

**Влияние сверхактивации генов циркадных ритмов
в различных тканях на стрессоустойчивость и продолжительность
жизни *Drosophila melanogaster***

© 2016. Е. В. Добровольская¹, м. н. с.,
И. А. Соловьёв¹, старший лаборант, Е. Н. Прошкина¹, к. б. н., с. н. с.,
А. А. Москалёв, д. б. н., член-корреспондент РАН,
зав. лабораторией^{1,3}, зав. кафедрой²,

¹ Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,

167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28,

² Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина,
167000, Россия, г. Сыктывкар, Октябрьский проспект, 55,

³ Московский физико-технический институт,
141701, Россия, г. Долгопрудный, Институтский переулок, 9,

e-mail: dobrovolskaya.evgenia@gmail.com, ilyasolovev-ksc@yandex.ru,
kateplus@mail.ru, amoskalev@list.ru

В настоящей работе на модели *Drosophila melanogaster* показан вклад генов циркадного осциллятора в способности организма адаптироваться к воздействию стресс-факторов различной модальности. Рассматриваемые гены (*cry*, *per*, *tim*, *cyc* и *Clk*) кондиционно сверхактивировали при помощи GAL4/UAS в мускулатуре, жировом теле и нервной системе, после чего изучали продолжительность жизни и стрессоустойчивость мух. Сверхэкспрессия в нервной системе продлила жизнь и увеличила устойчивость к действию прооксиданта параквата, голоданию и гипертермии. Эффекты сверхэкспрессии в периферических тканях на фоне ограничительной диеты разнонаправлены. Регрессионный и корреляционный анализы полученных данных показали возможность корректировки нарушения циркадных ритмов при помощи ограничения калорийности питания.

Ключевые слова: циркадные ритмы, стрессоустойчивость, продолжительность жизни, *Drosophila melanogaster*, ограничительная диета.

**Effects of genes overactivation of circadian rhythms
in different tissues to stress resistance and longevity
of *Drosophila melanogaster***

E. V. Dobrovolskaya¹, I. A. Solovyov¹,
E. N. Proshkina¹, A. A. Moskalev^{2,3},

¹ Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS,
28 Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

² Syktyvkar State University named after Pitirim Sorokin,
55 Oktyabrskiy Prospect, Syktyvkar, Russia, 167000,

³ Moscow Institute of Physics and Technology,

9 Institutskiy Pereulok, Dolgoprudny, Russia, 141701,

e-mail: dobrovolskaya.evgenia@gmail.com, ilyasolovev-ksc@yandex.ru,
kateplus@mail.ru, amoskalev@list.ru

Genes of circadian rhythms change their expression during aging of different organisms, also it is known that mutations in circadian genes accelerate aging process or decrease its pace in some cases. In present work we tried to show the versatility of circadian clock impacts on lifespan and stress-resistance determination. Previous findings have led us to the idea of normalizing expression profiles of circadian oscillator elements to compensate potential aging-associated changes during all lifespan on *Drosophila* model. The aim of the present research was to investigate the role of molecular oscillator elements (*cry*, *per*, *tim*, *clk*, *cyc*) in aging and pro-longevity mechanisms responsible for caloric restriction ef-

fects and stress-resistance increase. We chose GAL4/UAS binary system to ensure conditioned (mifepristone-inducible) overexpression in flies' muscles, fat body and gut. *Drosophila* lines were placed on standard media with different caloric values and life span had been observed once a day. We observed increase in median lifespan and stress-resistance of flies overexpressing circadian genes in nervous system. Induced overexpression of *cry* in different chromosomes improved stress resistance by 8–41% and extended lifespan of female fruit flies. Up-regulation of *timeless* didn't enhance lifespan but increased oxidative stress-resistance in females by 46%. Gene *Clk* positively affects stress-resistance in males and reduces ability to cope with starvation, *cyc* changes survival under heat-shock conditions. Genes of interest up-regulated in peripheral tissues induced multidirectional effects on lifespan of flies which were fed different media (restricted and *ad libitum* diets). Also, *Clk*, *per* and *cry* overexpression validly rescued circadian locomotor activity in aged male imagos from deterioration. Using Cox-regression and correlation analysis of obtained data we sorted out that chronodisruption of genetic or environmental origin can be treated by diet restriction.

Keywords: circadian rhythms, stress-resistance, lifespan, *Drosophila melanogaster*, caloric restriction.

Световой режим наравне с режимом питания является ключевым фактором, синхронизирующим процессы жизнедеятельности организмов с экзогенными циклами внешней среды у всех живых организмов, от одноклеточных прокариот до человека. Циркадные ритмы проявляются на всех уровнях организации живой материи – от молекулярного до популяционного. Суточные и годовые колебания интенсивности света являются внешними факторами, регулирующими сон, двигательную активность, покой, рост, размножение, линьку. Актуальность для человека в настоящее время представляет проблема десинхроноза, связанного со световым загрязнением в крупных населённых пунктах, сменой часовых поясов, проживанием на территориях с чередованием полярного дня и ночи.

Циркадные ритмы находятся под строгим генетическим контролем. У плодовой мушки *Drosophila melanogaster* молекулярный осциллятор состоит из взаимозависимых петель обратной связи [1]. Гены *Clock* (*Clk*) и *cycle* (*cyc*) кодируют белки CLK/CYC димера, стимулирующие экспрессию генов *period* (*per*) и *timeless* (*tim*). В последствии продукты этих генов формируют гетеродимеры PER/TIM, которые осуществляют репрессию генов *Clk* и *cyc* и, соответственно, свою собственную. Продукт гена *cry*, улавливая синий спектр света, активируется и способствует деградации белка TIM, перезапуская экспрессию генов *Clk* и *cyc* [2].

Центральный осциллятор, формируемый генами циркадных ритмов и их продуктами, задающий эндогенный ритм, находится в головном мозге, однако имеются собственные осцилляторы в периферических тканях. Поддержание связи между разными осцилляторами является важным условием долголетия. Существует точка зрения, согласно которой влияние ограничительной диеты на здоровье и длительность жизни во многом определяется её благоприятным влиянием на циркадные ритмы в периферических тканях [3].

С возрастом наблюдается десинхронизация работы циркадных осцилляторов, существенно

уменьшается время сна, увеличивается количество ночных пробуждений. Возможно, это связано с изменением активности генов циркадных ритмов. В частности показано, что активность генов *cry*, *cyc*, *per*, *Clk* снижается с возрастом. Также известно, что у мышей с мутацией генов *cry*, *Clock* и *Bmal1* проявляются признаки преждевременного старения [4].

Мы предположили, что сверхэкспрессия генов циркадных ритмов (*cryptochrome*, *period*, *Clock*, *cycle*, *timeless*) в нервной системе и периферических тканях на фоне ограничительной диеты может способствовать нормализации ритмов при старении и увеличить стрессоустойчивость наряду с продолжительностью жизни особей *D. melanogaster*.

Материалы и методы

Линии с дополнительными копиями генов циркадных ритмов

Линии *cry12* (с генотипом *y, w; UAS-cry12/TM2*), *cry24* (*y, w; UAS-cry24/CyO*), *per10* (*w; UAS-per10*), *per2.4* (*w; UAS-per2.4*), *cyc* (*w; P{UAS-CYC.HA}*), *Clk* (*w; P{UAS-Clk.HA}*) предоставлены доктором П. Эмери (Университет Массачусетса, США). Линия *tim* (*y, w; P{tim-HA}*) получена от доктора П. Хардина (Центр исследований биологических часов, США).

Линии с драйвером GAL4

Линия с нейрональным драйвером *ELAV-GS* (генотип *y; P{ELAV-GeneSwitch}*) предоставлена доктором Х. Кешишьян (Йельский университет, США); в мышцах *GSG-311-2* (генотип *w; Sp/CyO; P{MHC-GeneSwitch}*) – доктором Л. Сероуде (Королевский университет, Канада); в жировом теле *P{Switch1}106* (генотип *w[1118]; P{w[+mW.hs]=Switch1}106*) получена из Bloomington Stock Center (США).

Сверхактивация генов циркадных ритмов

Для сверхактивации генов циркадных ритмов использовали GAL4/UAS с GeneSwitch драйвером GAL4, активируемым мифепристонном (RU486). Для получения особей дрозофил

с кондиционной (мифепристон-индуцибельной) сверхэкспрессией изучаемых генов в мышечной системе, жировом теле и нервной системе самцов линии с драйвером GAL4 скрещивали с виргинными самками, имеющими дополнительную копию исследуемого гена под контролем промотора UAS. В качестве контроля использовали мух с таким же генотипом, но живущих на питательной среде без добавления мифепристона.

Анализ продолжительности жизни

Мух отбирали в течение 24 ч после вылета имаго и разделяли по полу. Дрозофил рассаживали по пробиркам в количестве 30 особей (не менее 150 мух на вариант эксперимента). Контрольных и опытных особей содержали при температуре 25 °С, 60% относительной влажности воздуха, 12-часовом режиме освещения на стандартной питательной среде. Эксперименты проводили в двух повторностях для каждого варианта. Количество умерших особей считали ежедневно.

Анализ влияния ограничительной диеты на продолжительность жизни

Для изучения влияния ограничительной диеты на продолжительность жизни контрольных и опытных особей содержали на двух вариантах среды: (1) среда со стандартным содержанием дрожжевого экстракта: 1% агара, 5% сахара, 5% дрожжевого экстракта; (2) среда со сниженным количеством дрожжевого экстракта: 1% агара, 5% сахара, 0,5% дрожжевого экстракта. Дрожжевой экстракт является основным источником белков для дрозофил.

Оценка стрессоустойчивости

Для определения устойчивости к действию прооксиданта особей дрозофил рассаживали в пробирки с фильтровальной бумагой, пропитанной раствором 20 мМ паракавата (Methyl Viologen, Sigma) в 5% сахарозе. Анализ проводили при температуре 25 °С и 60% влажности. Для оценки устойчивости к высоким температурам мух содержали на стандартной питательной среде при температуре 35 °С и 60% влажности. Для определения устойчивости к голоданию дрозофил помещали в пробирки

с 1% агаром, содержали при температуре 25 °С и 60% влажности. Два раза в день подсчитывали количество умерших особей. Эксперимент проводили до гибели последней дрозофилы.

Анализ возрастной динамики циркадной активности

Для оценки возрастных изменений в циркадных ритмах самцов в течение 4-х сут содержали в режиме 12 ч – освещение, 12 ч – темнота (LD), а затем в условиях полной темноты (DD), используя аппаратно-программный комплекс DAM system (TriKinetics Inc., США). Двигательную активность самцов регистрировали в течение всей жизни. Для анализа и визуализации циркадной активности был использован программный пакет ActogramJ на базе платформы ImageJ.

Оценка возраст-зависимой динамики экспрессии изучаемых генов

Оценивали возраст-зависимое изменение экспрессии генов циркадных ритмов у особей линии *w¹¹¹⁸*, особей со сверхэкспрессией генов циркадных ритмов (*cry*, *Clk*, *per*, *cyc*, *tim*). Анализ экспрессии проводили на 5, 30 и 50 сут после вылета имаго.

Экспрессию генов измеряли методом количественного ПЦР в «реальном времени» с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). РНК выделяли с помощью Aurum Total RNA Mini Kit (Bio-Rad) по инструкции изготовителя. Из полученного раствора РНК синтезировали к ДНК по инструкции iScriptc DNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Реакционную смесь для ПЦР готовили по инструкции iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) с добавлением праймеров (табл. 1). Экспрессию исследуемых генов рассчитывали относительно экспрессии гена «домашнего хозяйства» *β-Tubulin* на CFX Manager (Bio-Rad).

Рассчитывали относительную экспрессию генов циркадных ритмов с использованием метода 2^{-ΔΔCt} по величинам пороговых циклов (Ct), полученных с помощью программного обеспечения амплификатора CFX96 (Bio-Rad). ΔΔCt рассчитывали как ΔΔCt = ΔCt (сверхэкспрессия

Таблица 1

Нуклеотидная последовательность прямого и обратного праймеров (SYNTOL, Россия)

Мишень	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>β-Tubulin</i>	5'-GCAACTCCACTGCCATCC-3'	5'-CCTGCTCCTCCTCGAACT-3'
<i>per</i>	5'-GGGATCATATCGCACGTGGAC-3'	5'-CTGCGGCAATCAGGTCCTG-3'
<i>tim</i>	5'-GCCTGGGCAATGAGCCATTC-3'	5'-GAGGTGGAGGCTCTGACTGG-3'
<i>cry</i>	5'-CCACCGCTGACSTACCAAA-3'	5'-GGTGAAGCCCAATAATTTGC-3'
<i>Clk</i>	5'-ATGATGACGCACGTTCAGTTTCGC-3'	5'-TCGATGGTGTTCCTCGGTGATGC-3'
<i>cyc</i>	5'-AAGGAGCAGCTATCCTCACTGG-3'	5'-GGTCTTAACGGGCAACATGGTC-3'

исследуемого гена) – ΔCt (без сверхэкспрессии исследуемого гена), и каждое значение $\Delta Ct = Ct$ (исследуемый ген) – $Ct (\beta-Tubulin)$.

Статистический анализ результатов

Для оценки статистической значимости различий распределений смертности в выборках использовали критерий Колмогорова-Смирнова, для сравнения различий медианной продолжительности жизни – критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона. Статистическая значимость изменений максимальной продолжительности жизни (возраста 90% смертности) оценивали с помощью метода Ванг-Аллисона. Для сравнения доли умерших особей спустя 24, 48 или 144 ч использовали ϕ -критерий Фишера для выборочных долей. Достоверность различий между значениями относительной экспрессии генов оценивали U-критерием Манна-Уитни для независимых выборок, корреляционную зависимость – по критерию Пирсона, предполагаемый риск смерти особи оценивали на модели Кокса. Анализ данных выполняли в Statistica 8.0 (StatSoft) и в R 3.0.1 (RCoreTeam).

Результаты

Изменение уровня экспрессии генов циркадных ритмов у особей *D. melanogaster* с возрастом

Оценивали изменение экспрессии генов циркадных ритмов особей линии *w¹¹¹⁸* на 5, 30 и 50 сут после появления имаго. У старых особей (50 сут) наблюдается снижение экспрессии генов циркадных ритмов по сравнению с мухами среднего возраста (рис. 1). Исключением явля-

ется ген *Clk* у самцов и *cyc* у самок, активность которых достоверно не изменяется на протяжении всей жизни. Таким образом, мы отмечаем снижение уровня экспрессии отдельных генов циркадных ритмов у старых дрозофил.

Изменение суточной активности самцов *D. melanogaster* с возрастом на фоне сверхэкспрессии генов циркадных ритмов

Для оценки возрастных изменений в циркадных ритмах были проанализированы суточные изменения двигательной активности у самцов со сверхэкспрессией генов циркадных ритмов в нервной системе и контрольных особей. Наблюдали, что у мух со сверхактивацией исследуемых генов суточные ритмы в старших возрастах более выражены по сравнению с контрольными особями. Полученные данные показывают, что сверхэкспрессия генов циркадных ритмов приводит к замедлению возраст-зависимых изменений суточных осцилляций показателя локомоторной активности (рис. 2).

Влияние сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в нервной системе на продолжительность жизни особей *D. melanogaster*

Для того чтобы изучить роль центрального осциллятора в продолжительности жизни, активировали дополнительные копии генов циркадных ритмов в нервной системе (табл. 2). Предварительный анализ экспрессии исследуемых генов показал её увеличение в 1,3–2,5 раза у самцов и в 1,7–19 раза у самок.

Влияние сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в нервной системе на устойчивость особей *D. melanogaster* к действию стресс-

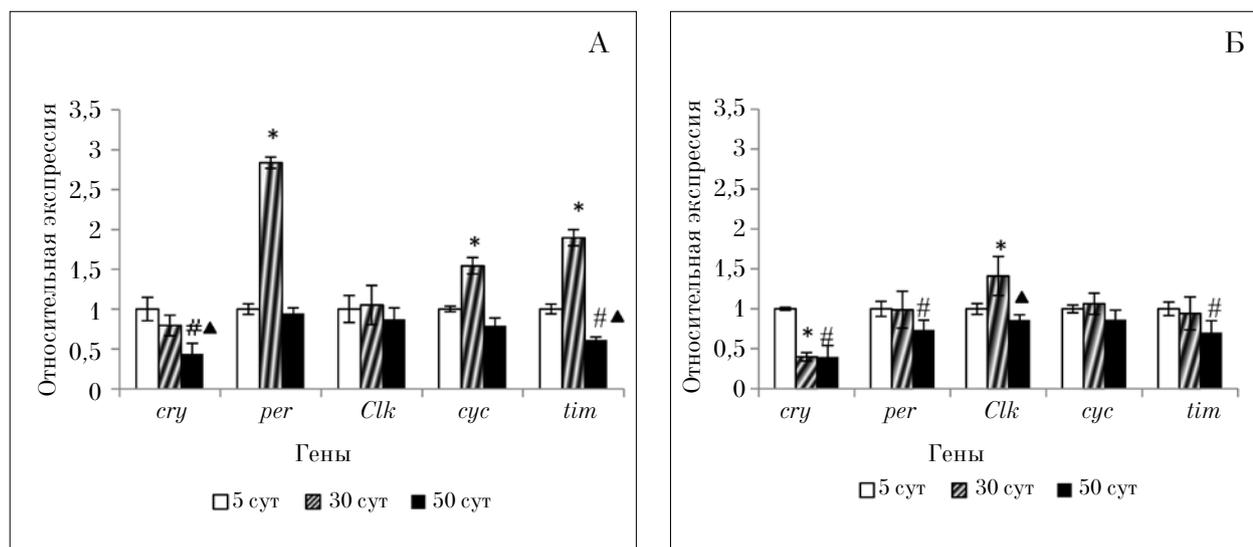


Рис. 1. Возраст-зависимое изменение экспрессии генов циркадных ритмов у самцов (А) и самок (Б) линии *w¹¹¹⁸*. * – $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни (5 и 30 сут); # – $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни (5 и 50 сут); ▲ – $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни (30 и 50 сут)

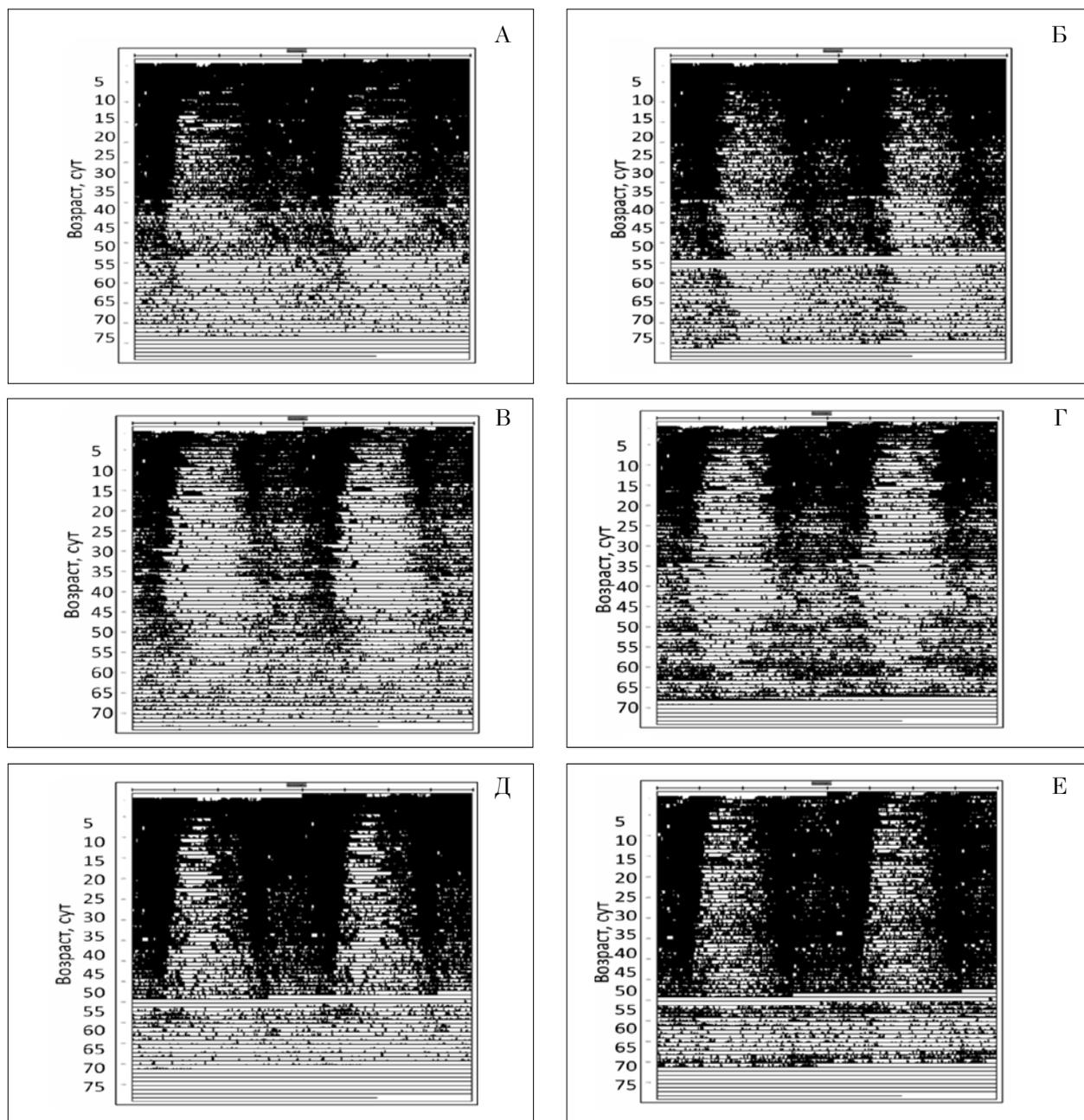


Рис. 2. Возрастная динамика суточной активности самцов *D. melanogaster* без сверхэкспрессии (А, В, Д) и со сверхэкспрессией (Б, Г, Е) генов *cry* (А, Б), *per* (В, Г), *Clk* (Д, Е)

факторов (оксидативному стрессу, гипертермии, голоданию)

Для того чтобы исследовать роль генов циркадных ритмов в стрессоустойчивости организма, мы проанализировали выживаемость мух в условиях гипертермии, окислительного стресса (прооксидант – параокват) и голодания (табл. 2).

Влияние ограничительной диеты на продолжительность жизни особей *D. melanogaster* на фоне сверхактивации генов циркадных ритмов в периферических тканях

Для того чтобы изучить влияние сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в периферических тканях на продолжительность жизни на

фоне ограничительной диеты, мы активировали исследуемые гены в мышцах и жировом теле самцов и самок *D. melanogaster* (табл. 3). Предварительный анализ экспрессии исследуемых генов показал индуцированное увеличение активности в мышцах в 1,6–14,5 раза у самцов и в 1,8–38 раза у самок и в жировом теле в 1,4–11,8 раза у самцов и в 1,6–11,6 раза у самок.

Обсуждение

У человека возраст существенно влияет на суточные ритмы сна и бодрствования. В зрелом возрасте результаты актиграфии показывают

Таблица 2

Влияние сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в нервной системе на продолжительность жизни и стрессоустойчивость (%)

Линии	Пол	Медианная продолжительность жизни	Гипертермия	Окислительный стресс	Голодание
UAS-cry12	♂♂	+15	+8	–	+13
	♀♀	+8,7	–	-34	–
UAS-cry24	♂♂	–	–	+41	–
	♀♀	+3,4	-34	–	–
UAS-per10	♂♂	–	+9	–	+19
	♀♀	+8,3	-23	+8	–
UAS-per2.4	♂♂	–	–	+8	+21
	♀♀	–	–	+17	-13
UAS-Clk	♂♂	–	+14	+9	+10
	♀♀	-9,4	–	+22	-44
UAS-cyc	♂♂	+10,7	+27	-24	–
	♀♀	–	-17	-17	–
UAS-tim	♂♂	–	–	–	+35
	♀♀	–	–	+46	-13

Примечание: ♂♂ – самцы, ♀♀ – самки, «–» – нет данных, **p*<0.05.

значительное уменьшение времени сна. Показатели «латентности сна», количество ночных пробуждений, фрагментация сна и частота дневного сна значительно увеличиваются в старших возрастных группах. Подобные же изменения выявляются на модели дрозофил [5].

При старении дрозофилы происходит ослабление выраженности периодизма, наблюдается

сдвиг периодов цикла «сна – бодрствования», однако в центральном осцилляторе в нервной системе колебания устойчивы к помехам даже у самых старых особей [6], несмотря на то, что циркадные ритмы в целом организме угнетаются при старении. Нами было показано, что во всём теле дрозофилы активность многих генов циркадных ритмов с возрастом уменьшается,

Таблица 3

Изменение медианной продолжительности жизни у особей со сверхэкспрессией генов циркадных ритмов на фоне ограничительной диеты (%)

Линии	Сверхэкспрессия в мышцах		Сверхэкспрессия в жировом теле	
	Среда со стандартным содержанием дрожжей	Среда с пониженным содержанием дрожжей	Среда со стандартным содержанием дрожжей	Среда с пониженным содержанием дрожжей
♂♂ UAS-cry12	-61	-11,6	-14	+20,8
♀♀ UAS-cry12	–	–	–	–
♂♂ UAS-cry24	-12,5	–	–	+19
♀♀ UAS-cry24	–	–	-15,3	-8,4
♂♂ UAS-per10	-28,2	-11,3	–	–
♀♀ UAS-per10	-56,3	–	–	+12
♂♂ UAS-per2.4	-20,8	-5,1	–	–
♀♀ UAS-per2.4	–	–	+23,6	+8,6
♂♂ UAS-Clk	-12,7	-13,4	–	–
♀♀ UAS-Clk	-10,9	–	-18,9	-2,7
♂♂ UAS-cyc	-21,6	–	–	–
♀♀ UAS-cyc	–	–	+23,6	+8,6
♂♂ UAS-tim	–	+14	+6,8	–
♀♀ UAS-tim	–	+4,7	-23,2	+3,6

Примечание: ♂♂ – самцы, ♀♀ – самки, «–» – нет данных, **p*<0.05.

что, вероятно, отрицательно сказывается на продолжительности и показателях качества жизни.

Ранее показано, что у старых имаго наблюдается снижение уровня осцилляций фоторецептора синего света *CRY* [4]. Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о том, что сверхактивация этого гена в нервной ткани привела к увеличению медианной продолжительности жизни и повышенной резистентности к действию прооксиданта параквата и голоданию. Согласно литературным источникам, восстановление активности *cry* путём индукции сверхэкспрессии у старых мух во всём теле усиливает амплитуду колебаний транскрипционной активности генов циркадного механизма [4].

Продолжительность жизни, как правило, сопряжена с устойчивостью живых организмов к различным видам стресса. Ранее было показано, что экспрессия многих ключевых генов-регуляторов клеточного цикла и участников ответа на генотоксический и оксидативный стресс (*Mdm2*, *Gadd45*, *Sod1*, *Cyclin D1*, *Cyclin B1*, *Cyclin E*, *Cylin A*, *p53*, *Wee1*, *c-Myc* и другие) проявляет циркадную ритмичность. Поэтому любое нарушение функции циркадных часов способно влиять на устойчивость организма к стрессу [1].

В условиях интенсивного стресса различной модальности (оксидативного стресса, гипертермии, голодания) кондиционная сверхактивация генов циркадных ритмов в нервной системе зачастую способствовала пол-специфичному увеличению выживаемости особей.

Одно из первых мест среди причин, ведущих к преждевременному старению, занимают разнообразные нарушения режима питания, ведущие к увеличению риска возникновения метаболического синдрома. Активация генов циркадных ритмов способствует синхронизации биохимических процессов в клетках, оптимизации обмена веществ и интенсификации метаболизма жиров, что в свою очередь ведёт к увеличению продолжительности жизни [7]. Показано, что ограничительная диета увеличивает амплитуду активности генов циркадных ритмов в периферических тканях [8]. Высококалорийная диета нарушает работу циркадных часов в печени и, тем самым, влияет на ритм колебаний транскрипционной активности генов метаболизма через активацию PPAR, который в обычном состоянии не активен [9]. Нарушение циркадных ритмов является причиной сахарного диабета, ожирения, артериальной гипертензии.

Нами установлено, что сверхэкспрессия генов *cry*, *per*, *cyc* и *tim* в жировом теле на фоне

ограничительной диеты увеличивает медианную продолжительность жизни. Возможно, это связано с усилением суточных метаболических циклов в периферических тканях.

С помощью регрессионного анализа было выявлено, что сверхактивация генов циркадных ритмов в мышцах увеличивает риск смерти особи (исключение – линия *cry24*) (рис. 3 А, Б), в то время как ограничительная диета сглаживает отрицательные эффекты, уменьшая риск смерти (рис. 3 В, Г). При сверхэкспрессии исследуемых генов в жировом теле риск смертности ниже, чем при сверхэкспрессии в мышцах (рис. 3 Д, Е).

Стоит отметить, что эффекты, связанные с изменением продолжительности жизни в связи со сверхэкспрессией генов циркадных ритмов, у самок выражены сильнее, чем у самцов. В то же время уровень индуцированной экспрессии исследуемых генов у самок со сверхактивацией также был выше.

Нами не обнаружено корреляционной зависимости между продолжительностью жизни и уровнем экспрессии исследуемых трансгенов в нервной системе мух (табл. 4). Однако чем выше была экспрессия в мышечной ткани, тем меньшая продолжительность жизни наблюдалась. Наиболее выраженная и статистически значимая отрицательная корреляционная зависимость проявлялась в случае с питанием без ограничений. В то же время на фоне ограничительной диеты эта зависимость уменьшилась и стала статистически незначимой. Таким образом, ограничительная диета сгладила потенциальное негативное воздействие сверхэкспрессии циркадных генов в мышечной ткани. В случае с жировым телом сверхэкспрессия у самцов имела тенденцию к увеличению продолжительности жизни, а у самок – к уменьшению, вне зависимости от типа диеты.

К молекулярным механизмам влияния низкокалорийной диеты на скорость старения следует отнести подавление инсулинового и TOR сигнальных путей, ускорение метаболизма жиров, активацию сиртуинов и FOXO, уменьшение интенсивности обмена веществ, увеличение амплитуды экспрессии генов циркадных ритмов [7].

Причиной снижения устойчивости к действию исследуемых стрессоров и уменьшения продолжительности жизни на фоне сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в некоторых вариантах эксперимента может быть нарушение баланса между различными компонентами молекулярного осциллятора циркадных ритмов. Сверхактивируя какой-либо один из исследуемых генов в изучаемой ткани, мы, вероятнее

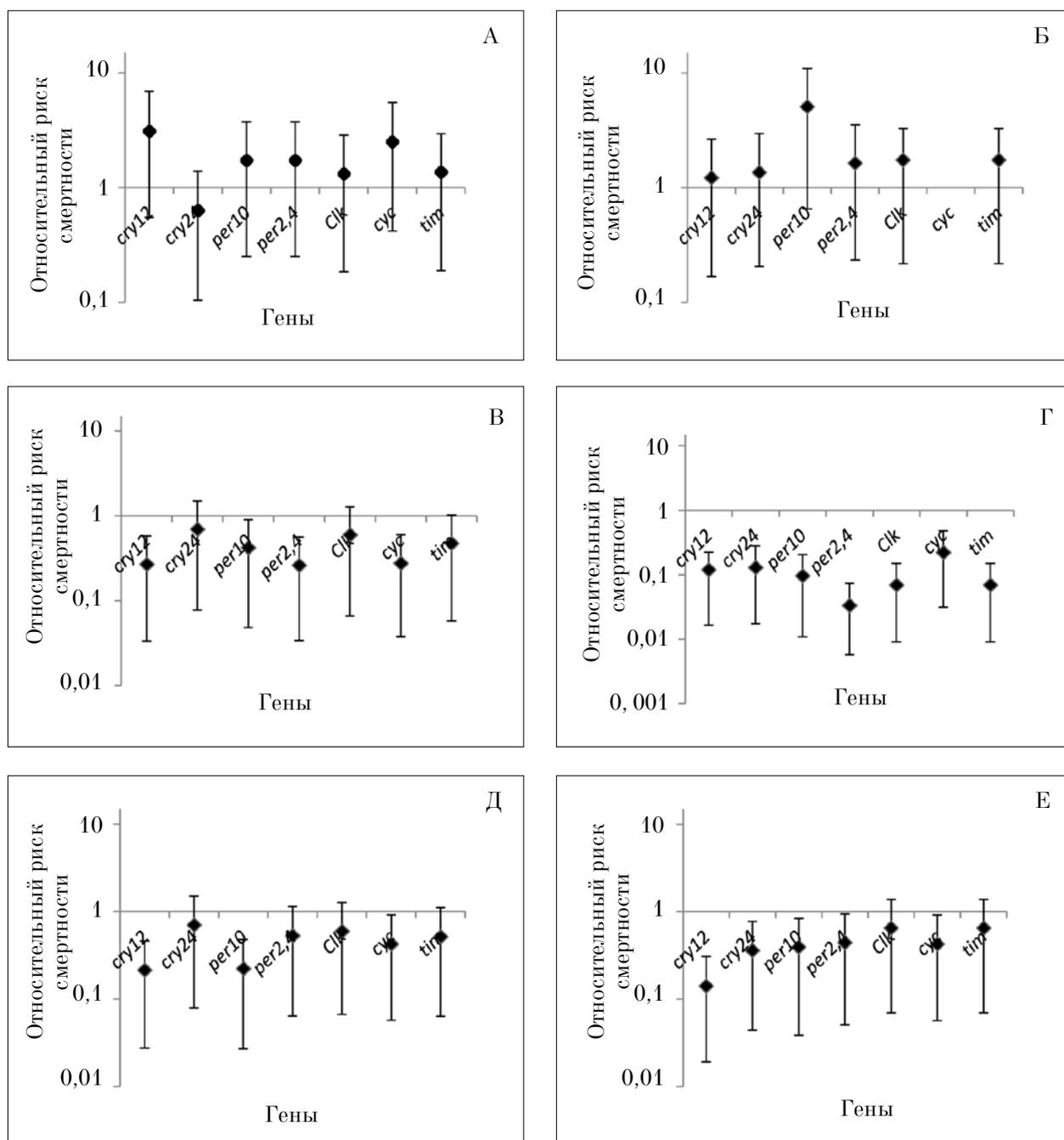


Рис. 3. Риск возникновения смерти самцов (А, В, Д) и самок (Б, Г, Е) *D. melanogaster* при сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в мышцах (А, Б), на фоне ограничительной диеты (В, Г) и при сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в жировом теле относительно сверхэкспрессии в мышцах (Д, Е)

Таблица 4

Корреляционная зависимость между изменением продолжительности жизни и уровнем экспрессии трансгенов

Тип ткани	Среда со стандартным содержанием дрожжей		Среда с пониженным содержанием дрожжей	
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀
Мышцы	-0,90298*	-0,86356*	-0,38429	-0,22264
Жировое тело	+0,326286	-0,14157	+0,668576	-0,31821
Нервная система	-0,020478	+0,008664	—	—

Примечание: ♂♂ – самцы, ♀♀ – самки, «—» – нет данных, * $p < 0.05$.

всего, нарушаем баланс между элементами молекулярного осциллятора, что может привести к отрицательным эффектам. В особенности в том случае, если экспрессия этого гена в норме в данной ткани при старении существенно не изменяется.

Дополнительной причиной снижения продолжительности жизни и устойчивости к стресс-факторам может служить энергетическое истощение, поскольку функционирование циркадного осциллятора требует больших энергетических затрат [7].

Отметим, что в условиях нарушения работы генов-регуляторов циркадных ритмов (режим освещения, режим питания) ограничительная диета сглаживает отрицательные эффекты за счёт увеличения амплитуды экспрессии генов циркадных ритмов [7].

Результаты проведённого исследования раскрывают роль генов циркадных ритмов в механизме ответа организма на такие стресс-факторы, как индуктор свободных радикалов паракват, гипертермия и голодание. Результаты исследований могут быть использованы при разработке рекомендаций по снижению негативных последствий светового загрязнения в крупных населённых пунктах, а также в условиях «полярного дня» и «полярной ночи» на Крайнем Севере. Наличие ортологов исследуемых генов у человека позволяет рассматривать их в качестве мишеней для разработки фармакологических и генотерапевтических препаратов, снижающих неблагоприятные последствия искусственного увеличения длины светового дня или нарушения циркадных ритмов человека.

Исследование было профинансировано из средств гранта Президиума РАН № 15-4-4-23, гранта РФФИ № 16-34-00734 и темы НИР «Сохра-

нение коллекций экспериментальных животных для фундаментальных исследований».

References

1. Solovyov I.A., Dobrovolskaya E.V., Moskalev A.A. Genetic control of circadian rhythms and aging // Russian Journal of Genetics. 2016. V. 52. № 4. P. 343–361.
2. Hardin P.E. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila* // Advances in Genetics. 2011. V. 74. P. 141–173.
3. Longo V., Panda S. Fasting, circadian rhythms, and time-restricted feeding in healthy lifespan // Cell Metabolism. 2016. V. 23. P. 1048–1059.
4. Rakshit K., Wambua R., Giebultowicz T.M., Giebultowicz J.M. Effects of exercise on circadian rhythms and mobility in aging *Drosophila melanogaster* // Experimental Gerontology. 2013. V. 48. № 11. P. 1260–1265.
5. Koh K., Evans J.M., Hendricks J.C., Sehgal A. A. *Drosophila* model for age-associated changes in sleep: wake cycles // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006. V. 103. № 37. P. 13843–13850.
6. Luo W., Chen W., Yue Z., Chen D., Sowcik M., Sehgal A., Zheng X. Old flies have a robust central oscillator but weaker behavioral rhythms that can be improved by genetic and environmental manipulations // Aging Cell. 2012. V. 11. № 3. P. 428–438.
7. Katewa S., Akagi K., Bose N., Rakshit K., Camarella T., Zheng X., Hall D., Davis S., Nelson C.S., Brem R.B., Ramanathan A., Sehgal A., Giebultowicz J.M., Kapahi P. Peripheral circadian clocks mediate dietary restriction-dependent changes in lifespan and fat metabolism in *Drosophila* // Cell Metabolism. 2016. V. 23. P. 1–12.
8. Patel S.A., Velingkaar N., Makwana K., Chaudhari A., Kondratov R. Calorie restriction regulates circadian clock gene expression through BMAL1 dependent and independent mechanisms // Scientific Reports. 2016. V. 12. P. 1–10
9. Sassone-Corsi P. Physiology. When metabolism and epigenetics converge // Science. 2013. V. 339. № 6116. P. 148–150.



Тепло и сердечно поздравляем нашего коллегу, члена редколлегии и автора статей журнала «Теоретическая и прикладная экология» доктора биологических наук, профессора РАН, заведующего Лабораторией молекулярной радиобиологии и геронтологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН **Алексея Александровича Москалёва** с избранием в члены-корреспонденты Российской академии наук! Желаем крепкого здоровья, удачи, новых творческих свершений, оригинальных идей и их скорейшего осуществления!