

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ**  
**ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України»**

*На правах рукопису*

**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

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:  
Вайсерман Олександр Михайлович,  
доктор медичних наук,  
старший науковий співробітник

Київ – 2016

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....   | 4  |
| ВСТУП .....   | 5  |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....   | 13 |
| 1.1. Застосування обмеженого харчування в експериментальних моделях ..  | 13 |
| 1.2. Експерименти з модифікаціями харчуванням у безхребетних тварин ...   | 16 |
| 1.2.1. Обмеження харчування на стадії розвитку комах .....  | 18 |
| 1.3. Застосування обмеженого харчування в імаго <i>D. melanogaster</i> .....  | 19 |
| 1.3.1. Токсичний ефект харчових компонентів .....   | 22 |
| 1.3.2. Баланс амінокислот у поживному середовищі .....  | 23 |
| 1.4. Зміни поведінки <i>D. melanogaster</i> при обмеженні харчування .....  | 24 |
| 1.5. Особливості реакцій на обмеження харчування у різних лабораторних<br>ліній <i>D. melanogaster</i> .....                              | 25 |
| 1.6. Залежні від статі розбіжності у реакціях на обмеження харчування.....  | 26 |
| 1.7. Епігенетичні та біохімічні зміни за умов стресу у <i>D. melanogaster</i> .....   | 29 |
| 1.8. Висновки та постановка задач дослідження .....   | 36 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....  | 38 |
| 2.1. Умови утримання <i>D. melanogaster</i> .....   | 38 |
| 2.2. Варіанти обмеження харчування у <i>D. melanogaster</i> .....   | 41 |
| 2.3. Статистична обробка результатів .....  | 55 |
| РОЗДІЛ 3. ЗМІНИ ПАРАМЕТРІВ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ПРИ<br>ЗАСТОСУВАННІ ОБМЕЖЕННЯ ХАРЧУВАННЯ НА СТАДІЇ ЛИЧИНКИ                                      | 56 |
| 3.1. Зміни тривалості розвитку та преімагінальної виживаності внаслідок<br>обмеження харчування.....                                      | 57 |
| 3.2. Вплив обмеження харчування впродовж личинкової стадії на параметри<br>життєздатності імаго .....                                     | 59 |
| 3.3. Тривалість життя <i>D. melanogaster</i> , вирощених за умов різних<br>концентрацій харчових компонентів у поживному середовищі ..... | 64 |

|  |     |
|--|-----|
| РОЗДІЛ 4. СПАДКУВАННЯ ЕФЕКТІВ ОБМЕЖЕННЯ ХАРЧУВАННЯ У НАЩАДКІВ <i>Drosophila melanogaster</i> .....   | 73  |
| 4.1. Наслідки невідповідності умов харчування на стадії личинки та на стадії імаго .....   | 73  |
| 4.2. Вплив 13-тигодинної харчової депривації батьків на тривалість життя нащадків.....   | 77  |
| РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ОБМЕЖЕННЯ ХАРЧУВАННЯ НА ЛИЧИНКОВІЙ СТАДІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ПОВ'ЯЗАНИХ ІЗ ТРИВАЛІСТЮ ЖИТТЯ ГЕНІВ ТА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЗАХИСТУ У <i>Drosophila melanogaster</i> ..... | 83  |
| 5.1. Зміни експресії генів у личинок та імаго <i>D. melanogaster</i> у відповідь на обмеження харчування.....  | 83  |
| 5.2. Оксидативний стрес за умов обмеження харчування.....  | 85  |
| 5.2.1. Зміни активності антиоксидантних ферментів в імаго <i>D. melanogaster</i> внаслідок застосування обмеження харчування на стадії личинки .....   | 87  |
| 5.2.2. Рівень накопичення кінцевих продуктів глікозилювання в імаго <i>D. melanogaster</i> після застосування обмеження харчування на стадії личинки .....   | 88  |
| 5.3. Висновок до розділу .....   | 88  |
| РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ..  | 90  |
| ВИСНОВКИ.....  | 111 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....  | 113 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АФК – активні форми кисню;  
КОХ – калорійне обмеження харчування;  
КППГ – кінцеві продукти глікозилювання;  
ОХ – обмеження харчування;  
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;  
ПС – поживне середовище;  
СОД – супероксиддисмутаза;  
ТЖ – тривалість життя;  
ТШ – тепловий шок;  
у.о. – умовні одиниці;  
ХК – харчові компоненти;  
ХД – тимчасова повна харчова депривація;  
*chico* – ген *CG5686*, субстрат інсулінового рецептору;  
dFOXO – транскрипційний фактор інсулінової відповіді на стрес дрозофіли;  
dNTPs – диоксинуклеотид трифосфати;  
*dSir2* – ген сіртуїну-2 дрозофіли;  
EAAAs – незамінні амінокислоти;  
FOXO – транскрипційний фактор інсулінової відповіді на стрес;  
*GAPDH* – гліцеральдегід-фосфатдегідрогеназа, ген "домашнього господарства";  
HSPs – білки теплового шоку;  
IGF – інсулін-подібний фактор росту;  
IIS – IGF-подібний сигнальний шлях;  
*InR* – ген рецептору інсуліну;  
SIR2 – сіртуїн-2;  
TOR – target of rapamycin, мішень рапаміцину;  
TSP – шлях транссульфурування.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Відомо, що обмеження харчування (ОХ) впливає на тривалість життя (ТЖ) багатьох організмів [143, 168, 212, 218]. Зокрема, виявлено, що поступове скорочення енергетичної цінності у межах 20-40 % від "нормальної" збільшує ТЖ у різних видів організмів: дріжджів, нематод, павуків, комах, мишей та щурів. Дослідження на приматах (макак-резусах) також показали, що, зокрема, калорійне обмеження харчування (КОХ) попереджає абдомінальне ожиріння, діабет, гіпертонію та серцево-судинні захворювання [168]. Виходячи із цих даних можна припустити, що ОХ має здатність викликати захисний ефект від старіння і у людей, вірогідно, зменшуючи ризик серцево-судинних захворювань та метаболічної патології.

Раніше вважалось, що КОХ змінює темп старіння внаслідок уповільнення інтенсивності метаболізму. Проте пізніше у деяких тварин в умовах КОХ був зафіксований такий же та дещо інтенсивніший метаболізм, ніж у контрольних особин [187, 246]. Інші гіпотези пояснюють вплив КОХ зміною рівнів глюкокортикоїдів та жирів, або чутливості клітин до проапоптичних факторів [143]. Оскільки у багатьох наукових джерелах наводяться дані про наявність позитивної кореляції між дією м'якого стресу і збільшенням ТЖ (зокрема, в експериментах на комахах), стала звичною думка, що аналогічне явище може проявлятися і за умов КОХ. Згідно із "гормезисною гіпотезою", КОХ є низько-інтенсивним стресом для організму та провокує захисну відповідь, сприяючи зниженню інтенсивності дії певних чинників старіння. На даний час ця гіпотеза видається найбільш адекватною, враховуючи збільшення концентрації кортикостерону за умов застосування низькокалорійної дієти [144]. До того ж вона є універсальною для пояснення всього різноманіття даних по застосуванню КОХ як на вищих тваринах, так і у нижчих організмів.

Виявлено, що недостатнє внутрішньоутробне харчування є одним із найважливіших факторів, які призводять до розвитку захворювань у подальшому житті (концепція "метаболічного програмування") [32]. Як відомо, адаптація до різних несприятливих умов навколишнього середовища під час раннього розвитку як у тварин, так і у людей впливає на чутливість організму до захворювань в більш пізньому віці, таких як серцево-судинні та нейродегенеративні патології, рак, а також цукрового діабету 2-го типу [78, 80, 81]. Наприклад, Л. П. Хорошиніна у 2002 р. продемонструвала наявність прискореного розвитку багатьох соматичних захворювань у людей середнього та похилого віку, які у дитинстві пережили блокаду Ленінграда. До того ж, ці особи вмирали достовірно раніше (на 1,3-1,8 років), ніж люди контрольної групи. Дослідниця зробила висновок, що вплив екстремальних чинників, і, насамперед, тривалого голодування, викликає дисфункцію багатьох регуляторних систем: гіпоталамо-гіпофізарно-ендокринних структур, ендотелію судин, зміни тонуусу симпатичної нервової системи, що призвело у кінцевому рахунку до розвитку пов'язаної із віком патології і прискореного старіння організму [16].

До цього часу вже проведено багато досліджень довгострокових наслідків недостатнього та надмірного споживання їжі під час вагітності на багатьох тваринних моделях [226]. Подібні роботи, зазвичай, демонструють зміни у структурі основних органів, таких як нирки і підшлункова залоза [118]. Ці ефекти відповідають концепції, що впливи під час розвитку можуть призводити до стабільних змін органів та систем організму [81].

Свого часу Osborne et al. на щурах виявили, що ОХ затримує ріст та збільшує ТЖ [171]. Того ж року подібне явище продемонстрували Loeб, Northrop на дрогофілах [131]. Проте, основоположником цього напрямку досліджень вважається С. М. McCay з Корнельського університету. У своїх перших експериментах група дослідників, яку він очолював, не звертала уваги на склад дієти, але у подальшому обмежували тільки споживання жиру і вуглеводів, тоді як кількість білку, мінеральних солей і вітамінів не

зменшували. У такий спосіб вчені встановили, що обмеження калорій на 30-50 % збільшує максимальну і середню ТЖ щурів та мишей [151].

До 70-х років феномен збільшення ТЖ внаслідок КОХ вже був відтворений у лабораторіях багатьох країн світу, у тому числі й у СРСР, де ним займались В. В. Фролькіс та Х. К. Мурадян [15]. Завдяки цим фундаментальним роботам модель впливу на механізми старіння і збільшення ТЖ за допомогою дієтичної рестрикції стала однією із провідних у дослідженнях уповільнення багатьох вікових біохімічних, фізіологічних і поведінкових параметрів [2].

А. Richardson et al. першими застосували методи молекулярної біології для вивчення впливу КОХ на процес старіння [194]. У 2002 р. було отримано перші дані про вплив КОХ на експресію генів завдяки використанню технології мікрочіпів [235].

Незважаючи на це, механізми процесу уповільнення старіння внаслідок впливу ОХ ще остаточно не з'ясовані. Крім того, до якогось часу вважалось, що саме загальне зниження споживання калорій, а не якого-небудь компонента дієти має визначати геропротекторний ефект голодування [236]. Проте пізніше виявили, що КОХ збільшує ТЖ не в усіх видів тварин [143]. На сьогоднішній день вже багато робіт демонструють експериментальні підтвердження того, що саме обмеження певних поживних речовин у харчуванні, а не КОХ загалом, може впливати на ТЖ комах, у тому числі й *D. melanogaster* [48, 101, 217, 230].

Слід підкреслити, що наслідки ОХ на стадії раннього дорослого життя були вивчені досить детально, тоді як його вплив впродовж розвитку на виживаність дорослих особин та їхню ТЖ досліджувався лише у декількох роботах. У людей експериментальні дослідження довгострокових наслідків впливу ОХ на стадії розвитку не є можливими з етичних міркувань та через їхню велику тривалість. У зв'язку із цим є необхідність проводити ретельно контрольовані експерименти на тваринах.

Застосування ОХ у личинки для вивчення його впливу на ТЖ *D. melanogaster* започаткували у своїх експериментах вчені Tu і Tatar [225]. Виявили, що утримання личинок *D. melanogaster* у поживному середовищі (ПС) без дріжджів (білки) призвело до розвитку імаго меншого розміру, зі зниженням репродуктивної активності у самиць, однак без змін показника ТЖ. Пізніше, Joy et al. здійснили експеримент на комарах виду *Aedes aegypti* і показали зовсім інший результат: комахи, які розвивались на "дієті" з обмеженням поживних речовин, жили істотно довше, ніж у контролі, незалежно від типу харчування на стадії імаго [109].

Таким чином, актуальність даного дослідження зумовлена тим, що на сьогодні досі немає остаточного розуміння механізмів реалізації впливу ОХ у період раннього розвитку на ТЖ дорослого організму. Результати цієї роботи можуть стати фундаментом для розробки методики прогнозування та профілактики негативних наслідків від неадекватного харчування впродовж розвитку. Екстраполяція даних дослідження 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 *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 дослідження: виділення РНК, зворотна транскрипція, кількісний ПЛР-аналіз у реальному часі. Біохімічні: колориметричний метод. Статистичні методи: непараметричні ( $\chi^2$ ) 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*. Продemonстровано, 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 дрозофіл. 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.

Продemonстровано, 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 помірного обмеження харчування на стадії розвитку дрозофіли 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 [27, 34, 181]. 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 проведені безпосередньо нею або за її участі. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено статистичну обробку результатів досліджень, аналіз та узагальнення одержаних даних, сформульовані основні положення та 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, що включені до дисертації, оприлюднені на засіданнях сектору "Біології старіння" ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», а також на 6 конференціях: X Міжнародній науковій конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012: біологічні науки» (Київ, 19-23 березня 2012 р.); III Міжнародній конференції «Дрозофила в експериментальній генетикі та біології» (Канів, 12-16 травня 2012 р.); X Міжнародному симпозіумі «Биологические механизмы старения» (Харків, 16-19 травня 2012 р.); XI науковій конференції молодих учених з міжнародною участю, присвяченій пам'яті академіка В. В. Фролькіса (Київ, 25 січня 2013 р.); Науково-практичній конференції і школі з міжнародною участю, присвяченій 90-літтю від дня народження академіка В. В. Фролькіса

«Современные аспекты геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Київ, 26-27 травня 2014 р.); IV Міжнародній конференції «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології» (Львів, 6-10 жовтня 2014 р.). Результати дослідження увійшли до звітів лабораторії.

**Публікації.** За матеріалами 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 дисертаційної роботи,** 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, у яких викладено результати власних досліджень, розділу, присвяченого аналізу і узагальненню результатів дослідження, висновків та списку використаних джерел із 252 найменувань. Повний обсяг дисертації становить 140 сторінок; робота містить 13 таблиць та ілюстрована 13-ма рисунками.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1. Застосування обмеженого харчування в експериментальних моделях**

Неодноразово продемонстровано, що КОХ – це найбільш ефективний засіб уповільнення старіння та подовження життя у різних короткоживучих лабораторних тварин [161, 212]. Важливо відзначити, що переведення тварин на 40 % і більше КОХ супроводжується загибеллю частини піддослідних тварин (до 30 %) на перших етапах адаптації, що, по суті, виробляє жорсткий відбір потенційних "довгожителів". В особин, які пройшли такий відбір, КОХ уповільнює процеси розвитку та виникнення асоційованої з віком патології, а також збільшує ТЖ [2].

Вченими було висловлено припущення, що одним із механізмів геропротекторної дії КОХ може бути гормезис, оскільки його можна розглядати як м'який стресовий фактор. У щурів і мишей при цьому посилюється продукування стресових білків, підвищується рівень кортизолу у крові, проте частково знижується імунітет [145]. Пізніше Masoro [142] припустив, що геропротекторна дія КОХ може бути пов'язана зі стійким зниженням рівня глюкози та інсуліну у плазмі крові, а також багатьох інших гормонів. Деякою мірою це схоже на явища, характерні для гіпофізектомії. Раніше було встановлено, що КОХ зменшує глікозилювання білків і нагромадження продуктів глибокого глікозилювання [62]. Виходячи із цього, а також із даних про те, що гіперглікемія і гіперінсулінемія чинять подібний до старіння згубний вплив, вчений припустив, що вплив низькокалорійної дієти зумовлений саме цим механізмом [142, 143]. У той же час виявлено, що

тварини, які перебувають на КОХ, є більш чутливими до дії стресових факторів, аніж ті, які утримуються за умов стандартного харчування [2, 143].

На відміну від постнатального КОХ, яке у щурів та мишей пов'язане із уповільненням старіння, пренатальне обмеження калорій зменшує ТЖ ссавців [214]. Ще на початку XX століття було показано, що неадекватне харчування на стадії розвитку у гризунів негативно впливає не лише на розміри тіла, але й на фізичну активність, репродуктивну здатність, захворюваність, смертність, та, як наслідок, на ТЖ [209-211]. В Індії Robert McCarrison [148] експериментально довів наявність впливу людської дієти на розвиток гризунів, показавши, що особини, яких утримували на типовому для Південної Азії рисовому раціоні, росли повільніше у порівнянні із тими, котрі перебували на характерному для Північної Європи раціоні, що містив достатню кількість білків та мікроелементів. Подальші класичні дослідження на щурах впродовж 1960-70-х років ілюструють різні наслідки голодування для розвитку, і особливо характерною є наявність їхньої залежності від часу та тривалості втручань у харчування [147, 239, 240]. Наприклад, щури, які перебували на ОХ протягом ембріонального періоду та у ранньому дитинстві, залишались невеликими протягом всього свого подальшого життя, а ті, для яких застосували ОХ пізніше, демонстрували лише тимчасове уповільнення зростання [147].

У найбільш ранніх експериментах щодо вивчення явищ харчового програмування на тваринних моделях вчені намагались впливати на вагу при народженні. Для цього застосовували материнське КОХ [241] або перев'язку маткових артерій [173], у результаті чого плід не отримував достатньої кількості поживних речовин. В інших роботах використовували експериментальні підходи, засновані на маніпуляції окремими компонентами материнської дієти, зокрема на обмеженні кількості мікроелементів (Fe, Zn, Na і Ca) в раціоні матері [40, 42, 70, 192]. Проте більшість досліджень присвячено програмуванню ефектів внаслідок скорочення споживання білків [117, 174]. Важливо відмітити, що обмеження білків у раціоні щурів

впродовж вагітності викликає ранню смертність жіночого потомства, тоді як для матерів така дієта є одним із ключових факторів, що може подовжити життя [119, 201].

Досить інформативними стали дослідження, проведені Ozanne та Hales [174], які виявили, що зміни раціону у період внутрішньоутробного, або на початку постнатального розвитку суттєво впливають на ТЖ щурів і мишей. Так, нащадки самиць, яких упродовж вагітності утримували на звичайному раціоні, а під час лактації – на білково-обмеженій дієті, росли повільніше та мали більшу ТЖ, ніж потомство, вигодоване самицями, не обмежуваними у харчуванні. І, навпаки, дитинчата тварин, яких на стадії вагітності утримували в умовах КОХ, але повноцінно годували під час лактації, при народженні були менші за розміром, характеризувались постнатальним прискореним компенсаторним зростанням та зменшеною ТЖ за умов стандартного харчування [55, 105]. Було висловлено припущення, що у даному випадку прискорення старіння виникало внаслідок ушкодження теломер киснем [106].

У деяких роботах визначали довгострокові ефекти впливу материнського переїдання та ожиріння [20, 165]. Інші дані експериментів на гризунах демонстрували наявність значного ожиріння у тварин, матері яких страждали від обмеження білку та споживали корм із високим вмістом жирів [39, 41, 167]. Вважається, що подібне збільшення ваги частково пов'язане із порушенням харчової поведінки. Так, "запрограмовані" пренатальним білковим обмеженням щури ставали схильними до споживання їжі, що містить більшу кількість жирів [41], у той час як потомство особин, котрі отримують стандартну кількість компонентів харчування під час вагітності, обирають подібний тип адекватної дієти [38]. Це зумовлено тим, що обмеження білків у материнському раціоні змінює відчуття ситості щурів, впливаючи на стан рецепторів серотоніну у гіпоталамусі [132, 169].

Таким чином, було виявлено суттєву схильність нащадків до збереження запрограмованого фенотипу, пов'язаного із материнським недо-

чи переїданням. Крім того, відмічено наявність певних негативних метаболічних та фізіологічних наслідків неадекватного материнського харчування, що включають підвищений кров'яний тиск, порушення гомеостазу глюкози, інсулін-резистентність, ожиріння, зміни у харчовій поведінці та наявність хронічних захворювань нирок у нащадків [118].

Зважаючи на дещо суперечливі результати попередніх досліджень механізми, які лежать в основі ефектів ОХ у період раннього розвитку на ТЖ дорослого організму, залишаються остаточно не з'ясованими.

## **1.2. Експерименти з модифікаціями харчуванням у безхребетних тварин**

У більшості вищеописаних досліджень використовували дрібних лабораторних тварин (щурів, мишей, морських свинок), оскільки вони мають відносно короткі термін вагітності та ТЖ, а також відносно детально вивчені геноми (зокрема це стосується мишей і щурів). Якщо ж експерименти були зосереджені переважно на ембріональному періоді з безпосереднім аналізом фізіологічного стану плода і плаценти, необхідним ставало використання більш великих видів тварин, таких як вівці. Незначна кількість робіт стосувалась впливу материнського харчування на розвиток у нижчих приматів [164].

Загалом, вивчення старіння з використанням хребетних є дещо незручним через довговічність цих тварин, їхні розміри, певні етичні аспекти та порівняно високу вартість їхнього утримання [133]. І хоча історично вагома кількість робіт була виконана на гризунах, проте експерименти щодо вивчення ТЖ за різних умов дієтичної рестрикції, а також молекулярні дослідження зручніше проводити на короткоживучих модельних організмах, зокрема на безхребетних [189]. Безхребетні організми – відносно прості об'єкти для утримання у лабораторних умовах і, не дивлячись на те, що вони



значно відрізняються за своєю морфологією та особливостями метаболізму від хребетних, їхні клітинні, фізіологічні, біохімічні та метаболічні механізми значною мірою подібні [136, 184, 206]. Так, відомо, що більшість механізмів старіння є еволюційно консервативними, а гени та сигнальні шляхи, пов'язані зі старінням і, навіть, із деякими людськими захворюваннями, філогенетично зберігаються. Саме тому дослідження на безхребетних організмах виявляються зручним інструментом для вивчення гомологічних процесів у ссавців [136, 184, 206].

Піддослідних гризунів, як правило, годують досхочу, внаслідок чого вони можуть поглинати необмежену кількість наявного корму (харчування «*ad libitum*») [236]. На відміну від цього, у дослідженнях із використанням безхребетних кількість та якість харчової суміші можна регулювати за допомогою зміни у ньому концентрації поживних речовин [184].

Достатньо довго найзручнішим модельним безхребетним організмом було прийнято вважати нематоду *Caenorhabditis elegans* [133]. Так, завдяки невеликій ТЖ і простоті організації досліджень, використання *C. elegans* значно допомогло в ідентифікації генів, шляхів і механізмів, що беруть участь у процесі старіння [191]. З експериментів на нематодах стало відомо, що основна роль того чи іншого механізму у подовженні життя тварин залежить від особливостей дієтичної рестрикції. Так, деякі роботи з *C. elegans* показали, що три варіанти схем обмеженого раціону – помірне ОХ протягом всього життя, годування через день і переведення на низькокалорійну дієту у середньому віці – запускають різні механізми змін, які призводять до однакового результату – збільшення ТЖ [86, 124, 175].

Існує припущення, що у результаті ОХ на ТЖ нематод позитивно впливають два фактори: зменшення токсичності їжі та обмежене надходження поживних речовин [189]. Так, нещодавні дослідження на *C. elegans*, показали, що найбільш розповсюджений лабораторний корм цього виду – *E. coli* – має токсичний ефект, через який ТЖ зменшується. Нематоди

живуть довше за умов споживання вбитих *E. coli* [73, 124], або за умов годування бактерією *B. subtilis* замість *E. coli* [71, 72].

Вірогідним механізмом, який є важливим для подовження життя у відповідь на ОХ, а, точніше, на недостатню кількість білків, є активація автофагії [141, 146]. Важливо підкреслити, що цей механізм є таким же еволюційно-консервативним, як і сам по собі ефект від ОХ [102]. Прямих доказів того, що збільшення автофагії може уповільнити процес старіння людей, немає. Однак, у дослідженнях на *C. elegans* було показано, що цей механізм є необхідною умовою для подовження життя червів, мутантних за рецептором інсуліну *DAF-2* [152].

### 1.2.1. Обмеження харчування на стадії розвитку комах

Зручною моделлю для дослідження старіння можуть бути різні комахи. Наприклад, цвіркуни, які належать до *hemimetabolous* (комахи з неповним метаморфозом), а тому їхні німфи харчуються так само, як і дорослі особини. На лабораторному виді цвіркунів *Acheta domesticus* застосовували дві основні методики ОХ: обмеження періоду доступу до їжі та кількісне обмеження поживних речовин [133]. До того часу більш звичним було вивчення балансу білки/вуглеводи, у цьому ж випадку поняття ОХ характеризувало скорочення поглинання їжі за умов збереження необхідних мікроелементів [64, 207, 236]. Тоді було показано, що зростання, дозрівання, виживаність і ТЖ цвіркунів варіюють залежно від типу дієтичної рестрикції та статі [133]. Варто наголосити, що переривчасте годування в *A. domesticus* сприяло збільшенню ТЖ, а цього, як відомо, не спостерігалось у хребетних. Варіанти кількісного ОХ також сприяли довголіттю, викликаючи подовження ювенільного періоду [133]. На противагу цьому, раніше в іншого виду цвіркунів, *Teleogryllus commodus*, подовження життя при застосуванні ОХ на стадії розвитку виявлено не було [244].

У подібних експериментах використовували і комарів (вид – *Aedes aegypti*), яким, окрім стандартного ПС (контроль), давали три варіанти

нестандартного: 1 – вдвічі більша концентрація поживних речовин, 2 – менша в 2 рази і 3 – менша в 4 рази, ніж у контролі. У результаті комахи, які розвивались за обох варіантів скороченого раціону, жили значно довше, ніж контрольні особини, незалежно від типу харчування на стадії імаго [109].

В експериментах на тарганах *Nauphoeta cinerea* вчені вивчали вплив різних поживних речовин протягом ювенільного періоду і статевого дозрівання у розподілі ресурсів поміж фізіологією, життєздатністю і репродуктивною здатністю самиць. Німф утримували у різних дієтичних режимах – за умов повноцінного або обмеженого харчування. Було виявлено, що ОХ на ювенільній стадії призвело до розвитку фенотипу із надлишком жиру, з уповільненим ростом молодих особин і з коротким періодом репродуктивної активності. Повноцінний раціон на ювенільній стадії спровокував формування протилежного, але, знову ж таки, стабільного фенотипу у зрілому віці. Це свідчило про те, що харчування молодих особин могло впливати на моделі розподілу ресурсів у дорослих комах [33].

### 1.3. Застосування обмеженого харчування в імаго *D. melanogaster*

Найбільш розповсюдженим модельним організмом є вид *D. melanogaster*, який належить до *holometabolous* (комахи з повним метаморфозом). Дрозофіли мають ключові органи та системи обміну речовин, які характерні для живих організмів; крім того, їм властива більшість консервативних метаболічних функцій, наявних у хребетних, у тому числі й аналогічні сигнальні шляхи інсуліну, інсулін-подібного фактора росту (IGF) та TOR, а також регулювання обміну вуглеводів і накопичення енергії [30, 203]. Такі властивості зумовлюють унікальні можливості для вивчення впливу харчування на життєві характеристики, застосовуючи генетично-молекулярні методики.

Разом із тим, цей вид має і певні недоліки, пов'язані із вивченням ефектів, спричинених змінами кількості або якості харчування. Справа у тому, що у мушок (подібно до нематод) важко застосувати точне дозування їжі, навіть за умови використання стандартного лабораторного ПС [133]. Так, личинки дрозофіли, перебуваючи всередині ПС, живляться тільки дріжджами, а дорослі особини поглинають змішану харчову суміш, не вибираючи окремих компонентів [218]. І, хоча історично склалось так, що *D. melanogaster* була представлена модельною генетичною системою для дослідження ОХ ще сто років тому, вчені досить довго розмірковували над оптимізацією експериментального харчування у вивченні його впливу на життєві характеристики цього виду [46].

Варто відзначити, що більшість даних досліджень застосування ОХ в експериментах із *D. melanogaster* відрізняються від результатів, одержаних на *C. elegans* [58, 181]. Так, кілька лабораторій безуспішно намагалися подовжити життя мушок, застосовуючи режим переривчастого годування [115, 122]. Відсутність позитивного результату пояснили тим, що ОХ взагалі не може впливати на дрозофіл [123]. Альтернативним припущенням було те, що, внаслідок щоденних довгих періодів харчової депривації, у мушок виникає певний негативний ефект, який не властивий гризунам за умов переривчастого годування. Припустили, що таке шкідливе явище нівелювало будь-які позитивні наслідки ОХ, і ТЖ у такому випадку не збільшувалась [189].

Перші роботи, що демонстрували явище збільшення ТЖ дрозофіл за умов ОХ, були представлені лише у 1993 р. [57]. Вони поставили питання стосовно визначення того, які особливості дієтичної рестрикції спричиняють найбільший ефект: зменшення кількості калорій або зміна концентрації конкретних речовин у ПС. Крім того, залишалось невідомо, чи було збільшення ТЖ за умов ОХ у *D. melanogaster* зумовлено зміною темпів старіння, або воно виникало внаслідок покращення виживаності [49, 138, 181, 217].

При вивченні ефектів ОХ у гризунів, дослідники зазвичай дотримувались точки зору, що скорочення споживання калорій є ключовим фактором, який зумовлює вплив "обмеженого раціону" на ТЖ, і тому завжди використовували термін "калорійне обмеження харчування" ("КОХ") [143, 236]. При дослідженні залежності ваги тіла від харчування у дрізофіли було виявлено, що, на відміну від ссавців, за умов більш калорійного "раціону" мушки поглинають такий же об'єм ПС, як і ті, що перебувають на "низькокалорійній дієті", а тому вони споживають більшу кількість калорій. Показано, що збільшення калорійності ПС у лабораторних популяцій мушок майже у два рази від нормальної концентрації не викликає негативних наслідків для життєвих характеристик [45].

Наразі вже є численні свідчення того, що варіанти ОХ без зміни калорійності здатні збільшити ТЖ *D. melanogaster* [24, 188, 236, 251]. Наприклад, у своїх дослідженнях Min et al. [156] виявили, що споживання калорій у мушок скорочується за будь-якого варіанту маніпулювання харчуванням, якщо він сприяє збільшенню ТЖ, проте концентрація дріжджів виявляється більш дієвим чинником. Так, за умов утримання імаго *Drosophila* на зерново-цукрово-агарозній "дієті" зі зниженою кількістю дріжджів їхня репродуктивна здатність зменшувалась, що сприяло збільшенню ТЖ [137]. Якщо ж плодових мушок утримували на занадто суворому ОХ, вони ставали повністю безплідними, а ТЖ навіть скорочувалась [53].

Підсумовуючи вищесказане, треба наголосити на тому, що за всю історію досліджень ТЖ за умов ОХ у дрізофіли вдалося збільшити на 10-30 %. Таке збільшення ТЖ виникало за умов середньої концентрації поживних речовин, і наразі вважається, що поняття "обмеження харчування" характеризує певне скорочення поглинання харчових компонентів (ХК) без явища недостатності поживних речовин [218].

### 1.3.1. Токсичний ефект харчових компонентів

На початку XX століття Stefan Korec дійшов висновку, що смерть за умов ОХ виникає внаслідок "аутоінтоксикації" метаболічними залишками [115]. Вчений припускав, що за умов ОХ виробляються "антитоксини" проти "наслідків" нормального метаболізму, адже у випадку нормального харчування продукуються "антитоксини" проти "голоду". Виходячи із цього, Korec [115] вважав, що певний баланс цих ефектів може бути корисним для організму і призведе до збільшення ТЖ. Він перевіряв свою гіпотезу експериментально у 1928 на *D. melanogaster*, застосовувавши режим, за якого годування чергували із харчовою депривацією. Було показано, що періоди нетривалої шестигодинної харчової депривації на добу із доступом до води не збільшували ТЖ мушок [115].

Разом із тим, прояви токсичного впливу їжі вважаються звичайним явищем, яке може виникати внаслідок: а) наявності токсичних метаболітів; 2) непрямого впливу харчової недостатності незбалансованого раціону; 3) появи джерела інфекції.

У *Drosophila*, в якій ПС складається із ХК і води, підвищення поживної цінності харчової суміші призводить також до збільшення співвідношення розчинених поживних речовин до об'єму води. Припускали, що ані густина ПС, ані ефект від недостатності води не відповідають за скорочення ТЖ, яке виникає внаслідок збільшення кількості поживних речовин [35].

У нещодавній роботі було показано, що для впливу на ТЖ мушок вирішальне значення має саме білковий компонент у "раціоні" [159]. Так, в експериментах продемонстровано, що наявність дріжджів виявляється головним чинником при модуляції ТЖ дрозофіли за умов голодування [128].

Було виявлено, що токсичним компонентом у харчуванні мушок є дріжджі, бо у випадку їхнього споживання у чистому вигляді дрозофіли помирали раніше, аніж комахи, які перебували на ОХ [230]. Одним із можливих пояснень такого ефекту могло бути те, що мушки є чутливими до пахучих речовин дріжджового екстракту [230]. У дослідженнях, здійснених

як на нематодах, так і на мушках, одержали свідчення того, що нюхове сприйняття продуктів харчування, так само як і споживання їжі, може впливати на ТЖ [21, 128]. Показано, що ефект запаху дріжджів інгібує спричинене ОХ подовження життя лабораторних ліній дрозофіл. Якщо ж комахам надавали дріжджову пасту, їхня ТЖ зменшувалась на 6-18 %. Це явище пояснили тим, що на ТЖ могли впливати токсичні властивості дріжджів, якими характеризуються структурні компоненти амінокислот – поліаміни [128].

В іншому дослідженні за умов підтримання стабільної концентрації сахарози та зменшеної концентрації дріжджового екстракту у ПС, ТЖ дрозофіл збільшувалась [69]. Припустили, що наявність сахарози у субстраті нівелює отруйні властивості дріжджів [232].

### **1.3.2. Баланс амінокислот у поживному середовищі**

У дослідженнях на *D. melanogaster* було показано, що ОХ може призводити до водного та амінокислотного дисбалансу у ПС, внаслідок чого вважали, що на ТЖ мушок впливає саме компонентний склад їжі, а не лише її калорійність [35, 84, 187, 190]. Серед найважливіших факторів, що могли впливати на ТЖ *D. melanogaster*, було прийнято вважати надмірне накопичення жиру і білку [204].

Продемонстровано, що на скорочення життя за умов ОХ впливають амінокислоти [159]. Виявлено, що всі замінні амінокислоти (NEAAs) майже не змінюють ТЖ і не впливають на репродуктивну здатність [84]. У той же час набір незамінних амінокислот (EAAs) впливає на ці характеристики, подібно до всього комплексу амінокислот або повноцінного харчування. Пізніше визначили, що лише метіонін відновлює репродуктивну здатність до нормального рівня, не викликаючи при цьому зменшення ТЖ. Показано, що додавання будь-якої ЕАА та всіх EAAs разом, окрім метіоніну, не впливає на ТЖ. Таким чином, метіонін у комбінації з однією або декількома EAAs сприяє скороченню життя за умов ОХ [84]. Такий ефект пояснили тим, що

зменшення концентрації метіоніну інгібує окисні ушкодження, через підвищення рівня глутатіону [223].

#### 1.4. Зміни поведінки *D. melanogaster* при обмеженні харчування

Було відмічено, що, як і у багатьох різних таксонів, чуттєві сприйняття *D. melanogaster* можуть впливати на старіння та фізіологію організмів. Зокрема виявлено, що сприйняття жіночих статевих феромонів специфічним смаковим рецептором, який експресується у скупченні нейронів передніх ніг самців дрозофіли, швидко зменшує запаси жиру, знижує стійкість до харчової депривації та зменшує ТЖ [74]. Було підтверджено важливість поведінки годування у випадку змін режиму харчування [125], адже виявлено, що мушки реагують на наявність конкретної кількості поживних речовин [230]. Показано, що функція годування мушок не є стабільною, а регулюється цілою низкою сенсорних стимулів, таких як нюх та дегустація, метаболічні потреби, система внутрішньої сигналізації стану голоду (інсулінова та пептидна) [52]. Подібні дані щодо змін харчової поведінки були отримані і при вивченні реакцій *Drosophila* на хронічну гіпоксію [231].

Загалом харчову поведінку *D. melanogaster* охарактеризували наступним чином: 1) мушки надають перевагу сахарозі порівняно із дріжджами; 2) особини, які харчуються розбавленими розчинами, прагнуть компенсувати недостатність поживних речовин, а тому вони інтенсивніше поглинають ПС; 3) комахи, які перебувають на неадекватному раціоні 1:1 (сахароза/дріжджі), потребуючи більшого споживання сахарози, ковтають також більше дріжджів, аніж ті, які мають змогу харчуватись вибірково [52, 230]. У результаті такого компенсаторного поглинання їжі позитивний для ТЖ ефект від ОХ пригнічується. Комахи, яким надається можливість вибору – харчуватись дріжджами і сахарозою з окремих джерел, живуть довше, ніж ті, які споживають суміш даних речовин. Припустили, що наявність певних



поживних речовин є основним чинником, який визначає чутливість мушок до ОХ [230].

Важливо зазначити, що при "нормальних" концентраціях білку і цукру в організмі відбувається процес "нормального" старіння (зниження гомеостатичної здатності з віком), який завершується смертю від старості. Підвищення білку у ПС призводить до його накопичення (приблизно пропорційно його концентрації), а при зниженні поглинання цукру "поступове старіння" замінюється швидким згасанням організму, яке призводить до смерті від голоду. У першому випадку запас енергії повільно зменшується через послаблення з віком гомеостатичної здатності, у другому – швидко вичерпується внаслідок недостатності цукру. За умов голодування швидкість процесу вмирання і ТЖ залежать від вмісту цукру у "раціоні". Недостатність білку призводить до скорочення репарації оксидативних ушкоджень, і навіть до її припинення, що призводить до збільшення коефіцієнта оксидативної вразливості і, відповідно, прискорює старіння [13].

### **1.5. Особливості реакцій на обмеження харчування у різних лабораторних ліній *D. melanogaster***

Еволюційний взаємозв'язок між ОХ та ТЖ був підтверджений при проведенні селекції у дослідженнях на *D. melanogaster*. І, хоча вплив ОХ на здоров'я і ТЖ був продемонстрований у різних організмів, поставало питання, чи можна його застосувати для дрозофіл дикого типу, адже більшість експериментів із харчовими маніпуляціями проводили на піддослідних лініях, адаптованих до лабораторних умов [198]. Було прийнято вважати, що лабораторні лінії *D. melanogaster*, відібрані за ознакою більшої ТЖ, демонструють і відносно кращу стійкість до дієтичної рестрикції.

Дослідники з'ясували, що мутанти-довгожителі *D. melanogaster* зазвичай є більш стійкими і до різних стресових факторів [130]. Водночас у

роботі іншої групи вчених показано, що селекція, направлена на стійкість до ОХ, призводить і до збільшення ТЖ [26]. Нещодавно було доведено, що всі ефекти ОХ можуть виникати у будь-яких природних популяцій *D. melanogaster* [153].

**Вплив тетрацикліну за умов обмеженого харчування.** Багато представників *Drosophila* є носіями бактерій роду *Wolbachia*, які знаходяться у цитоплазмі репродуктивних тканин [237]. Як було показано, у деяких випадках наявність вольбахії може змінювати ТЖ [160]. Важливо було визначити, чи впливає *Wolbachia* на ТЖ дрозофіли і за умов ОХ [85]. Показано, що повністю очищені тетрацикліном від *Wolbachia* представники лабораторних ліній дрозофіли *Dahomey* і *CantonS* реагували на ОХ із різними концентраціями поживних речовин так само, як і не позбавлені цієї бактерії *OregonR*. Навіть через п'ять поколінь без застосування антибіотиків результати були подібними. Тоді було зроблено висновок, що тетрациклін не змінює реакцію на ОХ [85].

#### **1.6. Залежні від статі розбіжності у реакціях на обмеження харчування**

Дрозофіли мають досить короткий цикл розвитку – у середньому 10 діб від яйця до імаго. Личинка линяє тричі і після третьої линьки перетворюється на лялечку. Непрямий розвиток дрозофіли завершується вильотом мушки, яка на другу добу після вилуплення стає статевозрілою. Статевий диморфізм у *D. melanogaster* виражений явно. Самиці – більшого за самців розміру (~ 3 мм), мають загострений кінчик черевця із яйцекладом. Самці дрібніші за самиць, мають заокруглений кінчик черевця, останні сегменти якого – злиті, завдяки чому він виглядає майже чорним. Перші 2-3 години після вильоту крила у мушки не розправлені, а тіло – видовжене. Незапліднена самиця

світло-сірого забарвлення; нещодавно вилуплені самці – світло-сірі, а на кінчику черевця мають чорну цятку, і через кілька годин кінчик черевця стає повністю чорним [195].

Як відомо, в еволюції життя компроміс між виживанням і розмноженням лишається фундаментальним. Через наявність статевого диморфізму самці та самиці оптимізують стан свого організму по-різному, а тому вони неоднаково реагують і на зміни кількості наявних ресурсів. Так, виявлено, що у самиць дріжджі позитивно впливають на репродуктивну здатність і негативно – на виживання. Було показано, що мушки жіночої статі живуть довше при харчуванні із проміжною концентрацією дріжджів, а за великої кількості дріжджів посилено поглинають ПС. Тому на ПС із малою концентрацією дріжджів вони споживають менше білків і менше калорій [157].

Виявлено статеві відмінності дрозофіли у показниках ТЖ після реакцій на різну інтенсивність ОХ. В особин обох статей життя було найдовшим за середньої концентрації ХК у ПС й зменшувалось як за умов її зменшення, так і при збільшенні. Проте оптимальна концентрація ХК, за якої смертність дорослих особин зводилась до мінімуму, значно відрізнялась у представників різної статі. Так, показано, що ТЖ самиць сягала піку при концентрації ХК у 60 %, а у самців – 40 %. Крім того, за оптимальної для кожної зі статей концентрації ХК самиці мушок жили на 60 % довше, в той час як самці – тільки на 30 %, порівняно з контролем [135].

**Взаємозалежність репродуктивної активності та тривалості життя за умов обмеження харчування.** Гіпотеза про еволюційне значення реакції на ОХ стосується концепції перерозподілу речовин між збереженням соми та репродукції, тобто організм може зменшувати прагнення до репродукції задля "економії" ресурсів, щоб збільшити шанси на виживання до того часу, коли кількість поживних речовин стане достатньою [93]. Загальноприйнятим припущенням було те, що ОХ індукує адаптивний перерозподіл ресурсів від

репродукції до індивідуальної виживаності [65], а тому одночасне збільшення і ТЖ, і репродуктивної здатності вважалось неможливим через наявність конкуренції за однакові поживні речовини, що є в обмеженій кількості за умов ОХ. Проте було виявлено, що ці параметри можуть бути максимальними, коли за умов незначного ОХ концентрації необхідних поживних речовин є адекватно збалансованими [85].

При зменшенні надходження енергії з їжею припинення продукування яєць являє собою екстрений механізм "збалансування". Якщо ж цього для відновлення нормального стану виявляється недостатньо, то починається перебудова метаболізму, в основі якої лежать інсуліновий, TOR (target of rapamycin – мішень рапаміцину) та SIR2 (сіртуїн-2) сигналінги. Але, оскільки репродукція відіграє важливу роль, то після відновлення стабільного стану починається заміна механізму скорочення репродуктивної здатності повільною метаболічною перебудовою, відразу після завершення якої процес продукування яєць відновлюється [13].

Наразі сформульовані принаймні чотири загальні принципи, які лежать в основі компромісів між репродукцією та ТЖ:

- 1) компроміс між виживанням і розмноженням властивий більшості живих організмів;
- 2) зв'язок між збільшенням ТЖ і зниженням репродуктивної здатності може бути розірваний за певних умов;
- 3) у той час, як ціна виживання та репродукції може бути не пов'язана із конкурентним розподілом ресурсів, не знайдено альтернативних пояснень її виникнення;
- 4) фізіологічні компроміси між відтворенням та подовженням життя не завжди мають еволюційно-генетичні наслідки [66].

У *Drosophila* збільшення прагнення до розмноження скорочує життя, як у самців, так і у самиць [180, 183]. У свою чергу, необмежене харчування призводить до збільшення відкладання яєць у дрозофіли, що спонукає їх схрещуватись частіше, ніж ті, які перебувають в умовах ОХ. Виходячи із

цього, виникло припущення, що мушки, які мають можливість вільно схрещуватись протягом усього життя, за умов утримання на повноцінному ПС живуть менше, ніж ті, що перебувають на ОХ та мають знижену репродуктивну здатність [178].

Пізніше було продемонстровано, що насправді подовження життя за умов ОХ не пов'язане зі зниженням репродукції у самиць дрозофіли, адже ТЖ збільшувалась не лише у нормальних, але й у мутантних стерильних мушок [140]. Так, внаслідок помірного ОХ життя подовжувалось і у самиць із заблокованим вітелогенезом – *ovoD1* (мутація блокування вітелогенезу), і у мушок, котрі у результаті рентгенівського опромінення не мали зародкової лінії. Таким чином, скорочення репродуктивної функції самиць дрозофіли не є необхідною умовою для подовження їхнього життя за умов ОХ [140].

### **1.7. Епігенетичні та біохімічні зміни за умов стресу у *D. melanogaster***

Всеохоплююче розуміння еволюційних механізмів становлення стійкості до обмеженого харчування потребує ідентифікації та характеристики генетичних локусів, які відповідають за становлення цієї ознаки та лежать в основі її еволюційних змін. Мутації, які посилюють витривалість до ОХ, вказують на можливості маніпулювати експресією залежних від "голоду" генів у штучних умовах [227]. За умов ОХ гени, задіяні у біосинтезі білків і гідролазній активності, мають тенденцію до підвищення рівня експресії. Це відбувається тому, що організм намагається компенсувати недостатність поживних речовин, щоб пережити несприятливі умови. Результати картування генів кількісних ознак дозволили ідентифікувати специфічні локуси, що відповідають за відмінності у стійкості до "голоду" [134].

Для цього застосовується моніторинг продукування мРНК зі специфічних генів, які є показниками залежної від віку експресії генів. Наприклад, було прийнято вважати, що кількість мРНК, яка відповідає білкам теплового шоку (HSPs), може демонструвати вік дрозофіли. Так, виявлено, що кількість мРНК білку HSP-70 впродовж процесу старіння істотно не збільшується [238], тоді як кількість мРНК двох менших білків теплового шоку – HSP-22 і HSP-23 – різко зростає, залежно від віку [113]. Показано, що надлишкова експресія *Hsp-22* призводить до зменшення ТЖ незалежно від рівня експресії *hsp-70* [113].

Раніше було виявлено, що експресія близько 127-и генів помітно змінюється впродовж старіння, а експресія третини цих генів залежить також і від окислювального стресу. Ця модель ко-експресії ідентифікує набір генів-кандидатів, які можуть сприяти збільшенню ТЖ [252].

Незважаючи на те, що експресії генів можуть мати відношення до збільшення ТЖ, залишається невизначеним, чи є кілька ключових генів, рівень активності яких найбільш суттєво впливає на цей показник [94]. На сьогоднішній день ключовим для збільшення ТЖ за умов застосування ОХ вважається механізм зростання економичності метаболізму, індукованого змінами в інсуліновій, TOR і SIR2 сигнальних системах [56, 100, 111, 166, 179, 187, 193, 242].

**Сигнальний шлях TOR.** Від харчування залежать процеси зростання, які також є й важливими регуляторами якості життя. Для того, щоб визначити кількість доступних поживних речовин у навколишньому середовищі, клітини мають оцінити концентрації та енергетичну якість амінокислот. У 1991 році було вперше ідентифіковано два гени у дріжджів – *TOR1* і *TOR2* [95]. Подальші дослідження призвели до виявлення генів *TOR* і в інших організмів, серед яких були і ссавці [199]. Можна припустити, що цей метаболічний шлях лишається консервативним у діапазоні видів – від дріжджів до людини.

Внаслідок помірного ОХ активність TOR-кінази інгібується, що індукує процес часткової аутофагії – "самоперетравлювання" клітини. Аутофагія забезпечує рециркуляцію цитоплазматичних макромолекул і органел, у тому числі й окиснених та ушкоджених, що сприяє омолодженню клітин і подовженню життя організму. До того ж TOR регулює загальний синтез білку на рибосомах, тому його інгібування може економити енергію, перерозподіляючи її від процесів росту і поділу клітин до інтенсивності реакції на стрес [89]. Таким чином, TOR – це один із найважливіших метаболічних шляхів у живих організмів, який інтегрує поживні речовини й екологічні сигнали у процесах росту та обміну речовин [120].

**Сигнальний шлях IGF.** Відомо, що IGF (insulin-like growth factor – інсулін-подібний фактор росту) відіграє важливу роль у процесі старіння багатьох видів – від дріжджів до ссавців. Елементи IGF1, зокрема, FOXO (фактор відповіді на стрес), SIR та TOR регулюють взаємозалежні процеси зростання, реакції на стрес, енергетичного обміну та ТЖ [136, 184].

З експериментів на мишах відомо, що дефіцит метіоніну викликає зниження рівня IGF1 [65]. Таким чином, за допомогою інгібування передачі сигналів IIS через зменшення кількості метіоніну можна досягти подовження життя [65, 136, 155, 223].

**Фактор відповіді на стрес дрозофіли – dFOXO.** Показано, що за певних умов каскад IIS не завжди впливає на зумовлені ОХ зміни фізіологічних характеристик. У такому випадку реакцію на "голод" модулює надекспресія dFOXO у жировому тілі плодових мушок [100]. В іншому експерименті активізували dFOXO, змінюючи експресію генів-мішеней, внаслідок чого ТЖ збільшувалась. Продемонстровано, що ОХ діє однаково ефективно, як у *foxo*-нульових мутантів, так і у контрольного їм дикого типу [76]. Разом із тим, висловили припущення, що цей ген може бути посередником адаптаційної реакції на "голод" [76].

У дослідженнях із приводу зміни чуттєвого сприйняття у нематод за умов ОХ показано, що відсутність запаху і смаку їжі та недостатня кількість

поживних речовин пригнічує нейроендокринну стимуляцію інсулін-подібного сигналіngu й активізує SIR. У свою чергу, це призводить до індукції транскрипційної активності FOXO, від якого залежить експресія важливих факторів стійкості до стресу: COD, HSP-70 та гена репарації *GADD45* [89]. У такий спосіб може виникати ефект гормезису за умов ОХ у дрозофіли.

**Шлях транссульфування – TSP.** На безхребетних модельних організмах виявлено, що шлях транссульфування (TSP), який контролює метаболізм сірковмісних амінокислот, реагує на харчові та гормональні сигнали і, тим самим, забезпечує виживання та сприяє метаболічному гомеостазу [191].

Пізніше такий механізм був виявлений і у *D. melanogaster* [110]. Загалом, TSP є досить консервативним механізмом метаболізму сірковмісних амінокислот – метіоніну та цистеїну. Показано, що цистатіонін  $\beta$ -синтаза дрозофіли (*dCBS*), яка каталізує термінальний етап у TSP, є позитивним регулятором ТЖ мушок. Показано, що діяльність *dCBS* змінюється за умов ОХ, а загальна, або нейрон-специфічна транс-генна надекспресія *dCBS* збільшує ТЖ в особин зі стандартним "раціоном". Загалом, інгібування TSP нівелює зміни таких життєвих параметрів, як схильність до ожиріння та накопичення білку, які можуть виникати внаслідок ОХ [110].

**мРНК.** Дослідження свідчать про важливу роль рівня трансляції мРНК в модуляції процесу старіння. Так, виявлено, що у випадку дієтичної рестрикції деякі мРНК розміщуються на рибосомах іншим чином, аніж за умов повноцінного харчування [250]. Пізніше було показано, що за умов ОХ виникає тотальне зменшення кількості пов'язаних із мРНК рибосом і зниження концентрації метіоніну у білках [69].

**Транспортний ланцюг електронів.** Відомо, що еволюційно-консервативне функціонування транспортного ланцюга електронів (ТЛЕ) в мітохондріях впливає на старіння тварин [60]. Неодноразово було підтверджено, що вік-залежне зниження метаболічної функції, про яке



свідчить зменшення експресії генів у ТЛЕ, виявляється спільною рисою між найвіддаленішими видами – нематодами, мушками та ссавцями [149, 243]. Ключова роль мітохондрій у реакціях збільшення ТЖ за умов ОХ продемонстрована у ряді досліджень [69].

**Метаболізм жирів.** Було продемонстровано, що над-експресія адипокінетичного гормону дрозофіли (*dAKH*) – функціонального ортолога глюкагону, – посилює метаболізм жирів, спонтанну активність організму та збільшує ТЖ [112]. Так, за умов ОХ дрозофіли "переключають" свій обмін речовин у бік посилення синтезу й розпаду жирних кислот, які необхідні для розвитку реакції на зменшене споживання їжі. Виявлено, що інгібування генів синтезу та окислення жирних кислот у м'язовій тканині гальмує збільшення ТЖ, яке виникає за умов ОХ. У свою чергу, ОХ підвищує спонтанну активність мушок, яка залежить від посилення метаболізму жирних кислот. І хоча не відомо, чи відіграють роль пов'язані з ОХ зміни у накопиченні жиру у реалізації різних реакцій на "голодування", висловлено припущення, що збільшення активності у поведінці, принаймні частково, є необхідною умовою для збільшення ТЖ за умов ОХ [112].

**"Харчові" мутанти дрозофіли.** Аналіз мутацій є зручною аналітичною методикою у сучасній біології. Нові мутації генерують і вивчають, щоб ідентифікувати гени, що відповідають за формування досліджуваної ознаки, яка у конкретному випадку представляє інтерес. Мета полягає у тому, щоб виявити основні гени, які контролюють прояв ознаки, а також визначити роль цих генів у даному процесі [94].

Деякі мутації демонструють гени, що можуть збільшити ТЖ, описані саме у дрозофіли. У даному випадку генами-кандидатами є ті, мутації в яких здатні подовжити життя. Чужорідні гени вводять у геном дрозофіли в якості транс-генів-кандидатів для того, щоб змінити рівні експресії конкретних генів і дослідити їхні функції. Введені гени можуть передаватись із покоління у покоління з іншою частиною хромосомного генетичного

матеріалу. Загалом, пов'язані зі стійкістю до стресів транс-гени, здатні збільшувати ТЖ [94].

У дослідженнях над мутантами використовуються методики щодо виявлення впливу ОХ на ТЖ генотипів, яким бракує певних молекулярних функцій. Адже коли ОХ однаково сприяє подовженню життя як у мутанта, так і у дикого типу, то воно має працювати незалежно від зміненого гена. І, навпаки, коли ТЖ зменшується лише за наявності конкретної мутації, продукт гену, що зазнав впливу, може брати участь у механізмі, за допомогою якого ОХ подовжує життя [99, 181, 217, 233]. До найбільш вірогідних генів-кандидатів належить ген *chico*, який кодує субстрат інсулінового рецептора (*InR*) [58], а також ген, який кодує транскрипційний фактор інсулінової відповіді FOXO.

***Methuselah.*** Найперші мутації щодо збільшення тривалості життя дрозофіли вчені спровокували у гені *Methuselah* (*mth*) [130]. *Mth* кодує білок, який належить до сімейства протеїнів, пов'язаних із багатьма функціями у вищих організмів: ендокринна, нервова, відповідь на зовнішні стимули тощо. Одна із мутацій гену *mth*, що сприяє частковій втраті функції гена, призводить до підвищення стійкості до стресів та збільшує ТЖ на 35 %. Так, мутантні мушки, які виявляються приблизно втричі більшими за розміром від контрольних, є значно стійкішими до харчової депривації, високої температури та окислювального стресу [130].

***Thor.*** Ще одним геном-кандидатом у *Drosophila* є *thor*, який кодує 4е-ВР (фактор ініціації трансляції зв'язувального білка 4Е еукаріот; регулює кеп-залежну трансляцію). У серії досліджень із розведенням автолізованих пивних дріжджів було виявлено, що ОХ подовжує життя як у 4е-ВР мутантів, так і у контрольних комах дикого типу [218].

***Chico.*** За умов харчування із обмеженням дріжджів збільшення ТЖ *D. melanogaster* може спричинятись мутаціями гена *chico*, який кодує субстрат рецептору інсуліну [58, 182]. Clancy et al. показали, що довго живучі мутанти *chico*<sup>1</sup> при утриманні на "обмеженій дієті", яка збільшує ТЖ у контрольних

дрозофіл, характеризуються зменшенням цього показника. Незважаючи на такий суперечливий результат, дослідники дійшли висновку, що доцільним було б продовження досліджень взаємозв'язку механізмів дії ОХ та мутації *chico*<sup>1</sup> [58].

**Indy.** Помітне збільшення ТЖ характеризує мутації у гені *Indy* [196]. Такі мутації можуть призводити до 50%-го збільшення максимальної ТЖ і до вдвічі більшої середньої ТЖ. Загалом, вчені виявили п'ять видів взаємозалежних мутацій у цьому гені, кожна з яких спонукає істотне збільшення ТЖ у поєднанні з нормальним геном (гетерозигота). Крім того, гетерозиготні самиці, отримані від схрещування між лабораторною популяцією (*Canton-S*) і мутантною, продукують значно більше яєць, ніж контрольні самиці цієї лінії [196].

**Ферменти системи антиоксидантного захисту.** Виходячи із вільно-радикальної теорії старіння, запропонованої Danhem Harman у 1950-х роках минулого сторіччя [91], окислювальний стрес може суттєво впливати на ТЖ і вік-залежні патології [215]. Окисним фактором виступають вільні радикали або активні форми кисню (АФК). Важливо, що більшість експериментальних даних на користь вільно-радикальної теорії старіння одержано на безхребетних тваринних моделях [170].

Захист від дії окислення в організмі здійснюють ендогенні антиоксиданти, зокрема ферменти супероксиддисмутаза (СОД), каталаза і глутатіонпероксидаза, котрі розкладають АФК у серії хімічних реакцій [22, 23]. Виявлено, що окремі довгоживучі штами *Drosophila* мають підвищений рівень антиоксидантних ферментів [90, 197]. Зважаючи на це, деякі дослідження спрямовуються на спроби збільшення ТЖ шляхом штучного підвищення активності антиоксидантних ферментів на генетичному рівні. Так, показано, що транс-генні *D. melanogaster* із підвищеною активністю цитоплазматичної форми СОД – Cu/ZnСОД або СОД1 і каталази мають на 34 % більшу ТЖ і демонструють затримку процесу старіння [170].

Збільшення активності СОД1 у рухових нейронах збільшує ТЖ плодових мушок на 40 % [177], а мітохондріальної форми СОД (MnСОД або СОД2) – дещо збільшує ТЖ, але не затримує старіння [67].

З іншого боку, деякі дослідження свідчать про відсутність позитивного ефекту від підвищення активності антиоксидантів. Так, показано, що підвищена активність СОД2 і каталази зменшує мітохондріальне вивільнення АФК, підвищуючи таким чином стійкість до окислювального стресу у дрозofil, проте їхня ТЖ при цьому, із невідомих причин, зменшується [37]. У той же час залишається недостатньо дослідженим питання щодо ролі АФК в ефектах, пов'язаних із впливом ОХ на ТЖ [215].

### **1.8. Висновки та постановка задач дослідження**

Аналіз, проведений вище, показав, що існує багато гіпотез стосовно пояснення механізмів збільшення ТЖ у *D. melanogaster* при застосуванні ОХ, але всі вони мають багато недоліків. По-перше, дивлячись на те, що набір генів цього модельного організму вивчений вже досить детально, за різних видів дієтичної рестрикції виникають неоднакові зміни у генетичній експресії, які дотепер залишаються мало дослідженими. По-друге, майже невідомим залишається те, яким чином застосування ОХ впродовж розвитку плодових мушок може сприяти збільшенню ТЖ дорослого організму. Таким чином, необхідно 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 і подальшого застосування цих відомостей у наукових розробках та медицині.

Для досягнення поставленої мети слід розв'язати такі завдання:

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

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Найзручнішим об'єктом генетичних досліджень є *D. melanogaster*, адже цей вид має чотири найбільш важливі особливості:

- 1) невеликий термін розвитку від яйця до імаго;
- 2) високу репродуктивну здатність;
- 3) багато спадкових рас або мутацій;
- 4) невелику кількість хромосом [1].

Ряд теоретичних питань генетики, зокрема штучне отримання мутації, визначення природи гена, статі і аналіз локалізації статевих чинників у хромосомах, проблеми експресії гена, генетика популяції, механізм расо- і видоутворення та багато інших проблем інтенсивно вивчаються на *D. melanogaster*. Подібні дослідження мають важливе значення не лише у генетиці, а й у вирішенні питань загальної біології та еволюції видів [1].

#### 2.1. Умови утримання *D. melanogaster*

У лабораторних умовах нормальною температурою утримання для *D. melanogaster* вважається 24-25°C. При температурі, яка трохи перевищує 31°C, мушки повністю або частково стають безплідними. За нормальної температури цикл розвитку дрозозфіли від яйця до імаго триває приблизно 10 діб. Розвиток яйця становить 20 годин, а розвиток личинки і лялечки – 8 діб, тобто по 4 доби відповідно. Зі зниженням температури розвиток значно сповільнюється. Так, при 10°C личинковий період розтягується до 57-ми діб, а період лялечки – до 13-14-ти діб; при 20°C терміни розвитку становлять 8 і 6,3 доби відповідно. ТЖ дорослої дрозозфіли, тобто від моменту її вилуплення

із лялечки, у лабораторних умовах дорівнює 3-4-м тижням і значною мірою залежить від умов утримання (температури, вологості, харчування, щільності популяції, наявності у поживному середовищі бактерій) [1].

У спеціальних дослідженнях вдавалось подовжити життя плодових мушок до 152-х діб. Життєздатність мутантів у більшості випадків знижена у порівнянні із диким типом, хоча деяким мутантним лініям властива підвищена порівняно із "нормальними" мушками життєздатність. Враховуючи простоту утримання, є можливість вирощувати до сорока поколінь дрозофіл на рік [1].

*Приготування поживного середовища.* Основними складовими компонентами поживного субстрату, в якому розводять *D. melanogaster* у лабораторії, є сахароза і дріжджі. У даному випадку до ПС додавали буряковий цукор. Сахароза є як необхідним для розвитку дріжджів субстратом, так і джерелом енергії для мушок. Дріжджі, у свою чергу, слугують основним компонентом "раціону" дрозофіли.

Для варіння поживного субстрату застосовували висушені дріжджі, перерахувавши їх на пресовані – пекарські дріжджі, що містять 75 % води. Важливо, що дріжджі захищають ПС від інтенсивного ураження цвіллю.

В якості складового компонента у ПС додавали також агар-агар, який надає суміші желеподібну консистенцію.

Готовий поживний субстрат зберігали до 3-х днів, розливши його у банки, стаканчики, пробірки за температури +3°C у холодильнику. Для попередження росту цвілі додавали 10%-й спиртовий розчин ніпагіну (етилбензойна кислота).

#### Протокол приготування ПС:

1. Розчинили 7,5 г агар-агару в 1 л холодної води і довели до кипіння. У такий спосіб отримали агаровий розчин.
2. Додали 25 г сухих дріжджів до киплячого агарового розчину і варили на малому вогні 20 хв.

3. Додали 40 г манної крупи і 40 г цукрового піску і варили, помішуючи, ще 15 хв.

4. Після охолодження до 60°C, для попередження появи плісняви, до готового ПС додали 10 мл 10%-го спиртового розчину ніпагіну.

5. Розлили ПС у лабораторний посуд товщиною приблизно 1-1,5 см. Пробірки затикали пробками із натуральної чистої вати. Через 30-40 хв ПС застигло у вигляді досить щільного желе.

**Експериментальні маніпуляції.** Всі маніпуляції із мушками виконували під наркозом. В якості наркотизуючої речовини застосовували діетиловий ефір. Наркоз дрозофіл виконували морилкою (ефіризатором), який являє собою колбу із корковою пробкою. Всередині розміщували ватний тампон, змочений ефіром. Обережним струшуванням та постукуванням пальцями об стінки пробірки мушок перегнали подалі від пробки, потім швидко відкрили і настільки ж швидко притулили її отвір до отвору морилки та витрусили туди дрозофіл (близько 50-ти штук). Як тільки мушки перестали рухатись, зачекали 4 с, а потім витрусили їх на чистий аркуш паперу. У такий спосіб мушок можна ділити за статтю, рахувати, зважувати тощо.

Для схрещування брали тільки віргінних самиць віком не більше 10-12 год. після вилуплення. Для цього щойно вилуплених самиць відокремлювали від самців і утримували окремо до моменту необхідних схрещувань, або інших експериментальних маніпуляцій. Загалом, в одній пробірці із 5-ма мл поживного субстрату утримували або < 25 самиць, або стільки ж самців. Наявність більшої кількості особин призводить до перенаселення (crowding effect), а це може скоротити ТЖ [5].

Перші 1,5-2 доби після вилуплення самиця дрозофіли не відкладає яєць. Пік репродуктивної здатності починається у віці 15 діб і триває близько 10 днів.



## 2.2. Варіанти обмеження харчування у *D. melanogaster*

Методика чергування годування із обмеженням доступу до поживних речовин. Варіант обмеження харчування, який ефективно застосовується для збільшення ТЖ у гризунів, полягає у використанні режиму переривчастого годування [25, 82]. У таких експериментах корм надається тваринам не постійно, тобто протягом 24 год вони мають необмежений доступ до їжі, після чого протягом наступної доби їжі не отримують взагалі, у той час як контрольні особини можуть харчуватись коли і скільки завгодно. За таких умов життя подовжується навіть тоді, коли тварини із переривчастим годуванням майже повністю компенсують пережитий голод, з'їдаючи при цьому більше корму. Це свідчить про те, що періоди голодування у гризунів можуть бути настільки ж важливими для збільшення їхньої ТЖ, як і загальне зниження споживання поживних речовин [85].

У дослідженнях на *D. melanogaster* за умов подібного режиму дієтичної рестрикції не було виявлено позитивного впливу на ТЖ у мушок, яких щодоби утримували 18 год на стандартному поживному субстраті та протягом шести годин – із доступом тільки до води [115]. Більш пізній експеримент також не показав позитивних ефектів застосування такої методики, або будь-яких інших подібних процедур чергування годування [122]. Через те, що "раціон" із періодичним харчовим обмеженням не сприяв подовженню життя дрозофіл [123], цілком логічно припустили, що механізми, за допомогою яких ОХ змінює ТЖ у плодових мушок і ссавців, певним чином відрізняються [85].

Із вищеописаними негативними результатами досліджень періодичного "голодування" у *D. melanogaster* [115] дещо контрастують дані іншої роботи, в якій мушки мали постійне джерело води із цукром [184]. Так, виявили, що, за умов періодичного додавання до ПС дрозофіл дріжджів (кожен шостий день), із наявністю постійної концентрації у воді сахарози, ТЖ збільшується

приблизно на 30 %, у порівнянні із мушками, котрі необмежено споживають як цукор, так і дріжджі [184]. Подібне явище могло бути наслідком того, що вуглеводи за умов обмеженого харчування стають необхідними для нівелювання негативних наслідків періодів цілковитої харчової депривації [137]. Можливо для того, щоб зрозуміти важливість конкретних поживних речовин, в якості медіаторів старіння дрозофіли необхідно вимірювати безпосередню кількість поглинутих ХК [158].

*Методика розбавлення поживного середовища.* Найпростіший спосіб реалізації харчового обмеження у дрозофіли – це розбавлення ПС, до якого мушки мають вільний доступ [181]. Один із найбільш розповсюджених типів харчового субстрату для лабораторних *D. melanogaster* складається із желеподібної агарової суміші, яка містить висушені дріжджі та цукор [28, 178]. Ефекти від варіювання концентрацій цих речовин змінюються у діапазоні від зменшення ТЖ *D. melanogaster* за мінімальних концентрацій поживних речовин, через пік збільшення ТЖ – за оптимальної і, коли кількість харчових компонентів стає надлишковою, життя скорочується. Було прийнято вважати, що збільшення ТЖ, спричинене зменшенням вмісту поживних речовин у харчовому субстраті, виникає внаслідок позитивного ефекту від зниження концентрації побічних продуктів у системах організму, та, можливо, через скорочення фізичної діяльності, такої як репродуктивна активність, котра сприяє збільшенню соматичних ушкоджень [182].

Виявлено, що ризик від застосування розбавленої суміші для реалізації дієтичної рестрикції полягає у можливості компенсації мушками зниження концентрації поживних речовин за рахунок посилення інтенсивності поглинання ПС. На сьогодні вже опубліковані докази, як на користь [52], так і проти [137, 157] компенсаторного харчування. Разом із тим, прийнято вважати, що компенсаторне харчування не може бути ключовим фактором у збільшенні ТЖ [187].

Трохи пізніше були опубліковані дані, які описують оптимізацію у поживному субстраті балансу цукор/дріжджі в експериментах із

застосуванням ОХ у плодових мушок [35]. Такі дослідження продемонстрували, що розведення лише дріжджів за умов стабільної концентрації інших компонентів у харчовому субстраті ефективно обмежує споживання поживних речовин у *D. melanogaster*, зменшуючи їхню репродуктивну здатність і збільшуючи при цьому показник ТЖ [84].

У свою чергу Ja зі спів. [101] припустили, що багато досліджень стосовно наслідків застосування дієтичної рестрикції у *D. melanogaster* фактично являються відображенням недостатнього поглинання води. Так, вчені виявили, що необмежене поглинання води зменшує ТЖ дрозофіл обох статей, яка була збільшена у результаті застосування у них харчового обмеження [77, 101].

**Популяція *D. melanogaster*.** Всі дослідження у цій роботі проводили на аутбредній лінії *Oregon-R*. *Oregon-R* – це лабораторна лінія дикого типу, яка підтримується в умовах масового розведення. Популяцію розведення (F0) мушок утримували у повноцінному ПС, тобто в агаровому субстраті із нормальним співвідношенням усіх ХК: цукор, сухі дріжджі, манна крупа, із додаванням 10%-го спиртового розчину ніпагіну. Всіх комах утримували за стандартних умов – у термостаті із температурою  $(25 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , у стабільній вологості, із добовим чергуванням освітлення – 12 год світла та 12 год темряви щодоби.

У всіх серіях даної роботи на стадії розвитку застосовували кількісне обмеження харчування. Розвиток комах відбувався у скляних банках на 200 мл (4 шт. на варіант), за щільності популяції 200-250 личинок у кожній. У цих мушок визначали тривалість розвитку – час вильоту 50 % імаго із лялечок. Показник виживаності на преімагінальній стадії визначали як частку комах, які пройшли повний цикл розвитку від яйця до імаго. Протягом восьми годин після вильоту із лялечок особин потрібної генерації розділяли на самиць і самців та, до здійснення експериментальних маніпуляцій, утримували окремо, задля запобіганню схрещувань.

*Визначення тривалості життя.* Для дослідження ТЖ імаго поміщали у пробірки висотою 140 мм і діаметром 13 мм, що містили по 2 мл поживного субстрату, за щільності популяції по 20-25 особин на пробірку. Для кожного варіанту експерименту було використано 5-8 пробірок-повторів (залежно від експериментальної частини). Таким чином, у кожному варіанті було по 110-200 особин кожної статі окремо. Переміщення до чистих пробірок, на свіже ПС, здійснювали 2 рази на тиждень, одночасно підраховуючи загиблих комах. Так робили до повного вимирання всіх мушок, після чого розраховували показники середньої та максимальної ТЖ. Показник максимальної ТЖ розраховували як середню ТЖ 10 % найбільш "довго живучих" дрозofil у кожному варіанті.

*Визначення репродуктивної активності.* Репродуктивну активність визначали в особин жіночої статі у віці 15 діб. Запліднених самиць індивідуально поміщали у пробірки на 24 години (по 20 пробірок на варіант). У цих особин визначали фекандильність – кількість яєць, відкладених однією самицею за добу.

Крім цього, у самиць дрозofil, вирощених у ПС із вмістом 50 % і 10 % ХК, у віці 7, 15, 21, 28 і 35 діб визначали репродуктивну здатність або фертильність. Показник характеризувався кількістю лялечок, що розвинулись із яєць, відкладених однією самицею за добу.

*Визначення інших фізіологічних показників.* Визначення середньої маси тіла: по 25 особин кожної статі зважували на торсіонних терезах (по 6 повторів на варіант). Загалом, у роботі вагу проаналізували у 150-ти дорослих особин кожної статі для всіх варіантів. Потім розраховували показник середньої маси тіла (мг) однієї мушки.

Дослідження стійкості до двох стресових факторів: тимчасова повна харчова депривація і значне підвищення температури. Для проведення тесту на стійкість до повної харчової депривації імаго кожної статі окремо розсаджували по 10 особин у пробірки без поживного субстрату (10 повторів на кожен варіант концентрації). За умов дії стресового чинника дрозofil

утримували протягом 19-ти год, після чого переміщали їх у пробірки із нормальною харчовою сумішшю. Через 3 год фіксували кількість мушок, які вижили. Для перевірки стійкості до значного підвищення температури мушок кожної статі окремо розсаджували по 10 особин у пусті пробірки (10 повторів на варіант) і поміщали їх на 60 хв у термостат із температурою 40°C. Через 2 год після припинення тесту фіксували кількість живих особин.

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

**РНК виділяли** із гомогенату, одержаного від 10 личинок, 10 самиць та 10 самців у кожному варіанті за допомогою набору "РІБО-преп" (виробництво "AmpliSens", РФ) за протоколом фірми виробника.

Комплект реагентів для виділення РНК: **1** – розчин для лізису; **2** – розчин для преципітації; **3** – розчин для очищення 3; **4** – розчин для очищення 4; **5** – РНК-буфер.

#### *Протокол виділення РНК.*

1. Розчин для лізису (**1**) нагріли при температурі 65 °С до повного розчинення кристалів.
2. У підготовлені промарковані пробірки об'ємом 1,5 мл внесли по 300 мкл розчину для лізису.
3. Додали по 100 мкл різних зразків приготовлених гомогенатів. Вміст пробірок перемішали на вортексі, центрифугували протягом 5 с для видалення крапель із внутрішньої поверхні кришки.
4. Термостатували упродовж 5-ти хв при температурі 65°C.
5. Додали у пробірки по 400 мкл розчину для преципітації (**2**), перемішали на вортексі.
6. Центрифугували пробірки протягом 5-ти хв при 13 тис. об/хв.
7. Відібрали супернатант, не зачіпаючи осад.

8. Додали у пробірки по 500 мкл розчину для очищення (3) і обережно промили осад.
9. Процентрифугували пробірки протягом 1-2 хв при 13 тис. об/хв.
10. Видалили супернатант не зачіпаючи осад.
11. Додали у пробірки по 200 мкл розчину для очищення (4) і обережно промили осад.
12. Процентрифугували пробірки протягом 1-2 хв при 13 тис. об/хв.
13. Видалили супернатант не зачіпаючи осад.
14. Висушили осад у термостаті при температурі 65°C протягом 5 хв (кришки пробірок відкриті).
15. Додали у пробірки по 50 мкл РНК-буферу (5) перемішали на вортексі, термостатували при температурі 65°C протягом 5 хв.
16. Процентрифугували пробірки протягом 1-ї хв при 13 тис. об/хв.

Одержаний супернатант містив очищені тотальні РНК досліджуваного матеріалу. Оскільки матеріали від імаго отримували пізніше, тотальну РНК від личинок зберігали при -80°C. Для подальшого проведення зворотної транскрипції РНК від личинок та імаго обробляли ДНКазою.

Для синтезу кДНК використовували комерційні набори "Реверта-L" (виробник – "AmpliSens", РФ). Комплект реагентів для одержання кДНК на матриці РНК містив: **1** – RT-G-mix-1; **2** – RT-mix; **3** – Ревертаза (MMIv); **4** – ДНК-буфер.

*Протокол проведення реакції зворотної транскрипції.*

1. Відібрали мікропробірки об'ємом 0,2 мл.
2. Приготували реакційну суміш. Для цього у пробірку cRT-mix внесли 5 мкл RT-G-mix-1, ретельно перемішали на вортексі, осадили краплі з кришок мікропробірок короткочасним центрифугуванням.
3. До отриманого розчину додали 6 мкл ревертази (MMIv), піпетували, перемішали на вортексі. Осадили краплі з кришок пробірок короткочасним центрифугуванням.
4. Внесли до мікропробірок по 10 мкл готової реакційної суміші.

5. Додали по 10 мкл кожної РНК-проби окремо у різні мікропробірки із реакційною сумішшю. Обережно перемішали піпетуванням.
6. Поставили пробірки в ампліфікатор із температурою 37°C на 30 хв.
7. Отриману в реакції зворотної транскрипції кДНК для наступного ПЛР-аналізу розвели у 2 рази ДНК-буфером (до 20 мкл кДНК кожного зразку окремим наконечником додали по 20 мкл ДНК-буфера, перемішали).

Для фіксування проходження зворотної транскрипції виконували негативні контролі (один без додавання зворотної транскриптази і другий – без додавання тотальної РНК). Отриману кДНК зберігали при -20°C.

Для ПЛР-аналізу підібрали специфічні для вивчених генів дрозофіли праймери (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>):

*InR*: F – 5'-cggaaaacgaaccsaact-3' і R – 5'-ggcagagtttgctgttcca-3';

*dSir2*: F – 5'-gtcggacaacgatgattgc-3' і R – 5'-actgtcgtcgtctctctga-3';

В якості внутрішнього контролю визначали рівень експресії гену "домашнього господарства" *GAPDH* (гліцеральдегід-фосфатдегідрогенази):

*GAPDH*: F – 5'cgttcatgccaccaccgcta-3' і R – 5'-ccacgtccatcacgccacaa-3'.

1. При постановці ПЛР використовували мікропробірки по 0,2 мл. Для побудови калібрувальної прямої ПЛР проводили на чотирьох концентраціях референтної ДНК в дуплетах, які охоплювали діапазон 10х розведення і були приготовлені за допомогою серії розведень. Всі зразки ДНК були проаналізовані у 5-ти повторах на варіант.

2. У пробірки внесли по 25 мкл попередньо приготованої реакційної суміші, приготовленої на основі "Набору для проведення ПЛР-РЧ за наявності інтеркалюючого барвника SYBR Green 1" ("Сінтол", РФ). Реакційна суміш для ПЛР містила: 20 ммоль KCl, 2 ммоль – MgCl<sub>2</sub>, 0,2 ммоль – dNTPs (диоксинуклеотид-3-фосфати), 0,6 мкмоль кожного праймера, 1

одиницю *Taq*-полімерази (термостабільна ДНК-полімераза) та 1x SYBR Green 1.

3. До різних пробірок додали по 5 мкл кДНК від різних зразків. В якості негативного контролю використовували проби без кДНК-матриці.

4. Всі зразки помістили в ампліфікатор Bio-Rad Chromo4. Початкову денатурація при 95°C проводили упродовж 3 хв.

5. Реакції ампліфікації складали 35 циклів. Температурні профілі полягали у денатурації за 95°C протягом 10 с, відпалі праймерів за 60°C – 10 с, синтезі – 72°C, 20 с. Після кожного циклу виконувалась детекція.

6. Завершальна полімеризація при 72°C – 3 хв.

7. Після завершення ампліфікації 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.** Для визначення активності ферментів системи антиоксидантного захисту готували ферментні екстракти шляхом гомогенізації 5 імаго плодових мушок у 300-х мл охолодженого льодом розчину із 0,05 моль/л фосфатним буфером [pH 7,4]. Зразки центрифугували 10 хв при 4°C і у супернатанті вимірювали кількість загального білка за методом Бредфорда [44].

Активність СОД визначали непрямым методом, описаним Kostyuk і Potapovich [116], за рівнем інгібування реакції супероксидзалежного окислення кверцетину за наявності N',N',N',N'-тетраметилетилендіаміна. Екстракт мушок в об'ємі 5 мкл із концентрацією 200 мкг/мл загального білку вносили у 150 мкл реакційної суміші, що містила 20 ммоль/л калій-фосфатний буфер [pH 10], 0,8 ммоль/л TEMED, 0,8 ммоль/л ЕДТА і 5 мкл вихідного розчину кверцетину (1,5 мг кверцетину у 10-ти мл



диметилсульфоксиду); реакційну суміш інкубували впродовж 20 хв при кімнатній температурі. Паралельно готували контрольну реакційну суміш без додавання екстракту мушок. 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 визначали колориметричним методом, описаним Goth [83]. Екстракт інкубували із перекисом водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) впродовж 1 хв при  $37^\circ\text{C}$ , після чого 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 перекису водню розраховували за калібрувальною кривою. Активність ферменту визначали за кількістю розкладеного пероксиду водню та виражали як кількість  $\text{H}_2\text{O}_2$  на  $\text{мг}^{-1}$  білку на  $\text{хв}^{-1}$  [83].

Вміст КПГ визначали за методикою, описаною Oudes et al. [172]. Заморожених мушок гомогенізували в 1 мл 0,2 моль/л фосфатного буфера [рН 7,4] із додаванням 10 ммоль/л ЕДТА. Очищений супернатант відокремлювали та переварювали 24 год при  $37^\circ\text{C}$  в 10 мг/мл трипсину. Потім гомогенат розбавляли до оптичної щільності  $< 0,05$  при 365 нм та вимірювали на флуоресцентному анізотропному спектрометрі, як описали Ayres et al. [29], при  $\lambda_{\text{зб.}} = 365$  нм та  $\lambda_{\text{ем.}} = 440$  нм. Кількість КПГ розраховували за калібрувальною кривою, побудованою із використанням штучних КПГ та нормували за вмістом загального білку. Застосовані довжини хвиль збудження та емісії демонстрували кількість КПГ, наявних у тканинах організму [163].

**Дизайн експериментальної роботи** продемонстровано на рисунку 2.1.

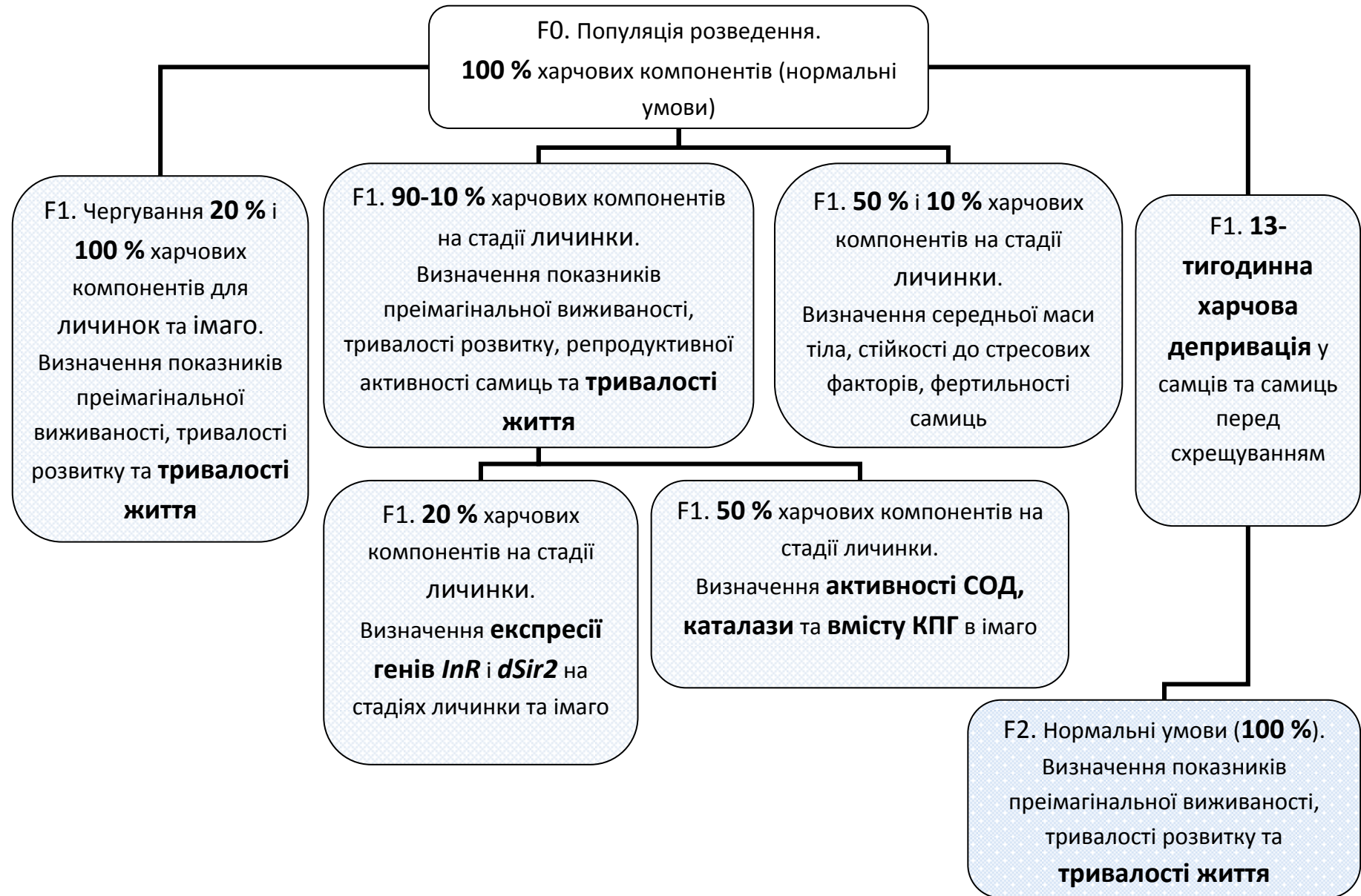


Рис. 2.1. Схема експериментальної роботи.

Для більш детального та систематичного опису всі представлені у даній роботі експерименти із обмеженням харчування можна умовно розділити на шість частин, особливості яких зазначено далі.

**2.2.1.** У першій частині досліджень личинок утримували у поживному субстраті, в якому ХК були у концентраціях, що становили 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % і 10 % порівняно зі стандартним ПС – 100 % (контроль). Поживний субстрат із потрібною концентрацією ХК одержували наступним чином.

1) Для 90%-ої суміші об'ємом 200 мл брали 180 мл суміші із концентрацією 100 % ХК та додавали 20 мл готового агарового розчину. Після охолодження додали 0,2 мл 10%-го спиртового розчину ніпагіну. Одержаний 90%-й розчин розлили у 4 банки об'ємом 250 мл (по 50 мл поживної суміші у кожному). Таке 90%-ве ПС містило 22,5 мг/мл дріжджів, 36 мг/мл манної крупи та 36 мг/мл цукру.

2) За таким же принципом одержали ПС із вмістом 80 % ХК. Брали 160 мл суміші із концентрацією 100 % ХК та додавали 40 мл готового агарового розчину. Після охолодження додали 0,2 мл 10%-го спиртового розчину ніпагіну. 80%-й розчин розлили у 4 банки об'ємом 250 мл (по 50 мл цієї поживної суміші у кожному). Отже, 80%-ве ПС містило 20 мг/мл дріжджів, 32 мг/мл манної крупи та 32 мг/мл цукру. Всі інші концентрації утворювали аналогічним способом.

3) Таким чином ПС із концентрацією 70 % ХК містило 17,5 мг/мл дріжджів, 28 мг/мл манної крупи та 28 мг/мл цукру, а також 0,2 мл ніпагіну.

4) ПС із концентрацією 60 % ХК містило 15 мг/мл дріжджів, 24 мг/мл манної крупи та 24 мг/мл цукру (і 0,2 мл ніпагіну).

5) 50%-ве ПС – 12,5 мг/мл дріжджів, 20 мг/мл манної крупи та 20 мг/мл цукру (і 0,2 мл ніпагіну).

6) 40%-ве ПС – 10 мг/мл дріжджів, 16 мг/мл манної крупи та 16 мг/мл цукру (і 0,2 мл ніпагіну).

7) 30%-ве ПС – 7,5 мг/мл дріжджів, 12 мг/мл манної крупи та 12 мг/мл цукру (і 0,2 мл ніпагіну).

8) 20%-ве ПС – 5 мг/мл дріжджів, 8 мг/мл манної крупи та 8 мг/мл цукру (і 0,2 мл ніпагіну).

9) 10%-ве ПС – 2,5 мг/мл дріжджів, 4 мг/мл манної крупи та 4 мг/мл цукру (і 0,2 мл ніпагіну).

У личинок визначали показники преімагінальної виживаності та тривалості розвитку; а на стадії імаго – тривалість життя та репродуктивну активність (фекандильність) самиць.

**2.2.2.** У другій експериментальній серії у плодових мушок, вирощених за умов ОХ, досліджували більше життєвих характеристик. Зокрема, в імаго, яких на личинковій стадії утримували у поживному субстраті із концентраціями ХК 50 % і 10 % від норми (100 % – контроль), визначали показники середньої маси тіла, стійкості до стресових факторів: 18-тигодинна харчова депривація і підвищення температури до 40°C. У самиць дрозофіл у віці 7, 15, 21, 28 і 35 діб визначали репродуктивну здатність, тобто фертильність.

**2.2.3.** Особливість третьої експериментальної частини полягала у тому, що застосували ПС із концентрацією 20 % ХК для різних груп мушок у різних режимах: тільки на стадії розвитку чи тільки у дорослих особин, або і для личинок, і для імаго. Так, половину личинок *D. melanogaster* утримували у 10 банках із поживним субстратом, в якому концентрація ХК була зниженою до 20 % від норми, а інших – вирощували у 10 банках, що містили ПС зі 100 % компонентів харчування. В усіх цих комах визначали тривалість розвитку і виживаність на преімагінальній стадії.

Імаго, вирощених у поживному субстраті із вмістом 20 % ХК розділили на 2 половини: одну з них у подальшому утримували на стандартному ПС, а другу на ПС із 20 % компонентів харчування. У такий же спосіб розділили і

дорослих особин, вирощених за умов 100 % ХК у поживному субстраті. Таким чином, в експерименті сформували чотири варіанти груп мушок, в яких на різних стадіях онтогенезу застосовували обмежене та/або "повноцінне харчування":

- 1) – контроль, мушок утримували на 100 % поживному субстраті впродовж всього життя;
- 2) – мушок утримували у стандартному ПС на личинковій стадії, а у дорослому віці перевели на поживний субстрат із 20 % ХК;
- 3) – дрозофіл утримували на личинковій стадії із 20 % ХК у поживному субстраті, а у дорослому віці – на 100 % ПС;
- 4) – мушок утримували із 20 % компонентів харчування у ПС впродовж всього життя.

У всіх цих груп імаго визначали показник середньої ТЖ.

**2.2.4.** У четвертій частині роботи на початку експерименту мушок покоління F1 вирощували у стандартному поживному субстраті (100 % ХК). Після вилуплення імаго розділили за статтю та утримували окремо, щоб самиці були віргінними. У віці 10 діб половину самців та половину самиць поміщали у пусті банки, де їх утримували протягом 13 год (для 13-тигодинної харчової депривації), а інших утримували за умов "нормального харчування", тобто без харчової депривації. Безпосередньо після тимчасової повної харчової депривації (ХД) здійснювали схрещування між дрозофілами із різних банок. Для цього 50 самців і 50 самиць, які були піддані ХД, або ні, поміщали у банки об'ємом 200 мл (по 5 штук для кожного експериментального варіанту), що містили по 20 мл стандартного поживного субстрату. Загалом тривалість періоду схрещувань і відкладання яєць становила 3 год. Для запобігання ефекту перенаселення, який міг вплинути на життєздатність личинок і, згодом, на ТЖ імаго покоління F2, треба було ретельно контролювати кількість яєць у кожній банці. Після відкладання 150-200-т яєць, самиць покоління F1 вилучали із банок.

Таким чином, у цій серії експерименту показник ТЖ визначили у п'яти варіантах нащадків, сформованих від різних батьківських пар плодових мушок:

- 1) контроль – нащадки самців і самиць, для яких взагалі не застосували ХД;
- 2) нащадки "нормальних" самиць (без ХД) та самців, для яких до схрещування застосували ХД;
- 3) нащадки самиць, для яких до схрещування застосували ХД, та "нормальних" самців (без ХД);
- 4) нащадки самців та самиць, для яких до схрещування застосували 13-тигодинну харчову депривацію.

У цих нащадків (тобто покоління F2) фіксували показники преімагінальної виживаності та тривалість розвитку, а на стадії імаго показники середньої та максимальної ТЖ розраховували після вимирання всіх плодових мушок.

**2.2.5.** У п'ятій серії експериментів у плодових мушок після утримання за умов ОХ на стадії розвитку аналізували рівні експресії двох генів *InR* та *dSir2* на різних етапах онтогенезу. Личинок *D. melanogaster* утримували у поживному субстраті, що містив 20 % ХК, у порівнянні з контролем (100 % ХК). У дорослому віці всіх мушок утримували на повноцінній (100 %) поживній суміші. Визначення експресії генів у кожному із експериментальних варіантів здійснили у 5 повторах.

**2.2.6.** У шостій експериментальній частині у плодових мушок досліджували зміну рівнів активності ферментів системи антиоксидантного захисту СОД і каталази, а також рівні накопичення КПП в імаго дрозофіл, вирощених за умов ОХ. Личинок генерації F1 вирощували у поживному субстраті, що містив 50 % ХК у порівнянні зі стандартним 100 % ПС. Усіх мушок на стадії імаго утримували на "повноцінному" поживному субстраті

за стандартних умов. Визначення активності СОД, каталази та кількості КПП здійснювали у віці 15 і 20 діб у п'яти повторях.

### 2.3. Статистична обробка результатів

Для статистичного опрацювання отриманих результатів використовували програму Statistica 6. Нормальність розподілу даних аналізували тестом Шапіро-Вілка. Достовірність відмінностей преімагінальної виживаності личинок визначали за допомогою непараметричного критерію Пірсона (метод  $\chi^2$ ). Для статистичної оцінки залежності середньої та максимальної ТЖ від концентрації ХК на стадії личинки застосовували метод однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Для виявлення статистичної значущості різниці між групами застосовували post-hoc Tukey's HSD test. Оцінку відмінностей поміж варіантами у рівнях експресії генів здійснювали за допомогою t-критерію Стьюдента [122]. Аналогічним чином визначали рівні статистичної значущості у різниці біохімічних показників.

Для визначення вікової динаміки смертності використали формулу моделі смертності Гомпертца:

$$\mu(x) = R_0 \exp(\alpha x) \quad (2.1),$$

де  $\mu(x)$  – рівень смертності у віці  $x$ , а  $R_0$  і  $\alpha$  – константи.

У логарифмічній формі рівняння 2.1 має вигляд:

$$\ln \mu(x) = \ln(R_0) + \alpha x,$$

де константа " $\alpha$ " відображає рівень смертності у віці " $x$ ", а  $\ln(R_0)$  – незалежний від віку коефіцієнт смертності. Параметри рівняння Гомпертца " $\alpha$ " і " $b$ ", де  $b = \ln(R_0)$ , розраховані методом лінійної регресії.

### РОЗДІЛ 3

## ЗМІНИ ПАРАМЕТРІВ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ОБМЕЖЕННЯ ХАРЧУВАННЯ НА СТАДІЇ ЛИЧИНКИ

Проблему впливу обмеження харчування на ТЖ комах вивчали та описували у багатьох дослідженнях [48, 101, 138, 189, 218, 230]. Показано, що за допомогою харчових обмежень можна збільшувати ТЖ лабораторних тварин, проте дані щодо його впливу на параметри життєздатності *D. melanogaster* лишаються суперечливими. Так, в огляді вчених, які тривалий час займались вивченням цього питання, відзначено, що у 20-ти статтях продемонстрований позитивний ефект дієтичної рестрикції у дрозофіл, а у 6-и роботах таке явище відсутнє [189]. Крім того, майже всі ці дослідження, за виключенням деяких експериментів, проводили на імаго [225].

У даній роботі застосовували варіанти режимів кількісного ОХ на стадії розвитку *D. melanogaster*, за якого у поживному субстраті був зменшений вміст усіх компонентів харчування. Популяцію мушок F0 вирощували у повноцінній поживній суміші, тобто із нормальним співвідношенням усіх компонентів харчування (100 %). Всіх комах утримували за стандартних умов – у термостаті із температурою  $(25 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , у стабільній вологості, із добовим чергуванням освітлення – 12 год світла та 12 год темряви.



### 3.1. Зміни тривалості розвитку та преімагінальної виживаності внаслідок обмеження харчування

Личинок плодових мушок покоління F1 вирощували у поживному субстраті, що містив білковий (дріжджі) і вуглеводний (цукор) компоненти в обмежених концентраціях – 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % і 10 %, у порівнянні зі стандартним ПС (контроль – 100 % ХК), але з нормальною кількістю агар-агару й ніпагіну.

Оскільки ОХ застосовували на стадії розвитку, то, перш за все, необхідно було дослідити його вплив на показники тривалості розвитку та виживаності на преімагінальній стадії *D. melanogaster*. Це виявляється важливим не лише тому, що вищезазначені параметри життєздатності відображають адаптаційні можливості організму за умов стресу, але й демонструють наявність чи відсутність впливу добору впродовж розвитку, який певним чином впливає на ТЖ дорослих плодових мушок.

Тривалість розвитку і преімагінальну виживаність визначали у дрозофіл покоління F1, розвиток яких відбувався у скляних банках об'ємом 200 мл (4 шт. на групу), за щільності популяції 200-250 личинок у кожній.

**Тривалість розвитку.** Показник визначили як проміжок часу від закінчення відкладання яєць до моменту вильоту приблизно половини імаго з лялечок. Як показали проведені дослідження, зниження вмісту ХК у поживному субстраті плодових мушок до 60 % від нормального рівня не впливало на тривалість їхнього розвитку (рис. 3.1).

Відмічено, що у дрозофіл, яких утримували у поживному субстраті із 50 % і 40 % ХК, спостерігалась затримка початку лялькування. Достовірне збільшення тривалості розвитку зафіксовано у плодових мушок, яких утримували у поживному субстраті із концентраціями компонентів харчування, починаючи із 30 % ( $p < 0,05$ ). Зі зменшенням вмісту ХК у поживному субстраті показник тривалості розвитку поступово зростає і сягає

найбільшого результату за умов утримання личинок при концентрації 10 % поживних компонентів у порівнянні з контролем ( $p < 0,001$ ) (див. рис. 3.1).

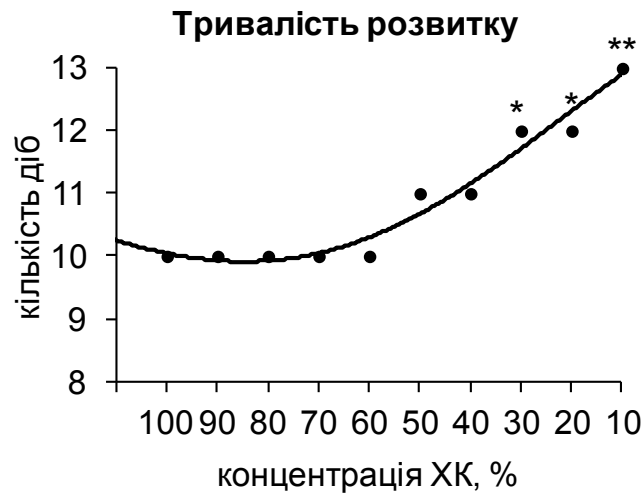


Рис. 3.1. Залежність тривалості розвитку *D. melanogaster* від різної концентрації харчових компонентів у поживному субстраті.

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

**Виживаність на преімагінальній стадії.** Для визначення виживаності на преімагінальній стадії фіксували частку комах, які пройшли повний цикл розвитку, від яйця до імаго. Відмічено, що зменшення концентрації компонентів харчування у поживному субстраті до 30 % від контрольного рівня не впливало на показник виживаності личинок дрозофіл. Достовірне збільшення смертності на преімагінальній стадії *D. melanogaster* виявлено за умов розвитку у варіантах поживної суміші, що містили мінімальні концентрації компонентів харчування. Так, при 20 % ХК показник сягав значення 0,76 [ $F=6,64$ ;  $p=0,01$ ], а при 10 % ХК виживала тільки близько половини особин – 0,55 [ $F=28,55$ ;  $p=0,00001$ ] (рис. 3.2).

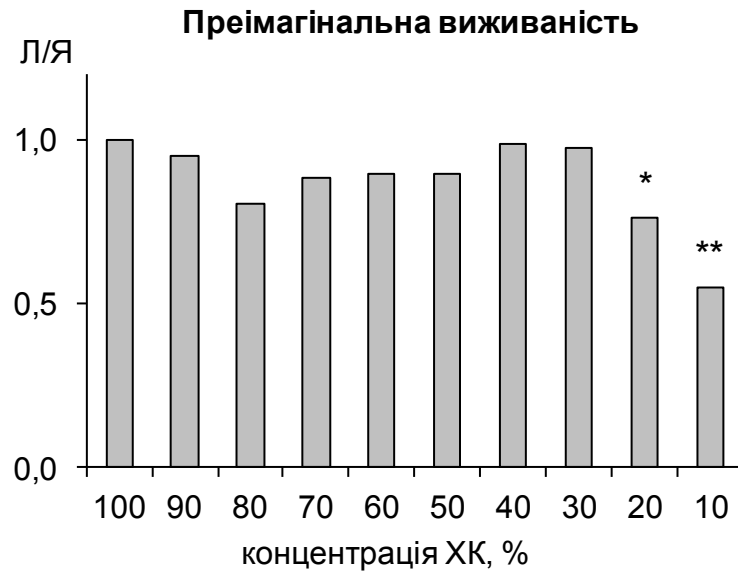


Рис. 3.2. Залежність виживаності на преімагінальній стадії *D. melanogaster* від концентрації харчових компонентів у поживному субстраті.

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

### 3.2. Вплив обмеження харчування впродовж личинкової стадії на параметри життєздатності імаго

У наступній частині експериментальної роботи у плодових мушок досліджували важливі параметри життєздатності на стадії дорослого організму після того, як на етапі розвитку застосували ОХ. Виходячи із даних попереднього дослідження, в експериментальній серії цього підрозділу фізіологічні параметри аналізували саме для дрозофіл, вирощених за умов 50 % і 10 % ХК порівняно зі стандартним ПС (100 % ХК).

**Маса тіла.** У самців, які розвивались у ПС із 10 % ХК, виявлено достовірне зменшення показника середньої маси тіла –  $0,45 \pm 0,022$  ( $p < 0,001$ ) порівняно з контролем –  $0,937 \pm 0,008$  (рис. 3.3, А).

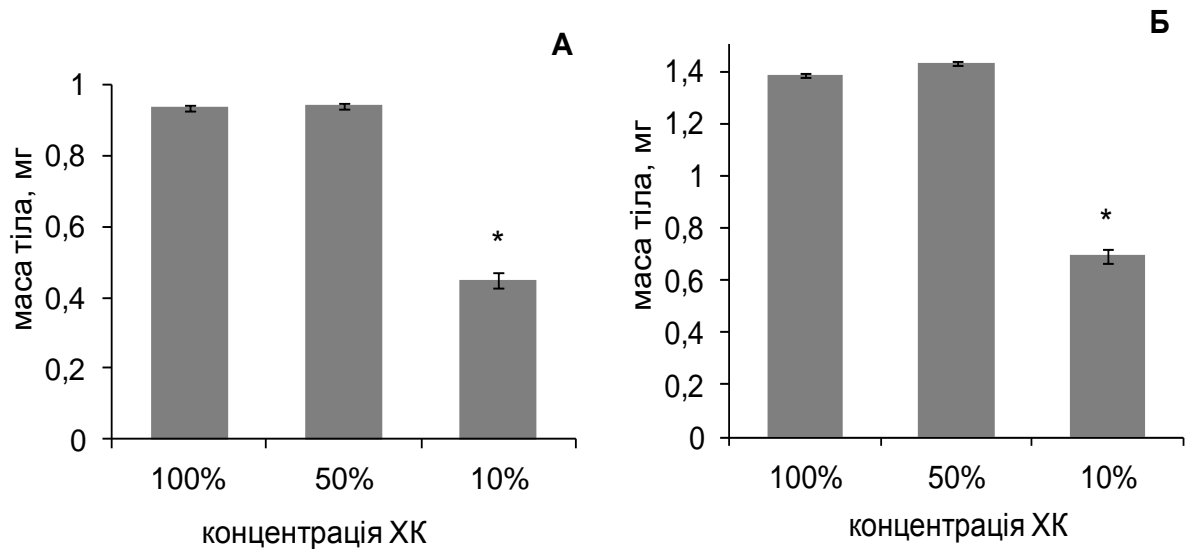


Рис. 3.3. Вага самців (А) і самиць (Б) дрозофіл, які розвивались у поживному субстраті, що містив 50 % і 10 % харчових компонентів порівняно з контролем (100 %).

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

Подібно до особин чоловічої статі, у самиць, котрі розвивались у поживному субстраті із 10 % компонентів харчування, зафіксовано достовірне зниження середньої маси тіла –  $0,694 \pm 0,026$  ( $p < 0,001$ ) порівняно з контролем –  $1,387 \pm 0,008$  (див. рис. 3.3, Б).

На відміну від цього за умов утримання дрозофіл на стадії розвитку у поживному субстраті із 50 % ХК не було зафіксовано зменшення маси тіла дорослих мушок обох статей: самці –  $0,94 \pm 0,009$  і самиці –  $1,43 \pm 0,007$  (див. рис. 3.3, А і Б).

**Тести на стійкість до стресових факторів.** Стійкість до ХД визначали у самців та самиць дрозофіли, яких на стадії розвитку утримували у поживному субстраті із 50 % ХК порівняно з контролем. Достовірне підвищення стійкості до ХД зафіксовано у самців, вирощених із 50 %

компонентів харчування –  $36 \pm 2,6$  штук ( $p < 0,05$ ) порівняно з контролем –  $17 \pm 2,1$  штук (рис. 3.4).

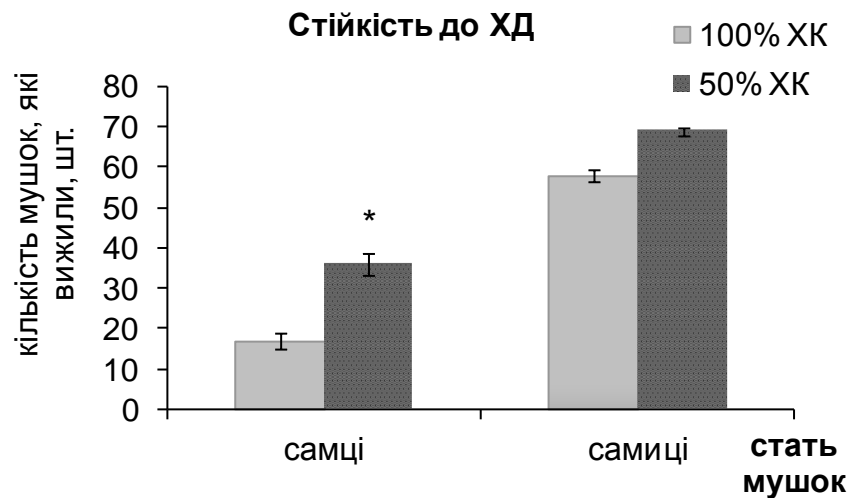


Рис. 3.4. Стійкість до 18-тигодинної харчової депривації у дрозодфіл, вирощених у поживному субстраті із концентрацією 50 % харчових компонентів порівняно з контролем (100 %).

Примітка. ХД – 18-тигодинна харчова депривація. \* –  $p < 0,01$  (за методом  $\chi^2$ ).

Разом із тим, у самиць достовірного результату виявлено не було: у контролі вижило  $58 \pm 1,5$  штук, а в групі особин, які розвивались за умов ОХ –  $69 \pm 1$  штук (див. рис. 3.4).

Для тесту на стійкість до значного підвищення температури брали самців та самиць дрозодфіли, яких на стадії розвитку утримували у поживному субстраті із 50 % ХК порівняно з контролем. Достовірних відмінностей у стійкості до ТШ як у самців (у контролі –  $8 \pm 0,8$  штук, після розвитку в умовах ОХ –  $13 \pm 1,9$  штук), так і у самиць (у контролі –  $46 \pm 2,1$  штук, після розвитку в умовах ОХ –  $45 \pm 3,1$  штук) дрозодфіли, вирощених за умов 50 % ХК у поживному субстраті виявлено не було (рис. 3.5).

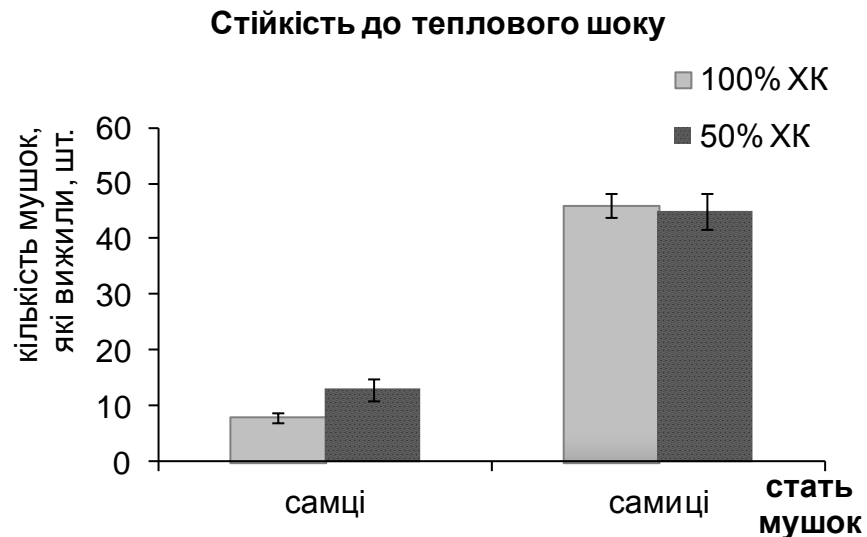


Рис. 3.5. Стійкість до теплового шоку (40°C) у дрозофіл, вирощених у поживному субстраті із концентрацією 50 % харчових компонентів порівняно з контролем (100 %).

Примітка. ХК – харчові компоненти.

**Визначення репродуктивної здатності самиць.** У самиць *D. melanogaster*, вирощених у поживному субстраті із 50 % ХК і 10 % ХК проаналізували здатність до репродукції. Для цього визначали показник фертильності (fertility), що відображає кількість мушок, які розвинулись до стадії лялечки із яєць, відкладених однією самицею за добу. Для виявлення можливого зміщення піку репродуктивної здатності фертильність фіксували у самиць різних вікових груп. Продемонстровано, що у віці 7-и, 15-и, 21-ї, діб репродуктивна здатність після розвитку за умов ОХ достовірно менша за контрольний показник. На зображенні видно відмінності у піках фертильності, що зумовлено розвитком із різними варіантами харчування (рис. 3.6). У віці 7 діб виявлено зниження показника у самиць, вирощених за умов як 50 % ХК –  $4,90 \pm 2,21$  ( $p < 0,001$ ), так і 10 % ХК –  $8,20 \pm 2,36$  ( $p < 0,01$ ), на відміну від 100 % ХК (контроль) –  $22,05 \pm 3,05$ . У віці 15 діб зменшення показника здатності до репродукції зафіксували лише у жіночих особин, вирощених за умов 10 % компонентів харчування –  $13,10 \pm 2,39$  ( $p < 0,05$ ) порівняно зі 100 % ХК –  $23,30 \pm 2,63$ .

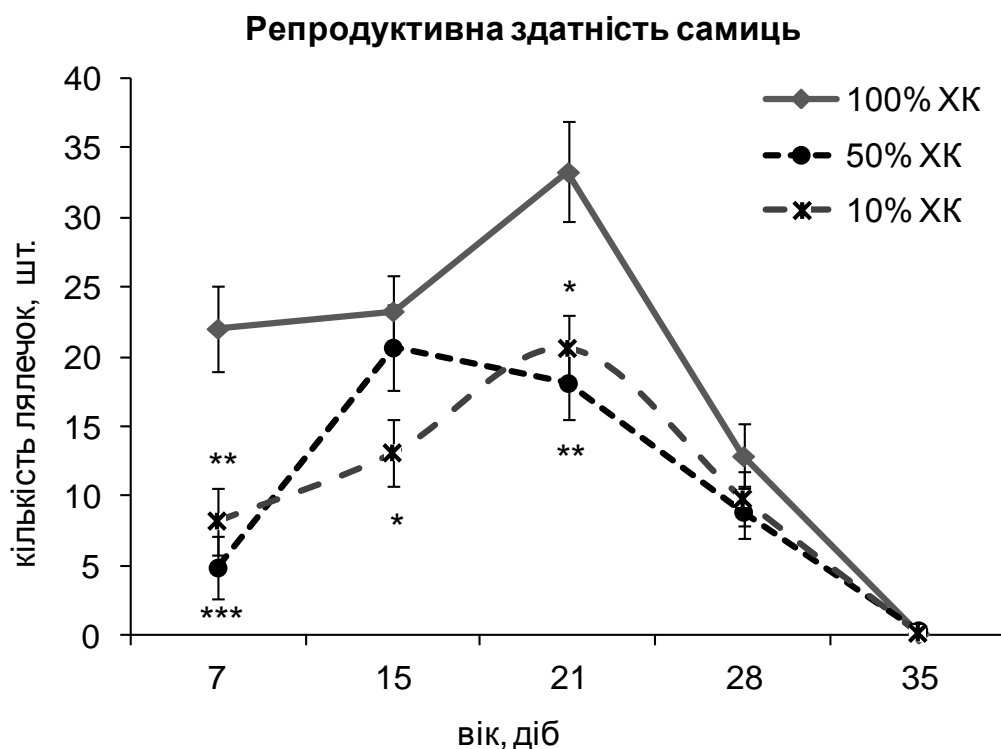


Рис. 3.6. Динаміка репродуктивної здатності самиць дрозофіли різного віку, вирощених у поживному субстраті із концентраціями 50 % і 10 % харчових компонентів.

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

Крім цього, зменшення репродуктивної здатності відмічено і у третьої вікової групи – 21 доба – для обох варіантів зменшення концентрацій компонентів харчування на стадії розвитку: 50 % ХК –  $18,15 \pm 2,68$  ( $p < 0,01$ ), 10 % ХК –  $20,60 \pm 2,35$  ( $p < 0,05$ ) порівняно з контролем –  $33,30 \pm 3,61$  (див. рис. 3.6).

### 3.3. Тривалість життя *D. melanogaster*, вирощених за умов різних концентрацій харчових компонентів у поживному середовищі

Таким чином, внаслідок розвитку за умов зменшеної концентрації компонентів харчування у поживному субстраті виникає статистично значуще зниження репродуктивної здатності самиць. Потрібно зазначити, що при різних варіантах зменшення концентрації поживних компонентів на стадії розвитку, репродуктивна активність особин жіночої статі також зменшується. Зазначений показник характеризується фекандильністю (fecundity), що визначається кількістю яєць, які відкладає одна самиця статевозрілого віку (6 діб) за добу. Достовірне зменшення репродуктивної активності починали фіксувати із концентрації 70 % ХК –  $8,75 \pm 1,71$  ( $p < 0,05$ ), при 50 % ХК –  $8,95 \pm 2,03$  ( $p < 0,05$ ), 40 % ХК –  $2,5 \pm 1,07$  ( $p < 0,001$ ), 30 % ХК –  $7,2 \pm 1,46$  ( $p < 0,01$ ), порівняно з контролем (100 % ХК) –  $14,8 \pm 1,78$  (рис. 3.7).

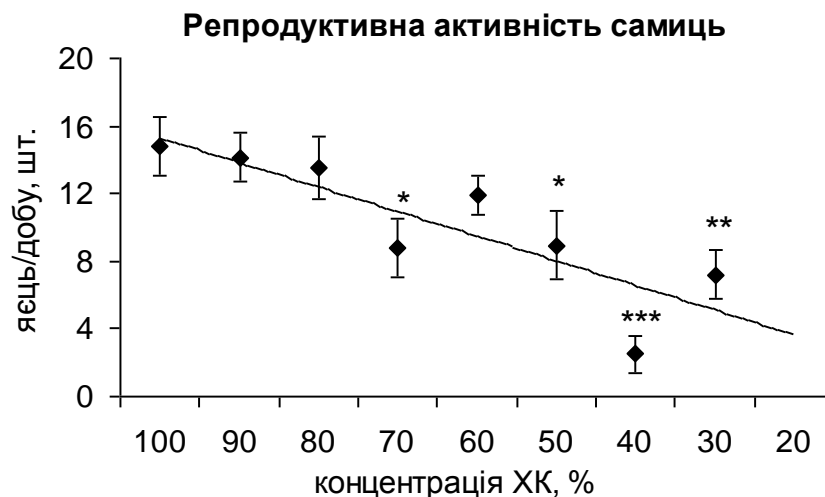


Рис. 3.7. Залежність репродуктивної активності самиць *D. melanogaster* від різних концентрацій харчових компонентів у поживному субстраті на стадії розвитку.

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



За умов розвитку дрізофіл у поживному субстраті із мінімальними концентраціями компонентів харчування – 20 % і 10 % від норми – яйцекладка була суттєво пригнічена, а тому на графіку цих даних немає (див. рис. 3.7).

**Визначення тривалості життя.** Криві виживаності демонструють відсутність достовірних змін у ТЖ самиць (не зважаючи на зменшення їхньої репродуктивної активності), які розвивались за умов зменшення концентрацій компонентів харчування у поживному субстраті (рис. 3.8).

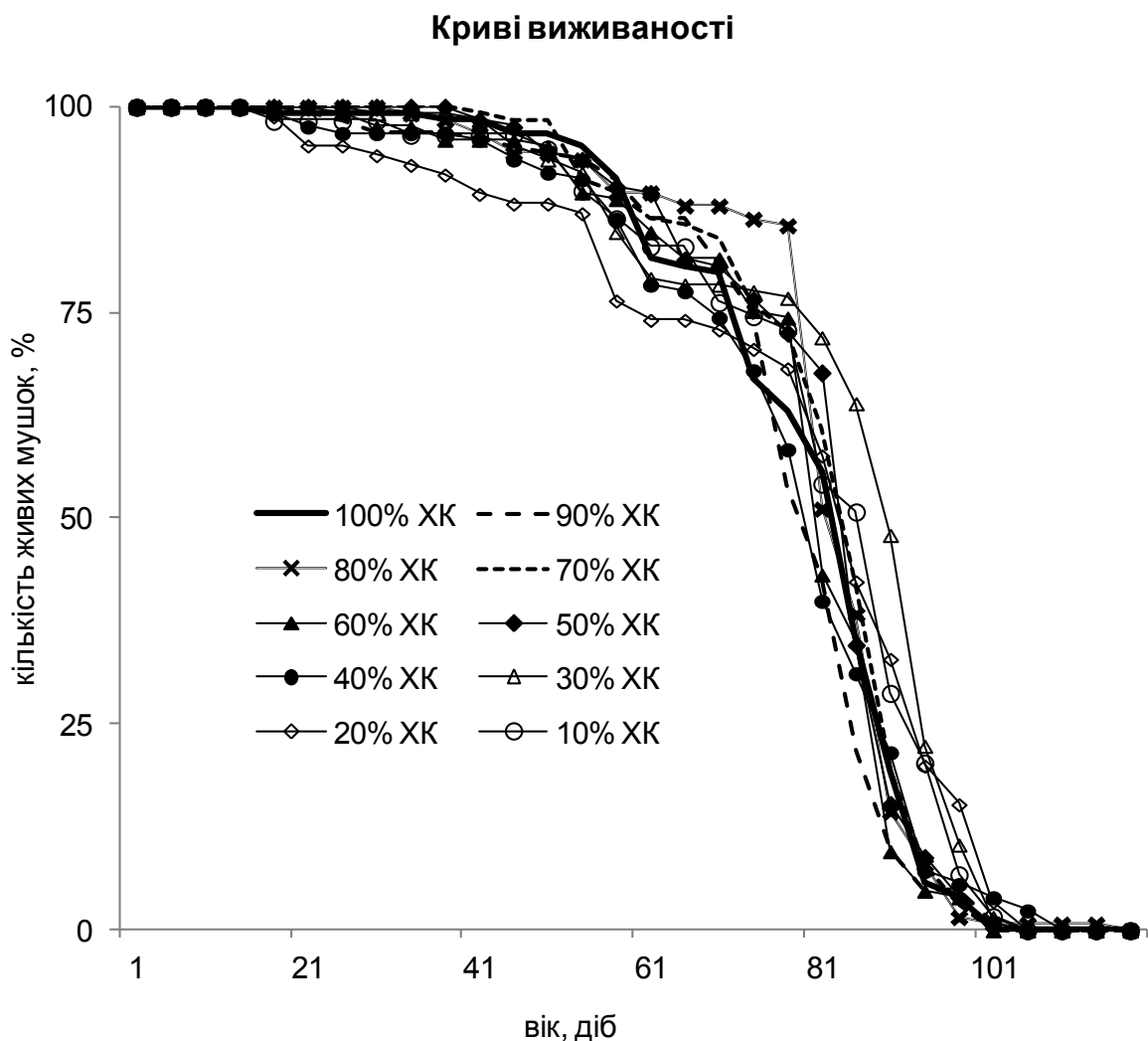


Рис. 3.8. Криві виживаності самиць дрозофіли, які розвивались у поживному субстраті зі зниженими концентраціями харчових компонентів (90-10 %) порівняно з контролем (100 %).

Збільшення ТЖ виявлено в особин чоловічої статі після розвитку за умов проміжних концентрацій компонентів харчування, що і демонструють наступні криві виживаності (рис. 3.9).

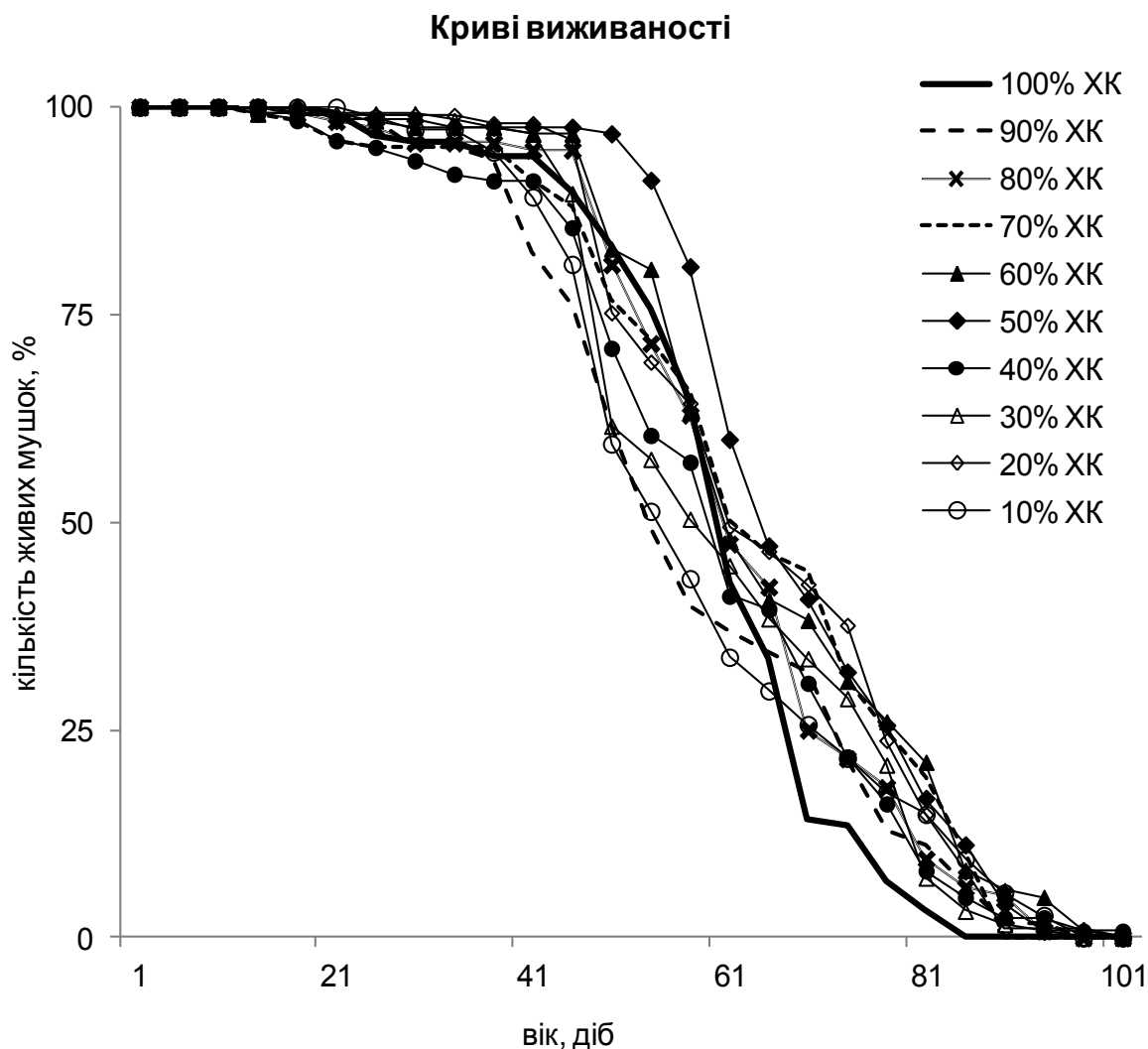


Рис. 3.9. Криві виживаності самців дрозофіли, які розвивались у поживному субстраті зі зниженими концентраціями харчових компонентів (90-10 %) порівняно з контролем (100 %).

Так, лінія із чорним трикутником та лінія із чорним ромбом відображають криві виживаності особин чоловічої статі, вирощених за умов відповідно 60 % і 50 % компонентів харчування [ $F=6,12$ ;  $p<0,001$ ], порівняно з контролем (100 % ХК) – потовщена чорна лінія (див. рис. 3.9).

При розрахунку середньої ТЖ у самців, які розвивались у поживному субстраті із концентраціями 60 % ХК і 50 % ХК, виявлено достовірне збільшення показника:  $67,74 \pm 1,39$  і  $67,74 \pm 1,21$  відповідно, у порівнянні з контролем:  $61,06 \pm 1,16$ , при  $p < 0,001$  (рис. 3.10, А).

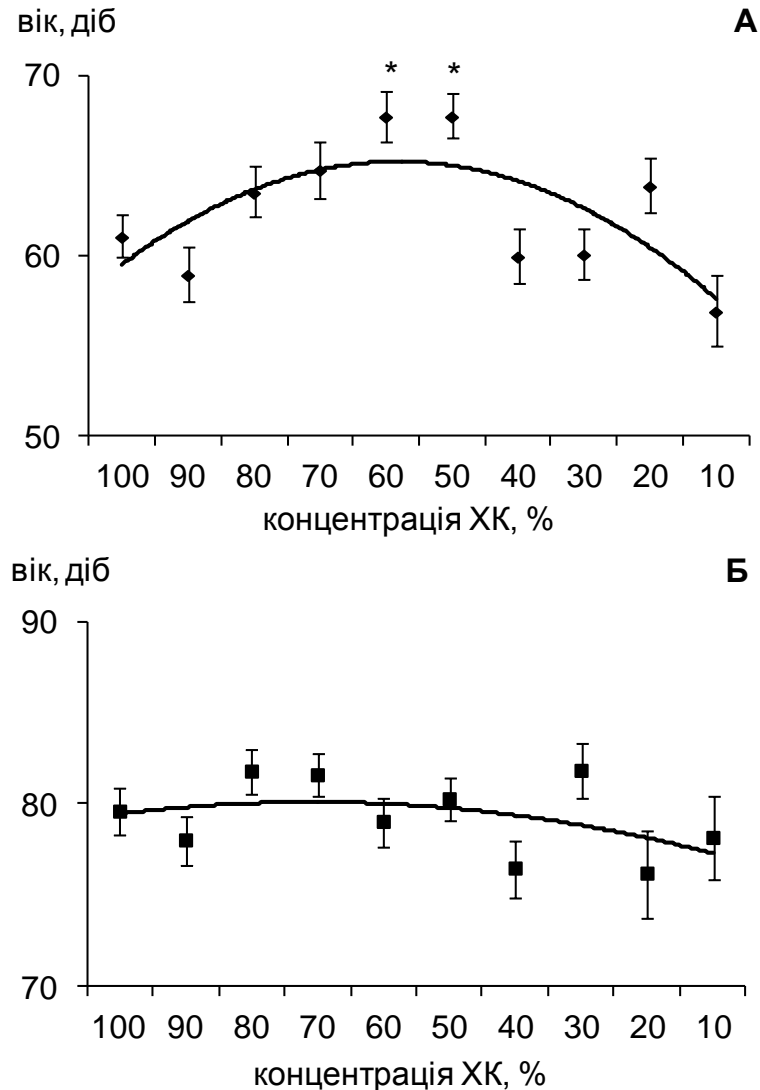


Рис. 3.10. Середня тривалість життя самців (А) і самиць (Б) *D. melanogaster*, які розвивались зі зниженими концентраціями харчових компонентів у поживному субстраті.

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

Варто відмітити, що у самиць не було зафіксовано якихось змін середньої ТЖ після розвитку за умов будь-якої зменшеної концентрації компонентів харчування у поживному субстраті (див. рис. 3.10, Б).

Подібно до середньої ТЖ, було зображено залежність максимальної ТЖ мушок від застосування ОХ на стадії розвитку (рис. 3.11).

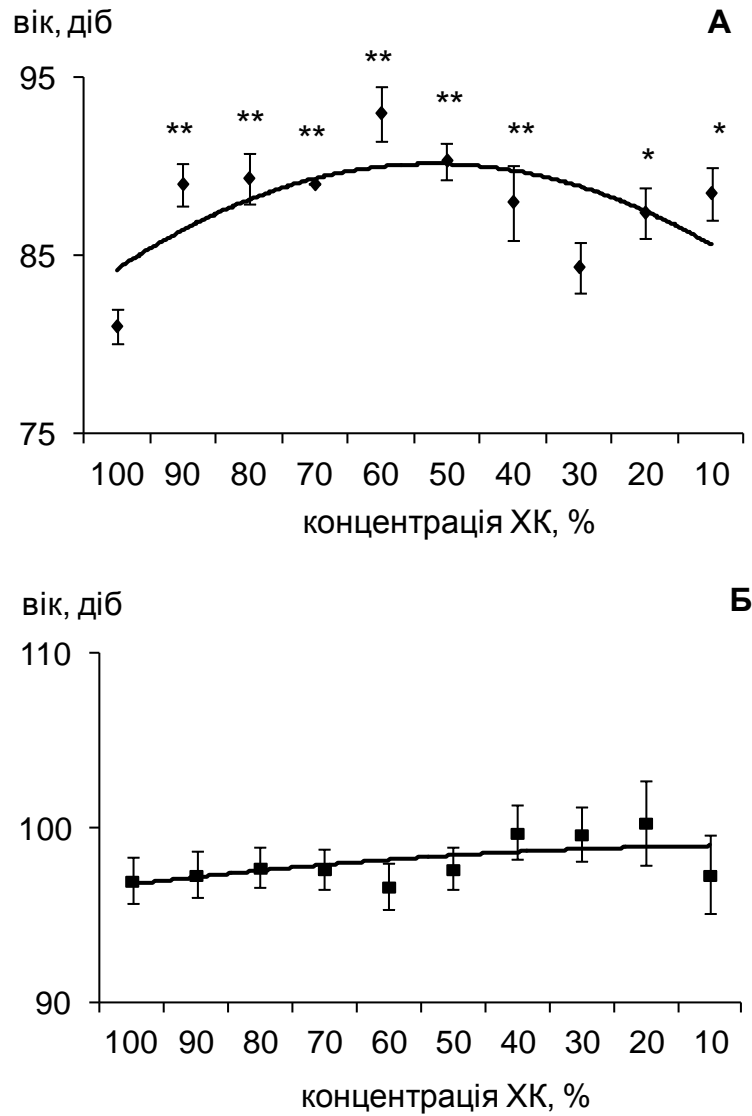


Рис. 3.11. Максимальна тривалість життя самців (А) і самиць (Б) *D. melanogaster*, які розвивались зі зниженими концентраціями харчових компонентів у поживному субстраті.

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

Для самців характерним було те, що майже в усіх групах (крім 30 % ХК) максимальна ТЖ була більшою: 90 % ХК –  $89,00 \pm 1,21$ , 80 % ХК –  $89,33 \pm 1,43$ , 70 % ХК –  $89,00 \pm 0,01$ , 60 % ХК –  $93,00 \pm 1,56$ , 50 % ХК –  $90,33 \pm 1,04$ , 40 % ХК –  $88,00 \pm 2,09$  порівняно зі 100 % ХК –  $81,00 \pm 0,98$  (в усіх випадках –  $p < 0,01$ ) (див. рис. 3.11, А).

Відмічено, що показник максимальна ТЖ самців в діапазоні від 100 % ХК до 30 % ХК, характеризується досить вираженою "гормезисною" формою залежно від концентрації компонентів харчування у поживному субстраті. Помітно, що максимальна ТЖ сягає максимуму при концентрації 60 % ХК, а потім починає знижуватись і на рівні 30 % ХК –  $84,33 \pm 1,42$  майже не відрізняється від контролю (див. рис. 3.11, А). За умов мінімальних концентрацій компонентів харчування цей показник знову збільшується: 20 % ХК –  $87,40 \pm 1,39$  і 10 % ХК –  $88,50 \pm 1,50$ , сягаючи статистично значущих відмінностей від контролю –  $p < 0,05$ . Варто зазначити, що максимальна ТЖ самиць, подібно до середньої ТЖ, достовірно не залежала від зменшення концентрації компонентів харчування у поживному субстраті впродовж розвитку (див. рис. 3.11, Б).

**Модель смертності Гомпертца.** З метою оцінки впливу ОХ на швидкість старіння *D. melanogaster* дані про виживаність мушок, вирощених за умов зменшених концентрацій компонентів харчування у поживному субстраті, проаналізували і моделі смертності Гомпертца. Ця модель припускає, що швидкість вікової смертності протягом життя збільшується по експоненті. Прийнято вважати, що параметр рівняння Гомпертца "α" характеризує швидкість старіння, а "b" виражає ініціальний рівень уразливості особин.

У самців мушок спостерігалась значна дисперсія значень параметрів Гомпертца (табл. 3.1), а тому залежність швидкості старіння від концентрації ХК у поживному субстраті не була достовірною.

Таблиця 3.1

**Значення параметрів Гомпертца для дрозофіл, які розвивались зі зниженням концентрації харчових компонентів у поживному субстраті**

| Концентрація<br>ХК | Самці    |        | Самиці   |        |
|--------------------|----------|--------|----------|--------|
|                    | $\alpha$ | b      | $\alpha$ | b      |
| 100%               | 0,056    | -5,210 | 0,082    | -8,572 |
| 90%                | 0,019    | -3,023 | 0,099    | -9,627 |
| 80%                | 0,029    | -3,562 | 0,095    | -9,796 |
| 70%                | 0,038    | -4,464 | 0,086    | -8,870 |
| 60%                | 0,035    | -4,211 | 0,075    | -8,018 |
| 50%                | 0,072    | -6,841 | 0,096    | -9,829 |
| 40%                | 0,039    | -4,319 | 0,070    | -7,636 |
| 30%                | 0,039    | -4,279 | 0,079    | -8,818 |
| 20%                | 0,037    | -4,303 | 0,071    | -7,914 |
| 10%                | 0,006    | -2,090 | 0,064    | -7,198 |

Примітка. ХК – харчові компоненти;  $\alpha$  – швидкість старіння; b – ініціальний рівень уразливості особин.

У той же час, для самиць *D. melanogaster* виявилось можливим розрахувати за цими даними рівняння лінійної регресії та коефіцієнти кореляції між параметрами Гомпертца і концентрацією компонентів харчування у поживній суміші.

На рис. 3.12 зображено графік, на якому видно, що швидкість старіння самиць (параметр " $\alpha$ ") вірогідно ( $p < 0,05$ ) знижується при зменшенні концентрації компонентів харчування у поживному субстраті. Для одержання більш точних даних необхідно провести експериментальне дослідження на значно більшій популяції *D. melanogaster*.

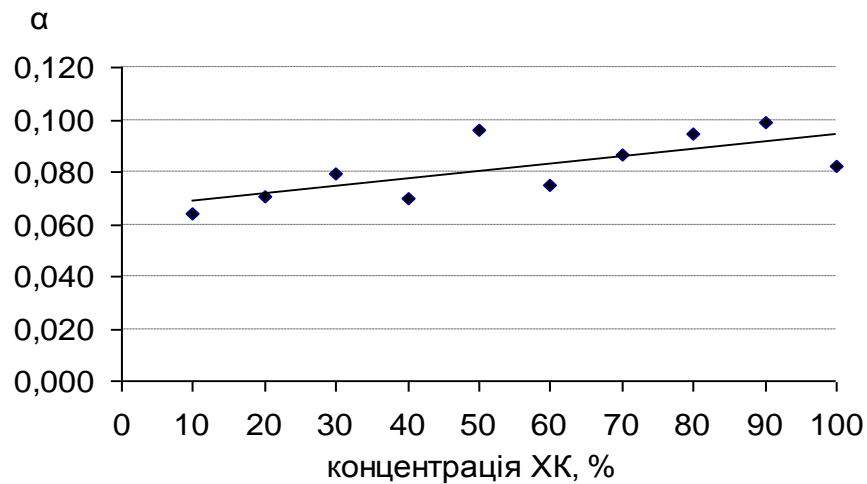


Рис. 3.12. Залежність швидкості старіння самиць *D. melanogaster* від зниження концентрації харчових компонентів у поживному субстраті на стадії розвитку.

Примітка.  $\alpha$  – швидкість старіння; ХК – харчові компоненти.

Таким чином, у цьому розділі продемонстровано істотне збільшення тривалості розвитку та смертності на преімагінальній стадії у дрозоділ за умов обмеженого харчування у порівнянні із тими, які розвивались у стандартному поживному субстраті.

Особливістю цієї частини роботи є зосередження уваги на тих життєвих характеристиках імаго, які специфічно пов'язані із показником ТЖ дрозоділ та можуть залежати від дієтичних умов: маса тіла, стійкість до стресових факторів: 18-тигодинна харчова депривація та підвищення температури до 40°C, а також фекандильність і фертильність мушок жіночої статі. У самців і у самиць, які розвивались у поживній суміші із 10 % компонентів харчування, виявлено достовірне зменшення маси тіла.

Реакція на тимчасову повну харчову депривацію змінювалась тільки у самців, вирощених за умов зменшення концентрації компонентів харчування у поживному субстраті на стадії розвитку. Дорослі самиці різного віку внаслідок вирощування за умов ОХ продемонстрували зниження репродуктивної активності та відсутність, при цьому, достовірних змін у

своїй ТЖ. Тоді як у дорослих самців, що розвивались за умов концентрацій 60 % і 50 % компонентів харчування у поживному субстраті, виявили збільшення обох показників – як середньої, так і максимальної ТЖ у порівнянні з контролем.

### **Основні результати розділу відображено у наукових публікаціях:**

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.

2. **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 наукової конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012: біологічні науки» (м. Київ, 19-23 березня 2012 р.). – Київ: 2012. – С. 116–117.

3. **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 международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» (г. Канев, 12-16 мая 2012 г.). – Киев: Фитосоциоцентр. – 2012. – С. 20–22.

4. **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* // Материалы X Международного симпозиума «Биологические механизмы старения» (Харьков, 16-19 мая 2012 г.). – Харьков: 2012. – С. 24.



## РОЗДІЛ 4

### СПАДКУВАННЯ ЕФЕКТІВ ОБМЕЖЕННЯ ХАРЧУВАННЯ У НАЩАДКІВ *Drosophila melanogaster*

У цьому розділі описується дослідження щодо визначення наслідків застосування невідповідності дієтичних умов на стадії личинки та на стадії імаго *D. melanogaster*. Крім того, тут продемонстровано вплив 13-тигодинної харчової депривації, застосованої під час прекоцепційного періоду життєвого циклу плодових мушок, на ТЖ їхніх нащадків.

#### **4.1. Наслідки невідповідності умов харчування на стадії личинки та на стадії імаго**

"Гіпотеза невідповідності" (mismatch hypothesis) повідомляє, що виникнення внутрішньоутробних адаптаційних прогностичних перебудов призводить до збільшення постнатальної пристосованості організму у тому випадку, якщо умови життя до і після народження підтримуються незмінними [79]. З метою виявлення епігенетичних механізмів появи наслідків дієтичної рестрикції впродовж розвитку для ТЖ варто було перевірити це твердження. У цьому експерименті застосували ОХ з обмеженням усіх компонентів харчування на 20 % для окремих груп мушок у різних режимах:

- тільки у личинок;
- тільки в імаго;
- як на стадії личинки, так і на стадії імаго.

Личинок *D. melanogaster* утримували у двох варіантах ПС: із концентраціями 20 % і 100 % компонентів харчування. Після вилуплення

мушкам обох варіантів концентрацію поживного субстрату або змінювали, або ні. Таким чином, в експерименті було сформовано 4 групи дрізофіл із різними типами чергування дієтичних умов упродовж онтогенезу (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

**Умовні позначення груп дрізофіл із різними варіантами  
чергування концентрацій харчових компонентів у поживному субстраті  
протягом онтогенезу**

| Імаго<br>Личинка | 100% ХК   | 20% ХК   |
|------------------|-----------|----------|
|                  | 100% ХК   | 20% ХК   |
| 100% ХК          | Л100/І100 | Л100/І20 |
| 20% ХК           | Л20/І100  | Л20/І20  |

Примітка. ХК – харчові компоненти.

Отже, у дослідженні ТЖ визначили в імаго таких груп: 1) – Л100/І100, 2) – Л100/І20, 3) – Л20/І100 і 4) – Л20/І20, кожен із яких складали по 8 пробірок-повторів, і, загалом, було використано по 200 плодів мушок кожної статі.

*Стадія личинки.* Мушки розвивались у банках об'ємом 250 мл (по 10 штук у кожній експериментальній групі). Для виявлення ефекту добору, у цих личинок, подібно до попередньої частини роботи, визначали тривалість розвитку та смертність на преімагінальній стадії. Зафіксовано наявність несуттєвої зміни тривалості розвитку, яка виникла внаслідок застосування 20 % компонентів харчування у поживному субстраті (табл. 4.2).

Показник виживаності на преімагінальній стадії за умов утримання у поживному субстраті із 20 % компонентів харчування характеризувався статистично значущим ( $p < 0,001$ ) зменшенням у порівнянні з контролем (див. табл. 4.2).

Таблиця 4.2

**Тривалість розвитку і виживаність на преімагінальній стадії  
дрозофіл при утриманні за умов 20 % харчових компонентів**

| Концентрація<br>ХК | ТР, год ( $M \pm m$ ) | Кількість<br>яєць | Кількість<br>лялечок | Виж<br>(Л/Я) |
|--------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|--------------|
| 100%               | 197,1 $\pm$ 1,21      | 1841              | 1367                 | 0,74         |
| 20%                | 195,1 $\pm$ 0,85      | 2179              | 1268                 | 0,58         |

Примітка. ХК – харчові компоненти; ТР – тривалість розвитку; Виж – преімагінальна виживаність; Л/Я – співвідношення кількості лялечок до кількості яєць.

Зважаючи на це, можна припустити, що наявні на стадії імаго позитивні ефекти ОХ, деякою мірою, пояснюються впливом добору упродовж розвитку дрозодів (селекція найбільш пристосованих особин).

**Визначення ТЖ.** Для виявлення впливу невідповідності типу харчування впродовж розвитку та у дорослому віці, із застосуванням дисперсійного аналізу, попарно порівнювали показники середньої ТЖ різних груп мушок. Пари групували залежно від варіанту дієтичних умов на стадії імаго: спочатку порівняли дві групи з одним типом харчування у дорослому віці (100 % ХК), потім дві групи – з іншим (20 % ХК) (табл. 4.3, 4.4).

Таблиця 4.3

**Середня тривалість життя дрозодів (діб), яким на стадії імаго  
надавали 100 % харчових компонентів ( $M \pm m$ )**

| Режим раціону | Самці            | Самиці           |
|---------------|------------------|------------------|
| Л100/І100     | 32,74 $\pm$ 0,38 | 33,63 $\pm$ 0,42 |
| Л20/І100      | 32,46 $\pm$ 0,45 | 34,13 $\pm$ 0,64 |

У першому випадку, при порівнянні середньої ТЖ самців та самиць *D. melanogaster* груп, яким, незалежно від типу харчування на стадії личинки, у дорослому віці надавали стандартну кількість компонентів харчування, не було виявлено статистично значущих відмінностей (див. табл. 4.3). У другому випадку середня ТЖ імаго обох статей, які упродовж всього життя перебували в умовах ОХ – Л20/І20, була достовірно більшою у порівнянні з показником групи дорослих мушок, для яких 20 % ХК у поживному субстраті застосували тільки після вилуплення – Л100/І20 (див. табл. 4.4).

Таблиця 4.4

**Середня тривалість життя дрозofil (дiб), яким на стадії імаго надавали 20 % харчових компонентів ( $M \pm m$ )**

| 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 положення "гіпотези невідповідності" у деяких випадках експериментів на *D. melanogaster* може бути підтвердженим. Зокрема, це стосується відповіді на "харчовий стрес", яка виникає на стадії розвитку і надалі викликає збільшення життєздатності організму вже у дорослому віці.

#### 4.2. Вплив 13-тигодинної харчової депривації батьків на тривалість життя нащадків

У багатьох епідеміологічних дослідженнях показано, що ТЖ організму може залежати не лише від його раціону на стадії розвитку, але й від особливостей харчування батьків цього організму на прекоцепційному етапі онтогенезу, тобто перед схрещуванням [185, 186, 200, 218, 222]. У представлений частині роботи метою було дослідити вплив стресового фактору – 13-тигодинної харчової депривації, – застосованої на прекоцепційній стадії життєвого циклу самців і самиць батьківського покоління *D. melanogaster*, на життєздатність і ТЖ їхніх нащадків. Зокрема, прагнули виявити можливість передачі явища впливу на ТЖ за материнською лінією – через яйцеклітину, або за батьківською – через спермії. Приблизно половина самців і самиць предкового покоління була піддана стресу 13-тигодинної харчової депривації (далі – "харчова депривація" або ХД) безпосередньо перед моментом схрещування. У результаті було отримано п'ять варіантів батьківських пар дрозофіл. Схема здійснених схрещувань та позначення експериментальних груп нащадків представлено у табл. 4.5.

Таблиця 4.5

**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 предків, для яких харчову депривацію застосували після схрещування –  $\text{♀} \times \text{♂}(\text{сх-ХД})$ .

**Виживаність на преімагінальній стадії у нащадків.** Мушок покоління F2 утримували за нормальних умов. Подібно до попередніх розділів роботи, у даній частині досліджень визначали виживаність на преімагінальній стадії.

Як і передбачалось, не виявлено відмінностей у показниках преімагінальної виживаності між нащадками двох груп –  $\text{♀} \times \text{♂}$  та  $\text{♀} \times \text{♂}(\text{сх-ХД})$ , а це свідчить про те, що застосування харчової депривації для запліднених самиць не впливало на життєздатність зачатого потомства (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

**Преімагінальна виживаність нащадків різних варіантів схрещувань**

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

Примітка. Виж – виживаність на преімагінальній стадії; Л/Я – співвідношення кількості лялечок до кількості яєць. \* –  $p < 0,01$ ; \*\* –  $p < 0,001$  порівняно зі  $\text{♀} \times \text{♂}$  (метод  $\chi^2$ ).

Статистично значуще зменшення преімагінальної виживаності виявлено у групи нащадків  $\text{♀} \times \text{♂} \text{ХД}$ , для якої харчову депривацію застосували тільки до предків чоловічої статі (див. табл. 4.6). Суттєве

збільшення виживаності на преімагінальній стадії продемонстровано для нащадків двох інших груп:  $\text{ХД}\text{♀}\times\text{♂}$  і  $\text{ХД}\text{♀}\times\text{♂}\text{ХД}$ , в обох із яких харчову депривацію застосували до предків жіночої статі. Варто зазначити, що показник виявився більшим саме у другій вказаній групі –  $\text{ХД}\text{♀}\times\text{♂}\text{ХД}$ , де харчову депривацію на прекоцепційній стадії застосували до предків обох статей (див. табл. 4.6).

Зважаючи на такі результати даного показника, можна припустити, що ефекти, виявлені у тих же дрозофіл покоління F2 вже у дорослому віці, не є наслідком добору впродовж преімагінальної стадії, що міг би у наступному вплинути на ТЖ.

**Визначення ТЖ.** Перш за все, важливо зазначити, що у цій експериментальній частині роботи не було виявлено статистично значущих відмінностей у показнику середньої ТЖ для нащадків предкових пар, які були піддані тимчасовій повній харчовій депривації після схрещування  $\text{♀}\times\text{♂}(\text{сх-ХД})$  у порівнянні із тими, для яких не застосували харчову депривацію  $\text{♀}\times\text{♂}$  (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

**Середня тривалість життя (діб) нащадків різних варіантів  
схрещувань**

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

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні зі  $\text{♀}\times\text{♂}$  (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 зачатого потомства.

Із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу показано, що харчова депривація предків саме жіночої статі (тобто представників пар  $\text{ХД}\text{♀}\times\text{♂}$  і  $\text{ХД}\text{♀}\times\text{♂}\text{ХД}$ ) перед схрещуванням достовірно вплинула на середню ТЖ тільки самиць-нащадків:  $F(3,53)=4,14$ ;  $p<0,05$ . Водночас, у самців-нащадків у жодній із експериментальних груп середня ТЖ суттєво не змінилась:  $F(3,58)=1,04$ ,  $p>0,05$  (див. табл. 4.7).

У показнику максимальної ТЖ, подібно до середньої ТЖ, не було виявлено статистично значущих відмінностей у нащадків батьківських пар, які були піддані 13-тигодинній харчовій депривації після схрещування  $\text{♀}\times\text{♂}(\text{сх-ХД})$  у порівнянні із тими, для яких не застосували харчову депривацію  $\text{♀}\times\text{♂}$  (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

**Максимальна тривалість життя (діб) нащадків різних варіантів  
схрещувань**

| Група                                      | Самці |             | Самиці |            |
|--|-------|-------------|--------|------------|
|  | n     | (M±m)       | n      | (M±m)      |
| $\text{♀}\times\text{♂}$                   | 15    | 75,28±0,62  | 14     | 74,27±0,77 |
| $\text{♀}\times\text{♂}\text{ХД}$          | 14    | 74,55±0,75  | 11     | 73,5±0,64  |
| $\text{ХД}\text{♀}\times\text{♂}$          | 15    | 77,07±0,25* | 14     | 76,8±0,28* |
| $\text{ХД}\text{♀}\times\text{♂}\text{ХД}$ | 15    | 74,67±0,60  | 15     | 72,93±0,64 |
| $\text{♀}\times\text{♂}(\text{сх-ХД})$     | 14    | 72,43±0,90  | 11     | 76,09±0,44 |

Примітка. \* –  $p<0,05$  порівняно із  $\text{♀}\times\text{♂}$  (методом дисперсійного аналізу та апостеріорних множинних порівнянь між групами).



Харчова депривація самиць батьківського покоління дрозофіл безпосередньо перед схрещуванням вплинула на максимальну ТЖ нащадків як жіночої [ $F(3,50)=4,24$ ,  $p<0,01$ ], так і чоловічої [ $F(3,55)=8,02$ ,  $p<0,001$ ] статей. Зокрема, у самиць та самців групи  $ХД♀ \times ♂$  виявлено збільшення максимальної ТЖ у порівнянні з контролем  $♀ \times ♂$  (див. табл. 4.8).

Таким чином, харчова депривація у самиць перед схрещуванням і заплідненням призводить до подовження життя їхніх нащадків. Разом із тим, харчова депривація у самців перед схрещуванням істотного значення для нащадків будь-якої статі не має. Можна припустити, що результати даного експерименту демонструють прояв материнського ефекту.

Результати цього розділу підтверджують "гіпотезу невідповідності", що повідомляє про негативні ефекти від "неспівпадіння" умов навколишнього середовища, в якому перебуває організм на стадії розвитку, із тими, у котрих він буде існувати у дорослому житті. Крім того, показано, що епігенетичні процеси у гаметах *D. melanogaster* на прекоцепційній стадії є вкрай чутливими до впливу різних факторів середовища. Так, наявність вираженого материнського ефекту від застосування харчової депривації до запліднення свідчить про те, що викликані адаптивні зміни у цей період відбуваються на епігенетичному рівні, і тому можуть призводити до збільшення ТЖ *D. melanogaster* у наступному поколінні.

#### **Основні результати розділу відображено у наукових публікаціях:**

1. 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.

2. Забуга О. Г. Влияние голода во время прекоцепционного периода у родителей на продолжительность жизни потомков у *Drosophila*

*melanogaster* / **О. Г. Забуга**, Н. М. Кошель, А. К. Коляда, А. М. Вайсерман // Проблемы старения и долголетия. – 2012. – Т. 21, № 4. – С. 470–477.

3. **Забуга О. Г.** Вплив обмеження харчування на різних етапах онтогенезу на життєздатність та тривалість життя *Drosophila melanogaster*: експериментальна перевірка «гіпотези невідповідності» / **О. Г. Забуга**, Н. М. Кошель // Тезисы докладов XI-ой научной конференции молодых ученых с международным участием, посвященная 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>

## РОЗДІЛ 5

### ВПЛИВ ОБМЕЖЕННЯ ХАРЧУВАННЯ НА ЛИЧИНКОВІЙ СТАДІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ПОВ'ЯЗАНИХ ІЗ ТРИВАЛІСТЮ ЖИТТЯ ГЕНІВ ТА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЗАХИСТУ У *Drosophila melanogaster*

Зважаючи на особливості онтогенезу *D. melanogaster*, які належать до *holometabolous* (комахи з повним метаморфозом), найбільш інформативні дані щодо змін генетичної експресії можна отримати при застосуванні маніпуляцій харчуванням упродовж розвитку. У дослідженні Ту і Татара [225] плодові мушки, яких на стадії личинки обмежували у споживанні дріжджів, мали багато рис, притаманних мутантам *chico*: невеликі розміри тіла, затримка вилуплення, зменшення кількості оваріол і фертильності. Але, на відміну від конститутивних мутантів системи інсулін/IGF, ці дрозофіли не відрізнялись від контрольних за параметрами вік-залежної смертності та ТЖ.

З метою виявлення епігенетичної природи перебудов, які виникають в організмі у відповідь на маніпуляції харчуванням, у даній роботі провели дослідження змін генетичної експресії двох генів, пов'язаних зі старінням та ферментів антиоксидантної системи захисту, які також можуть залежати від дієтичних умов та впливають на життєздатність *D. melanogaster*.

#### 5.1. Зміни експресії генів у личинок та імаго *D. melanogaster* у відповідь на обмеження харчування

Для перевірки того, чи можуть виявлені в цій роботі ефекти бути пов'язані з епігенетичною природою змін регуляції генів, асоційованих із ТЖ у *D. melanogaster*, важливо було визначити рівні експресії двох генів – *InR* та

*dSir2*. Саме такі гени обрали тому, що вони можуть мати відношення до реалізації ефектів, які спричиняють маніпуляції раціоном на стадії личинки.

Аналіз ПЛР у реальному часі застосували до дрозofil, яких вирощували у поживному субстраті із обмеженням усіх компонентів харчування до 20 % від норми (100 % ХК). У дорослому віці всіх мушок утримували за умов "повноцінного харчування", тобто 100 % компонентів харчування.

Рівень експресії генів *InR* та *dSir2* визначили у личинок третьої стадії розвитку (~ 3 доба після вилуплення). Показано, що за умов вирощування у поживному субстраті із 20 % ХК, у личинок виникло достовірне збільшення рівня транскрипції обох досліджуваних генів у порівнянні з контролем (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

**Рівні експресії генів (у.о.) у личинок дрозofil, 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).

Для імаго молекулярно-генетичний аналіз провели у віці 6 діб. У результаті цього виявили суттєве підвищення рівня експресії гена *InR* у дорослих самців, які розвивались за умов 20 % компонентів харчування у поживному субстраті у порівнянні з контролем (100 % ХК). У самиць не зафіксовано будь-якої відмінності у рівні експресії гена *InR* після вирощування за умов "обмеженої дієти" порівняно з контролем (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

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

| Концентрація<br>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).

Рівень експресії другого досліджуваного гена – *dSir2* – в імаго обох статей майже не відрізнявся від контролю. Можна припустити, що наявність суттєвих змін транскрипційної активності цього гену лише на личинковій стадії пов'язана із тим, що ці зміни є нестабільними, а тому нівелюються впродовж метаморфозу та зовсім зникають до моменту визначення рівня експресії гену *dSir2* у дорослих мушок. У свою чергу, підвищення рівня експресії гена *InR* у самців може пояснювати наявність статевих відмінностей у реакції на обмежене харчування у *D. melanogaster*.

## **5.2. Оксидативний стрес за умов обмеження харчування**

Rebeca Gerschman et al. вперше запропонували ідею, що вільні радикали є токсичними речовинами, які сприяють старінню [75]. Показано, що АФК або оксиданти, такі як синглетний кисень, можуть ушкоджувати всі види клітинних структур [215].

У цій експериментальній частині роботи досліджували активність двох ферментів системи антиоксидантного захисту, щоб виявити, чи можуть вони бути задіяні в епігенетичних механізмах збільшення ТЖ, яке виникає

внаслідок застосування кількісного харчового обмеження впродовж розвитку.

Перший фермент, на якому зосередили увагу у даному дослідженні – це СОД, котра захищає організм від високотоксичних кисневих радикалів і у більшості організмів відіграє найважливішу роль в антиоксидантному захисті майже всіх типів клітин, які мають контакт із киснем [51]. Другий досліджений у цій роботі антиоксидантний ензим – каталаза, яка належить до класу оксиредуктаз та розкладає перекис водню, утворений СОД, на воду та кисень ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ ) [54]. Активність обох цих ферментів забезпечує ефективний захист клітинних структур від окисного руйнування.

Окремою частиною цієї роботи було визначення кількості кінцевих продуктів глікозилювання, або КПП (AGEs – advanced glycation end-products). У 1997 році у першому дослідженні щодо вивчення впливу КПП на ТЖ *D. melanogaster* A. J. Oudes et al. продемонстрували, що мушки при утриманні за температури 24°C із віком накопичують значну кількість цих побічних продуктів [172]. Істотно зменшити інтенсивність накопичення КПП у тканинах дрозофіли виявилось можливим шляхом додавання до поживного субстрату протягом життя комах аміногуанідину, хоча такі маніпуляції не чинили позитивного впливу на ТЖ *D. melanogaster* [172].

Пізніше Jacobson et al. [104] запропонували використовувати рівень накопичення КПП в якості біомаркера старіння у *Drosophila*. Важливо зазначити, що штучне додавання до харчового субстрату *D. melanogaster* КПП провокує у них зниження активності ферментів антиоксидантного захисту, яке, у свою чергу, супроводжується прискоренням "старіння" [224].

### 5.2.1. Зміни активності антиоксидантних ферментів в імаго *D. melanogaster* внаслідок застосування обмеження харчування на стадії личинки

Аналіз активності ферментів антиоксидантної системи захисту (СОД і каталази) визначали в імаго *D. melanogaster* двох вікових груп – 15 і 20 діб, яких на стадії личинки утримували за умов концентрацій 50 % компонентів харчування у порівнянні з контролем – 100 % ХК.

У самців, вирощених за умов 50 % ХК у поживному субстраті, виявлено підвищення активності СОД у віці як 15, так і 20 діб. У самиць достовірної різниці в активності цього ферменту в обох вікових групах не зафіксовано (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

**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 самців на 15-у добу життя, яких на стадії личинки утримували за умов 50 % компонентів харчування у поживному субстраті порівняно з контролем (див. табл. 5.3). У самиць достовірної різниці не виявлено. На 20-у добу життя активність ферменту не змінювалась в особин обох статей.

### 5.2.2. Рівень накопичення кінцевих продуктів глікозилювання в імаго *D. melanogaster* після застосування обмеження харчування на стадії личинки

Для визначення кількості КППГ брали імаго *D. melanogaster*, вирощених за умов 50 % компонентів харчування у поживному субстраті. Кількість КППГ фіксували у мушок обох статей окремо у віці 15 і 20 діб життя. Достовірне зниження рівня накопичення КППГ виявили як у самців, так і у самиць у віці 20 діб, яких на стадії розвитку утримували за умов 50 % ХК у поживній суміші (табл. 5.4). У 15-тидобовому віці ніяких відмінностей в особин експериментальних груп порівняно з контролем виявлено не було.

Таблиця 5.4

#### 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).

### 5.3. Висновок до розділу

У цьому розділі показано, що індуковані на стадії розвитку епігенетичні перебудови залежать від активності генетичного апарату. Зміна експресії генів *InR* і *dSir2*, виявлена при проведенні ЗТ-ПЛР аналізу, підтверджує це припущення.



Крім цього, у розділі показана наявність залежності кількості ферментів СОД і каталази від маніпуляцій харчуванням на стадії личинки у дрозofil чоловічої статі, що виражається у підвищенні активності вищезазначених ензимів. Це супроводжувалось зменшенням рівня накопичення КПП у більш пізньому віці. Цілком можливо, що від цього механізму, деякою мірою, залежить вплив дієтичних умов на ТЖ організму.

### **Основні результати розділу відображено у наукових публікаціях:**

1. 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.
2. **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.
3. **Забуга О. Г.** Вплив обмеження раціону на стадії розвитку на тривалість життя *D. melanogaster* // Матеріали IV Міжнародної конференції «Дрозofiла в експериментальній генетиці та біології» (м. Львів, 6-10 жовтня 2014 р.).
4. **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. – 2015. – Т. 61, № 6. – С. 113–118.

## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Питання про вплив обмеження дієти у період розвитку на тривалість життя дорослого організму комах і, зокрема, дрозофіли до цього часу залишалось відкритим. Ключові органи та системи обміну речовин *D. melanogaster* є характерними і для всіх живих організмів [30, 203]. У той же час, на сьогоднішній день майже всі функціональні системи плодової мушки вдалось пов'язати із дією того чи іншого гена [14]. Важливо зазначити, що механізми фізіологічних реакцій на харчовий стрес зберігаються і закріплюються в особин усього тваринного світу [27, 181, 221].

Особливістю даної роботи стало застосування системного підходу при вивченні залежності тривалості життя від маніпуляції харчуванням на стадії розвитку. Це, зокрема, дослідження фізіологічних характеристик із наступним проведенням аналізу певних асоційованих із тривалістю життя генів, а також біохімічного аналізу, що представляє значуще теоретичне підґрунтя для розробки методик профілактики наслідків обмеженого харчування на стадії розвитку. Виходячи із того, що у дрозофіли наявна більшість метаболічних функцій, які так само властиві і хребетним, у тому числі й аналогічні регулювання обміну вуглеводів і накопичення енергії [30, 203], дані щодо розуміння генетики і шляхів адаптації до "неадекватного харчування", отримані в експериментах на *D. melanogaster*, можна застосовувати не лише до мушок, а й до інших тварин та, найголовніше, до людини.

Раніше вже було відомо, що саме обмеження поживних речовин у харчуванні, а не калорій, може впливати на тривалість життя *D. melanogaster* [220], проте наявність лише невеликої кількості досліджень стосовно змін

дієтичних умов на стадії розвитку цього виду викликала суперечливість стосовно того, чи можна впливати на тривалість життя ще до настання зрілості організму. Крім того, важливо було з'ясувати, чи є можливість за допомогою маніпуляцій харчуванням предків змінювати життєздатність нащадків.

У роботі було застосоване кількісне обмеження харчових компонентів у поживному середовищі без впливу на калорійність, або зміни співвідношення поживних речовин на стадії розвитку дрозофіли. Важливо зазначити, що у роботі не було визначено, яку кількість харчової суміші личинки споживають за умов різних концентрацій харчових компонентів, адже це не було метою даного дослідження. Таким чином, результати роботи свідчать про опосередкований вплив зміни "дієтичних умов" на визначені параметри життєздатності.

Аналіз отриманих у цій роботі даних дозволив дійти висновку, що біологічні наслідки маніпуляцій харчуванням на стадії розвитку у *D. melanogaster* залежать, головним чином, від концентрації харчових компонентів у поживному середовищі та від статі комах.

Серед параметрів життєздатності, що змінюються за умов обмеження харчування на стадії розвитку, в роботі визначали показники тривалості розвитку та виживаності на преімагінальній стадії личинок *D. melanogaster*. І, хоча, як зазначалось, увагу, головним чином, було зосереджено на дослідженні саме стадії імаго плодових мушок, вищезазначені фізіологічні параметри личинок важливі для демонстрації адаптаційних можливостей організму за умов стресу.

У проведеному дослідженні показано, що зниження вмісту харчових компонентів у поживному субстраті плодових мушок до концентрації 60 % від нормального рівня (100 %) не впливало на тривалість їхнього розвитку. У випадку менших концентрацій компонентів харчування у поживній суміші, швидкість розвитку личинок дрозофіл пропорційно зменшувалась. Варто зауважити, що подібний результат був продемонстрований і у роботі інших

дослідників [225], проте принцип дієтичної рестрикції у їхньому експерименті був дещо інший.

Той факт, що зниження вмісту компонентів харчування до 60 % від нормального рівня не призводив до змін тривалості розвитку, можливо, пояснюється тим, що дрозофіли мають здатність компенсувати зниження концентрації харчових компонентів за рахунок посилення інтенсивності поглинання поживної суміші. Однак, природно, що ці компенсаторні можливості мають свою фізіологічну межу, яка, вочевидь, досягається за наявності у поживному середовищі концентрацій харчових компонентів менше за 60 %.

Варто зазначити, що у дрозофіл, яких вирощували за умов 50 % і менше компонентів харчування у поживному субстраті, була зафіксована затримка початку лялькування. Таке явище збереглось і у нащадків першого покоління плодових мушок – генерації F2. Можна припустити, що цей факт свідчить про наявність епігенетичного механізму, який має здатність сприяти успадкуванню викликаних впливами навколишнього середовища змін.

У роботі виявлено зниження виживаності на преімагінальній стадії за умов розвитку зі зменшеними концентраціями харчових компонентів у поживному субстраті порівняно з контролем. Достовірне підвищення смертності личинок дрозофіл зафіксовано за умов вмісту компонентів харчування 30 % і менше від концентрації контролю (100 %). Найбільш суттєве збільшення летальності на преімагінальній стадії *D. melanogaster* виявлено при розвитку за умов концентрації 20 % харчових компонентів у поживному середовищі, а за умов мінімальної – 10 % від норми – виживало лише близько половини особин.

Стабільність показника виживаності на преімагінальній стадії у дрозофіл при утриманні личинок із концентраціями 40 % і більше харчових компонентів демонструє відсутність добору впродовж розвитку, який, певним чином, міг би впливати на тривалість життя плодових мушок у дорослому віці.

В імаго важливим параметром життєздатності у випадку маніпуляцій харчуванням може виступати показник маси тіла організму. У даній роботі при визначенні ваги імаго у самців та у самиць, які розвивались у поживному середовищі із 10 % харчових компонентів, виявлено достовірне зниження (більш ніж у два рази) показника середньої маси тіла порівняно з контролем. Треба зазначити, що за умов утримання личинок із концентрацією 50 % харчових компонентів у поживному субстраті вага дрозофіл не відрізнялась від контрольного показника. Таким чином, можна вважати, що середня маса тіла не пов'язана із тривалістю життя плодових мушок. Варто зазначити, що в іншому експерименті, який полягав у зменшенні кількості дріжджів у поживному середовищі личинок, дослідники [225] також спостерігали зменшення розмірів тіла імаго.

Очевидно, що параметри життєздатності, які можуть змінюватись внаслідок маніпуляцій харчуванням, пов'язані із адаптаційною здатністю організму. У даній роботі для визначення того, чи збільшувалась витривалість організму до несприятливих умов навколишнього середовища в імаго дрозофіл, вирощених за умов 50 % харчових компонентів у поживному середовищі, визначали стійкість до двох видів стресу: 13-тигодинна харчова депривація або "харчова депривація" та підвищення температури до 40°C або "тепловий шок". Проаналізували саме такі параметри життєздатності, які специфічно пов'язані із показником тривалості життя.

Одержані результати дослідження демонструють підвищення стійкості до харчової депривації у самців, вирощених із 50 % компонентів харчування, порівняно з контролем. На противагу цьому, у самиць підвищення витривалості до тимчасової повної харчової депривації виявлено не було. Відмічено, що аналогічне обмеження вмісту харчових компонентів у поживному середовищі на 50 % не викликало змін у стійкості до значного підвищення температури у плодових мушок обох статей. Таким чином, можна припустити, що взаємозв'язок між умовами харчування та адаптацією до різних чинників є суто специфічним.

У багатьох дослідженнях показано, що збільшення тривалості життя за умов дієтичної рестрикції, як правило, супроводжується зниженням здатності до репродукції в особин жіночої статі різних видів комах. Таку кореляцію широко інтерпретували як доказ того, що за умов "обмеженого раціону" виникає адаптивний перерозподіл ресурсів від репродукції до соматичного функціонування. Проте останні дані свідчили про те, що здатність виживати і розмножуватись не обов'язково має бути у компромісі за умов дієтичної рестрикції, що і поставило гіпотезу перерозподілу під сумнів [18, 218]. Крім того, виявлено, що дієтична рестрикція на стадії розвитку *D. melanogaster*, зумовлена відсутністю білку у поживному середовищі личинок, викликає зниження репродуктивної здатності дорослих самиць, і, разом із тим, не впливає на їхню тривалість життя [225].

Результати даної дисертаційної роботи продемонстрували, що репродуктивна активність (фекандильність) особин жіночої статі внаслідок розвитку за умов обмеження харчування, зменшується зі зниженням концентрації харчових компонентів у поживному субстраті. Крім того, у дослідженні виявлено зсув піку репродуктивної здатності (фертильності) у самиць дрозофіл різних вікових груп, вирощених у поживному субстраті із 50 % і 10 % харчових компонентів. У першому випадку (50 %) максимальна здатність до репродукції була зафіксована у віці 15-ти діб, а у другому (10 %), подібно до контролю (100 %), – у віці 21-ї доби. При цьому обидва піки фертильності після розвитку дрозофіл за умов обмеження харчування були майже вдвічі меншими за контрольний показник.

Незважаючи на продемонстроване у даній роботі зменшення фекандильності та фертильності, не було виявлено змін тривалості життя (як середньої, так і максимальної) у самиць плодових мушок після розвитку за будь-якої зниженої концентрації харчових компонентів у поживному середовищі. Цей результат збігається із даними вже згадуваного дослідження [225], яке до цього часу було єдиним, що було пов'язане із застосуванням дієтичної рестрикції на стадії розвитку у *D. melanogaster*.

Таким чином, у даному дослідженні підтверджено, що пряма залежність тривалості життя від рівня репродукції відсутня, принаймні, у випадку змін умов харчування. Однак, у даній роботі кількісне обмеження харчування упродовж розвитку сприяло статистично значущому подовженню життя самців *D. melanogaster*. Це демонструє наявність статевих відмінностей у зміні даного показника внаслідок застосування обмеження харчування на стадії розвитку.

До цього часу інші дослідження також продемонстрували статеві відмінності, якими характеризувались показники тривалості життя дрізофіл після реакцій на різну інтенсивність скорочення "раціону". Зокрема, було показано, що оптимальна концентрація харчових компонентів у поживному середовищі, за якої смертність дорослих особин зводилась до мінімуму, значно відрізнялась у представників різної статі [135].

У роботі продемонстровані досить неоднозначні наслідки впливу недостатнього харчування у період розвитку на тривалість життя *D. melanogaster*. Важливим аспектом даного дослідження стало визначення найсприятливішої концентрації харчових компонентів у поживному середовищі для найбільш ефективного подовження життя плодових мушок. Так, продемонстровано, що саме проміжні концентрації компонентів харчування у поживному субстраті личинок, тобто 50 % і 60 % харчових компонентів порівняно зі стандартом (100 %) можуть сприяти збільшенню тривалості життя дорослих дрізофіл, а точніше – самців. Так, в імаго чоловічої статі, саме внаслідок таких умов утримання на стадії личинки, виникало достовірне збільшення показника середньої тривалості життя.

Крім зміни середньої тривалості життя, самці також характеризувались збільшенням показника максимальної тривалості життя майже в усіх групах, що розвивались зі зменшеними концентраціями харчових компонентів у порівнянні з контролем. На відміну від цього, у самиць максимальна тривалість життя не залежала від кількості компонентів харчування у поживному середовищі на стадії розвитку.

Динаміка максимальної тривалості життя самців у діапазоні від 100 % до 30 % харчових компонентів характеризувалась досить вираженою "гормезисною" формою залежності даного показника від концентрації харчових компонентів у поживній суміші. Зокрема, показник сягав максимуму за вмісту 60 % компонентів харчування у поживному середовищі, після чого, зі зменшенням концентрації харчових компонентів у поживній суміші, – знижувався і на рівні 30 % майже не відрізнявся від максимальної тривалості життя у контролі (100 %). За умов найбільших розведень харчових компонентів (20 % і 10 %) максимальна тривалість життя самців знову сягала статистично значущих відмінностей від контролю. Це може бути пов'язане із тим, що, як було зазначено і стосовно виживаності на преімагінальній стадії, за умов розвитку із мінімальними концентраціями харчових компонентів у поживному субстраті (20 % і 10 %) у плодових мушок спостерігається виражена селекція. Виходячи із цього, можна припустити, що у таких випадках виживають найсильніші, і, отже, потенційно найбільш "довго живучі" особини.

Важливо зауважити, що вищеописані результати не узгоджуються із даними багатьох інших досліджень, в яких збільшення тривалості життя внаслідок обмеження харчування виникало, головним чином, у самиць, а не у самців [181].

Для пояснення статевих розходжень у показниках тривалості життя можна розглянути запропоноване дослідниками на початку XXI ст. припущення, що у подібних випадках міг би мати значення IGF-подібний сигнальний шлях, або IIS, специфічна перебудова якого властива самцям та виникає в якості відповіді на гормональні сигнали чоловічих гонад за умов стресу [17]. Крім того, інші вчені повідомляли, що обмеження харчування призводило до збільшення кількості стовбурних клітин у самців дрозофіли, що могло би бути механізмом подовження їхньої тривалості життя [139].

Важливо відмітити, що пізніше відмінності впливу дієтичних маніпуляцій на представників різної статі комах були продемонстровані й у



деяких інших роботах [245]. І, хоча у вищевказаних дослідженнях реалізацію "обмеженого раціону" практикували лише у дорослих плодових мушок, такі припущення щодо виникнення статевих розходжень у реакціях на маніпуляції харчуванням можуть бути підґрунтям і для пояснення позитивного ефекту, що виникає внаслідок дієтичної рестрикції, застосованої і на стадії личинки.

Одним із завдань даної роботи було експериментальне застосування відмінних типів харчування на різних стадіях онтогенезу *D. melanogaster* – у личинки та імаго, а також дослідження спричинених такою маніпуляцією наслідків для тривалості життя. Отримані у цій частині дослідження результати можуть бути пояснені у межах так званої "гіпотези невідповідності" (mismatch hypothesis), згідно якої виникнення внутрішньоутробних адаптаційних прогностичних перебудов призводить до збільшення постнатальної пристосованості організму у тому випадку, якщо умови життя до і після народження підтримуються незмінними [79]. Це припущення могло би бути справедливим і при застосуванні кількісного обмеження харчування впродовж розвитку та пояснювати вірогідність виникнення на цій стадії епігенетичних перебудов, які змінюють пристосованість організму до умов довкілля.

У дослідженні було зафіксовано майже трикратне скорочення життя, характерне для усіх дрозофіл, яких у дорослому віці утримували за умов 20 % компонентів харчування у поживному субстраті порівняно із тими, яким надавали 100 % харчових компонентів у "раціоні". Таке явище було очікуваним, бо раніше група дослідників, очолювана Linda Partridge, у своїх експериментах продемонструвала, що обмеження харчових компонентів у поживному субстраті до концентрації 20 % на стадії імаго негативно впливає на життєздатність плодових мушок [181].

З метою порівняння результатів, характерних для мушок із різними режимами дієти, їх групували попарно, залежно від типу харчування на стадії імаго. Перша пара – це дві групи дрозофіл, яких на стадії імаго утримували

за умов 100%-го харчування, і відрізнялись вони одна від одної типом "дієти" упродовж личинкової стадії, тобто це були групи, умовно позначені Л100/І100 й Л20/І100.

Як у самців, так і у самиць *D. melanogaster* не було виявлено статистично значущих відмінностей між цими групами, які відрізнялись одна від одної типом "дієти" упродовж личинкової стадії (Л100/І100 й Л20/І100). Можна припустити, що тип "дієти" із 20 % компонентів харчування не впливає негативно на життєздатність плодових мушок, якщо умови утримання у дорослому віці стають нормальними, тобто за умов 100 % харчових компонентів у поживному середовищі.

При порівнянні дрозofil, яких упродовж стадії імаго утримували на поживному середовищі із вмістом 20 % харчових компонентів, та різними типами "дієти" упродовж личинкової стадії, тобто, це були групи умовно позначені (Л100/І20 й Л20/І20), виявили достовірне збільшення середньої тривалості життя імаго обох статей, яких упродовж усього життя утримували за умов обмеження харчування – Л20/І20, на відміну від показника групи плодових мушок, для яких поживний субстрат із концентрацією 20 % харчових компонентів застосували тільки у дорослому віці – Л100/І20.

Такий результат, виявлений при порівнянні груп із дією негативного чинника тільки на стадії імаго, із тими особинами, які перебували під впливом обмеженого харчування упродовж всього життя, підтверджує запропонований раніше принцип "гіпотези невідповідності". Зокрема, можна припустити, що обмеження харчових компонентів у поживному субстраті личинок сприяє адаптації, можливості якої реалізуються у вигляді пристосування до аналогічних "дієтичних" умов у дорослому віці. Якщо ж дія негативного чинника виникає тільки на стадії імаго, тобто у "неприспособлених" особин, їхня тривалість життя суттєво зменшується на відміну від дрозofil, які "підготувались" до шкідливого фактору, коли він впливав упродовж розвитку. Крім того, можна припустити, що обмеження харчування до вмісту 20 % харчових компонентів у поживному середовищі є

помірним стресом, а тому може сприяти виникненню ефекту гормезису, що діє протягом стадії розвитку та збільшує тривалість життя імаго дрозодів.

У багатьох епідеміологічних дослідженнях було показано залежність життєздатності організму та параметрів, які її характеризують, не лише від раціону цього організму на стадії розвитку, але й від особливостей харчування його предків на прекоцепційному етапі онтогенезу [185, 186, 200, 218, 222]. Виходячи із цього, одним із завдань даної роботи було застосування стресового фактору – тимчасової повної харчової депривації – безпосередньо перед схрещуванням у самців і самиць предкового покоління *D. melanogaster*, з метою подальшого дослідження впливу цього чинника на тривалість життя їхніх нащадків.

У схрещуваннях були задіяні самці, яких або піддавали харчовій депривації, або ні, а також віргінні самиці, частину з яких, подібно до чоловічих особин, піддавали харчовій депривації, а частину – ні.

Треба зазначити, що у показниках виживаності на преімагінальній стадії та середньої тривалості життя не було зафіксовано різниці між нащадками двох варіантів схрещувань, а саме, самців та самиць, для яких не застосували харчову депривацію взагалі (контроль), та самців і самиць, яких піддали дії харчової депривації вже після схрещування. Це свідчить про те, що тимчасова повна харчова депривація не може впливати на життєздатність наступного покоління, якщо даний стресовий чинник впливав на предків уже після того, як відбулось зачаття цих нащадків.

У потомства дрозодів, матері яких були піддані харчовій депривації, було виявлено статистично значуще збільшення преімагінальної виживаності, незалежно від наявності такого стресу у батьків. Це свідчить про відсутність ефекту добору у таких нащадків. Неочікуваним стало те, що застосування харчової депривації тільки до предків-самців викликало у мушок наступного покоління зменшення виживаності на преімагінальній стадії.

Показник середньої тривалості життя був достовірно більшим від контролю у групах самиць, матері яких були піддані тимчасовій повній харчовій депривації. Значення цього показника не залежало від наявності чи відсутності перед схрещуванням харчової депривації у батьків. У самців, нащадків будь-яких варіантів схрещувань, розбіжностей у показниках середньої тривалості життя виявлено не було.

Варто зазначити, що наявність ефекту від застосування тимчасової повної харчової депривації тільки у матерів, але не у батьків, виявили у нащадків обох статей при визначенні максимальної тривалості життя.

Загалом, можна припустити, що результати, описані вище, демонструють прояв материнського ефекту. У свою чергу, наявність вираженого материнського ефекту у випадку застосування харчової депривації перед заплідненням свідчить про те, що епігенетичні процеси у гаметах *D. melanogaster* на прекоцепційній стадії є вкрай чутливими до впливу різних факторів середовища. Вірогідно, викликані на прекоцепційній стадії зміни є адаптаційними та відбуваються саме на епігенетичному рівні, а тому можуть зберігатись і відтворюватись навіть за нормальних умов (тобто після припинення дії негативного чинника) протягом тривалого часу. Ймовірно, саме такі статево специфічні адаптивні зміни і призводять до подовження життя *D. melanogaster* жіночої статі у наступному поколінні.

Важлива частина даної роботи полягає у дослідженні можливої ролі епігенетичних процесів у виявлених змінах параметрів життєздатності плодових мушок. Як відмічалось раніше, онтогенез *D. melanogaster* можна чітко розділити на дві основні стадії: личинка та імаго. Дрозофіли належать до комах із повним метаморфозом (*holometabolous*), отже, після стадії личинки мушки лялькуються. У лялечці організм цих комах зазнає цілковитої перебудови: клітини личинки підлягають лізису, а тканини дорослих особин утворюються з імагінальних дисків. Вважається, що після метаморфозу зберігається тільки певна кількість клітин гангліїв та гонад, і

доросла особина вилуплюється з лялечки вже повністю сформована з іншим складом клітин [19].

Виходячи із вищезазначеного, на стадії личинки у дрозодфіл можуть бути викликані певні епігенетичні модифікації, які можна ідентифікувати при визначенні змін генетичної експресії, окремо як у личинок, так і в імаго. Це стосується, звичайно, і досліджень у даній роботі.

Важливо зазначити, що більшість дослідників до сьогоднішнього дня схилились до думки, що найважливішим фактором для збільшення тривалості життя у випадку застосування різних методик дієтичного обмеження може бути механізм зростання економічності метаболізму [56, 100, 111, 166, 179, 187, 193, 220, 246]. Існує припущення, що цей механізм реалізується за участі ключових модуляторів тривалості життя за умов обмеження харчування, якими є сигнальні шляхи інсуліну/IGF (IIS), мішені рапаміцину (TOR), АМФ-залежної протеїнкінази (AMPK) і сіртуїну (SIRT) [126].

Відомо, що мозок комах, жирове тіло (еквівалент печінки ссавців і білої жирової тканини) та зародкова лінія, а також взаємозв'язки між ними та з іншими тканинами, відіграють важливу роль у визначенні тривалості життя. І, не дивлячись на те, що у жировому тілі відбулась редукція IGF1-каскаду, було показано, що посилення експресії FOXO здатне збільшити ТЖ організму. Так, нейрон-секреторні клітини продукують деякі інсулін-подібні білки (ІПБ). За умов стресу активується JNK (Jun-N-terminal kinase), що призводить до скорочення експресії білків ІПБ-2 й ІПБ-5, і, внаслідок цього, до зменшення ефективності роботи IGF1-каскаду. При активації цієї кінази молекулярними методами спостерігається збільшення тривалості життя дрозодфіл [179].

Загалом, клітинні шляхи детоксикації, підвищена аутофагія та зміни синтезу білків приймають участь у подовженні життя саме через зменшення активності IIS шляху. Показано, що у дрозодфіли зміна активності ряду компонентів IIS може збільшити ТЖ і поліпшити рухові та сердечні функції,

які згасають упродовж процесу старіння. У той же час, незначне інгібування IIS може суттєво знизити смертність, тобто, воно здатне пом'якшити наслідки пов'язаних зі старінням ушкоджень, хоча і не запобігає розвитку цих явищ [179].

За умов харчової депривації було виявлено значне зменшення тривалості життя у нормальних мушок, і, майже непомітне, – у мутантів без *InR*, який опосередковує активність IIS [136]. Показано, що шлях IIS зумовлює ключові впливи амінокислот на старіння та розмноження [84]. У процесах розвитку і зростання, IIS взаємодіє із TOR-сигналінгом, за допомогою якого незамінні амінокислоти впливають на тривалість життя [250].

Показано, що зниження активності IGF1-каскаду призводить до зменшення фертильності самиць, адже цей шлях відіграє одну з ключових ролей у регуляції росту, проліферації і виживанні стовбурових клітин – попередників яйцеклітин. Разом із тим виявлено, що при застосуванні ОХ у мушок дикого типу, яке призводить до інгібування активності IGF1, кількість статевих клітин збільшується [96].

Таким чином, значна кількість моделей збільшення тривалості життя, у тому числі і внаслідок застосування обмеження харчування, характеризувалась виникненням певних змін елементів IIS [63, 64, 207, 236].

Було показано, що IIS інгібується у відповідь на обмеження харчування, тобто індуковане обмеженням харчування подовження життя може сприяти репресії сигналізації інсуліну/IGF [59].

Як відомо, одним із основних внутрішньоклітинних компонентів IIS є *INR* у комбінації зі своїм субстратом *chico*, що регулюють ріст, розміри тіла і тривалість життя [219]. У дослідженні, яке полягало в обмеженні кількості дріжджів у поживному середовищі личинок, дорослі дрозофіли не відрізнялись від контрольних за параметрами вік-залежної смертності та тривалості життя, проте їхні сигнальні шляхи інсулін/IGF змінювались подібно до конститутивних мутантів даної системи [225]. Це могло свідчити

про те, що тривалість життя, на яку можна впливати дієтичними маніпуляціями, не супроводжується змінами експресії генів інсулінового сигнального шляху.

З іншого боку, показано, що в усіх випадках інгібування шляху IGF1, збільшується активність генів, які приймають участь у процесах клітинної детоксикації, хоча це і не свідчить, що саме такий механізм уповільнює процес старіння [96]. Разом із тим, продемонстровано, що інгібування цього шляху може переключити або заблокувати зміни у тривалості життя, які зумовлює обмеження харчування [179].

Важливо також зазначити, що у *D. melanogaster* було виявлено залежність експресії генів від статі [108]. В іншій роботі висловлене припущення, що наявність різниці у реакції на дієтичне обмеження серед дрозофіл різної статі може бути пов'язана із відмінностями у залежності тривалості життя саме за участі IGF-сигналіngu [135].

Традиційно прийнято вважати, що білки-сіртуїни беруть участь у реалізації реакції на скорочення "раціону", як на один із видів стресу [208]. Зокрема припускали, що у дрозофіли *dSir2* є посередником збільшення тривалості життя у випадку обмеження харчування, адже мушки, для яких застосовується "дієта", мають підвищений рівень мРНК цього гену [176], а транскрипція *Sir2* за таких умов збільшується [61]. Разом із тим, Burnett et al. (2011) продемонстрували, що збільшення тривалості життя мушок внаслідок дієтичного обмеження не залежить від експресії *dSir2* [50].

Показано, що нокдаун *dSir2* нівелює вплив дієтичної рестрикції на смертність, тоді як надлишкова експресія *dSir2* імітує позитивний ефект обмеження харчування [31]. Разом із тим, виявлено, що надекспресія *dSir2* у жировому тілі, але не у м'язах, зумовлює подовження життя [97]. Підсумовували, що тривалість життя мушок можна збільшити через підвищення експресії *Sir2* у конкретному типі тканин за певних експериментальних умов [126].

Важливо, що у багатьох видів хребетних та безхребетних *Sir2* і його ортологи відіграють вирішальну роль у метаболічному гомеостазі та IIS [127, 202, 247]. У клітинах ссавців фактор транскрипції FOXO є мішенню деацетилювання SIRT1 [36]. У свою чергу dFOXO у дрізофіли пов'язаний із регулюванням "довговічності", яке опосередковує IIS [179].

Зважаючи на вищезазначені факти, у даній роботі було проведено аналіз двох пов'язаних зі старінням генів – *InR* та *dSir2*, які мають відношення до реалізації ефектів, спричинених дієтичними маніпуляціями. Як і у попередніх частинах роботи, застосували кількісне обмеження харчових компонентів тільки на стадії розвитку *D. melanogaster*, оскільки саме у цей період епігеном демонструє підвищену чутливість до зовнішніх факторів.

Вирощування плодових мушок у поживному субстраті із обмеженням харчових компонентів до 20 % від норми у личинок сприяло достовірному підвищенню рівня транскрипції обох генів у порівнянні з контролем. Це дало підстави продовжити дослідження для виявлення змін на молекулярно-генетичному рівні і на стадії дорослого організму.

Імаго, як зазначалось, утримували вже за умов "стандартного харчування", тобто на поживному середовищі із вмістом 100 % харчових компонентів. У результаті ПЛР-аналізу було зафіксовано достовірне підвищення рівня експресії гена *InR* тільки у дорослих самців, які розвивались у поживному субстраті із концентрацією 20 % харчових компонентів у порівнянні з контролем. Подібного явища не спостерігали у самиць. У даному випадку не можна не враховувати вірогідність того, що і на стадії личинки продемонстроване підвищення експресії гена *InR* було властиве тільки особинам чоловічої статі, адже визначити це було неможливо. Разом із тим, зміни експресії *InR* у дорослих самців можуть пояснювати наявність статевих відмінностей, характерних для реакції на обмеження харчування у *D. melanogaster*.



Що стосується визначення експресії другого гену *dSir2*, то його залежності від харчування на стадії розвитку не виявили в імаго обох статей. Можна припустити, що суттєве підвищення транскрипційної активності цього гену лише на личинковій стадії може бути пов'язане із тим, що така реакція на стимул не є достатньо стійкою, а тому нівелюється упродовж метаморфозу та зовсім зникає до моменту проведення ПЛР-аналізу в імаго плодових мушок. У свою чергу, це може свідчити про те, що активність даного гену підвищується тільки у відповідь на стресовий фактор, а коли його дія припиняється, активність *dSir2* відразу ж нормалізується. Разом із тим, можливість виникнення стійкої перебудови в організмі у той момент, коли активність гену підвищена, є цілком ймовірною.

Варто зауважити, що у личинок дрозофіли відбувається активна проліферація, у той час як на стадії імаго майже всі тканини комах є пост-мітотичними, отже, поділ клітин не відбувається, а тому будь-які перебудови в організмі на даному етапі життя не виникають. Вірогідно, саме на стадії розвитку можуть бути індуковані епігенетичні модифікації, що залежать від активності генетичного апарату. Зважаючи на це, можна припустити, що механізм збільшення тривалості життя, продемонстрованого у даній роботі, виникає за рахунок відповіді на зміну дієтичних умов упродовж розвитку, яка індукує зміни в IIS і SIR2 сигнальних системах. У свою чергу, механізм збільшення тривалості життя, який є реакцією на маніпуляції харчуванням, може виникати за рахунок появи модифікацій в інсуліновому та сіртуїновому сигнальних шляхах. Зміни експресії генів *InR* і *dSir2*, виявлені при проведенні ПЛР-аналізу, говорять на користь такого припущення.

Раніше було виявлено, що експресія близько 127-и генів помітно змінюється впродовж старіння *D. melanogaster*, а експресія третини цих генів залежить також і від окислювального стресу [252]. Окремим завданням даної роботи було визначення взаємозв'язку між обмеженням харчування на стадії розвитку та окислативним стресом у дорослих дрозофіл.

Виходячи із вільно-радикальної теорії старіння, запропонованої Danhem Harman ще у 1950-х роках минулого сторіччя [91], оксидативний стрес може суттєво впливати на тривалість життя і вік-залежні патології [215].

Виявлено зв'язок ураження перекисним окисленням ліпідів зі старінням і тривалістю життя *D. melanogaster*; у свою чергу, обмеження у мушок калорій, подібно до ссавців, уповільнює накопичення ліпідів, які викликають окисне ушкодження [248].

З іншого боку, показано, що подовження тривалості життя, викликане низькокалорійним харчуванням, не залежить від кількості антиоксидантного ферменту СОД, хоча, окрім цього, було виявлено, що його високий рівень є необхідною умовою для збільшення тривалості життя за умов обмеження білка, у випадку чого концентрація вуглеводів у раціоні стає підвищеною [215].

У даному дослідженні показані статеві-специфічні зміни активності ферментів антиоксидантної системи захисту (СОД і каталази). Так, у самців, вирощених за умов 50 % харчових компонентів у поживному субстраті, було виявлено підвищення активності СОД (у віці 15-ти і 20-ти діб) та каталази (у віці 15-ти діб), тоді як у самиць достовірної різниці в активності обох ферментів у будь-якому віці не зафіксовано.

Відсутність відмінності в активності ферментів системи антиоксидантного захисту в особин жіночої статі може бути одним із пояснень того, чому у них не спостерігалось збільшення тривалості життя після розвитку у поживному середовищі зі зменшеними концентраціями харчових компонентів. Варто нагадати, що збільшення показника середньої тривалості життя було характерним тільки для самців, яких на стадії розвитку утримували у поживному субстраті із концентраціями харчових компонентів 60 % і 50 % порівняно з контролем – 100 %. Таким чином, продемонстровані у роботі зміни активності ферментів системи

антиоксидантного захисту можуть відігравати роль у виявленому раніше збільшенні тривалості життя самців.

Кінцеві продукти глікозилювання запропоновані в якості біомаркерів старіння *D. melanogaster*, оскільки інтенсивність їх накопичення посилюється із віком, а також збільшується у специфічних ліній плодових мушок, які мають скорочену, порівняно із диким типом, тривалість життя [104]. Аналізуючи вищезазначені відомості, одним із завдань даної роботи було виявлення змін у рівні накопичення кінцевих продуктів глікозилювання після застосування 50 % харчових компонентів у поживному середовищі впродовж розвитку, щоб з'ясувати, чи можуть вони бути задіяні в епігенетичних механізмах збільшення тривалості життя імаго. Окрім цього, даний біохімічний показник певним чином демонструє інтенсивність метаболізму організму.

Достовірно зниження рівня накопичення кінцевих продуктів глікозилювання в імаго *D. melanogaster*, вирощених за умов 50 % компонентів харчування у поживному субстраті, виявлено як у самців, так і у самиць віком 20 діб.

Варто зазначити, що функція ліквідації кінцевих продуктів глікозилювання може бути пов'язана із механізмом автофагії. Цей процес направлений на видалення ушкоджених білків та органел клітин, накопичення яких сприяє старінню [187]. Раніше було показано, що у дрозофіл автофагія активується у відповідь на репресію IIS та TOR сигналізацій [61, 205]. У тому ж випадку, коли енергетичний та амінокислотний статуси організму знижені, процес автофагії посилюється [61, 205]. Отже, можна припустити, що виявлені у цій роботі зміни експресії генів та рівня накопичення кінцевих продуктів глікозилювання у самців плодових мушок після розвитку за умов обмеженого харчування пов'язані з процесом автофагії.

Важливо зазначити, що ферменти антиоксидантної системи захисту є досить нестійкими сполуками, а тому у 15-20-тидобовому віці після

вилуплення із лялечок дрозофіли вже не могли мати їхні молекули, які, ймовірно, синтезувались раніше, протягом преімагінального розвитку, коли личинки перебували в умовах обмеження харчування. Таким чином, можна припустити, що виявлені у роботі на біохімічному рівні зміни, вірогідно, є наслідком довгострокових епігенетичних модифікацій, спричинених дієтичними маніпуляціями впродовж розвитку. Можливість подібних перебудов, викликаних дією стресових чинників на ранніх етапах життя, продемонстрована у попередніх розділах роботи.

У кінці ХХ-го століття почало з'являтися усе більше доказів того, що довгострокові фенотипічні зміни, індуковані різноманітними факторами навколишнього середовища у ранньому онтогенезі, можуть бути пов'язані із модифікацією епігенетичних процесів, що здійснюють часовий і просторовий контроль активності генів, необхідних для розвитку від зиготи до дорослого організму [162]. Зокрема, було продемонстровано, що стимули навколишнього середовища можуть призводити до виникнення специфічних модифікацій хроматину, що зберігаються протягом тривалого часу. У свою чергу, такі "перебудови" мають здатність обумовлювати виникнення адаптивної відповіді на стимул [162]. Зазначене явище може бути важливим не лише впродовж розвитку організму, але й на наступних етапах його життя, включаючи стадію старіння. Це стосується, зокрема, і обмеження харчування, яке на стадії розвитку *D. melanogaster* може індукувати довгострокові зміни на епігенетичному рівні.

З іншого боку, є вірогідність того, що дієтична рестрикція на ранніх етапах життя сприяє виникненню гормезису, який на стадії дорослого організму проявляється збільшенням тривалості життя. Досить розповсюдженим прикладом подібного явища є малі дози опромінення, які, певним чином, стимулюють виживаність живих організмів. Можна припустити, що обмеження харчування впродовж розвитку спричиняє гормезис, тобто неспецифічне збільшення життєздатності. Вірогідно, у

такому випадку цей ефект може зберігатись протягом тривалого часу і сприяти збільшенню тривалості життя імаго дрозofil [6, 229].

Враховуючи вищезазначене, найбільш імовірним є припущення, що ключову роль у збільшенні тривалості життя плодових мушок внаслідок застосування обмеження харчування на стадії розвитку можуть відігравати індуковані стресом упродовж личинкової стадії епігенетичні модифікації (зміни активності генів, не пов'язані зі змінами у послідовності ДНК, до складу якої вони належать). Оскільки на ранніх етапах онтогенезу епігеном демонструє підвищену чутливість до зовнішніх факторів, індуковані різними видами стресу, включаючи дієтичні маніпуляції на стадії розвитку, епігенетичні перебудови (модифікації метилювання ДНК, ацетилювання гістонів хроматину, малих некодуючих РНК тощо) можуть "імпринтуватись" і стійко відтворюватись протягом багатьох клітинних поділів, зумовлюючи довгострокові зміни різних характеристик організму та визначаючи темп його старіння [213, 234].

Численні дослідження підтвердили, що збільшення тривалості життя, яке пов'язане із маніпуляціями харчуванням, ймовірно, є наслідком вік-залежних епігенетичних змін, наприклад, метилювання ДНК і модифікації гістонів, до яких належать ацетилювання, метилювання, фосфорилування і біотинілювання гістонів [98, 103, 154, 249]. Одна із них – метилювання ДНК – була у центрі уваги багатьох досліджень завдяки тому, що вона є більш стабільною, ніж інші епігенетичні модифікації [114]. Разом із тим, наразі все більше уваги зосереджується на вивченні метилювання гістонів, завдяки його консервативності у збільшенні тривалості життя як безхребетних тварин, так і ссавців [87, 107, 121, 150, 216].

До сьогодні немає точних відомостей щодо епігенетичної природи впливу обмеження харчування саме у дрозofil, проте дане явище продемонстроване у мишей, а також у людини [43, 47, 103, 129, 154]. У цілому, було виявлено, що компоненти харчування можуть опосередковувати

"здорове" довголіття, впливаючи на стан метилювання ДНК і регулюючи транскрипцію та експресію специфічних генів [126].

Результати цієї дисертаційної роботи можна вважати перспективою для розробки методів попередження негативних для стану здоров'я наслідків, що виникають внаслідок недостатнього харчування у ранньому віці. Дослідження наступної роботи можуть бути направлені на більш детальне вивчення механізмів, пов'язаних із ефектами, спричиненими обмеженням харчування на стадії розвитку.

## 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 дрозofil 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.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Боготова З.И. Генетический анализ на *Drosophila melanogaster* / З.И. Боготова, М.М. Биттуева, М.К. Кереева // Методические указания к практическим занятиям по большому практикуму. – Нальчик: Каб.-Балк. ун-т, 2009. – 54 с.
2. Божков А.И. Низкокалорийная диета как модель увеличения продолжительности жизни и исследования механизмов старения / А.И. Божков // Успехи геронтологии. – 2001. – Т. 7. – С. 89–99.
3. Вайсерман А.М. Влияние ограничения компонентов рациона питания в период стадии развития на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* / А.М. Вайсерман, Е.А. Федоренко, Н.М. Кошель [и др.] // Проблемы старения и долголетия. – 2011. – Т. 20, № 4. – С. 361–370.
4. Вайсерман А.М. Влияние ограничения питательных компонентов в корме на разных этапах онтогенеза на жизнеспособность и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* / А.М. Вайсерман, О.Г. Забуга, А.И. Бажинова [и др.] // Проблемы старения и долголетия. – 2012. – Т. 21, № 4. – С. 462–469.
5. Вайсерман А.М. Влияние плотности популяции на личиночной и имагинальной стадиях онтогенеза на жизнеспособность и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* / А.М. Вайсерман // Проблемы старения и долголетия. – 1996. – Т. 6, № 1-2. – С. 3–10.
6. Вайсерман А.М. Молекулярные и клеточные аспекты радиационного гормезиса у *Drosophila melanogaster* / А.М. Вайсерман, А.Я. Литошенко, Т.Ю. Квитницкая-Рыжова [и др.] // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 37, № 3. – С. 41–48.
7. Забуга О.Г. Влияние голодания в прекоцепционный период самцов и самок родительского поколения *Drosophila melanogaster* на продолжительность жизни их потомков / О.Г. Забуга, Н.М. Кошель, А.К. Коляда, А.М. Вайсерман // Проблемы старения и долголетия. – 2012. –

Т. 21, № 4. – С. 470–477.

8. Забуга, О.Г. Влияние калорийного ограничения рациона в раннем онтогенезе на жизнеспособность и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* / О.Г. Забуга, А.К. Коляда, Н.М. Кошель, А.И. Бажинова, А.М. Вайсерман // Материалы III-ей международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» / г. Канев, 12-16 мая 2012 г. – Киев: Фитосоциоцентр. – 2012. – С. 20–22.
9. Забуга О.Г. Влияние ограничения рациона в период развития на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* / О.Г. Забуга, Н.М. Кошель, А.К. Коляда, А.И. Бажинова, А.М. Вайсерман // Материалы X Международного симпозиума «Биологические механизмы старения» / Харьков, 16-19 мая 2012 г. – Харьков: 2012. – С. 24.
10. Забуга О. Вплив зменшення концентрації поживних речовин у харчовому субстраті на стадії розвитку на тривалість життя та експресію пов'язаних зі старінням генів *Inr* та *dSir2* у *Drosophila melanogaster* / О. Забуга, О. Коляда, О. Вайсерман // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2015. – Вип. 69. – С. 111–118.
11. Забуга, О. Г. Вплив обмеження харчування в період розвитку на активність ферментів системи антиоксидантного захисту у *Drosophila melanogaster* / О. Г. Забуга, О. К. Коляда, В. М. Кухарський, А. І. Бажинова, О. М. Вайсерман // Фізіологічний журнал. – 2015. – Т.61, № 6. – С. 113–118.
12. Забуга О.Г. Вплив обмеження харчування на різних етапах онтогенезу на життєздатність та тривалість життя *Drosophila melanogaster*: експериментальна перевірка «гіпотези невідповідності» / О.Г. Забуга, Н.М. Кошель // Тезисы докладов XI-ой научной конференции молодых ученых с международным участием, посвященная памяти академика В.В. Фролькиса / г. Киев, 25 января 2013 г. – [Електрон. ресурс]: <http://antiaging.org.ua/abstracts-of-frolkis-conference/fc-2013/514-zabuga->

koshel

13. Новосельцев В.Н. Ограничение питания у плодовых мушек: системный анализ / В.Н. Новосельцев, Ж.А. Новосельцева // Успехи геронтологии. – 2010. – № 2. – С.186–195.
14. Тоцький В.М. Генетика / В.М. Тоцький. – Одеса: Астропринт, 2008. – 710 с.
15. Фролькис В.В. Экспериментальные пути продления жизни / В.В. Фролькис, Х.К. Мурадян. – Л.: Наука, 1988. – 248 с.
16. Хорошина Л.П. Голодание в детстве как причина болезней в старости (на примере малолетних жителей блокированного Ленинграда) / Л.П. Хорошина. – СПб.: Издательский дом СПбМАПО, 2002. – 188 с.
17. Шапошников М.В. Половой диморфизм по продолжительности жизни / М.В. Шапошников // Успехи геронтологии. – 2008. – Т. 3. – С. 507–509.
18. Adler M.I. The lifespan-reproduction trade-off under dietary restriction is sex-specific and context-dependent / M.I. Adler, E.J. Cassidy, C. Fricke, R. Bonduriansky // Experimental Gerontology. – 2013. – Vol. 48. – P. 539–548.
19. Aguila J.R. Contribution of larval nutrition to adult reproduction in *Drosophila melanogaster* / J.R. Aguila, D.K. Hoshizaki, A.G. Gibbs // J. Exp. Biol. – 2013. – Vol. 216. – P. 399–406.
20. Akyol A. Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat / A. Akyol, S.C. Langley-Evans, S. McMullen // Br. J. Nutr. – 2009. – Vol. 102. – P. 1601–1610.
21. Alcedo J. Regulation of *C. elegans* longevity by specific gustatory and olfactory neurons / J. Alcedo, C. Kenyon // Neuron. – 2004. – Vol. 41. – P. 45–55.
22. Ames B.N. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis / B.N. Ames,

- R. Cathcart, E. Schwiers, P. Hochstein // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1981. – Vol. 78(11). – P. 6858–6862.
23. Ames B.N. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging / B.N. Ames, M.K. Shigenaga, T.M. Hagen // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1993. – Vol. 90(17). – P. 7915–7922.
  24. Anson R.M. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake / R.M. Anson, Z. Guo, R. de Cabo [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2003. – Vol. 100(10). – P. 6216–6220.
  25. Anson R.M. The diet restriction paradigm: a brief review of the effects of every-other-day feeding / R.M. Anson, B. Jones, R. de Cabo // AGE. – 2005. – Vol. 27. – P. 17–25.
  26. Archer M.A. Breakdown in correlations during laboratory evolution. II. Selection on stress resistance in *Drosophila* populations / M.A. Archer, J.P. Phelan, K.A. Beckman, M.R. Rose // Evolution. – 2003. – Vol. 57. – P. 536–543.
  27. Arsham A.M. Thinking globally and acting locally with TOR / A.M. Arsham, T.P. Neufeld // Curr. Opin. Cell. Biol. – 2006. – Vol. 18. – P. 589–597.
  28. Ashburner M. *Drosophila: A laboratory manual* / M. Ashburner – Cold Spring Harbor (New York): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 434 p.
  29. Ayres W.A computerized fluorescence anisotropy spectrometer / W. Ayres, E. Small, I. Isenberg // Ann. Biochem. – 1974. – Vol. 58. – P. 361–367.
  30. Baker K.D. Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila* / K.D. Baker, C.S. Thummel // Cell Metab. – 2007. – Vol. 6(4). – P. 257–266.
  31. Banerjee K.Kr. *dSir2* in the Adult Fat Body, but Not in Muscles, Regulates Life Span in a Diet-Dependent Manner / K.Kr. Banerjee, C. Ayyub, S.Z. Ali [et al.] // Cell Reports. – 2012. – Vol. 2(6). – P. 1485–1491.

32. Barker D.J. The developmental origins of adult disease / D.J. Barker // J. Am. Coll. Nutr. – 2004. – Vol. 23. – P. 588S–595S.
33. Barrett E.L.B. A potential function for oocyte apoptosis in unmated *Nauphoeta cinerea* / E.L.B. Barrett, A.J. Moore, P.J. Moore // Physiological Entomology. – 2009. – Vol. 34(3). – P. 272–277.
34. Bartke A. Mutation prolongs life in flies: implication for ageing in mammals / A. Bartke // Trends Endocrinol Metab. – 2000. – Vol. 12. – P. 233–234.
35. Bass T.M. Optimization of dietary restriction protocols in *Drosophila* / T.M. Bass, R.C. Grandison, R. Wong [et al.] // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. – 2007. – Vol. 6. – P. 1071–1081.
36. Baur J.A. Biochemical effects of SIRT1 activators / J.A. Baur // Biochim Biophys Acta. – 2010. – Vol. 1804. – P. 1626–1634.
37. Bayne A.C. Enhanced catabolism of mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide and aging in transgenic *Drosophila* / A.C. Bayne, R.J. Mockett, W.C. Orr, R.S. Sohal // Biochem. J. – 2005. – Vol. 391(Pt 2). – P. 277–284.
38. Bayol S.A. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring / S.A. Bayol, S.J. Farrington, N.C. Stickland // Br. J. Nutr. – 2007. – Vol. 98. – P. 843–851.
39. Bayol S.A. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females / S.A. Bayol, B.H. Simbi, J.A. Bertrand, N.C. Stickland // J. Physiol. – 2008. – Vol. 586. – P. 3219–3230.
40. Beach R.S. Gestational zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency for three generations / R.S. Beach, M. Gershwin, L.S. Hurley // Science. – 1982. – Vol. 218. – P. 469–471.
41. Bellinger L. Prenatal exposure to a maternal low protein diet programmes a preference for high fat foods in the young adult rat / L. Bellinger, C. Lilley, S. C. Langley–Evans // Br. J. Nutr. – 2004. – Vol. 92. – P. 513–520.

42. Bergel E. A deficient maternal calcium intake during pregnancy increases blood pressure of the offspring in adult rats / E Bergel, J.M. Belizan // *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. – 2002. – Vol. 109. – P. 540–545.
43. Bouchard L. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction / L. Bouchard, R. Rabasa-Lhoret, M. Faraj [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2010. – Vol. 91. – P. 309–320.
44. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
45. Bross T. Behavioral, physical, and demographic changes in *Drosophila* populations through dietary restriction / T. Bross, G.B. Rogina, S.L. Helfand // *Aging Cell*. – 2005. – Vol. 4(6). – P. 309–317.
46. Buescher J.L. Evidence for transgenerational metabolic programming in *Drosophila* / J.L. Buescher, L.P. Musselman, C.A. Wilson [et al.] // *Dis. Model Mech.* – 2013. – Vol. 6(5). – P. 1123–1132.
47. Burdge G.C. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations / G.C. Burdge, J. Slater-Jefferies, C. Torrens [et al.] // *Brit. J. Nutr.* – 2007. – Vol. 97. – P. 435–439.
48. Burger J.M. Dietary restriction affects lifespan but not cognitive aging in *Drosophila melanogaster* / J.M. Burger, S.D. Buechel, T.J. Kawecki // *Aging Cell*. – 2010. – Vol. 9. – P. 327–335.
49. Burger J.M.S. The functional costs and benefits of dietary restriction in *Drosophila* / J.M.S. Burger, D.S. Hwangbo, V. Corby-Harris, D.E.L. Promislow // *Aging Cell*. – 2007. – Vol. 6. – P. 63–71.
50. Burnett C. Absence of effects of *Sir2* overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila* / C. Burnett, S. Valentini, F. Cabreiro [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 477(7365). – P. 482–485.

51. Campana F. Topical superoxide dismutase reduces post-irradiation breast cancer fibrosis / F. Campana // J. Cell. Mol. Med. – 2004. – Vol. 8(1). – P. 109–116.
52. Carvalho G.B. Compensatory ingestion upon dietary restriction in *Drosophila melanogaster* / G.B. Carvalho, P. Kapahi, S. Benzer // Nat. Methods. – 2005. – Vol. 2. – P. 813–815.
53. Chapman T. Female fitness in *Drosophila melanogaster*: an interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males / T. Chapman, L. Partridge // Proc. Biol. Sci. – 1996. – Vol. 263. – P. 755–759.
54. Chelikani P. Diversity of structures and properties among catalases / P. Chelikani, I. Fita, P.C. Loewen // Cell. Mol. Life Sci. – 2004. – Vol. 61(2). – P. 192–208.
55. Chen J.H. Maternal protein restriction affects postnatal growth and the expression of key proteins involved in lifespan regulation in mice / J.H. Chen, M.S. Martin-Gronert, J. Tarry-Adkins, S.E. Ozanne // PLoS One. – 2009. – Vol. 4. – P. 49–50.
56. Cheng Ch.L. Role of insulin/insulin-like growth factor 1 signaling pathway in longevity / Ch.L. Cheng, T.Q. Gao, Z. Wang, D.D. Li // World J. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 11. – P. 1891–1895.
57. Chippindale A.K. Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution. I. Nutrition and the cost of reproduction / A.K. Chippindale, A.M. Leroi, S.B. Kim, M.R. Rose // J. Evol. Biol. – 1993. – Vol. 6. – P. 171–193.
58. Clancy D.J. Dietary restriction in long-lived dwarf flies / D.J. Clancy, D. Gems, E. Hafen [et al.] // Science. – 2002. – Vol. 296. – P. 319.
59. Clancy D.J. Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a *Drosophila* Insulin Receptor Substrate / D.J. Clancy, D. Gems, L.G. Harshman [et al.] // Protein. Science. – 2001. – Vol. 292. – P. 104–106.

60. Copeland J.M. Extension of *Drosophila* life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain / J.M. Copeland, J. Cho, T.Jr. Lo [et al.] // Curr. Biol. – 2009. – Vol. 19(19). – P. 1591–1598.
61. Droge W. Autophagy and aging-importance of amino acid levels / W. Droge // Mech. Ageing Dev. – 2004. – Vol. 125. – P. 161–168.
62. Everitt A.V. The effects of hypophysectomy and continuous food restriction, begun at ages 70 and 400 days, on collagen aging, proteinuria, incidence of pathology and longevity in the male rat / A.V. Everitt, N.J. Seedsman, F. Jones // Mech. Ageing Dev. – 1980. – Vol. 12. – P. 161–172.
63. Everitt A.V. Calorie restriction, aging and longevity / Ed. A.V. Everitt, S.I.S. Rattan, D.G. Couteur, R. Cabo. – Dordrecht: Springer, 2010. – 323 p.
64. Finch, C.E. The Biology of human longevity: inflammation, nutrition, and aging in the evolution of life spans / C.E. Finch. – Massachusetts: Academic Press Incorporated, 2007. – 640 p.
65. Flatt T. Integrating evolutionary and molecular genetics of aging / T. Flatt, P. S. Schmidt // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1790. – P. 951–962.
66. Flatt T. Survival costs of reproduction in *Drosophila* / T. Flatt // Experimental Gerontology. – 2011. – Vol. 46. – P. 369–375.
67. Fleming J.E. Role of oxidative stress in *Drosophila* aging / J.E. Fleming, I. Reveillaud, A. Niedzwiecki // Mutat. Res. – 1992. – Vol. 275(3-6). – P. 267–279.
68. Frankel S. *dSir2* and longevity in *Drosophila* / S. Frankel, T. Ziafazeli, B. Rogina // Exp. Gerontol. – 2011. – Vol. 46(5). – P. 391–396.
69. Gaetani S. Sideways glance: does dietary restriction promote longevity, though impairing fecundity? Not necessarily, if the diet has a correct nutrient balance / S. Gaetani, F. Virgili // Genes Nutr. – 2010. – Vol. 5(3). – P. 183–187.
70. Gambling L. Maternal iron deficiency during pregnancy in the rat induces high blood pressure, obesity and dyslipidaemia in her offspring /



- L. Gambling, C.A. Maloney, H.S. Andersen, H.J. McArdle // *Pediatr. Res.* – 2005. – Vol. 58. – P. 1024.
71. Garsin D.A. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors / D.A. Garsin, C.D. Sifri, E. Mylonakis [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2001. – Vol. 98(19). – P. 10892–10897.
  72. Garsin D.A. Long-lived *C. elegans daf-2* mutants are resistant to bacterial pathogens / D.A. Garsin, J.M. Villanueva, J. Begun [et al.] // *Science.* – 2003. – Vol. 300. – P. 1921.
  73. Gems D. Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans* / D. Gems, D.L. Riddle // *Genetics.* – 2000. – Vol. 154. – P. 1597–1610.
  74. Gendron C.M. *Drosophila* life span and physiology are modulated by sexual perception and reward / C.M. Gendron, T.-H. Kuo, Z.M. Harvanek [et al.] // *Science.* – 2014. – Vol. 343(6170). – P. 544–548.
  75. Gerschman R. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common / R. Gerschman, D.L. Gilbert, S.W. Nye [et al.] // *Science.* – 1954. – Vol. 119. – P. 623–626.
  76. Giannakou M.E. Role of dFOXO in lifespan extension by dietary restriction in *Drosophila melanogaster*: not required, but its activity modulates the response / M.E. Giannakou, M. Goss, L. Partridge // *Aging Cell.* – 2008. – Vol. 7. – P. 187–198.
  77. Gil B. Reply to Piper et al.: *Drosophila* dietary restriction – Does it hold water? / B. Gil, B. Carvalho, M. Zid [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2010. – Vol. 107(14). – P. E57.
  78. Gluckman P.D. A conceptual framework for the developmental origins of health and disease / P.D. Gluckman, M.A. Hanson, T. Buklijas // *Journal of Developmental Origins of Health and Disease.* – 2010. – Vol. 1. – P. 6–18.

79. Gluckman P.D. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease / P.D. Gluckman, M.A. Hanson // *Science*. – 2004. – Vol. 305. – P. 1733–1736.
80. Gluckman P.D. Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease / P.D. Gluckman, A.S. Beedle, M.A. Hanson [et al.] // *Lancet*. – 2009. – Vol. 373. – P. 1654–1657.
81. Godfrey K.M. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives / K.M. Godfrey, P.D. Gluckman, M.A. Hanson // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2010. Vol. 21. – P. 199–205.
82. Goodrick C.L. Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age / C.L. Goodrick, D.K. Ingram, M.A. Reynolds [et al.] // *Mech. Ageing Dev.* – 1990. – Vol. 55(1). – P. 69–87.
83. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range / L. Goth // *Clin. Chim. Acta*. – 1991. – Vol. 196(2-3). – P. 143–151.
84. Grandison R.C. Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila* / R.C. Grandison, M.D. Piper, L. Partridge // *Nature*. – 2009a. – Vol. 462. – P. 1061–1064.
85. Grandison R.C. Effect of a standardised dietary restriction protocol on multiple laboratory strains of *Drosophila melanogaster* / R.C. Grandison, R. Wong, T. M. Bass [et al.] // *PLoS ONE*. – 2009b. – Vol. 4(1). – P. e4067.
86. Greer E.L. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans* / E.L. Greer, D. Dowlathshahi, M.R. Banko [et al.] // *Curr Biol*. – 2007. – Vol. 17. – P. 1646–1656.
87. Greer E.L. Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans* / E.L. Greer, T.J. Maures, A.G. Hauswirth [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 466. – P. 383–387.

88. Hansen M. Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans* / M. Hansen, S. Taubert, D. Crawford [et al.] // Aging Cell. – 2007. – Vol. 6. – P. 95–110.
89. Hansen M. A Role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans* / M. Hansen, A. Chandra, L.L. Mitic [et al.] // PLoS Genet. – 2008. – Vol. 4(2). – P. e24.
90. Hari R. Immunological confirmation of elevated levels of CuZn superoxide dismutase protein in an artificially selected long-lived strain of *Drosophila melanogaster* / R. Hari, V. Burde, R. Arking // Exp. Gerontol. – 1998. – Vol. 33(3). – P. 227–237.
91. Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry / D. Harman // J. Gerontol. – 1956. – Vol. 11. – P. 298–300.
92. Harris T.E. TOR signaling / T.E. Harris, J.C. Lawrence // Sci. STKE. – 2003. – Vol. 2003(212) – P. re15.
93. Harrison D.E. Natural selection for extended longevity from food restriction / D.E. Harrison, J.R. Archer // Growth Dev Aging. – 1989. – Vol. 53. – P. 3–6.
94. Harshman L.G. Life span extension of *Drosophila melanogaster*: genetic and population studies / L.G. Harshman // From: Carey, James R. and Shripad Tuljapurkar (eds.). Life Span: Evolutionary, Ecological, and Demographic Perspectives, Supplement to Population and Development Review. – New-York: Population Council, 2003. – Vol. 29. – P. 99–126.
95. Heitman J. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast / J. Heitman, N.R. Movva, M.N. Hall // Science. 1991. – Vol. 253. – P. 905–909.
96. Hirth F. *Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration / F. Hirth // CNS Neurol Disord Drug Targets. – 2010. – Vol. 9(4). – P. 504–523.

97. Hoffmann J. Overexpression of *Sir2* in the adult fat body is sufficient to extend lifespan of male and female *Drosophila* / J. Hoffmann, R. Romey, C. Fink [et al.] // *Aging* (Albany NY). – 2013. – Vol. 5. – P. 315–327.
98. Hou N. Vitamin A Deficiency Impairs Spatial Learning and Memory: The Mechanism of Abnormal CBP-Dependent Histone Acetylation Regulated by Retinoic Acid Receptor Alpha / N. Hou, L. Ren, M. Gong [et al.] // *Mol. Neurobiol.* – 2014. – Vol. 21. – P. 17–24.
99. Houthoofd K. Dietary restriction in the nematode *Caenorhabditis elegans* / K. Houthoofd, D. Gems, T.E. Johnson, J.R. Vanfleteren // *Interdiscip. Top. Gerontol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 98–114.
100. Hwangbo D.S. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body / D.S. Hwangbo, B. Gershman, M.-P. Tu [et al.] // *Nature*. – 2004. – Vol. 429. – P. 562–566.
101. Ja W.W. Water- and nutrient-dependent effects of dietary restriction on *Drosophila* lifespan / W.W. Ja, G.B. Carvalho, B.M. Zid [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106. – P. 18633–18637.
102. Jacinto E. Tor signalling in bugs, brain and brawn / E. Jacinto, M.N. Hall // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 4. – P. 117–126.
103. Jacobsen S.C. Young men with low birthweight exhibit decreased plasticity of genome-wide muscle DNA methylation by high-fat overfeeding / S.C. Jacobsen, L. Gillberg, J. Bork-Jensen [et al.] // *Diabetologia*. – 2014. – Vol. 57. – P. 1154–1158.
104. Jacobson J. Biomarkers of aging in *Drosophila* / J. Jacobson, A.J. Lambert, M. Portero-Otín [et al.] // *Aging Cell*. – 2010. – Vol. 9(4). – P. 466–477.
105. Jennings B.J. Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney / B.J. Jennings, S.E. Ozanne, M.W. Dorling, C.N. Hales // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 448. – P. 4–8.

106. Jennings B.J. Nutrition, oxidative damage, telomere shortening, and cellular senescence: individual or connected agents of aging? / B.J. Jennings, S.E. Ozanne, C.N. Hales // *Mol. Genet. Metab.* – 2000. – Vol. 71. – P. 32–42.
107. Jin C. Histone Demethylase UTX-1 Regulates *C. elegans* Life Span by Targeting the Insulin/IGF-1 Signaling Pathway / C. Jin, J. Li, C.D. Green [et al.] // *Cell Metab.* – 2011. – Vol. 14. – P. 161–172.
108. Jin W. The contribution of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster* / W. Jin, R.M. Riley, R.D. Wolfinger [et al.] // *Nature Genetics.* – 2001. – Vol. 29. – P. 389–395.
109. Joy T.K. The impact of larval and adult dietary restriction on lifespan, reproduction and growth in the mosquito *Aedes aegypti* / T.K. Joy, A.J. Arik, V. Corby-Harris [et al.] // *Exp. Gerontol.* – 2010. – Vol. 45. – P. 685–690.
110. Kabil H. Increased transsulfuration mediates longevity and dietary restriction in *Drosophila* / H. Kabil, O. Kabil, R. Banerjee [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2011. – Vol. 108(40). – P. 16831–16836.
111. Kapahi P. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway / P. Kapahi, B M. Zid, T. Harper [et al.] // *Curr. Biol.* – 2004. – Vol. 14(10). – P. 885–890.
112. Katewa S.D. Intramyocellular fatty-acid metabolism plays a critical role in mediating responses to dietary restriction in *Drosophila melanogaster* / S.D. Katewa, F. Demontis, M. Kolipinski [et al.] // *Cell Metab.* – 2012. – Vol. 16(1). – P. 97–103.
113. King V. Aging-specific expression of *Drosophila hsp22* / V. King, J. Tower // *Dev Biol.* – 1999. – Vol. 207(1). – P. 107–118.
114. Kondo Y. Epigenetic Cross-Talk between DNA Methylation and Histone Modifications in Human Cancers / Y. Kondo // *Yonsei Med. J.* – 2009. – Vol. 50. – P. 455–463.

115. Kopec S. On the influence of intermittent starvation on the longevity of the imaginal stage of *Drosophila melanogaster* / Kopec S. // British J. Exp. Biol. – 1928. – Vol. 5. – P. 204–211.
116. Kostyuk V.A. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase / V.A. Kostyuk, A.I. Potapovich // Biochem. Int. – 1989. – Vol. 19(5). – P. 1117–1124.
117. Langley S.C. Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero / S.C. Langley, R.F. Browne, A.A. Jackson // Comp. Biochem. Physiol. – 1994. – Vol. 109A. – P. 223–229.
118. Langley-Evans S.C. Nutritional Programming of Disease: Unravelling the mechanism / S.C. Langley-Evans // J. Anatomy. – 2008. – Vol. 215. – P. 36–51.
119. Langley-Evans S.C. The association between birthweight and longevity in the rat is complex and modulated by maternal protein intake during fetal life / S.C. Langley-Evans, D.V. Sculley, // FEBS Letters. – 2006. – Vol. 580(17). – P. 4150–4153.
120. Laplante M. mTOR signaling at a glance / M. Laplante, D.M. Sabatini // J. Cell Sci. – 2009. – Vol. 122. – P. 3589–3594.
121. Larson K. Heterochromatin Formation Promotes Longevity and Represses Ribosomal RNA Synthesis / K. Larson, S.-J. Yan, A. Tsurumi [et al.] // PLoS Genet. – 2012. – Vol. 8. – P. e1002473.
122. Le Bourg E. Food restriction and longevity in *Drosophila melanogaster* / E. Le Bourg, J. Medioni // Age Nutr. – 1991. – Vol. 2. – P. 90–94.
123. Le Bourg E. Does dietary restriction really increase longevity in *Drosophila melanogaster*? / E. Le Bourg, N. Minois // Ageing Res. Rev. – 2005. – Vol. 4. – P. 409–421.
124. Lee G.D. Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* / G.D. Lee, M.A. Wilson, M. Zhu [et al.] // Aging Cell. – 2006. – Vol. 5. – P. 515–524.

125. Lee K.P. Lifespan and reproduction in *Drosophila*: new insights from nutritional geometry. / K.P. Lee, S.J. Simpson, F.J. Clissold, R. Brooks, J.W.O. Ballard, P.W. Taylor, N. Soran, D. Raubenheimer // PNAS. – 2008. – Vol. 105. – P. 2498–2503.
126. Lian T. Epigenetic mechanisms of dietary restriction induced aging in *Drosophila* / T. Lian, U. Gaur, D. Yang, D. Li, Y. Li, M. Yang // Exp. Gerontol. – 2015. – Vol. 72. – P. 38–44.
127. Liang F. SIRT1 and insulin resistance / F. Liang, S. Kume, D. Koya // Nat. Rev. Endocrinol. – 2009. – Vol. 5. – P. 367–373.
128. Libert S. Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors / S. Libert, J. Zwiener, X. Chu, W. VanVoorhies, G. Roman, S.D. Pletcher // Science. – 2007. – Vol. 315(5815). – P. 1133–1137.
129. Lillycrop K.A. Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR $\alpha$  promoter of the offspring / K.A. Lillycrop, E.S. Phillips, C. Torrens, M.A. Hanson, A.A. Jackson, G.C. Burdge // Brit. J. Nutr. – 2008. – Vol. 100. – P. 278–282.
130. Lin Y.J. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *Methuselah* / Y.J. Lin, L. Seroude, S. Benzer // Science. – 1998. – Vol. 282. – P. 943–946.
131. Loeb J. On the influence of food and temperature-upon duration of life / J. Loeb, J.H. Northrop // J. Biol. Chem. – 1917. – Vol. 32. – P. 103–126.
132. Lopes de Souza S. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake / S. Lopes de Souza, R. Orozco–Solis, I. Grit [et al.] // Eur. J. Neurosci. – 2008. – Vol. 27. – P. 1400–1408.
133. Lyn J.C. Influence of two methods of dietary restriction on life history features and aging of the cricket *Acheta domesticus* / S. Lopes de Souza, R. Orozco–Solis, I. Grit [et al.] // Age (Dordr). – 2011. – Vol. 33(4). – P. 509–522.

134. Mackay T.F.C. Polygenic mutation in *Drosophila melanogaster*: genetic interactions between selection lines and candidate quantitative trait loci / T.F.C. Mackay, J.D. Fry // Genetics. – 1996. – Vol. 144. – P. 671–688.
135. Magwere T. Sex differences in the effect of dietary restriction on life span and mortality rates in female and male *Drosophila Melanogaster* / T. Magwere, T. Chapman, L. Partridge // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2004. – Vol. 59. – P. B3–B9.
136. Mair W. Aging and survival: the genetics of lifespan extension by dietary restriction / W. Mair, A. Dillin // Annu. Rev Biochem. – 2008. – Vol. 77. – P. 727–754.
137. Mair W. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila* / W. Mair, M.D.W. Piper, L. Partridge // PLoS Biol. – 2005. – Vol. 3(7). – P. e223.
138. Mair W. Demography of Dietary Restriction and Death in *Drosophila* / W. Mair, P. Goymer, S.D. Pletcher, L. Partridge // Science. – 2003. – Vol. 301(5640). – P. 1731–1733.
139. Mair W. Dietary restriction enhances germline stem cell maintenance / W. Mair, C.J. McLeod, L. Wang [et al.] // Aging Cell. – 2010. – Vol. 9. – P. 916–918.
140. Mair W. Lifespan extension by dietary restriction in female *Drosophila melanogaster* is not caused by a reduction in vitellogenesis or ovarian activity / W. Mair, C.M. Sgrò, A.P. Johnson, T. Chapman, L. Partridge // Exp. Gerontol. – 2004. – Vol. 39(7). – P. 1011–1019.
141. Martinez-Vicente M. Protein degradation and aging / M. Martinez-Vicente, G. Sovak, A.M. Cuervo // Exp. Gerontol. – 2005. – Vol. 40. – P. 622–633.
142. Masoro E.J. Caloric restriction and ageing: an update / E.J. Masoro // Exp. Gerontol. – 2000. – Vol. 35. – P. 299–305.
143. Masoro E.J. Overview of caloric restriction and ageing / E.J. Masoro // Mech. Ageing Dev. – 2005. – Vol. 126. – P. 913–922.



144. Masoro E.J. The role of hormesis in life extension by dietary restriction / E.J. Masoro // *Interdiscip. Top Gerontol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 1–17.
145. Masoro E.J. Use of rodents as models for the study of "normal aging": Conceptual and practical issues / E.J. Masoro // *Neurobiol. Aging.* – 1991. – Vol. 12. – P. 639–643.
146. Massey A.C. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease / A.C. Massey, C. Zhang, A.M. Cuervo // *Curr. Top Dev. Biol.* – 2006. – Vol. 73. – P. 205–235.
147. McCance R.A. Food, growth, and time / R.A. McCance // *Lancet.* – 1962. – Vol. 2(7258). – P. 671–676.
148. McCarrison R. Nutrition and Health / McCarrison R. // *British Medical Journal.* – 1953. – Vol. 1(4816). – P. 922.
149. McCarrol S.A. Comparing genomic expression patterns across species identifies shared transcriptional profile in aging / S.A. McCarrol, C.T. Murphy, S. Zou, S.D. Pletcher, C.S. Chin, Y.N. Jan, C. Kenyon, C.I. Bargmann, H. Li // *Nat Genet.* – 2004. – Vol. 36. – P. 197–204.
150. McCauley B.S. Histone methylation and aging: Lessons learned from model systems / B.S. McCauley, W. Dang // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1839. – P. 1454–1462.
151. McCay C.M. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size / C.M. McCay, M.F. Crowder, L.A. Maynard // *J. Nutr.* – 1935. – Vol. 10. – P. 63–79.
152. Meléndez A. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans* / A. Meléndez, Z. Tallóczy, M. Seaman, E.L. Eskelinen, D.H. Hall, B. Levine // *Science.* – 2003. – Vol. 301(5638). – P. 1387–1391.
153. Metaxakis A. Dietary restriction extends lifespan in wild-derived populations of *Drosophila melanogaster* / A. Metaxakis, L. Partridge // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8(9). – P. e74681.

154. Milagro F.I. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss / F.I. Milagro, J. Campión, P. Cordero, E. Goyenechea, A.M. Gómez-Uriz, I. Abete, M.A. Zulet, J.A. Martínez // *FASEB J.* – 2011. – Vol. 25. – P. 1378–1389.
155. Miller R.A. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance / R.A. Miller, G. Buehner, Y. Chang, J.M. Harper, R. Sigler, M. Smith-Wheelock // *Aging Cell.* – 2005. – Vol. 4. – P. 119–125.
156. Min K.J. Counting calories in *Drosophila* diet restriction / K.J. Min, T. Flatt, I. Kulaots, M. Tatar // *Exp. Gerontol.* – 2007. – Vol. 42. – P. 247–251.
157. Min K.J. *Drosophila* diet restriction in practice: Do flies consume fewer nutrients? / K.J. Min, M. Tatar // *Mech. Ageing Dev.* – 2006a. – Vol. 127. – P. 93–96.
158. Min K.J. Resource allocation to reproduction and soma in *Drosophila*: stable isotope analysis of carbon from dietary sugar / K.J. Min, M.F. Hogan, M. Tatar, D.M. O'Brien // *Journal of Insect Physiology.* – 2006. – Vol. 52(7). – P. 763–770.
159. Min K.J. Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster* / K.J. Min, M. Tatar // *Mech. Ageing Dev.* – 2006b. – Vol. 127(7). – P. 643–646.
160. Min K.T. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death / K.T. Min, S. Benzer // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 1997. – Vol. 94. – P. 10792–10796.
161. Minor R.K. Dietary interventions to extend life span and health span based on calorie restriction / R.K. Minor, J.S. Allard, C.M. Younts, T.M. Ward, R. de Cabo // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* – 2010. – Vol. 65. – P. 695–703.

162. Monk M. Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution / M. Monk // Dev. Genet. – 1995. – Vol. 17. – P. 188–197.
163. Monnier V. Nonenzymatic browning in vivo: Possible process for aging of long-lived proteins / V. Monnier, A. Cerami // Science. – 1981. – Vol. 211. – P. 491–493.
164. Nijland M.J. Epigenetic modification of fetal baboon hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase following exposure to moderately reduced nutrient availability / M.J. Nijland, K. Mitsuya, C. Li, S. Ford, T.J. McDonald, P.W. Nathanielsz, L.A. Cox // J. Physiol. – 2010. – Vol. 588. – P. 1349–1359.
165. Nivoit P. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance / P. Nivoit, C. Morens, F.A. Van Assche, E. Jansen, L. Poston, C. Remacle, B. Reusens // Diabetologia. – 2009. – Vol. 52. – P. 1133–1142.
166. O'Brien D.M. Use of stable isotopes to examine how dietary restriction extend *Drosophila* lifespan / D.M. O'Brien, K.-J. Min, T. Larsen, M. Tatar // Curr. Biol. Magazine. – 2006. – Vol.18. – P. 155–156.
167. Oben J.A. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice / J.A. Oben, A. Muralidarane, A.M. Samuelsson [et al.] // J. Hepatol. – 2010. – Vol. 52. – P. 913–920.
168. Omodei D. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease / D. Omodei, L. Fontana // FEBS Lett. – 2011. – Vol. 585(11). – P. 1537–1542.
169. Orozco-Sólis R. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding / R. Orozco-Sólis, S. Lopes de Souza, R.J. Barbosa Matos [et al.] // Physiol. Behav. – 2009. – Vol. 96. – P. 481–492.

170. Orr W.C. Extension of life span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* / W.C. Orr, R.J. Sohal // Science. – 1994. – Vol. 263. – 1128–1130.
171. Osborne T.B. The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life in rats / T.B. Osborne, L.B. Mendel, E.L. Ferry // Science. – 1917. – Vol. 45(1160). – P. 294–295.
172. Oudes A.J. Age-dependent accumulation of advanced glycation end-products in adult *Drosophila melanogaster* / A.J. Oudes, C.M. Herr, Y. Olsen, J.E. Fleming // Mechanisms of Ageing and Development. – 1998. – Vol. 100. – P. 221–229.
173. Owens J.A. Specific effects of placental restriction on components of the metabolic syndrome in young adult sheep / J.A. Owens, P. Thavaneswaran, M.J. De Blasio, I.C. McMillen, J.S. Robinson, K.L. Gatford // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2007. – Vol. 292. – P. E1879–E1889.
174. Ozanne S.E. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice / S.E. Ozanne, C.N. Hales // Nature. – 2004. – Vol. 427. – P. 411–412.
175. Panowski S.H. PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans* / S.H. Panowski, S. Wolff, H. Aguilaniu, J. Durieux, A. Dillin // Nature. – 2007. – Vol. 447(7144). – P. 550–555.
176. Parashar V. *dSir2* mediates the increased spontaneous physical activity in flies on calorie restriction / V. Parashar, B. Rogina // Aging. – 2009. – Vol. 1. – P. 529–541.
177. Parkes T.L. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons / T.L. Parkes, E.A.J. Dickinson, D. Hilliker, A.J. Phillips, G.L. Boulianne // Nat. Genet. – 1998. – Vol. 19. – P. 103–104.
178. Partridge L. Female fitness in *Drosophila melanogaster*: An interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males / L. Partridge // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 1996. – Vol. 263. – P. 755–759.

179. Partridge L. Ageing in *Drosophila*: The role of the insulin/IGF and TOR signalling network / L. Partridge, N. Alic, I. Bjedov, M.D.W. Piper // Exp. Gerontol. – 2011. – Vol. 46(5). – P. 376–381.
180. Partridge L. Effects of egg-production and of exposure to males on female survival in *Drosophila melanogaster* / L. Partridge, A. Green, K. Fowler // J. Insect Physiol. – 1987. – Vol. 33. – P. 745–749.
181. Partridge L. Dietary restriction in *Drosophila* / L. Partridge, M.D.W. Piper, W. Mair // Mech. Ageing Dev. – 2005b. – Vol. 126. – P. 938–950.
182. Partridge L. Sex and death: what is the connection? / L. Partridge, D. Gems, D.J. Withers // Cell. – 2005a. – Vol. 120. – P. 461–472.
183. Partridge L. Sexual activity reduces lifespan of male fruitflies / L. Partridge, M. Farquhar // Nature. – 1981. – Vol. 294. – P. 580–582.
184. Partridge L. Yeast a feast: the fruit fly *Drosophila* as a model organism for research into aging / L. Partridge, J. Tower // [In: Guarente L., Partridge L., Wallace D.C. (eds)] Mol Biol Aging. Cold Spring Harbor Monograph Series. – 2007. – Vol. 51. – P. 267–308.
185. Pembrey M.E. Male-line transgenerational responses in humans / M.E. Pembrey // Hum. Fertil. (Camb.). – 2010. – Vol. 13. – P. 268–271.
186. Pembrey M.E. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans / M.E. Pembrey, L.O. Bygren, G. Kaati [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. – 2006. – Vol. 14. – P. 159–166.
187. Pijl H. Longevity. The allostatic load of dietary restriction / H. Pijl // Physiol. Behav. – Vol. 2. – 2011. – P. 36–38.
188. Piper M.D. Counting the calories: The role of specific nutrients in extension of life span by food restriction. / M.D. Piper, W. Mair, L. Partridge // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. – 2005. – Vol. 60. – P. 549–555.
189. Piper M.D. Dietary restriction in *Drosophila*: delayed aging or experimental artefact? / M.D. Piper, W. Mair, L. Partridge // PLoS Genet. – 2007. – Vol. 3(4). – P. e57.

190. Piper M.D. Water-independent effects of dietary restriction in *Drosophila* / M.D. Piper, R. Wong, R.C. Grandison [et al.] // Exp. Gerontol. – 2010. – Vol. 45(9). – P. 685–690.
191. Pletcher S.D. Flies and their golden apples: the effect of dietary restriction on *Drosophila* aging and age-dependent gene expression. / S.D. Pletcher, S. Libert, D. Skorupa // Ageing Res Rev. – 2005. – Vol. 4. – P. 451–480.
192. Porter J.P. Prenatal high-salt diet in the Sprague-Dawley rat programs blood pressure and heart rate hyperresponsiveness to stress in adult female offspring / J.P. Porter, S.H. King, A.D. Honeycutt, // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2007. – Vol. 293. – P. R334–342.
193. Qiu X. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation / X. Qiu, K. Brown, M.D. Hirschey [et al.] // Cell Metab. – 2010. – Vol. 1. – P. 662–667.
194. Richardson A. Effect of age and dietary restriction on the expression of O<sub>2</sub>v-globulin / A. Richardson, J.A. Butler, M.S. Rutherford [et al.] // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262. – P. 12821–12825.
195. Robertson F.W. The ecological genetics of growth in *Drosophila* 1. Body size and developmental time on different diets / F.W. Robertson // Genet. Res. – 1960. – Vol. 1. – P. 288–304.
196. Rogina B. *Sir2* mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction / B. Rogina, S.L. Helfand // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2004. – Vol. 101. – P. 12980–12985.
197. Rose M.R. Genetics of increased lifespan in *Drosophila* / M.R. Rose // Bioessays. – 1989. – Vol. 11. – P. 132–135.
198. Rose M.R. Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila melanogaster* / M.R. Rose, L.N. Vu, S.U. Park, J.L. Graves // Exp. Gerontol. – 1992. – Vol. 27. – P. 241–250.
199. Sabatini D.M. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs /

- D.M. Sabatini, H. Erdjument-Bromage, M. Lui, P. Tempst, S.H. Snyder // Cell. – 1994. – Vol. 78. – P. 35–43.
200. Saffery R. Cohort profile: The peri/post-natal epigenetic twins study / R. Saffery, R. Morley, J.B. Carlin [et al.] // Int. J. Epidemiol. – 2012. – Vol. 41(1). – P. 55–61.
201. Sayer A.A. Intrauterine exposure to a maternal low protein diet shortens lifespan in rats / A.A. Sayer, R.L. Dunn, S.C. Langley-Evans, C. Cooper // Gerontology. – 2001. – Vol. 47. – P. 9–14.
202. Schenk S. Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction. / S. Schenk, C.E. McCurdy, A. Philp, M.Z. Chen, M.J. Holliday, G.K. Bandyopadhyay, O. Osborn, K. Baar, J.M. Olefsky // J. Clin. Invest. – 2011. – Vol. 121. – P. 4281–4288.
203. Schlegel A. Lessons from "lower" organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism / A. Schlegel, D.Y. Stainier // PLoS Genet. – 2007. – Vol. 3(11). – P. e199.
204. Scorupa D.A. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster* / D.A. Scorupa, A. Dervisevendic, J. Zweiner, S.D. Pletcher // Aging Cell. – 2008. – Vol. 7. – P. 478–490.
205. Scott R.C. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body / R.C. Scott, O. Schuldiner, T.P. Neufeld // Dev. Cell. – 2004. – Vol. 7. – P. 167–178.
206. Shaw P. *Drosophila* aging 2006/2007 / P. Shaw, K. Ocorr, R. Bodmer, S. Oldham // Exp. Gerontol. – 2008. – Vol. 43. – P.5–10.
207. Simpson S.J. The nutritional geometry of aging. [In: Everitt AV, Rattan SIS, Couteur DG, Cabo R, editors. Calorie restriction, aging and longevity] / S.J. Simpson, D. Raubenheimer. – Dordrecht: Springer, 2010. – P. 111–122.
208. Sinclair D.A. Unlocking the secrets of longevity genes / D.A. Sinclair, L. Guarente // Sci. Am. – 2006. – Vol. 294(3). – P. 48–51, 54–57.

209. Slonaker J.R. The effect of a restricted diet. V. On mortality, cannibalism and the sex ratio / J.R. Slonaker // Am. J. Physiol. – 1923. – Vol. 64. – P. 297–309.
210. Slonaker J.R. The effect of different per cents of protein in the diet. III. Intake and expenditure of energy / J.R. Slonaker // Am. J. Physiol. – 1931. – Vol. 97. – P. 15–21.
211. Slonaker J.R. The effect of a restricted diet. I. On growth / J.R. Slonaker, T.A. Card // Am. J. Physiol. – 1923. – Vol. 63. – P. 503–512.
212. Smith D.L.Jr. Calorie restriction: what recent results suggest for the future of ageing research / D.L.Jr. Smith, T.R. Nagy, D.B. Allison // Eur. J. Clin. Invest. – 2010. – Vol. 40(5). – P. 440–450.
213. Sookoian S. Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: a systems biology approach / S. Sookoian, T.F. Gianotti, A.L. Burgueño, C.J. Pirola // Pediatr. Res. – 2013. – Vol. 73(4 Pt 2). – P. 531–542.
214. Speakman J.R. Starving for life: what animal studies can and cannot tell us about the use of caloric restriction to prolong human lifespan / J.R. Speakman, C. Hambly // J. Nutr. – 2007. – Vol. 137. – P. 1078–1086.
215. Sun X. Nutrient-dependent requirement for SOD1 in lifespan extension by protein restriction in *Drosophila melanogaster* / X. Sun, T. Komatsu, J. Lim [et al.] // Aging Cell. – 2012. – Vol. 11(5). – P. 783–793.
216. Takahashi A. DNA Damage Signaling Triggers Degradation of Histone Methyltransferases through APC/CCdh1 in Senescent Cells / A. Takahashi, Y. Imai, K. Yamakoshi, S. Kuninaka [et al.] // Mol. Cell. – 2012. – Vol. 45. – P. 123–131.
217. Tatar M. Diet restriction in *Drosophila melanogaster*: design and analysis / M. Tatar // Interdiscip. Top. Gerontol. – 2007. – Vol. 35. – P. 115–136.
218. Tatar M. The plate half-full: status of research on the mechanisms of dietary restriction in *Drosophila melanogaster* / M. Tatar // Exp. Gerontol. – 2011. – Vol. 46(5). – P. 363–368.



219. Tatar M. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life span and impairs neuroendocrine function / M. Tatar, A. Kopelaman, D. Epstein [et al.] // Science. – 2001. – Vol. 292. – P. 107–110.
220. Tatar M. Nutrient control of *Drosophila* longevity / M. Tatar, S. Post, K. Yu // Trends in Endocrinology & Metabolism. – 2014. – Vol. 25(10). – P. 509–517.
221. Tatar M. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals / M. Tatar, A. Bartke, A. Antebi // Science. – 2003. – Vol. 299. – P. 1346–1351.
222. Thompson R.F. Epigenetic basis for fetal origins of age-related disease / R.F. Thompson, F.H. Einstein // Journal of Women's Health. – 2010. – Vol. 19. – P. 581–587.
223. Troen A.M. Lifespan modification by glucose and methionine in *Drosophila melanogaster* fed a chemically defined diet / A.M. Troen, E.E. French, J.F. Roberts, J. Selhub, J.M. Ordovas, L.D. Parnell, C.Q.T. Lai // Age. – 2007. – Vol. 29. – P. 29–39.
224. Tsakiri E.N. Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces life span in *Drosophila melanogaster* / E.N. Tsakiri, K.K. Iliaki, A. Höhn, S. Grimm, I.S. Papassideri, T. Grune, I.P. Trougakos // Free Radic. Biol. Med. – 2013. – Vol. 65. – P. 1155–1163.
225. Tu M.-P. Juvenile diet restriction and the aging and reproduction of adult *Drosophila melanogaster* / M.-P. Tu, M. Tatar // Aging Cell. – 2003. – Vol. 2. – P. 327–333.
226. Vaiserman A.M. Early-life epigenetic programming of human disease and aging / A.M. Vaiserman [Epigenetics in Human Disease. Eds: Trygve Tollefsbol]. – San Diego: Academic Press, 2012. – P. 545–567.
227. Vaiserman A.M. Hormesis, adaptive epigenetic reorganization, and implications for human health and longevity / A.M. Vaiserman // Dose Response. – 2010. – Vol. 8(1). – P. 16–21.

228. Vaiserman A.M. Effect of Dietary Restriction during Development on the Level of Expression of Longevity-Associated Genes in *Drosophila melanogaster* / A.M. Vaiserman, A.K. Koljada, O.G. Zabuga // *Advances in Gerontology*. – 2014. – Vol. 4(3). – P. 193–196.
229. Vaiserman A.M. Effects of X-irradiation in early ontogenesis on the longevity and amount of the S1 nuclease-sensitive DNA sites in adult *Drosophila melanogaster* / A.M. Vaiserman, N.M. Koshel, A.Y. Litoshenko, T.G. Mozzhukhina, V.P. Voitenko // *Biogerontology*. – 2003. – Vol. 4. – P. 9–14.
230. Vigne P. Food presentation modifies longevity and the beneficial action of dietary restriction in *Drosophila* / P. Vigne, C. Frelin // *Exp. Gerontol.* – 2010a. – Vol. 45(2). – P. 113–118.
231. Vigne P. Hypoxia modifies the feeding preferences of *Drosophila*. Consequences for diet dependent hypoxic survival / P. Vigne, C. Frelin // *BMC Physiol.* – 2010b. – Vol. 10. – P. 8.
232. Vigne P. The role of polyamines in protein-dependent hypoxic tolerance of *Drosophila* / P. Vigne, C. Frelin // *BMC Physiol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 22.
233. Walker G. Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways / G. Walker, K. Houthoofd, J.R. Vanfleteren, D. Gems // *Mech. Ageing Dev.* – 2005. – Vol. 26. – P. 929–937.
234. Wang X.M. Early life programming and metabolic syndrome / X.M. Wang // *World J. Pediatr.* – 2013. – Vol. 9(1). – P. 5–8.
235. Weindruch R. Gene expression profiling of aging using DNA microarrays / R. Weindruch, T. Kayo, C.K. Lee, T.A. Prolla // *Mech. Ageing Dev.* – 2002. – Vol. 123. – P. 177–193.
236. Weindruch R. The retardation of aging and disease by dietary restriction / R. Weindruch, R.L. Walford. – Springfield IL: Charles C. Thomas, 1988.
237. Werren J.H. Biology of *Wolbachia* / Werren J.H. // *Annu. Rev. Entomol.* – 1997. – Vol. 42. – P. 587–609.

238. Wheeler J.C. Muscle-specific expression of *Drosophila hsp70* in response to aging and oxidative stress / J.C. Wheeler, E.T. Bieschke, J. Tower // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1995. – Vol. 92(22). – P. 10408–10412.
239. Widdowson E.M. A review: new thoughts on growth / E.M. Widdowson, R.A. McCance // Pediatr. Res. – 1975. – Vol. 9(3). – P. 154–156.
240. Widdowson E.M. Some effects of accelerating growth. I. General somatic development / E.M. Widdowson, R.A. McCance // ProcRSocSerB. – 1960. – Vol. 152. – P. 188–206.
241. Woodall S.M. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring / S.M. Woodall, B.M. Johnston, B.H. Breier, P.D. Gluckman // Pediatr. Res. – 1996. – Vol. 40. – P. 438–443.
242. Yamamoto R. Insulin receptor substrate *chico* acts with the transcription factor FOXO to extend *Drosophila* lifespan / R. Yamamoto, M. Tatar // Aging Cell. – 2011. – Vol. 10. – P. 729–732.
243. Zahn J.M. Transcriptional profiling of aging in human muscle reveals a common aging signature / J.M. Zahn, R. Sonu, H. Vogel, E. Crane, K. Mazan-Mamczarz, R. Rabkin, R.W. Davis, K.G. Becker, A.B. Owen, S.K. Kim // PLoS genetics. – 2006. – Vol. 2. – P. e115.
244. Zajitschek F. Effects of juvenile and adult diet on ageing and reproductive effort of male and female black field crickets, *Teleogryllus commodus* / F. Zajitschek, J. Hunt, M.D. Jennions [et al.] // Funct. Ecology. – 2009. – Vol. 23. – P. 602–611.
245. Zeng C. Gender-specific prandial response to dietary restriction and oxidative stress in *Drosophila melanogaster* / C. Zeng, Y. Du, T. Alberico [et al.] // Fly (Austin). – 2011. – Vol. 5(3). – P. 174–180.
246. Zera A.J. The physiology of life history trade-offs in animals / A.J. Zera, L.G. Harshman // Annu. Rev. Ecol. Syst. – 2001. – Vol. 32. – P. 95–126.

247. Zhang J. The direct involvement of SIRT1 in insulin-induced insulin receptor substrate-2 tyrosine phosphorylation / J. Zhang // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 34356–34364.
248. Zheng J. Calorie restriction delays lipid oxidative damage in *Drosophila melanogaster* / J. Zheng, R. Mutcherson, S.L. Helfand // Aging Cell. – 2005. – Vol. 4. – P. 209–216.
249. Zhu C.-C. Effect of Mycotoxin-Containing Diets on Epigenetic Modifications of Mouse Oocytes by Fluorescence Microscopy Analysis / C.-C. Zhu, Y.-J. Hou, J. Han, H.-L. Liu, X.-S. Cui, N.-H. Kim, S.-C. Sun, // Microsc. Microanal. – 2014. – Vol. 20. – P. 1158–1166.
250. Zid B.M. 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila* / B.M. Zid, A.N. Rogers, S.D. Katewa, M.A. Vargas, M.C. Kolipinski, T.A. Lu, S. Benzer, P. Kapahi // Cell. – 2009. – Vol. 139. – P. 149–160.
251. Zimmerman J.A. Nutritional control of aging / J.A. Zimmerman, V. Malloy, R. Krajcik, N. Orentreich // Exp. Gerontol. – 2003. – Vol. 38. – P. 47–52.
252. Zou S. Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster* / S. Zou, S. Meadows, L. Sharp, L.Y. Jan, Y.N. Jan. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 13272.