, які вилупились перші два дні (ВЦ1 і ВЦ2) мали суттєву перевагу у порівнянні з тими мухами, які вилупились пізніше (ВЦ3, ВЦ4 та ВЦ5), оскільки вони зазнали мінімального впливу негативних наслідків перенаселення. Також можна припустити, що імовірним поясненням наших результатів може бути вибіркова переімагільна смертність або дія природного добору особин, які були вирощені в умовах перенаселеності. Це, однак, здається малоімовірним, оскільки була збільшена не тільки середня, але й максимальна тривалість життя в групах

ВЩ порівняно з групою НЩ. Очевидно, що навіть якщо найслабші мухи гинули через несприятливі події, пов'язані з личинковим перенаселенням, це вплинуло б лише на середню, але не на максимальну тривалість життя. Також в нашому дослідженні було виявлено гендерну відмінність у зв'язку між швидкістю розвитку та максимальною тривалістю життя у мух, а саме: негативний зв'язок у самців і відсутність зв'язку у самок. Ці відмінності, ймовірно, можна пояснити зниженням репродуктивної активності у самок, вирощених в умовах ВЩ, і перерозподілом ресурсів з репродуктивних процесів на соматичне підтримання та виживання, оскільки продукування гамет це затратний процес, як енергетично, так і ресурсно [165]. Оскільки вважається, що організм може мати обмежену кількість ресурсів; таким чином, особини повинні розподіляти ці ресурси між еволюційно важливими компонентами пристосованості, такими як ріст, соматичне підтримання, розмноження або виживання [166]. Дійсно, максимальна тривалість життя самок була достовірно вищою в усіх групах ВЩ, ніж у групі НЩ, тоді як репродуктивна активність самок (рівень фекандильності) була статистично достовірно знижена лише в групі ВЩ5 порівняно з групою НЩ, хоча для всіх інших груп спостерігалась тенденція до зниження рівня. Таким чином, подовження тривалості життя самок, вирощених в умовах ВЩ, можна пояснити їхньою зниженою репродуктивною активністю. На теперішній момент факт впливу розмноження на тривалість життя, а саме тенденцію до скорочення тривалості життя, ґрунтовно досліджений [167–169]. Вперше існування компромісу між розмноженням і виживанням, так званої «вартості розмноження», було експериментально продемонстровано еволюційним генетиком Джоном Мейнардом Смітом 1958 році, який показав, що стерильні мутанти плодової мушки *D. subobscura* живуть значно довше, ніж фертильні мухи дикого типу [170]. Хоча для мишей не було показано впливу репродукції на тривалість життя, як самці так і самки продемонстрували відсутність суттєвої різниці в тривалості життя між незайманими і спареними особинами [171]. Хоча вважається, що негативний вплив розмноження на

тривалість життя є повсюдним, деякі дослідження ставлять під сумнів це припущення. У *D. melanogaster*, зібраної в дикій природі, спарені самки жили довше, ніж незаймані самки в лабораторії [172], а спарені самці *D. virilis* жили довше, ніж незаймані [173]. Більше того, матки комах, які постійно розмножуються, живуть довше, ніж їхні стерильні робочі особини [174]. З чого можна зробити висновок, що загальний вплив розмноження на тривалість життя є більш складним, ніж часто припускають. Також необхідно зауважити, що викликані личинковим перенаселенням зміни в експресії досліджуваних генів, асоційованих довголіттям та тривалістю життя, були менш вираженими у самок, ніж у самців *D. melanogaster*, хоча максимальна тривалість життя була збільшеною. Це може бути пов'язано методологічним обмеженням цього дослідження, оскільки плодючість самок була визначена лише один раз у віці 10-14 днів після вилуплення, тоді як повторні вимірювання дали б більше інформації про вплив репродуктивної активності на виживання мух.

Результати, отримані в нашому дослідженні, подібні до тих, що спостерігалися в дослідженні Economos та Lints [156], але з певними відмінностями. Змінюючи кількість дріжджів, доданих до середовища, вони виявили, що тривалість життя залежить від швидкості розвитку двофазним чином у самців. Швидкість розвитку в даному дослідженні визначалась як співвідношення розміру тіла імаго (маса тіла) і тривалості розвитку від запліднення до вилуплення дорослої особини. У всьому діапазоні швидкостей росту, охопленому цим дослідженням, отримана залежність мала параболічну форму з максимумом приблизно при 55-60 мкг/добу. Подібний зв'язок між швидкістю росту і тривалістю життя спостерігався у зміні щільності личинок при постійній кількості доданих дріжджів. У цьому дослідженні використовували обидва підходи, варіації швидкості росту були зумовлені протилежними варіаціями обох компонентів швидкості росту, тобто часу розвитку та розміру тіла. Розвиток у поживному середовищі з різною кількістю доданих дріжджів при постійній личинковій щільності

призводив до подібної двофазної залежності між швидкістю росту і тривалістю життя, хоча час розвитку не змінювався. Автори дійшли висновку, що їхні результати не підтверджують простого причинно-наслідкового зв'язку між швидкістю розвитку і тривалістю життя дрозофіли [156].

Подібний двофазний зв'язок був також виявлений між швидкістю розвитку і тривалістю життя дорослих особин, коли в якості модулюючого фактору виступала варіація температури розвитку [31]. При дослідженні *D. melanogaster* було виявлено фазу плато в діапазоні температур від 16 °C до 29°C, коли тривалість життя як самців, так і самок мух майже не залежала від температури розвитку. Нижче і вище цього діапазону тривалість життя різко скорочувалася, а розвиток був неможливим за температури нижче 12 °C і вище 32,5 °C. З чого можна припустити, що фаза плато відповідала «фізіологічному» діапазону температур розвитку, за межами якого розвиток, вірогідно, порушувався. Оскільки швидкість росту в цьому діапазоні змінювалася вдвічі, а тривалість життя залишалася практично незмінною, автори дійшли висновку, що тривалість життя мух не визначається лише швидкістю росту як такою, а негативний зв'язок між швидкістю росту і тривалістю життя, ймовірно, має місце лише у вузькому діапазоні умов навколишнього середовища.

Тип залежності «доза-відповідь», отриманий у нашому дослідженні, ймовірно, можна пояснити накладанням двох процесів – одного, що сприяє, а іншого, що пригнічує довголіття. Такий тип взаємозалежності характерний для гормезисних дозових реакцій. Гормезис – це явище, коли стресор, який, як відомо, є токсичним у високих дозах, викликає стимулюючі реакції в менших дозах. Це, як правило, призводить до двофазної залежності «доза-відповідь», коли реакція змінюється від стимулюючої до інгібуючої [175, 176]. Слід розуміти, що гормезис не є результатом відбору слабких особин з популяції, що зазнала стресу, з подальшим збільшенням виживання тих особин, які пережили стрес завдяки внутрішній більшій стійкості. Натомість

гормезис включає активацію адаптивних механізмів, які підвищують життєздатність і стійкість усієї популяції до подальших стресових умов [108, 177]. Ще в 1917 році Дейві було продемонстровано, що гормезис впливає на збільшення тривалості життя [178]. В дослідженні було показано, що низькі дози іонізуючого випромінювання збільшували тривалість життя хрущака плутаника – *Tribulium confusion*. Дослідження Davey були визначними для своєї епохи, оскільки включали ключові концепції відтворюваності досліджень, розміру вибірки, змінних, що впливають на модельний об'єкт, діапазону доз, інтервалів і кількості доз, а також статистичного аналізу [178, 179]. Висновки Davey були відтворені Cork з використанням того ж самого модельного організму, але з джерелом гамма-променів, а не рентгенівського випромінювання [180]. Подібне збільшення тривалості життя підтверджено на різних моделях комах під впливом іонізуючого випромінювання, що продемонструвало сильну узгодженість з гормезисною дозовою реакцією [181, 182]. Гормезис зазвичай стимулює відповідь на 20-60 % порівняно з контролем [183, 184]. Що слугує підтвердженням результатів, отриманих в нашому дослідженні, оскільки було продемонстровано підвищення середньої тривалості життя як для самців, так і для самок імаго *D. melanogaster* більше ніж на 20 %, в групах ВЩ1 та ВЩ2. Індукція гормезисоподібної реакції була запропонована як правдоподібне пояснення сприятливого впливу легкого скупчення личинок у дрозофіли [74]. У цьому відношенні скупченість личинок можна розглядати як умову, що індукує ефект загартовування і генерує перехресну толерантність до різних стресів у дорослому житті [74, 76, 185]. Типи ефектів, що спостерігаються в нашому дослідженні, подібні до тих, про які повідомлялося в дослідженні нематод *C. elegans*, які зазнали теплового шоку різної тривалості на початку свого дорослого життя. Після короткого впливу тепла спостерігаються чіткі ефекти гормезису, а після тривалого – виснаження. Проміжна тривалість призводить до поєднання цих двох ефектів. В останньому випадку криві виживання контрольної та експериментальної популяцій перетинаються [186]. Автори пояснюють

спостережувані ефекти за допомогою моделі дискретної гетерогенності, згідно якої кожна популяція нематод в експерименті є сумішшю підгруп слабких, нормальних і міцних особин; вплив тепла змінює початкове співвідношення черв'яків у підгрупах (розподіл гетерогенності); і ці зміни залежать від тривалості впливу. Іншими словами, вплив тепла не впливає на рівень смертності в підгрупах, але спричиняє перехід особин з однієї підгрупи в іншу. У біологічній інтерпретації цього результату автори припустили, що для подолання стресу *C. elegans* використовують кілька ліній захисту. Увімкнення та вимкнення цих ліній у відповідь на стрес в окремих організмів генерує спектр спостережуваних ефектів виживання на популяційному рівні. Можна припустити, що в нашому дослідженні вплив стресових факторів, пов'язаних із личинковим перенаселенням для груп ВЩ1 та ВЩ2, через індукцію гормезисної відповіді може сприятливо впливати на життєздатність у подальшому житті. Однак, у тих дослідних груп, які вилупились пізніше (групи ВЩ3, ВЩ4 та ВЩ5), вплив несприятливих факторів, включаючи значні обмеження в харчуванні та вплив токсичних відходів, міг накопичуватися, що призвело до нівелювання сприятливих (гормезисних) ефектів. На основі наших результатів можна припустити, що розвиток в умовах перенаселення личинок (якщо воно не надто тривале) може викликати гормезисну реакцію, тим самим збільшуючи тривалість життя.

В нашому дослідженні було продемонстровано межове достовірне підвищення експресії гена *Hsp70* для самців і відсутність достовірної зміни у самок. Наші результати були подібні до тих, які були продемонстровані в роботі інших авторів, які продемонстрували наявність підвищення рівня експресії гена *Hsp70* у личинок, розвиток яких проходив за умов перенаселення і теплового стресу, і відсутність такого ефекту на стадії імаго, що свідчить про те, що *Hsp70* може бути одним з багатьох компонентів стресової відповіді, і, можливі, інші *Hsps* експресуються пізніше в даному сигнальному шляху [76]. Також в іншому дослідженні було

продемонстровано підвищення рівня експресії *Hsp70* у личинок у відповідь на перенаселення, що, ймовірно, є механізмом пом'якшення наслідків стресу, спричиненого скупченістю личинок, що призвело до еволюції толерантності до теплового стресу у самців імаго, але не було пов'язано з експресією гена *Hsp70* на стадії імаго [187]. Відомо, що мутації рецептора тирозинкінази інсуліну/IGF сповільнюють старіння у *D. melanogaster* та *C. elegans* [81], змінюючи стабільність рецептора та подальшу сигналізацію, що часто призводить до компромісів, пов'язаних ростом та розмноженням [84]. В дослідженні Vaiserman та ін. (2014) з впливу обмеженого харчування на личинковій стадії розвитку на тривалість життя та експресію генів було продемонстровано значне підвищення рівня експресії гена *InR* у дорослих самців, тоді як у самок таких змін не спостерігалось [188]. У нашому дослідженні було продемонстровано достовірне збільшення рівня експресії гена *InR* у самців імаго дрозофіл в групах зі зниженою тривалістю життя і відсутність ефекту на аналізований вплив у самок, що може свідчити про неспецифічну реакцію на стрес, в результаті якої пригнічується транскрипційний фактор dFOXO, який відіграє роль головного регулятора експресії наступних генів, що беруть участь у метаболізмі, клітинному циклі, стрес-реакції, контролі тривалості життя та апоптозі [189]. Рівень експресії гена *Sirt1* в нашому дослідженні був статистично достовірно підвищений у самців, в той час як у самок цього не було. Також в іншому дослідженні було продемонстровано, що підвищена експресія гена *Sir2*, який кодує білок SIRT1, подовжує тривалість життя дрозофіли в дозозалежний спосіб. Було показано значне подовження тривалості життя при індукції експресії *dSir2* від 2 до 5 разів. Однак вищі рівні зменшують тривалість життя і можуть індукувати клітинну токсичність [133]. Також було продемонстровано, що дуплікація, яка містить *sir-2.1* – ген *C. elegans*, найбільш гомологічний до дріжджового *SIR2* – збільшує тривалість життя на 50 % [190]. Було продемонстровано, що помірна надекспресія *Sir2* у жировому тілі лише у

імаго може сприяти збільшенню тривалості життя в обох статей приблизно на 13 % [191].

Наші дані щодо аналізу експресії генів також можуть свідчити на користь «гормезисного» пояснення спостережуваних ефектів. Розвиток в умовах скупченості викликав посилену експресію усіх досліджуваних генів у самців, що дозволяє припустити наявність адаптивної епігенетичної відповіді, тобто зміну експресії генів у відповідь на вплив навколишнього середовища без зміни послідовності ДНК [192, 193]. 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.

Експериментальні втручання, спрямовані на подовження життя будуть найбільш ефективними, якщо застосовувати їх на ранніх стадіях розвитку [194, 195]. У нашому дослідженні ми спостерігаємо як епігенетичні зміни, індуковані на преімагінальній стадії розвитку, зберіглися на більш пізніх стадіях онтогенезу. Фактори навколишнього середовища змінили патерни експресії генів таким чином, що кожна зміна епігенетичного стану підтримувала себе навіть після зникнення індуктивного сигналу, і, таким чином, мала довготривалий вплив на фенотип, що можна вважати як програмуванням розвитку [193]. Гендерні відмінності у впливі на рівні експресії генів, зокрема, відсутність спостережуваних ефектів у самок, потребують подальшого вивчення.

Отже, отримані дані суперечать прогнозам теорії розвитку старіння. Дійсно, якби існував причинно-наслідковий зв'язок між часом розвитку і тривалістю життя, то можна було б очікувати, що мухи, які пізніше вилупилися, матимуть довшу тривалість життя в порівнянні з особинами, які вилупились раніше. Однак ми спостерігали протилежну картину. Це протиріччя, ймовірно, можна пояснити або некоректністю теорії старіння, або неадекватністю «класичного» дизайну, використаного для перевірки цієї

теорії, а саме, модуляцією швидкості росту дрозофіли за допомогою стресів навколишнього середовища. Дійсно, в результаті такого експерименту можна отримати два потенційні результати – один, пов'язаний з модуляцією тривалості розвитку як такої, а інший – з впливом стресу. Тому на основі даних, отриманих у таких дослідженнях, не можна зробити точних висновків про причинно-наслідкові зв'язки.

Підсумовуючи результати отримані в нашій роботі ми продемонстрували, 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 (рис. 6.1).



Рис. 6.1. Вплив умов преімагінального розвитку на тривалість життя і рівень експресії генів *D. melanogaster*

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: у 3–4 рази для генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* та у 5–6 разів для генів *mTor* та *foxo*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Murabito JM, Yuan R, Lunetta KL (2012) The Search for Longevity and Healthy Aging Genes: Insights From Epidemiological Studies and Samples of Long-Lived Individuals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67A(5):470–9
2. Tian X, Seluanov A, Gorbunova V (2017) Molecular Mechanisms Determining Lifespan in Short- and Long-Lived Species. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 28(10):722–34
3. Phillippe M, Phillippe SM (2017) Birth and death: Evidence for the same biologic clock. *American Journal of Reproductive Immunology* 77(5)
4. Silva-García CG (2023) Devo-Aging: Intersections Between Development and Aging. *Geroscience* 45(4):2145–59
5. Lints FA (1978) Genetics and Aging. In: *Interdisciplinary Topics in Gerontology*. Basel, N.Y.: Karger p. 14
6. Wells JCK (2017) Worldwide variability in growth and its association with health: Incorporating body composition, developmental plasticity, and intergenerational effects. *American Journal of Human Biology* 29(2)
7. Bateson P (2015) Why are individuals so different from each other? *Heredity (Edinb)* 115(4):285–92
8. Lucas A (1998) Programming by Early Nutrition: An Experimental Approach. *J Nutr* 128(2):401S-406S
9. Feil R, Fraga MF (2012) Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 13(2):97–109
10. Vaiserman A, Koliada A, Lushchak O (2018) Developmental programming of aging trajectory. *Ageing Res Rev* 47:105–22
11. He Y, Jasper H (2015) Studying aging in *Drosophila*. *Methods* 68(1):129–33
12. Crimmins EM (2015) Lifespan and Healthspan: Past, Present, and Promise. *Gerontologist* 55(6):901–11
13. Arias E, Heron M, Xu J (2017) United States Life Tables, 2014. *Natl Vital Stat Rep* 66(4):1–64

14. Kontis V, Bennett JE, Mathers CD, Li G, Foreman K, Ezzati M (2017) Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble. *The Lancet* 389(10076):1323–35
15. Curtin SC, Tejada-Vera B, Bastian BA (2023) Deaths: Leading Causes for 2020. *Natl Vital Stat Rep* 72(13):1–115
16. Vijg J, Le Bourg E (2017) Aging and the Inevitable Limit to Human Life Span. *Gerontology* 63(5):432–4
17. Schaible R, Scheuerlein A, Daňko MJ, Gampe J, Martínez DE, Vaupel JW (2015) Constant mortality and fertility over age in *Hydra*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(51):15701–6
18. Butler PG, Wanamaker AD, Scourse JD, Richardson CA, Reynolds DJ (2013) Variability of marine climate on the North Icelandic Shelf in a 1357-year proxy archive based on growth increments in the bivalve *Arctica islandica*. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 373:141–51
19. Vijg J, Kennedy BK (2016) The Essence of Aging. *Gerontology* 62(4):381–5
20. Helfand SL, Rogina B (2003) From Genes to Aging in *Drosophila*. *Adv Genet* 49:67-109
21. Ogienko AA, Omelina ES, Bylino O V., Batin MA, Georgiev PG, Pindyurin A V (2022) *Drosophila* as a Model Organism to Study Basic Mechanisms of Longevity. *Int J Mol Sci* 23(19):11244
22. Rafi MA, Alavi A (2017) Debate on human aging and lifespan. *BioImpacts* 7(3):135–7
23. Stearns SC (1983) The Influence of Size and Phylogeny on Patterns of Covariation among Life-History Traits in the Mammals. *Oikos* 41(2):173
24. Vachon PJ (2013) Sestier F. Life Expectancy Determination. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 24(3):539–51
25. Davidovic M, Sevo G, Svorcan P, Milosevic DP, Despotovic N, Erceg P (2010) Old age as a privilege of the “selfish ones”. *Aging Dis* 1(2):139–46
26. Jin K (2010) Modern Biological Theories of Aging. *Aging Dis* 1(2):72–4

27. Lints FA, Lints CV (1971) Influence of preimaginal environment on fecundity and ageing in *Drosophila melanogaster* hybrids—III. Developmental speed and life-span. *Exp Gerontol* 6(6):427–45
28. Soliman MH, Lints FA (1982) Influence of preimaginal constant and alternating temperatures on growth rate and longevity of adults of five genotypes in *Tribolium castaneum*. *Mech Ageing Dev* 18(1):19–31
29. Cohet Y (1975) Epigenetic influences on the lifespan of the *Drosophila*: Existence of an optimal growth temperature for adult longevity. *Exp Gerontol* 10(3–4):181–4
30. Economos AC, Lints FA (1984) Growth rate and life span in *Drosophila*. I. Methods and mechanisms of variation of growth rate. *Mech Ageing Dev* 27(1):1–13
31. Economos AC, Lints FA (1986) Developmental temperature and life span in *Drosophila melanogaster* I. Constant developmental temperature evidence for physiological adaptation in a wide temperature range. *Gerontology* 32(1):18–27
32. Economos AC, Lints FA (1986) Developmental temperature and life span in *Drosophila melanogaster*. II. Oscillating temperature. *Gerontology* 32(1):28–36
33. Rose MR, Flatt T, Graves JL, Greer LF, Martinez DE, Matos M, Mueller LD, Shmookler Reis RJ, Shahrestani P (2013) What is Aging? *Front Genet* 3:134
34. Walker RF (2011) Developmental Theory of Aging Revisited: Focus on Causal and Mechanistic Links Between Development and Senescence. *Rejuvenation Res* 14(4):429–36
35. Mary S. Tyler (2000) Development of the Fruit Fly. In: *Developmental Biology, A Guide for Experimental Study*. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc :85–6.
36. Hyde RR (1913) Inheritance of the Length of Life in *Drosophila ampelophila*. *Indiana Sci. Rep* 23:113–123
37. Loeb J, Northrop JH (1916) Is There a Temperature Coefficient for the Duration of Life? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2(8):456–7

38. Loeb J, Northrop JH (1917) On the Influence of Food and Temperature on the Duration of Life. *Journal of Biological Chemistry* 32:103–21
39. Gonzalez B (1923) Experimental Studies on the Duration of Life. VIII. The Influence Upon Duration of Life of Certain Mutant Genes of *Drosophila melanogaster*. *Am Nat* 57(651):289–325
40. Pearl R, Parker S (1922) Experimental studies on duration of life II. Hereditary differences in duration of life in line-bread strains of *Drosophila*. *Am Nat* 56(643):174–87
41. Pearl R, Parker S (1921) Experimental Studies on the Duration of Life. I. Introductory Discussion of the Duration of Life in *Drosophila*. *The American Naturalist* 55(641):481–509
42. Piper MDW, Partridge L (2018) *Drosophila* as a model for ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1864(9):2707–17
43. Smith MJ (1958) The effect of temperature and egg-laying on the longevity of *Drosophila subobscura*. *Journal of Experimental Biology* 35:832–42
44. Luckinbill LS, Clare MJ (1985) Selection for life span in *Drosophila melanogaster*. *Heredity (Edinb)* 5:9–18
45. Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans. *Science* 328(5976):321–6
46. Taormina G, Ferrante F, Vieni S, Grassi N, Russo A, Mirisola MG (2019) Longevity: Lesson from Model Organisms. *Genes (Basel)* 10(7):518
47. Jones OR, Scheuerlein A, Salguero-Gómez R, Camarda CG, Schaible R, Casper BB, Dahlgren JP, Ehrlén J, García MB, Menges ES, Quintana-Ascencio PF, Caswell H, Baudisch A, Vaupel JW (2014) Diversity of ageing across the tree of life. *Nature* 505(7482):169–73
48. McKee BD, Yan R, Tsai JH (2012) Meiosis in male *Drosophila*. *Spermatogenesis* 2(3):167–84
49. Miller DE, Cook KR, Hawley RS (2019) The joy of balancers. *PLoS Genet* 15(11):e1008421

50. Nisha, Raj K, Pragati, Tandon S, Chanu SI, Sarkar S (2020) Aging: Reading, Reasoning, and Resolving Using *Drosophila* as a Model System. In: Models, Molecules and Mechanisms in Biogerontology. Springer Singapore :259–302
51. Helfand SL, Rogina B (2003) Genetics of Aging in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Genet* 37(1):329–48
52. Bylino O V., Ogienko AA, Batin MA, Georgiev PG, Omelina ES (2024) Genetic, Environmental, and Stochastic Components of Lifespan Variability: The *Drosophila* Paradigm. *Int J Mol Sci* 25(8):4482
53. Arroyo JI, Díez B, Kempes CP, West GB, Marquet PA (2022) A general theory for temperature dependence in biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119(30)
54. Evans A, Ferrer AJ, Fradkov E, Shomar JW, Forer J, Klein M (2023) Temperature sensitivity and temperature response across development in the *Drosophila* larva. *Front Mol Neurosci* 16:1275469
55. Zwaan BJ, Bijlsma R, Hoekstra RF (1992) On the developmental theory of ageing. II. The effect of developmental temperature on longevity in relation to adult body size in *D. melanogaster*. *Heredity (Edinb)* 68:123–30
56. Leiser SF, Begun A, Kaeberlein M (2011) HIF- 1 modulates longevity and healthspan in a temperature- dependent manner. *Aging Cell* 10(2):318–26
57. Van Voorhies WA, Ward S (1999) Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(20):11399–403
58. Keil G, Cummings E, de Magalhães JP (2015) Being cool: how body temperature influences ageing and longevity. *Biogerontology* 16(4):383–97
59. Borowiak-sobkowiak B (2017) Effect of temperature on the biological parameters of *Aphis craccivora* (*Hemiptera aphididae*) on *Robinia pseudoacacia*. *Redia* 65–71
60. Hsu C, Chiu Y (2009) Ambient temperature influences aging in an annual fish (*Nothobranchius rachovii*). *Aging Cell* 8(6):726–37

61. Conti B, Sanchez-Alavez M, Winsky-Sommerer R, Morale MC, Lucero J, Brownell S, Fabre V, Huitron-Resendiz S, Henriksen S, Zorrilla EP, de Lecea L, Bartfai T (2006) Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span. *Science* 314(5800):825-8
62. Fontana L, Partridge L (2015) Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans. *Cell* 161(1):106–18
63. Green CL, Lamming DW, Fontana L (2022) Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23(1):56–73
64. Gao Y, Cheng X, Tian Y, Yuan Z, Fan X, Yang D, Yang M (2023) Nutritional Programming of the Lifespan of Male *Drosophila* by Activating FOXO on Larval Low-Nutrient Diet. *Nutrients* 15(8):1840
65. Mair W, Piper MDW, Partridge L (2005) Calories Do Not Explain Extension of Life Span by Dietary Restriction in *Drosophila*. *PLoS Biol* 3(7):e223
66. Lee KP, Simpson SJ, Clissold FJ, Brooks R, Ballard JWO, Taylor PW, Soran N (2008) Lifespan and reproduction in *Drosophila* : New insights from nutritional geometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(7):2498–503
67. Grandison RC, Piper MDW, Partridge L (2009) Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* 462(7276):1061–4
68. Tsurumi A, Li WX (2020) Aging mechanisms—A perspective mostly from *Drosophila*. *Advanced Genetics* 1(1):e10026
69. Economos AC, Lints FA (1985) Growth rate and life span in *Drosophila* V. The effect of prolongation of the period of growth on the total duration of life (J.H. Northrop, 1917) — revisited. *Mech Ageing Dev* 33(1):103–13
70. Economos AC, Lints FA (1985) Growth rate and life span in *Drosophila*, IV. Role of cell size and cell number in the biphasic relationship between life span and growth rate. *Mech Ageing Dev* 32(2–3):193–204

71. May CM, Doroszuk A, Zwaan BJ (2015) The effect of developmental nutrition on life span and fecundity depends on the adult reproductive environment in *Drosophila melanogaster*. *Ecol Evol* 5(6):1156–68
72. Stefana MI, Driscoll PC, Obata F, Pengelly AR, Newell CL, MacRae JI, Gould AP (2017) Developmental diet regulates *Drosophila* lifespan via lipid autotoxins. *Nat Commun* 8(1):1384
73. Vaiserman AM, Koliada AK, Zabuga OG (2014) Effect of dietary restriction during development on the level of expression of longevity-associated genes in *Drosophila melanogaster*. *Advances in Gerontology* 4(3):193–6
74. Youn H, David R, Hervé C (2017) Hormesis-like effect of mild larval crowding on thermotolerance in *Drosophila* flies. *Journal of Experimental Biology* 221(Pt 2):jeb169342
75. Botella LM, Moya A, González MC, Ménsua JL (1985) Larval stop, delayed development and survival in overcrowded cultures of *Drosophila melanogaster*: Effect of urea and uric acid. *J Insect Physiol* 31(3):179–85
76. Sørensen JG, Loeschcke V (2001) Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *J Insect Physiol* 47(11):1301–7
77. Gems D, Partridge L (2008) Stress-Response Hormesis and Aging: “That which Does Not Kill Us Makes Us Stronger.” *Cell Metab* 7(3):200–3.
78. Quintana A, Prevosti A (1990) Genetic and environmental factors in the resistance of *Drosophila subobscura* adults to high temperature shock. *Theoretical and Applied Genetics* 79(1):103–7
79. Bublì OA, Imasheva AG, Loeschcke V (1998) Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities. *Evolution (N Y)* 52(2):619–25
80. Arias LN, Sambucetti P, Scannapieco AC, Loeschcke V, Norry FM (2012) Survival of heat stress with and without heat hardening in *Drosophila melanogaster*: interactions with larval density. *Journal of Experimental Biology* 215(13):2220–5

81. Altintas O, Park S, Lee SJ (2016) The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Rep* 49(2):81–92
82. Nässel DR, Broeck J Vanden (2016) Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(2):271–90
83. Vinayagam A, Kulkarni MM, Sopko R, Sun X, Hu Y, Nand A, Villalta C, Moghimi A, Yang X, Mohr SE, Hong P, Asara JM, Perrimon N (2016) An Integrative Analysis of the InR/PI3K/Akt Network Identifies the Dynamic Response to Insulin Signaling. *Cell Rep* 16(11):3062-3074
84. Yamamoto R, Palmer M, Koski H, Curtis-Joseph N, Tatar M. Aging modulated by the *Drosophila* insulin receptor through distinct structure-defined mechanisms. *Genetics* 217(2)
85. Grönke S, Clarke DF, Broughton S, Andrews TD, Partridge L (2010) Molecular Evolution and Functional Characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptides. *PLoS Genet* 6(2):e1000857.
86. Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS (1979) A Mutant *Drosophila* Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function. *Science* 292(5514):107–10
87. Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G (2011) FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813(11):1938–45
88. Birnbaum A, Wu X, Tatar M, Liu N, Bai H (2019) Age-Dependent Changes in Transcription Factor FOXO Targeting in Female *Drosophila*. *Front Genet* 10:312
89. Webb AE, Kundaje A, Brunet A (2016) Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution. *Aging Cell* 15(4):673–85
90. Dutriaux A, Godart A, Brachet A, Silber J (2013) The Insulin Receptor Is Required for the Development of the *Drosophila* Peripheral Nervous System. *PLoS* 8(9):e71857

91. Proshkina EN, Shaposhnikov M V., Sadritdinova AF, Kudryavtseva A V., Moskalev AA (2015) Basic mechanisms of longevity: A case study of *Drosophila* pro-longevity genes. *Ageing Res Rev* 24:218–31
92. Slack C, Giannakou ME, Foley A, Goss M, Partridge L (2011) dFOXO- independent effects of reduced insulin- like signaling in *Drosophila*. *Aging Cell* 10(5):735–48
93. Broughton SJ, Piper MD, Ikeya T, Bass TM, Jacobson J, Drieger Y, Martinez P, Hafen E, Withers DJ, Leivers SJ, Partridge L (2005) Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8):3105-10
94. Nielsen MD, Luo X, Biteau B, Syverson K, Jasper H (2008) 14- 3- 3ε antagonizes FoxO to control growth, apoptosis and longevity in *Drosophila*. *Aging Cell* 7(5):688–99
95. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L (1979) Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a *Drosophila* Insulin Receptor Substrate Protein. *Science* 292(5514):104–6
96. Tu M, Epstein D, Tatar M (2002) The demography of slow aging in male and female *Drosophila* mutant for the insulin- receptor substrate homologue *chico*. *Aging Cell* 1(1):75–80
97. Hwangbo DS, Gersham B, Tu MP, Palmer M, Tatar M (2004) *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429(6991):562–6
98. Demontis F, Perrimon N (2010) FOXO/4E-BP Signaling in *Drosophila* Muscles Regulates Organism-wide Proteostasis during Aging. *Cell* 143(5):813–25
99. Giannakou ME, Goss M, Jünger MA, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L (1979) Long-Lived *Drosophila* with Overexpressed *dFOXO* in Adult Fat Body. *Science* 305(5682):361–361
100. Wessells RJ, Fitzgerald E, Cypser JR, Tatar M, Bodmer R (2004) Insulin regulation of heart function in aging fruit flies. *Nat Genet* 36(12):1275–81

101. Lehmann M (2018) Endocrine and physiological regulation of neutral fat storage in *Drosophila*. *Mol Cell Endocrinol* 461:165–77
102. Eijkelenboom A, Burgering BMT (2013) FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(2):83–97
103. Donovan MR, Marr MT (2016) dFOXO Activates Large and Small Heat Shock Protein Genes in Response to Oxidative Stress to Maintain Proteostasis in *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry* 291(36):19042–50
104. Wheeler JC, King V, Tower J (1999) Sequence requirements for upregulated expression of *Drosophila* hsp70 transgenes during aging☆. *Neurobiol Aging* 20(5):545–53
105. Feder JH, Rossi JM, Solomon J, Solomon N, Lindquist S (1992) The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Dev* 6(8):1402–13
106. Gong WJ, Golic KG (2006) Loss of Hsp70 in *Drosophila* Is Pleiotropic, With Effects on Thermotolerance, Recovery From Heat Shock and Neurodegeneration. *Genetics* 172(1):275–86
107. Welte MA, Tetrault JM, Dellavalle RP, Lindquist SL (1992) A new method for manipulating transgenes: engineering heat tolerance in a complex, multicellular organism. *Current Biology* 3(12):842–53
108. Khazaeli AA, Tatar M, Pletcher SD, Curtsinger JW (1997) Heat-Induced Longevity Extension in *Drosophila*. I. Heat Treatment, Mortality, and Thermotolerance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52A(1):B48–52
109. Tatar M, Khazaeli AA, Curtsinger JW (1996) Chaperoning extended life. *Nature* 390(6655):30–30
110. Xiao C, Hull D, Qiu S, Yeung J, Zheng J, Barwell T, Robertson RM, Seroude L (2019) Expression of Heat Shock Protein 70 Is Insufficient To Extend *Drosophila melanogaster* Longevity. *G3 (Bethesda)* 9(12):4197–207
111. Dobrenel T, Caldana C, Hanson J, Robaglia C, Vincentz M, Veit B, Meyer C (2016) TOR Signaling and Nutrient Sensing. *Annu Rev Plant Biol* 67:261–85

112. Antikainen H, Driscoll M, Haspel G, Dobrowolski R (2017) TOR- mediated regulation of metabolism in aging. *Aging Cell* 16(6):1219–33
113. Bjedov I, Rallis C (2020) The Target of Rapamycin Signalling Pathway in Ageing and Lifespan Regulation. *Genes (Basel)* 11(9):1043
114. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 28(10):721–6
115. Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, Partridge L (2010) Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab* 11(1):35-46
116. Oldham S, Montagne J, Radimerski T, Thomas G, Hafen E (2000) Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev* 14(21):2689–94
117. Zhang Y, Billington CJ, Pan D, Neufeld TP (2006) *Drosophila* Target of Rapamycin Kinase Functions as a Multimer. *Genetics* 172(1):355–62
118. Soulard A, Cohen A, Hall MN (2009) TOR signaling in invertebrates. *Curr Opin Cell Biol* 21(6):825–36
119. Glatter T, Schittenhelm RB, Rinner O, Roguska K, Wepf A, Jünger MA, Köhler K, Jevtov I, Choi H, Schmidt A, Nesvizhskii AI, Stocker H, Hafen E, Aebersold R, Gstaiger M (2011) Modularity and hormone sensitivity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor/target of rapamycin interaction proteome. *Mol Syst Biol* 7:547
120. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 10(8):935–45
121. Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, Ortiz-Vega S, Yonezawa K (2006) Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* 25(48):6361-72
122. Kim M, Lee J (2015) Identification of an AMPK Phosphorylation Site in *Drosophila* TSC2 (gigas) that Regulate Cell Growth. *Int J Mol Sci* 16(4):7015–26

123. Cully M, Genevet A, Warne P, Treins C, Liu T, Bastien J, Baum B, Tapon N, Leevers SJ, Downward J (2010) A role for p38 stress-activated protein kinase in regulation of cell growth via TORC1. *Mol Cell Biol* 30(2):481-95
124. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S (2004) Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Current Biology* 14(10):885–90
125. Wang MC, Bohmann D, Jasper H (2005) JNK Extends Life Span and Limits Growth by Antagonizing Cellular and Organism-Wide Responses to Insulin Signaling. *Cell* 121(1):115–25
126. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13(19):2570–80
127. Viswanathan M, Kim SK, Berdichevsky A, Guarente L (2005) A Role for SIR-2.1 Regulation of ER Stress Response Genes in Determining *C. elegans* Life Span. *Dev Cell* 9(5):605–15
128. Rogina B, Helfand SL (2004) *Sir2* mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(45):15998–6003
129. Mair W, Dillin A (2008) Aging and Survival: The Genetics of Life Span Extension by Dietary Restriction. *Annu Rev Biochem* 77(1):727–54
130. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and *SIR2* for Life-Span Extension by Calorie Restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289(5487):2126–8
131. Wang Y, Tissenbaum HA (2006) Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech Ageing Dev* 127(1):48–56
132. Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvári M, Piper MD, Hoddinott M, Sutphin GL, Leko V, McElwee JJ, Vazquez-Manrique RP, Orfila AM, Ackerman D, Au C, Vinti G, Riesen M, Howard K, Neri C, Bedalov A,

- Kaeberlein M, Soti C, Partridge L, Gems D (2011) Absence of effects of *Sir2* overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature* 477(7365):482-5
133. Whitaker R, Faulkner S, Miyokawa R, Burhenn L, Henriksen M, Wood JG, Helfand SL (2013) Increased expression of *Drosophila Sir2* extends life span in a dose-dependent manner. *Aging (Albany NY)* 5(9):682-91
134. Banerjee KKr, Ayyub C, Sengupta S, Kolthur-Seetharam U (2012) *dSir2* deficiency in the fatbody, but not muscles, affects systemic insulin signaling, fat mobilization and starvation survival in flies. *Aging* 4(3):206–23
135. Griswold AJ, Chang KT, Runko AP, Knight MA, Min KT (2015) *Sir2* mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(25):8673–8
136. Ashburner M (1989) *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Harste E, editor. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
137. Miller RS, Thomas JL (1958) The Effects of Larval Crowding and Body Size on the Longevity of Adult *Drosophila Melanogaster*. *Ecology* 39(1):118–25
138. Chattopadhyay D, Chitnis A, Talekar A, Mulay P, Makkar M, James J, Thirumurugan K (2017) Hormetic efficacy of rutin to promote longevity in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* 18(3):397-411
139. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25(4):402–8
140. Arias-Rojas A, Iatsenko I (2022) The Role of Microbiota in *Drosophila melanogaster* Aging. *Frontiers in Aging* 3:909509
141. Deshpande SA, Yamada R, Mak CM, Hunter B, Soto Obando A, Hoxha S, Ja WW (2015) Acidic Food pH Increases Palatability and Consumption and Extends *Drosophila* Lifespan. *J Nutr* 145(12):2789-96
142. Baret P, Fouarge A, Bullens P, Lints FA (1994) Life-span of *Drosophila melanogaster* in highly oxygenated atmospheres. *Mech Ageing Dev* 76(1):25–31
143. Sohal RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC (1993) Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(15):7255–9

144. Polan DM, Alansari M, Lee B, Grewal S (2020) Early-life hypoxia alters adult physiology and reduces stress resistance and lifespan in *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology* 223(Pt 22):jeb226027
145. Heinrich EC, Farzin M, Klok CJ, Harrison JF (2011) The effect of developmental stage on the sensitivity of cell and body size to hypoxia in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* 214(9):1419–27
146. Frazier MR, Woods HA, Harrison JF (2001) Interactive Effects of Rearing Temperature and Oxygen on the Development of *Drosophila melanogaster*. *Physiological and Biochemical Zoology* 74(5):641–50
147. Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarani S, Benvenuti F, Canestrari F (2004) Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin Biochem* 37(4):312–7
148. Weaver M, Krasnow MA (2008) Dual Origin of Tissue-Specific Progenitor Cells in *Drosophila* Tracheal Remodeling. *Science* 321(5895):1496–9
149. Gruenewald C, Botella JA, Bayersdorfer F, Navarro JA, Schneuwly S (2009) Hyperoxia-induced neurodegeneration as a tool to identify neuroprotective genes in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med* 46(12):1668–76
150. Zwaan BJ, Bijlsma R, Hoekstra RF (1992) On the developmental theory of ageing. II. The effect of developmental temperature on longevity in relation to adult body size in *D. melanogaster*. *Heredity (Edinb)* 68(2):123–30
151. Leiser SF, Begun A, Kaeberlein M (2011) HIF- 1 modulates longevity and healthspan in a temperature- dependent manner. *Aging Cell* 10(2):318–26
152. Partridge L, Fowler K, Trevitt S, Sharp W (1986) An examination of the effects of males on the survival and egg-production rates of female *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 32(11):925–9
153. Mayer PJ, Baker GT (1985) Genetic Aspects of *Drosophila* as a Model System of Eukaryotic Aging. *Int Rev Cytol* 95:61-102.
154. Mołoń M, Dampc J, Kula-Maximenko M, Zebrowski J, Mołoń A, Dobler R, Durak R, Skoczowski A (2020) Effects of Temperature on Lifespan of *Drosophila*

melanogaster from Different Genetic Backgrounds: Links between Metabolic Rate and Longevity. *Insects* 11(8):470

155. Martin GM, Austad SN, Johnson TE (1996) Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat Genet* 13(1):25–34

156. Economos AC, Lints FA (1984) Growth rate and life span in *Drosophila*. II. A biphasic relationship between growth rate and life span. *Mech Ageing Dev* 27(2):143–51

157. Zwaan BJ, Bijlsma R, Hoekstra RF (1991) On the developmental theory of ageing. I. Starvation resistance and longevity in *Drosophila melanogaster* in relation to pre-adult breeding conditions. *Heredity (Edinb)* 66(1):29–39

158. Gribble KE, Moran BM, Jones S, Corey EL, Mark Welch DB (2018) Congeneric variability in lifespan extension and onset of senescence suggest active regulation of aging in response to low temperature. *Exp Gerontol* 114:99–106

159. Le Bourg É (2016) Life-time protection against severe heat stress by exposing young *Drosophila melanogaster* flies to a mild cold stress. *Biogerontology* 17(2):409–15

160. Pomatto LCD, Tower J, Davies KJA (2018) Sexual Dimorphism and Aging Differentially Regulate Adaptive Homeostasis. *The Journals of Gerontology: Series A* 73(2):141–9

161. Chauhan V, Anis A, Chauhan A (2021) Effects of Starvation on the Levels of Triglycerides, Diacylglycerol, and Activity of Lipase in Male and Female *Drosophila Melanogaster*. *J Lipids*:5583114.

162. Chandegra B, Tang JLY, Chi H, Alic N (2017) Sexually dimorphic effects of dietary sugar on lifespan, feeding and starvation resistance in *Drosophila*. *Aging* 9(12):2521–8

163. Niveditha S, Deepashree S, Ramesh SR, Shivanandappa T. Sex differences in oxidative stress resistance in relation to longevity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology B* 187(7):899–909

164. Lin YC, Zhang M, Chang YJ, Kuo TH (2023) Comparisons of lifespan and stress resistance between sexes in *Drosophila melanogaster*. *Heliyon* 9(8):e18178

165. Flatt T. Survival costs of reproduction in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 46(5):369–75
166. Hoffman JM, Dudeck SK, Patterson HK, Austad SN (2021) Sex, mating and repeatability of *Drosophila melanogaster* longevity. *R Soc Open Sci* 8(8):210273
167. Tatar M (2010) Reproductive aging in invertebrate genetic models. *Ann N Y Acad Sci* 1204(1):149–55
168. Kenyon C (2010) A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci* 1204(1):156–62
169. Harshman LG, Zera AJ (2007) The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol Evol* 22(2):80–6
170. Smith JM (1958) The Effects of Temperature and of Egg-Laying on the Longevity of *Drosophila Subobscura*. *Journal of Experimental Biology* 35(4):832–42
171. Tarín JJ, Gómez-Piquer V, García-Palomares S, García-Pérez MA, Cano A (2014) Absence of long-term effects of reproduction on longevity in the mouse model. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12(1):84
172. Markow TA (2011) “Cost” of virginity in wild *Drosophila melanogaster* females. *Ecol Evol* 1(4):596–600
173. Aigaki T, Ohba S (1984) Effect of mating status on *Drosophila virilis* lifespan. *Exp Gerontol* 19(4):267–78
174. Heinze J, Schrempf A (2008) Aging and Reproduction in Social Insects – A Mini-Review. *Gerontology* 54(3):160–7
175. Calabrese EJ, Dhawan G, Kapoor R, Iavicoli I, Calabrese V (2015) What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity? *Biogerontology* 16(6):693–707
176. Agathokleous E, Calabrese EJ, Barceló D (2024) Environmental hormesis: New developments. *Science of The Total Environment* 906:167450
177. Michalski AI, Yashin AI (2002) Detection of hormesis effect in longevity: simulation approach for heterogeneous population. *Math Biosci* 175(1):57–66

178. Davey WP (1917) The effect of X- rays on the length of life of *Tribolium confusum*. Journal of Experimental Zoology 22(3):573–92
179. Davey WP (1919) Prolongation of life of *Tribolium confusum* apparently due to small doses of x- rays. Journal of Experimental Zoology 28(3):447–58
180. Cork JM (1957) Gamma-Radiation and Longevity of the Flour Beetle. Radiat Res 7(6):551
181. Calabrese EJ (2013) Low doses of radiation can enhance insect lifespans. Biogerontology 14(4):365–81
182. Calabrese EJ, Iavicoli I, Calabrese V (2012) Hormesis: why it is important to biogerontologists. Biogerontology 13(3):215–35
183. Cypser JR, Tedesco P, Johnson TE (2006) Hormesis and aging in *Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol 41(10):935–9
184. Calabrese EJ (2013) Low doses of radiation can enhance insect lifespans. Biogerontology 14(4):365–81
185. Klepsatel P, Procházka E, Gálíková M (2018) Crowding of *Drosophila* larvae affects lifespan and other life-history traits via reduced availability of dietary yeast. Exp Gerontol. 2018 Sep;110:298–308.
186. Yashin AI, Cypser JW, Johnson TE, Michalski AI, Boyko SI, Novoseltsev VN (2002) Heat Shock Changes the Heterogeneity Distribution in Populations of *Caenorhabditis elegans*: Does It Tell Us Anything About the Biological Mechanism of Stress Response? J Gerontol A Biol Sci Med Sci 57(3):B83–92
187. Kapila R, Kashyap M, Gulati A, Narasimhan A, Poddar S, Mukhopadhaya A, Prasad NG (2021) Evolution of sex-specific heat stress tolerance and larval *Hsp70* expression in populations of *Drosophila melanogaster* adapted to larval crowding. J Evol Biol 34(9):1376-1385
188. Vaiserman AM, Koliada AK, Zabuga OG (2014) Effect of dietary restriction during development on the level of expression of longevity-associated genes in *Drosophila melanogaster*. Advances in Gerontology 4(3):193–6

189. Bobrovskikh MA, Gruntenko NE (2023) Mechanisms of Neuroendocrine Stress Response in *Drosophila* and Its Effect on Carbohydrate and Lipid Metabolism. *Insects* 14(5):474
190. Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410(6825):227–30
191. Hoffmann J, Romey R, Fink C, Yong L, Roeder T (2013) Overexpression of *Sir2* in the adult fat body is sufficient to extend lifespan of male and female *Drosophila*. *Aging* 5(4):315–27
192. Vaiserman AM (2010) Hormesis, Adaptive Epigenetic Reorganization, and Implications for Human Health and Longevity. *Dose-Response* 8(1):16-21
193. Vaiserman AM (2008) Epigenetic Engineering and Its Possible Role in Anti-Aging Intervention. *Rejuvenation Res* 11(1):39–42
194. Waterland RA, Garza C (2002) Early Postnatal Nutrition Determines Adult Pancreatic Glucose-Responsive Insulin Secretion and Islet Gene Expression in Rats. *J Nutr* 132(3):357–64
195. Waterland RA, Jirtle RL (2004) Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 20(1):63–8

ДОДАТОК

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, **Karaman 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](https://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 «Дрозоділа 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.