

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

ЗАБУГА ОКСАНА ГЕННАДІЇВНА

УДК: 612.68.014.481

**ВПЛИВ ОБМЕЖЕННЯ ХАРЧУВАННЯ В ПЕРІОД РОЗВИТКУ НА
ПАРАМЕТРИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА ТРИВАЛІСТЬ ЖИТТЯ**

Drosophila melanogaster

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у лабораторії епігенетики ДУ "Інститут геронтології ім. Д.Ф.Чеботарьова НАМН України".

Науковий керівник: доктор медичних наук, старший науковий співробітник
Вайсерман Олександр Михайлович,
ДУ "Інститут геронтології
ім. Д.Ф.Чеботарьова НАМН України",
завідувач лабораторії епігенетики

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник,
Літовка Ірина Георгіївна,
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
провідний науковий співробітник відділу клінічної
патофізіології

доктор біологічних наук, доцент,
Козерецька Ірина Анатоліївна,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
доцент кафедри загальної та молекулярної генетики
Навчально-наукового центру "Інститут біології"

Захист відбудеться "17" травня 2016 р. о 16 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01601, м.Київ-24, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (01601, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4) та на сайті:
<http://biph.kiev.ua/uk>

Автореферат розісланий "15" квітня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Неодноразово продемонстровано, що обмеження харчування (ОХ) впливає на тривалість життя (ТЖ) і репродуктивну функцію багатьох організмів (Bellinger et al., 2004; Partridge et al., 2005; Omodei & Fontana, 2011). Експерименти у цій галузі започаткував Clyve M. McCay із Корнельського університету у 30-і роки, коли очолювана ним група дослідників встановила, що обмеження калорій на 30-50 % призводить до збільшення середньої та максимальної ТЖ щурів і мишей (McCay, 1935). Значно пізніші дослідження, проведені на приматах (макаках резус), продемонстрували, що калорійне обмеження харчування попереджає абдомінальне ожиріння, діабет, гіпертонію та серцево-судинні захворювання (Omodei & Fontana, 2011).

На відміну від скорочення калорійності "раціону" щурів та мишей у дорослому віці, яке пов'язане з уповільненням старіння, застосування дієтичної рестрикції у ссавців до народження зменшує їхню ТЖ (Speakman and Hambly, 2007). Варто зазначити, що виходячи із концепції "метаболічного програмування" (Barker, 2004), недостатнє пренатальне харчування людини – це один із найважливіших факторів, які призводять до розвитку захворювань у подальшому житті.

Історично велика кількість робіт, які стосувались маніпуляцій із харчуванням, була виконана на гризунах, проте, експерименти щодо вивчення впливу ОХ на ТЖ впродовж кількох поколінь, а також молекулярно-генетичні дослідження зручніше проводити на короткоживучих модельних організмах, таких як безхребетні (Piper and Partridge, 2007). Ссавці значно відрізняються від безхребетних за своєю морфологією й особливостями метаболізму, проте їхні гени та сигнальні шляхи, пов'язані зі старінням і, навіть, із деякими людськими захворюваннями, філогенетично зберігаються (Partridge and Tower, 2007; Mair and Dillin, 2008; Shaw et al. 2008).

Одним із найбільш розповсюджених універсальних модельних видів вважається *Drosophila melanogaster*, проте дані щодо впливу маніпуляцій харчуванням на життєві характеристики плодових мушок залишаються суперечливими. Так, Piper (2007) повідомляє, що у 20-ти статтях був зафіксований позитивний ефект ОХ у дрозофіл, а у 6-ти інших цього не виявлено. Важливо зазначити, що майже всі такі дослідження, окрім роботи однієї групи вчених (Tu & Tatar, 2003), проводили на імаго. Так, утримання личинок *D. melanogaster* у поживному середовищі (ПС) без дріжджів (білковий компонент) призвело до розвитку мушок меншого розміру, зі зниженням репродуктивної активності самиць, однак без змін темпів старіння (Tu & Tatar, 2003). До цього часу зовсім не дослідженим залишався механізм виникнення наслідків в імаго після застосування ОХ впродовж розвитку *D. melanogaster*, зокрема його вплив на ТЖ.

Актуальність роботи полягає у тому, що результати цього дослідження можуть стати фундаментом для розробки методики прогнозування та профілактики негативних наслідків, спричинених неадекватним харчуванням упродовж розвитку. Екстраполяція результатів роботи безпосередньо на людину виявляється неможливою, проте, зважаючи на те, що більшість механізмів старіння є еволюційно консервативними, експерименти на *D. melanogaster* можуть надати нову інформацію

щодо виникнення на стадії розвитку епігенетичних модифікацій, які впливають на виживаність та ТЖ організмів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Базисною для підготовки та подання дисертації, проведення досліджень та аналізу результатів, в яких здобувач приймала участь, була науково-дослідна робота, виконана у межах наукової тематики Інституту геронтології НАМН України: «Вплив голодування в ранньому онтогенезі на темп старіння та смертність (експериментальні та демографічні дослідження)» (2011-2013 рр., номер державної реєстрації 0111U001488).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було виявлення довгострокових наслідків обмеженого харчування на стадії личинки для життєздатності та тривалості життя імаго *D. melanogaster*.

Для вирішення поставленої мети були визначені наступні завдання:

1) дослідити вплив обмеження харчування впродовж преімагінальної стадії на тривалість розвитку та виживаність личинок *D. melanogaster*;

2) проаналізувати вплив обмеження харчування у личинок *D. melanogaster* на показники життєздатності імаго: репродуктивна активність самиць, стійкість до стресів – 18-тигодинна харчова депривація та підвищення температури до 40°C, середня і максимальна тривалість життя;

3) виявити наслідки невідповідності режимів харчування на личинковій та імагінальній стадіях;

4) дослідити вплив 13-тигодинної харчової депривації під час прекоцепційного періоду життєвого циклу мушок на тривалість життя їхніх нащадків;

5) проаналізувати рівень експресії асоційованих із тривалістю життя генів *D. melanogaster*: інсулінового рецептору (*InR*) та сіртуїну-2 дрозофіли (*dSir2*) в імаго, які розвивались за умов обмеженого харчування;

6) визначити активність ферментів – супероксиддисмутази та каталази, а також рівень накопичення кінцевих продуктів глікозилювання в імаго за умов обмеження харчування на стадії личинки.

Об'єкт дослідження: життєздатність, тривалість життя та експресія генів, які впливають на тривалість життя у *D. melanogaster*.

Предмет дослідження: зміни темпу старіння представників лабораторної популяції *D. melanogaster*, які виникають внаслідок обмеження харчування на стадії личинки.

Методи дослідження. Фізіологічні: визначення тривалості розвитку та преімагінальної виживаності у личинок; визначення репродуктивної активності та фертильності самиць; маси тіла, стресостійкості, тривалості життя в імаго. Молекулярно-генетичні: виділення РНК, зворотна транскрипція, кількісний ПЛР-аналіз у реальному часі. Біохімічні: колориметричний метод. Статистичні: непараметричні (χ^2) та параметричні (варіаційний і дисперсійний аналіз).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше були виявлені наслідки кількісного ОХ на стадії личинки для параметрів життєздатності та ТЖ імаго модельного організму *D. melanogaster*. Продемонстровано, що помірне ОХ впродовж личинкового періоду розвитку *D. melanogaster* може збільшувати ТЖ

дорослих мушок. Визначено найсприятливішу концентрацію харчових компонентів у ПС для ефективного збільшення ТЖ дрозодфіл. Показано, що пряма залежність ТЖ від репродуктивної активності за умов ОХ відсутня. Виявлено, що дієтична рестрикція більше 50 % пропорційно гальмує швидкість розвитку личинок та зменшує преімагінальну виживаність.

Показано негативний вплив на ТЖ харчування впродовж розвитку, якщо воно не відповідає "дієті" у дорослому віці. Виявлено наслідки впливу 13-тигодинної харчової депривації під час прекоцепційного періоду батьківських особин на ТЖ їхніх нащадків, де материнський ефект є більш суттєвим за батьківський.

Продемонстровано, що внаслідок недостатнього харчування впродовж розвитку у самців спостерігається збільшення експресії гену *InR*. Крім того, для особин чоловічої статі, вирощених у подібних умовах, характерним є підвищення активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД) і каталази. Вперше виявлено, що обмеження харчування (50 %) на стадії розвитку спричиняє зниження рівня накопичення складних продуктів глікозилювання в імаго *D. melanogaster*.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Отримані результати доповнюють і поглиблюють сучасні уявлення про характер фізіологічних змін у процесі старіння організму. Застосування системного підходу при вивченні залежності ТЖ від ОХ на стадії розвитку дрозодфіли і наступним аналізом асоційованих із ТЖ генів представляє суттєве теоретичне та практичне значення, оскільки механізми фізіологічних реакцій на харчовий стрес є еволюційно консервативними у тваринному світі (Arsham & Neufeld, 2006). Виходячи із цього, дані щодо розуміння певних шляхів адаптації до харчової депривації, отримані в експериментах на *D. melanogaster*, можна застосовувати не лише до мушок, а й до інших тварин та, найголовніше, до людини. Таким чином, результати цієї дисертаційної роботи можна вважати першим кроком у розробці методів попередження негативних для стану здоров'я наслідків недостатнього харчування у ранньому віці.

Особистий внесок здобувача. Головна ідея роботи була запропонована науковим керівником, а її практичне виконання належить дисертанту. Дисертант самостійно провела аналіз літературних джерел із відповідних тем, обґрунтувала актуальність дослідження, його мету та завдання, описувала та вивчала отримані результати. Всі представлені у роботі експериментальні маніпуляції були виконані безпосередньо нею або за її участі. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено статистичну обробку результатів досліджень, аналіз та узагальнення одержаних даних, сформульовані основні положення і висновки, реалізована апробація результатів дослідження та підготовка до друку робіт. Здобувач приймала активну участь у написанні статей, а також складала лабораторні звіти, що стосуються теми дисертації.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, які включені до дисертації, оприлюднені на засіданнях сектору "Біології старіння" ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», а також на шістьох конференціях: X Міжнародна наукова конференція студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012: біологічні науки» (Київ, 2012 р.), III Міжнародна

конференція «Дрозофіла в експериментальній генетикі та біології» (Канів, 2012 р.), X Міжнародний симпозіум «Биологические механизмы старения» (Харків, 2012 р.), XI наукова конференція молодих учених з міжнародною участю, присвячена пам'яті академіка В. В. Фролькіса (Київ, 2013 р.), Науково-практична конференція і школа з міжнародною участю, присвячена 90-літтю від дня народження академіка В. В. Фролькіса «Современные аспекты геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Київ, 2014 р.), IV Міжнародна конференція «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології» (Львів, 2014). Результати дослідження увійшли до звітів лабораторії.

Публікації. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 7 наукових праць, серед яких 5 статей у наукових фахових виданнях України, 2 – в іноземних журналах, а також 5 тез доповідей на конференціях і симпозіумах.

Структура і обсяг дисертації, обумовлені метою та завданнями дослідження, демонструють епігенетичні прояви впливу недостатнього харчування впродовж розвитку на життєздатність та тривалість життя *D. melanogaster*. Робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу, присвяченого опису об'єктів і методів досліджень, 3-х розділів, в яких викладено результати власних досліджень, розділу, присвяченого аналізу і узагальненню результатів дослідження, висновків та списку використаних джерел із 252-х найменувань. Повний обсяг дисертації становить 140 сторінок, результати представлено 13-ма таблицями та ілюстровано 13-ма рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Багато досліджень демонструють, що калорійне ОХ – це найбільш ефективний засіб уповільнення старіння та подовження життя різних лабораторних тварин (Minor et al., 2010; Smith et al., 2010). Було виявлено, що обмеження калорій у межах 20-40%-го від "нормального" споживання енергії збільшує ТЖ у найрізноманітніших організмів: дріжджів, нематод, павуків, дрозофіл, мишей та щурів. Із попередньо отриманих даних можна було зробити висновок, що калорійне ОХ має здатність викликати захисний ефект проти старіння і у людей, завдяки зниженню ризику розвитку серцево-судинної та метаболічної патології (Gluckman et al., 2010).

Водночас недостатнє внутрішньоутробне харчування є одним із найважливіших факторів, які призводять до розвитку захворювань у подальшому житті (концепція "метаболічного програмування"). Так, дослідження на тваринах демонструють, що адаптація до різних несприятливих умов навколишнього середовища під час раннього розвитку сприяє підвищенню чутливості організму до захворювань у більш пізньому віці, таких як серцево-судинні та нейродегенеративні патології, рак, а також цукровий діабет II типу (Godfrey et al., 2010).

Найбільш розповсюдженим модельним організмом справедливо вважається *D. melanogaster*, яка належить до *holometabolous* (комахи із повним метаморфозом). Дрозофіли мають ключові органи та системи обміну речовин, які характерні для живих організмів; крім того, їм властива більшість консервативних метаболічних шляхів, наявних у хребетних, у тому числі й аналогічні сигнальні шляхи інсуліну,

інсулін-подібного фактора росту (IGF) та мішені рапаміцина (TOR), а також регулювання обміну вуглеводів і накопичення енергії (Baker & Thummel, 2007).

Перші роботи, що демонстрували явище збільшення ТЖ дрозофіл за умов ОХ, були представлені тільки у 1993 році (Chippindale et al., 1993). Вони стали передумовою досліджень з приводу того, які особливості ОХ спричиняють найбільший ефект: зменшення кількості калорій, або зміна концентрації конкретних речовин у ПС. Крім того, було невідомо, чи є збільшення ТЖ за умов ОХ у *D. melanogaster* наслідком зміни темпів старіння, або воно виникає завдяки стимулюванню виживаності (Burger et al., 2007; Tatar, 2007).

Треба зазначити, що існує багато гіпотез стосовно механізмів збільшення ТЖ у *D. melanogaster* внаслідок застосування ОХ, але вони мають багато недоліків. По-перше, набір генів цього модельного організму вже досить детально вивчений, проте з'ясовано, що за різних варіантів дієтичної рестрикції виникають неоднакові зміни у генетичній експресії, які досі досліджувались лише у декількох роботах (Partridge, 2011; Tatar, 2011). По-друге, майже невідомим виявляється те, яким саме чином застосування ОХ впродовж розвитку плодових мушок може сприяти збільшенню ТЖ дорослого організму. У дисертаційній роботі необхідно було дослідити вплив обмеженого харчування у період розвитку на показники життєздатності та тривалість життя *D. melanogaster*, з метою виявлення закономірностей виникнення позитивних наслідків для життєвих характеристик за умов помірного скорочення компонентів харчування у "раціоні" і подальшого застосування цих даних у наукових розробках та медицині.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Фізіологічні методи. для досліджень було обрано лабораторну аутбредну лінію *Oregon-R*. Популяцію *D. melanogaster* утримували у "повноцінному" ПС, тобто із нормальним співвідношенням усіх харчових компонентів (ХК). Мушки перебували за стандартних умов – у термостаті, при температурі $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ та стабільній вологості, із добовим чергуванням освітлення – 12 год світла та 12 год темряви. Протягом 8 год після вильоту із лялечок імаго розділяли на самиць і самців та до здійснення експериментальних маніпуляцій утримували окремо, щоб запобігти їхньому схрещуванню. Личинок наступної генерації утримували у поживному субстраті, в якому ХК були у концентраціях, що становили 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % і 10 % у порівнянні зі стандартним ПС – 100 % (контроль), але з нормальною концентрацією агар-агару і ніпагіну. У личинок визначали показники преімагінальної виживаності та тривалості розвитку.

В імаго дрозофіл визначали масу тіла: по 25 особин кожної статі зважували на торсіонних терезах. Потім розраховували середню масу тіла однієї мушки (мг).

Для визначення репродуктивної активності запліднених самиць індивідуально поміщали у пробірки на 24 год. У цих особин визначали фекандильність – кількість яєць, відкладених однією самицею за добу, а також окремо фіксували фертильність – кількість лялечок, що розвинулись із яєць, відкладених однією самицею за добу.

В імаго обох статей досліджували стійкість до стресових факторів: 18-тигодинна харчова депривація (ХД) та підвищення температури до 40°C – тепловий

шок (ТШ). Для проведення тесту на стійкість до ХД мушок кожної статі окремо поміщали у пробірки без ПС на 18 годин. Через 1 год після припинення тесту фіксували кількість особин, які вижили. Для перевірки стійкості до ТШ мушок кожної статі окремо розсаджували у пусті пробірки, які поміщали на 60 хв у термостат із температурою 40°C. Через 2 год після припинення тесту фіксували кількість живих особин.

Для дослідження ТЖ імаго розділяли за статтю та на третю добу після вилуплення поміщали у пробірки, в яких було по 2 мл ПС. Переміщення на свіжий поживний субстрат здійснювали 2 рази на тиждень, одночасно підраховуючи загиблих комах. Після вимирання всіх мушок аналізували показники середньої та максимальної ТЖ (максимальну ТЖ розраховували як середню ТЖ останніх 10 % особин, що вижили).

Молекулярно-генетичний аналіз. Рівні експресії генів *InR* та *dSir2* визначали у личинок на 3-й стадії розвитку та в імаго у віці 6-ти діб, користуючись методом кількісної ПЛР у реальному часі.

РНК виділяли із гомогенату, одержаного від 10 личинок, 10 самиць та 10 самців у кожній групі за допомогою набору "РІБО-преп" (виробництво "AmpliSens", РФ) за протоколом фірми виробника. РНК від личинок та імаго обробляли ДНКазою. Для синтезу кДНК проводили реакцію зворотної транскрипції, використовуючи комерційні набори "Реверта-L" ("AmpliSens", РФ).

Для ПЛР-аналізу підібрали специфічні для досліджуваних генів дрозофіли праймери: *dSir2*: F – 5'-gtcggacaacgatgattgc-3' і R – 5'-actgtcgtcgtctctga-3'; *InR*: F – 5'-cggaaaacsgaaacssaact-3' і R – 5'-ggcagagtttgctgttcca-3'. В якості внутрішнього контролю визначали рівень експресії гена "домашнього господарства" *GAPDH* (гліцеральдегід-фосфатдегідрогенази): F – 5'cggtcatgccaccaccgcta-3' і R – 5'-ccacgtccatcacgssaca-3' (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

При постановці ПЛР використовували мікропробірки по 0,2 мл (у 5 повторах на варіант), в які вносили 25 мкл попередньо приготованої реакційної суміші і 5 мкл кДНК. В якості негативного контролю використовували проби без кДНК-матриці. Реакційна суміш для ПЛР була приготовлена на основі "Набору для проведення ПЛР-РЧ за наявності інтеркалюючого барвника SYBR Green 1" ("Сінтол", РФ), відповідно до рекомендацій фірми-виробника.

Після завершення ампліфікації (35 циклів) для генерування стандартних кривих була використана програма Opticon Monitor 3. За циклом виходу флуоресцентного сигналу, використовуючи калібрувальну пряму, визначали рівень експресії *dSir2* щодо референтного *GAPDH*; аналогічно були отримані дані для *InR*. Рівні експресії кожного гену розраховували у співвідношенні до *GAPDH* та виражали в умовних одиницях (у.о.).

Біохімічний аналіз. Аналіз активності каталази і СОД здійснили в імаго, які розвивались у ПС із 50 % ХК, і у 100%-му контролі. Зразки ферментних екстрактів готували, гомогенізувавши по 5 дорослих мушок кожної статі окремо. У супернатанті вимірювали кількість загального білка за методом Бредфорда (Bradford, 1976). Загальну активність СОД аналізували непрямим методом (Kostyuk and Potarovich, 1989) за рівнем інгібування реакції супероксидзалежного окислення кверцетину за наявності N',N',N',N'-тетраметилетилендіаміна. Концентрацію

кверцетину визначали вимірюванням довжини хвилі за значенням 406 нм на початку та у кінці реакції за калібрувальною кривою. Активність СОД визначали як дебіт не окисненого кверцетину між експериментальними та контрольними показниками і нормували із урахуванням часу і кількості загального білку в екстракті. Активність каталази в екстрактах мушок вимірювали колориметричним методом (Goth, 1991): екстракт інкубували із перекисом водню (H_2O_2) і зупиняли реакцію додаванням розчину молібдату амонію $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$. Інтенсивність забарвлення жовтого комплексу, вимірювали при 405 нм на спектрофотометрі. Концентрацію H_2O_2 розраховували за калібрувальною кривою. Активність ферменту визначали за кількістю розкладеного пероксиду водню та виражали як кількість H_2O_2 на мг^{-1} білку на хв^{-1} .

Рівень накопичення кінцевих продуктів глікозилування (КПГ) визначали за методикою, описаною Oudes et al. (Oudes et al., 1998). Гомогенат із мушок розбавляли до оптичної щільності та вимірювали на флуоресцентному анізотропному спектрометрі, при $\lambda_{\text{зб.}} = 365$ нм та $\lambda_{\text{ем.}} = 440$ нм. Концентрацію КПГ розраховували за калібрувальною кривою, побудованою з використанням штучних КПГ та нормували за вмістом загального білка. Застосовані довжини хвиль збурення та емісії вказали на вміст КПГ у тканинах організму (мг/мл) (Monnier and Cerami, 1981).

Статистична обробка даних. Для статистичного опрацювання отриманих результатів використовували програму Statistica 6.0. Для перевірки розподілу значень на нормальність застосовували тест Шапіро-Вілка. Статистичну значущість змін показників середньої та максимальної ТЖ, а також, рівнів експресії генів за нормальних умов визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) із подальшими апостеріорними співставленнями (Tukey HSD post hoc tests) груп. Оцінку відмінностей між групами у рівнях експресії генів та активності ферментів здійснювали із застосуванням t-критерію Стюдента. Розбіжності між групами у преімагінальній виживаності визначали непараметричним методом χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідженні застосовували варіанти кількісного ОХ на стадії розвитку *D. melanogaster*, які полягали у пропорційному зменшенні вмісту усіх компонентів харчування у поживному субстраті.

Виживаність на преімагінальній стадії та тривалість розвитку за умов обмеження харчування. Виявлено істотне збільшення тривалості розвитку у мушок, що розвивались у ПС із вмістом ХК менше 40 % (рис. 1).

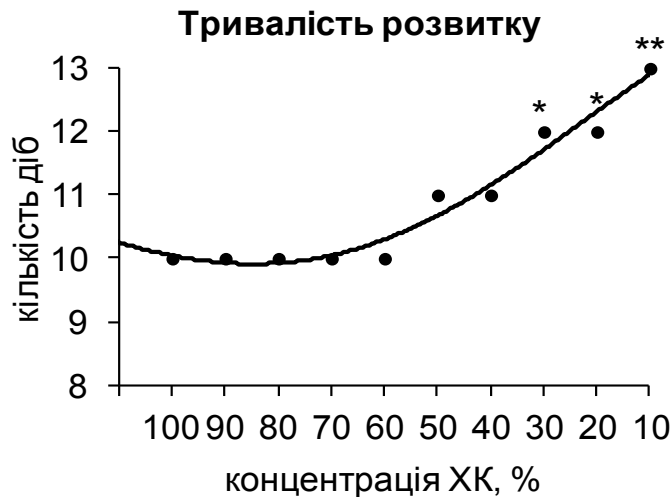


Рис. 1. Залежність тривалості розвитку *D. melanogaster* від концентрації харчових компонентів у поживному субстраті.

Примітка. ХК – харчові компоненти. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (t-критерій Стьюдента).

При розвитку у ПС із мінімальними концентраціями ХК виявлено значне збільшення смертності на преімагінальній стадії *D. melanogaster* (рис. 2). Можна припустити, що зниження вмісту ХК до 40 % від нормального рівня не призводить до змін ТР завдяки здатності мушок компенсувати помірне ОХ за рахунок посилення інтенсивності поглинання ПС. Однак, природно, що ці компенсаторні можливості мають свою фізіологічну межу, яка, вочевидь, досягається за умов концентрацій менше 40 % від норми.

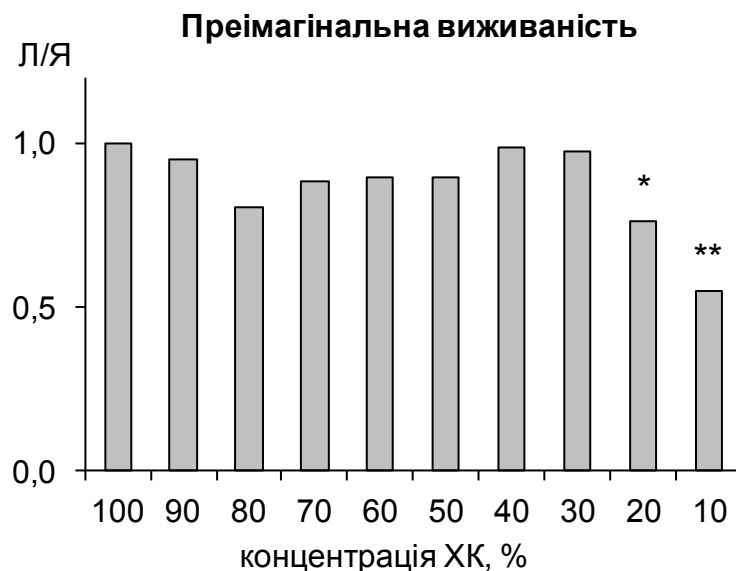


Рис. 2. Залежність виживаності на преімагінальній стадії *D. melanogaster* від концентрації харчових компонентів у поживному субстраті.

Примітка. ХК – харчові компоненти, Л/Я – співвідношення кількості лялечок до кількості яєць. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$ (метод χ^2).

Параметри життєздатності імаго, вирощених за умов обмеження харчування. Показано, що дрозофіли обох статей, вирощені у ПС із 10 % ХК, характеризувались зменшенням середньої маси тіла (табл. 1).

Таблиця 1

Параметри життєздатності дрозофіл, вирощених у поживному субстраті з різними концентраціями харчових компонентів (M±m)

Тест	100% ХК		50% ХК		10% ХК	
	самці	самиці	самці	самиці	самці	самиці
СМ, мг	0,94±0,01	1,39±0,01	0,94±0,01	1,43±0,01	0,45±0,02*	0,69±0,03*
ХД, %	17	58	36 [#]	69	–	–
ТШ, %	8	32	13	45	–	–

Примітка. ХК – харчові компоненти; СМ – середня маса тіла; ХД – 18-тигодинна харчова депривація; ТШ – тепловий шок (40°C). * – p<0,001 (t-критерій Стьюдента); # – p<0,01 (метод χ^2) порівняно з контролем (100 %).

Виявлено достовірне підвищення стійкості до ХД у самців (але не у самиць), вирощених у ПС із 50 % ХК порівняно з контролем. Достовірних відмінностей у стійкості до ТШ у дрозофіл обох статей не зафіксовано (див. табл. 1).

Зміна репродуктивної здатності самиць *D. melanogaster* внаслідок обмеження харчування впродовж розвитку. Фертильність самиць у віці 7-и і 21-ї доби, вирощених за умов 50%-го ОХ, виявилась зниженою у порівнянні з контролем. Достовірне зниження показника спостерігалось у віці 7-и, 15-и і 21-ї доби в особин жіночої статі, що розвивались за умов вмісту 10 % ХК у поживному субстраті (табл. 2).

Таблиця 2

Фертильність самиць, вирощених у поживному субстраті з різними концентраціями харчових компонентів (M±m)

Концентрація ХК	Вік, діб				
	7	15	21	28	35
100%	22,1±3,1	23,3±2,6	33,3±3,6	12,9±2,4	0,2±0,1
50%	4,9±2,2**	20,7±3,1	18,2±2,7**	8,9±1,9	0,4±0,1
10%	8,2±2,3**	13,1±2,4*	20,6±2,4*	9,8±1,9	0,2±0,1

Примітка. ХК – харчові компоненти. * – p<0,05; ** – p<0,01 у порівнянні зі 100 % (t-критерій Стьюдента).

Статистично значуще зниження фекандильності зафіксовано у самиць, вирощених у варіантах ПС, що містили менше 70 % ХК від нормального рівня. За умов розвитку дрозофіл у поживному субстраті із мінімальними концентраціями ХК – 20 % і 10 % яйцекладка була суттєво пригнічена, а тому на даному графіку цих даних немає (рис. 3).

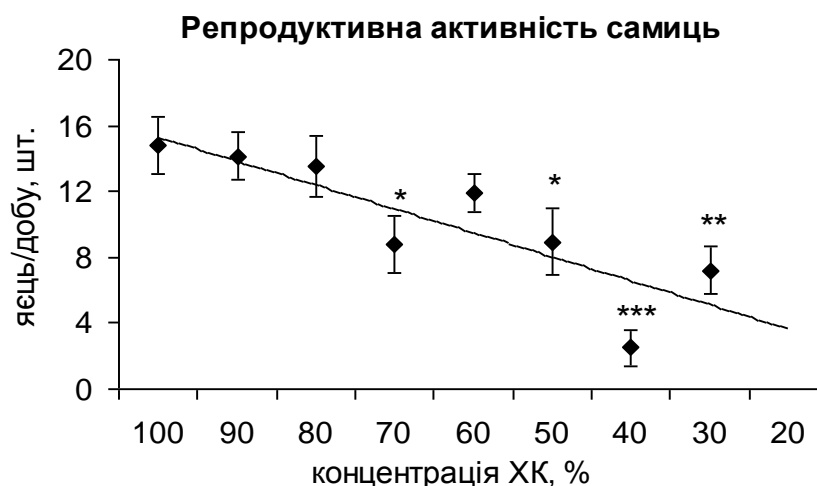


Рис. 3. Залежність репродуктивної активності самиць *D. melanogaster* від різних концентрацій харчових компонентів у поживному субстраті на стадії розвитку.

Примітка. ХК – харчові компоненти. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (t-критерій Стьюдента).

Вплив обмеження харчування впродовж розвитку на тривалість життя *D. melanogaster*. За допомогою однофакторного дисперсійного аналізу виявлено, що застосування ОХ на стадії розвитку плодових мушок впливає на ТЖ самців [$F=6,12$; $p < 0,001$], а у самиць достовірних розбіжностей зафіксовано не було. Так, в особин чоловічої статі, які розвивались у ПС із вмістом 50 % і 60 % ХК, спостерігалось достовірне збільшення середньої ТЖ порівняно з контролем (див. табл. 3).

Таблиця 3

Середня тривалість життя (дів) дрозофіл, які розвивались зі зниженими концентраціями харчових компонентів у поживному субстраті ($M \pm m$)

Концентрація ХК	Самці	Самиці
100%	61,1±1,2	79,6±1,3
90%	59±1,5	78±1,3
80%	63,5±1,4	81,8±1,2
70%	64,8±1,6	81,6±1,2
60%	67,7±1,4*	79±1,3
50%	67,7±1,2*	80,3±1,2
40%	60±1,6	76,5±1,6
30%	60,1±1,4	81,8±1,5
20%	63,9±1,5	76,2±2,4
10%	56,9±2	78,1±2,3

Примітка. ХК – харчові компоненти. * – $p < 0,001$ (методом дисперсійного аналізу та апостеріорних множинних порівнянь між групами).

Максимальна ТЖ самців була більшою за контрольний показник майже в усіх групах імаго (крім 30 % ХК). Зокрема, максимальна ТЖ сягала піку у мушок, які розвивались за умов 60 % ХК. А от після розвитку у 30%-й концентрації ХК максимальна ТЖ майже не відрізнялась від рівня контролю. Однак, у самців, вирощених за умов найбільших розведень – 10 % і 20 % ХК, максимальна ТЖ була статистично більшою за контрольний показник (табл. 4). Таке явище може бути пов'язане із тим, що, як відзначалось вище, за умов розвитку із мінімальною концентрацією ХК у личинок плодових мушок спостерігається виражена селекція, внаслідок якої виживають тільки найсильніші особини, котрі і мають здатність до найбільшої максимальної ТЖ.

Таблиця 4

Максимальна тривалість життя (дів) дрозофіл, які розвивались зі зниженням концентрації харчових компонентів у поживному субстраті ($M \pm m$)

Концентрація ХК	Самці	Самиці
100%	81,0±1,0	97,0±1,1
90%	89,0±1,2**	97,3±1,3
80%	89,3±1,4**	97,8±1,3
70%	87,9±0,3**	97,7±0,8
60%	93,0±1,6**	96,7±1,2
50%	90,3±1,0**	97,7±0,9
40%	88,0±2,1**	99,8±1,7
30%	84,3±1,4	99,7±0,5
20%	87,4±1,4*	100,3±0,7
10%	88,5±1,5*	97,3±1,2

Примітка. ХК – харчові компоненти. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ (методом дисперсійного аналізу та апостеріорних множинних порівнянь між групами).

У самиць, які розвивались в умовах ОХ, не виявлено достовірних відмінностей у показнику максимальної ТЖ порівняно із контрольними особинами (див. табл. 4). Варто зазначити, що такий результат суперечить даним багатьох інших досліджень, в яких збільшення ТЖ внаслідок ОХ істотніше проявлялось серед самиць, а не самців (Partridge et al., 2005). Відмінності впливу ОХ на представників різної статі були отримані і в інших роботах, однак їхні причини лишаються малодослідженими (Zeng et al., 2011).

Наслідки невідповідності умов харчування на стадії розвитку та в імаго *D. melanogaster*

У цій частині роботи застосували відмінні типи "раціону" на різних стадіях онтогенезу: личинок *D. melanogaster* вирощували у двох варіантах ПС – 20 % ХК і 100 % ХК. У дорослому віці мушок обох груп розділили на 2 частини кожену: дві підгрупи помістили на ПС зі 100 % ХК, а дві інші – із 20 % ХК (табл. 5).

Для виявлення впливу невідповідності типу харчування впродовж розвитку та у дорослому віці, попарно порівнювали середню ТЖ мушок різних підгруп. Залежно

від варіанту дієтичних умов на стадії імаго, підгрупи проаналізували наступним чином: спочатку співставили дві підгрупи з одним типом харчування у дорослому віці (100 % ХК), потім дві – з іншим (20 % ХК).

Таблиця 5

Умовні позначення груп дрозофіл із різними варіантами чергування концентрацій харчових компонентів у поживному субстраті протягом життя

Імаго Личинки	100% ХК	20% ХК
100% ХК	Л100/І100	Л100/І20
20% ХК	Л20/І100	Л20/І20

Примітка. ХК – харчові компоненти.

При порівнянні середньої ТЖ самців та самиць *D. melanogaster*, яким, незалежно від типу харчування на стадії личинки, у дорослому віці надавали стандартну кількість ХК, не було виявлено статистично значущих відмінностей (табл. 6).

Таблиця 6

Середня тривалість життя дрозофіл (діб), яким на стадії імаго надавали 100 % харчових компонентів (M±m)

Режим раціону	Самці	Самиці
Л100/І100	32,74±0,38	33,63±0,42
Л20/І100	32,46±0,45	34,13±0,64

На противагу цьому середня ТЖ імаго обох статей, які упродовж всього життя перебували в умовах ОХ – Л20/І20, була достовірно більшою порівняно із показником підгрупи мушок, для яких 20 % ХК у поживному субстраті застосували тільки після вилуплення – Л100/І20 (табл. 7).

Таблиця 7

Середня тривалість життя дрозофіл (діб), яким на стадії імаго надавали 20 % харчових компонентів (M±m)

Режим раціону	Самці	Самиці
Л100/І20	9,03±0,14	10,96±0,14
Л20/І20	10,17±0,13**	11,54±0,17*

Примітка. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$ (методом дисперсійного аналізу та апостеріорних множинних порівнянь між групами).

Зважаючи на це, можна підсумувати, що у деяких випадках експериментів на *D. melanogaster* підтверджується положення "гіпотези невідповідності" ("mismatch hypothesis"), за якою виникнення на стадії розвитку так званих "прогностичних адаптивних перебудов" призводить до збільшення постнатальної пристосованості

організму у випадку, коли умови існування до і після народження виявляються подібними (Gluckman & Hanson, 2004). Зокрема, це стосується відповіді на "харчовий дисбаланс", яка виникає на стадії розвитку, і надалі викликає збільшення життєздатності організму вже у дорослому віці.

Вплив харчової депривації батьків на тривалість життя нащадків *D. melanogaster*

В епідеміологічних дослідженнях показано, що ТЖ може залежати не тільки від раціону на стадії розвитку організму, але й від особливостей харчування його батьків перед їхнім схрещуванням, а отже, перед заплідненням (Saffery et al., 2012). У цій частині роботи досліджували вплив прекоцепційної харчової депривації самців і самиць батьківського покоління *D. melanogaster* на ТЖ їхніх нащадків. Самиці покоління F1 до схрещування були віргінними та до здійснення експериментальних маніпуляцій їх утримували окремо від самців. У такий спосіб прагнули виявити можливість передачі впливу на ТЖ за материнською лінією – через яйцеклітину, або за батьківською – через спермії. У віці 10-ти діб приблизно половина самців і самиць предкового покоління безпосередньо перед схрещуванням була піддана стресу ХД впродовж 13-ти год. Тривалість ХД, яку застосували в експерименті, була спеціально підібрана за результатами попередніх досліджень, як досить довга і, разом із тим, не летальна для дрозофіл. Після стресу здійснили різні варіанти схрещувань між "стресованими" та "нормальними" особинами. У результаті було отримано п'ять варіантів батьківських пар мушок (табл. 8).

Таблиця 8

Умовні позначення груп нащадків різних пар самиць і самців дрозофіл, між якими здійснили схрещування

	Самці без харчової депривації – ♂	Самці після харчової депривації – ♂ХД
Самиці без харчової депривації – ♀	♀×♂	♀×♂ХД
Самиці після харчової депривації – ХД♀	ХД♀×♂	ХД♀×♂ХД

Окремо одержали нащадків від батьків, для яких харчову депривацію застосували після схрещування – ♀×♂(сх-ХД).

Визначення параметрів життєздатності у нащадків. Як і передбачалось, не виявлено відмінностей у показниках преімагінальної виживаності між нащадками двох груп – ♀×♂ та ♀×♂(сх-ХД), а це свідчить про те, що застосування харчової депривації для запліднених самиць не впливало на життєздатність нащадків. Достовірне збільшення показника виявлено у представників груп ХД♀×♂ і ХД♀×♂ХД, в обох із яких харчову депривацію застосували до предків жіночої статі (табл. 9). На противагу цьому, статистично значуще зменшення преімагінальної виживаності виявлено у групі нащадків ♀×♂ХД, в яких харчову депривацію застосували тільки до предків чоловічої статі (див. табл. 9).

Таблиця 9

Преімагінальна виживаність нащадків різних варіантів схрещувань

Група нащадків	Кількість яєць, шт.	Кількість лялечок, шт.	Виж, Л/Я
♀×♂	674	371	0,55
♀×♂ХД	668	319	0,48*
ХД♀×♂	747	491	0,66**
ХД♀×♂ХД	818	671	0,82**
♀×♂(сх-ХД)	628	363	0,58

Примітка. Виж – виживаність на преімагінальній стадії; Л/Я – співвідношення кількості лялечок до кількості яєць. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$ у порівнянні зі ♀×♂ (метод χ^2).

У показнику середньої ТЖ не було виявлено статистично значущих відмінностей між нащадками предкових пар, які були піддані харчовій депривації після схрещування ♀×♂(сх-ХД) та тими, яких не піддавали стресу ♀×♂ (табл. 10).

Таблиця 10

Середня тривалість життя (діб) нащадків різних варіантів схрещувань

Група нащадків	Самці		Самиці	
	n	M±m	n	M±m
♀×♂	147	55,89±1,48	135	57,16±1,27
♀×♂ХД	140	57,41±1,56	112	55,43±1,06
ХД♀×♂	149	58,43±1,27	142	60,41±1,28*
ХД♀×♂ХД	148	56,31±1,48	150	60,68±1,68*
♀×♂(сх-ХД)	137	55,07±1,71	111	57,62±1,16

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно зі ♀×♂ (методом дисперсійного аналізу та апостеріорних множинних порівнянь між групами).

Дане явище свідчить про те, що застосування харчової депривації для запліднених самиць не сприяє зміні ТЖ вже зачатого потомства. За допомогою однофакторного дисперсійного аналізу показано, що харчова депривація предків саме жіночої статі перед схрещуванням достовірно вплинула на середню ТЖ лише нащадків-самиць [$F(3,53)=4,14$; $p < 0,05$]. А-от у чоловічих особин у жодній з експериментальних груп середня ТЖ суттєво не змінилась [$F(3,58)=1,04$, $p > 0,05$] (див. табл. 10).

Зважаючи на одержані результати, припустили, що ХД у матерів перед схрещуванням і заплідненням призводить до подовження життя їхніх нащадків жіночої статі. Разом із тим, ХД у батьків істотного значення не має. У зв'язку із цим, можна зробити висновок, що виявлені ефекти передаються переважно по материнській лінії. Ймовірно, це відбувається за допомогою певних факторів, локалізованих у цитоплазмі яйцеклітини, або ж є результатом специфічних

гормональних перебудов, що передаються від матері у той момент, коли яйцеклітина знаходиться всередині її організму.

Відомо, що у період до запліднення і формування зиготи епігенетичні процеси є вкрай сприйнятливими до впливу різних факторів середовища (Vaiserman, 2010). В імаго *Drosophila*, як і в інших *Diptera*, метилювання цитозинових основ ДНК майже не відбувається. Однак, на стадії личинки метилювання відіграє важливу роль в епігенетичних перебудовах (Vigne & Frelin, 2010a). Оскільки подібні адаптивні зміни на епігенетичному рівні можуть стійко відтворюватись протягом тривалого часу, ймовірно, вони призводять до підвищення життєздатності і, відповідно, до подовження життя наступного покоління самиць *D. melanogaster*.

Експресія генів *InR* і *dSir2* у *D. melanogaster* при застосуванні обмеження харчування на личинковій стадії

У багатьох дослідженнях виявлено, що ОХ призводить до глобальних змін транскрипційної активності генів у *D. melanogaster* (зокрема, *Rpd3*, *Indy*, *chico*, *methuselah* та *takeout*), які мають відношення до реалізації метаболічних та імунних функцій і реакції на стрес, а також відіграють суттєву роль у детермінації ТЖ мушок (Lian et al., 2015). Для перевірки того, чи може виявлене у роботі збільшення ТЖ самців *D. melanogaster* внаслідок застосування ОХ на личинковій стадії бути пов'язане із довгостроковими змінами епігенетичної регуляції асоційованих зі старінням генів, одним із завдань було визначення рівня експресії двох генів – *InR* та *dSir2*, які мають відношення до реалізації ефектів, спричинених обмеженим "раціоном".

У результаті проведення ПЛР-аналізу у реальному часі виявили, що при розвитку личинок за умов вмісту 20 % ХК у поживному субстраті виникає достовірне збільшення рівня транскрипції генів *InR* та *dSir2* порівняно з контролем (табл. 11).

Таблиця 11

Рівні експресії генів (у.о.) у личинок дрозофіл, яких утримували за умов вмісту 20 % харчових компонентів у поживному субстраті (M±m)

Концентрація ХК	<i>InR</i>	<i>dSir2</i>
100%	1,82±0,11	2,85±0,09
20%	2,77±0,12*	3,49±0,14*

Примітка. ХК – харчові компоненти. * – $p < 0,05$ (t-критерій Стьюдента).

Аналіз на стадії імаго у віці 6-ти діб продемонстрував суттєве підвищення рівня експресії гена *InR* у самців, вирощених у ПС, що містив 20 % ХК, чого не спостерігалось у самиць. Рівень експресії гена *dSir2* в імаго обох статей не відрізнявся від контролю (табл. 12).

Варто зауважити, що підвищення рівня експресії *InR* за умов ОХ у даній роботі суперечить результатам іншого дослідження, в якому подовження життя, навпаки, асоціювалось зі зниженням активності цього гену (Tatar et al., 2001). Проте, зважаючи на те, що у представленому дослідженні ОХ було більш суттєвим (20 %

ХК від норми), імовірно, збільшення рівня експресії гена *InR* стало компенсаторною реакцією на стресовий чинник, який впливав упродовж розвитку дрозофіл.

Таблиця 12

Рівні експресії генів (у.о.) в імаго дрозофіл, вирощених за умов вмісту 20 % харчових компонентів у поживному субстраті (M±m)

Концентрація ХК	Самці		Самиці	
	<i>InR</i>	<i>dSir2</i>	<i>InR</i>	<i>dSir2</i>
100%	1,56±0,13	1,53±0,07	1,95±0,08	1,34±0,14
20%	2,51±0,07*	1,32±0,12	2,03±0,12	1,44±0,08

Примітка. ХК – харчові компоненти. * – $p < 0,05$ (t-критерій Стьюдента).

Зміни активності ферментів системи антиоксидантного захисту в імаго *D. melanogaster* внаслідок застосування обмеження харчування на стадії розвитку

Активність ферментів СОД і каталази та рівень накопичення КПП визначили у плодових мушок, яких на стадії личинки утримували за умов концентрацій 50 % ХК. Параметри фіксували в імаго віком 15-ти і 20-ти діб. У самців, вирощених за умов вмісту 50 % ХК у поживному субстраті, виявлено підвищення активності СОД у віці як 15-ти, так і 20-ти діб. У самиць достовірної різниці у даному показнику не зафіксовано (табл. 13).

Таблиця 13

Активність антиоксидантних ферментів (мкмоль/хв*мг) в імаго *D. melanogaster* після розвитку за умов вмісту 50 % харчових компонентів у поживному субстраті (M±m)

Фермент	Вік, діб	Самці		Самиці	
		100% ХК	50% ХК	100% ХК	50% ХК
СОД	15	0,105±0,012	0,14±0,006*	0,097±0,012	0,075±0,005
	20	0,09±0,01	0,146±0,014*	0,12±0,009	0,286±0,148
Каталаза	15	0,574±0,037	0,773±0,068*	0,508±0,04	0,369±0,04
	20	1,127±0,195	0,797±0,072	0,688±0,167	0,568±0,083

Примітка. ХК – харчові компоненти. * – $p < 0,05$ (t-критерій Стьюдента).

Підвищення активності другого дослідженого у роботі ферменту – каталази – відмічено у 15-тидобових самців, яких на стадії розвитку утримували за умов вмісту 50 % ХК у поживному субстраті порівняно з контролем (див. табл. 13). У самиць достовірної різниці не виявлено. Можна припустити, що виявлені зміни активності СОД та каталази відіграють роль у продемонстрованому збільшенні ТЖ самців *D. melanogaster*.

У цій експериментальній частині роботи також визначали рівень накопичення КПП в імаго *D. melanogaster*, вирощених за умов ОХ. Оскільки було показано, що у молодих мушок віком 10-ти діб вміст КПП на 44 % менший, ніж у старих комах у

віці 75-ти діб (Oudes et al., 1998), Jacobson et al. запропонували використовувати рівень накопичення КПП як біомаркер старіння у *Drosophila* (Jacobson et al., 2010).

Застосування 50%-го ОХ на стадії розвитку призвело до достовірного зниження рівня накопичення КПП як у самців, так і у самиць віком 20 діб (табл. 14).

Таблиця 14

Вміст кінцевих продуктів глікозилювання (мг/мл) в імаго *D. melanogaster* після розвитку за умов вмісту 50 % харчових компонентів у поживному субстраті (M±m)

Вік, діб	Самці		Самиці	
	100% ХК	50% ХК	100% ХК	50% ХК
15	63,238±5,106	68,952±9,79	15,859±1,845	10,818±2,07
20	100,445±13,658	58,14±9,184*	22,893±2,687	12,794±1,42*

Примітка. ХК – харчові компоненти. * – $p < 0,05$ (t-критерій Стьюдента).

Важливо, що ферменти системи антиоксидантного захисту є досить нестійкими сполуками, а тому мушки у віці 15-20-ти діб після вилуплення з лялечок не мають молекули цих ферментів, які синтезуються протягом преімагінального розвитку. Зважаючи на це, можна припустити, що виявлені на молекулярному та біохімічному рівнях зміни, пояснюються довгостроковими епігенетичними модифікаціями. Можливість подібних перебудов, викликаних стресами на ранніх етапах життя, продемонстрована у попередніх частинах цієї роботи.

ВИСНОВКИ

Зважаючи на результати роботи, можна припустити, що кількісне обмеження харчування на стадії розвитку викликає збільшення тривалості життя у самців *D. melanogaster*. Показано епігенетичну природу цього явища, яку підтверджено даними молекулярно-генетичного та біохімічного аналізів. Відповідно до поставлених завдань дисертаційної роботи сформульовано наступні висновки:

1. Показано, що розведення харчових компонентів у поживному середовищі до концентрацій 10 % і 20 % порівняно зі 100 % контролю спричиняє підвищення рівня смертності плодових мушок на преімагінальній стадії. Тривалість розвитку личинок, починаючи із 40%-ї концентрації, зростає пропорційно зменшенню вмісту компонентів харчування у поживному субстраті. В імаго *D. melanogaster* обмеження харчування на стадії розвитку більше 50 % призводить до зменшення маси тіла.

2. Зафіксовано підвищення стійкості до 18-тигодинної харчової депривації у самців, вирощених у поживному середовищі із 50 % харчових компонентів, тоді як у самиць цього не виявлено. За аналогічних умов не відмічено достовірних відмінностей у стійкості до теплового шоку у представників обох статей.

3. Показано, що внаслідок розвитку дрозофіл у поживному субстраті із концентрацією менше 70 % харчових компонентів знижується репродуктивна активність та фертильність самиць.

4. Зафіксовано достовірне збільшення середньої тривалості життя самців після розвитку у поживному середовищі, що містило 50 % і 60 % харчових компонентів. Показник максимальної тривалості життя майже за будь-якого варіанту обмеження "раціону" впродовж розвитку був більшим за контрольний.

5. Підтверджено основне положення "гіпотези невідповідності", зокрема, зменшення вмісту харчових компонентів до 20 % у поживному субстраті личинок *D. melanogaster* призводило до подовження життя лише у тому випадку, якщо мушок утримували із аналогічним типом "дієти" і на стадії імаго.

6. Показано, що 13-тигодинна харчова депривація у самиць, але не у самців, перед схрещуванням призводить до подовження життя їхніх нащадків жіночої статі.

7. У личинок, які розвивались за умов обмеження харчування, виявлено збільшення рівня транскрипції генів *InR* та *dSir2* порівняно з контролем. На стадії імаго цих самих дрозофіл статистично значуще підвищення рівня експресії *InR* зафіксоване тільки у самців, але не у самиць; для гена *dSir2* відмінностей не виявлено.

8. Після розвитку за умов вмісту 50 % харчових компонентів у поживному середовищі у самців зафіксовано підвищення активності супероксиддисмутази та каталази. За аналогічних умов зменшення рівня накопичення кінцевих продуктів глікозилювання виявлено у дрозофіл обох статей віком 20 діб.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

КПГ – кінцеві продукти глікозилювання;

ОХ – обмеження харчування;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

ПС – поживний субстрат;

СОД – супероксиддисмутаза;

ТЖ – тривалість життя;

ТШ – тепловий шок;

ХД – тимчасова повна харчова депривація;

ХК – харчові компоненти;

GAPDH – гліцеральдегід-фосфатдегідрогеназа, ген "домашнього господарства";

InR – ген рецептора інсуліну;

dSir2 – ген сіртуїну-2 дрозофіли.

СПИСОК ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вайсерман А. М., Федоренко Е. А., Кошель Н. М., Мехова Л. В., Писарук А. В., Бажинова А. И., Коляда А. К., **Забуга О. Г.**, Войтенко В. П. Влияние ограничения компонентов рациона питания в период стадии развития на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* // Проблемы старения и долголетия. – 2011. – Т. 20, № 4. – С. 361–370. (Здобувач проаналізувала життєві характеристики та тривалість життя плодових мушок).

2. Вайсерман А. М., **Забуга О. Г.**, Бажинова А. И., Кошель Н. М., Войтенко В. П. Влияние ограничения питательных веществ на различных этапах онтогенеза на жизнеспособность и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* // Проблемы старения и долголетия. – 2012. – Т. 21, № 4. – С. 462–469. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних маніпуляцій та оформленні отриманих даних у таблиці та рисунки).

3. **Забуга О. Г.**, Кошель Н. М., Коляда А. К., Вайсерман А. М. Влияние голода во время прекоцепционного периода у родителей на продолжительность жизни потомков у *Drosophila melanogaster* // Проблемы старения и долголетия. – 2012. – Т. 21, № 4. – С. 470–477. (Здобувач приймала участь в експерименті, оформила отримані дані та здійснила статистичну обробку).

4. Vaiserman A. M., Koljada A. K., **Zabuga O. G.** Effect of Dietary Restriction during Development on the Level of Expression of Longevity-Associated Genes in *Drosophila melanogaster* // Advances in Gerontology. – 2014. – Vol. 4, No 3. – P. 193–196. (Здобувач приймала участь у постановці експерименту, самотійно проаналізувала та оформила отримані дані, здійснила статистичну обробку, переклала та підготувала статтю до публікації).

5. **О. Забуга**, О. Коляда, О. Вайсерман. Вплив зменшення концентрації поживних речовин у харчовому субстраті на стадії розвитку на тривалість життя й експресію пов'язаних зі старінням генів *InR* та *dSir2* у *Drosophila melanogaster* // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2015. – Вип. 69. – С. 111–118. (Здобувач приймала участь у постановці експерименту, досліджувала життєві характеристики плодових мушок і здійснила статистичну обробку).

6. **О. Г. Забуга**, О. К. Коляда, В. М. Кухарський, А. І. Бажинова, О. М. Вайсерман. Вплив обмеження харчування в період розвитку *Drosophila melanogaster* на активність ферментів системи антиоксидантного захисту // Фізіологічний журнал. – Т. 61, № 6. – С. 113–118. (Здобувач проаналізувала та оформила отримані дані, здійснила статистичну обробку).

7. **Zabuga O. G.**, Akhaladze N. G., Vaiserman A. M. Nutritional Programming: Theoretical Concepts and Experimental Evidence // Advances in Gerontology. – 2014. – Vol. 4, No. 1. – P. 3–11. (Особистий внесок здобувача полягає у дослідженні тривалості життя дрозофіл, опрацюванні літературних джерел та перекладі статті).

Тези доповідей:

1. **Забуга О. Г.**, Кошель Н. М., Коляда А. К., Бажинова А. И., Вайсерман А. М. Влияние ограничения рациона в период развития на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* // Матеріали Х міжнародної наук. конф. студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012: біологічні науки» (м. Київ, 19-23 березня 2012 р.). – Київ: 2012. – С. 116–117.

2. **Забуга О. Г.**, Коляда А. К., Кошель Н. М., Бажинова А. И., Вайсерман А. М. Влияние калорийного ограничения рациона в раннем онтогенезе на жизнеспособность и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* // Материалы III-ей международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» (г. Канев, 12-16 мая 2012 г.). – Киев: Фитосоцицентр. – 2012. – С. 20–22.

3. **Забуга О. Г.**, Кошель Н. М., Коляда А. К., Бажинова А. И., Вайсерман А. М. Влияние ограничения рациона в период развития на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* // X Международный симпозиум «Биол. механизмы старения» (Харьков, 16-19 мая 2012 г.). – Харьков: 2012. – С. 24.

4. **Забуга О. Г.**, Кошель Н. М. Вплив обмеження харчування на різних етапах онтогенезу на життєздатність та тривалість життя *Drosophila melanogaster*: експериментальна перевірка «гіпотези невідповідності» // Тезиси докладов XI научної конференції молодих учених с міжнародним участієм, посвященая памяти академика В.В. Фролькиса (г. Киев, 25 января 2013 г.). [Електр. ресурс]: <http://antiaging.org.ua/abstracts-of-frolkis-conference/fc-2013/514-zabuga-koshel>.

5. В. М. Кухарський, К. В. Гаврилюк, **О. Г. Забуга**. Механізми реалізації феномену подовження тривалості життя, за умов калорійної рестрикції, на ранніх етапах онтогенезу *Drosophila melanogaster* // Научно-практическая конференция и школа с международным участием, посвященная 90-летию со дня рождения академика В.В.Фролькиса «Современные аспекты геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (г. Киев, 26-27 мая 2014 г.). – Киев: 2014. – № 21.

АНОТАЦІЯ

Забуга О. Г. Вплив обмеження харчування в період розвитку на параметри життєздатності та тривалість життя *Drosophila melanogaster* – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю **03.00.13** – фізіологія людини і тварин. Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2016.

Дисертація присвячена дослідженню змін тривалості життя *Drosophila melanogaster* внаслідок обмеження харчування на стадії розвитку. Показано, що у личинок, яких утримували у поживному субстраті із вмістом харчових компонентів менше 60 %, наявне істотне збільшення тривалості розвитку, а за концентрацій 10 і

20 % – суттєве збільшення смертності на преімагінальній стадії. Підвищення стійкості до стресу харчової депривації зафіксовано у самців, вирощених у поживному середовищі із 50 % харчових компонентів. Виявлено достовірне зниження фертильності самиць, яких утримували на етапі розвитку у "неповноцінному" поживному субстраті. Обмеження харчування на стадії личинки викликало збільшення середньої та максимальної тривалості життя самців, проте, не самиць. Застосування перед схрещуванням 13-тигодинної харчової депривації в особин жіночої статі (але не самців) призвів до подовження життя їхніх нащадків-самиць. Значуще збільшення транскрипції генів *InR* та *dSir2* виявлене у личинок *D. melanogaster* при розвитку за умов 20%-го вмісту харчових компонентів у поживному субстраті порівняно з контролем. У дорослому віці зафіксовано підвищення рівня експресії одного дослідженого гену – *InR* тільки у самців плодових мушок. Виявлено збільшення активності СОД і каталази в особин чоловічої статі, після розвитку за умов 50%-го обмеження харчування. Зменшення рівня накопичення кінцевих продуктів глікозилування зафіксовано у всіх 20-тидобових дрозофіл, які розвивались у поживному субстраті із вмістом 50 % компонентів харчування. Можна припустити, що виявлені на молекулярному та біохімічному рівнях зміни пояснюються довгостроковими епігенетичними модифікаціями, які виникають внаслідок обмеження харчування на стадії розвитку та сприяють збільшенню тривалості життя імаго *D. melanogaster*.

Ключові слова: обмеження харчування, *Drosophila melanogaster*, стадія розвитку, тривалість життя, епігенетичні механізми, пов'язані зі старінням гени, антиоксиданти ферменти.

АННОТАЦІЯ

Забуга О. Г. Влияние ограничения питания в период развития на параметры жизнеспособности и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* – Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности **03.00.13** – физиология человека и животных. Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена исследованию изменений продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* вследствие ограничения питания на стадии развития. Показано, что личинкам, которые пребывали в питательной среде, содержащей менее 60 % пищевых компонентов, свойственно существенное увеличение длительности развития, а при концентрациях 10 и 20 % – значительное увеличение преімагінальної смертності. Повышение уровня стойкости к стрессу пищевой депривации зафиксировано у самцов, выращенных в питательной среде с 50 % пищевых компонентов. Показано достоверное уменьшение фертильности самок, которых на этапе развития содержали в "неполноценном" пищевом субстрате. Ограничение питания на стадии личинки способствовало увеличению средней и максимальной продолжительности жизни самцов, но не самок. Применение перед скрещиванием 13-тичасовой пищевой депривации у особей женского пола (но не

мужского) привело к удлинению жизни их потомков-самок. Существенное увеличение транскрипции генов *InR* и *dSir2* обнаружено у личинок *D. melanogaster* при развитии в питательной среде с 20%-ой концентрацией пищевых компонентов по сравнению с контролем. Во взрослом возрасте зафиксировано повышение уровня экспрессии одного исследуемого гена – *InR* только у самцов плодовых мушек. Продемонстрировано увеличение активности СОД и каталазы у представителей мужского пола, которые развивались в условиях 50%-го ограничения питания. Уменьшение уровня накопления конечных продуктов гликозилирования зафиксировано у всех 20-тисуточных дрозофил, которые развивались в питательном субстрате с 50%-ой концентраций пищевых компонентов. Можно предположить, что выявленные на молекулярном и биохимическом уровне изменения объясняются долгосрочными эпигенетическими модификациями, которые возникают вследствие ограничения питания на стадии развития и способствуют увеличению продолжительности жизни самцов *D. melanogaster*.

Ключевые слова: ограничение питания, *Drosophila melanogaster*, стадия развития, продолжительность жизни, эпигенетические механизмы, ассоциированные со старением гены, антиоксидантные ферменты.

SUMMARY

Zabuga O. G. The Effect of Dietary Restriction during Development on Fitness and Life Span of *Drosophila melanogaster* – Manuscript.

The thesis for gaining the scientific degree of the candidate of biological sciences in speciality **03.00.13** – Human and Animal Physiology. Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

The dissertation is focused on the changes in life span and fitness of *Drosophila melanogaster* that are resulted by the dietary restriction implemented during development. There is shown that the larvae reared in the culture medium that contained food components under the concentration of 60% had the significant increase in the duration of their development. The larvae reared in the culture medium with the food components' concentrations of 10% and 20% had the increase in their mortality. The flies reared in the culture medium with the minimal concentration of food components have been characterised with the decrease in their average body weight.

There has been recorded the increase in the resistance to a complete food deprivation in the males developed in the culture medium that contained 50% of food components compared to the control. There hasn't been detected the same effect in the female flies.

The females aged of 7, 15 and 21 days reared in the culture medium with the food components' concentration of 50% had their fertility reduced compared to the control.

At the same time, those female flies showed no significant differences in the mean and maximum life span compared to the control population. In contrast the dietary restriction significantly effected on the life expectancy of the males. Thus the male flies developed in the culture medium that contained 50% and 60% of food components had the increase in the average life span for 11%.

The results of the research confirm the "mismatch hypothesis". Thus if flies have been developed in the 100% culture medium but being adult have been maintained with the dietary restriction, they had the almost three fold decrease in the average life span. In the contrary, when flies have been maintained in the conserve restricted diet conditions throughout all their ontogenesis they demonstrated the significant increase in the average life expectancy.

There have been indicated that only mothers' (nor fathers') 13-hour food deprivation before mating and fertilization had led to the increase in the lives of their female descendants. Such an effect haven't been detected in the male descendants.

The development in the culture medium that contained 20% of food components resulted into the increase in the transcription levels of a *dSir2* and an *InR* genes compared to the control. The significant increase in the *InR* expression has been detected only in the adult males reared in the dietary restriction but not in the females.

In the male flies the 50% dietary restriction implemented during the development resulted into the increase in SOD activity in the age of 15 and 20 days as well as catalase activity at the 15 day of life. Also there has been demonstrated the reduction in the advanced glycation end-products' (AGEs) accumulation in both male and female *D. melanogaster* reared in the culture medium that contained 50% of food components.

It should be assumed that identified at the molecular and biochemical level changes can be explained by the long-term epigenetic modifications that occur as a result of dietary restriction at the stage of development and lead to the increase in the life span of the male *D. melanogaster*.

Keywords: dietary restriction, *Drosophila melanogaster*, developmental stage, life span, epigenetic mechanisms, ageing-related genes, antioxidant enzymes.