

УДК: 612.68.014.481

**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***

О. Забуга, О. Коляда, О. Вайсерман

*ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»
вул. Вишгородська, 67, Київ 04114, Україна
e-mail: narelem12@gmail.com*

Багато досліджень демонструють, що обмеження харчування (ОХ) змінює тривалість життя (ТЖ) численних видів тварин. Однак питання про вплив ОХ впродовж розвитку на ТЖ дорослого організму дотепер залишається відкритим. У цьому дослідженні личинок *Drosophila melanogaster* вирощували в харчовому субстраті, що містив поживні речовини в концентраціях 90–10%, на відміну від контролю (100%). У самців (а не у самиць), що розвивалися за умов ОХ, виявили збільшення ТЖ. Щоб перевірити, чи пов'язане це явище з довгостроковими змінами епігенетичної регуляції асоційованих з ТЖ генів, ми визначили рівні експресії генів – *InR* (інсуліновий рецептор) та *dSir2* (сіртуїн-2 дрозофіли), які стосуються реакцій на вміст поживних речовин у харчовій суміші. Концентрація 20% поживних речовин у харчуванні призвела до достовірного збільшення рівня транскрипції *InR* та *dSir2* у незрілих комах порівняно з контролем. У дорослому віці суттєве підвищення експресії виявили тільки для гена *InR* у самців, які розвивалися з ОХ (20%), чого не спостерігалось за таких же умов у самиць. Рівень експресії гена *dSir2* в імаго обох статей внаслідок вирощування в умовах ОХ не відрізнявся від контролю. Можна зробити висновок, що ОХ упродовж розвитку призвело до більш суттєвих змін експресії генів *InR* та *dSir2* на стадії личинки, ніж у імаго.

Ключові слова: Drosophila melanogaster, обмеження харчування, розвиток, аналіз експресії генів, тривалість життя.

Проблему впливу обмеження харчування (ОХ) на тривалість життя (ТЖ) комах вивчали й описували в багатьох роботах [3, 6, 7, 14, 18]. Показано, що за допомогою ОХ можна збільшувати ТЖ лабораторних тварин, проте дані щодо його впливу на життєві характеристики *D. melanogaster* суперечливі. Так, Piper і Partridge відзначають, що в 20-ти статтях продемонстрований позитивний ефект ОХ у дрозофіл, а в 6-ти роботах такого явища не було [11]. Крім того, майже всі ці дослідження, за винятком робіт однієї групи вчених [16], проводили на імаго. Ту і Татар зважали на особливості онтогенезу *D. melanogaster*, які належать до *holometabolous*, тобто до комах із повним метаморфозом, а тому розуміли, що суттєві зміни багатьох життєво важливих функцій можна спровокувати при застосуванні ОХ упродовж розвитку. У їхній роботі було показано, що мухи, яких на стадії личинки протягом певного часу обмежували у споживанні дріжджів, мали багато рис, притаманних мутантам інсулінового рецептора *chico*: невеликі розміри тіла, затримку вилуплення, зниження кількості оваріол і фертильності. Але, на відміну від *chico*-мутантів, ці дрозофіли не відрізнялися від контрольних за параметрами вік-залежної смертності й ТЖ [16]. Такі результати відкрили питання щодо впливу ОХ упродовж розвитку організму на ТЖ до-

рослої особини. У даному експерименті ми застосовували варіанти режимів ОХ на стадії розвитку *D. melanogaster*: у харчовому субстраті (ХС) був пропорційно зменшений вміст усіх поживних речовин (ПР).

Для перевірки того, чи можуть виявлені ефекти бути пов'язані з довгостроковими змінами епігенетичної регуляції генів, асоційованих зі старінням і ТЖ у *Drosophila*, ми мали на меті визначити рівні експресії двох генів – *InR* (інсуліновий рецептор) і *dSir2* (сиртуїн-2 дрозофіли). Ці гени обрали тому, що вони стосуються реалізації ефектів, які спричиняє ОХ. У *D. melanogaster* сигнальний шлях рецептора інсуліну (IIS) або фосфоінозитид 3-кінази (*InR/PI3K*) – це важливий регулятор росту клітин [2]. Необхідно зазначити, що ген інсулін-подібного рецептора – *InR* плодової мухи – гомологічний інсуліновим рецепторам ссавців [15]. Припускають, що основна функція *InR* сигналізації у *Drosophila* – це координація клітинного метаболізму з умовами харчування [2]. Показано, що мутація *InR*, унаслідок якої в мух виникає карликовість, сприяє збільшенню до 85% ТЖ самиць і зменшенню пізньої вік-специфічної смертності самців [15]. Тим не менш, функція IIS під час розвитку мух досі залишається невизначеною [2].

Сиртуїни (Sirtuins) (регулятори замовчування інформації) – це сімейство консервативних білків, які відіграють суттєву роль у контролі експресії генів. У ссавців сиртуїни впливають на різні аспекти фізіології, включаючи метаболізм, реакції на стрес, виживаність клітин, реплікативне старіння, запалення, циркадний ритм, нейродегенеративні патології та навіть рак [4]. Rogina і Helfand (2004) виявили, що у дрозофіли сиртуїн-2 (*Sir2*) задіяний у збільшенні ТЖ в умовах калорійно обмеженого харчування. Так, продемонстровано, що збільшення *Sir2* *Drosophila* (*dSir2*) подовжує життя, в той час як зменшення блокує цей ефект, навіть за умов гіпокалорійної дієти. Виходячи з таких даних, вчені дійшли висновку, що експресія *dSir2* зумовлює генетичний шлях, за допомогою якого обмеження калорій збільшує ТЖ [12].

Матеріали та методи

Розведення популяції та експериментальні маніпуляції

Дослідження проводили на аутбредній популяції *Oregon-R* виду *Drosophila melanogaster*. Предкове покоління (F0) мух вирощували в повноцінному ХС, тобто з нормальним співвідношенням усіх ПР: на 100 мл води – 4 г сахарози, 2,5 г сухих дріжджів, 4 г манної крупи, 1 г агар-агару та 1 мл 10%-ного спиртового розчину ніпагіну (для пригнічення росту цвілі). Усіх комах утримували за стандартних умов – у термостаті з температурою (25±0,5)°С, при стабільній вологості й режимі освітлення 12 год світла/12 год темряви за добу. Протягом 8 год після вильоту з лялечок особин F0 розділяли на самиць і самців та до здійснення експериментальних маніпуляцій утримували окремо, для запобігання схрещуванням. Личинок покоління F1 утримували у ХС, в якому всі ПР були в кондиціях, що становили 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 і 10% порівняно зі стандартним 100%-ним поживним середовищем (ПС), але з нормальною кількістю агар-агару й ніпагіну. Розвиток комах відбувався у скляних банках об'ємом 200 мл (4 шт. на групу), за щільності популяції 200–250 личинок у кожній.

Визначення тривалості життя

Для дослідження імагінальної ТЖ мух розподіляли за статтю і на третю добу після вилуплення поміщали у пробірки заввишки 140 мм і діаметром 13 мм, що містили по 2 мл ПС, за щільності популяції по 25 особин на пробірку, по 5 шт. у кожній експериментальній групі. Переміщення на свіже ПС здійснювали 2 рази на тиждень, одночасно підраховуючи загиблих комах. Після вимирання всіх мух розраховували показники середньої та максимальної тривалості життя. Максимальну тривалість життя (МТЖ) розраховували

як показник середньої тривалості (СТЖ) найбільш довгоживучих 10% дрозозфіл кожного варіанта.

Молекулярно-генетичний аналіз

Рівень експресії генів *InR* та *dSir2* визначили у личинок 3-ї стадії розвитку та в імаго віком 6-ти діб, застосувавши метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією – RT-PCR (ЗТ-ПЛР). РНК виділяли з гомогенату, одержаного від 10 живих мух обох статей у кожній групі. РНК обробляли ДНКазою, після чого отримували з неї кДНК за стандартною методикою [1]. Для ПЛР підібрали специфічні для вивчених генів дрозозфіли праймери: для *dSir2*: F – 5'-gtcggacaacgatgattgc-3' і R – 5'-actgtcgcctcctctctga-3'; для *InR*: F – 5'-cggaacaacgaaccsaact-3' і R – 5'-ggcagagtttctgttcca-3'. Як внутрішній контроль рівня експресії визначали рівень експресії гена «домашнього господарства» GADPH (гліцеральдегід-фосфатдегідрогенази). ПЛР проводили в 25 мкл буфера, що містив 20 ммоль KCl, 2 ммоль – MgCl₂, 0,2 ммоль – dNTPs, 0,6 мкмоль кожного праймера та 1 од. *Taq* ДНК-полімерази. Реакції ампліфікації складалися з денатурації при 95°C упродовж 3 хв, 45-ти циклів ампліфікації та завершальної полімеризації при 72°C упродовж 3 хв. Температурні профілі повторюваних циклів для фрагментів складалися з денатурації за 95°C протягом 10 с, відпалу праймерів за 60°C протягом 10 с, синтезу за 72°C, протягом 20 с. Як негативний контроль використовували проби без кДНК-матриці. Продукти ПЛР розділяли в 3%-ному агарозному гелі з додаванням EtBr (бромистий етидій). Кількість ампліфікованого продукту визначали як добуток площі плями й інтенсивності світіння, використовуючи комп'ютерну програму «BioTest». Рівень експресії генів *InR* та *dSir2* на рівні мРНК розраховували як відношення кількості ампліфікованого продукту до кількості ампліфікованого продукту GADPH у тому ж зразку і переводили значення в умовні одиниці (у.о.). Оцінку рівня експресії кожного гена в усіх групах експерименту здійснили у 5-ти повторях.

Статистичний аналіз

Для статистичного опрацювання отриманих результатів застосовували програму «STATISTICA 6.0»: однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), після якого – post-hoc Tukey's HSD test для виявлення значущості відмінностей між групами. Оцінку відмінностей поміж групами в рівнях експресії генів здійснювали за допомогою t-критерію Стьюдента.

Результати і їхнє обговорення

У самиць, які розвивалися за умов ОХ, не продемонстровано достовірного збільшення СТЖ (рис. 1, зліва).

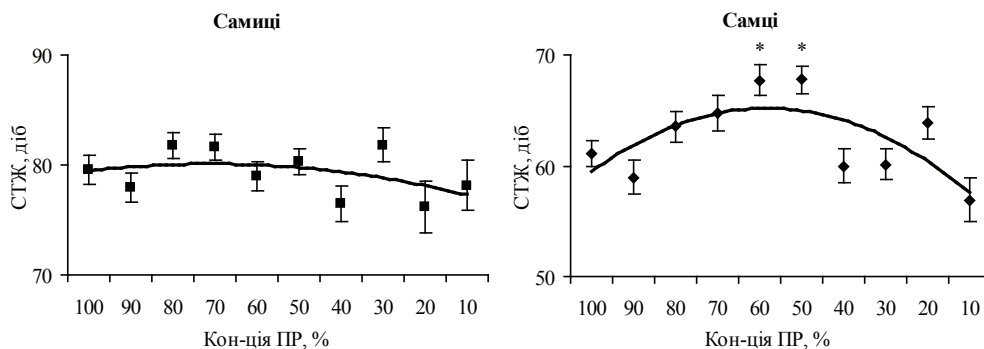


Рис. 1. Середня тривалість життя (СТЖ) самиць (зліва) і самців (справа), що розвивалися у харчовому субстраті з різними концентраціями ПР. * – p<0,001 порівняно з контролем.

Разом з тим, за допомогою ANOVA у самців виявлена залежність СТЖ від кількості ПР у харчуванні: $F=6,12$; $p<0.001$. Post-hoc порівняння між групами продемонстрували, що ОХ з концентраціями 50 і 60% упродовж розвитку призвело до статистично значущого подовження СТЖ самців порівняно з контролем (рис. 1, справа).

У самиць залежності МТЖ від концентрації ПР в ХС виявлено не було (рис. 2, зліва). А от у самців у всіх групах (за винятком «30% ПР») спостерігалось збільшення МТЖ порівняно з контролем (рис. 2, справа).

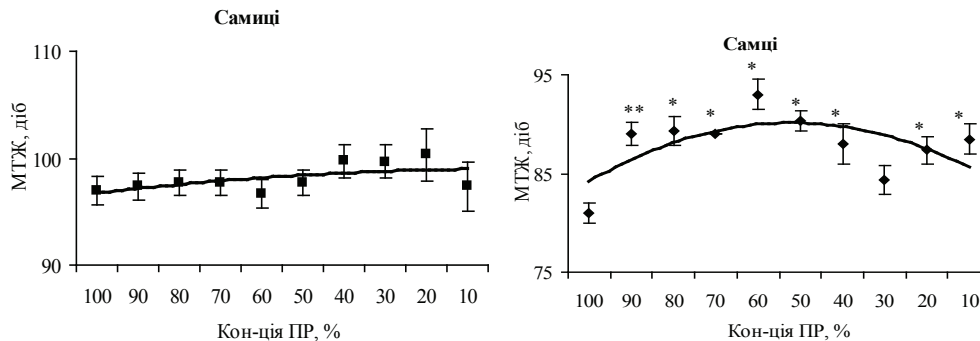


Рис. 2. Максимальна тривалість життя (МТЖ) самців (справа) і самиць (зліва), що розвивалися в харчовому субстраті з різними концентраціями ПР. * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$ порівняно з контролем.

Варто звернути увагу на те, що цей показник спочатку помірно зростає, сягаючи піку при концентраціях 50–60%, а потім поступово знижується. Проте за умов найбільших розведень ПР (10 і 20% від норми) МТЖ самців знову збільшується, сягаючи статистично значущих відмінностей від контролю (рис. 2, справа). Це може бути пов'язане з тим, що розвиток у мінімально поживному ХС призводив до збільшення смертності на личинковій стадії. Так, виживаність личинок сягала 55 і 76% при розвитку за 10 і 20% концентрацій ПР, відповідно, в той час як виживання у контролі сягало 100% ($p<0,05$). Таким чином, у мух цих двох груп збільшення ТЖ могло, принаймні, частково бути пов'язане з добром, тобто з виживанням найбільш життєздатних особин. Проте селекція не могла впливати на збільшення ТЖ в інших експериментальних групах, оскільки виживаність личинок у них не відрізнялася від контрольного показника (рис. 2, справа).

Важливо відмітити, що динаміка змін як СТЖ, так і МТЖ самців при концентраціях ПР у ХС від 100 до 30% характеризується добре вираженою «дзвоноподібною» формою (рис. 1 та 2, справа), яка зазвичай свідчить про наявність так званих «гормезисних» явищ, якими називають стимулювальний ефекти малих доз ушкоджуючих впливів. Треба зауважити, що на сьогоднішній день саме «гормезисну версію» численні автори визнають найбільш вірогідною при поясненні подовження життя різних організмів за умов ОХ [8, 10].

Одержані в нашому дослідженні результати суперечать даним багатьох інших робіт, у яких збільшення ТЖ внаслідок помірного голоду більш виразно проявлялось у самиць, а не у самців, що зазвичай пов'язують зі зниженням за умов ОХ репродуктивної активності дрософіл жіночої статі, від якої суттєво залежить їхнє «довголіття» [9, 20].

Рівні експресії генів *InR* та *dSir2* визначили у личинок та імаго, яких упродовж стадії розвитку утримували в умовах розведення ПС до 20%. Знижена концентрація ПР у харчуванні призвела до достовірного збільшення рівня транскрипції *InR* та *dSir2* у незрілих комах порівняно з контролем (рис. 3).

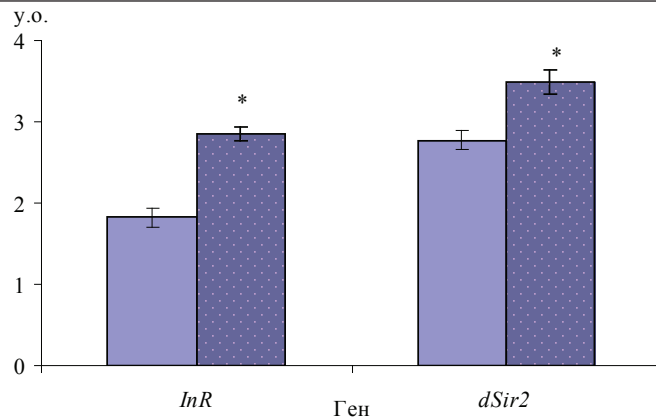


Рис. 3. Рівень експресії генів у личинок дрозофіл (у.о.), яких утримували у стандартному ХС (100%, світлі стовпчики) та з обмеженням поживних речовин (20%, темні стовпчики). * – $p < 0,05$ порівняно з контролем (світлі стовпчики).

У дорослому віці рівні експресії генів визначали у зрілих 6-денних мух (рис. 4). Рівень експресії *dSir2* у імаго обох статей внаслідок вирощування за умов ОХ не відрізнявся від контролю. Відомо, що у личинок дрозофіли відбувається активна проліферація, а от на стадії імаго майже всі тканини комах є пост-мітотичними, тобто поділ клітин не відбувається. Наявність суттєвих змін транскрипційної активності *dSir2* лише на личинковій стадії, вірогідно, може бути пов'язана з тим, що вони (зміни) не є дуже стійкими, а тому нівелюються упродовж метаморфозу та зникають до моменту визначення рівня експресії цього гена у дорослих мух.

На ілюстрації видно, що у самиць, які розвивалися за умов ОХ (20%), відсутні достовірні зміни експресії *InR* порівняно з контролем (рис. 4, зліва). Статистично вищий рівень експресії цього гена виявили у дорослих самців (рис. 4, справа).

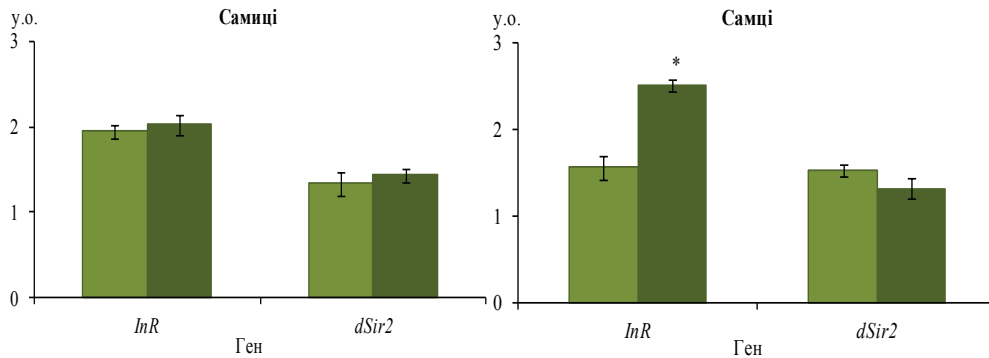


Рис. 4. Рівень експресії генів у дорослих дрозофіл (у.о.), яких виростили у стандартному ХС (100%, світлі стовпчики) та з обмеженням поживних речовин (20%, темні стовпчики). * – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Ми припускаємо, що на стадії розвитку голод може індукувати епігенетичні зміни транскрипційної активності *InR* (завдяки метилюванню ДНК, ацетилюванню гістонів хроматину, малим некодуєчим РНК тощо), які «імпринтуються» і стійко відтворюються протягом багатьох клітинних поділів [13, 19], впливаючи на різні фізіологічні характеристики і внаслідок цього на ТЖ імаго.

Наявність змін експресії гена *InR* у дорослих самців і їхня відсутність у самиць може певною мірою пояснювати наявність статевих відмінностей у реакції комах на ОХ упродовж розвитку. Оскільки ефекти на фізіологічному рівні (зокрема, збільшення ТЖ комах) проявлялися протягом довгого часу після закінчення стадії розвитку, ми припустили, що ці зміни можуть бути пов'язані з модуляцією епігенетичної регуляції онтогенезу комах. Відомо, що епігенетичні зміни, індуковані на етапах розвитку, можуть довгостроково зберігатися та визначати різні характеристики організму, включаючи його життєздатність і ТЖ [17]. Підсумовуючи, ми робимо висновок, що індуковані внаслідок ОХ на стадії розвитку епігенетичні модифікації, пов'язані, зокрема, з перебудовами в ПІС, можуть бути вірогідним молекулярним механізмом, який зумовлює довгострокові зміни різних характеристик організму та призводить до збільшення ТЖ *D. melanogaster*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Тычко Р. А., Опарина Н. Ю., Зиновьева О. Л. и др. Количественная оценка изменения уровня экспрессии гена *YB-1* при немелкоклеточном раке лёгкого // Труды МФТИ. 2009. Т. 1. № 1. С. 111–119.
2. Britton J. S., Lockwood W. K., Li L. et al. *Drosophila*'s Insulin/PI3-Kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions // Dev. Cell. 2002. Vol. 2. N 2. P. 239–249.
3. Burger J. M., Buechel S. D., Kawecki T. J. Dietary restriction affects lifespan but not cognitive aging in *Drosophila melanogaster* // Aging Cell. 2010. Vol. 9. P. 327–335.
4. Frankel S., Ziafazel T., Rogina B. *dSir2* and longevity in *Drosophila* // Exp. Gerontol. 2011. Vol. 46. N 5. P. 391–396.
5. Guarente L. Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism // Mech. Ageing Dev. 2005. Vol. 126. N 9. P. 923–928.
6. Ja W. W., Carvalho G. B., Zid B. M. et al. Water- and nutrient-dependent effects of dietary restriction on *Drosophila* lifespan // Proc Natl Acad Sci. USA. 2009. Vol. 106. P. 18633–18637.
7. Mair W., Goymer P., Pletcher D. S., Partridge L. Demography of Dietary Restriction and Death in *Drosophila* // Sci. 2003. Vol. 301. N 5640. P. 1731–1733.
8. Masoro E. J. The role of hormesis in life extension by dietary restriction // Interdiscip Top Gerontol. 2007. Vol. 35. P. 1–17.
9. Partridge L., Piper M. D. W., Mair W. Dietary restriction in *Drosophila* // Mech. Ageing Dev. 2005. Vol. 126. P. 938–950.
10. Pijl H. Longevity. The allostatic load of dietary restriction // Physiol. Behav. 2012. Vol. 106. N 1. P. 51–7.
11. Piper M. D. W., Partridge L. Dietary restriction in *Drosophila*: delayed aging or experimental artefact? // PLoS Genet. 2007. Vol. 3. N 4. P. e57.
12. Rogina B., Helfand S. L. *Sir2* mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. N 45. P. 15998–16003.
13. Sookoian S., Gianotti T. F., Burgueño A. L., Pirola C. J. Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: a systems biology approach // Pediatr. Res. 2013. Vol. 73. N 4. Pt 2. P. 531–542.
14. Tatar M. The plate half-full: status of research on the mechanisms of dietary restriction in *Drosophila melanogaster* // Exp. Gerontol. 2011. Vol. 46. N 5. P. 363–368.
15. Tatar M., Kopelman A., Epstein D. et al. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function // Sci. 2001. Vol. 292. N 5514. P. 107–110.

16. Tu M.-P., Tatar M. Juvenile diet restriction and the aging and reproduction of adult *Drosophila melanogaster* // *Aging Cell*. 2003. Vol. 2. P. 327–333.
17. Vaiserman A. M. Early-life nutritional programming of longevity // *J. Developmental Origins of Health and Disease*. 2014. Vol. 5. N 5. P. 325–338.
18. Vigne P., Frelin C. Food presentation modifies longevity and the beneficial action of dietary restriction in *Drosophila* // *Exp. Gerontol*. 2010. Vol. 45. N 2. P. 113–118.
19. Wang X. M. Early life programming and metabolic syndrome // *World J. Pediatr*. 2013. Vol. 9. N 1. P. 5–8.
20. Zeng C., Du Y., Alberico T. et al. Gender-specific prandial response to dietary restriction and oxidative stress in *Drosophila melanogaster* // *Fly (Austin)*. 2011. Vol. 5. No. 3. P. 174–180.

Стаття: надійшла до редакції 03.09.14

доопрацьована 15.12.14

прийнята до друку 19.12.14

THE IMPACT OF REDUCED NUTRIENT CONCENTRATIONS IN MEDIUM IMPLEMENTED DURING DEVELOPMENT ON LIFE EXPECTANCY AND EXPRESSION OF AGEING-RELATED GENES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

O. Zabuga, O. Kolyada, O. Vaiserman

DF Chebotarev Institute of Gerontology, NAMS of Ukraine

67, Vyshgorodska St., Kiev 04114, Ukraine

e-mail: narelem12@gmail.com

Many studies show that diet restriction changes life span (LS) of many species. However, the impact of food restriction (FR) during development on the LS of adults still remains open. In this study, larvae of *Drosophila melanogaster* were grown in the medium (M) that contained nutrients (N) in conditions of 90–10% in contrast to the standart nutrition (the control – 100%). In males (but not females) that have been kept under the FR condition, we discovered the increase in their LS. To test whether this phenomenon is associated with long-term changes in the epigenetic regulation of genes associated with LS, we determined the expression levels of an *InR* (insulin receptor) and a *dSir2* (sirtuin 2 of *Drosophila*), the genes related to reactions to the content of the N in M. We discovered that FR during development causes more significant changes in gene the expression of *InR* and *dSir2* at the larval stage, but not in adults.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, food restriction, development, gene expression analysis, lifespan.

**ВЛИЯНИЕ СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В
ПИЩЕВОМ СУБСТРАТЕ НА СТАДИИ РАЗВИТИЯ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ
ЖИЗНИ И ЭКСПРЕССИЮ СВЯЗАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ ГЕНОВ
У *DROSOPHILA MELANOGASTER***

О. Забуга, А. Коляда, А. Вайсерман

*ГУ «Институт геронтологии имени Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины»
ул. Вышгородская, 67, Киев 04114, Украина
e-mail: narelem12@gmail.com*

Многие исследования демонстрируют, что ограничение питания (ОП) изменяет продолжительность жизни (ПЖ) разнообразных видов животных. Однако вопрос о влиянии ОП на протяжении развития на ПЖ взрослого организма до сих пор остается открытым. В этом исследовании личинок *Drosophila melanogaster* выращивали в пищевом субстрате (ПС), содержащем питательные вещества (ПВ) в концентрациях 90–10%, в отличие от контроля (100%). У самцов (но не у самок), развивавшихся в условиях ОП, мы обнаружили увеличение ПЖ. Чтобы проверить, связано ли это явление с долгосрочными изменениями эпигенетической регуляции ассоциированных с ПЖ генов, мы определили уровни экспрессии генов – *InR* (инсулиновый рецептор) и *dSir2* (сиртуин-2 дрозофилы), которые имеют отношение к реакциям на содержание ПВ в ПС. Показано, что ОП на стадии развития, вызывает более существенные изменения экспрессии генов *InR* и *dSir2* у личинок, но не у имаго.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, ограничение питания, развитие, анализ экспрессии генов, продолжительность жизни.