

На правах рукописи



ДОБРОВОЛЬСКАЯ
Евгения Владимировна

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ (ГИПЕРТЕРМИИ, ГОЛОДАНИЯ,
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА) НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *DROSOPHILA*
MELANOGASTER СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ**

03.02.08 – экология (биология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Сыктывкар 2017

Работа выполнена в лаборатории молекулярной радиобиологии и геронтологии отдела радиозкологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Москалев Алексей Александрович
доктор биологических наук, чл.-корр. РАН,
заведующий лабораторией молекулярной
радиобиологии и геронтологии ФГБУН
Института биологии Коми НЦ УрО РАН

Официальные оппоненты:

Илюха Виктор Александрович,
доктор биологических наук, врио директора
ФГБУН Института биологии КарНЦ РАН,
г. Петрозаводск

Мыльников Сергей Владимирович,
кандидат биологических наук, доцент кафедры
генетики и биотехнологии ФГБОУ ВПО Санкт-
Петербургского государственного университета,
г. Санкт-Петербург

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биохимии и
генетики Уфимского научного центра РАН,
г. Уфа

Защита диссертации состоится «19» апреля 2017 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН по адресу: 167982, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Коммунистическая, 28

Факс: 8(8212) 24-01-63, e-mail: dissovet@ib.komisc.ru

Сайт института: www.ib.komisc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Коми научного центра Уральского отделения РАН по адресу: 167982, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 24.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,

доктор биологических наук



Алевтина Григорьевна Кудяшева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одной из основных задач факториальной экологии является изучение воздействия факторов окружающей среды на живые организмы и механизмов адаптации к ним (Васильев, 1988).

Известно, что систематическое нарушение светового режима ухудшает способность организма к стресс-ответу и приводит к снижению продолжительности жизни у экспериментальных животных (Световой режим, старение..., 2012; Беньковская, Мустафина, 2012; Москалев и др., 2006; Majercak, 2002; Circadian disruption induced..., 2009; Environmental 24-hr Cycles..., 2016). Было обнаружено, что искусственное увеличение длины светового дня или интенсивности света вызывает нарушение циклов сна и бодрствования, вызывает желудочно-кишечные и сердечно-сосудистые заболевания, нарушения обмена веществ и репродуктивной системы, увеличивает риск развития онкологических заболеваний (Световое загрязнение, десинхроноз..., 2014; Melatonin as antioxidant, geroprotector ..., 2006).

Периодичность освещения, соотношение длительности дня и ночи играют важную роль в регулировании биологических часов (Конев, Волотовский, 1979). Циркадные ритмы – это универсальная сложноорганизованная система, которая является интегрирующим фактором, синхронизирующим физиологические и биохимические процессы, обеспечивая адаптацию организма к постоянно меняющимся условиям окружающей среды (Antoch, 2008). Циркадные ритмы наблюдаются на всех уровнях организации живой материи.

Эндогенные и экзогенные факторы могут приводить к большому количеству повреждений, следствием чего является десинхронизации циркадных ритмов (Phase resetting of ..., 2008). Поэтому знание механизмов функционирования системы циркадных ритмов может служить важной основой для теоретических обобщений в области факториальной экологии и прогнозирования устойчивости организмов и популяций в экстремальных условиях природной среды.

Также показано, что существует взаимосвязь между обменом веществ и работой генов циркадных ритмов (Peripheral circadian clocks ..., 2016). Существует точка зрения, согласно которой влияние на здоровье и длительность жизни ограничительной диеты во многом определяется ее благоприятным влиянием на амплитуду экспрессии циркадных генов в периферических тканях (Longo, Panda, 2016).

Данные о влиянии нарушения работы циркадных часов на продолжительность и качество жизни актуальны для жителей северных широт, где наряду с другими неблагоприятными факторами (перепады температуры, давления, нерегулярно меняющаяся геомагнитная активность) имеют место длительные периоды «полярных» дней и ночей.

Ранее установлено, что экспрессия некоторых ключевых генов циркадных ритмов изменяется при старении (Rakshit et al., 2013). Мы предположили, что индукция экспрессии генов циркадных ритмов (*cryptochrome*, *period*, *Clock*, *cycle*, *timeless*) на фоне ограничительной диеты у особей *Drosophila melanogaster* компенсирует возраст-зависимое снижение активности исследуемых генов и повысит устойчивость к стресс-факторам. Для проверки этой гипотезы экспрессию циркадных генов индуцировали в нервной системе, мышцах и жировом теле дрозофилы.

Наличие полной информации о геноме и обширная коллекция лабораторных линий с различными генетическими модификациями, простота содержания и короткий жизненный

цикл делает плодую мушку *Drosophila melanogaster* удобным модельным объектом для изучения механизмов стрессоустойчивости и регуляции продолжительности жизни.

Цель и задачи исследования. Цель исследования заключалась в изучении устойчивости *Drosophila melanogaster* к разным факторам окружающей среды (гипертермия, голодание, действие прооксидантов) при сверхэкспрессии генов циркадных ритмов (*cryptochrome*, *period*, *Clock*, *cycle*, *timeless*). Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) исследовать продолжительность жизни и устойчивость к голоданию особей *Drosophila melanogaster* с мутацией гена *cryptochrome*;
- 2) изучить возраст-зависимую динамику экспрессии генов циркадных ритмов (*cryptochrome*, *period*, *Clock*, *cycle*, *timeless*) у особей линии w^{1118} ;
- 3) выявить действие сверхэкспрессии генов циркадных ритмов (*cryptochrome*, *period*, *Clock*, *cycle*, *timeless*) в нервной системе *Drosophila melanogaster* на продолжительность жизни, устойчивость к действию прооксиданта параквата, гипертермии и голоданию;
- 4) оценить влияние сверхэкспрессии генов циркадных ритмов (*cryptochrome*, *period*, *Clock*, *cycle*, *timeless*) в мышцах и жировом теле *Drosophila melanogaster* на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты.

Научная новизна. Впервые в комплексных экспериментах *in vivo* доказана роль ключевых генов циркадных ритмов (*cryptochrome*, *period*, *Clock*, *cycle*, *timeless*) в обеспечении устойчивости организма к стресс-факторам различной природы – действию прооксиданта параквата, гипертермии, голоданию. Впервые показано, что мутация в гене регулятора циркадных ритмов *cryptochrome* у дрозофил вызывает уменьшение продолжительности жизни. Установлено, что при кондиционной сверхэкспрессии исследуемых генов в мышцах и жировом теле дрозофилы ограничительная диета смягчает ее отрицательные эффекты на продолжительность жизни, связанные с нарушением работы генов регуляции циркадных ритмов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования раскрывают роль механизмов работы генов циркадных ритмов в ответе организма *Drosophila melanogaster* на действие индуктора свободных радикалов параквата, тепловой стресс и голодание. С помощью демографических методов анализа изучена связь между отдельными клеточными процессами и изменением параметров жизнедеятельности организма (продолжительность жизни, стрессоустойчивость). Результаты исследований могут быть учтены при разработке рекомендаций по снижению негативных последствий для здоровья населения светового загрязнения в крупных населенных пунктах, а также «полярного дня» и «полярной ночи» в условиях Крайнего Севера. Наличие ортологов исследуемых генов в геноме млекопитающих и 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 у человека.

Положения, выносимые на защиту.

- 1) Мутация гена *cryptochrome* принимает участие в обеспечении устойчивости *Drosophila melanogaster* к голоданию и регуляции продолжительности жизни.
- 2) Сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в нервной системе влияет на продолжительность жизни и устойчивость к различным видам стресса.
- 3) Ограничительная диета уменьшает выраженность негативного влияния нарушения работы генов циркадных ритмов на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*.

Личный вклад автора. Соискатель лично принимал участие в постановке и решении задач исследования, в сборе экспериментальных данных, самостоятельно провел статистическую

обработку, анализ данных, обобщение результатов. В совместных публикациях вклад соискателя – 70 %.

Апробация диссертации. Результаты работы докладывались на международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2014, 2015), на международной конференции «Генетика старения и долголетия» (Сочи, 2014), на VI съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров и ассоциированных генетических симпозиумах (Ростов-на-Дону, 2014), на XXII всероссийской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2015, 2016), на IV международной конференции имени Н.В. Тимофеева-Рессовского «Современные проблемы генетики, радиобиологии и эволюции» (Санкт-Петербург, 2015), на международной конференции «Биомедицинские инновации для здорового долголетия», (Санкт-Петербург, 2016).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 21 работа, в том числе пять статей в рецензируемых журналах из списка изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 273 источника публикаций, в том числе 237 публикаций из зарубежных изданий. Работа изложена на 137 страницах машинописного текста и содержит 12 таблиц и 22 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе рассмотрены данные литературы об основных механизмах влияния экологических факторов (холодовой и тепловой шок, действие прооксидантов, голодание, ионизирующее излучение) на продолжительность жизни и старение организма. Обсуждаются эффекты продления жизни на фоне ограничительной диеты. Особое внимание уделяется роли генов циркадных ритмов в механизмах старения и их вкладу в регуляцию продолжительности жизни организма и стрессоустойчивость.

Глава 2. Материалы и методы

Линии *Drosophila melanogaster*. Для проведения экспериментов использовали следующие лабораторные линии *Drosophila melanogaster*: линию w^{1118} , линии с мутацией гена *cryptochrome*: cry^{01} (генотип $w; cry01/+$), cry^{02} ($w; cry02/+$) - предоставлены доктором Я. Гебультович, университет Орегона, США; линии дрозофил, в геном которых встроены дополнительные копии исследуемых генов по контролю промотора UAS: $cry12$ (генотип $y, w; UAS-cry12/TM2$), $cry24$ ($y, w; UAS-cry24/CyO$), $per10$ ($w; UAS-per10$), $per2.4$ ($w; UAS-per2.4$), cyc ($w; P\{UAS-CYC.HA\}$), Clk ($w; P\{UAS-Clk.HA\}$) предоставлены доктором П. Эмери (Университет Массачусетса, США); 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 *w¹¹¹⁸*; *P{w[+mW.hs]=Switch1}106*) получена из Bloomington Stock Center (США).

Дрозофил содержали в термостате при 25 °C и 12-часовом режиме освещения на стандартной агарно-дрожжевой питательной среде (Ashburner, 1989).

Сверхактивация генов циркадных ритмов. Для сверхактивации генов регуляции циркадных ритмов использовали GAL4/UAS метод (Brand, Perrimon, 1993), в котором применен RU486-активируемый GeneSwitch (A conditional..., 2001; P [Switch]..., 2001).

Анализ 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.

Оценка стрессоустойчивости. Для определения устойчивости к действию прооксиданта дрозофил рассаживали в пробирки с фильтровальной бумагой, пропитанной раствором 20 мМ параквата (Methyl Viologen, Sigma) в 5 % сахарозе. Анализ проводили при температуре 25 °C и 60% влажности. Для оценки устойчивости к высоким температурам мух содержали на стандартной питательной среде при температуре 35 °C и 60% влажности. Для определения устойчивости к голоданию дрозофил помещали в пробирки с 1% агаром, содержали при температуре 25 °C и 60% влажности. Два раза в день подсчитывали количество умерших особей. Эксперимент проводили до гибели последней дрозофилы.

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*). На каждый вариант эксперимента отбирали 150 особей по 30 штук на пробирку, между измерениями мух содержали в стандартных условиях. На каждую точку эксперимента использовали по 15 самцов и 10 самок. Анализ экспрессии проводили на пятые, 35 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 кДНК по инструкции iScriptc DNA Synthesiskit (Bio-Rad). Реакционную смесь для проведения реакции ПЦР готовили по инструкции изготовителя iTaq Universal SYBRGreen Supermix (Bio-Rad) и праймеров (SYNTOL). Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad), используя следующую программу: 1) 95° C в течение 10 мин, 2) 95° C в течение 15 с, 3) 60° C в течение 60 с, 4) этапы 2-3 повторяли 50 раз.

Экспрессию исследуемых генов рассчитывали относительно экспрессии гена домашнего хозяйства *β-Tubulin* с использованием программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad).

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 Drosophila Activity Monitor (TriKinetics Inc., США). Двигательную активность самцов регистрировали в течение всей жизни. Для анализа и визуализации циркадной активности был использован программный пакет ActogramJ (Schmid et al., 2011), разработанный на основе программного обеспечения для анализа изображений ImageJ (Schneider et al., 2012).

Статистический анализ результатов

Для оценки статистической значимости различий по распределению смертности в выборках применили критерий Колмогорова-Смирнова (Fleming et al., 1980), для сравнения

различий по медианной продолжительности жизни – критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона (Breslow, 1970). Достоверность различий по максимальной продолжительности жизни (возрасту 90% смертности) оценивали с помощью метода Ванг-Аллисона (Statistical methods..., 2004). Для сравнения доли умерших особей спустя 24, 48 или 144 ч использовали ϕ -критерий Фишера для выборочных долей (Fisher, 1915). Достоверность различий между значениями относительной экспрессии генов оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни для независимых выборок (Mann, 1947), корреляционную зависимость – по критерию Пирсона, предполагаемый риск смертности особи – с помощью регрессии Кокса. Анализ данных выполняли в статистических пакетах Statistica 8.0 (StatSoft), R 3.0.1 (RCoreTeam).

Глава 3. Результаты

3.1. Влияние мутации гена *cryptochrome* на продолжительность жизни и устойчивость к голоданию особей *Drosophila melanogaster*

Изучали влияние мутации гена *cry* на продолжительность жизни (ПЖ) и устойчивость к голоданию дрозофилы. Медианная ПЖ у самцов снижена на 18.2 – 24 % (различия достоверны при $p < 0.001$ по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). У самок достоверных изменений не обнаружено. Кроме того, произошло уменьшение показателя максимальной ПЖ – возраста 90 % смертности у самцов на 10 – 19 % и на 6.4 % у самок (различия достоверны при $p < 0.001$ по критерию Ванг-Аллисона) (табл. 1).

Обнаружено, что у дрозофилы с мутацией гена *cry* по сравнению с особями исходной линии w^{1118} спустя 72 ч голодания количество выживших особей у мутантных самцов уменьшилось на 35 % (различия достоверны при $p < 0.001$ по ϕ -критерию Фишера), у самок на 33 % ($p < 0.001$) по сравнению с особями исходной линии (табл. 1). Анализ других показателей выживаемости показал аналогичный результат.

Таблица 1

Влияние мутации гена *cry* на продолжительность жизни и устойчивость к голоданию особей *Drosophila melanogaster*

Вариант	Продолжительность жизни						Голодание			
	Min	$\bar{X} \pm \Delta m$	M	90%	Max	N	24 ч	48 ч	72 ч	N
♂♂ w^{1118}	20	68.7 $\pm$ 0.8	72	77	81	175	100	99	37	175
♂♂ Cry^{01}	7	55.4 $\pm$ 0.9	57*	62*	76	123	100	72*	1,4*	195
♂♂ Cry^{02}	40	58.1 $\pm$ 0.9	60*	69*	73	95	98	68*	4,5*	172
♀♀ w^{1118}	11	68.7 $\pm$ 0.8	72	78	81	147	100	100	83.3*	123
♀♀ Cry^{01}	7	69.5 $\pm$ 1.1	74**	83**	86	172	100	88	53*	147
♀♀ Cry^{02}	7	69.1 $\pm$ 0.7	73	78	82	148	100	94**	52.5*	148

Обозначения: здесь и далее ♂♂ – самцы; ♀♀ – самки; M – медианная продолжительность жизни (сут); $\bar{X} \pm \Delta m$ – средняя продолжительность жизни (сут) и ошибка средней; 90 % – возраст 90 % смертности (сут); min – минимальная продолжительность жизни (сут); max – максимальная продолжительность жизни (сут); N – количество особей в выборке; 24, 48 ч и 72 ч – процент выживших особей через 24, 48 и 72 ч после начала воздействия; * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ (M – по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; 90% – по критерию Ванг-Аллисона, 24, 48, 72 ч – ϕ -критерий Фишера).

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

Оценивали изменение экспрессии генов циркадных ритмов особей линии w^{1118} на пятые сутки после появления имаго, через 30 сут (соответствует началу вымирания особей линии дикого типа w^{1118} в экспериментальных условиях) и через 50 сут (соответствует возрасту 90 %

смертности). У самок и самцов линии дикого типа w^{1118} экспрессия генов циркадных ритмов существенно не отличалась. У взрослых особей (50 сут) наблюдали снижение экспрессии генов циркадных ритмов по сравнению с мухами среднего возраста (30 сут). Исключением является ген *Clk* у самцов и *cus* у самок, активность которых достоверно не изменяется на протяжении всей жизни. У самцов спустя 30 сут после вылета имаго наблюдали увеличение экспрессии генов *per*, *cus* и *tim* в 1.5 – 3 раза, однако в возрасте 50 сут экспрессия этих генов вновь уменьшилась. У самок активность гена *cry* снижается уже на 30 сут. Таким образом, мы отмечаем снижение уровня экспрессии большинства генов циркадных ритмов у старых дрозофил.

3.3 Возрастная динамика циркадной активности самцов *Drosophila melanogaster*

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 с возрастом выражены сильнее по сравнению с контрольными особями. Сверхэкспрессия генов циркадных ритмов приводила к замедлению возраст-зависимых изменений суточных осцилляций показателя локомоторной активности (рис. 1).

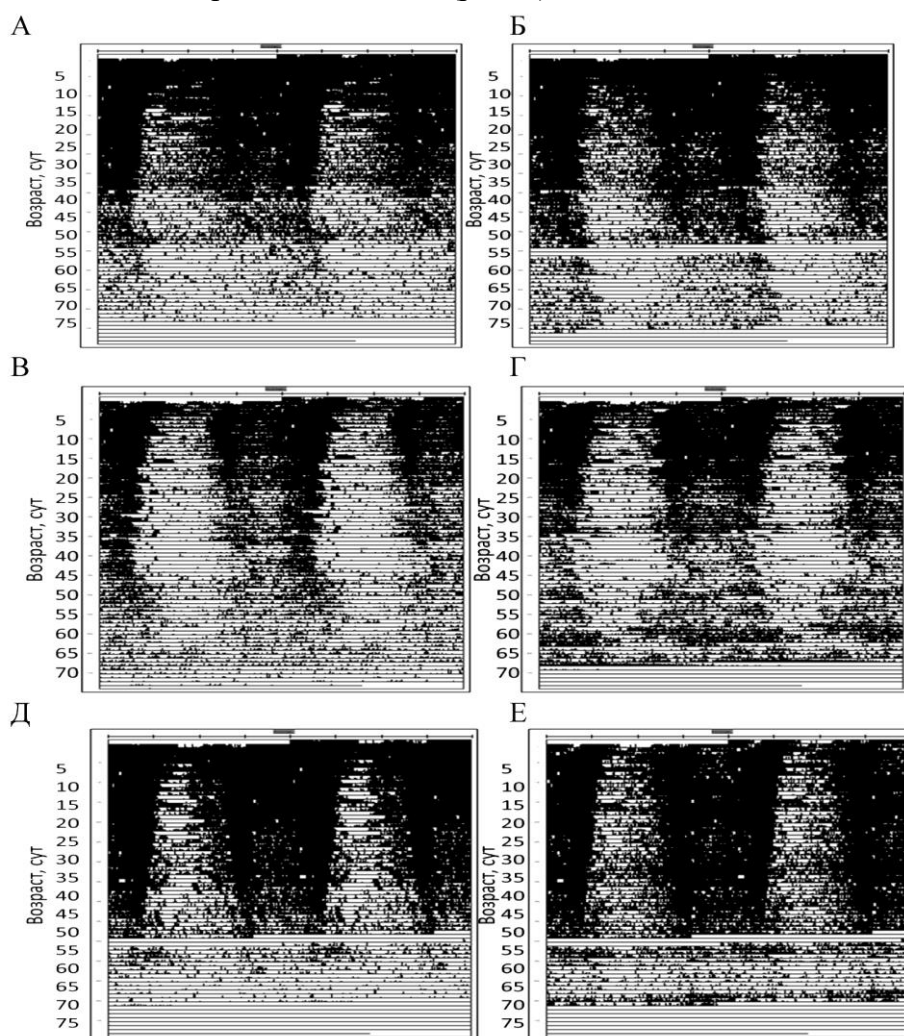
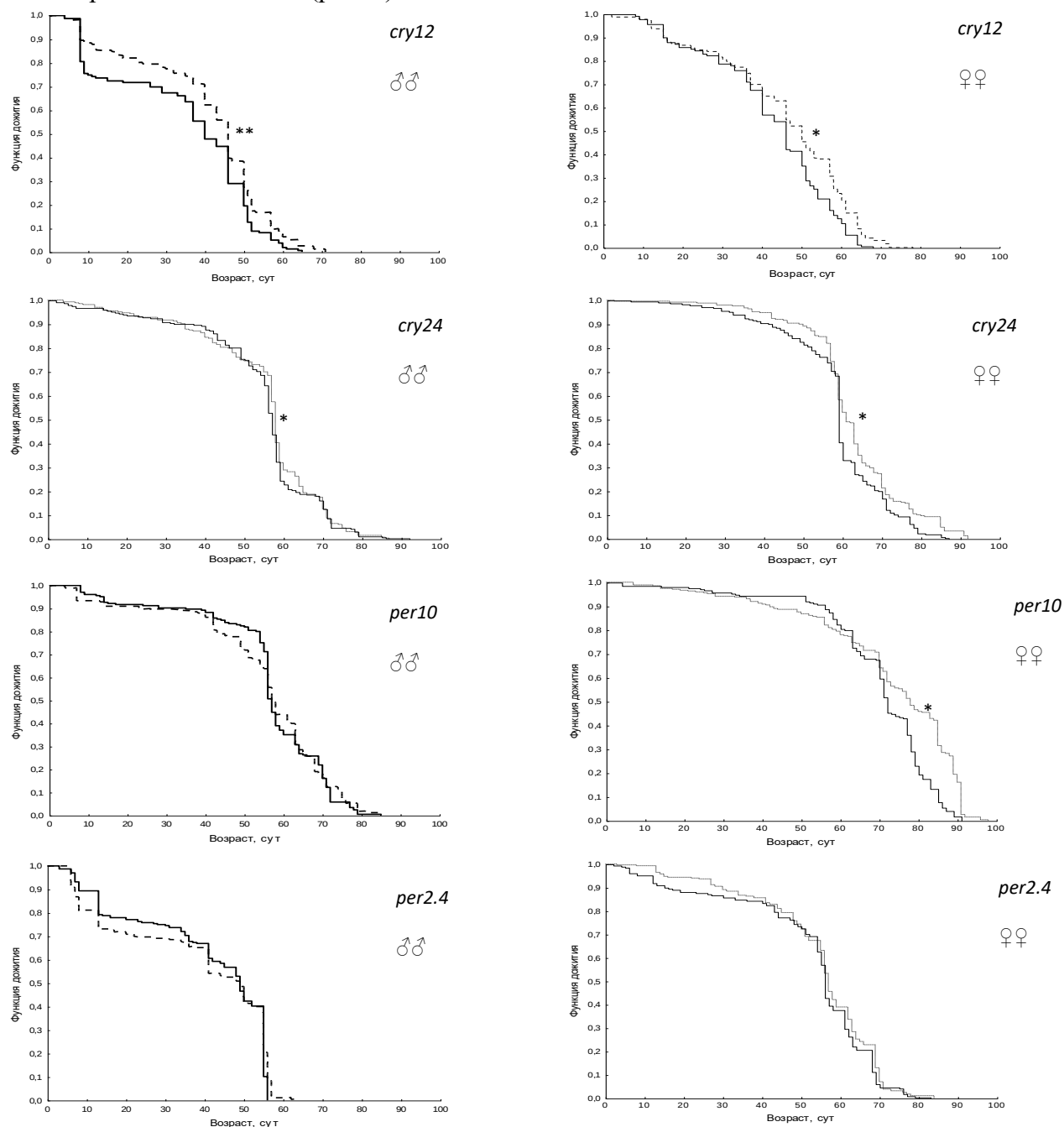


Рис. 1. Возрастная динамика суточной активности самцов без сверхэкспрессии (А, В, Д) и со сверхэкспрессией (Б, Г, Е) генов *cry* (А, Б), *per* (В, Г), *Clk* (Д, Е). Примечание: белые участки на рисунке означают покой особи (без движения), черные участки – период бодрствования и количество движений мух.

3.4. Влияние сверхэкспрессии генов циркадных в нервной системе на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*

Кондиционная сверхэкспрессия генов *cry* и *suc* в нервной системе у самцов и самок и гены *Clk*, *cry24* и *per10* у самок увеличила медианную продолжительность жизни на 3.4 – 15% (различия достоверны при $p < 0.001$ по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). Однако, продолжительность жизни у самок со сверхактивацией гена *Clk* уменьшилась на 9.4% ($p < 0.001$). В остальных вариантах эксперимента медианная продолжительность жизни достоверно не изменилась (рис. 2).



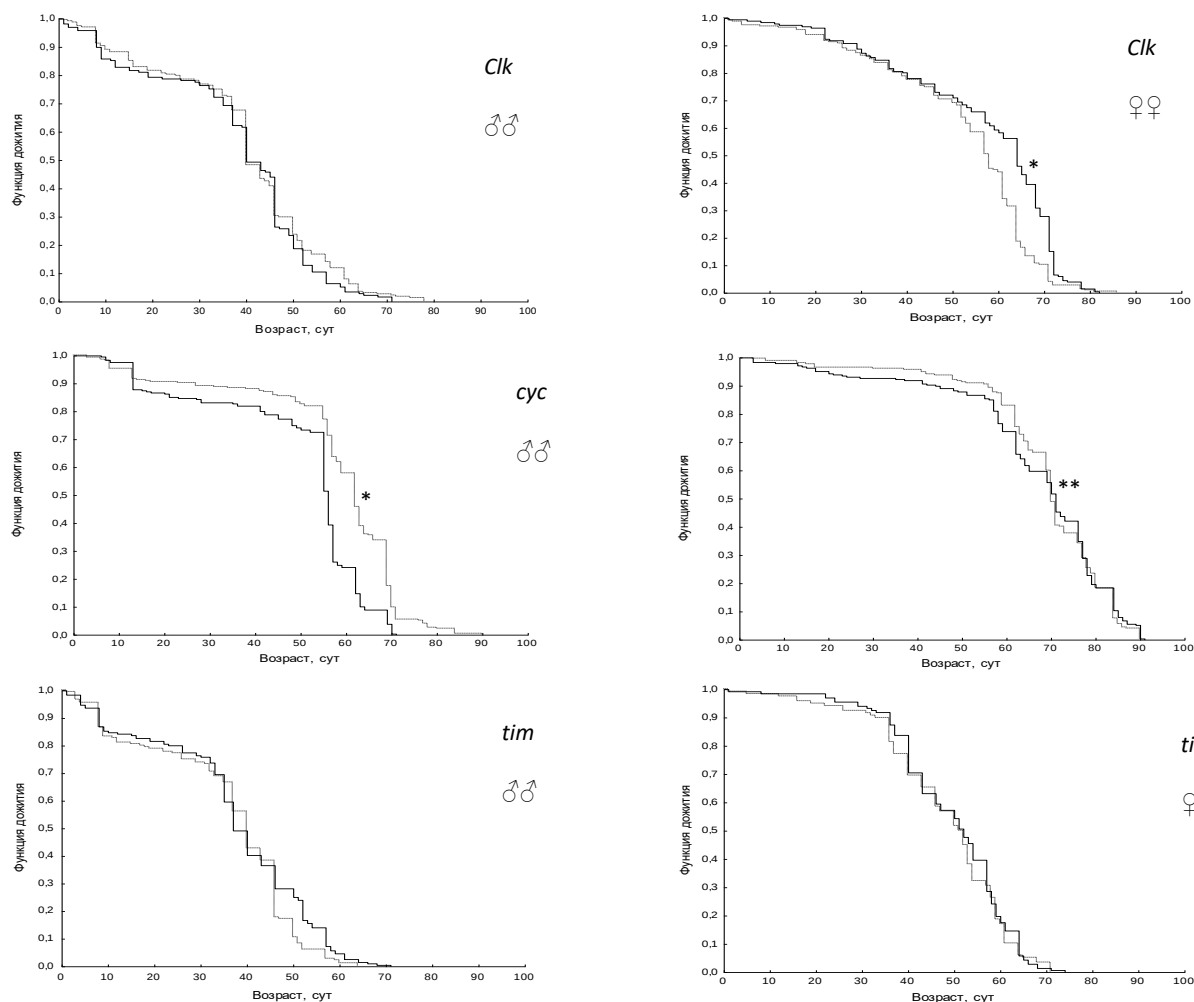


Рис. 2. Влияние кондиционной сверхэкспрессии генов регуляции циркадных ритмов в нервной системе на продолжительность жизни.

Обозначения: ♂♂ – самцы; ♀♀ – самки; — без сверхэкспрессии, --- сверхэкспрессия; * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ (по критерию Колмогорова-Смирнова).

3.5. Влияние сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в нервной системе на устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к действию стресс-факторов (оксидативному стрессу, гипертермии, голоданию)

Анализ экспрессии исследуемых генов показал увеличение в 1.3-2.5 раза у самцов и 1.7-1.9 раз у самок.

У самцов кондиционная сверхактивация генов *cry*, *Clk*, *per*, *cus* в нервной системе вызвала достоверное увеличение устойчивости к гипертермии (35 °C). Спустя 144 ч процент выживших особей увеличился на 8 – 27 % ($p < 0.01$) по сравнению с самцами без сверхэкспрессии (табл. 2). У самок сверхактивация генов *cry*, *per*, *cus* привела к снижению процента выживших особей к 144 ч на 17 – 34 % ($p < 0.001$).

В большинстве случаев сверхэкспрессия генов циркадных ритмов привела к увеличению количества выживших после первых сут в условиях действия индуктора свободных радикалов параквата у самцов на 8 – 41 % ($p < 0.01$), у самок на 17 – 46 % ($p < 0.001$). Исключением является ген *cus*, сверхактивация которого у самцов и у самок вызвала снижение устойчивости дрозофилы в условиях действия прооксиданта (табл. 2).

Сверхактивация генов *per* и *tim* у самцов снизила устойчивость к голоданию. Число выживших особей после двух сут уменьшилось на 19 – 35% ($p < 0.01$) по сравнению с контрольными особями. Однако повышенная активность генов *cry*, *cus* и *Clk* увеличила

количество выживших на 10 – 13% ($p < 0.01$). У самок активация генов *Clk*, *per* и *tim* снизила число выживших после двух сут на 13 – 43 % ($p < 0.001$) (табл. 2).

Таблица 2

Влияние сверхэкспрессии генов циркадных ритмов (*cryptochrome*, *period*, *Clock*, *cycle*, *timeless*) на устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к действию прооксиданта, гипертермии и голоданию

Варианты эксперимента, линии мух с разными генотипами	Гипертермия			Действие прооксиданта параквата			Голодание		
	М	$\bar{X} \pm \Delta m$	144 ч	М	$\bar{X} \pm \Delta m$	24 ч	М	$\bar{X} \pm \Delta m$	48 ч
♂UAS-cry12/ELAV(-)	73	78.4±1.2	0	16	22.5±1	22	96	92.6±2.1	45
♂UAS-cry12/ELAV(+)	96**	106.9±3.2	8*	16	22.7±1	28	96	98.9±2	58**
♀UAS-cry12/ELAV(-)	96	92.6±2.1	3	16	17.8±0.4	8	46	41.9±1	18
♀UAS-cry12/ELAV(+)	96	98.9±2	6	22**	26.8±1.5	25*	46	41.5±1.3	22
♂UAS-cry24/ELAV(-)	195	182.6±3.6	93	22	26.9±1.8	40	195	180±2.2	42
♂UAS-cry24/ELAV(+)	195	174.5±3.6	82	54*	41.8±1.6	81*	144*	150±4.5	47
♀UAS-cry24/ELAV(-)	195	180.1±2.2	89	34	45.6±2.2	70	46	50.2±1.1	33
♀UAS-cry24/ELAV(+)	144	150.3±4.5	66**	29**	39.7±2.2	53	46	48.5±1.1	33
♂UAS-per10/ELAV (-)	176	150.9±7.3	67	54	51.6±1.9	92	195	180.9±3	67
♂UAS-per10/ELAV(+)	176	162.8±4.6	76**	54	45.5±1.7	85	195	168±4.2	48**
♀UAS-per10/ELAV(-)	195	180.9±3	91	34	32.6±1.8	58	46	49.2±1.3	35
♀UAS-per10/ELAV(+)	195	167.6±4.2	74**	54	45.2±1.8	80*	46	51.2±1.1	40
♂UAS-per2.4/ELAV(-)	195	191.6±0.9	100	54	46.9±1.9	84	95	179±3.1	55
♂UAS-per2.4/ELAV(+)	195	182.8±3.4	89	59	53.3±1.5	92**	195	173±3.4	34**
♀UAS-per2.4/ELAV(-)	195	176.8±3.1	83	34	33.2±1.6	60	46	57.3±2.3	45
♀UAS-per2.4/ELAV(+)	195	172.7±3.4	80	34	42.4±2.3	68**	46	45.9±0.9	23**
♂UAS-Clk/ELAV(-)	195	172.4±2.9	80	34	40.8±1.5	72	148	107±3.5	65
♂UAS-Clk/ELAV(+)	196	190±1.5	94**	54	43.6±1.6	81**	96*	180±2.2	76**
♀UAS-Clk/ELAV(-)	148	147.2±4	51	34	42.9±2.1	73	70	77.6±2.2	96
♀UAS-Clk/ELAV(+)	96	106.9±3.5	16*	54	55.1±2.3	85	54*	59.2±1.9	52*
♂UAS-cyc/ELAV(-)	148	140.1±3	50	34	41.2±2.1	69	155	154±3.7	63
♂UAS-cyc/ELAV(+)	195	170.2±4.4	77*	22	31±1.6	45**	103*	127±3.9	76**
♀UAS-cyc/ELAV(-)	155	154.4±3.7	57	34	37.5±2.1	91	46	49.5±1.1	48
♀UAS-cyc/ELAV(+)	103*	127.4±3.9	37	54*	45.2±2.4	74**	46	49.8±1.1	39
♂UAS-tim/ELAV(-)	195	179.8±3	50	31	42.3±2.1	70	195	185±2.2	32
♂UAS-tim/ELAV(+)	195	179.9±3.3	77*	23	33±1.6	45	195	183±2.2	2
♀UAS-tim/ELAV(-)	195	184.9±2.2	90	22	21.6±0.9	21	46	46.9±1.9	21
♀UAS-tim/ELAV(+)	195	183±2.2	95	29	40.5±2.1	67*	46	39.1±0.9	8*

Обозначения: ♂ - самцы; ♀ - самки; (-) – без сверхэкспрессии; (+) – сверхэкспрессия; М – медианная выживаемость (ч); $\bar{X} \pm \Delta$ - средняя выживаемость (ч); 144, 48 ч и 24 ч – процент выживших особей через 144 ч, 48 ч и 24 ч после начала воздействия; * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ (М – критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; 144 ч, 48 ч и 24 ч – ф-критерий Фишера).

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

Для изучения влияния сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в периферических тканях на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты активировали исследуемые гены в мышцах и жировом теле самцов и самок *D. melanogaster*. Анализ экспрессии исследуемых генов показал индуцированное увеличение активности в мышцах в 1.6-14.5 раза у самцов и 1.8-38 раз у самок и в жировом теле в 1.4-11.8 раз у самцов и 1.6-11.6 раз у самок.

Установлено, что кондиционная сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в мышцах на фоне ограничительной диеты в большинстве случаев привела к уменьшению медианной

продолжительности жизни самцов и самок. Исключением является ген *tim*, активация которого увеличила продолжительности жизни. Сверхэкспрессия гена *cry* у самцов и генов *per*, *cyc* и *tim* у самок в жировом теле на среде с низким содержанием белка увеличивала медианную ПЖ (табл. 3).

Таблица 3

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

Линии мух	Сверхэкспрессия в мышцах		Сверхэкспрессия в жировом теле	
	Среда 1	Среда 2	Среда 1	Среда 2
♂♂UAS- <i>cry12</i>	-61*	-11.6**	-14*	+20.8*
♀♀UAS- <i>cry12</i>	—	—	—	—
♂♂UAS- <i>cry24</i>	-12.5**	—	—	+19*
♀♀UAS- <i>cry24</i>	—	—	-15.3*	-8.4**
♂♂UAS- <i>per10</i>	-28.2*	-19.3*	—	—
♀♀UAS- <i>per10</i>	-56.3*	—	—	+12**
♂♂UAS- <i>per2,4</i>	-20.8*	-5.1**	—	—
♀♀UAS- <i>per2,4</i>	—	—	+23.6*	+8.6**
♂♂UAS- <i>Clk</i>	-12.7*	-13.4*	—	—
♀♀UAS- <i>Clk</i>	-10.9**	—	-18.9*	-2.7**
♂♂UAS- <i>cyc</i>	-21.6*	—	—	—
♀♀UAS- <i>cyc</i>	—	—	+23.6*	+8.6*
♂♂UAS- <i>tim</i>	—	+14*	+6.8**	—
♀♀UAS- <i>tim</i>	—	+4.7**	-23.2*	+3.6**

Обозначения: ♂♂ - самцы, ♀♀ - самки, различия достоверны по сравнению с контролем при: * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; — - отличий нет, среда 1 - со стандартным содержанием дрожжей, среда 2 - с пониженным содержанием дрожжей.

Глава 4. Обсуждение результатов

Продолжительность жизни на внутривидовом уровне имеет высокую степень пластичности и зависит от внешних экологических факторов, прежде всего температуры и обилия пищи. У человека возраст существенно влияет на суточные ритмы сна и бодрствования, происходит уменьшение продолжительности сна. Показатели «латентности сна», количество ночных пробуждений, фрагментация сна и частота дневного сна значительно увеличиваются в зрелом возрасте (Age-associated difference in..., 2002). Подобные изменения выявляются на модели дрозофил (Koh et al., 2006).

При старении дрозофилы происходит ослабление выраженности периодизма, наблюдается сдвиг периодов цикла «сна-бодрствования», однако в центральном осцилляторе циркадные ритмы сохраняются даже у самых старых особей (Old flies have a..., 2012), несмотря на то, что циркадные ритмы в целом организме угнетаются при старении.

До настоящего времени роль генов регуляции циркадных ритмов в старении изучена недостаточно. Используя линии *Drosophila melanogaster* с мутациями и сверхэкспрессией генов циркадных ритмов и применяя продолжительность жизни в качестве интегрального показателя стрессоустойчивости организма, нами впервые показано влияние сверхэкспрессии целого блока генов регуляции циркадных ритмов в различных типах тканей в обеспечении устойчивости дрозофил к действию факторов окружающей среды (гипертермии, голоданию, действию прооксиданта параквата).

Нарушение функций многих генов ведет к укорочению продолжительности жизни, что может быть не только результатом ускорения процесса нормального старения, но и следствием патологии, независимой от старения. Не являются исключением и гены циркадных ритмов, утрата которых приводит к снижению продолжительности жизни (Rakshit et al., 2013). В проведенных нами экспериментах у самцов дрозофилы с мутацией гена *cry* медианная продолжительность жизни меньше на 16-20% ($p < 0.001$) по сравнению с исходной линией w^{1118} , а устойчивость к голоданию у обоих полов снизилась на 33-35 % ($p < 0.001$) (табл. 1).

Так как центральный осциллятор генов циркадных ритмов находится в головном мозге, то мы предположили, что если активировать исследуемые гены в нервной системе, то можно получить положительные эффекты. Известно, что сигналы, поступающие из нервной системы к другим тканям организма и изменение экспрессии некоторых генов стресс-ответа в нервной ткани способно влиять на стрессоустойчивость и продолжительность жизни целого организма.

Имеются сведения, что в головах старых имаго наблюдается снижение уровня осцилляций фоторецептора белка *CRY* как на уровне мРНК, так и на уровне белка (Rakshit et al., 2013). Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о том, что сверхактивация этого гена в нервной ткани увеличивала медианную продолжительность жизни и резистентность к действию прооксиданта параквата и голоданию. Согласно литературным источникам, восстановление активности *cry* путем индукции сверхэкспрессии у старых мух во всем теле усиливает амплитуду колебаний транскрипционной активности генов циркадного механизма (Rakshit et al., 2013).

Изменение продолжительности жизни, как правило, сопряжено с изменением устойчивости живых организмов к различным видам стресса (Age-dependent loss..., 1987; Thermotolerance and extended..., 1995;; Brown-Borg, 2006; Slack et al., 2010). Экспрессия многих ключевых генов, которые регулируют клеточный цикл и участвуют в ответе на генотоксический и оксидативный стрессы (*Mdm2*, *Gadd45*, *Sod*, *Cyclin D1*, *Cyclin B1*, *Cyclin E*, *Cylin A*, *p53*, *Wee1*, *c-Myc* и многие другие) имеет циркадную ритмичность (Karahi et al., 1999; Morley et al., 2004). Поэтому любое нарушение функции циркадных часов может повлиять на активность вышеперечисленных генов и снизить устойчивость организма к стрессу. Поскольку гены циркадных ритмов вовлечены в механизмы ответа на действие экзогенных и эндогенных факторов, мы предположили, что их сверхэкспрессия приведет к повышению устойчивости особей *Drosophila melanogaster* к различным видам стресса.

Нами установлено, что в большинстве случаев сверхэкспрессия генов циркадных ритмов приводила к увеличению средней продолжительности жизни самцов и самок в условиях действия индуктора свободных радикалов параквата, по сравнению с особями без сверхэкспрессии. Исключением являются особи со сверхэкспрессией гена *sus* – их медианная продолжительность жизни в условиях данного фактора была ниже.

Основным типом повреждений при тепловом шоке являются повреждения белков. Под его влиянием в результате увеличения скорости метаболизма и выработки свободных радикалов также происходит повреждение ДНК. Наши исследования показали, что повышенная транскрипция генов циркадных ритмов у самцов повысила устойчивость к гипертермии, когда у самок получили обратный результат.

Известно, что чрезмерное потребление пищи, помимо прочих негативных эффектов, вызывает окислительный стресс. В экспериментах в условиях голодания нами было обнаружено увеличение средней длительности жизни у самцов при повышенной транскрипционной активности генов *cry* и *Clk*. Однако сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в остальных вариантах эксперимента с воздействием голодания не повлияла на медианную выживаемость, либо вызвала негативный эффект.

Известно, что одно из первых мест среди причин, ведущих к преждевременному старению, занимают разнообразные нарушения режима питания, которое ведет к увеличению риска возникновения метаболического синдрома (Pot et al., 2015). Активация генов циркадных ритмов способствует синхронизации биохимических процессов в клетках, оптимизации обмена веществ и интенсификации метаболизма жиров, что в свою очередь ведет к увеличению продолжительности жизни (Calorie restriction regulates..., 2015). Показано, что ограничительная диета увеличивает амплитуду активности генов циркадных ритмов в периферических тканях (Peripheral circadian clocks..., 2015). Однако высококалорийная диета также способствует нарушению работы циркадных часов в печени и тем самым влияет на ритм колебаний транскрипционной активности генов метаболизма через активацию PPAR, который в обычном состоянии не активен (Sassone-Corsi, 2013). Нарушение циркадных ритмов у человека приводит к различным заболеваниям: сахарному диабету, ожирению, артериальной гипертензии. Также у дрозофилы известны ритмы питания (мухи едят больше всего утром). У дрозофил с низкокалорийной диетой и долголетием ассоциированы сигнальные механизмы, опосредуемые белками Sir2 и p53, а также 4E-BP. Выключение активности Sir2 подавляет увеличение продолжительности жизни при недостатке калорий. Следует также отметить, что к молекулярным механизмам влияния низкокалорийной диеты на скорость старения можно отнести подавление инсулинового (снижение поступления углеводов) и TOR сигнальных путей (аминокислотное голодание), ускорение обменов жиров, активация сиртуинов и FOXO, уменьшение интенсивности метаболизма (продукции свободных радикалов), увеличение амплитуды генов циркадных ритмов (4E-BP extends lifespan..., 2009).

S. Katewa с соавторами (2015) показали, что сверхэкспрессия генов циркадных ритмов у *Drosophila melanogaster* имеет различное фенотипическое проявление в зависимости от ткани-мишени на фоне ограничительной диеты. Наши результаты показали, что сверхактивация генов циркадных ритмов в мышцах на фоне ограничительной диеты, как у самцов, так и у самок вызвала снижение медианной продолжительности жизни (до 56 %), исключением является ген *tim*, активация которого привела к увеличению продолжительности жизни на низкокалорийной среде. Установлено, что при сверхактивации генов циркадных ритмов в жировом теле ген *cry* у самцов увеличивал медианную продолжительность жизни (до 20 %) на низкокалорийной среде.

Результаты регрессионного анализа выявили, что сверхактивация генов циркадных ритмов в мышцах увеличивает риск смерти особи (исключение – линия *cry24*) (рис. 3 А, Б), в то время как ограничительная диета сглаживала 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 были 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 транскрипционных факторов в нервной системе мух. При этом, чем выше была экспрессия в мышечной ткани, тем меньше продолжительность жизни. Наиболее выраженная и статистически значимая отрицательная корреляционная зависимость проявлялась в случае с питанием без ограничений. При этом на фоне ограничительной диеты эта зависимость уменьшилась и стала статистически незначимой. Таким образом, ограничительная диета сгладила негативное действие сверхэкспрессии циркадных генов в мышечной ткани дрозофилы. В случае с жировым телом

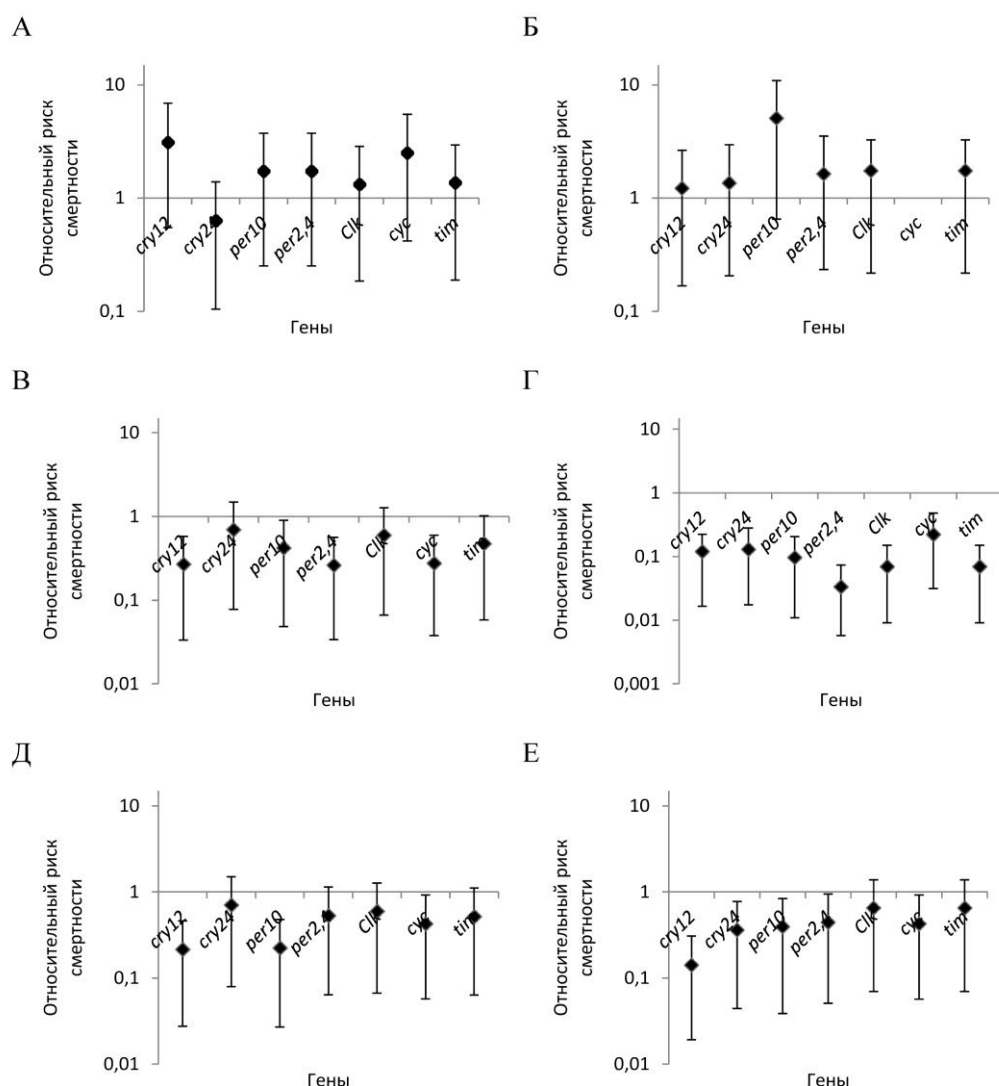


Рис. 3. Риск возникновения смерти самцов (А, В, Д) и самок (Б, Г, Е) *D. melanogaster* при сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в мышцах (А, Б), на фоне ограничительной диеты (В, Г) и при сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в жировом теле относительно сверхэкспрессии в мышцах.

сверхэкспрессия у самцов имела тенденцию к увеличению продолжительности жизни, а у самок – к уменьшению, вне зависимости от типа диеты, однако коэффициенты корреляции не были статистически значимы.

Мы предполагаем, что наблюдаемый эффект продления жизни при сверхэкспрессии генов циркадных ритмов может быть обусловлен компенсацией возраст-зависимого снижения активности изучаемых генов.

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. Возможно, сверхактивируя какой-либо один из исследуемых генов в изучаемой ткани, мы нарушаем баланс между элементами молекулярного осциллятора, что приводит к отрицательным эффектам. В особенности в том случае, если экспрессия этого гена в норме в данной ткани при старении существенно не изменяется. Согласно данным литературы механизм работы генов циркадных ритмов требует больших энергетических затрат (Katewa et al., 2015), что является причиной снижения продол-

жительности жизни и устойчивости к стресс-факторам. Следовательно, сверхактивация исследуемых генов могла привести к чрезмерному расходу энергии в ущерб другим жизненно важным процессам (Blagosklonny, 2009).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в нервной системе может увеличивать продолжительность жизни, в условиях интенсивного стресса (оксидативного стресса, гипертермии, голодания) в большинстве случаев происходит повышение выживаемости при нарушении суточных ритмов. Кроме того, в условиях нарушения работы генов-регуляторов циркадных ритмов (режим освещения, режим питания) ограничительная диета сглаживает отрицательные эффекты за счет увеличения амплитуды экспрессии генов циркадных ритмов.

ВЫВОДЫ

1) Установлено, что мутация гена *cryptochrome* приводит к снижению устойчивости *Drosophila melanogaster* к голоданию на 33-35 % ($p < 0.001$) и сокращению продолжительности жизни у самцов на 16-20 % ($p < 0.001$).

2) Выявлено снижение активности большинства изученных генов циркадных ритмов (*cryptochrome*, *period*, *cycle*, *timeless*) у старых особей линии w^{1118} *Drosophila melanogaster* по сравнению с особями среднего возраста, за исключением гена *Clock*, активность которого достоверно не изменяется.

3) Кондиционная сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в нервной системе дрозофилы приводит как к продлению жизни животных (*cryptochrome*, *cycle*) по сравнению с особями без сверхэкспрессии (до 15 %), так и к уменьшению продолжительности жизни (*Clock*) (до 10 %) или остается неизменной (*period*, *timeless*). Сверхэкспрессия генов *cryptochrome* и *cycle* в нервной системе у самцов увеличила устойчивость к гипертермии, голоданию и действию прооксиданта параквата. У самок сверхактивация исследуемых генов циркадных ритмов в нервной системе повысила устойчивость к действию индуктора свободных радикалов, но снизила резистентность к гипертермии и голоданию.

4) Установлено, что сверхактивация генов циркадных ритмов (*cryptochrome*, *period*, *cycle*, *timeless*, *Clock*) в мышцах на фоне ограничительной диеты самцов и самок вызвала снижение медианной продолжительности жизни на 5.1 – 61% ($p < 0.01$), исключением является ген *tim*, активация которого привела к увеличению продолжительности жизни на низкокалорийной среде. Сверхактивация генов *cryptochrome* и *cycle* в жировом теле у особей, содержащихся на низкокалорийной среде, вызвала увеличение медианной продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* на 20.8 % и 8.7 % ($p < 0.001$), соответственно.

5) Результаты корреляционного анализа и регрессии Кокса показывают, что ограничительная диета уменьшила выраженность негативного влияния нарушения работы генов циркадных ритмов на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. A comparison of the transcriptome of *Drosophila melanogaster* in response to entomopathogenic fungus, ionizing radiation, starvation and cold shock / A. Moskalev, S. Zhikrivetskaya, G. Krasnov, M. Shaposhnikov, E. Proshkina, D. Borisoglebsky, A. Danilov, D. Peregudova, I. Sharapova, **E.Dobrovolskaya**, I. Solovev, N. Zemsкая, L. Shilova, A. Snezhkina, A. Kudryavtseva // BMC Genomics. - 2015. - Vol. 13. - № S8. - P. 1 - 18.

2. Aging Chart: a community resource for rapid exploratory pathway analysis of age-related processes / A. Moskalev, S. Zhikrivetskaya, M. Shaposhnikov, **E. Dobrovolskaya**, R. Gurinovich, O. Kuryan, A. Pashuk, L. C. Jellen, A. Aliper, A. Peregudov and A. Zhavoronkov // *Nucleic Acids Research*. - 2016. - Vol. 44. - № D1. - P.894-899.

3. Geroprotectors.org: a new, structured and curated database of current therapeutic interventions in aging and age-related disease / A. Moskalev, E. Chernyagina, J. P. Magalhães, D. Barardo, H. Thoppil, M. Shaposhnikov, A. Budovsky, V. E. Fraifeld, A. Garazha, V. Tsvetkov, E. Bronovitsky, V. Bogomolov, A. Scerbacov, O. Kuryan, R. Gurinovich, L. C. Jellen, B. Kennedy, P. Mamoshina, **E. Dobrovolskaya**, A. Aliper, D. Kaminsky, and A. Zhavoronkov // *AGING*. - 2015. - P. 616-628.

4. Соловьёв, И.А. Генетический контроль циркадных ритмов и старение / И.А. Соловьёв, **Е.В. Добровольская**, А.А. Москалев // *Генетика*. 2016. Т. 52. № 4. С. 393 – 413.

5. **Добровольская, Е.В.** Влияние сверхактивации генов циркадных ритмов на стрессоустойчивость и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* / Е.В. Добровольская, И.А. Соловьёв, Е.Н. Прошкина, А.А. Москалев // *Теоретическая и прикладная экология*. - 2016. № 3. - С. 32-41.

В прочих изданиях:

1. **Добровольская, Е. В.** Влияние сверхэкспрессии генов регуляции циркадных ритмов на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* / Е. В. Добровольская, Е. Н. Плюснина, А. А. Москалев // тезисы докладов VI съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров и ассоциированных генетических симпозиумов. – Новосибирск, 2014. – С. 44.

2. **Добровольская, Е. В.** Влияние сверхэкспрессии генов регуляции циркадных ритмов на продолжительность жизни и стрессоустойчивость особей *Drosophila melanogaster* / Е. В. Добровольская, Е. Н. Плюснина, И. А. Соловьёв, А. А. Москалев // *Биология - наука XXI века: тезисы докладов 18-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых*. – Пущино, 2014. - С. 248-249.

3. **Dobrovolskaya, E.** Effects of overexpression of genes of the circadian rhythm regulation on the lifespan of *Drosophila melanogaster* / E. Dobrovolskaya, E. Plyusnina, I. Solovev, A. Moskalev // *Genetics of aging and longevity: abstracts of the 3rd International conference*. – Sochi, 2014. - P. 64.

4. Москалев, А.А. Исследование молекулярно-генетических механизмов радиационного гормезиса и радиоадаптивного ответа *Drosophila melanogaster* / А.А. Москалев, М.В. Шапошников, Е.Н. Плюснина, Л.А. Шилова, Н.В. Земская, Д.О. Перегудова, А.А. Данилов, **Е.В. Добровольская**, А. В. Кудрявцева // *Радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность: тезисы докладов VII съезда по радиационным исследованиям*. – Москва, 2014. - С. 79.

5. **Добровольская, Е. В.** Влияние ограничительной диеты на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster* со сверхактивацией генов циркадных ритмов / Е. В. Добровольская, Е. Н. Плюснина, И. А. Соловьёв, А.А. Москалев // *Биология - наука XXI века: тезисы докладов 19-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых*. – Пущино, 2015. - С. 227-228.

6. Москалев, А.А. Механизмы радиационного гормезиса на модели дрозофилы / А.А. Москалев, М.В. Шапошников, Е.Н. Плюснина, Л.А. Шилова, Н.В.Земская, Д.О. Перегудова, А.А. Данилов, **Е.В. Добровольская**, А. В. Кудрявцева // *Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды: материалы Международной конференции*. – Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2014. С. - 64-66.

7. **Добровольская, Е.** Влияние сверхэкспрессии генов регуляции циркадных ритмов на стрессоустойчивость и суточную активность *Drosophila melanogaster* / Е. Добровольская, Е. Плюснина, И. Соловьев, А. А. Москалев // XXII всероссийская молодежная научная конференция «Актуальные проблемы биологии и экологии». – Сыктывкар: КомиНЦ УрО РАН, 2015. - С. 215-220.

8. **Dobrovolskaya, E.** Caloric restriction influences lifespan of *Drosophila melanogaster* individuals whose genes controlling circadian rhythms are overexpressed in peripheral tissues / E. Dobrovolskaya, E. Proshkina, I. Solovev, A. Moskalev // Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology, and evolution : abstracts, papers by young scientists of the Fourth International conference, dedicated to N.W. Timofeeff-Resovsky and his scientific school. – Дубна: ОИЯИ, 2015. - P. 18.

9. Plyusnina, E. Dose-dependent effects of pharmacological agents on the *Drosophila melanogaster* lifespan and sensitivity to radiation exposure / E. Plyusnina, E. Lashmanova, L. Shilova, **E. Dobrovolskaya**, A. Moskalev // Abstracts of the 15th International congress of radiation research. – Kyoto, 2015. - P. 2–5.

10. **Dobrovolskaya, E.** «Effect of caloric restriction on lifespan of *Drosophila melanogaster* individuals with tissue-specific overexpression of circadian clock genes» / E. Dobrovolskaya, E. Proshkina, I. Solovev, A. Moskalev // Биомедицинские инновации для здорового долголетия. – Санкт-Петербург, 2016. - С. 47.

11. **Добровольская, Е.** Влияние сверхэкспрессии генов регуляции циркадных ритмов на показатели жизнеспособности *Drosophila melanogaster* / **Е. Добровольская**, Е. Прошкина, И. Соловьев, А. Москалев // XXIII всероссийская молодежная научная конференция «Актуальные проблемы биологии и экологии». – Сыктывкар: КомиНЦ УрО РАН, 2016. - С. 152-156.

12. Прошкина, Е.Н. Влияние голодания и обезвоживания на старение *Drosophila melanogaster* / Е.Н. Прошкина, **Е.В. Добровольская**, Д.О. Перегудова, А. А. Москалев // XXIII всероссийская молодежная научная конференция «Актуальные проблемы биологии и экологии». – Сыктывкар: КомиНЦ УрО РАН, 2016. - С. 165-168.

13. **Добровольская, Е.** Влияние сверхэкспрессии генов циркадных ритмов на показатели жизнеспособности *Drosophila melanogaster* / Е. Добровольская, Е. Прошкина, И. Соловьев, А. Москалев // Сборник тезисов по молекулярной и клеточной биологии. Институт цитологии РАН. – Санкт-Петербург, 2016. - С. 15-16.

14. Solovyev, I.A. Genetic control of circadian rhythms: An impact of molecular clock expression profile changes in longevity / I.A. Solovyev, **E.V. Dobrovolskaya**, Moskalev A.A. // Abstracts: The tenth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure. Systems Biology, BGRS\SB. – Novosibirsk, 2016. – P.288.

15. Москалев, А. А. Изучение молекулярно-генетических механизмов продолжительности жизни и старения на модели *Drosophila melanogaster* / А. А. Москалев, Е. Н. Прошкина, М. В. Шапошников, Л. А. Шилов, А. А. Данилов, Д. О. Перегудова, **Е. В. Добровольская**, Н. В. Земская, А. А. Белый, И. А. Соловьев, Е. А. Лашманова, С. О. Жикривецкая, А. В. Кудрявцева // Сборник тезисов всероссийской конференции «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы». – Москва, 2016. – С. 232.

16. Moskalev A. Effects of pharmacological inhibition of aging-associated pathways on *Drosophila* lifespan and healthspan / A. Moskalev, M. Shaposhnikov, N. Zemskaya, E. Proshkina, **E. Dobrovolskaya** // Abstracts of papers presented at the 2016 meeting on mechanisms of aging. – Cold Spring Harbor Laboratory, 2016. – P. 136.