

УДК 5957:591.163]:537.312.6

DOI: <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2024.96.15-23>

Ганна КАРАМАН¹, асп.
ORCID ID: 0000-0002-3802-0512
e-mail: hanna.karaman90@gmail.com

Олександр ВАЙСЕРМАН², д-р мед. наук, проф.
ORCID ID: 0000-0003-0597-0439
e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua

Катерина АФАНАСЬЄВА¹, д-р біол. наук
ORCID ID: 0000-0002-1349-2767
e-mail: aphon@ukr.net

Андрій СИВОЛОБ¹, д-р біол. наук, проф.
ORCID ID: 0000-0002-7306-0763
e-mail: asivolob@gmail.com

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
²Державна установа "Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України", Київ, Україна

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ ЛИЧИНКОВОЇ СТАДІЇ РОЗВИТКУ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ *HSP70*, *INR*, *SIRT1*, *MTOR* ТА *FOXO* У САМЦІВ І САМОК *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Вступ. Незважаючи на прогрес у розумінні явища старіння, ключові фактори, що впливають на цей процес, залишаються недостатньо вивченими. Старіння, як генетично запрограмована сукупність подій, веде до структурних та функціональних змін, що скорочують тривалість життя організму. Актуальність дослідження полягає у розширенні розуміння впливу факторів оточуючого середовища, зокрема температури, на ранніх етапах розвитку на тривалість життя дорослих особин, використовуючи *Drosophila melanogaster* як модельний об'єкт. Метою роботи було визначення та аналіз рівня експресії генів, асоційованих із тривалістю життя у *D. melanogaster* – *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTOR* та *foxo* – у мух, вирощених за різних температур личинкової стадії розвитку.

Методи. Личинок утримували за різних температур, після чого у дорослих мух визначали рівень експресії генів за допомогою кількісної ПЛР з детекцією результатів у режимі реального часу. Відносний рівень експресії розраховували за допомогою методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Статистична достовірність отриманих даних була оцінена за допомогою ANOVA-тесту з подальшим апостеріорним парним множинним порівнянням Tukey's HSD. Відмінності вважалися значущими при $p < 0,05$.

Результати. Температура личинкової стадії розвитку статистично достовірно не впливала на експресію генів самців імаго. Водночас, для самок спостерігалось суттєве статистично достовірне підвищення експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* та *mTOR* у особин, личинковий розвиток яких проходить за температури 20°C та 30°C, порівняно з контролем 25°C.

Висновки. Підвищений рівень експресії досліджених нами генів під впливом критичних температурних умов свідчить про індукцію генералізованої стресової відповіді, яка не корелювала зі збільшенням тривалості життя. Виявлення статеві відмінності у патернах генної експресії вимагають подальшого дослідження з метою розкриття молекулярних механізмів, що лежать в її основі.

Ключові слова: тривалість життя, *Drosophila melanogaster*, личинкова стадія розвитку, температура, експресія.

Вступ

Незважаючи на численні дослідження процесу старіння, питання, щодо ключових факторів, які на цей процес впливають, досі не знайшли чітких відповідей (Molon et al., 2020). Старіння можна визначити як сукупність подій, які запрограмовані генетично і призводять до смерті організму через структурні та функціональні зміни (Ayar et al., 2011).

Дослідження в галузі біogerонтології традиційно зосереджені на пізніх стадіях життя. Однак є дані, які свідчать про те, що швидкість вікового зниження функціональних можливостей і тривалість життя можуть бути обумовлені харчуванням та іншими факторами навколишнього середовища під час розвитку (de Magalhães, 2012; Monaghan, & Haussmann, 2015; Vaiserman, 2014; Vaiserman, 2015; Vaiserman, Koliada, & Lushchak, 2018; Walker, 2011). Розвиток – це процес росту та диференціації організму від ранніх стадій до зрілої форми, який проходить крізь різноманітні зміни в структурі, функціях та поведінці. Накопичені дані свідчать про те, що організм надзвичайно чутливий до сигналів навколишнього середовища на ранніх стадіях розвитку (критичні вікна),

результати яких впливають на подальші етапи життєвого циклу (Vaiserman, Koliada, & Lushchak, 2018). Цей тип пластичності вважається дуже цінним, оскільки дозволяє організмам з однаковим генотипом генерувати різні фенотипи, які краще пристосовані до різних умов навколишнього середовища (Bateson, 2015; Projecto-Garcia, Biddle, & Ragsdale, 2017; Vaiserman, Koliada, & Lushchak, 2018). Ці процеси зазвичай називають "програмуванням розвитку", ідея якого полягає в тому, що "стимул, застосований під час критичного або чутливого періоду розвитку, може мати довготривалий або стійкий вплив на структуру або функцію організму" (Lucas, 1998). Критичні періоди розвитку характеризуються підвищеною швидкістю проліферації клітин у тканинах, що розвиваються, і високим ступенем пластичності (Hochberg et al., 2011; Vaiserman, Koliada, & Lushchak, 2018).

Плодова мушка, *Drosophila melanogaster*, є одним із найбільш часто використовуваних модельних організмів для вивчення старіння і, вважається, що вона є придатною моделлю для вивчення "програмування розвитку". Незважаючи на відмінності в онтогенезі між

мухами і людиною, плодова мушка зазнає значних змін під час розвитку, у тому числі метаморфоз, що супроводжується проліферацією і диференціацією клітин. Доросла плодова мушка переважно постмітотична, що робить її ідеальною для вивчення старіння клітин без впливу нових клітин, які здатні до поділу (Rogina, 2011). У зв'язку з цим основні епігенетичні зміни у плодових мушок відбуваються на стадії розвитку, коли епігеном характеризується підвищеною чутливістю до впливу факторів оточуючого середовища. Це забезпечує адаптацію комах до змін навколишнього середовища. А після метаморфозу, коли організм стає постмітотичним, механізми епігенетичної регуляції кардинально змінюються. Тому, особливості онтогенезу плодової мушки роблять її корисною моделлю для вивчення епігенетичних механізмів, що лежать в основі програмування розвитку (Vaiserman, Koliada, & Zabuga, 2014).

У дослідженнях Економоса і Лінтса (1984–1985) було виявлено, що мушки, які проходили личинкову стадію розвитку за низьких температур, мали збільшені розміри тіла та підвищену тривалість життя порівняно з тими, що розвивалися за звичайних температурних умов. Низькі температури можуть впливати на різноманітні біологічні процеси у *Drosophila*, зокрема, на метаболізм і розвиток мух. Серед механізмів, які можуть сприяти подовженню тривалості життя при личинковому розвитку за низьких температур, може бути синтез білків теплового шоку та антиоксидантних ферментів; зміна розмірів тіла за рахунок модифікації темпу розвитку; варіація кількості та розмірів субклітинних органел, а також сповільнення метаболічних процесів та зменшення енергетичних витрат. Всі ці механізми можуть сприяти підвищенню витривалості до голодування шляхом накопичення більшого об'єму жиру в дорослих особин. Зміни, які відбуваються на етапах личинкового розвитку, можуть призвести до тривалого підвищення стійкості дорослих особин до впливу стресових чинників і, таким чином, впливати на їхню тривалість життя (Караман, 2018).

У нашій попередній роботі (Караман та ін. 2018) було досліджено вплив температури на стадії розвитку та тривалість життя *D. melanogaster*. Дослідження проводили з використанням лінії дикого типу *Oregon-R*. Личинки і лялечки утримували за різних температур від 20°C до 30°C, тоді як імаго утримували при постійній температурі 25°C. Вимірювали тривалість розвитку від яйця до імаго і вагу особин та реєстрували середню і максимальну тривалість життя мух. Результати показали нелінійну залежність між температурою і тривалістю розвитку: зниження температури з 27,5°C до 20,0°C збільшило тривалість розвитку в 1,7 рази. Встановлено, що максимальна вага мух спостерігалася при температурі розвитку 22,5°C. За зниження температури від 22,5°C до 20,0°C вага мух зменшувалася, і при підвищенні температури до 30,0°C також спостерігалася зменшення ваги. Середня та максимальна тривалість життя мух була найвищою за температури розвитку 22,5°C, за температури 20,0°C і вище 22,5°C тривалість життя мух суттєво зменшувалася, найнижчою виживаність була при температурі 30,0°C. Таким чином, температура на личинковій стадії розвитку достовірно впливає на тривалість розвитку, вагу та тривалість життя *D. melanogaster*. Наявний фізіологічний оптимум температури розвитку, при якому тривалість життя досягає максимальних значень, можливо, пов'язаний із тим, що при оптимальних температурних умовах роз-

виток дрозофіл проходить найбільш повноцінно, що призводить до високої життєздатності організму.

Для перевірки можливого зв'язку спостережуваних ефектів зі змінами у регуляції генів, які асоціюються зі старінням та тривалістю життя, у цій роботі ми визначали рівень експресії генів *Hsp70* (під геном *Hsp70* тут і далі мається на увазі його варіант *Hsp70Aa*), *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*. Ген *Hsp70* (*heat shock protein 70 Aa*) (FlyBase ID: FBgn0013275) кодує білок теплового шоку з молекулярною вагою 70 kD, що належить до надсімейства висококонсервативних молекулярних шаперонів. Ген *InR* (*insulin/IGF tyrosine kinase receptor*) (FlyBase ID: FBgn0283499) кодує тирозинкіназний рецептор, який є гомологом рецепторів інсуліну та *IGF-1* (*insulin-like growth factor 1 receptor*) у ссавців і регулює такі ознаки, як розвиток, ріст, метаболізм, розмноження, старіння, сон, поведінку та діапаузу у мух (Tatar, 2021). *Drosophila Sirt1* (FlyBase ID: FBgn0024291) кодує білки silent information regulator proteins. Вони є членами висококонсервативного сімейства білків, які діють як нікотинамід-аденіндинуклеотид (НАД⁺)-залежні протеїндаецетилази або моно-АДФ-рибозилтрансферази. Сиртуїни в багатоклітинних організмах пов'язані з багатьма фізіологічними процесами: метаболізм, реакція на стрес, виживання клітин, реплікативне старіння, запалення, циркадні ритми, нейродегенерація та інші (Frankel, Ziafazeli, & Rogina, 2011). Ген мішені рапаміцину дрозофіли (*mTor*, *mechanistic target of rapamycin*) (FlyBase ID: FBgn0021796) кодує протеїнкіназу, яка регулює чутливість до поживних речовин, синтез білка, метаболізм для підтримки гомеостазу та контролює реакції на стрес і старіння. Шлях TOR тісно взаємодіє з сигнальним шляхом інсуліну/інсуліноподібного фактору росту (Igf) (Eleftherianos, & Castillo, 2012). Фактори транскрипції *Drosophila Forkhead Box O* (*foxo*) (FlyBase ID: FBgn0038197) контролюють численні ознаки (регуляцію клітинного циклу, загибель клітин, ріст і метаболізм) як на рівні організму, так і на клітинному рівні. Крім того, *foxo* беруть участь у модуляції сигнального шляху інсуліну. Вони проявляють чутливість до клітинних стресів і є важливими для старіння, даючи суттєвий внесок у цей процес в еволюційно консервативний спосіб (Alic et al., 2014). Ці гени були обрані, оскільки, як відомо з численних досліджень, вони пов'язані з тривалістю життя, старінням і реакцією на стрес у *D. melanogaster* та інших модельних організмів. Також, згідно з біоінформатичним онлайн-ресурсом FlyBase, всі ці гени залучені до такого важливого біологічного процесу, як "відповідь на стимулюючий вплив". У даному дослідженні було визначено та проаналізовано рівні експресії вищеписаних генів у дорослих мух, вирощених за різних температур на личинковій стадії розвитку, яка суттєво впливає на тривалість життя імаго (Sarup, Sorensen, & Loeschcke, 2014; Tatar et al., 2001; Frankel, Ziafazeli, & Rogina, 2011; Karahi et al., 2004; Hwangbo et al., 2004).

Методи

Умови утримання мух та всі особливості постановки експерименту були детально описані в нашому попередньому дослідженні (Караман та ін. 2018).

Виділення РНК та синтез кДНК. Тотальну клітинну РНК виділяли зі зразків гомогенізованих мух (по чотири зразки на групу; п'ять мух на зразок), віком 10–14 дб після вилуплення, за допомогою набору для екстракції РНК "РИБО-Сорб" ("ІнтерЛабСервіс") згідно з протоколом виробника. Концентрацію РНК визначали на спектрофотометрі "NanoDrop ND-1000" ("NanoDrop Technologies Inc.", США). Співвідношення

A260/A280 у зразках РНК становило 1,8-2,0. Для проведення реакції зворотної транскрипції використовували набір "REVERTA-L" ("ІнтерЛабСервіс"). Одноланцюгову кДНК синтезували з 1 µg тотальної РНК, попередньо обробленої набором реактивів. Синтез відбувався при 37°C протягом 30 хв на термоциклері "Veriti" ("Applied Biosystems", США).

Кількісна ПЛР у реальному часі. Для ПЛР-аналізу були підібрані праймери, специфічні до послідовностей досліджуваних нами генів: *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*. В якості гена ендogenous контролю та для

визначення відносного рівня експресії використовувався ген "домашнього господарства" *Gapdh2* (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа). Послідовності праймерів *Gapdh2*, *Hsp70*, *InR* та *Sirt1* були сконструйовані з використанням "PrimerExpress Software v3.0" ("Applied Biosystems", США), а послідовності праймерів *foxo*, *mTor* були синтезовані українською компанією "Ukrainian Genetic Technologies", як описано в Chattopadhyay et al. 2017. Послідовності праймерів наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Послідовності праймерів для кількісної ПЛР у реальному часі

Ген	Прямий праймер	Зворотний праймер
<i>Gapdh2</i>	CGT TCA TGC CAC CAC CGC TA	CAA CGT CCA TCA CGC CAC AA
<i>Hsp70</i>	CTG GGC ACC ACC TAC TCC T	GCG TTC CGA GTC TGT GAA A
<i>InR</i>	CGG AAA ACG AAA CCC AAC T	GGC AGA GTT TGC TGT TCC A
<i>Sirt1</i>	GTC GGA CAA CGA TGA TTG C	ACT GTC GCT CGC TCT CTG A
<i>foxo</i>	TTC GCT TGC GGT TAA AAG CC	GGG CCT CAA AAG ATC ACT GC
<i>mTor</i>	CAC CGA CTT CCA GAC GGA AA	CAC TGG CAG AGG TTC TCG TT

Аналіз рівня експресії генів проводився за допомогою ПЛР у реальному часі на приладі "7500 Real-Time PCR System" ("Applied Biosystems", США) з використанням "MasterMix з інтеркалюючим флуоресцентним барвником SYBR Green та референсним барвником ROX" ("Ukrainian Genetic Technologies", Україна). Кінцевий об'єм реакційної ПЛР-суміші складав 20 мкл, що містила 1U Taq полімерази із гарячим стартом, 1 мМ дНТФ, 0,5 мМ MgCl₂, по 0,5 мкМ зворотних і прямих праймерів та 100 нг кДНК. Кожну реакцію проводили у трьох повторях і кожний повтор в триплетах. Реакції ампліфікації проводили за наступних температурних режимів: ініціююча денатурація при 95°C – 5 хв, накопичення ампліфікаційного продукту протягом 50 циклів (денатурація: 94°C – 3 с, відпал праймерів: 58°C – 6 с і синтез: 72°C – 27 с) та фінальної полімеризації при 72°C протягом 3 хв. Як негативний контроль було використано зразки без додавання кДНК. Ефективність ампліфікації, яка складала 88-94 %, визначали за допомогою стандартного методу серійних розведень. Значення відносного рівня експресії розраховували за стандартним методом $\Delta\Delta Ct$.

Статистичний аналіз. Усі дані були підпорядковані нормальному розподілу, що було перевірено методом Шапіро-Уїлка. Отримані дані про відносну експресію генів були зведені до нормального розподілу за допомогою

логарифмічного перетворення і проаналізовані за допомогою односпрямованого дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) із пост-тестом Тукея (Tukey's HSD) (Ganger, Dietz, & Ewing, 2017). Всі розрахунки були виконані в середовищі програмування "Python" з використанням статистичних бібліотек numpy версії 1.26.1, statsmodels версії 0.14.1 та scipy версії 1.11.1. Візуалізації (рис. 1) були створені за допомогою бібліотеки plotly версії 2.27.0. Відмінності вважалися значущими при $p < 0,05$.

Результати

Отримані результати аналізу відносного рівня експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*, асоційованих з тривалістю життя у *D. melanogaster*, показали різний ефект впливу аналізованого нами стимулу, а саме: температури личинкової стадії розвитку, на самців і самок. Дисперсійний аналіз (табл. 2) продемонстрував, що у самців взагалі не спостерігалось статистично достовірної зміни експресії генів у відповідь на зміну температури, в той час як для самок вона була ідентифікована. Той самий висновок можна зробити на підставі попарних порівнянь рівнів експресії з контролем (личинковий розвиток за 25°C, рис. 1): у самок, личинковий розвиток яких проходив за температури 20,0°C та 30,0°C, спостерігалось суттєве достовірне підвищення експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* та *mTor* порівняно з контролем.

Таблиця 2

Результат ANOVA-тесту* для оцінки впливу стимулу (температура личинкового розвитку) на рівень експресії генів, асоційованих з тривалістю життя у самців і самок *D. melanogaster*.

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

* – дисперсійний статистичний тест ANOVA базується на аналізі варіацій даних всередині груп та між групами, дозволяючи оцінити, наскільки групові середні відрізняються одна від одної, порівняно з варіацією всередині кожної групи. Результат тесту допомагає визначити, чи є різниця між групами випадковою або таку різницю можна пояснити впливом досліджуваного фактора.

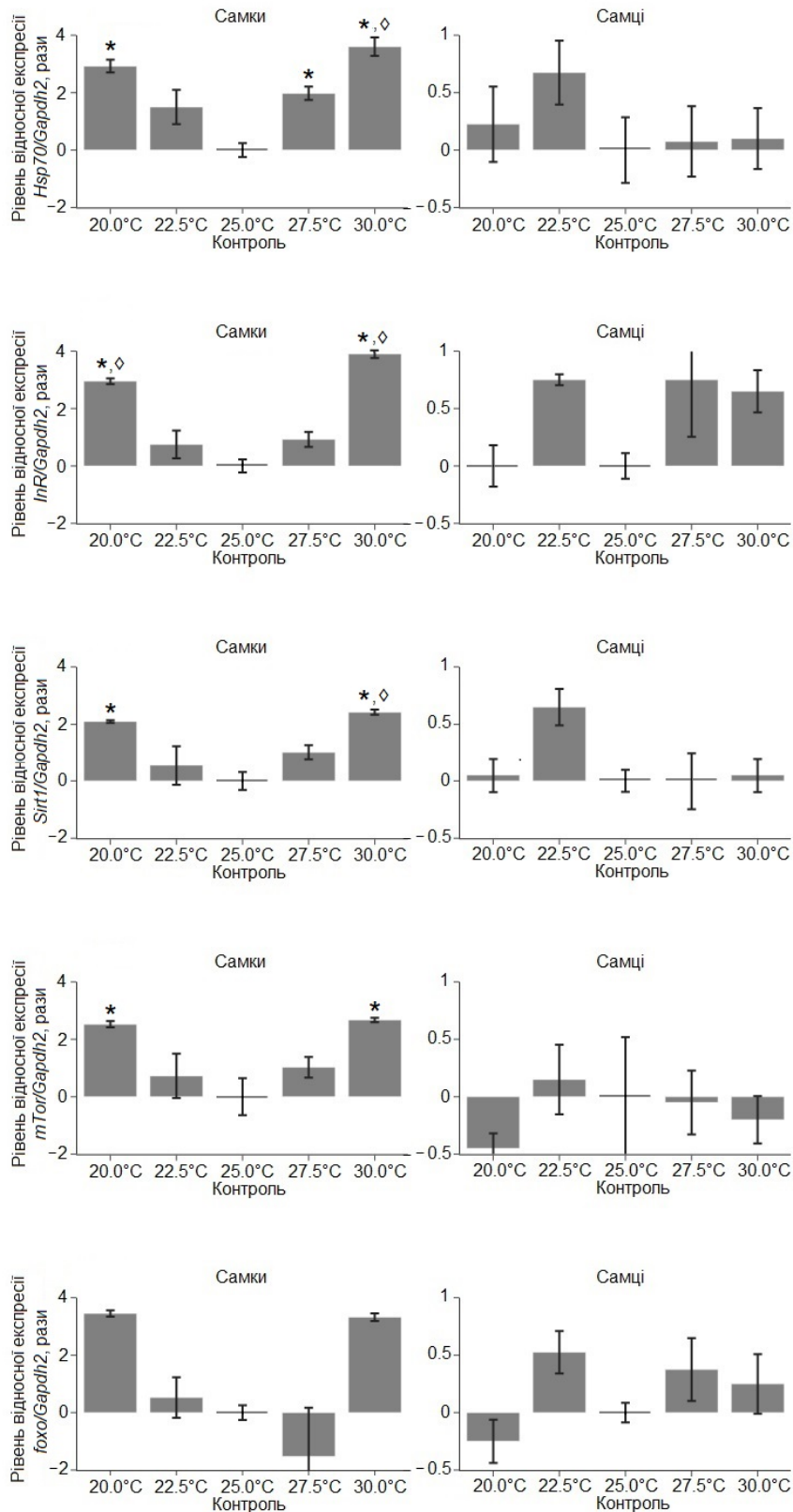


Рис. 1. Рівень відносної експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* та *foxo*, асоційованих з тривалість життя у самців і самок *D. melanogaster*, личинки і лялечки яких на стадії розвитку утримували за різної температури: 20,0; 22,5; 25,0; 27,5 і 30,0°C. Всі дані зображено як середнє значення, нормалізоване шляхом логарифмічного перетворення. Погрішність продемонстрована у вигляді стандартної похибки

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

Згідно з тестом TukeyHSD, у самок, личинковий розвиток яких проходив при 20°C, рівень експресії гена *Hsp70* підвищувався у 2,9 ($\pm 0,22$) рази ($p=0,0003$), гена *InR* у 2,95 ($\pm 0,1$) рази ($p<0,001$), гена *Sirt1* у 2,1 ($\pm 0,04$) рази ($p=0,0063$) та гена *mTor* у 2,5 ($\pm 0,11$) рази ($p=0,0154$). У випадку, коли личинкова стадія здійснювалась за 30°C, підвищення рівня експресії спостерігалось для гена *Hsp70* у 3,6 ($\pm 0,32$) рази ($p<0,001$), для *InR* у 3,9 ($\pm 0,14$) рази ($p<0,001$), для *Sirt1* у 2,4 ($\pm 0,09$) рази ($p=0,0018$) та *mTor* у 2,7 (0,08) рази ($p=0,0101$). Крім того, при порівнянні контролю та групи особин, личинковий розвиток яких проходив при 27,5°C, показано достовірне збільшення експресії для гена *Hsp70* (у 1,98 ($\pm 0,23$) рази, $p=0,0096$). Порівняння групи особин, личинковий розвиток яких проходив при 22,5°C, з групою особин, личинковий розвиток яких проходив при 30°C, показало достовірне збільшення експресії для генів *Hsp70*, *InR* та *Sirt1*. Зміни рівня експресії гена *foxo* виявились статистично недостовірними.

Таким чином, у результаті нашого експерименту виявлено відмінну реакцію рівнів експресії досліджених генів на температуру, за якою утримувались личинки та лялечки, між самцями та самками. У самців не виявлено жодної зміни у експресії аналізованих генів порівняно з контрольною групою (25°C), тоді як у самок спостерігалася зміна експресії генів *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* та *mTor* різного ступеня для більш низьких або більш високих температур. Для гена *foxo*, статистично значущі відмінності не спостерігались – статистичні показники мали межові значення (p на рівні 0,06 – 0,08). Подібні результати, але на самцях, були отримані в нашому попередньому дослідженні при личинковому розвитку за умов перенаселення (Lushchak et al., 2018), де ми продемонстрували підвищення рівня експресії генів *InR*, *mTor*, *Sirt1* та *foxo*, в той час як для гена *Hsp70* ми спостерігали межові статистичні показники.

Стресостійкість у плодових мушок досліджувалася широко, і загалом вважається, що самки виявляють вищий рівень стійкості до різних видів стресу порівняно із самцями (Pomatto, Tower, & Davies., 2017). Зокрема, кілька досліджень зафіксували кращу стійкість самок до голодування (Chandegra et al., 2017; Chauhan, Anis, & Chauhan, 2021). Однак щодо стійкості до окислювального стресу отримані дещо протирічні результати. Хоча деякі дослідження вказують на вищий рівень стійкості самок до окислювального стресу (Niveditha et al., 2017), інші, проведені на кількох штаммах, не виявили суттєвих розбіжностей (Lin et al., 2023).

Часткове підвищення стресостійкості у самок порівняно із самцями може бути пов'язане з їхнім більшим розміром (і більшою кількістю клітин), що потенційно забезпечує більші запаси поживних речовин. Крім того, ця різниця може бути, принаймні частково, пов'язана з більшою кількістю копій генів, розташованих на X-хромосомі, у самок порівняно із самцями (Pomatto, Tower, & Davies., 2017).

Гени, обрані нами для аналізу рівня експресії, є одними з ключових елементів у низці консервативних сигнальних каскадів, чутливих до стресу та нутрієнтів. Ці сигнальні шляхи тісно взаємопов'язані один з одним через безпосередні чи опосередковані взаємодії, тим самим формуючи складну мережу кооперацій, що відіграє ключову роль у регуляції клітинної відповіді на зовнішні та внутрішні впливи.

Біохімічні та протекторні властивості білка теплового шоку 70 вказують на його потенційну роль як критично важливого фактору, що модулює тривалість життя

організму. Накопичення *Hsp70*, що спостерігається в м'язах дрозофіли з віком і в скелетних м'язах старих щурів, вказує на тканинно-специфічний, селективний механізм накопичення, який потенційно сприяє подовженню тривалості життя (Wheeler, King, & Tower, 1999). Однак було виявлено, що гіперекспресія *Hsp70* негативно впливає на ріст і виживання за нормальних умов розвитку (Feder et al., 1992). Було показано кореляцію між генетичними змінами в гені *Hsp70* та зниженням виживання в умовах теплового стресу (Gong, & Golis, 2006), тоді як гіперекспресія *Hsp70* підвищує терmostійкість личинок дрозофіли (Welte et al., 1993). Більше того, було показано, що вплив нелетального теплового шоку збільшує тривалість життя дорослих мух, причому більш виражені ефекти спостерігаються у штамів з додатковими копіями гена *Hsp70* (Khazaeli et al. 1997; Tatar, Khazaeli, & Curtsinger, 1997). Ці дані підкреслюють значний вплив *Hsp70* на тривалість життя. Тим не менш, варто зазначити, що обробка тепловим шоком одночасно стимулює експресію інших білків теплового шоку, що дозволяє припустити, що спостережувані біологічні ефекти можуть бути пов'язані як з ізолюваною дією *Hsp70*, так і з його синергічною взаємодією з іншими білками теплового шоку (Xiao et al., 2019). У нашому дослідженні було зафіксовано значне зростання рівня експресії гена *Hsp70* у порівнянні з контрольною групою. Спостережувана залежність між інтенсивністю експресії гена *Hsp70* та відхиленням температури від фізіологічного оптимуму свідчить про протекторні функції цього білка. Однак, варто зазначити, що в зразку, розвиток якого відбувався при температурі 22,5°C, який у нашому попередньому експерименті демонстрував найвищу тривалість життя, збільшення експресії не було виявлено. Що свідчить про те, що збільшення тривалості життя дрозофіл не було асоційовано з підвищенням рівня експресії гена *Hsp70*.

Мутації інсулінового тирозинкіназного рецептора сповільнюють старіння у *Drosophila* та *C. elegans* (Altintas, Park, & Lee, 2016). Ці безхребетні мають по одному insulin/IGF tyrosine kinase рецептору, *InR* у дрозофіли та *Daf-2* у *C. elegans*. *Daf-2* та *InR* стимулюються інсуліноподібними пептидами для індукції внутрішньоклітинних сигналів через Akt (протеїнкіназа B), Ras (протоонкогенний білок P21) та TOR, які разом опосередковують фактори транскрипції та клітинний метаболізм і, таким чином, забезпечують виживання. Нокдаун *IR*, рецептора інсуліноподібного фактора росту1 (*IGF1R*) та субстратів інсулінових рецепторів (*IRS1*, *IRS2*) асоціюється з уповільненим старінням у мишей. (Yamamoto et al., 2021). Показано, що Akt сприяє синтезу білка через TOR-опосередковане фосфорилування та інактивіацію інгібітора трансляції 4E-BP (eukaryotic initiation factor 4E binding protein), який тісно взаємодіє з фактором ініціації eIF-4E (eukaryotic translation initiation factor 4E). Інший компонент, супресор пухлин TSC2, є мішенню фосфорилування Akt. TOR також фосфорилує кіназу S6 (*S6K*). Мутанти *S6K* демонструють затримку розвитку та зменшення розмірів тіла з меншими клітинами. Таким чином, шлях *InR/TOR* тонко налаштований, щоб бути особливо чутливим до поживних речовин та змін в оточуючому середовищі. (Dutriaux et al., 2013). Дефіцит функції *mTor* у дрозофіли призводить до зменшення розміру та кількості клітин у різних тканинах мухи (Oldham et al., 2000). Роль *mTor* у тривалості життя дрозофіли була продемонстрована тим, що інгібування сигналізації dTOR-шляхом масштабної надекспресії домінантно-негативного алеля *dTOR* призводить

до збільшення середньої тривалості життя на 24–26 % (Karahi et al., 2004; Eleftherianos, & Castillo, 2012).

Позаклітинні ліганди, гомологи інсуліну, регулюють активність InR під час розвитку. Було ідентифіковано сім генів *dilp1-7* для інсуліноподібних пептидів дрозофіли. Основний компонент інсулінового сигнального каскаду, транскрипційний фактор foxo, фосфорилується Akt, що призводить до його цитоплазматичної локалізації і, таким чином, до пригнічення його активності. Мутант foxo, позбавлений сайтів фосфорилування Akt, залишається в ядрі і є конститутивно активним. Foxo безпосередньо регулює транскрипційний регулятор 4E-BP і сам InR, забезпечуючи таким чином механізм зворотного зв'язку. Це робить foxo ключовим транскрипційним регулятором інсулінового шляху регуляції росту (Dutriaux et al., 2013). *Drosophila melanogaster* має єдиний ортолог foxo (*dFOXO*), і збільшення його активності в мозку, жировому тілі та м'язах є достатнім для подовження тривалості життя мух (Giannakou et al., 2004; Hwangbo et al., 2004; Demontis, & Perrimon, 2010), тоді як інші дослідники показали, що індукція *dFOXO* виключно в кишечнику глибоко впливає на тривалість життя (Karas, Biteau, & Jasper, 2013). Більше того, як *dFOXO*, так і ортолог *Caenorhabditis elegans*, *daf-16*, строго необхідні для подовження тривалості життя при зниженні сигналізації IIS (Insulin/insulin-like growth factor signaling) (Slack et al., 2011; Alic et al., 2014).

Хоча найбільш вивченим шляхом контролю сімейства FOXO є інсулінова сигналізація, тепер зрозуміло, що численні стресові фактори можуть активувати foxo (Eijkelenboom, & Burgering, 2013). В умовах клітинного стресу активація сімейства FOXO та протеотоксичність через неправильно згорнуті або агреговані білки є поширеним явищем. Для боротьби з протеотоксичністю та для підтримки протеостазу клітини індукують білки теплового шоку. Hsps поділяються на малі та великі родини, з різними функціями щодо запобігання агрегації білків та сприяння правильному згортанню білків відповідно. У *D. melanogaster* та *C. elegans* транскрипційний фактор FOXO відіграє вирішальну роль у стрес-реакції, регулюючи експресію Hsps. У той час як у *C. elegans* *daf-16* специфічно регулює малі Hsps, у дрозофіли foxo впливає на експресію як малих Hsps, так і великих Hsp, таких як Hsp70. Це вказує на ширшу мережу транскрипційних мішеней у дрозофіли, що посилює клітинний захист від стресу та протеотоксичності за допомогою більш комплексної системи шаперонів (Donovan, & Marr, 2016).

Ген *Sirt1*, локалізований на другій хромосомі *D. melanogaster*, кодує єдиний ановотаний транскрипт та трансклюється в один поліпептид. Детальні дослідження ефектів легкої надекспресії *Sirt1* у суворо контрольованому генетичному середовищі продемонстрували, що помірна активація *Sirt1* сприяє збільшенню тривалості життя, тоді як виражена надмірна експресія призводить до протилежних результатів (Rogina, & Helfand, 2004; Burnett et al., 2011). Цілеспрямоване нокадаун *Sirt1* у жировому тілі порушує інсулінову сигналізацію та метаболічну рівновагу, що підкреслює ключову роль *Sirt1* у поєднанні вкладу харчування з загальною фізіологією організму та перспективами виживання (Banerjee et al., 2012). Крім того, *Sirt1* демонструє функціональний взаємозв'язок з транскрипційним фактором FOXO, який опосередковує апоптичну загибель клітин через активацію шляхів JNK та FOXO, що свідчить про невід'ємну участь гена в регуляції як довголіття, так і апоптозу (Griswold et al., 2008).

Дискусія і висновки

У рамках нашого дослідження було зафіксовано зростання рівня експресії генів *Hsp70*, *InR*, *mTor*, *Sirt1* та foxo у самок *Drosophila*, які розвивалися при температурах 20°C і 30°C. Встановлено, що підвищення експресії генів *Hsp70*, *InR*, *mTor* та *Sirt1* є статистично значущим при порівнянні з контрольною групою (розвиток за температури 25°C), в той час як для гена foxo статистично значущі відмінності не були зареєстровані, незважаючи на межові значення статистичних показників (значення *p* на рівні 0,06–0,08), що може свідчити про недостатній обсяг вибірки для адекватного статистичного аналізу. Підвищення експресії зазначених генів за критичних температур, які були задіяні в нашому експерименті, вказує на генералізовану неспецифічну реакцію на стрес, яка не була пов'язаною з підвищенням тривалості життя. Виявлена статистична відмінність у профілів експресії генів потребує подальшого ретельного дослідження для з'ясування молекулярних механізмів, що лежать в його основі.

Внесок авторів: Ганна Караман – проведення експериментів, статистичний аналіз, аналіз літератури, написання статті; Олександр Вайсерман – загальна концепція роботи; Катерина Афанасьєва – планування роботи, написання статті; Андрій Сиволоб – планування роботи, написання статті.

Список використаних джерел

- Караман, Г.С., Вайсерман, О.М., Писарук, А.В., Кошель, Н.М., Мехова, Л.В., & Козерецька І.А. (2018). Вплив температури на личинковій стадії розвитку на тривалість життя *Drosophila melanogaster*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 22, 51–55. <https://doi.org/10.7124/FEECO.v22.923>
- Alic, N., Giannakou, M.E., Papatheodorou, I., Hodinott, M.P., Andrews, T.D., Bolukbasi, E., & Partridge, L. (2014). Interplay of dFOXO and Two ETS-Family Transcription Factors Determines Lifespan in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 10(9), e1004619. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004619>
- Altintas, O., Park, S., & Lee, S.J. (2016). The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB reports*, 49(2), 81–92. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2016.49.2.261>
- Ayar, A., Uysal, H., Altun, D., & Aşkin, H. (2019). The Effects of Heat Shock on the Longevity in Some Strains of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Applied Biological Sciences*, 6(1), 45–49.
- Banerjee, K.K., Ayyub, C., Sengupta, S., & Kolthur-Seetharam, U. (2012). *dSir2* deficiency in the fatbody, but not muscles, affects systemic insulin signaling, fat mobilization and starvation survival in flies. *Aging (Albany NY)*, 4(3), 206–223. <https://doi.org/10.18632/aging.100435>
- Bateson, P. (2015). Why are individuals so different from each other? *Heredity (Edinburgh)*, 115(4), 285–292. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.103>
- Bumett, C., Valentini, S., Cabreiro, F., Goss, M., Somogyvári, M., Piper, M.D., Hodinott, M., Sutphin, G.L., Leko, V., McElwee, J.J., Vazquez-Marranque, R.P., Orfila, A.M., Ackerman, D., Au, C., Vinti, G., Riesen, M., Howard, K., Neri, C., Bedalov, A., Kaeberlein, M., Soti, C., Partridge, L., & Gems, D. (2011). Absence of effects of *Sir2* overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature*, 477(7365), 482–5. <https://doi.org/10.1038/nature10296>
- Chandegra, B., Tang, J.L.Y., Chi, H., & Alic, N. (2017). Sexually dimorphic effects of dietary sugar on lifespan, feeding and starvation resistance in *Drosophila*. *Aging (Albany NY)*, 9(12), 2521–2528. <https://doi.org/10.18632/aging.101335>
- Chattopadhyay, D., Chitnis, A., Talekar, A., Mulay, P., Makkar, M., James, J., & Thirumurugan, K. (2017). Hormetic efficacy of rutin to promote longevity in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, 18(3), 397–411. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9700-1>
- Chauhan, V., Anis, A., & Chauhan, A. (2021). Effects of starvation on the levels of triglycerides, diacylglycerol, and activity of lipase in male and female *Drosophila melanogaster*. *Journal of Lipids*, 2021, 5583114. <https://doi.org/10.1155/2021/5583114>
- de Magalhães, J.P. (2012). Programmatic features of aging originating in development: aging mechanisms beyond molecular damage? *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 26(12), 4821–4826. <https://doi.org/10.1096/fj.12-210872>
- Demontis, F., & Perrimon, N. (2010). FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell*, 143(5), 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.007>
- Donovan, M.R., & Marr, M.T. (2016). *dFOXO* Activates Large and Small Heat Shock Protein Genes in Response to Oxidative Stress to

- Maintain Proteostasis in *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry*, 291(36), 19042–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.723049>
- Dutriaux, A., Godart, A., Brachet, A., & Silber, J. (2013). The Insulin Receptor Is Required for the Development of the *Drosophila* Peripheral Nervous System. *PLoS ONE*, 8(9), e71857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071857>
- Eijkelenboom, A., & Burgering, B.M. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(2), 83–97. <https://doi.org/10.1038/nrm3507>
- Eleftherianos, I., & Castillo, J.C. (2012). Molecular Mechanisms of Aging and Immune System Regulation in *Drosophila*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 9826–9844. <https://doi.org/10.3390/ijms13089826>
- Feder, J. H., Rossi, J. M., Solomon, J., Solomon, N., & Lindquist, S. (1992). The Consequences of Expressing *Hsp70* in *Drosophila* Cells at Normal Temperatures. *Genes & Development*, 6, 1402–1413. <https://doi.org/10.1101/gad.6.8.1402>
- Frankel, S., Ziafazel, T., & Rogina, B. (2011). *dSir2* and longevity in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, 46(5), 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.08.007>
- Ganger, M.T., Dietz, G.D. & Ewing, S.J. (2017). A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 534. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1949-5>
- Giannakou, M.E., Goss, M., Jünger, M.A., Hafen, E., Leivers, S.J., & Partridge, L. (2004). Long-lived *Drosophila* with overexpressed *dFOXO* in adult fat body. *Science*, 305(5682), 361. <https://doi.org/10.1126/science.1098219>
- Gong, W. J., & Golic, K. G. (2006) Loss of *Hsp70* in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics* 172: 275–286. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.048793>
- Griswold, A.J., Chang, K.T., Runko, A.P., Knight, M.A., & Min, K.T. (2008). *Sir2* mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(25), 8673–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803837105>
- Hochberg, Z., Feil, R., Constancia, M., Fraga, M., Junien, C., Carel, J.C., Boileau, P., Le Bouc, Y., Deal, C.L., Lillycrop, K., Scharfmann, R., Sheppard, A., Skinner, M., Szyf, M., Waterland, R.A., Waxman, D.J., Whitelaw, E., Ong, K., & Albertsson-Wikland, K. (2011). Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocrine reviews*, 32(2), 159–224. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0039>
- Hwangbo, D.S., Gershman, B., Tu, M.P., Palmer, M., & Tatar, M. (2004). *Drosophila* *dFOXO* controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*, 429(6991), 562–566. <https://doi.org/10.1038/nature02549>
- Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., & Benzer, S. (2004). Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current biology*, 14(10), 885–890. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.059>
- Karpac, J., Biteau, B., & Jasper, H. (2013). Misregulation of an adaptive metabolic response contributes to the age-related disruption of lipid homeostasis in *Drosophila*. *Cell reports*, 4(6), 1250–1261. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.004>
- Khazaeli, A. A., Tatar, M., Pletcher, S. D., & Curtsinger, J. W. (1997). Heat-induced longevity extension in *Drosophila*. I. Heat treatment, mortality, and thermotolerance. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 52, B48–B52. <https://doi.org/10.1093/gerona/52A.1.B48>
- Lin, Y.C., Zhang, M., Chang, Y.J., & Kuo, T.H. (2023). Comparisons of lifespan and stress resistance between sexes in *Drosophila melanogaster*. *Heliyon*, 9(8), 18178. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18178>
- Lucas, A. (1998). Programming by early nutrition: An experimental approach. *The Journal of nutrition*, 128(2), 401–406. <https://doi.org/10.1093/jn/128.2.401S>
- Lushchak, O.V., Karaman, H.S., Kozeretska, I.A., Koliada, A.K., Zabuga, O.G., Pisaruk, A.V., Koshel, N.M., Mechova, L.V., Inomistova, M.V., Khranovska, N.M., & Vaiserman, A.M. (2018). Larval crowding results in hormesis-like effects on longevity in *Drosophila*: timing of eclosion as a model. *Biogerontology*, 20(2), 191–201. <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9786-0>
- Moloń, M., Dampc, J., Kula-Maximenko, M., Zebrowski, J., Moloń, A., Dobler, R., Durak, R., & Skoczowski, A. (2020). Effects of temperature on lifespan of *Drosophila melanogaster* from different genetic backgrounds: Links between metabolic rate and longevity. *Insects*, 11(8), 470. <https://doi.org/10.3390/insects11080470>
- Monaghan, P., & Haussmann, M.F. (2015). The positive and negative consequences of stressors during early life. *Early human development*, 91(11), 643–647. <https://doi.org/10.1016/j.earhumdev.2015.08.008>
- Niveditha, S., Deepashree, S., Ramesh, S.R., & Shivanandappa, T. (2017). Sex differences in oxidative stress resistance in relation to longevity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of comparative physiology*, 187(7), 899–909. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1061-1>
- Oldham, S., Montagne, J., Radimerski, T., Thomas, G., & Hafen, E. (2000). Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes & development*, 14(21), 2689–94. <https://doi.org/10.1101/gad.845700>
- Pomatto, L.C.D., Tower, J., & Davies, K.J.A. (2017). Sexual Dimorphism and Aging Differentially Regulate Adaptive Homeostasis. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 73(2), 141–149. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx083>
- Projecto-Garcia, J., Biddle, J.F., & Ragsdale, E.J. (2017). Decoding the architecture and origins of mechanisms for developmental polyphenism. *Current opinion in genetics & development*, 47, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cog.2017.07.015>
- Rogina, B. (2011). For the special issue: aging studies in *Drosophila melanogaster*. *Experimental gerontology*, 46(5), 317–319. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.09.001>
- Rogina, B., & Helfand, S.L. (2004). *Sir2* mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 15998–6003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404184101>
- Sarup, P., Sørensen, P., & Loeschcke, V. (2014). The long-term effects of a life-prolonging heat treatment on the *Drosophila melanogaster* transcriptome suggest that heat shock proteins extend lifespan. *Experimental gerontology*, 50, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.017>
- Slack, C., Giannakou, M.E., Foley, A., Goss, M., & Partridge, L. (2011). *dFOXO*-independent effects of reduced insulin-like signaling in *Drosophila*. *Aging Cell*, 10(5), 735–748. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00707.x>
- Tatar, M. (2021). Aging Regulated Through a Stability Model of Insulin/Insulin Growth Factor Receptor Function. *Frontiers in endocrinology*, 12, 649880. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.649880>
- Tatar, M., Khazaeli, A. A., & Curtsinger, J. W. (1997). Chaperoning extended life. *Nature*, 390(6655), 30. <https://doi.org/10.1038/36237>
- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., & Garofalo, R.S. (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*, 292(5514), 107–110. <https://doi.org/10.1126/science.1057987>
- Vaiserman, A. (2015). Epidemiologic evidence for association between adverse environmental exposures in early life and epigenetic variation: a potential link to disease susceptibility? *Clinical epigenetics*, 7(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0130-0>
- Vaiserman, A., Koliada, A., & Lushchak, O. (2018). Developmental programming of aging trajectory. *Ageing research reviews*, 47, 105–122. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.07.007>
- Vaiserman, A., Koliada, A., & Zabuga, O. (2014) Effect of dietary restriction during development on the level of expression of longevity-associated genes in *Drosophila melanogaster*. *Advances in Gerontology*, 4(3), 193–196. <https://doi.org/10.1134/S2079057014030096>
- Vaiserman, A.M. (2014). Early-life nutritional programming of longevity. *Journal of developmental origins of health and disease*, 5(5), 325–338. <https://doi.org/10.1017/S2040174414000294>
- Walker, R.F. (2011). Developmental theory of aging revisited: focus on causal and mechanistic links between development and senescence. *Rejuvenation research*, 14(4), 429–436. <https://doi.org/10.1089/rej.2011.1162>
- Welte, M. A., Tetrault, J. M., Dellavalle, R. P., & Lindquist, S. L. (1993). A New Method for Manipulating Transgenes – Engineering Heat Tolerance in a Complex, Multicellular Organism. *Current biology*, 3, 842–853. [https://doi.org/10.1016/0960-9822\(93\)90218-D](https://doi.org/10.1016/0960-9822(93)90218-D)
- Wheeler, J. C., V. King, & J. Tower, (1999). Sequence requirements for upregulated expression of *Drosophila hsp70* transgenes during aging. *Neurobiology of aging*, 20, 545–553. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)00088-3](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00088-3)
- Xiao, C., Hull, D., Qiu, S., Yeung, J., Zheng, J., Barwell, T., Robertson, R.M., & Seroude, L. (2019). Expression of Heat Shock Protein 70 Is Insufficient To Extend *Drosophila melanogaster* Longevity. *G3: genes – genomes – genetics*, 9(12), 4197–4207. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400782>
- Yamamoto, R., Palmer, M., Koski, H., Curtis-Joseph, N., & Tatar, M. (2021). Aging modulated by the *Drosophila* insulin receptor through distinct structure-defined mechanisms. *Genetics*, 217(2), iyaa037. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyaa037>

References

- Alic, N., Giannakou, M.E., Papatheodorou, I., Hoddinott, M.P., Andrews, T.D., Bolukbasi, E., & Partridge, L. (2014). Interplay of *dFOXO* and Two ETS-Family Transcription Factors Determines Lifespan in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 10(9), e1004619. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004619>
- Altintas, O., Park, S., & Lee, S.J. (2016). The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB reports*, 49(2), 81–92. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2016.49.2.261>
- Ayar, A., Uysal, H., Altun, D., & Aşkin, H. (2019). The Effects of Heat Shock on the Longevity in Some Strains of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Applied Biological Sciences*, 6(1), 45–49.
- Banerjee, K.K., Ayyub, C., Sengupta, S., & Kolthur-Seetharam, U. (2012). *dSir2* deficiency in the fatbody, but not muscles, affects systemic insulin signaling, fat mobilization and starvation survival in flies. *Aging (Albany NY)*, 4(3), 206–223. <https://doi.org/10.18632/aging.100435>

- Bateson, P. (2015). Why are individuals so different from each other? *Heredity (Edinburgh)*, 115(4), 285–292. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.103>
- Burnett, C., Valentini, S., Cabreiro, F., Goss, M., Somogyvári, M., Piper, M.D., Hoddinott, M., Sutphin, G.L., Leko, V., McElwee, J.J., Vazquez-Manrique, R.P., Orfila, A.M., Ackerman, D., Au, C., Vinti, G., Riessen, M., Howard, K., Neri, C., Bedalov, A., Kaeblerlein, M., Soti, C., Partridge, L., & Gems, D. (2011). Absence of effects of *Sir2* overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature*, 477(7365), 482–5. <https://doi.org/10.1038/nature10296>
- Chandegra, B., Tang, J.L.Y., Chi, H., & Alic, N. (2017). Sexually dimorphic effects of dietary sugar on lifespan, feeding and starvation resistance in *Drosophila*. *Aging (Albany NY)*, 9(12), 2521–2528. <https://doi.org/10.18632/aging.101335>
- Chattopadhyay, D., Chitnis, A., Talekar, A., Mulay, P., Makkar, M., James, J., & Thirumurugan, K. (2017). Hormetic efficacy of rutin to promote longevity in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, 18(3), 397–411. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9700-1>
- Chauhan, V., Anis, A., & Chauhan, A. (2021). Effects of starvation on the levels of triglycerides, diacylglycerol, and activity of lipase in male and female *Drosophila melanogaster*. *Journal of Lipids*, 2021, 5583114. <https://doi.org/10.1155/2021/5583114>
- de Magalhães, J.P. (2012). Programmatic features of aging originating in development: aging mechanisms beyond molecular damage? *Federation of American Societies for Experimental Biology journal*, 26(12), 4821–4826. <https://doi.org/10.1096/fj.12-210872>
- Demontis, F., & Perrimon, N. (2010). FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell*, 143(5), 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.007>
- Donovan, M.R., & Marr, M.T. (2016). *dFOXO* Activates Large and Small Heat Shock Protein Genes in Response to Oxidative Stress to Maintain Proteostasis in *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry*, 291(36), 19042–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.723049>
- Dutriaux, A., Godart, A., Brachet, A., & Silber, J. (2013). The Insulin Receptor Is Required for the Development of the *Drosophila* Peripheral Nervous System. *PLoS ONE*, 8(9), e71857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071857>
- Eijkelenboom, A., & Burgering, B.M. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(2), 83–97. <https://doi.org/10.1038/nrm3507>
- Eleftherianos, I., & Castillo, J.C. (2012). Molecular Mechanisms of Aging and Immune System Regulation in *Drosophila*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 9826–9844. <https://doi.org/10.3390/ijms13089826>
- Feder, J. H., Rossi, J. M., Solomon, J., Solomon, N., & Lindquist, S. (1992). The Consequences of Expressing *Hsp70* in *Drosophila* Cells at Normal Temperatures. *Genes & Development*, 6, 1402–1413. <https://doi.org/10.1101/gad.6.8.1402>
- Frankel, S., Ziafazel, T., & Rogina, B. (2011). *dSir2* and longevity in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, 46(5), 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.08.007>
- Ganger, M.T., Dietz, G.D. & Ewing, S.J. (2017). A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 534. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1949-5>
- Giannakou, M.E., Goss, M., Jünger, M.A., Hafen, E., Leevers, S.J., & Partridge, L. (2004). Long-lived *Drosophila* with overexpressed *dFOXO* in adult fat body. *Science*, 305(5682), 361. <https://doi.org/10.1126/science.1098219>
- Gong, W. J., & Golic, K. G. (2006) Loss of *Hsp70* in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics* 172: 275–286. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.048793>
- Griswold, A.J., Chang, K.T., Runko, A.P., Knight, M.A., & Min, K.T. (2008). *Sir2* mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(25), 8673–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803837105>
- Hochberg, Z., Feil, R., Constanica, M., Fraga, M., Junien, C., Carel, J.C., Boileau, P., Le Bouc, Y., Deal, C.L., Lillycrop, K., Scharfmann, R., Sheppard, A., Skinner, M., Szyf, M., Waterland, R.A., Waxman, D.J., Whitelaw, E., Ong, K., & Albertsson-Wikland, K. (2011). Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocrine reviews*, 32(2), 159–224. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0039>
- Hwangbo, D.S., Gershman, B., Tu, M.P., Palmer, M., & Tatar, M. (2004). *Drosophila dFOXO* controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*, 429(6991), 562–566. <https://doi.org/10.1038/nature02549>
- Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., & Benzer, S. (2004). Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current biology*, 14(10), 885–890. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.059>
- Karaman H.S., Vaiserman A.M., Pisaruk A.V., Koshel N.M., Mekhova L.V., & Kozeretska I.A. (2018) Influence of the temperature during the larval stage of development on lifespan in *Drosophila melanogaster*. Factors in experimental evolution of organisms, 22, 51–55 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.923>
- Karpac, J., Biteau, B., & Jasper, H. (2013). Misregulation of an adaptive metabolic response contributes to the age-related disruption of lipid homeostasis in *Drosophila*. *Cell reports*, 4(6), 1250–1261. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.004>
- Khazaeli, A. A., Tatar, M., Pletcher, S. D., & Curtsinger, J. W. (1997). Heat-induced longevity extension in *Drosophila*. I. Heat treatment, mortality, and thermotolerance. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 52, B48–B52. <https://doi.org/10.1093/gerona/52A.1.B48>
- Lin, Y.C., Zhang, M., Chang, Y.J., & Kuo, T.H. (2023). Comparisons of lifespan and stress resistance between sexes in *Drosophila melanogaster*. *Heliyon*, 9(8), 18178. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18178>
- Lucas, A. (1998). Programming by early nutrition: An experimental approach. *The Journal of nutrition*, 128(2), 401–406. <https://doi.org/10.1093/jn/128.2.401S>
- Lushchak, O.V., Karaman, H.S., Kozeretska, I.A., Koliada, A.K., Zabuga, O.G., Pisaruk, A.V., Koshel, N.M., Mechova, L.V., Inomistova, M.V., Khranovska, N.M., & Vaiserman, A.M. (2018). Larval crowding results in hormesis-like effects on longevity in *Drosophila*: timing of eclosion as a model. *Biogerontology*, 20(2), 191–201. <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9786-0>
- Motoń, M., Dampc, J., Kula-Maximenko, M., Zebrowski, J., Motoń, A., Dobler, R., Durak, R., & Skoczowski, A. (2020). Effects of temperature on lifespan of *Drosophila melanogaster* from different genetic backgrounds: Links between metabolic rate and longevity. *Insects*, 11(8), 470. <https://doi.org/10.3390/insects11080470>
- Monaghan, P., & Haussmann, M.F. (2015). The positive and negative consequences of stressors during early life. *Early human development*, 91(11), 643–647. <https://doi.org/10.1016/j.earhumdev.2015.08.008>
- Niveditha, S., Deepashree, S., Ramesh, S.R., & Shivanandappa, T. (2017). Sex differences in oxidative stress resistance in relation to longevity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of comparative physiology*, 187(7), 899–909. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1061-1>
- Oldham, S., Montagne, J., Radimerski, T., Thomas, G., & Hafen, E. (2000). Genetic and biochemical characterization of *dTOR*, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes & development*, 14(21), 2689–94. <https://doi.org/10.1101/gad.845700>
- Pomatto, L.C.D., Tower, J., & Davies, K.J.A. (2017). Sexual Dimorphism and Aging Differentially Regulate Adaptive Homeostasis. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 73(2), 141–149. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx083>
- Projecto-Garcia, J., Biddle, J.F., & Ragsdale, E.J. (2017). Decoding the architecture and origins of mechanisms for developmental polyphenism. *Current opinion in genetics & development*, 47, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.07.015>
- Rogina, B. (2011). For the special issue: aging studies in *Drosophila melanogaster*. *Experimental gerontology*, 46(5), 317–319. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.09.001>
- Rogina, B., & Helfand, S.L. (2004). *Sir2* mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 15998–6003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404184101>
- Sarup, P., Sørensen, P., & Loeschcke, V. (2014). The long-term effects of a life-prolonging heat treatment on the *Drosophila melanogaster* transcriptome suggest that heat shock proteins extend lifespan. *Experimental gerontology*, 50, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.017>
- Slack, C., Giannakou, M.E., Foley, A., Goss, M., & Partridge, L. (2011). *dFOXO*-independent effects of reduced insulin-like signaling in *Drosophila*. *Aging Cell*, 10(5), 735–748. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00707.x>
- Tatar, M. (2021). Aging Regulated Through a Stability Model of Insulin/Insulin Growth Factor Receptor Function. *Frontiers in endocrinology*, 12, 649880. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.649880>
- Tatar, M., Khazaeli, A. A., & Curtsinger, J. W. (1997). Chaperoning extended life. *Nature*, 390(6655), 30. <https://doi.org/10.1038/36237>
- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., & Garofalo, R.S. (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*, 292(5514), 107–110. <https://doi.org/10.1126/science.1057987>
- Vaiserman, A. (2015). Epidemiologic evidence for association between adverse environmental exposures in early life and epigenetic variation: a potential link to disease susceptibility? *Clinical epigenetics*, 7(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0130-0>
- Vaiserman, A., Koliada, A., & Lushchak, O. (2018). Developmental programming of aging trajectory. *Ageing research reviews*, 47, 105–122. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.07.007>
- Vaiserman, A., Koliada, A., & Zabuga, O. (2014) Effect of dietary restriction during development on the level of expression of longevity-associated genes in *Drosophila melanogaster*. *Advances in Gerontology*, 4(3), 193–196. <https://doi.org/10.1134/S2079057014030096>

Vaiserman, A.M. (2014). Early-life nutritional programming of longevity. *Journal of developmental origins of health and disease*, 5(5), 325–338. <https://doi.org/10.1017/S2040174414000294>

Walker, R.F. (2011). Developmental theory of aging revisited: focus on causal and mechanistic links between development and senescence. *Rejuvenation research*, 14(4), 429–436. <https://doi.org/10.1089/rej.2011.1162>

Welte, M. A., Tetrault, J. M., Dellavalle, R. P., & Lindquist, S. L. (1993). A New Method for Manipulating Transgenes – Engineering Heat Tolerance in a Complex, Multicellular Organism. *Current biology*, 3, 842–853. [https://doi.org/10.1016/0960-9822\(93\)90218-D](https://doi.org/10.1016/0960-9822(93)90218-D)

Wheeler, J. C., V. King, & J. Tower, (1999). Sequence requirements for upregulated expression of *Drosophila hsp70* transgenes during aging. *Neurobiology of aging*, 20, 545–553. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)00088-3](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00088-3)

Xiao, C., Hull, D., Qiu, S., Yeung, J., Zheng, J., Barwell, T., Robertson, R.M., & Seroude, L. (2019). Expression of Heat Shock Protein 70 Is Insufficient to Extend *Drosophila melanogaster* Longevity. *G3: genes – genomes – genetics*, 9(12), 4197–4207. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400782>

Yamamoto, R., Palmer, M., Koski, H., Curtis-Joseph, N., & Tatar, M. (2021). Aging modulated by the *Drosophila* insulin receptor through distinct structure-defined mechanisms. *Genetics*, 217(2), iyaa037. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyaa037>

Отримано редакцією журналу / Received: 07.02.24
Прорецензовано / Revised: 07.03.24
Схвалено до друку / Accepted: 07.03.24

Hanna KARAMAN¹, PhD Student
ORCID ID: 0000-0002-3802-0512
e-mail: hanna.karaman90@gmail.com

Alexander VAISERMAN², DSc (Med.), Prof.
ORCID ID: 0000-0003-0597-0439
e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua

Katerina AFANASIEVA¹, DSc (Biol.)
ORCID ID: 0000-0002-1349-2767
e-mail: aphon@ukr.net

Andrei SIVOLOB¹, DSc (Biol.), Prof.
ORCID ID: 0000-0002-7306-0763
e-mail: asivolob@gmail.com

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

²Dmitry F. Chebotarev Institute of Gerontology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

IMPACT OF THE TEMPERATURE ON LARVAL STAGE OF DEVELOPMENT ON THE EXPRESSION LEVELS OF *HSP70*, *INR*, *SIRT1*, *MTOR* AND *FOXO* GENES IN MALES AND FEMALES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Background. Despite the progress in understanding the phenomenon of aging, the key factors that influence this process remain poorly understood. Aging is a genetically programmed set of events, leading to structural and functional changes that reduce the life expectancy of an organism. The relevance of the study is to expand the understanding of the impact of environmental factors, in particular temperature, on the early stages of development on the life expectancy of imago, using *Drosophila melanogaster* as a model. The aim was to determine and analyze the expression level of genes associated with lifespan in *D. melanogaster* – *Hsp70*, *InR*, *Sirt1*, *mTor* and *foxo* – in flies reared at different temperatures of the larval stage of development.

Methods. The larvae were kept at different temperatures, after which the gene expression level was determined by RT-qPCR in adult flies. The relative expression level was calculated by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The data were analyzed using ANOVA-test followed by a pairwise multiple comparison post-hoc Tukey HSD test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results. The temperature of the larval stage of development did not significantly affect the gene expression of male adults. At the same time in females imago a significant increase in the expression of *Hsp70*, *InR*, *Sirt1* and *mTor* genes was observed in individuals with larval development took at 20°C and 30°C, compared to the control at 25°C.

Conclusions. The increased expression levels of the genes chosen for analysis under the critical temperature conditions indicates the induction of a generalized stress response that did not correlate with an increased life expectancy. The finding of sex differences in gene expression patterns requires further investigation to uncover the molecular mechanisms underlying it.

Keywords: life span, *Drosophila melanogaster*, larval stage of development, temperature, expression.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; у рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.