

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
КОМИ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ

УДК 574.24

на правах рукописи



Добровольская Евгения Владимировна

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

Специальность: 03.02.08. – экология (биология)

диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

научный руководитель:

доктор биологических наук, чл.-корр. РАН

А. А. Москалев

Сыктывкар, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Основные гипотезы механизмов старения.....	12
1.2. Влияние экологических факторов на продолжительность жизни и старение	16
1.2.1. Тепловой и холодовой шок.....	18
1.2.2. Окислительный стресс	19
1.2.3. Ионизирующие излучения	21
1.2.4. Ограничительная диета	22
1.3. Механизмы регуляции циркадных ритмов в связи со старением.....	25
1.3.1. Роль генов циркадных ритмов в механизмах старения.....	29
1.3.2. Сиртуины	35
1.3.3. Роль гена <i>Bmal1</i> в регуляции процесса старения	36
1.3.4. Роль генов <i>Clock</i> и <i>NPAS2</i> в регуляции процессов старения	37
1.3.5. Роль гена <i>timeless</i> в регуляции процесса старения	38
1.3.6. Влияние генов семейства <i>PERs</i> на процесс старения.....	39
1.3.7. Влияние гена <i>cryptochrome</i> на продолжительность жизни	40
1.4. Трансляционные осцилляторы эукариот и их место в процессе старения	41
1.5. Циркадные часы на организменном уровне	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1. Линии <i>Drosophila melanogaster</i>	45
2.2. Сверхактивация генов циркадных ритмов.....	47
2.3. Анализ продолжительности жизни	48
2.4. Анализ влияния ограничительной диеты на продолжительность жизни	48
2.5. Оценка стрессоустойчивости.....	48
2.6. Оценка возраст-зависимой динамики экспрессии изучаемых генов ..	49
2.7. Анализ возрастной динамики циркадной активности	50

2.8. Статистический анализ результатов	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	52
3.1. Влияние мутации гена <i>cryptochrome</i> на продолжительность жизни и устойчивость к голоданию особей <i>Drosophila melanogaster</i>	52
3.2. Изменение уровня экспрессии генов циркадных ритмов у особей <i>Drosophila melanogaster</i> с возрастом.....	55
3.3 Возрастная динамика циркадной активности самцов <i>D. melanogaster</i> ..	56
3.4. Влияние сверхэкспрессии генов циркадных в нервной системе на показатели жизнеспособности у особей <i>Drosophila melanogaster</i>	58
3.4.1. Сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в нервной системе <i>Drosophila melanogaster</i>	58
3.4.2. Влияние сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в нервной системе на продолжительность жизни особей <i>Drosophila melanogaster</i> ..	58
3.4.3. Влияние сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в нервной системе на устойчивость особей <i>Drosophila melanogaster</i> к действию стресс-факторов (оксидативному стрессу, гипертермии, голоданию).....	64
3.5. Влияние ограничительной диеты на продолжительность жизни особей <i>Drosophila melanogaster</i> на фоне сверхактивации генов циркадных ритмов в периферических тканях	70
3.5.1.Сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в мышечной системе и жировом теле <i>Drosophila melanogaster</i>	70
3.5.2. Влияние сверхэкспрессии гена <i>cryptochrome</i> на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты.....	71
3.5.3. Влияние сверхэкспрессии гена <i>period</i> на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты	75
3.5.4. Влияние сверхэкспрессии гена <i>Clock</i> на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты	78
3.5.5. Влияние сверхэкспрессии гена <i>cycle</i> на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты	81
3.5.6. Влияние сверхэкспрессии гена <i>timeless</i> на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты.....	84
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	92
ВЫВОДЫ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	111

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОЗ – антиоксидантная защита

АТФ – аденозинтрифосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ИИ – ионизирующее излучение

кДНК – комплементарная ДНК

ПЖ – продолжительность жизни

СХЯ – супрахиазматическое ядро

ВВЕДЕНИЕ

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).

Именно периодичность освещения, соотношение длительности дня и ночи обеспечивает регулирование 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 приводят 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 является актуальным 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 прооксидантов, 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.

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 (*cryptochrome*, *period*, *Clock*, *cycle*, *timeless*) 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 и подготовку публикаций в соавторстве.

Научная новизна. Впервые в комплексных экспериментах *in vivo* доказана роль ключевых генов циркадных ритмов (*cryptochrome*, *period*, *Clock*, *cycle*, *timeless*) в обеспечении устойчивости целостного организма к стресс-факторам различной природы – действию прооксидантов, гипертермии, голоданию. Впервые показано, что мутация в гене регулятора циркадных ритмов *cryptochrome* у дрозофил вызывает уменьшение продолжительности жизни. Показано, 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 на такие факторы среды как действие индуктора свободных радикалов параквата, тепловой стресс и голодание. С помощью демографических методов анализа изучена связь между отдельными клеточными процессами и изменением параметров жизнедеятельности целого организма (продолжительность жизни, стрессоустойчивость). Результаты исследований могут быть использованы 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.

Диссертационная работа являлась разделом госбюджетной темы «Молекулярно-генетические механизмы взаимосвязи стрессоустойчивости и продолжительности жизни на модели *Drosophila melanogaster*» (№ Гр. 115012130067), целевой программы «Молекулярная и клеточная биология»

(№ 12-П-4-1005), проекта Программы Президиума РАН «Экологическая генетика продолжительности жизни модельных животных (*Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*)» (№ 12-П-4-1005), гранта Президента РФ «Сравнение механизмов ответа *Drosophila melanogaster* на оксидативный, тепловой, холодовой, и генотоксический стрессы с использованием полногеномного анализа транскриптомов» (№ МД-1090.2014.4), научного проекта для молодых ученых и аспирантов УрО РАН «Изучение влияние активации генов стресс-ответа и циркадных ритмов на старение и стрессоустойчивость *Drosophila melanogaster*» (№ 14-4-НП-103), выполняемых в лаборатории молекулярной радиобиологии и геронтологии Отдела радиэкологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Работа поддержана из средств темы НИР «Сохранение коллекций экспериментальных животных для фундаментальных исследований».

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.

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

Апробация диссертации. Результаты работы докладывались на международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2014, 2015), на международной конференции «Генетика старения и долголетия» (Сочи, 2014), на VI съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров и ассоциированных генетических симпозиумов (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).

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность руководителю диссертации д.б.н. Москалеву А.А. за идею, лежащую в основе данной работы, за научное руководство, полезные советы и предложения, всестороннюю помощь при выполнении и написании диссертации. Особую благодарность автор выражает коллегам по работе к.б.н. Шапошникову М. В., к.б.н. Прошкиной Е. Н и Соловьеву И. А., коллективу отдела радиозэкологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН за полезные советы и замечания в ходе работы над текстом диссертации. Автор благодарен своим родителям и близким людям за их всестороннюю поддержку на протяжении всего исследовательского процесса.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В мире постепенно увеличивается доля пожилого населения, а в след за этим – распространенность возраст-зависимых хронических заболеваний, изменяется демографическая структура (Кирик, 2010). В то же время известно, что люди-долгожители медленнее стареют и на 20-30 лет позже становятся нетрудоспособными, а у некоторых долгоживущих млекопитающих (например, голый землекоп) существенно снижен риск заболеть опухолевыми заболеваниями, сахарным диабетом и остеопорозом (GβL, a positive regulator ..., 2011). Таким образом, изучение механизмов старения у животных и человека позволит выявить новые мишени для создания лекарств, направленных на профилактику и лечение социально-значимых заболеваний, повысить качество жизни пожилого населения.

В настоящее время в связи с обострившейся экологической ситуацией активно исследуется влияние на продолжительность жизни (ПЖ) различных экологических факторов, таких как температура, ионизирующее излучение, окислительный стресс, качество пищи (Москалев и др., 2008; Sasaki, Fukuda, 2006; Moskalev, 2007; Moskalev et al., 2008). Ведется поиск генетических механизмов их влияния на скорость старения организма.

Продолжительность жизни регулируется комплексом фенотипических и генотипических факторов и является временной характеристикой взаимодействия повреждающих и восстанавливающих процессов в организме, приводящих к старости и смерти (Большой энциклопедический словарь, 1999). ПЖ, как и любой другой видовой количественный признак, имеет определенный диапазон своей изменчивости. По результатам исследований, выполненных на различных организмах от дрожжей до человека, стало известно, что ПЖ имеет выраженный генетический компонент (Vijg, Suh, 2005), однако его вклад в наблюдаемую изменчивость по ПЖ оказался невелик: коэффициенты наследуемости составляют 0.132-0.442 у дрозофилы, 0.2-0.3 у нематод, 0.21-0.36 у мышей (Мыльников, Смирнова, 1997). При выяснении вклада средовой компоненты в

изменчивость ПЖ оказалось, что средовые влияния, такие, как температура, состав пищи и другие, более существенны (Мыльников, Смирнова, 1997).

Среди множества факторов, ограничивающих ПЖ (несчастные случаи, голод, насильственная гибель), только старение является внутренней причиной (Vijg, Suh, 2005) и даже при благоприятных условиях оно имеет место у большинства организмов. Старение в биологии — процесс постепенного угнетения основных функций организма, в том числе регенерационных и репродуктивных, вследствие чего организм становится менее приспособленным к постоянно меняющимся условиям окружающей среды (теряет способность противостоять стрессам, болезням и травмам), что делает его гибель неизбежной (Москалев, 2009). Несмотря на многочисленные исследования, до сих пор не удалось выявить единого механизма старения, что указывает на то, что старение вызывает не одна причина, а скорее группа сложных взаимосвязанных процессов, контролируемых различными механизмами. Более того, не исключено, что на различных этапах жизни действуют разные механизмы, её обрывающие (Гаврилов, Гаврилова, 1991).

1.1. Основные гипотезы механизмов старения

На сегодняшний день существует множество гипотез старения, объясняющих механизмы этого сложного процесса. Тем не менее, они могут быть разделены на две группы. Сторонники первой группы гипотез рассматривают старение как генетически запрограммированный процесс. По их мнению, старение также контролируется генами, как и все другие этапы развития организма. В этом случае действие факторов окружающей и внутренней среды может повлиять, но в незначительной степени, на темп старения. В качестве доказательств существования генетической программы старения приводят тот факт, что соматические клетки организма могут претерпевать только ограниченное количество делений. В 1965 году Хейфлик наблюдал, как клетки человека, делящиеся в

клеточной культуре, умирают приблизительно после 50 делений и проявляют признаки старения при приближении к этой границе (Оловников, 1971).

Теломерная теория Оловникова (Оловников, 1971) объясняет «предел Хейфлика» тем, что в соматических клетках при каждой репликации ДНК из-за особенностей работы ферментов репликации (ДНК-полимеразы) недореплицируются концы хромосом – теломеры, а фермент теломераза, которая достраивает укороченные теломеры в половых и опухолевых клетках, обеспечивая их бессмертие, в них неактивна (Анисимов, 2007, 2008). В результате концы хромосом теряют защитные структуры (связанные с ними покровные белки и Т-петлю) и воспринимаются клеткой в качестве нерепарируемых двухцепочечных разрывов, что является сигналом для индукции апоптоза или перманентной остановки деления (репликативного старения), либо служит причиной возникновения нестабильности генома (Effectors of mammalian ..., 2005; Sharpless, DePinho, 2007). На сегодняшний день не вызывает сомнений, что укорочение теломер является одним из внутриклеточных механизмов, которые регулируют ПЖ клеток. Однако большинство исследователей считают, что лимит Хейфлика является проявлением механизма, возникшего у многоклеточных организмов для подавления опухолеобразования и лишь побочно является причиной старения (Sharpless, DePinho, 2007; Serrano, Blasco, 2007).

Сторонники гипотезы запрограммированного старения считают также, что оно вызывается изменением экспрессии генов. Действительно, исследования на дрозофиле показали, что уровень экспрессии некоторых генов с возрастом увеличивается, в то время как уровень активности других уменьшается. Так, например, уровень экспрессии некоторых генов циркадных ритмов с возрастом снижается (Kondratov, Antoch., 2009). Все это приводит к снижению физиологической активности клеток (Zou et al., 2000; Gene regulation and DNA ..., 2004; Transcriptional profiling of ..., 2006). Кроме того, происходит сдвиг от метаболизма жиров к углеводному метаболизму (Lee et al., 2002). Однако геномная регуляция еще не доказывает того, что

старение «запрограммировано». Изменение экспрессии генов, наблюдаемое при старении, может быть ответом на случайные повреждения (молекулярные ошибки, окислительный стресс) или отражать побочные плейотропные эффекты генов, контролирующих процессы роста, развития и метаболизма (Москалев и др., 2009; Oberdoerffer, Sinclair, 2007). Приверженцам запрограммированности старения до сих пор не удалось выявить эволюционно консервативную группу генов, возникшую с одной лишь целью – запустить программу старения и смерти.

Сторонники альтернативной гипотезы о стохастической природе старения рассматривают его как результат нарушения, повреждения генетического аппарата под действием факторов внешней и внутренней среды. По их мнению, старение генетически не запрограммировано, но детерминировано биологическими свойствами организма. Изменение генной регуляции может происходить в результате взаимодействия различных эндогенных и экзогенных факторов (высокие температуры, радиация, свободные радикалы) с генетическим материалом клетки (ядерной и митохондриальной ДНК), приводящего к постепенному накоплению мутаций в генетическом аппарате. Повреждение ДНК влияет на экспрессию генов, предотвращая транскрипцию ДНК в РНК, а накопление мутаций в свою очередь является причиной синтеза аномального белка, который не может нормально функционировать, что приводит к старению клетки, ткани, органа (Анисимов, Соловьёв, 1999).

Хотелось бы отметить, что среди повреждающих факторов особое значение придается свободным радикалам, выработка которых в организме усиливается после воздействия различных видов стресса: высокой температуры, радиации, УФ-облучения и других (Анисимов, Соловьёв, 1999; Система антиоксидантной защиты ..., 2000; Le Bourg 2001). Также было установлено, что повреждение ДНК напрямую влияет на работу циркадных ритмов (Oklejewicz, 2008).

В настоящее время большую роль в процессе старения отводится эпигенетике. Эпигенетические модификации, в том числе метилирование ДНК и модификация гистонов, поддаются воздействию внешних факторов, в том числе и образу жизни (диета) и меняются в процессе старения, запуская процесс развития возраст-зависимых заболеваний (Reik, 2007).

На сегодняшний день благодаря многочисленным исследованиям удалось выявить эволюционно-генетический компонент старения и доказать, что гены играют важную роль в регуляции ПЖ и скорости старения. Найден ряд консервативных генов, мутация или сверхактивация которых значительно влияют на ПЖ и скорость старения. В первую очередь к ним относят гены, вовлеченные в инсулин/инсулиноподобный сигнальный путь и регулирующие внутриклеточный метаболизм, а также гены, влияющие на репарацию и репликацию ДНК, участвующие в ответе на окислительный стресс и ряд других генов (Extension of life-span by..., 2001; A Mutant *Drosophila* insulin..., 2001; Helfand, Inouye, 2002; Dietary restriction in..., 2002; Hspa4 (HSP70) is involved..., 2002; Kultz, 2005). Не являются исключением и гены циркадных ритмов (Kondratov, Antoch, 2009).

Накопленные экспериментальные данные по генетике ПЖ позволяют утверждать, что в процессе развития и старения организма происходит тесное взаимодействие как генетических, так и средовых факторов, причем это взаимодействие происходит посредством нейроэндокринной системы. Какое-либо изменение фактора внешней среды служит сигналом, который воспринимается нервной, а затем эндокринной системой, которая в свою очередь посредством гормонов может влиять на экспрессию тех или иных генов. Особенность средовых и генетических факторов, которые увеличивают продолжительность жизни, состоит в том, что они повышают устойчивость клетки к стресс-факторам (Mattson et al., 2002).

Показано, что с возрастом способность оптимально реагировать на стрессорные воздействия постепенно теряется. Это происходит из-за снижения функциональной активности всех или большинства органов и

систем организма, что снижает его возможности приспосабливаться к влиянию внешних и внутренних факторов и является причиной старения (Тодоров, 2003). Поэтому с возрастом воздействия даже низкой интенсивности зачастую являются губительными для организма.

Таким образом, старение – это комплексный процесс взаимодействия генов и среды, который регулируется стрессом, метаболическими факторами и репродукцией, а также защитными системами на уровне клетки, ткани и организма (Москалев, Малышева, 2009). Не возникает сомнений, что значимую роль в регуляции ПЖ и скорости старения играют факторы внешней среды, их интенсивность и длительность действия на организм. В настоящее время достаточно хорошо изучены механизмы влияния на ПЖ и скорость старения таких факторов как, температура, радиация, голодание. Выявлены ключевые гены, регулирующие стресс-ответ (Москалев, Малышева, 2009). Далее более подробно рассмотрим влияние экологических факторов на продолжительность жизни.

1.2. Влияние экологических факторов на продолжительность жизни и старение

Ежедневно клетки подвергаются воздействию различных биотических и абиотических факторов, которые могут приводить к нарушениям протекания процессов жизнедеятельности. Неблагоприятные факторы, вызывающие стрессовое состояние, называют стресс-факторами. К экологическим факторам, которые вызывают стресс, относят гипо- и гипероксию, гипер- и гипотермию, ионизирующие излучения, голодание. Стресс был определен как совокупность неспецифических реакций организма на воздействие различных неблагоприятных факторов (Selye, 1936). В. А. Барабой определил стресс, как необходимый первый этап приспособления организма к изменившимся условиям, этап срочной адаптации, мобилизирующий, в свою очередь, работу механизмов адаптации долговременной (Барабой, 2006). В более узком понимании, стресс – это внезапное изменение, индуцирующее

повреждения на молекулярном, клеточном и организменном уровнях (Москалев, 2008). По длительности воздействия стресс разделяют на хронический и острый. Острый стресс возникает при неожиданном воздействии стрессового фактора. Хронический стресс – незаметная на первый взгляд суммарная реакция организма на длительное воздействие стресс-факторов. Сила воздействия стрессора в данном случае, невелика, однако, постоянна или регулярна. В ответ на стрессовые воздействия в организме происходит комплекс реакций под общим названием адаптационный синдром. Ганс Селье выделил 3 стадии общего адаптационного синдрома: реакция тревоги, стадия сопротивляемости и стадия истощения (Selye, 1936; Lupien, 2015).

Наиболее фундаментальными и общими для всех живых организмов являются молекулярно-генетические механизмы ответа на стресс. Основными макромолекулами, реализующими стресс-реакцию клетки, являются белки (Welch, 1992; Feder, 1996; Турышева и др., 2008; The role of..., 2012; Methionine sulfoxide reductase..., 2012). Формирование клеточного ответа на воздействие стрессового фактора происходит в три этапа: восприятие первичного сигнала, внутриклеточная передача этого сигнала и его усиление, и ответная реакция клетки на молекулярном уровне.

Изменение продолжительности жизни, как правило, сопряжено с изменением устойчивости живых организмов к различным видам стресса (Age-dependent loss and..., 1987; Sohal, 1990; Kapahi, 1999; Morley, Morimoto, 2004; Longevity is associated with..., 2009).

Ответ клетки на стресс на молекулярном уровне контролируется с помощью высоко консервативных в эволюции сигнальных путей и транскрипционных факторов (Kenyon, 2010). Их скоординированные действия способствуют поддержанию гомеостаза в стрессовых условиях.

Рассмотрим основные механизмы ответа организма на стрессовые воздействия разного рода.

1.2.1. Тепловой и холодовой шок

Как известно, в клетках растений, насекомых, млекопитающих как тепловой, так и холодовой шок вызывает изменения в активности генов. В частности, высокие температуры приводят к нарушению структуры и функции клеток, прежде всего, к потере третичной структуры и к агрегации белков. Поэтому в ходе эволюции был выработан комплекс приспособительных мер, приводящий к экспрессии защитных белков.

В ответ на увеличение температуры происходит тримеризация и активация транскрипционного фактора теплового шока HSF (Shamovsky, 2008), который приводит к транскрипции целого комплекса белков под общим названием белки теплового шока (Heat Shock..., 1982). В стандартных условиях они уже присутствуют в клетке, но их количества недостаточно, чтобы справиться с последствиями теплового шока. Большинство живых организмов имеют близкие по структуре белки теплового шока (Nover, 1984). Белки семейства HSP принадлежат к группе молекулярные шаперонов. Главная их функция заключается в восстановлении правильной нативной третичной или четвертичной структуры белков, а также образование и диссоциация белковых комплексов (Hartl, Hayer-Hartl, 2002). Также HSP участвуют в процессе подавления апоптоза (Jacobson et al., 1997).

Экспериментально показано, что с возрастом происходит изменение ответа клеток на тепловой шок (Kauffman, 1992). С возрастом снижается способность организма к внезапному индуцированному синтезу HSP (Malyshev, 2013). Синтез HSF и HSP, особенно HSP70, снижается с возрастом (Richardson, Holbrook, 1996; Tower, 2009). Поскольку HSP участвует в ответе клетки на термальный, окислительный и других виды стресса, снижение его продукции с возрастом уменьшает способность организма адекватно реагировать на изменения окружающей среды.

Таким образом, белки семейства HSP участвуют в восстановлении правильной нативной третичной или четвертичной структуры белков, а также защите клеток от перегрева и других видов стресса. С возрастом

происходит уменьшение синтеза данных белков, что снижает устойчивость организма к действию стресс-факторов.

1.2.2. Окислительный стресс

Одним из факторов, воздействующий на организм, является окислительный стресс. Его можно определить как результат нарушения баланса между продукцией оксидантов и эффективностью работы антиоксидантной системы, которая приводит к повреждениям ДНК (Crawford, Davies, 1994; Sies, 1997). Индукторами свободных радикалов могут выступать как факторы внешней, так и внутренней среды. Они возникают под воздействием химических окислителей, ионизирующего и ультрафиолетового излучений, загрязнителей воздуха, воды, почв и продуктов питания (Скулачев, 2001; Sies, 1997).

У человека окислительный стресс является причиной или важной составляющей многих серьёзных заболеваний, таких как атеросклероз (Role of reactive oxygen..., 2010), болезнь Альцгеймера (Oxidative stress in Alzheimer..., 2010), сахарный диабет 2 типа (Giacco et al., 2010), а также является одной из составляющих процесса старения (Romano, 2008). В некоторых случаях окислительный стресс используется организмом как защитный механизм. Иммунная система человека использует окислительный стресс для борьбы с патогенами (Forman et al., 2010).

Универсальными факторами, инициирующими разрушение клеток путем окислительного повреждения, являются активные формы кислорода, хлора и азота (Free radicals and..., 2007; Inflammatory cytokines..., 2013; Tripathi, Pandey, 2013; Oxidative stress status..., 2014).

Свободные радикалы образуются в митохондриях, пероксисомах, микросомах, фагоцитах (Dröge, 2002). Окислители нельзя однозначно считать молекулами-разрушителями. В небольших концентрациях они необходимы для выполнения ряда физиологических функций. Оксиданты

участвуют в регуляции клеточных сигналов, где они играют роль вторичных мессенджеров (Dröge, 2002).

Поддержание физиологически допустимых концентраций свободных радикалов обеспечивается благодаря системе антиоксидантной защиты (АОЗ). К АОЗ относят следующие ферменты: супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталаза; гидрофильные вещества-антиоксиданты, такие как глутатион и аскорбиновая кислота; липофильные антиоксиданты, такие как токоферолы, флавоноиды, каротиноиды и убихинон; белки, участвующие в восстановлении окисленных антиоксидантов и ферментов глутатион-редуктазы (Halliwell, Gutteridge, 2007). При превышении концентрационного порога оксиданты индуцируют ответ со стороны АОЗ.

При высоких концентрациях свободные радикалы потенциально токсичны и мутагены. Они служат причиной различных повреждений макромолекул и нарушений метаболических путей. Вызывают одиночные или двойные разрывы ДНК, подавление гликолиза, агрегацию и денатурацию белков, сшивки белковых молекул и нитей ДНК, укорочение теломер, перекисное окисление липидов, апоптоз или некроз (Кольтовер, 1998; Orr, Sohal, 1994; Vayssier, Polla, 1998; Oxidative DNA damage ..., 2001; Mitochondria, aging and ..., 2001; Skulachev, 2001; Effects of UVB-induced ..., 2010; Биологическая роль ..., 2012).

В здоровом организме АОЗ эффективно поддерживает концентрацию оксидантов на физиологическом уровне (Ji et al., 1991). Известно, что с возрастом окислительный стресс усиливается, а его прогрессирующее развитие можно считать одним из маркеров старения. Вероятно, что возрастание окислительного стресса при старении является следствием снижения эффективности АОЗ (Ames, 2004).

Таким образом, ферменты АОЗ играют важную роль в защите клетки от повреждений, которые вызываются активными формами кислорода, тем самым оказывая влияние на ПЖ. Причиной окислительного стресса является действие разнообразных факторов среды и нарушение баланса про- и

антиоксидантов. В поддержании безопасного уровня свободных радикалов участвует система АОЗ.

1.2.3. Ионизирующие излучения

Ионизирующее излучение (ИИ) – это любое излучение, вызывающее ионизацию среды, т. е. протекание электрических токов в среде (в том числе и в организме человека), что приводит к разрушению клеток, изменению состава крови, ожогам и другим тяжким последствиям (Гусев, 1989).

По виду частиц, которые входят в состав ИИ, различают α -, β - и γ -излучение, рентгеновское излучение, нейтронное излучение, протонное излучение и др.

Заряженные α - и β -частицы, проникая в ткани организма, теряют энергию в ходе электрического взаимодействия с электронами тех атомов, близ которых они проходят (Curie, 1989).

Биологическое действие ИИ на молекулярном уровне в основном связано с повреждениями наиболее чувствительной мишени – молекулы ДНК (Valentin, 2005; Lehnert, 2007). Было показано, что повреждение ДНК у млекопитающих приводит к десинхронизации циркадных ритмов (Phase resetting of the..., 2008).

В ответ на воздействие ИИ в клетках активируются различные сигнальные пути. Среди ключевых ферментов, запускающих данные реакции, можно выделить киназы ATM и ATR, ДНК-зависимую протеинкиназу, протеинкиназу C, MAPK, Chk1/Chk2 (Suzuki et al, 2001; Stress and radiation..., 2003).

Активные протеинкиназы в свою очередь активируют ядерный фактор κB (NF- κB) и транскрипционный фактор p53 (Schreck et al., 1992; Vogelstein et al., 2000). Транскрипционная активность p53 играет важную роль в радиационном адаптивном ответе, стимулируя экспрессию генов регуляции клеточного цикла (*p21*), репарации ДНК (*GADD45a*), клеточного старения (*p16*) и апоптоза (*BH3*, *PUMA*, *NOXA*).

В ответ на воздействие ИИ происходит остановка клеточного цикла в контрольных точках G1/S, S/G2, G2/M и M. Остановка клеточного цикла необходима для инициации механизмов репарации ДНК.

Белки GADD45 α и β являются мишенями транскрипционных факторов p53 и FOXO, соответственно (Carrier et al., 1999; Furukawa-Hibi et al., 2002). В ответ на повреждение ДНК они быстро накапливаются в клетке и контролируют активность белков эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов – PCNA, XPC и XPG, а также они обеспечивают доступность поврежденных участков ДНК для ферментов репарации (Ma et al., 2009).

Если механизмам репарации не удалось восстановить поврежденное ДНК, то клетка переходит в состояние стресс-индуцированного клеточного старения или идет по пути программируемой клеточной гибели – апоптоза (Probin, 2006).

Таким образом, воздействие ИИ в первую очередь связано с повреждением молекулы ДНК, подавляет выработку мелатонина, что в конечном счете влияет на стрессоустойчивость и ПЖ организмов.

1.2.4. Ограничительная диета

Одно из первых мест среди причин, ведущих к преждевременному старению, занимают разнообразные нарушения режима питания. Старение организма – сложный и многогранный процесс и он не может быть сведен к одному механизму, но разумное питание благотворно влияет на процесс старения. Достаточное количество энергии и необходимые питательные вещества являются обязательным условием для нормального роста и развития. В свою очередь, неограниченный доступ к высококалорийной пище может принести вред организму. Линии крыс и мышей, содержащиеся в лабораторных условиях, живут значительно дольше, если количество потребляемой ими пищи ниже *ad libitum* (Partridge et al., 2005).

Предполагается, что в механизмах увеличения продолжительности жизни при ограничении калорийности питания основную роль играют такие

факторы, как замедление роста, снижение плодовитости, уменьшение содержания висцерального жира в теле, замедление нейроэндокринных или иммунологических возрастных сдвигов, увеличение репарации ДНК, изменения скорости биосинтеза белков (Анисимов, Соловьев, 1999; Guarente, Kenyon, 2000; Partridge, Gems, 2002). Скорее всего, нервная система животных, воспринимая сигнал о недостатке пищи, запускает адаптационную программу стресс-ответа, приводящую к повышению экономичности метаболизма и стрессоустойчивости, что и обуславливает долгожительство (Москалев, 2008). Это явление носит название «ограничительная диета». Имеются данные о том, что уменьшение калорийности пищи приводит к увеличению медианной и максимальной продолжительности жизни лабораторных животных (нематоды, дрозофилы, млекопитающих) (Mortality and morbidity..., 2003; Delay of T cell..., 2006; Caloric restriction and..., 2006; Holloszy, Fontana, 2007).

Гены циркадных ритмов синхронизируют биохимические процессы в клетках и таким образом могут быть ответственны за оптимизацию обмена веществ. Было показано, что ограничительная диета увеличивает амплитуду экспрессии генов циркадных ритмов, как у мышей, так и дрозофил. Таким образом, способствуя увеличению обмена жиров, что в свою очередь ведет к увеличению ПЖ (Circadian clocks govern..., 2015; Peripheral circadian clocks..., 2015).

Было показано, что высоко жировая диета негативно влияет на молекулярный механизм, который контролирует внутренние биологические часы, и обменные процессы в печени (Sassone-Corsi, 2013). Высококалорийная диета перепрограммирует циркадные часы печеночного метаболизма через блокирование нормальных циклов и работу соответствующих генов (*BMAL1*) и инициирует новую программу колебаний активности генов (через активацию транскрипционного регулятора PPAR), которые в обычном состоянии не активны (Sassone-Corsi, 2013). Нарушение

циркадных ритмов может явиться причиной сахарного диабета, ожирения, повышенного артериального давления.

Рассмотрим основные механизмы влияния ограниченной диеты на ПЖ. По одной из версий, увеличение ПЖ происходит за счет уменьшения вероятности возникновения рака и других возраст-зависимых заболеваний. На лабораторных линиях мышей показано, что супрессия сигнального пути гормона роста (GH) за счет мутаций генов *GH*, *IGF1* или связанных с ними генов может приводить к увеличению ПЖ. Ограничение калорийности питания повышает чувствительность клеток к инсулину (Bartke et al., 2008). Также показано, что глюкоза укорачивает ПЖ *C. elegans* путем подавления активности комплекса DAF-16/FOXO и экспрессии гена аквапорина (DamID in *C. elegans* reveals..., 2010). Индукция белка SIRT1 способствует выживаемости клеток в ответ на ограничение диеты. Он деацетилирует белок репарации ДНК Ku70, который блокирует вход проапоптозного фактора Bax в митохондрии. Таким образом, происходит ингибирование апоптотической гибели клетки (Bordone, Guarente, 2005). У дрозофил с низкокалорийной диетой и долголетием ассоциированы сигнальные механизмы, опосредуемые белками Sir2 и p53, а также 4E-BP (BP extends lifespan..., 2009). Выключение активности Sir2 подавляет увеличение ПЖ при недостатке калорий.

В вопросе продления продолжительности жизни за счет ограничительной диеты большое значение отводится тому, какие именно компоненты питания мы ограничиваем. Ограничение поступления калорий без снижения поступления белков приводит к долгожительству. Снижение содержания одной только аминокислоты метионина увеличивает ПЖ мышей и крыс. Питание одинаковой по калорийности пищей, в которой мало либо жиров, либо минеральных компонентов не приводит к увеличению ПЖ (Methionine-deficient..., 2005; Sun et al., 2009). Мухи, живущие на среде с одинаковой калорийностью, но с разной концентрацией питательных веществ, заметно различаются по ПЖ. К долгожительству у них приводит

снижение в диете доли дрожжей или сахара (Helfand, Rogina, 2003; Min, Tatar, 2006).

Таким образом, снижение калорийности питания увеличивает здоровый период жизни. К молекулярным механизмам влияния низкокалорийной диеты на скорость старения следует 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.

Итак, на все живые организмы воздействует целый комплекс абиотических и биотических факторов, которые обладают как отрицательными, так и положительными эффектами на продолжительность жизни. В зависимости от модальности, интенсивности и длительности воздействия меняется соотношение уровня накопления повреждений и активности индуцибельных систем стрессоустойчивости (белки теплового шока, антиокислительные ферменты, белки репарации ДНК, киназы факторы транскрипции), что приводит к ускорению или замедлению процессов старения (Age-dependent loss and..., 1987; Sohal, 1990; Kapahi, 1999; Morley, Morimoto, 2004; Longevity is associated with..., 2009).

Внешние условия среды постоянно меняются, и это требует наличия способности к адекватному приспособлению. На сегодняшний момент известно, что одной из важных составляющих адаптации является регуляция биологических ритмов.

1.3. Механизмы регуляции циркадных ритмов в связи со старением

Гены, экспрессирующиеся ритмично и способные к синхронизации циклической активности с внешними воздействиями присутствуют уже у архей и цианобактерий (группы генов *cir* и *kai*), но порядок межгенных взаимодействий существенно отличен от такового у эукариотических клеток (Johnson, 1986). В белках, кодируемых генами циркадных ритмов прокариот,

не обнаружено доменов, связывающих ДНК. Таким образом, наблюдаемые петли обратной связи являются посттрансляционными (Hut, Beersma, 2011). К примеру, 60% генома цианобактерии *Synechococcus elongatus* подчиняются осциллятору, состоящему из трех белков KaiA, KaiB и KaiC, не связывающихся с ДНК (Kondo, 1994).

Перейдем к рассмотрению осциллятора одноклеточных эукариот на примере представителя аскомицет *Neurospora crassa*. У этого гриба формируется уже транскрипционно-трансляционная петля отрицательной обратной связи циркадного осциллятора (Lee et al., 2000). Базовым элементом ее являются продукты генов *WC-1* (осуществляет фоторецепцию) и *WC-2*, образующие трансактиваторный комплекс WCC, индуцирующий экспрессию гена *frequency*, а так же экспрессию многих других подконтрольных ему генов, не относящихся к центральному осциллятору (Baker et al., 2012). FRQ, кодируемый геном *frequency* и определяющий период осцилляций, связывается с FRH, образуя димер, репрессирующий *wc-1* и *wc-2*, так петля замыкается.

Среди многоклеточных эукариот необходимо упомянуть о циркадных генах нематоды. В настоящее время установлена осцилляторная активность генов *lin-42* (гомолог *PER* млекопитающих) и *aha-1* (гомолог *CLOCK*). Эти гены являются ключевыми в процессе детерминирования ритмики (Jeon, 1999). Впрочем, гомологи и паралоги всех остальных циркадных генов более высокоразвитых организмов (*tim-1*, *ces-2*, *atf-2*, *kin-20/kin-19*, *gsk-3*, *kin-3*, *kin-10*, *gsp-1/gsp-2*, *sur-6*), за исключением *pdf-1,-2*, задействованы в процессах развития, но, по-видимому, совершенно не принимают участия в генерации циркадных ритмов. По данным недавнего исследования транскриптома *C. elegans*, осцилляции уровня экспрессии в ответ на воздействие классических факторов, задающих период колебаний, а именно светового и температурного режимов, отмечаются в гомологических группах, имеющих мало общего с циркадной ритмикой у других организмов (Hasegawa et al., 2005).

У плодовой мушки гомологи генов млекопитающих *Clock* (*Clk*) и *cycle* (*cyc*) кодируют белки CLK/CYC димера, стимулирующие, в свою очередь, экспрессию *period* (*per*) и *timeless* (*tim*). В последствии продукты *per* и *tim* формируют гетеродимеры, которые осуществляют репрессию генов *Clk* и *cyc* и, соответственно, свою собственную (Hardin et al., 2011). В другой петле отрицательной обратной связи комплекс CLK/CYC индуцирует экспрессию генов транскрипционных факторов *Par domain protein 1ε* (*Pdp1ε*) и *vri* (*vri*), первый из которых ведет себя как активатор *Clk*, а второй как его репрессор (*vri*, *Pdp1*, and *dClock* form..., 2003). Отдельного упоминания заслуживает ген *cwo*, его продукт репрессирует собственную экспрессию, транскрипцию *tim*, *Pdp1*, *per* и *vri*. Функционально белок CWO – антипод димера CLK/CYC (Clockwork orange encodes..., 2007).

Рассмотрим современную модель молекулярного осциллятора млекопитающих. Он состоит из двух взаимозависимых петель обратной связи: CLOCK, наряду с NPAS2 и BMAL1, известным также под названием ARNTL, активируют транскрипцию генов, кодирующих белки PER1 и PER2, а также CRY1 и CRY2 (Kondratov et al., 2007). Многокомпонентные корепрессорные комплексы на базе PER и CRY, включающие множество других полипептидов, достигая предельной концентрации, связываются с CLOCK/BMAL1, тем самым подавляя его способность активировать транскрипцию подконтрольных генов *per* и *cry* (Partch et al., 2014). Постепенно система приходит в состояние, когда концентрация упомянутых белковых комплексов становится недостаточной для поддержания CLOCK/BMAL1 в деактивированном состоянии. Когда возобновляется процесс накопления PER/CRY, первая петля запускается вновь.

Существует гипотеза независимости репрессорных свойств PER и CRY. Основным аргументом её сторонников является способность *mCRY2* функционально замещать *mPER2* у нокаутных животных.

Во второй петле обратной связи CLOCK/BMAL1 осуществляет положительный контроль транскрипции REV-ERBα и REV-ERBβ, которые

репрессируют ген *Bmal1* (Preitner et al., 2002). REV-ERB α и REV-ERB β контролируют транскрипцию *per* и *cry*, модулируя фазу их экспрессии, наряду с экспрессией множества генов, не относящихся к осцилятору. Концентрации REV-ERB α и REV-ERB β колеблются с большой амплитудой, они периодически связываются с *RORE* последовательностями в ДНК промоторов генов *Clock* и *Bmal1*, где конкурируют с ROR α , ROR β и ROR γ , являющимися трансаktиваторами *Clock* и *Bmal1* (Preitner, 2002) (рис.1).

Существуют также метаболические механизмы регуляции циркадных ритмов. В частности, для одноклеточных и многоклеточных организмов известны суточные колебания внутриклеточной концентрации ионов Mg²⁺. Так как от концентрации магния зависит обмен АТФ и ГТФ, то от неё же зависит энергетический расход клетки и активность большого количества ферментов (в первую очередь АТФ- и ГТФ-зависимых). Показана также двусторонняя обратная связь циркадных колебаний концентрации магния с экспрессией генов циркадных часов (Daily magnesium fluxes..., 2016).

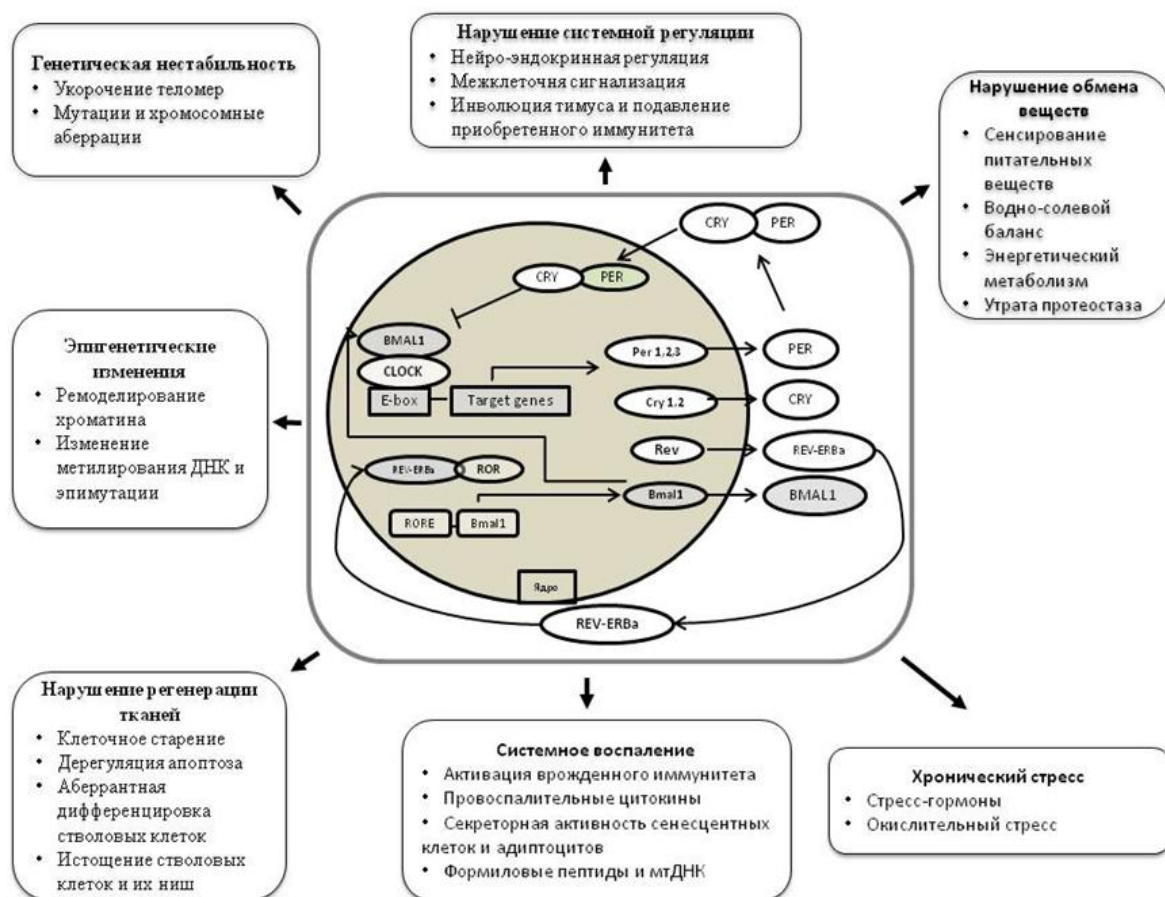


Рисунок 1. Центральный осциллятор и его роль в процессе старения на примере млекопитающих (Соловьёв и др., 2016).

1.3.1. Роль генов циркадных ритмов в механизмах старения

Около 20-43% генов любой клетки человека находятся в зависимости от циркадных регуляторов. Так, известно, что основной гетеродимер CLOCK/BMAL1 контролирует экспрессию целой группы генов, объединяемых под общим названием *CCGs* (*clock controlled genes*) (Katewa, 2015).

Примером транскрипционного фактора, подвергающегося влиянию гетеродимера CLOCK/BMAL1, является продукт гена *NRF2*, сопрягающий осциллятор с локальными системами детоксификации свободных радикалов, в их числе: *Gclm* (*glutamate-cysteine ligase modifier*) и *Gsta3* (*glutathione S-transferase A3*). Стоит отметить, что синдром ускоренного старения Хатчинсона-Гилфорда связан с репрессией *NRF2* пути (Kubbenetal et al.,

2016). Таким образом, повышение концентрации гетеродимера может способствовать замедлению старения тканей дыхательной системы вследствие увеличения устойчивости к оксидативному стрессу (Delayed ageing through damage..., 2007).

Под контролем циркадных ритмов находятся гены, регулирующие клеточный цикл и подавляющие клеточное старение - необратимый выход из клеточного цикла. В частности, CLOCK/BMAL1 непосредственно контролирует экспрессию гена *Wee1*, который, в свою очередь, отвечает за переход G2/M в клеточном цикле (Katada, Sassone-Corsi, 2010). Кроме того, димер регулирует экспрессию онкогена *c-myc*, под контролем которого находится переход от интерфазы к пресинтетической фазе, а также гена *Cyclin D1*, контролирующего переход от пресинтетической к синтетической (Tasselli et al., 2015).

Следует отметить, что некоторые исследователи показали связь между сигнальными путями, формирующими ответ на повреждение ДНК (ключевой фактор индукции клеточного старения), и продуктами циркадных генов. PER1 и TIM взаимодействуют с киназами свёрточных точек (checkpoints) клеточного цикла ATM и ATR (Kondratov, Antoch, 2007). Они ответственны за реакцию клетки на двухцепочечные и одноцепочечные разрывы ДНК, соответственно. ATM аутофосфорилируется, фосфорилируя затем различные контроллеры клеточного цикла, репарационных и других процессов (Kamminga et al., 2006). Субстратом этой протеинкиназы является и хорошо изученный транскрипционный фактор p53, инициирующий остановку клеточного цикла, клеточное старение или апоптоз (Hirayama et al., 2007). Стабилизированный p53 активирует различные сигнальные пути, формируя стресс-ответ клетки или включает программу самоуничтожения. Несмотря на то, что активный p53 на клеточном уровне вызывает необратимую остановку цикла делящихся клеток, на уровне целого организма сверхэкспрессия p53 способна замедлять старение нервной системы и продлевать жизнь мышей (Masri et al., 2012). Вероятно, это связано с уменьшением доли животных,

погибших от онкологических заболеваний. По другим данным, введение дополнительной копии *p53* (Yamamoto et al., 2007) или снижение уровня экспрессии гена *Mdm2*, приводящего к протеасомальной деградации белка *p53*, хотя и защищает от рака, но не сказывается на показателе максимальной продолжительности жизни популяции (Preyat, Leo, 2013).

В продолжение укажем на место в циркадной системе факторов эпигенетической модификации, роль которой в старении трудно переоценить. Не столь давно была установлена связь гистонметилтрансферазы MLL1 с молекулярным осциллятором. Она взаимодействует с CLOCK/BMAL1 и в комплексе модифицирует промоторы *CCGs*, усиливая их экспрессию. После присоединения к комплексу деацетилазы гистонов SIRT1 экспрессия прекращается (Rogina et al., 2004). Связь эту можно назвать реципрокной, поскольку оказалось, что SIRT1, управляемый опосредованно через никотинамид фосфорибозилтрансферазу NAMPT димером CLOCK/BMAL1, деацетилирует в том числе и промотор самой *Mll1*. MLL1 принимает участие в процессах омоложения гематопозитических стволовых клеток (Disruption of the clock components..., 2009). Роль самого SIRT1 в старении и долголетию подробно рассмотрена далее.

Гистонацетилтрансфераза CLOCK ацетилирует BMAL1 в качестве альтернативного субстрата. Это ведет к CRY-опосредованной репрессии. Следует отметить, что CLOCK всё же способен к ремоделированию хроматина в промоторах clock-контролируемых генов, среди которых известна не одна детерминанта старения (Nakagawa, Guarente, 2011). В свою очередь, SIRT1, NAD^+ -зависимая гистондеацетилаза, снимает ацетильную группу с BMAL1, а также с PER2. К числу мишеней этого фермента относятся, помимо элементов «часового механизма», лизины K9/K14 гистонов H3 промоторов генов, управляемых циркадной системой (Huang et al., 2007) (табл. 1).

Таблица 1 Эволюционный консерватизм и функции генов циркадных ритмов.

Белок	Ген	Ортолог у <i>D.melanogaster</i>	Ортолог у <i>C.elegans</i>	Ортолог у <i>neurospora</i>	Физиологическая функция
PERIOD	<i>PER1, PER2, PER3</i>	<i>per1, 2, 3</i>	<i>lin-42</i>	<i>frq</i>	Негативно регулирует MAPK14 / p38 и MAPK8 / JNK MAPK каскады, а также последующую активацию NFκB. Регулирует циркадные ритмы, циклы сна и бодрствования, синхронизирует осциллятора с фотопериодом, гравитаксис, локомоторные ритмы, половое поведение, нейропептидный сигнальный путь.
CIRCADIAN LOCOMOTOR OUTPUT CYCLES PROTEIN KAPUT	<i>CLOCK</i>	<i>Clk</i>	<i>aha-1</i>	<i>wc1</i>	Кодируемый белок образует гетеродимер с Arntl (BMAL1), который связывает элементы E-BOX с генами <i>period</i> (<i>Per1, Per2, Per3</i>) и <i>cryptochrome</i> (<i>Cry1, Cry2, Cry3</i>) и активирует их транскрипцию. Образует основной компонент циркадных часов. Участвует в циркадной регуляции экспрессии генов, циклов сна и бодрствования, адаптивном ответе на тепловой шок.
NEURONAL PAS DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2	<i>NPAS2</i>				Участвует в метаболизме липидов, клеточном ответе на повреждение ДНК, регуляции экспрессии генов циркадных ритмов, регуляции циклов сна и бодрствования.
ARYL HYDROCARBON RECEPTOR NUCLEAR TRANSLOCATOR-LIKE PROTEIN 1/BMAL1	<i>ARNTL/BMAL1</i>	<i>cyc</i>	<i>aha-1</i>	<i>wc2</i>	Действуют в виде гетеродимера и активирует транскрипцию генов ARNTL / BMAL1. Позитивно регулирует миогенез и негативно регулирует липогенез через транскрипционный контроль генов канонического Wnt сигнального пути. Играет важную роль в производстве ритма. Регулирует

					глюкозо-стимулированную секрецию инсулина с помощью регулирования антиоксидантных генов <i>NFE2L2 / Nrf2</i> и целевых <i>SESN2, PRDX3, CCLC</i>. Отрицательно регулирует mTORC1 путь; регулирует экспрессию MTOR и DEPTOR. Регулирует экспрессию <i>HSD3B2, STAR, PTGS2, CYP11A1, CYP19A1</i> и <i>LHCGR</i> в яичнике, а также гены, участвующие в росте волос. Играет важную роль во взрослом гиппокампе нейрогенеза путем регулирования своевременного вступления нервных стволовых клеток/клеток-предшественников (NSPCs) клеточного цикла и количество клеточных делений, которые происходят до выхода из клеточного цикла.
CRYPTOCHROME 1, 2	<i>CRY1, CRY2</i>	<i>cry</i>	-	<i>frh</i>	Гены PER1/ 2/3 и CRY1 / 2, образуют транскрипционные репрессоры негативного звена петли обратной связи и взаимодействуют с CLOCK NPAS2-ARNTL / BMAL1 ARNTL2 / BMAL2. Репрессор транскрипции, который образует основной компонент циркадных часов. Играют важную роль в регуляции биологического ритма.
TIMELESS CIRCADIAN CLOCK	TIMELESS	<i>tim</i>	<i>tim-1</i>	-	Играет важную роль в контроле репликации ДНК, поддержание стабильности генома во время репликации ДНК и в регуляции циркадных ритмов. Образует комплекс с TIPIN, и этот комплекс регулирует процессы репликации ДНК в нормальных и стрессовых условиях. TIMELESS способствует ядерной локализации TIPIN. Участвует в выживаемости клеток после повреждения ДНК.
RAR-related orphan receptor alpha	<i>RORA</i>	-	-	<i>vvd</i>	Влияет на длину периода и стабильность биологических ритмов. Является ключевым

					регулятором эмбрионального развития, клеточной дифференцировки, регуляции циркадного ритма, а также липидов, стероидов, ксенобиотиков и участвует в метаболизме глюкозы. Требуется для нормального развития мозжечка, регулирует экспрессию гена <i>SHH</i> . Регулирует гены, участвующие в метаболизме липидов, таких как <i>APOA1</i> , <i>APOA5</i> , <i>APOC3</i> и <i>PPARG</i> . Также он участвует в регуляции метаболизма глюкозы в печени за счет модуляции <i>G6PC</i> и <i>PCK1</i> . Может подавлять рост клеток в ответ на клеточный стресс. Может оказывать противовоспалительный эффект, вызывая экспрессию <i>CHUK</i> и ингибирования <i>NF-kappa-B</i> .
Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1	<i>NR1D1,2</i>	-	-		Интегральная составляющая комплексного аппарата транскрипции, который регулирует циркадную ритмичность. Кроме того, регулирует гены, участвующие в метаболических процессах, в том числе липидов и метаболизма желчных кислот, адипогенеза, глюконеогенеза. Регулирует липидный обмен, подавляя экспрессию. Регулирует глюконеогенез через репрессии <i>G6PC</i> и <i>PEPCK</i> . Подавляет экспрессию <i>SERPINE1</i> / <i>PAI1</i> , важного модулятора сердечно-сосудистых заболеваний и выражения воспалительных цитокинов и хемокинов в макрофагах. Играет роль в циркадной регуляции температуры тела.

1.3.2. Сиртуины

Сиртуины (от названия дрожжевого белка Sir2 - silent mating-type information regulation 2) представляют собой группу белков с деацетилазной, моно-АДФ-рибозилтрансферазной, демалонилазной, десукцинилазной и некоторыми другими видами активности (Hsu et al., 2008). Под контролем сиртуинов находятся процессы клеточного старения, апоптоза, транскрипции, биогенеза митохондрий, а так же циркадные ритмы. У млекопитающих описано семь сиртуинов, для сравнения, у дрозофилы обнаружено только пять последовательностей (Parmentier et al., 2013).

В высоких концентрациях продукт гена *sirt2* дрозофил обнаруживается в ядрах нейронов, цитоплазме и ядрах клеток жирового тела. Сверхактивация *sirt2* в нервной ткани на стадии личинки продлевает жизнь самцам и самкам соответственно на 20 % и 52 % (Ro et al., 2013). SIRT1 способен регулировать собственную активность, связываясь с димером CLOCK/BMAL1 (Anwar et al., 2016).

Старение, прежде всего, – постепенная утрата клеткой и организмом способности реагировать на стресс и возвращать организм к норме после воздействия. Роль сиртуинов в формировании стресс-ответа более не подвергается сомнению. Например, участие этих белков в стресс-ответе обнаруживается при ограничении калорийности питания и голодании, что объясняется их способностью к высвобождению липидов, депонируемых жировой тканью. Помимо этого, сиртуины участвуют в переключении между путями окисления глюкозы и липидов в скелетной мускулатуре и печени (Hwang et al., 2014).

SIRT1-опосредованное деацетилирование гистонов H3 по K9/K14 наблюдается рядом с промоторами транскрипционных факторов, таких как FoxO, E2F1, p300/CBP и PPAR-γ (Moskalev et al., 2011). В числе мишеней сиртуинов – инсулин/IGF-1 сигнальный путь и подавляемые этим путем Forkhead box (FoxO) транскрипционные факторы, связанные с энергетическим гомеостазом. В семействе FoxO у млекопитающих четыре

белка: FoxO1, FoxO3, FoxO4, FoxO6. Трансактиваторная функция этих белков подавляется участниками инсулинового/IGF сигнального пути посредством PI3k/Akt-механизма (Kanfi et al., 2012). Данный факт дает основание утверждать связь этих путей с контролем процесса старения посредством регуляции метаболизма, канцерогенеза, пролиферативной способности, механизмами формирования стресс-ответа, нейрогенеза и апоптоза (Circadian clock protein..., 2012).

Установлено, что SIRT1 взаимодействует с провоспалительными транскрипционными факторами семейства NF-κB (The circadian rhythm..., 2014). Последние ускоряют процесс старения, инициируя хроническое воспаление в различных тканях (Antagonistic effects of telomerase..., 2005). Хроническое воспаление является одним из ключевых механизмов старения, а ингибирование NF-κB сигнального пути приводит к увеличению продолжительности жизни. Данные о SIRT6 были получены несколько раньше, замечена коактивация RELA, фактора транскрипции из этого же семейства (De Bruyne et al., 2007). Суть этой связи заключается в ингибировании сигнального каскада NF-κB, ведущем к продлению жизни (Core circadian protein CLOCK..., 2012). Далее обратимся к роли в старении регулярных составляющих базовых димеров осциллятора.

1.3.3. Роль гена *Bmal1* в регуляции процесса старения

Среди известных генов циркадных ритмов, ген *Bmal1* является единственным, удаление которого приводит к полной потере циркадных ритмов (Timing of expression of..., 2016).

Еще одним доказательством того, что циркадные часы вовлечены в контроль процесса старения, может служить исследование, в котором мышь с недостаточностью продукта гена *Bmal1*, вызванной мутацией, проявляла фенотип ускоренного старения (Yang et al., 2016). Согласно новым данным, циркадная система сопряжена с mTOR-S6K путем передачи сигнала именно посредством упомянутого гена (A role for the segment..., 2001).

Продолжительность жизни *Bmal1*-дефицитных трансгенных животных почти в четыре раза короче, нежели у контрольной группы. Помимо этого у подопытных мышей существенно раньше отмечаются такие зависимые от возраста патологии, как воспаление роговицы, катаракта, саркопения, остеопороз, опущение внутренних органов, облысение, редукция висцеральной и подкожной жировой ткани, изменения состава крови. Замедлить старение мышей с недостатком BMAL1 удалось при помощи антиоксидантов, в частности, N-ацетилцистеин продлил их жизнь на 30% (Kondratov, Antoch, 2009). Муха с мутацией гомолога BMAL1, гена *сус*⁰¹, жила меньше, эффект показывал гендерную специфичность: у самцов обнаруживали снижение медианной продолжительности жизни (Zhang et al., 2014).

Ген *Bmal1* участвует в контроле метаболизма глюкозы и жиров, а также системах, формирующих ответ на генотоксический стресс, Главенствующим объяснением природы геропротекторных свойств белка BMAL1 является указание на его способность к ингибированию mTOR-киназного каскада, дерегуляция которого приводит к развитию рака и преждевременному старению (The human Tim/Tipin complex..., 2007).

1.3.4. Роль генов *Clock* и *NPAS2* в регуляции процессов старения

Делеция гена *Clock* связана с развивающейся довольно рано, сравнительно с диким типом, катарактой и обширным дерматитом. У *Clock*-дефицитных мышей отмечается снижение продолжительности жизни на 10% (The human Tim/Tipin complex..., 2007). Мыши с индуцированной недостаточностью экспрессии *Clock* имеют низкую активность теломеразы. Данный факт может послужить одним из ключевых объяснений наблюдаемого сокращения продолжительности жизни. Длина теломер, несомненно, существенна в процессе старения клетки. По некоторым данным этот показатель важен и при определении продолжительности жизни, так ее укорочение может быть связано с компенсацией функции

CLOCK в гетеродимере CLOCK/BMAL1 его парологом NPAS2 (Lemberger et al., 1996).

Отмечена способность CLOCK связываться с транскрипционным фактором NF-κB, а именно стимулировать его, т.к. в случае нокаута CLOCK наблюдается снижение активности NF-κB относительно клеток дикого типа (Reciprocal regulation of brain..., 2006). Во втором случае механизм функционирует при посредничестве серин-треониновой киназы GSK-3β, сверхэкспрессия гена которой у дрозофилы ведет к появлению сдвигов в циркадной ритмике за счет гиперфосфорилирования TIM, ключевого белка, формирующего димер с PER и осуществляющего таким образом непосредственный контроль над работой всей петли обратной связи (Wang et al., 2008).

Отдельно отметим, что инсулин оказывает влияние на транскрипцию *Clock*, тем самым устанавливается обратная связь метаболизма нутриентов, столь важного в процессе старения, и циркадной системы (Aging alters circadian..., 2015).

1.3.5. Роль гена *timeless* в регуляции процесса старения

Ген *timeless* представляет собой ключевой ген циркадных ритмов дрозофилы, ортологи которого выявлены у мышей и человека (Li, 2015). У дрозофил он представлен в виде двух паралогов, *timeless* и *timeout*. Наиболее изучена в связи с механизмами старения роль гена *timeless*. Некоторые исследования указывают на связь гена *timeless* с регуляторами клеточного цикла, задействованными в контроле процессов старения. Ортолог *timeless* взаимодействует с киназой контрольных точек клеточного цикла Chk1 и ATR-ATRIP, ассоциированным с CRY2 (The circadian clock gene..., 2009). Утрата гена *tim* ведет к снижению продукции PER2. Считается, что *tim* ответствен за контроль репликации в отсутствие повреждающих ДНК воздействий (Loss of circadian clock..., 2012).

1.3.6. Влияние генов семейства *PERs* на процесс старения

Гены *PERs* являются потенциальными супрессорами опухолевого роста. Снижение их экспрессии может влиять на возникновение опухолей. У мышей с делецией генов *per1* и *per2* наблюдали ускоренное истощение пулов стволовых клеток, что обуславливало преждевременное старение (Mammalian clock gene..., 2010). Также было показано, что делеция гена *per2* может влиять на репликацию ДНК и накопление повреждений ДНК в процессе старения (Wang et al., 2015). Была выявлена роль *per1* и *per2* в регуляции работы митохондрий. У мышей с делецией этих генов отмечали изменение в митохондриальном дыхании (Circadian control of oscillations..., 2015). Показана взаимосвязь между *Sirt1* и *per2* (*Per2* induction limits..., 2016).

Довольно плохо освещена в современной литературе связь генов *Ppar* (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) с циркадными ритмами. Известно лишь, что *PER2* ингибирует *PPAR γ* , связываясь с его N-концевым доменом, тем самым препятствуя взаимодействию *PPAR γ* с мишенями (Zhdanova et al., 2011). Один из важнейших процессов, подконтрольных описанному каскаду - это метаболизм липидов, в известной степени определяющий качество жизни во всех возрастах (Lessons from autoimmune..., 2009). Суточные колебания уровней транскрипции и трансляции *Ppara* обнаруживаются в кишечниках крыс и мышей, а также в белой и бурой жировых тканях последних. Кроме этого, наличие в промоторе сайта связывания с *BMAL1* делает промоторы в генах *Ppara* мишенью *CLOCK/BMAL1*-димера. Тип взаимодействия можно характеризовать как петлю положительной обратной связи, хотя в кровеносных сосудах *PPAR α* управляет экспрессией *BMAL1* (O'Neill, Reddy, 2011).

Мушки с нулевой мутацией *per* на 30-й день жизни показывают существенно более высокую смертность при 24-часовой гипероксии (экспозиция атмосфере 100% кислорода) относительно дикого типа. Помимо этого, было выявлено повышение частоты появления свободнорадикальных повреждений белков и липидов, а так же свидетельствующее о

прогрессирующей нейродегенерации угасание спонтанной двигательной активности (Molin, Demir, 2014). Предполагается, что одна из ведущих ролей увеличения продления жизни при сверхактивации *per* принадлежит контролируемым циркадной системой генам-участникам метаболизма внутриклеточного антиоксиданта глутатион, уровень которого снижен в головах имаго дрозофил при старении (Molin, Demir, 2014). У дрозофилы, кроме этого, показан эффект продления периода жизни, в течение которого особи остаются активными, при сверхэкспрессии *per* и сокращения такового при дефиците этого белка (Kim, 2003). Выше перечисленное дает основания считать *per* одним из естественных нейропротекторов.

1.3.7. Влияние гена *cryptochrome* на продолжительность жизни

Сверхэкспрессия генов *CRY* ведет к достоверному увеличению продолжительности жизни дрозофил, возможно за счет снижения трансактивации воспалительного цитокина TNF- α , который, в свою очередь, в норме ингибирует CLOCK/BMAL1-ассоциированную экспрессию генов, несущих в промоторах *E-box* последовательности. Провоспалительные цитокины способны повышать уровень CRY1, индуцируя тем самым нарушение ритмики у мышей (Berson et al., 2003).

Реципрокность иммунной и циркадной систем в последнее время является объектом пристального внимания. Превосходно иллюстрирует зависимость циркадной ритмики и воспалительных процессов эксперимент, где мышам вводили компонент бактериальной стенки липополисахарид. В итоге исследователи наблюдали фазовый сдвиг, выразившийся в задержке ритмов (Kalsbeeka et al., 2012). Недостаток криптохромов приводит к активации цитокинов посредством активации ядерного транскрипционного фактора NF- κ B. Делеция генов *cry1* и *cry2* обостряет течение артритов через интенсификацию выработки интерлейкинов и фактора некроза опухолей (Berson, 2003). Явное снижение концентрации молекул адгезии (VCAM- 1, ICAM-1 и E-selectin), увеличивающих сродство моноцитов к эндотелиальным

клеткам, напрямую подтверждает участие генов *CRY* в механизмах, в том числе и возраст-зависимого воспаления, в первую очередь в патогенезе атеросклероза. Известен эффект ингибирования cAMP/PKA сигнального каскада за счет сверхактивации CRY1 (Kondratova, 2012). Упомянутый молекулярный каскад, подвергаясь супрессии, позволяет пулу гематопозитических стволовых клеток включиться в процессы регенерации тканей млекопитающих, в том числе снизить темпы возрастной инволюции иммунной системы (Tosini, Menaker, 1996).

1.4. Трансляционные осцилляторы эукариот и их место в процессе старения

Современной науке известен общий для всех живых организмов механизм, который можно назвать простейшим осциллятором – это одна из систем инактивации свободных радикалов кислорода, базирующаяся на сверхконсервативной группе белков пероксиредоксинов (PRX) (Helfrich-Förster et al., 1995). Исследования в области циркадной биологии по данной теме начались с открытия «редокс-часового механизма» в эритроцитах человека, клетках, утрачивающих ядра и митохондрии при созревании, следовательно, по определению не способных проявлять осцилляторную активность на базе транскрипционно-трансляционных петель обратной связи, где участвуют нуклеиновые кислоты (Hardin et al., 2011).

Колебания, собственно, представлены сменой редокс-статуса и переходом из мономеров в димеры белков пероксиредоксинов, которые несут на N-конце остатки цистеина, способного взаимодействовать с перекисью водорода и другими активными формами кислорода. Наряду с другими системами детоксификации свободных радикалов пероксиредоксины играют существенную роль в патогенезе возрастных заболеваний, участвуя в формировании комплексной реакции клетки на окислительный стресс (Hardin et al., 2011). Следует отметить, что связь пероксиредоксинов и клеточного старения была выявлена еще до открытия их способности к

проявлению осцилляторной активности. Делеция гена *PrxII* приводит к активации киназ p38 и ERK в фибробластах мышцы, а так же ERK и JNK в клетках кожи, что вероятно вызвано инактивацией фосфатаз (Romanowski et al., 2014). Эти изменения ведут к остановке клеточного цикла и к старению клетки.

Итак, влияние циркадных генов на процесс старения достаточно обширно, оно затрагивает множество молекулярных и клеточных механизмов, значимых в формировании возраст-зависимых патологий. В феноменологии старения присутствуют механизмы, поддерживающие стабильность генома, пути, ответственные за контроль над поступлением питательных веществ, регуляцию эпигенетической модификации, формирование стресс-ответа клетки, хроническое воспаление и многие другие. Все они подвергаются прямо или опосредованно воздействию циркадной системы, синхронизирующей их с фоторежимом и формирующей множественные адаптации на уровне организма.

1.5. Циркадные часы на организменном уровне

Основным фактором, сообщающим об изменении времени суток для человека и млекопитающих является свет. Фоторежим воспринимается клетками ганглиев сетчатки, которые содержат фотопигмент меланопсин, чувствительный к свету синей области спектра. От сетчатки информация по ретино-гипоталамическому тракту передается в супрахиазматические ядра (СХЯ) гипоталамуса, далее — в верхний шейный ганглий и от него — в эпифиз. В верхнем шейном ганглии нервный сигнал превращается в химический: нервные окончания ганглия выделяют в ткань эпифиза норадреналин, который активируют синтез мелатонина в эпифизе (Circadian rhythms in the..., 2012). Благодаря поступающему в кровь мелатонину, главный ритмоводитель контролирует и синхронизирует ритмы всех периферических органов и тканей. Также мелатонин контролирует суточный ритм синтеза других гормонов, в том числе гормонов репродуктивной

системы. В результате пик содержания половых гормонов в крови наблюдается в светлое время суток, в первой половине дня (Шишко и др., 2010). Если человек находится в условиях искусственного освещения перманентно, ночного подъема концентрации мелатонина в крови и, соответственно, снижения содержания гонадотропинов не происходит. Напротив, повышается уровень содержания половых гормонов в крови и нарушается функция их рецепторов. Отсюда — риск возникновения гормонозависимых патологий, некоторые из них ускоряют старение (Шишко и др., 2010).

Структура циркадной системы млекопитающих иерархична, её центральным звеном (пейсмейкером) у млекопитающих, задающим ритм осцилляций, являются СХЯ, локализованные в вентральном гипоталамусе, в которых представлено 10000 и 20000 клеток у крысы и человека соответственно (Hofman, Swaab, 2006). Стремясь поддерживать фазовую когерентность колебаний, нейроны ядер взаимодействуют между собой посредством синапсов, механизмов паракринной секреции и щелевых контактов (Hofman, Swaab, 2006). Ежедневно при воздействии света (цайтгебера) на структуры, предающие сигнал в СХЯ, происходит синхронизация молекулярных часов. Сигнал, конвертируемый нейронами из электрического в химический, изменяет фазу ритма экспрессии циркадных генов в СХЯ.

Довольно долгое время считалось, что СХЯ — единственный орган, ответственный за генерацию циркадных ритмов, но затем показали способность культуры клеток сетчатки вырабатывать мелатонин, до этого рассматривавшийся как гормон, имеющий эпифизарное происхождение (Melatonin prevents age-related..., 2008).

Рассмотрев тканевой осциллятор млекопитающих, обратимся к осциллятору насекомых, на примере *Drosophila melanogaster*. Клеточные часы мозга дрозофилы автономны и представлены всего примерно полутора сотнями клеток. Выделяют семь основных групп нейронов, названных в

зависимости от анатомического расположения. Группа пейсмекерных нейронов мозга контролирует остальные ганглии и периферические ткани, таким образом, циркадная система дрозофилы имеет четкую иерархию.

Важно отметить принципиальное сходство и гомологичность организации систем осцилляторов у млекопитающих и беспозвоночных.

Далее мы обозначим связь дерегуляции циркадной системы с патологиями, проявляющимися в позднем зрелом возрасте.

Обобщая данные литературы, можно сделать вывод, что в регуляции процессов старения и продолжительности жизни принимают участие разнообразные механизмы, которые протекают на клеточном, тканевом и организменном уровнях. Все они обеспечивают ответ на действие разнообразных стресс-факторов, адаптацию организма к условиям среды и поддержание гомеостаза, а также обеспечение репродуктивного успеха. Тем не менее, дополнительная стимуляция данных процессов может носить как позитивный характер, способствуя замедлению старения, так и вызывать негативные реакции из-за чрезмерной стимуляции некоторых функций клетки и организма. Наиболее фундаментальными для всех живых организмов являются молекулярно-клеточные механизмы. Немаловажную роль среди них выполняют механизмы генов циркадных ритмов. Стимуляция данных механизмов может привести к повышению стрессоустойчивости и увеличению продолжительности жизни организма в целом. Тем не менее, до настоящего момента не было экспериментально доказано, либо опровергнуто данное предположение. Данная работа направлена на изучение влияния сверхэкспрессии генов циркадных ритмов на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Drosophila melanogaster является удобным модельным объектом. У нее довольно короткий жизненный цикл и относительно небольшая максимальная продолжительность жизни. Полностью отсеквенирован геном, в котором большая часть генов является ортологами генов человека. Имеется большое количество линий с измененным генотипом, разработаны технологии молекулярной генетики, позволяющие создавать собственные трансгенные линии (Helfand, Rogina, 2003; Москалев, Яцкив, 2004).

2.1. Линии *Drosophila melanogaster*

Для изучения роли генов циркадных ритмов в процессе старения использовали линию w^{1118} и следующие трансгенные линии:

Линии с мутацией гена *cryptochrome*

$w; cry^{01}/+$ - Любезно предоставлены доктором Я. Гебультович, университет Орегона, США.

$w; cry^{02}/+$ - Любезно предоставлены доктором Я. Гебультович, университет Орегона, США.

Линии с UAS-конструкциями

$u, w; UAS-cry12/TM2$ (конструкция локализована на 3 хромосоме) и $u, w; UAS-cry24/CyO$ (конструкция локализована на 2 хромосоме) – несут дополнительную копию гена *cryptochrome*, который находится под контролем промотора UAS. Кодирован репрессор транскрипции, который образует основной компонент циркадных часов (Emery et al., 1998). Любезно предоставлены доктором П. Эмери, Университет Массачусетса, США.

$w; UAS-per10$ (встроена одна дополнительная копия *per*) и $w; UAS-per2.4$ (встроено две дополнительные копии *per*) – несут дополнительную копию гена *per* под контролем промотора UAS. Регулирует циркадные ритмы, циклы сна и бодрствования, синхронизирует осциллятор с фотопериодом, гравитаксис, половое поведение, нейропептидную сигнализацию (Stoleru et

al., 2007). Любезно предоставлены доктором П. Эмери, Университет Массачусетса, США.

$w; P\{UAS-CYC.HA\}$ – несет дополнительную копию гена *cycle* (ортолог гена *Bmal1*), находящийся под контролем промотора *UAS* (Tanoue et al., 2004). Белок, кодируемый этим геном, образует димер CLC/CYC, который стимулирует экспрессию *period* (*per*) и *timeless* (*tim*) (Hardin et al., 2011). Любезно предоставлены доктором П. Эмери, Университет Массачусетса, США.

$y, w; P\{tim-HA\}$ – несет дополнительную копию гена *tim* под промотором *UAS* (Yang and Sehgal et al., 2001). Его продукт формирует гетеродимер с белком Period, который осуществляет репрессию CLC/CYC комплекса и своей активности (Hardin et al., 2011). Любезно предоставлена доктором П. Хардиным, Центр исследований биологических часов, США.

$w; P\{UAS-Clk.HA\}$ – несет дополнительную копию гена *Clock* (*Clk*) под промотором *UAS*. Кодированный этим геном белок образует гетеродимер с CYC (ортолог BMAL1), который связывает элементы E-BOX с генами *per* и *cry* и активирует их транскрипцию (Allada et al., 2003). Любезно предоставлены П. Эмери, Университет Массачусетса, США.

Линии с драйвером GAL4

ELAV-GS (генотип $y; P\{ELAV-GeneSwitch\}$) – экспрессирует драйвер GAL4, активируемый мифепристоном (RU486), в нейронах (Poirier et al., 2008). Любезно предоставлены доктором Х. Кешишьян, Йельский университет, США.

GSG-311-2 (генотип $w; Sp/CyO; P\{MHC-GeneSwitch\}$) – линия, содержащая мифепристон-индуцибельный GAL4, вырабатываемый в мышечной ткани. Любезно предоставлены доктором Л. Сероуде, Королевский университет, Канада.

$P\{Switch1\}106$ (генотип $w[1118]; P\{w[+mW.hs]=Switch1\}106$) – линия с мифепристон-индуцибельным GAL4 в жировом теле (Roman et al., 2001). Мухи были получены из Bloomington Stock Center (США).

2.2. Сверхактивация генов циркадных ритмов

Для сверхактивации генов циркадных ритмов использовали *UAS-GAL4* систему с GeneSwitch драйвером *GAL4*, который активируется с помощью мифепристона (RU486) (Moskalev, 2012; A conditional tissue-specific..., 2001). Для получения особей дрозофил с кондиционной (мифепристон-индуцибельной) сверхэкспрессией изучаемых генов в мышечной системе, жировом теле и нервной системе, самцов линии с драйвером *GAL4*, который несет активатор транскрипции от дрожжей, скрещивали с виргинными самками, имеющими дополнительную копию исследуемого гена под контролем промотора *UAS*. При добавлении в пищу потомкам скрещивания этих двух линий агониста прогестерона мифепристона активируется экспрессия *GAL4*, в результате чего запускается транскрипция генов под контролем *UAS*. В качестве контроля использовали мух с таким же генотипом, но живущих на питательной среде без добавления мифепристона.

Для приготовления стокового раствора с концентрацией 25 мг/мл разводили мифепристон (Sigma) в 96% этаноле, затем добавляли в воду (1:100). 200 мкл полученного раствора наносили на поверхность питательной среды дрозофил. Контрольных мух содержали на среде, которую обрабатывали 0.96% раствором этанола.

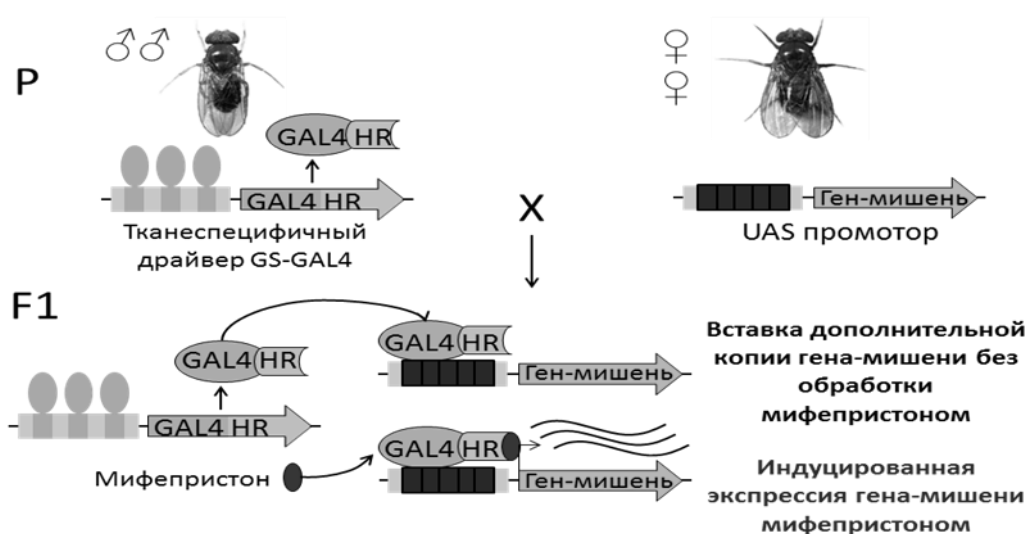


Рисунок 2. Схема активации кондиционной (мифепристон-индуцибельной) сверхэкспрессии изучаемых генов.

2.3. Анализ продолжительности жизни

Мух отбирали в течение 24 ч после вылета имаго и разделяли по полу. Дрозофил рассаживали по пробиркам в количестве 30 особей (не менее 150 мух на вариант эксперимента). Контрольных и опытных особей содержали в климатической камере Binder KBF720-ICH, 720 l-(Binder, Germany) при температуре 25 °C, 60% относительной влажности воздуха, 12-часовом режиме освещения на стандартной питательной среде (Ashburner, 1989). Эксперименты проводились в двух повторностях для каждого варианта. Мух пересаживали на свежую среду три раза в неделю. Количество умерших особей считали ежедневно. По полученным данным строили кривые дожития. Оценивали медианную продолжительность жизни и возраст 90% смертности.

2.4. Анализ влияния ограничительной диеты на продолжительность жизни

Для изучения влияния ограничительной диеты на продолжительность жизни контрольных и опытных особей содержали на двух вариантах среды: (1) среда с нормальным содержанием белков: 1% агара, 5% сахара, 5% дрожжевого экстракта; (2) среда со сниженным количеством белков: 1% агара, 5% сахара, 0.5% дрожжевого экстракта (Katewa et al., 2012; Zid et al., 2009).

2.5. 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 °С и 60% влажности. Два раза в день подсчитывали количество умерших особей. Эксперимент проводили до гибели последней дрозофилы.

2.6. Оценка возраст-зависимой динамики экспрессии изучаемых генов

Оценивали возраст-зависимое изменение экспрессии генов циркадных ритмов у особей линии w^{1118} , 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 (молодые особи, время характеризующееся наибольшей плодовитостью), 30 (средневозрастные, соответствует началу вымирания особей линии) и 50 (старые, соответствует возрасту 90 % смертности) 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) (табл. 2). Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad), используя следующую программу: 1) 95° С в течение 10 мин, 2) 95° С в течение 15 с, 3) 60° С 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).

Нуклеотидная последовательность прямого и обратного праймеров

Мишень	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>β-Tubulin</i>	5'-GCAACTCCACTGCCATCC-3'	5'-CCTGCTCCTCCTCGAACT-3'
<i>per</i>	5'-GGGATCATATCGCACGTGGAC-3'	5'-CTGCGGCCAATCAGGTCCTG-3'
<i>tim</i>	5'-GCCTGGGCAATGAGCCATTC-3'	5'-GAGGTGGAGGCTCTGACTGG-3'
<i>cry</i>	5'-CCACCGCTGACCTACCAAA-3'	5'-GGT-GGA-AGC-CCA-ATA-ATT-TGC-3'
<i>Clk</i>	5'-ATGATGACGCACGTCAGTTCGC-3'	5'-TCGATGGTGTTCTCGGTGATGC-3'
<i>cyc</i>	5'-AAGGAGCAGCTATCCTCACTGG-3'	5'-GGTCTTAACGGGCAACATGGTC-3'

Рассчитывали относительную экспрессию генов циркадных ритмов с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001) по величинам пороговых циклов (Ct), полученных с помощью программы ANK32 1.1 (Институт аналитического приборостроения, Россия). $\Delta\Delta Ct$ рассчитывали как $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (сверхэкспрессия исследуемого гена) – ΔCt (без сверхэкспрессии исследуемого гена), и каждое значение $\Delta Ct = Ct$ (исследуемый ген) – Ct (*β-Tubulin*).

2.7. 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).

2.8. Статистический анализ результатов

Для оценки статистической значимости различий по распределению смертности в выборках использовали 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 – с помощью коэффициента линейной корреляции 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 ПЖ и устойчивость к голоданию дрозофилы. Обнаружено, что у самцов с делецией исследуемого гена кривые выживаемости проходят ниже, чем у особей исходной линии w^{111} (рис. 3). Это говорит о снижении жизни особей с делецией гена *cry*. Анализ медианной ПЖ подтвердил данный результат. 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, обнаружено уменьшение показателя максимальной продолжительности жизни – возраста 90 % смертности у самцов на 10 – 19 % (различия достоверны при $p < 0.001$ по критерию Ванг-Аллисона) (табл. 4).

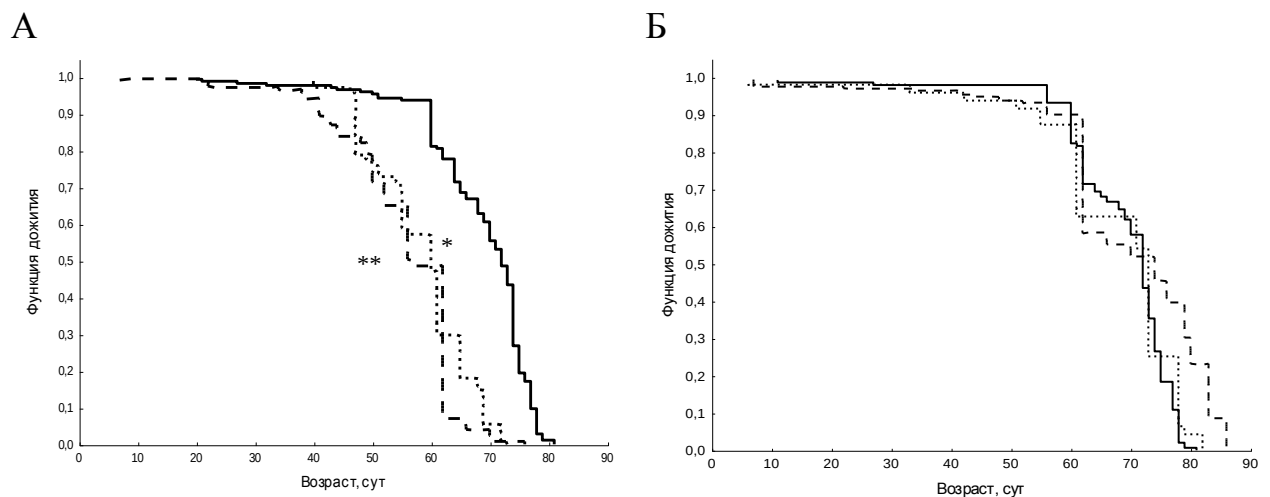


Рисунок 3. Продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) с мутацией гена

Обозначения: – w^{1118} , --- cry^{01} ; cry^{02} ; * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ (по критерию Колмогорова-Смирнова).

Таблица 4

Показатели качества жизни самцов и самок с мутацией гена *cry*

	Min	$\bar{X} \pm \Delta m$	M	90%	Max	MRDT	a	R	N
♂♂ <i>w</i> ¹¹¹⁸	20	68.7±0.8	72	77	81	4.23	0.16403	0	175
♂♂ <i>Cry</i> ^{01*}	7	55.4±0.9	57*	62*	76	5.2	0.13338	5e-05	123
♂♂ <i>Cry</i> ^{02*}	40	58.1±0.9	60*	69*	73	5.1	0.13583	3e-05	95
♀♀ <i>w</i> ¹¹¹⁸	11	68.7±0.8	72	78	81	4.17	0.16642	0	147
♀♀ <i>Cry</i> ⁰¹	7	69.5±1.1	74**	83**	86	7.03	0.09863	6e-05	172
♀♀ <i>Cry</i> ⁰²	7	69.1±0.7	73	78	82	6.17	0.11241	3e-05	148

Обозначения: *здесь и далее в табл. 5–9:* 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); a и R – параметры уравнения Гомпертца; MRDT – время удвоения интенсивности смертности; N – количество особей в выборке; ♂♂ – самцы; ♀♀ – самки; * p<0.001; ** p<0.01 (первый столбец – по критерию Колмогорова-Смирнова, четвертый столбец – по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; пятый столбец – по критерию Ванг-Аллисона).

Обнаружено, что у дрозофилы с мутацией гена *cry* по сравнению с особями исходной линии *w*¹¹¹⁸ спустя 72 ч процент выживших особей у мутантных самцов уменьшился на 35 % (различия достоверны при p<0.001 по ф-критерию Фишера), у самок на 33 % (p<0.001) по сравнению с особями исходной линии (рис. 4). Анализ других показателей выживаемости показал аналогичный результат (табл. 5).

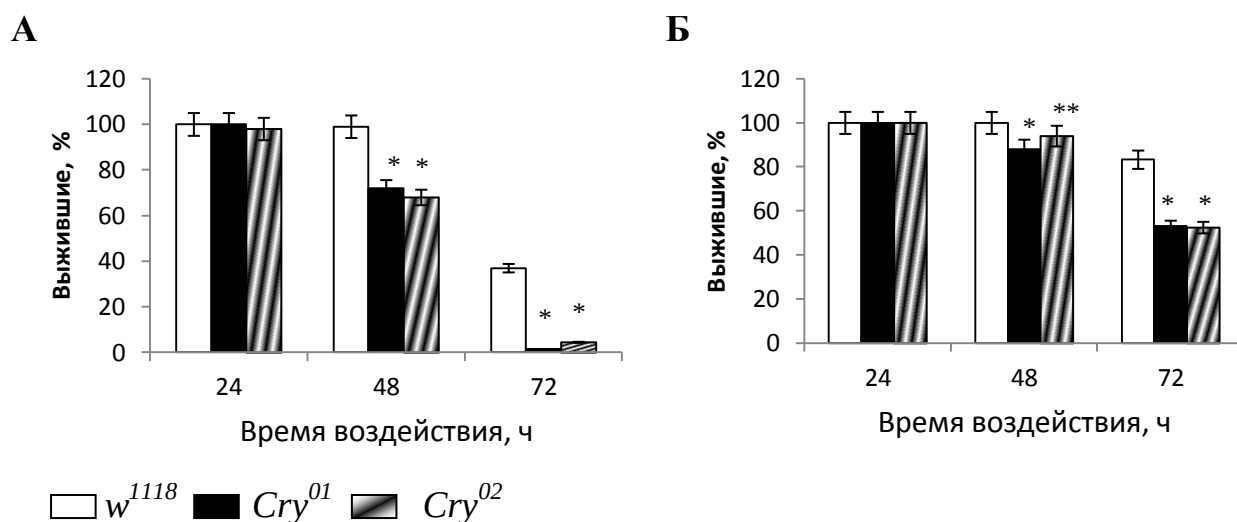


Рисунок 4. Влияние мутации гена *cry* на устойчивость самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster* к голоданию.

Обозначения: * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ – по χ^2 -критерию Фишера.

Таблица 5

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

	М	$\bar{X} \pm \Delta m$	24 ч	48 ч	72 ч	N
♂♂ w^{1118}	84	82.2 ± 0.8	100	99	37	175
♀♀ w^{1118}	96	88.4 ± 0.9	100	100	83,3	123
♂♂ Cry^{01}	60*	59.7 ± 1	100	72*	1,4*	195
♀♀ Cry^{02}	84*	77.2 ± 1.6	100	88	53*	147
♂♂ Cry^{02}	60*	58.3 ± 1.1	98	68*	4,5*	172
♀♀ Cry^{01}	84*	76.4 ± 1.6	100	94**	52,5*	148

Обозначения: ♂♂ - самцы; ♀♀ - самки; 24, 48 ч и 72 ч – процент выживших особей через 24, 48 и 72 ч после начала воздействия; N - количество мух в выборке; * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ (M – критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; 24, 48, 72 ч – χ^2 -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 5 сутки после появления имаго, через 30 сут (соответствует началу вымирания особей линии 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 старых особей (50 сут) наблюдали снижение экспрессии генов циркадных ритмов по сравнению с мухами среднего возраста (рис. 5). Исключением является ген *Clk* у самцов и *cyc* у самок, активность которых достоверно не изменяется на протяжении всей жизни. У самцов спустя 30 сут после вылета имаго наблюдали увеличение экспрессии генов *per*, *cyc* 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 генов циркадных ритмов у старых дрозофил.

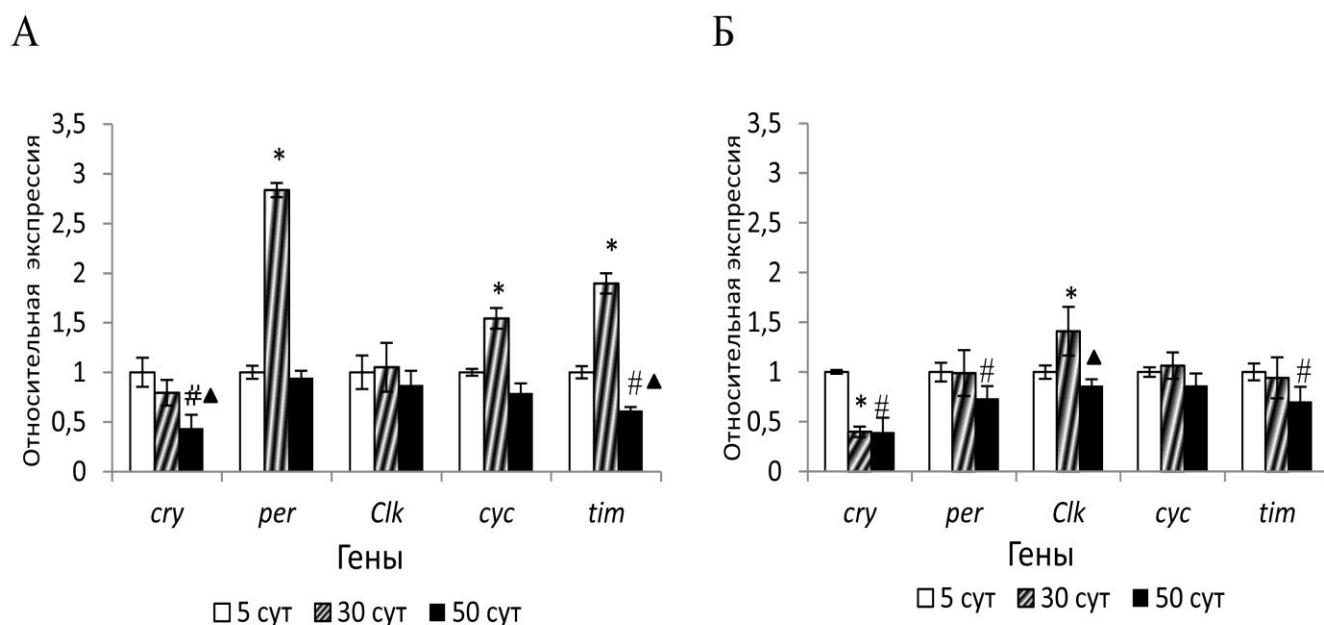


Рисунок 5. Возраст-зависимое изменение экспрессии генов циркадных ритмов у самцов (А) и самок (Б) линии w^{1118}

Обозначения: * $p < 0.05$, критерий Манна – Уитни (5 и 30 сут); # $p < 0.05$, критерий Манна – Уитни (5 и 50 сут); $\blacktriangle$ $p < 0.05$, критерий Манна – Уитни (30 и 50 сут).

3.3 Возрастная динамика циркадной активности самцов *D. melanogaster*

Для оценки возрастных изменений в циркадных ритмах были проанализированы суточные изменения двигательной активности у самцов со сверхэкспрессией генов циркадных ритмов в нервной системе и контрольных особей. Наблюдали, что у мух со сверактивацией исследуемых генов суточные ритмы в старших возрастах более выражены по сравнению с контрольными особями. Полученные данные показывают, что сверхэкспрессия генов циркадных ритмов приводит к замедлению возраст-зависимых изменений суточных осцилляций показателя локомоторной активности (рис.6).

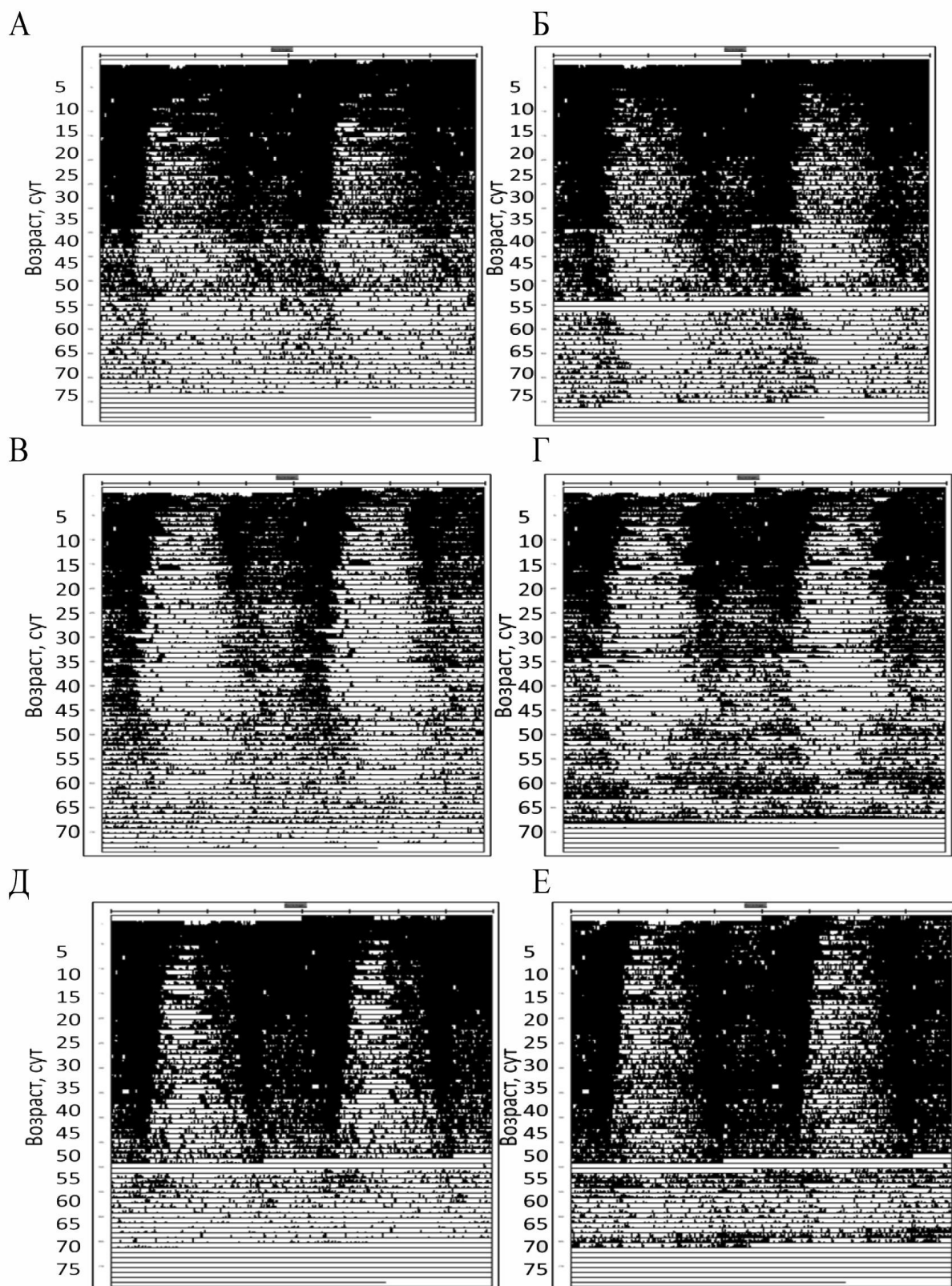


Рисунок 6. Возрастная динамика суточной активности самцов без сверхэкспрессии (А, В, Д) и со сверхэкспрессией (Б, Г, Е) генов *cry* (А, Б), *per* (В, Г), *Clk* (Д, Е).

3.4. Влияние сверхэкспрессии генов циркадных в нервной системе на показатели жизнеспособности у особей *Drosophila melanogaster*

3.4.1. Сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в нервной системе *Drosophila melanogaster*

Для подтверждения наличия кондиционной сверхэкспрессии генов циркадных ритмов сравнивали уровень экспрессии исследуемых генов в нервной ткани у особей, которых содержали на среде с мифепристоном (особи с предполагаемой кондиционной сверхэкспрессией генов циркадных ритмов в нервной системе), с особями с таким же генотипом, но содержащихся на среде без мифепристона. Анализ величин относительной экспрессии генов циркадных ритмов показал статистически значимое увеличение активности всех исследуемых генов ($p < 0.05$, критерий Манна-Уитни) (рис. 7).

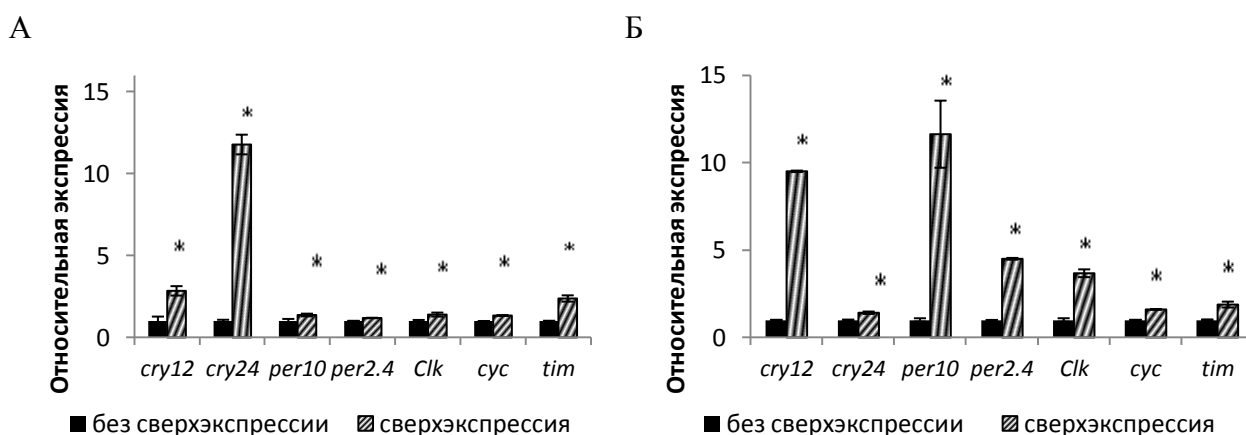


Рисунок 7. Относительный уровень экспрессии генов циркадных ритмов у самцов (А) и самок (Б), связанный с индукцией изучаемого трансгена в системе *GAL4-UAS*, * $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни ($\bar{X} \pm \Delta m$).

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

Изучали влияние кондиционной сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в нервной системе на ПЖ самцов и самок *Drosophila melanogaster*.

В первом эксперименте оценивали эффект кондиционной сверхэкспрессии гена *cryptochrome* (*cry*) в нервной системе. Обнаружено, что

у самцов и самок с кондиционной сверхэкспрессией гена *cry* кривые выживаемости проходят выше (рис. 8). Это свидетельствует о продлении жизни особей со сверхактивацией гена *cry* в нервной системе по сравнению с особями без сверхактивации. Анализ медианной продолжительности жизни подтвердил данный результат. Медианная продолжительность жизни у самцов с кондиционной сверхэкспрессией исследуемого гена в нервной системе увеличена на 15 % (различия достоверны при $p < 0.001$ по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). У самок сверхэкспрессия данного гена увеличила медианную ПЖ на 8.7%. Кроме того, обнаружено увеличение показателя максимальной продолжительности жизни – возраста 90 % смертности. Возраст 90 % смертности у самок со сверхэкспрессией гена *cry* в нервной системе увеличен на 5-7.5% (различия достоверны при $p < 0.001$ по критерию Ванг-Аллисона) (табл. 6).

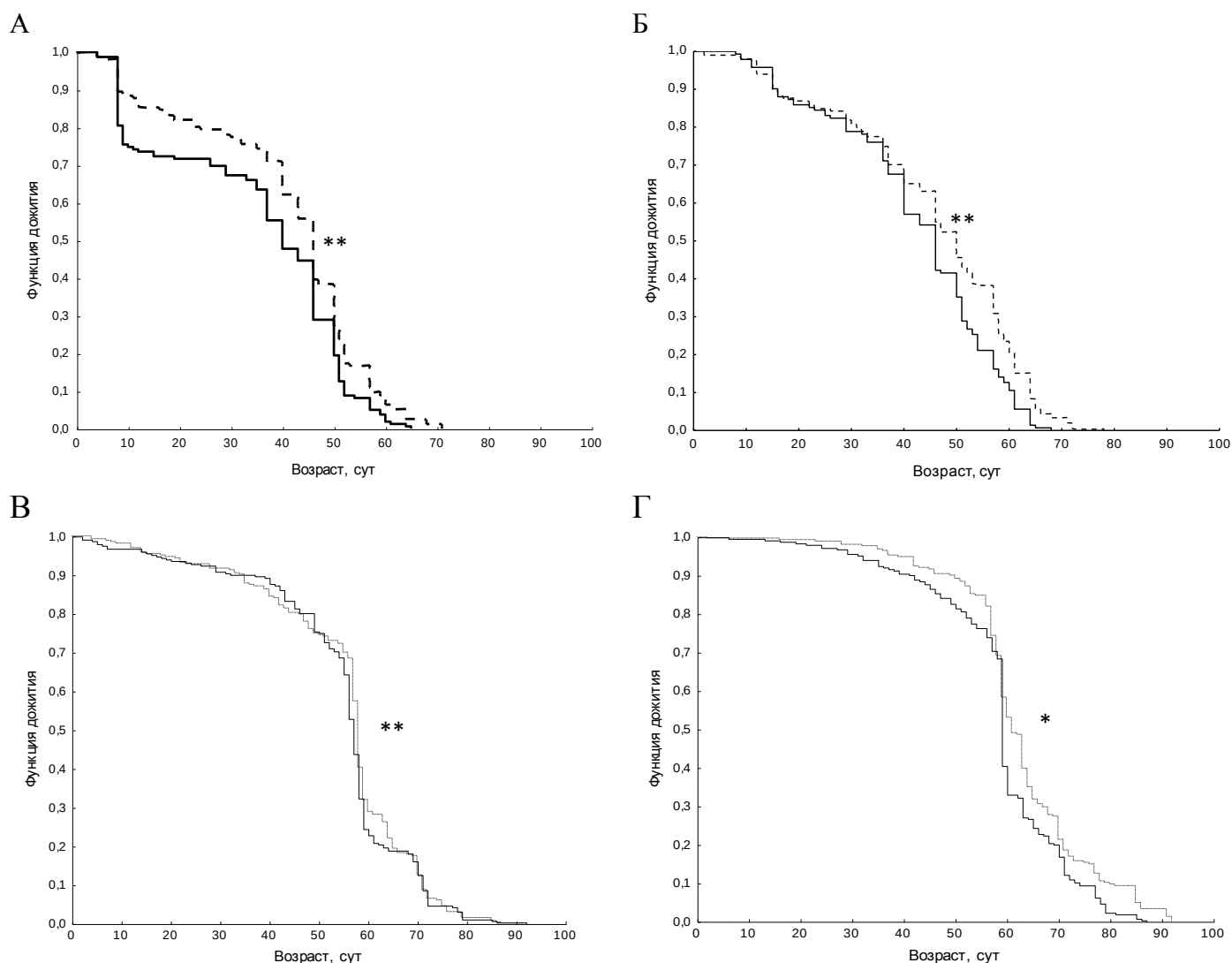


Рисунок 8. Влияние кондиционной сверхэкспрессии гена *cry* в нервной системе на ПЖ самцов (А, В) и самок (Б, Г) с генотипами *UAS-cry12/ELAV* (А, Б) и *UAS-cry24/ELAV* (В, Г).

Обозначения: *здесь и далее*:— без сверхэкспрессии, --- сверхэкспрессия; * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ (по критерию Колмогорова-Смирнова).

При сверхэкспрессии гена *period* (*per*) наблюдали увеличение возраста 90 % смертности у самцов на 4.1 % ($p < 0.01$) и у самок на 6.5 % ($p < 0.001$) относительно мух без сверхэкспрессии. Медианная ПЖ у самок была увеличена на 8.3 %, у самцов не наблюдали достоверных изменений (табл. 6). Анализ кривых выживаемости подтвердил полученные данные (рис. 9).

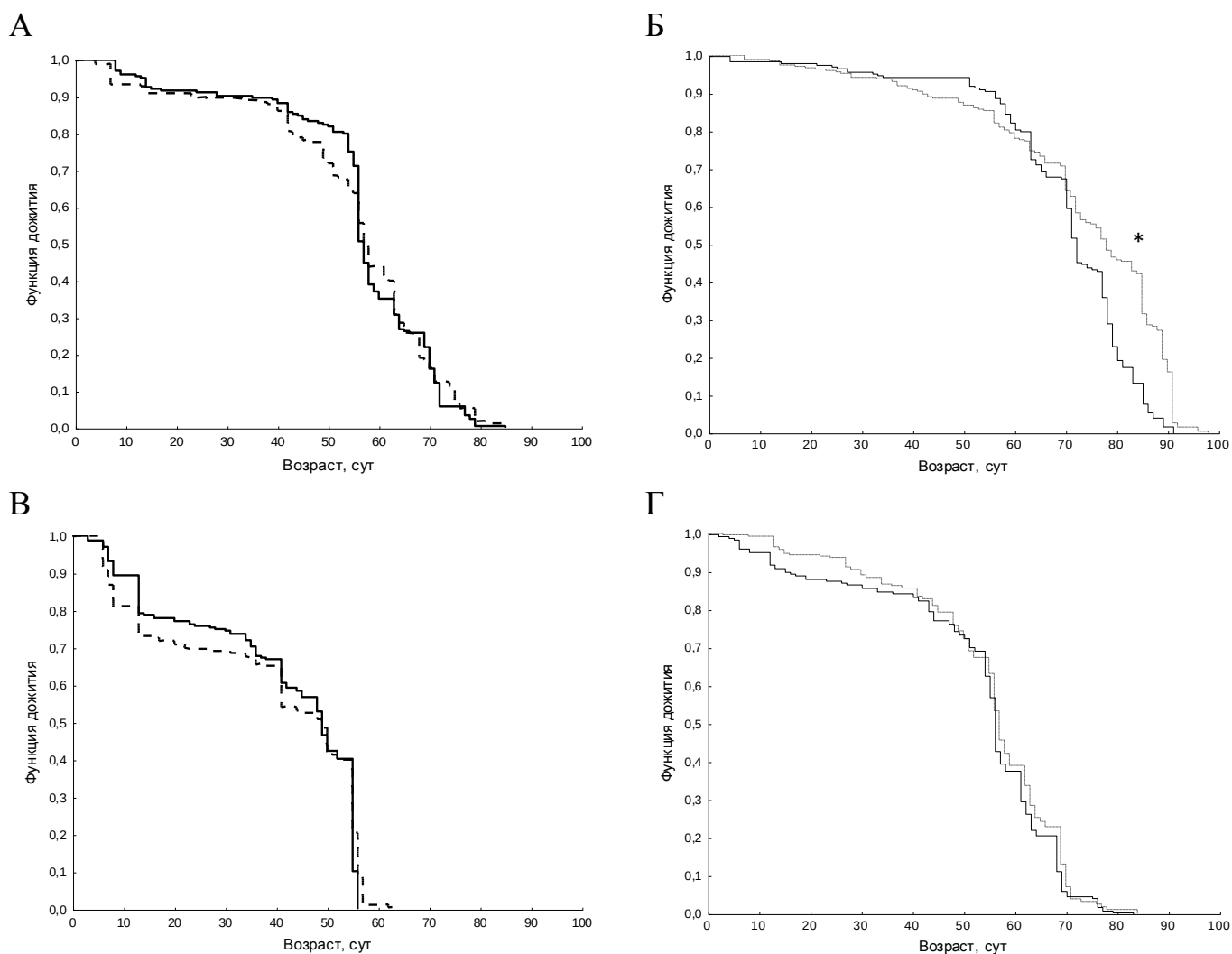
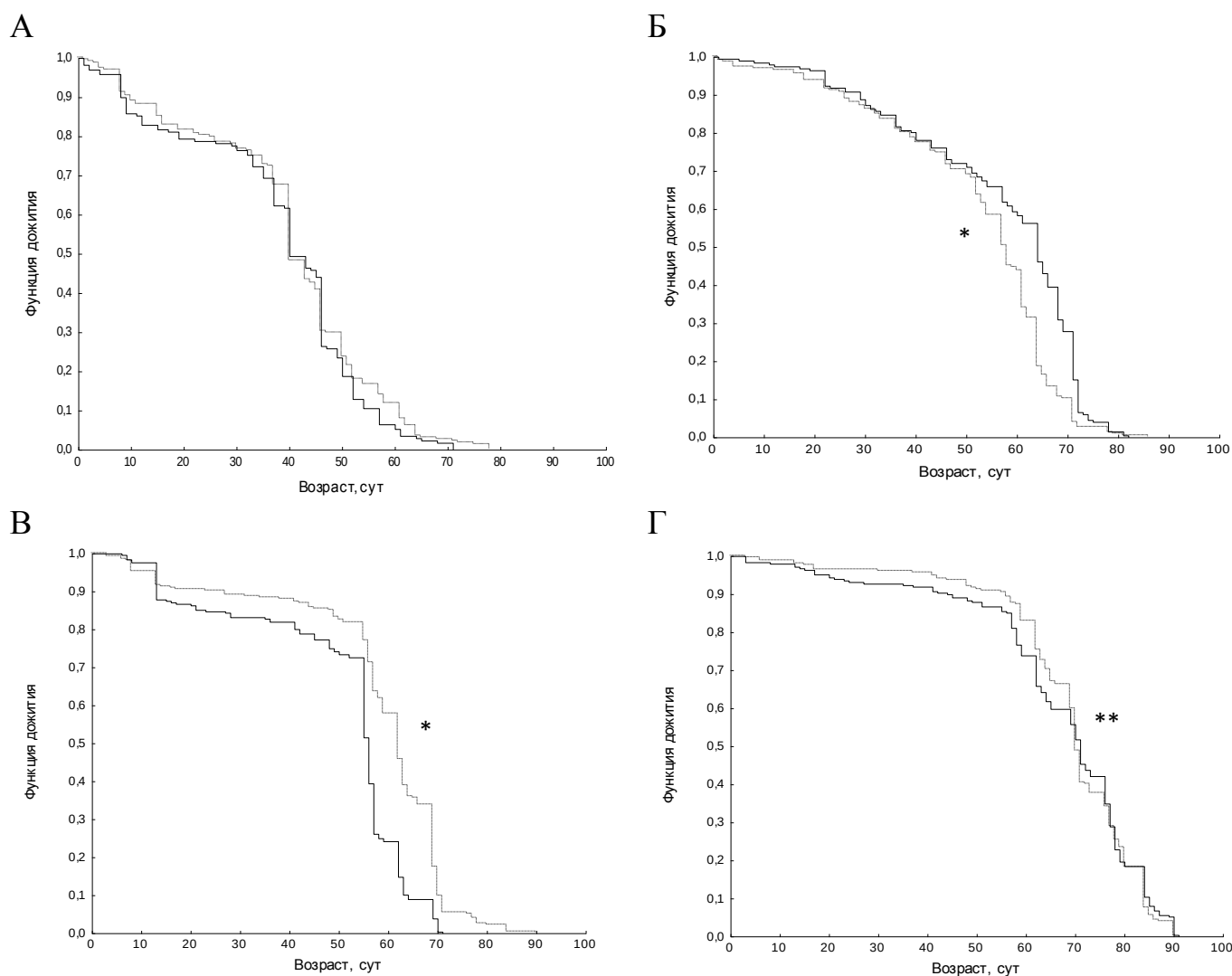


Рисунок 9. Влияние кондиционной сверхэкспрессии гена *per* в нервной системе на ПЖ самцов (А, В) и самок (Б, Г) с генотипами *UAS-per10/ELAV* (А, Б) и *UAS-per2.4/ELAV* (В, Г).

Кривая выживаемости у самок с генотипом *UAS-Clk/ELAV*, содержащихся на среде с мифепристоном, (особи с мифепристон-индуцибельной сверхэкспрессией гена *Clock* в нервной системе) проходят ниже с уменьшением максимальной продолжительности жизни по сравнению с кривой выживаемости самок *UAS-Clk/ELAV* ($p < 0.001$), содержащихся на среде без мифепристона (рис. 10). Сверхактивация гена *Clock* снизила медианную продолжительность жизни у самок на 10.3 % ($p < 0.001$), а возраст 90 % смертности – на 2.8 % ($p < 0.001$).

Кривая выживаемости у самцов с генотипом *UAS-cyc/ELAV*, содержащихся на среде с мифепристоном, (особи с мифепристон-индуцибельной сверхэкспрессией гена *cycle* в нервной системе) проходит выше с увеличением максимальной продолжительности жизни по сравнению с кривой выживаемости самцов *UAS-cyc/ELAV* ($p < 0.001$), содержащихся на среде без мифепристона (рис. 10). Медианная продолжительность жизни у самцов со сверхэкспрессией гена *cyc* в нервной системе увеличена на 10.7 % ($p < 0.001$), у самок достоверных изменений не наблюдали. Кроме того, у самцов с кондиционной сверхэкспрессией гена *cyc* в нервной системе отмечали увеличение возраста 90 % смертности на 8.5 % ($p < 0.001$) по сравнению с особями без сверхэкспрессии (табл. 6).



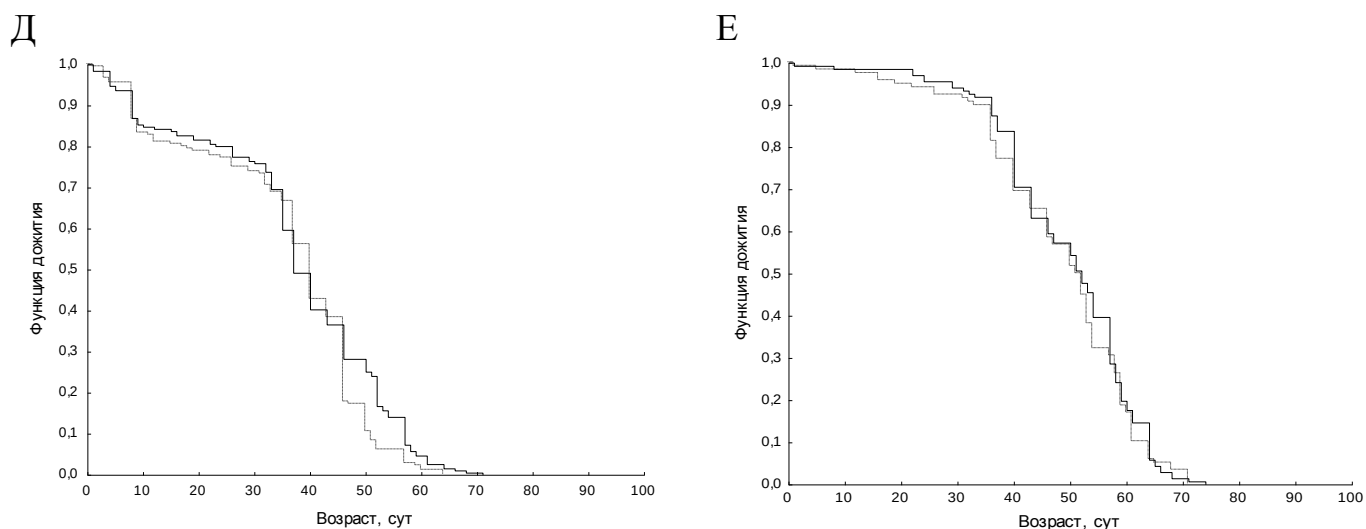


Рисунок 10. Влияние кондиционной сверхэкспрессии генов *Clk* (А, Б), *cyc* (В, Г), *tim* (Д, Е) в нервной системе на ПЖ самцов (А, В, Д) и самок (Б, Г, Е) *Drosophila melanogaster*.

Таблица 6

Влияние кондиционной сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в нервной системе на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*

Вариант эксперимента	Min	$\bar{X} \pm \Delta m$	M	90%	Max	MRDT	a	R	N
♂UAS-cry12/ELAV(-)	4	35±1.4	40	52	65	11.74	0.06	0.00525	159
♂UAS-cry12/ELAV(+)**	4	40.8±1.3	46**	57	71	9.82	0.07	0.00248	172
♀UAS-cry12/ELAV(-)	8	42.5±1.3	46	61	68	8.91	0.08	0.00173	142
♀UAS-cry12/ELAV(+)**	2	45.8±1.2	50**	64**	78	9.91	0.07	0.00172	204
♂UAS-cry24/ELAV(-)	2	54.3±1	57	71	92	8.96	0.08	0.0007	253
♂UAS-cry24/ELAV(+)**	4	55±1	58	71	87	8.66	0.08	0.0006	263
♀UAS-cry24/ELAV(-)	6	58.6±0.8	59	74	87	7.9	0.09	0.0003	254
♀UAS-cry24/ELAV(+)**	2	62.6±0.8	61**	80**	92	8.94	0.08	0.0004	249
♂UAS-per10/ELAV (-)	8	55.8±1.2	57	72	85	8.27	0.08	0.0004	205
♂UAS-per10/ELAV(+)*	4	54.7±1.3	57	75**	85	9.66	0.07	0.0008	210
♀UAS-per10/ELAV(-)	3	40.4±1.2	49	56	56	9.01	0.08	0.0020	236
♀UAS-per10/ELAV(+)	5	38.4±1.3	49	56	63	11.62	0.06	0.0040	220
♂UAS-per2.4/ELAV(-)	4	69.9±1.1	72	85	91	7.19	0.10	0.0001	216
♂UAS-per2.4/ELAV(+)	7	72.7±1.2	78*	91*	98	9.21	0.08	0.0002	273
♀UAS-per2.4/ELAV(-)	2	52.1±1.2	56	69	83	8.97	0.08	0.0008	212
♀UAS-per2.4/ELAV(+)	3	54.6±0.9	57	70**	84	8.25	0.08	0.0005	285
♂UAS-Clk/ELAV(-)	1	37.9±1.3	40	57	71	10.86	0.06	0.00382	170
♂UAS-Clk/ELAV(+)	1	39.7±1.1	40	61	78	12.03	0.06	0.00412	228
♀UAS-Clk/ELAV(-)	1	56.7±1.3	64	72	82	8.73	0.08	0.00048	197
♀UAS-Clk/ELAV(+)*	1	52.5±1.1	58*	70*	86	8.99	0.08	0.00077	226
♂UAS-cyc/ELAV(-)	6	50±1.1	56	64	71	7.7	0.09	0.0005	256
♂UAS-cyc/ELAV(+)*	3	57.5±1.1	62*	70*	90	8.21	0.08	0.0004	275
♀UAS-cyc/ELAV(-)	3	66.7±1.2	71	85	91	8.87	0.08	0.0002	249

♀ <i>UAS-cyc/ELAV(+)</i> **	3	68.9±1	70**	84	90	7.4	0.09	0.0001	252
♂ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i>	1	37.1±1.2	37	57	71	11.08	0.06	0.00421	191
♂ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i>	1	35.5±1.2	40	51**	64	9.43	0.07	0.00345	180
♀ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i>	1	49.4±1.1	52	64	74	7.1	1	0.00045	136
♀ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i>	1	48.2±1.3	51.5	62	71	7.72	0.09	0.00069	148

Обозначения: «-» - особи без сверхэкспрессии; «+» - особи со сверхэкспрессией генов циркадных ритмов; ♂ – самцы; ♀ – самки; * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ (первый столбец – по критерию Колмогорова-Смирнова, четвертый столбец – по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; пятый столбец – по критерию Ванг-Аллисона).

Таким образом, сверхэкспрессия генов *cry* и *cyc* в нервной системе у самцов и самок и гены *Clk*, *cry24* и *per10* у самок увеличили медианную продолжительность жизни. Однако, продолжительность жизни у самок со сверхактивацией гена *Clk* уменьшилась. Также у самцов со сверхэкспрессией генов экспрессией *Clk*, *cry24*, *per10*, *per2.4* и *tim* и у самок со сверхэкспрессией генов *per2.4* и *tim* медианная продолжительность жизни достоверно не изменились.

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

Продолжительность жизни, как правило, сопряжена с увеличением устойчивости живых организмов к различным видам стресса (Age-dependent loss..., 1987; Thermotolerance and extended..., 1995; Kapahi et al., 1999; Morley et al., 2004; Brown-Borg, 2006; Slack et al., 2010). Проводили оценку влияния сверхэкспрессии генов циркадных ритмов на устойчивость дрозофил к действию стресс-факторов различной природы – оксидативному стрессу, гипертермии и голоданию.

У самцов кондиционная сверхактивация генов *cry*, *Clk*, *per*, *cyc* в нервной системе вызвала достоверное увеличение устойчивости к гипертермии (35 °C). Спустя 144 ч процент выживших особей увеличился на

8 – 27 % (различия достоверны при $p < 0.01$ по ϕ -критерию Фишера) по сравнению с самцами без сверхэкспрессии (рис. 11). У самок же сверхактивация генов *cry*, *per*, *cyc* привела к снижению процента выживших особей к 144 ч на 17 – 34 % ($p < 0.001$). В остальных случаях достоверных изменений не наблюдали. Анализ других показателей выживаемости показал аналогичный результат (табл. 7).

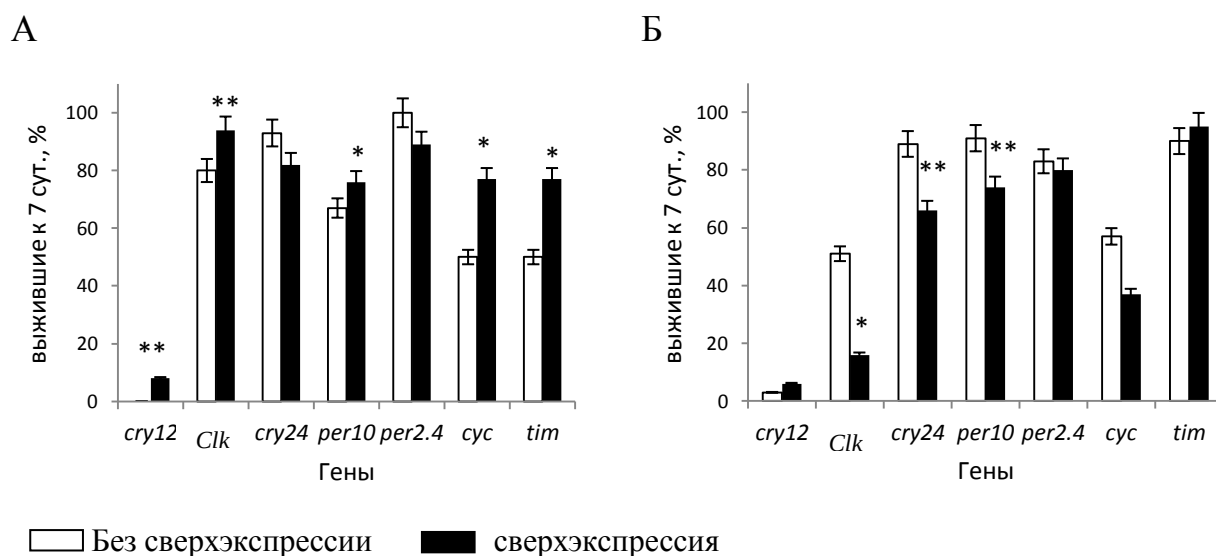
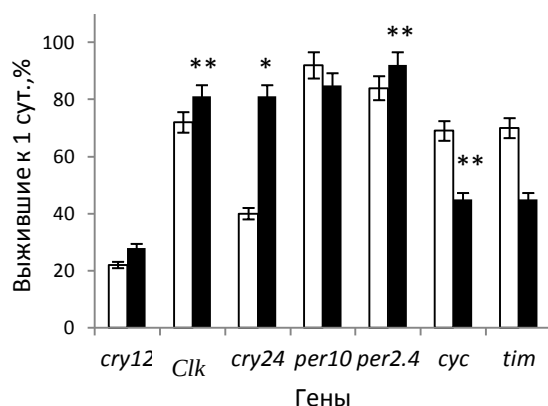


Рисунок 11. Влияние кондиционной сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в нервной системе на устойчивость самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster* к гипертермии.

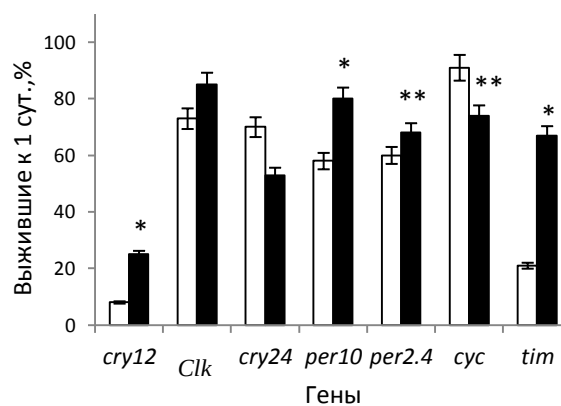
Обозначения: * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ – по ϕ -критерию Фишера.

В большинстве случаев сверхэкспрессия генов циркадных ритмов привела к увеличению процента выживших после первых сут в условиях действия индуктора свободных радикалов параквата у самцов на 8 – 41 % ($p < 0.01$), у самок на 17 – 46 % ($p < 0.001$) по сравнению с особями без сверхэкспрессии (рис. 12). Исключением является ген *cyc*, сверхактивация которого как у самцов, так и у самок привела к снижению устойчивости дрозофилы в условиях действия прооксиданта. Анализ других показателей выживаемости показал аналогичный результат (табл. 7).

А



Б

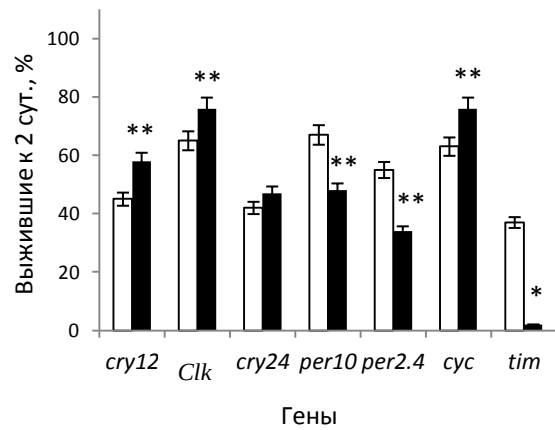


□ Без сверхэкспрессии ■ сверхэкспрессия

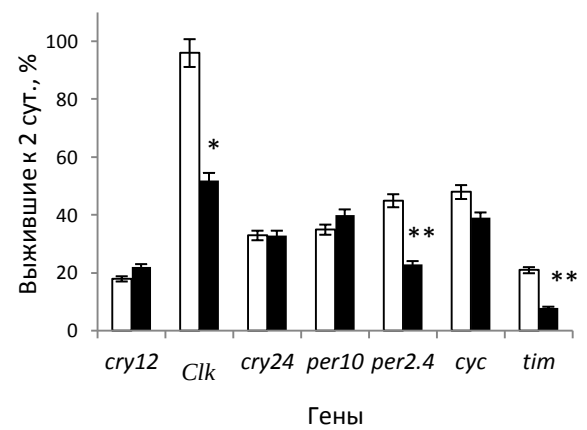
Рисунок 12. Влияние кондиционной сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в нервной системе на устойчивость самцов (А) и самок (Б) в условиях оксидативного стресса.

Сверхактивация генов *per* и *tim* у самцов снизила устойчивость к голоданию. Процент выживших особей после двух сут уменьшился на 19 – 35 % ($p < 0.01$) по сравнению с контрольными особями (рис. 13). Однако повышенная активность генов *cry*, *cys* и *Clk* увеличила процент выживших на 10 – 13 % ($p < 0.01$). У самок же активация генов *Clk*, *per* и *tim* снизила процент выживших после двух сут на 13 – 43 % ($p < 0.001$). Оценка других показателей выживаемости показала аналогичный результат (табл. 7).

А



Б



□ Без сверхэкспрессии ■ сверхэкспрессия

Рисунок 13. Влияние кондиционной сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в нервной системе на устойчивость самцов (А) и самок (Б) в условиях голодания.

Таблица 7

Влияние сверхэкспрессии генов циркадных ритмов на устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к действию прооксиданта, гипертермии и голоданию

Вариант эксперимента	Гипертермия				Действие прооксиданта параквата				Голодание			
	M	$\bar{X} \pm \Delta m$	144 ч	N	M	$\bar{X} \pm \Delta m$	24 ч	N	M	$\bar{X} \pm \Delta m$	48 ч	N
♂ <i>UAS-cry12/ELAV</i> (-)	73	78.4±1.2	0	179	16	22.5±1	22	206	96	92.6±2.1	45	141
♂ <i>UAS-cry12/ELAV</i> (+)	96**	106.9±3.2	8**	206	16	22.7±1	28	212	96	98.9±2	58**	142
♀ <i>UAS-cry12/ELAV</i> (-)	96	92.6±2.1	3	141	16	17.8±0.4	8	219	46	41.9±1	18	154
♀ <i>UAS-cry12/ELAV</i> (+)	96	98.9±2	6	142	22**	26.8±1.5	25*	150	46	41.5±1.3	22	140
♂ <i>UAS-cry24/ELAV</i> (-)	195	182.6±3.6	93	190	22	26.9±1.8	40	190	195	180.1±2.2	42	140
♂ <i>UAS-cry24/ELAV</i> (+)	195	174.5±3.6	82	199	54*	41.8±1.6	81*	213	144*	150.3±4.5	47	190
♀ <i>UAS-cry24/ELAV</i> (-)	195	180.1±2.2	89	140	34	45.6±2.2	70	210	46	50.2±1.1	33	195
♀ <i>UAS-cry24/ELAV</i> (+)	144	150.3±4.5	66**	190	29**	39.7±2.2	53	130	46	48.5±1.1	33	134
♂ <i>UAS-per10/ELAV</i> (-)	176	150.9±7.3	67	160	54	51.6±1.9	92	183	195	180.9±3	67	101
♂ <i>UAS-per10/ELAV</i> (+)	176	162.8±4.6	76**	103	54	45.5±1.7	85	180	195	167.6±4.2	48**	120
♀ <i>UAS-per10/ELAV</i> (-)	195	180.9±3	91	101	34	32.6±1.8	58	181	46	49.2±1.3	35	183
♀ <i>UAS-per10/ELAV</i> (+)	195	167.6±4.2	74**	120	54	45.2±1.8	80*	132	46	51.2±1.1	40	140
♂ <i>UAS-per2.4/ELAV</i> (-)	195	191.6±0.9	100	199	54	46.9±1.9	84	190	95	176.8±3.1	55	198
♂ <i>UAS-per2.4/ELAV</i> (+)	195	182.8±3.4	89	181	59	53.3±1.5	92**	179	195	172.7±3.4	34**	117
♀ <i>UAS-per2.4/ELAV</i> (-)	195	176.8±3.1	83	198	34	33.2±1.6	60	213	46	57.3±2.3	45	185
♀ <i>UAS-per2.4/ELAV</i> (+)	195	172.7±3.4	80	117	34	42.4±2.3	68**	200	46	45.9±0.9	23**	134
♂ <i>UAS-Clk/ELAV</i> (-)	195	172.4±2.9	80	137	34	40.8±1.5	72	220	148	106.9±3.5	65	117
♂ <i>UAS-Clk/ELAV</i> (+)	196	190±1.5	94**	153	54	43.6±1.6	81**	132	96*	180.1±2.2	76**	134
♀ <i>UAS-Clk/ELAV</i> (-)	148	147.2±4	51	117	34	42.9±2.1	73	180	70	77.6±2.2	96	121
♀ <i>UAS-Clk/ELAV</i> (+)	96	106.9±3.5	16*	134	54	55.1±2.3	85	196	54**	59.2±1.9	52*	113
♂ <i>UAS-cyc/ELAV</i> (-)	148	140.1±3	50	141	34	41.2±2.1	69	184	155	154.4±3.7	63	152
♂ <i>UAS-cyc/ELAV</i> (+)	195	170.2±4.4	77*	175	22	31±1.6	45**	211	103*	127.4±3.9	76*	145
♀ <i>UAS-cyc/ELAV</i> (-)	155	154.4±3.7	57	152	34	37.5±2.1	91	147	46	49.5±1.1	48	136

♀ <i>UAS-cyc/ELAV(+)</i>	103**	127.4±3.9	37	145	54*	45.2±2.4	74**	173	46	49.8±1.1	39	142
♂ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i>	195	179.8±3	50	197	31	42.3±2.1	70	202	195	184.9±2.2	32	115
♂ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i>	195	179.9±3.3	77*	175	23	33±1.6	45	172	195	183±2.2	2	110
♀ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i>	195	184.9±2.2	90	215	22	21.6±0.9	21	157	46	46.9±1.9	21	120
♀ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i>	195	183±2.2	95	210	29	40.5±2.1	67*	155	46	39.1±0.9	8*	144

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; N - количество мух в выборке; * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ (М – критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; 144 ч, 48 ч и 24 ч – ϕ -критерий Фишера).

Таким образом, в условиях интенсивного стресса различной природы (оксидативного стресса, гипертермии, голодания) кондиционная сверхактивация генов циркадных ритмов в нервной системе в большинстве вариантов эксперимента способствовала увеличению выживаемости особей, при этом выраженность эффектов зависела от пола.

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

3.5.1. Сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в мышечной системе и жировом теле *Drosophila melanogaster*

Для подтверждения наличия кондиционной сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в жировом теле и мышечной системе, сравнивали уровень экспрессии исследуемых генов у особей, которые содержались на среде с мифепристоном (особи с предполагаемой кондиционной сверхэкспрессией генов циркадных ритмов), с особями с таким же генотипом, но содержащихся на среде без мифепристона. Анализ величин относительной экспрессии генов циркадных ритмов показал статистически значимое увеличение активности всех исследуемых генов ($p < 0.05$, критерий Манна-Уитни) (рис. 14).

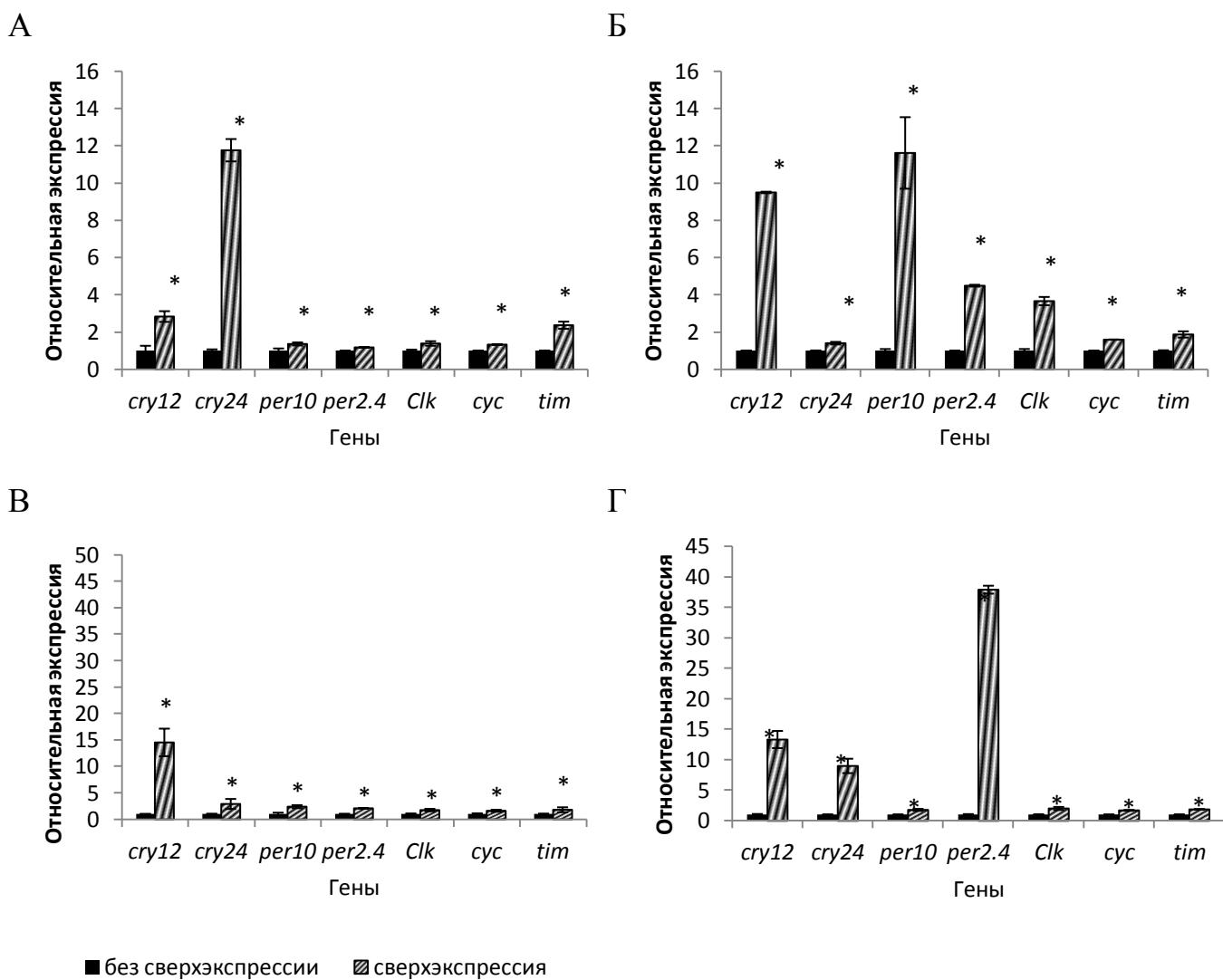


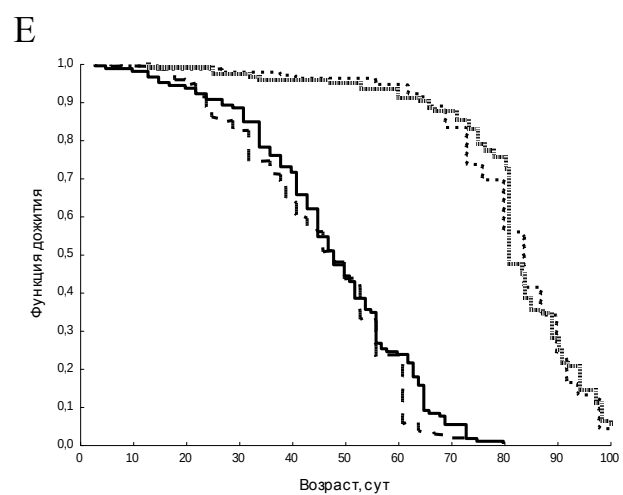
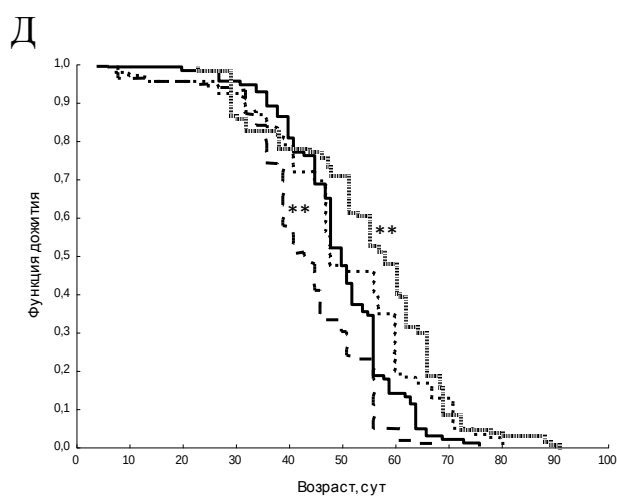
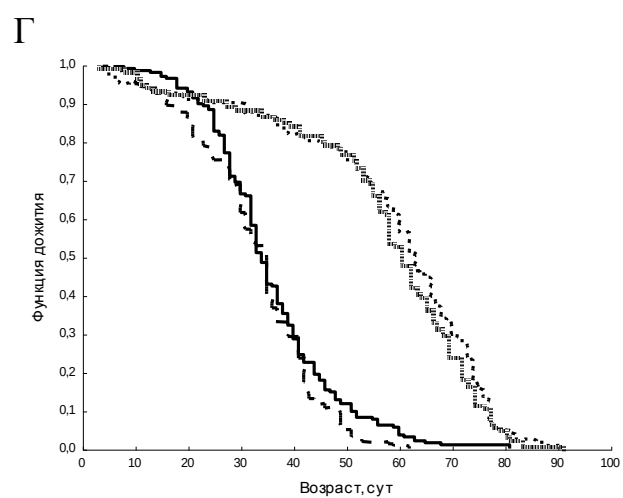
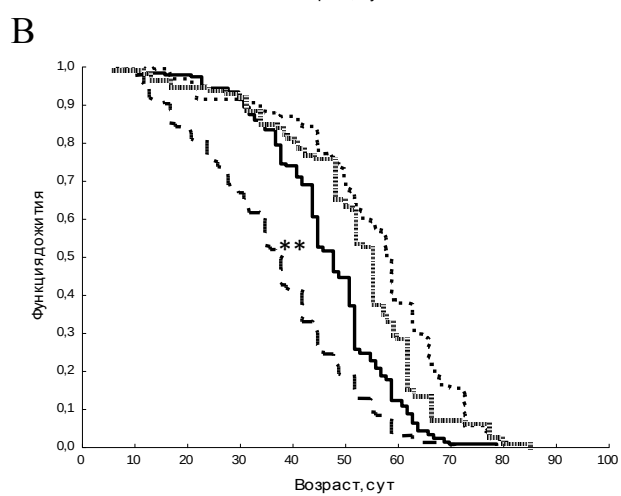
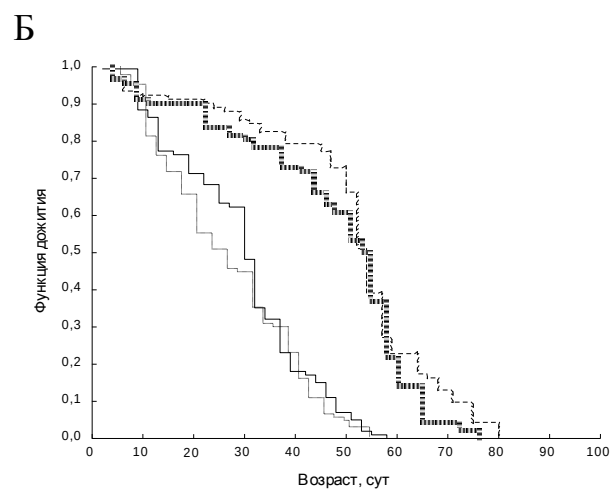
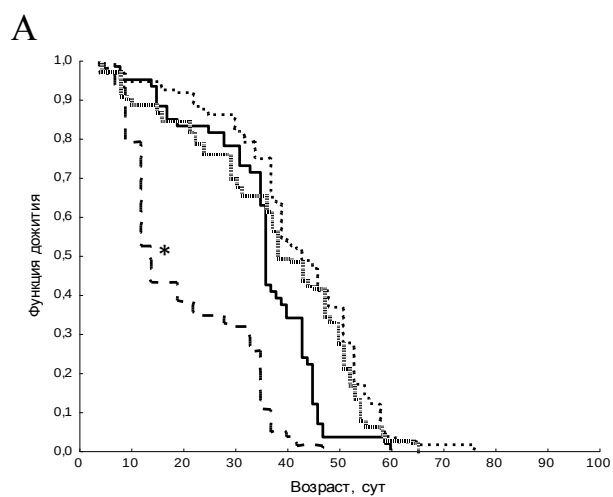
Рисунок 14. Относительный уровень экспрессии генов циркадных ритмов у самцов (А, В) и самок (Б, Г), связанный с индукцией изучаемого трансгена в системе *GAL4-UAS* в мышцах (А, Б) и жировом теле (В, Г), * $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни.

3.5.2. Влияние сверхэкспрессии гена *cryptochrome* на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты

Изучали влияние кондиционной сверхэкспрессии гена *cry* в мышечной системе и жировом теле на ПЖ самцов и самок на фоне ограничительной диеты. Использовали линии, несущие дополнительную копию гена *cryptochrome*, который находится под контролем промотора *UAS*: *y, w; UAS-cry12/TM2* (конструкция локализована на 3 хромосоме) и *y, w; UAS-cry24/CyO* (конструкция локализована на 2 хромосоме).

Обнаружено, что у самцов с кондиционной сверхэкспрессией гена *cry* на обеих средах в мышечной системе кривые выживаемости проходят ниже, чем у особей без сверхактивации (рис. 15). Это говорит об уменьшении продолжительности жизни особей со сверхактивацией гена *cry*. Анализ медианной продолжительности жизни подтвердил данный результат. Медианная продолжительность жизни у самцов с кондиционной сверхэкспрессией исследуемого гена в мышечной системе уменьшилась – на 11.6 – 61 % (различия достоверны при $p < 0.001$, критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). У самок сверхэкспрессия данного гена не вызвала достоверных изменений медианной ПЖ. Кроме того, обнаружено снижение показателя максимальной продолжительности жизни – возраста 90 % смертности (табл. 8,9).

Также было показано, что кондиционная сверхактивация данного гена в жировом теле на низкокалорийной среде (DR) вызвала увеличение медианной продолжительности жизни у самцов на 19 – 20.8 % ($p < 0.001$), а максимальную на 16.1 % ($p < 0.001$, критерий Ванг-Аллисона). У самок же медианная ПЖ снизилась на 8 – 15.3 % ($p < 0.001$) (рис. 16).



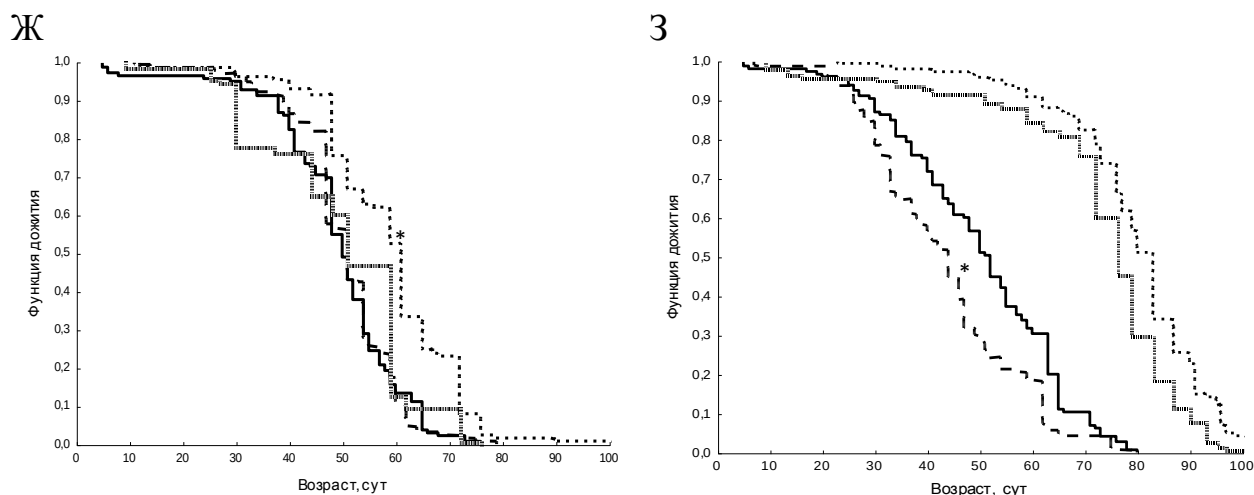


Рисунок 15. Влияние ограничительной диеты на ПЖ на фоне кондиционной сверхэкспрессии гена *cry* в мышцах (А, Б, В, Г) и жировом теле (Д, Е, Ж, З) самцов (А, В, Д, Ж) и самок (Б, Г, Е, З) с генотипами *UAS-cry12/ELAV* (А, Б, Д, Е) и *UAS-cry24/ELAV* (В, Г, Ж, З)

Обозначения: – особи без сверхэкспрессии на среде со стандартным содержанием белка, --- особи со сверхэкспрессией на среде со стандартным содержанием белка, особи без сверхэкспрессии на среде с пониженным содержанием белка, особи со сверхэкспрессией на среде с пониженным содержанием белка; * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ (критерий Колмогорова-Смирнова).

Далее полученные данные анализировали методом регрессии Кокса, который позволял дать прогноз риска наступления события (смерть мухи) и оценку влияния заранее определенных независимых переменных на этот риск.

У самцов, конструкция которых локализована на третьей хромосоме (*cry12*), сверхэкспрессия исследуемого гена статистически значимо увеличивает смертность (HR 3.1052, 95% CI: 2.5569-3.7711, $p < 0.0001$). Ограничительная диета снижает смертность при сверхактивации (HR 0.2696, 95% CI: 0.2362-0.3078, $p < 0.0001$). У самок со сверхактивацией смертность также выше, но менее выражена (HR 1.2225, 95% CI: 1.0545-1.4171, $p < 0.0001$). Ограничительная диета также снижает смертность при сверхактивации исследуемого гена (HR 0.1204, 95% CI: 0.1038-0.1396, $p < 0.0001$).

Самцы и самки со сверхэкспрессией данного гена в жировом теле имеют более низкую смертность по сравнению с особями со сверхэкспрессией в мышцах (HR 0.2151, 95% CI: 0.1876-0.2466, $p < 0.0001$; HR 0.1422, 95% CI: 0.1230-0.1645, $p < 0.0001$).

У самцов, конструкция которых локализована на второй хромосоме (*cry24*) сверхэкспрессия исследуемого гена статистически значимо уменьшает смертность (HR 0.6306, 95% CI: 0.5261-0.7558, $p < 0.0001$). Ограничительная диета дополнительно снижает смертность при сверхактивации гена *cry* (HR 0.6969, 95% CI: 0.6193-0.7842, $p < 0.0001$).

У самок же с данной конструкцией сверхэкспрессия напротив увеличивает смертность (HR 1.3578, 95% CI: 1.1517-1.6008, $p < 0.0001$). Ограничительная диета снижает смертность при сверхактивации гена *cry* (HR 0.1303, 95% CI: 0.1129-0.1503, $p < 0.0001$).

Самцы и самки со сверхэкспрессией данного гена в жировом теле имеют более низкую смертность по сравнению с особями со сверхэкспрессией в мышцах (HR 0.7085, 95% CI: 0.6293-0.7976, $p < 0.0001$; HR 0.3628, 95% CI: 0.3186-0.4131, $p < 0.0001$).

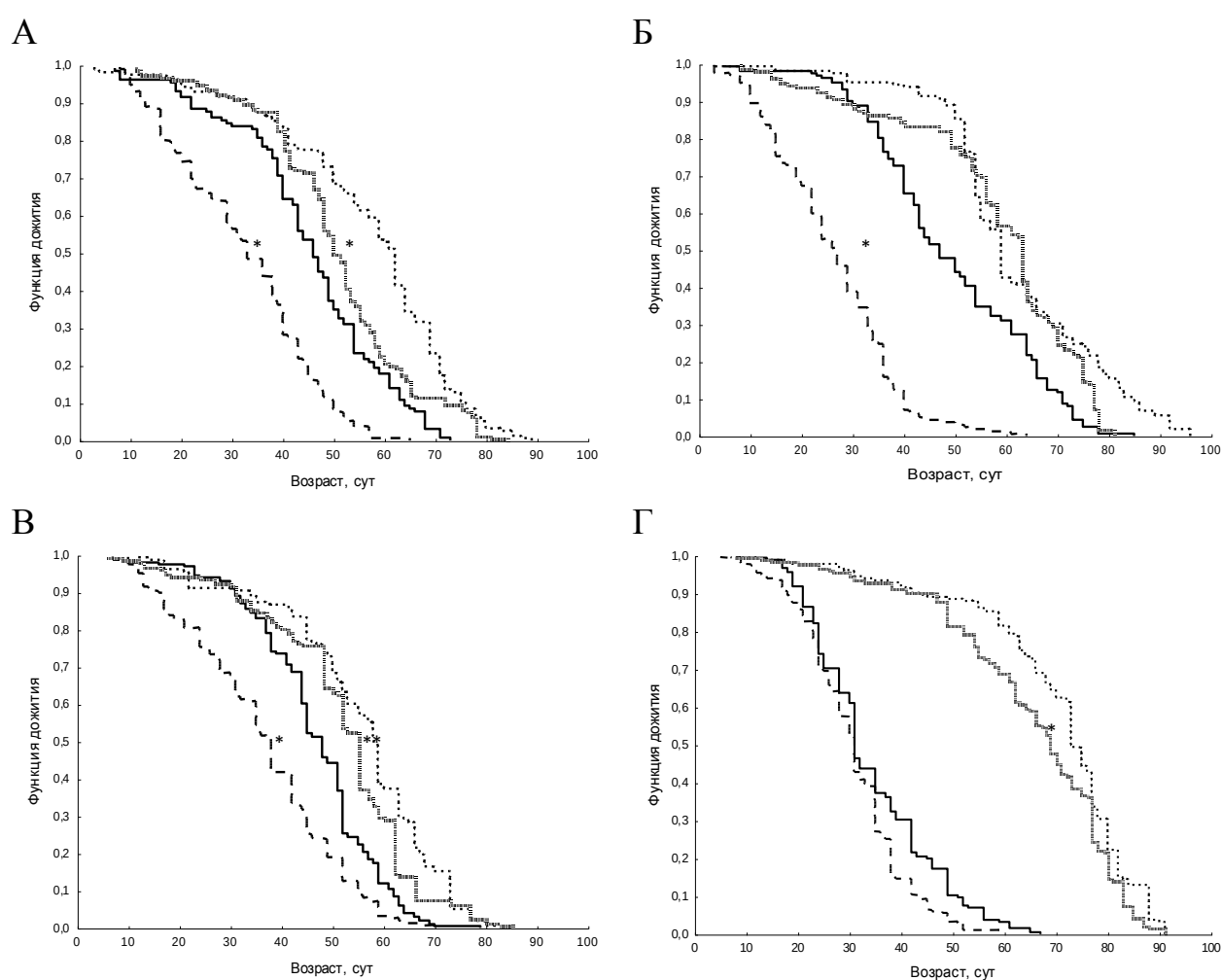
3.5.3. Влияние сверхэкспрессии гена *period* на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты

Изучали влияние кондиционной сверхэкспрессии гена *per* в мышечной системе и жировом теле на ПЖ самцов и самок на фоне ограничительной диеты. Использовали линии, несущие дополнительную копию гена *period*, который находится под контролем промотора *UAS*: *w*; *UAS-per10* (встроено две дополнительные копии *per*) и *w*; *UAS-per2.4* (встроена одна дополнительная копия *per*).

Обнаружено, что у самцов с кондиционной сверхэкспрессией гена *per* на обеих средах в мышечной системе кривые выживаемости проходят ниже, чем у особей без сверхактивации (рис. 16). Это указывает об уменьшении продолжительности жизни особей со сверхактивацией гена *per*. Анализ

медианной продолжительности жизни подтвердил данный результат (табл. 8, 9). Медианная продолжительность жизни у самцов с кондиционной сверхэкспрессией исследуемого гена в мышечной системе на среде со стандартным содержанием белка уменьшилась на 20.8 – 28.2 % ($p < 0.001$), а на низкокалорийной среде уменьшилась – на 5.1 – 13 % ($p < 0.001$). У самок же сверхэкспрессия данного гена в мышцах на среде со стандартным содержанием белка вызвала снижение медианной ПЖ на 56.3 %, а на среде с пониженным содержанием белка наоборот вызвала увеличение на 5.5 % ($p < 0.01$).

У самцов сверхактивация исследуемого гена в жировом теле не вызвала достоверных изменений медианной ПЖ как на среде с нормальным содержанием белка, так и на низкокалорийной среде. У самок было показано увеличение медианой ПЖ на низкокалорийной среде на 9.3 – 12 % ($p < 0.01$).



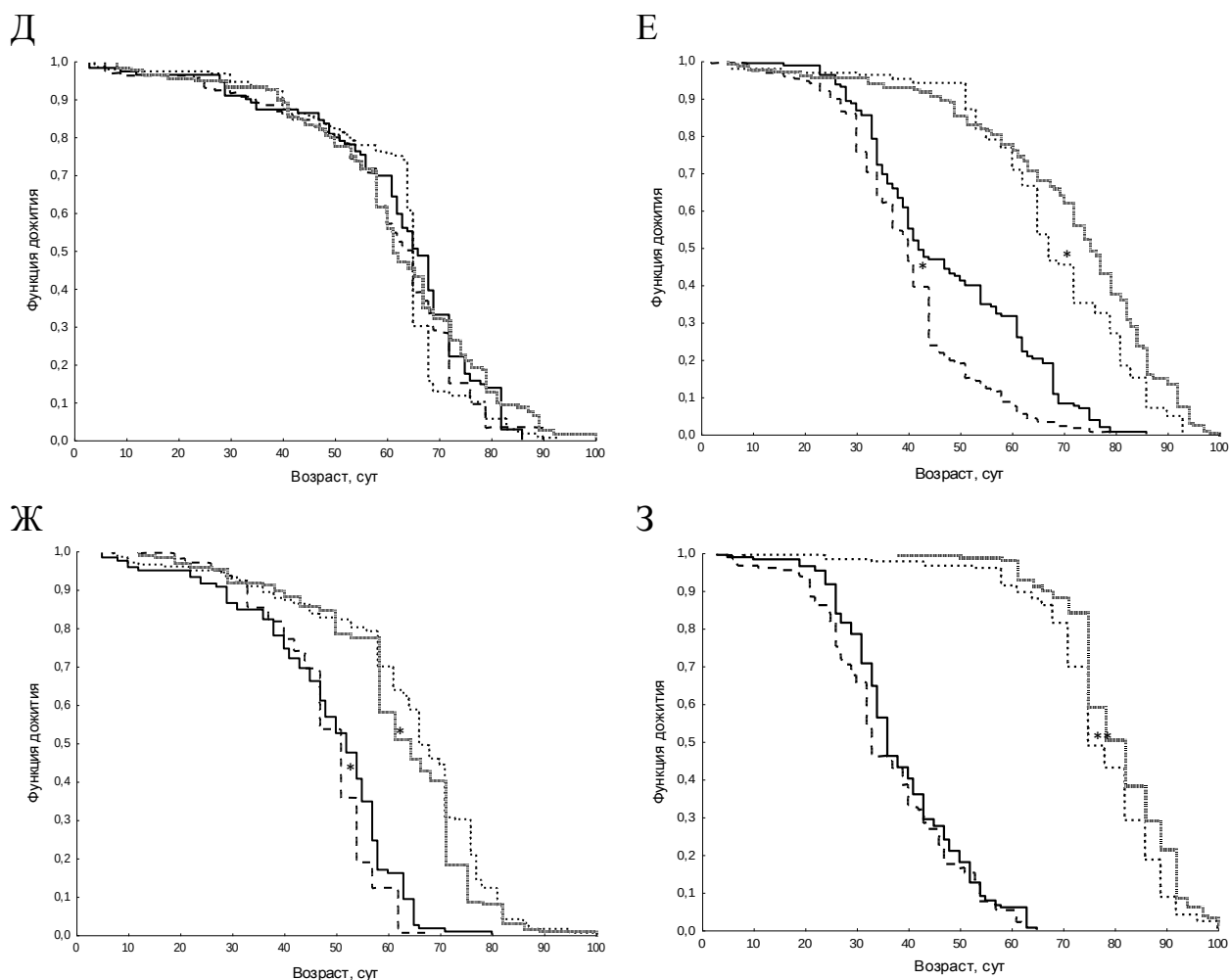


Рисунок 16. Влияние ограничительной диеты на ПЖ на фоне кондиционной сверхэкспрессии гена *per* в мышцах (А, Б, В, Г) и жировом теле (Д, Е, Ж, З) самцов (А, В, Д, Ж) и самок (Б, Г, Е, З) с генотипами $w; UAS-per10$ (А, Б, Д, Е) и $w; UAS-per2.4$ (В, Г, Ж, З)

Обозначения: — особи без сверхэкспрессии на среде со стандартным содержанием белка, --- особи со сверхэкспрессией на среде со стандартным содержанием белка, особи без сверхэкспрессии на среде с пониженным содержанием белка, -.-.-.-.- особи со сверхэкспрессией на среде с пониженным содержанием белка; * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ (критерий Колмогорова-Смирнова).

Затем полученные данные анализировали методом регрессии Кокса, который позволял дать прогноз риска наступления события (смерть мухи) и оценку влияния заранее определенных независимых переменных на этот риск.

У самцов, в конструкцию которых встроено две дополнительные копии гена *per*, сверхэкспрессия данного гена статистически значимо увеличивает

смертность (HR2.7613, 95% CI: 2.3590-3.2322, $p < 0.0001$). Ограничительная диета снижает смертность при сверхактивации (HR0.4214, 95% CI: 0.3732-0.4757, $p < 0.0001$).

У самок с данной конструкцией сверхэкспрессия сильно увеличивает смертность (HR5.07741, 95% CI: 4.42692-5.8235, $p < 0.0001$). Ограничительная диета значительно снижает смертность при сверхактивации гена *per* (HR0.09676, 95% CI: 0.08587-0.1090, $p < 0.0001$).

Самцы и самки со сверхэкспрессией исследуемого гена в жировом теле имеют более низкую смертность по сравнению с особями со сверхэкспрессией в мышцах (HR0.2237, 95% CI: 0.1968-0.2541, $p < 0.0001$; HR0.39652, 95% CI: 0.3578-0.4395, $p < 0.0001$).

У самцов, в конструкцию которых встроена одна дополнительная копия гена *per*, сверхэкспрессия исследуемого гена статистически значимо увеличивает смертность (HR1.7228, 95% CI: 1.4716-2.0169, $p < 0.0001$). Ограничительная диета снижает смертность при сверхактивации гена *per* (HR0.2626, 95% CI: 0.2288-0.3013, $p < 0.0001$).

У самок с данной конструкцией сверхэкспрессия также увеличивает смертность (HR1.63206, 95% CI: 1.39819-1.90505, $p < 0.0001$). Ограничительная диета значительно снижает смертность при сверхактивации гена *per* (HR0.03348, 95% CI: 0.02776-0.04039, $p < 0.0001$).

Самцы и самки со сверхэкспрессией исследуемого гена в жировом теле имеют более низкую смертность по сравнению с особями со сверхэкспрессией в мышцах (HR0.5335, 95% CI: 0.4699-0.6058, $p < 0.0001$; HR0.44369, 95% CI: 0.39276-0.50122, $p < 0.0001$).

3.5.4. Влияние сверхэкспрессии гена *Clock* на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты

Изучали влияние кондиционной сверхэкспрессии гена *Clk* в мышечной системе и жировом теле на ПЖ самцов и самок на фоне ограничительной

диеты. Использовали линию, которая несет дополнительную копию гена *Clock* под контролем промотора *UAS*: $w; P\{UAS-Clk.HA\}$.

Обнаружено, что у самцов с кондиционной сверхэкспрессией гена *Clk* на обеих средах в мышечной системе кривые выживаемости проходят ниже, чем у особей без сверхактивации (рис. 17). Это говорит об уменьшении продолжительности жизни особей со сверхактивацией исследуемого гена. Анализ медианной продолжительности жизни подтвердил данный результат (табл. 8, 9). Медианная продолжительность жизни у самцов с кондиционной сверхэкспрессией гена *Clk* в мышечной системе на среде с нормальным содержанием белка уменьшилась на 12.7 % ($p < 0.001$), а на низкокалорийной среде снизилась на 13.4 % ($p < 0.001$). У самок же со сверхэкспрессией данного гена в мышцах не выявила достоверных изменений медианной ПЖ.

У самцов сверхактивация исследуемого гена в жировом теле на среде со стандартным содержанием дрожжей вызвала снижение медианной ПЖ на 11 % ($p < 0.001$). У самок обнаружено уменьшение медианой ПЖ на этой же среде на 18.9 % ($p < 0.001$) и на среде низкокалорийной на 2.7 % ($p < 0.01$).

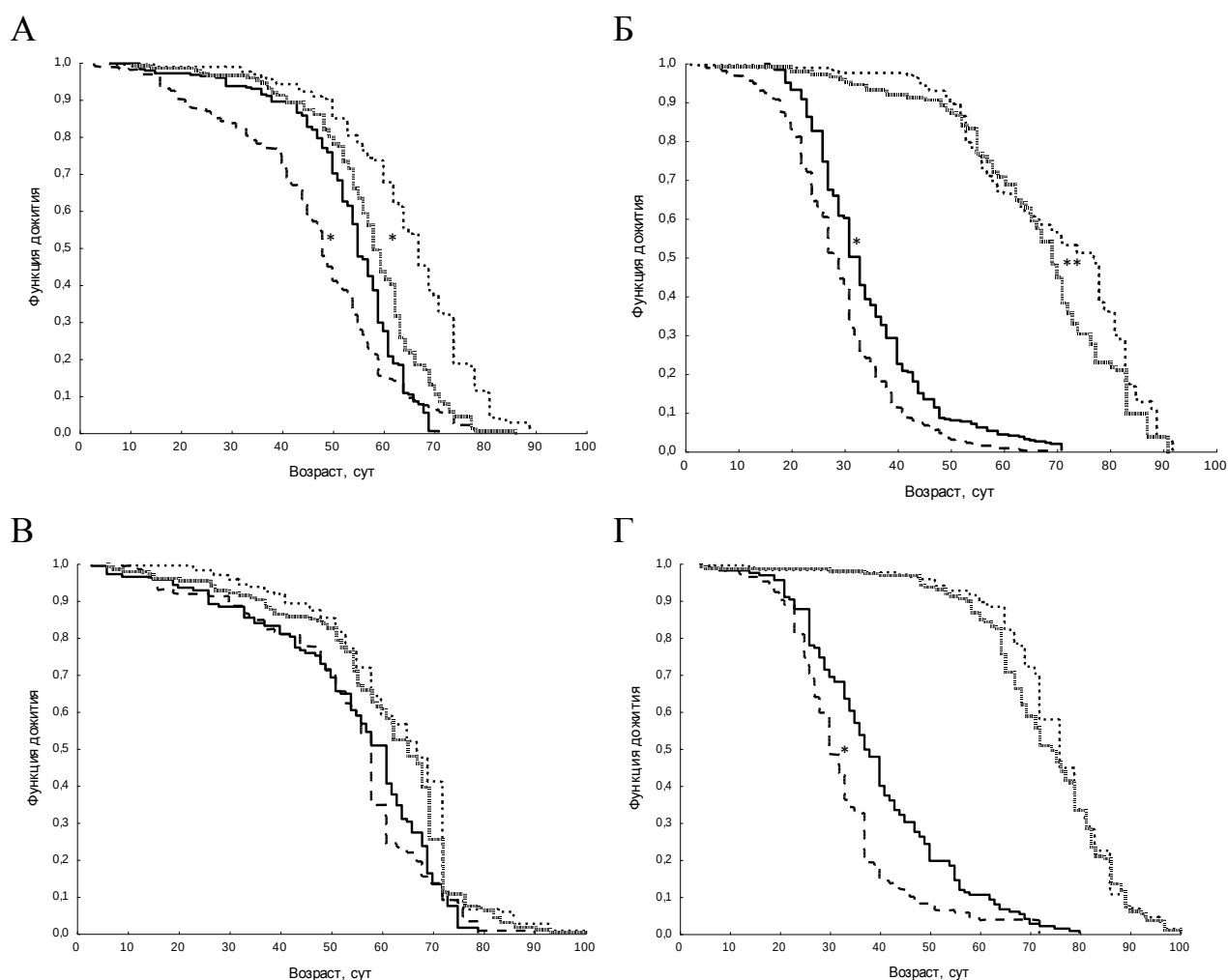


Рисунок 18. Влияние ограничительной диеты на ПЖ на фоне кондиционной сверхэкспрессии гена *Clk* в мышцах (А, Б) и жировом теле (В, Г) самцов (А, В) и самок (Б, Г)

Обозначения: — особи без сверхэкспрессии на среде со стандартным содержанием белка, --- особи со сверхэкспрессией на среде со стандартным содержанием белка, особи без сверхэкспрессии на среде с пониженным содержанием белка, -.-.-.-.- особи со сверхэкспрессией на среде с пониженным содержанием белка; * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ (критерий Колмогорова-Смирнова).

Далее полученные данные анализировали методом регрессии Кокса, который позволял дать прогноз риска наступления события (смерть мухи) и оценку влияния заранее определенных независимых переменных на этот риск.

У самцов сверхэкспрессия гена *Clk* статистически значимо увеличивает смертность (HR1.3229, 95% CI: 1.1382-1.5376, $p < 0.0001$). Ограничительная диета снижает смертность при сверхактивации исследуемого гена (HR0.5977,

95% CI: 0.5315-0.6720, $p < 0.0001$). У самок со сверхэкспрессией гена *Clk* смертность также выше (HR 1.74156, 95% CI: 1.52378-1.99048, $p < 0.0001$). Ограничительная диета значительно снижает смертность при сверхактивации исследуемого гена (HR 0.06972, 95% CI: 0.06064-0.08016, $p < 0.0001$).

Самцы и самки со сверхэкспрессией гена *Clk* в жировом теле имеют более низкую смертность по сравнению с особями, у которых исследуемый ген активирован в мышцах (HR 0.5988, 95% CI: 0.5319-0.6740, $p < 0.0001$; HR 0.65281, 95% CI: 0.58283-0.73118, $p < 0.0001$).

3.5.5. Влияние сверхэкспрессии гена *cycle* на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты

Изучали влияние кондиционной сверхэкспрессии гена *cyc* в мышечной системе и жировом теле на ПЖ самцов и самок на фоне ограничительной диеты. Анализ величин относительной экспрессии показал статистически значимое увеличение активности исследуемого гена ($p < 0.05$, критерий Манна-Уитни)(рис. 14). Использовали линию, которая несет дополнительную копию гена *cycle* под контролем промотора *UAS*: *w; P{UAS-CYC.HA}*. Белок, кодируемый этим геном, образует димер CLC/CYC, который стимулирует экспрессию *period (per)* и *timeless (tim)* (Hardin et al., 2011).

Показано, что у самцов с кондиционной сверхэкспрессией гена *cyc* в мышцах на среде с нормальным содержанием белка, кривая выживаемости проходит ниже, чем у особей без сверхактивации (рис. 19). Это свидетельствует об уменьшении продолжительности жизни особей со сверхактивацией исследуемого гена. Анализ медианной продолжительности жизни подтвердил данный результат (табл. 8, 9). Медианная продолжительность жизни у самцов с кондиционной сверхэкспрессией гена *cyc* в мышечной системе на среде со стандартным содержанием белка уменьшилась на 21.6 % ($p < 0.001$), а на низкокалорийной среде статистически значимых изменений не наблюдали. У самок же со сверхэкспрессией данного гена в мышцах достоверных изменений медианной ПЖ обнаружено не было.

У самцов со сверхактивацией исследуемого гена в жировом теле достоверных изменений не наблюдали. Показано, что у самок с кондиционной сверхэкспрессией гена *сус* в мышцах на обеих средах кривая выживаемости проходит выше, чем у особей без сверхактивации (рис. 18). Это свидетельствует об увеличении продолжительности жизни особей со сверхактивацией исследуемого гена. Анализ медианной продолжительности жизни подтвердил данный результат (табл. 8, 9). Медианная продолжительность жизни у самок с кондиционной сверхэкспрессией гена *сус* в мышцах на среде с нормальным содержанием белка увеличилась на 23.6 % ($p < 0.001$), а на низкокалорийной среде – на 8.6 % ($p < 0.01$).

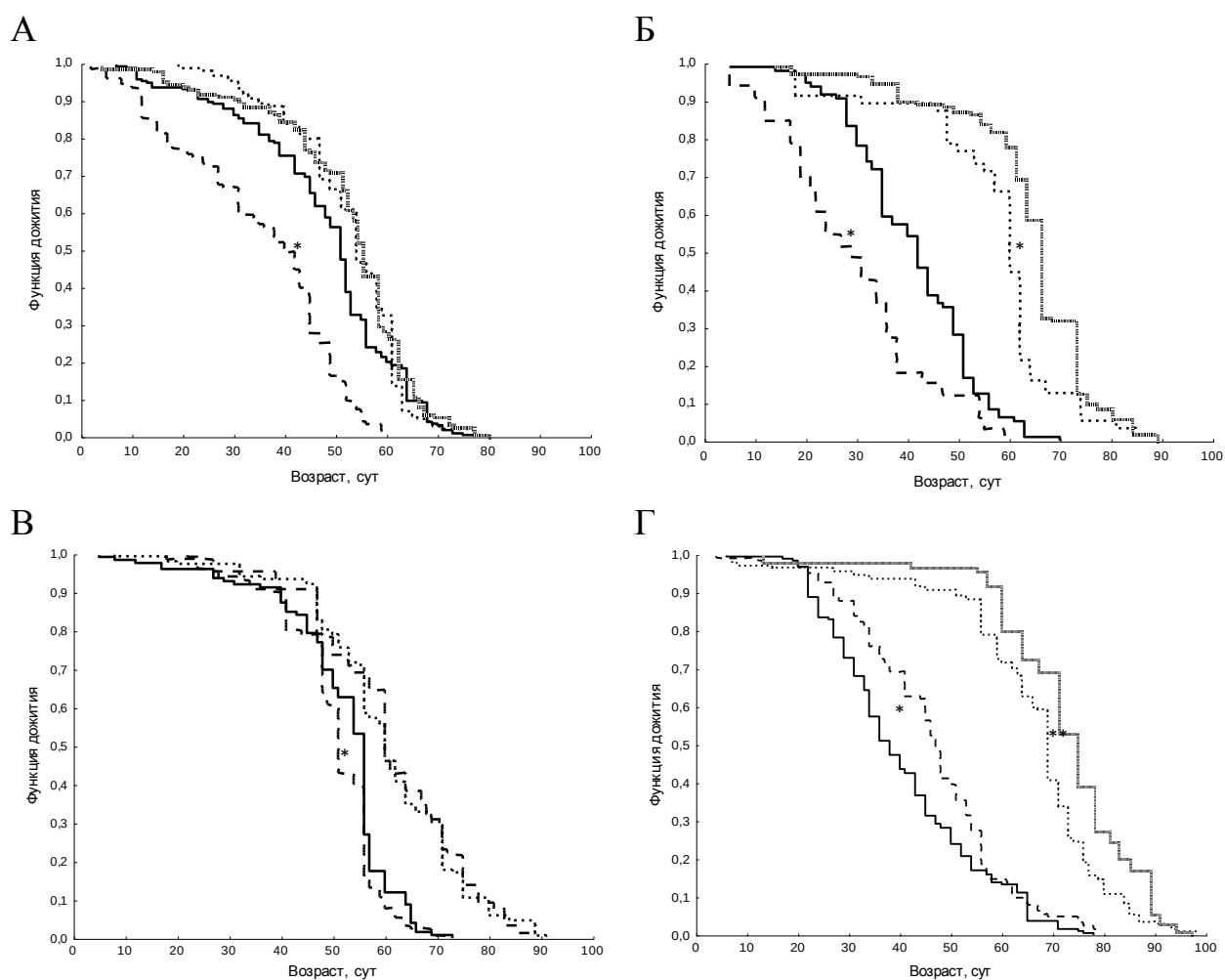


Рисунок 18. Влияние ограничительной диеты на ПЖ на фоне кондиционной сверхэкспрессии гена *sus* в мышцах (А, Б) и жировом теле (В, Г) самцов (А, В) и самок (Б, Г) *Drosophila melanogaster*.

Обозначения: — особи без сверхэкспрессии на среде со стандартным содержанием белка, --- особи со сверхэкспрессией на среде со стандартным содержанием белка, особи без сверхэкспрессии на среде с пониженным содержанием белка, -.-.-.-.- особи со сверхэкспрессией на среде с пониженным содержанием белка; * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ (критерий Колмогорова-Смирнова).

С помощью метода Кокса, установлено, что у самцов сверхэкспрессия гена *sus* статистически значимо увеличивает смертность (HR2.4997, 95% CI:2.0821-3.0011, $p < 0.0001$). Ограничительная диета снижает смертность при сверхактивации исследуемого гена (HR0.2762, 95% CI: 0.2384-0.3199, $p < 0.0001$). HR0.4267, 95% CI: 0.3695-0.4928, $p < 0.0001$.

У самок со сверхэкспрессией данного гена смертность статистически значимо не отличается. Ограничительная диета уменьшает смертность при активации гена *cuc* (HR 0.2227, 95% CI: 0.1913-0.2594, $p < 0.0001$).

Самцы и самки со сверхэкспрессией исследуемого гена в жировом теле имеют более низкую смертность по сравнению с особями со сверхэкспрессией в мышцах (HR 0.4267, 95% CI: 0.3695-0.4928, $p < 0.0001$; HR 0.4271, 95% CI: 0.3702-0.4927, $p < 0.0001$).

3.5.6. Влияние сверхэкспрессии гена *timeless* на продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты

Изучали влияние кондиционной сверхэкспрессии гена *tim* в мышцах и жировом теле на ПЖ самцов и самок на фоне ограничительной диеты. Анализ величин относительной экспрессии показал статистически значимое увеличение активности исследуемого гена ($p < 0.05$, критерий Манна-Уитни) (рис. 14). Использовали линию, которая несет дополнительную копию гена *timeless* под контролем промотора *UAS*: $y, w; P\{tim-HA\}$. Его продукт формирует гетеродимер с белком Period, который осуществляет репрессию CLC/CYC комплекса и своей активности (Hardin et al., 2011).

Показано, что у самцов с кондиционной сверхэкспрессией гена *tim* в мышцах и жировом теле на низкокалорийной среде кривая выживаемости проходит выше, чем у особей без сверхактивации (рис. 19). Это свидетельствует об увеличении продолжительности жизни особей со сверхактивацией исследуемого гена. Анализ медианной продолжительности жизни подтвердил данный результат (табл. 8, 9). Медианная продолжительность жизни у самцов с кондиционной сверхэкспрессией гена *tim* в мышечной системе и жировом теле на среде со стандартным содержанием белка не показала значимых изменений, а на низкокалорийной среде мы наблюдаем увеличение медианной ПЖ на 14 % ($p < 0.001$) и 4.7 % ($p < 0.01$) соответственно. У самок же сверхэкспрессия гена *tim* в мышцах на стандартной среде вызвала увеличение медианной ПЖ на 6.8 % ($p < 0.01$), а в

жировом теле мы получили снижение на 23.2 % ($p < 0.001$) и увеличение на 3.6% ($p < 0.001$) на среде с низким содержанием дрожжей.

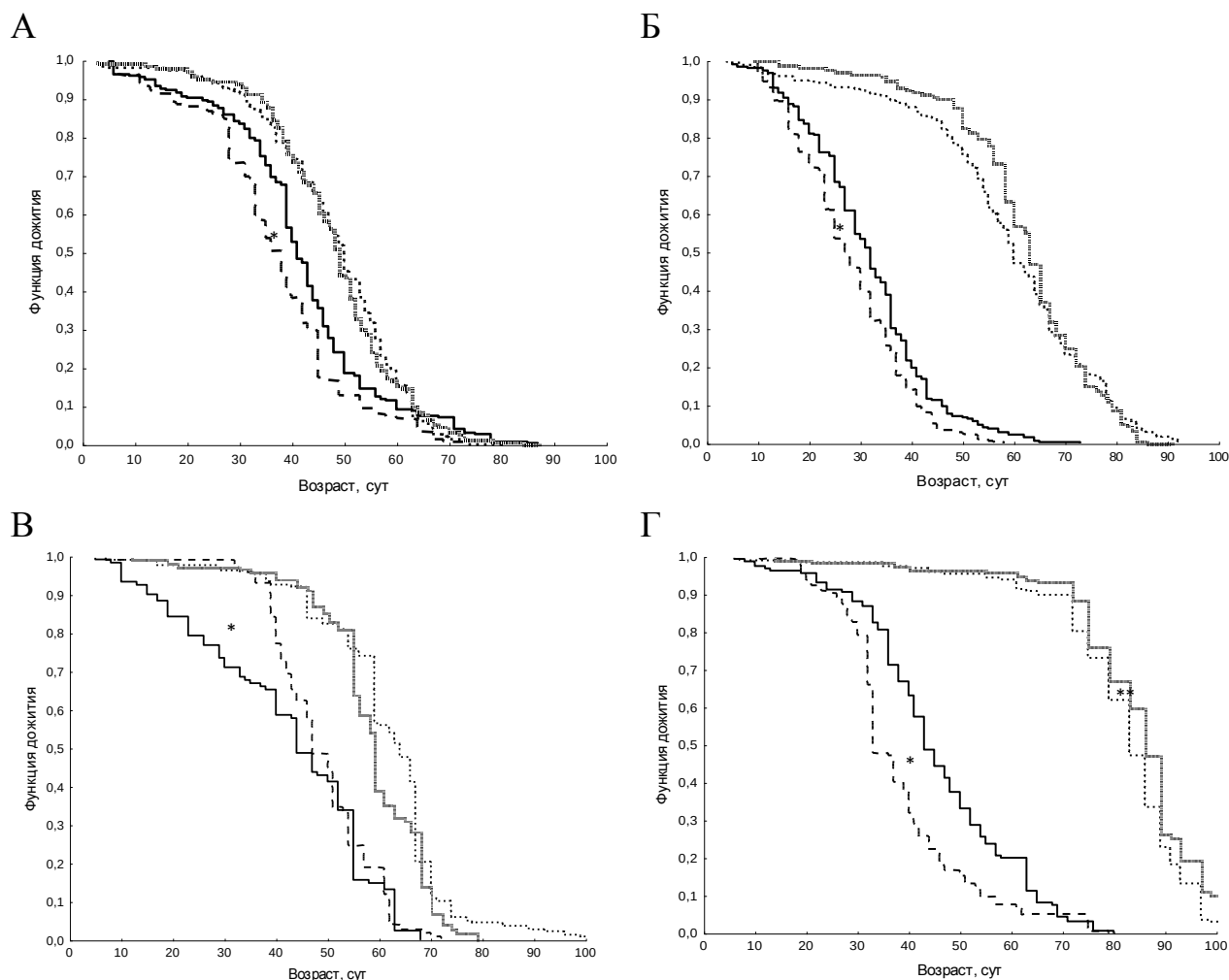


Рисунок 19. Влияние ограничительной диеты на ПЖ на фоне кондиционной сверхэкспрессии гена *tim* в мышцах (А, Б) и жировом теле (В, Г) самцов (А, В) и самок (Б, Г) *Drosophila melanogaster*.

Обозначения: — особи без сверхэкспрессии на среде со стандартным содержанием белка, --- особи со сверхэкспрессией на среде со стандартным содержанием белка, особи без сверхэкспрессии на среде с пониженным содержанием белка, особи со сверхэкспрессией на среде с пониженным содержанием белка; * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ (критерий Колмогорова-Смирнова).

Анализ регрессии Кокса показал, что у самцов сверхэкспрессия гена *tim* статистически значимо увеличивает смертность (HR1.3631, 95% CI: 1.1743-1.5823, $p < 0.0001$). Ограничительная диета снижает смертность при сверхактивации исследуемого гена (HR0.4748, 95% CI: 0.4167-0.5411, $p < 0.0001$).

У самок со сверхэкспрессией исследуемого гена смертность также выше (HR 1.59933, 95% CI: 1.40133-1.82531, $p < 0.0001$). Ограничительная диета значительно снижает смертность при сверхэкспрессии гена *tim* (HR 0.06376, 95% CI: 0.05563-0.07308, $p < 0.0001$).

Самцы и самки со сверхактивацией гена *tim* в жировом теле имеют более низкую смертность по сравнению с особями со сверхэкспрессией в мышцах (HR 0.5206, 95% CI: 0.4574-0.5925, $p < 0.0001$; HR 0.25156, 95% CI: 0.22223-0.28477, $p < 0.0001$).

Таблица 8

Влияние кондиционной сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в мышцах на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* на фоне ограничительной диеты

Вариант эксперимента	Min	$\bar{X} \pm \Delta m$	M	90%	Max	MRDT	a	R	N
♂ <i>UAS-cry12/ELAV(-)</i> 1	7	35±1.1	36	46	60	7.38	0.09386	0.00221	118
♂ <i>UAS-cry12/ELAV(+)</i> 1	5	20.2±0.9	14 *	37*	47	12.67	0.05471	0.01979	172
♀ <i>UAS-cry12/ELAV(-)</i> 1	2	29.3±0.9	30	48	58	10.41	0.06658	0.00726	199
♀ <i>UAS-cry12/ELAV(+)</i> 1	6	27.1±0.9	27	46	55	11.58	0.05988	0.01004	230
♂ <i>UAS-cry12/ELAV(-)</i> 2	4	41.7±0.9	43	58	76	9.38	0.07387	0.00218	240
♂ <i>UAS-cry12/ELAV(+)</i> 2	4	37.7±1.1	38 **	54 **	65	9.96	0.06962	0.00327	198
♀ <i>UAS-cry12/ELAV(-)</i> 2	4	50.6±1.2	54	71	80	10.56	0.06561	0.00145	248
♀ <i>UAS-cry12/ELAV(+)</i> 2	4	47±1.1	55*	65**	76	9.89	0.07012	0.00155	290
♂ <i>UAS-cry24/ELAV(-)</i> 1	4	37.9±1.1	40	52	63	6.89	0.10062	0.00132	130
♂ <i>UAS-cry24/ELAV(+)</i> 1	2	34.5±1.2	35 **	53 **	74	15.19	0.04563	0.00822	214
♀ <i>UAS-cry24/ELAV(-)</i> 1	6	35.8±0.9	34	51	81	11.56	0.05998	0.00552	196
♀ <i>UAS-cry24/ELAV(+)</i> 1	3	32.9±0.9	35	49**	62	7.99	0.0868	0.00331	161
♂ <i>UAS-cry24/ELAV(-)</i> 2	4	43.9±1.1	46	61	88	11.5	0.06029	0.00294	196
♂ <i>UAS-cry24/ELAV(+)</i> 2	5	45±1.1	48	71 *	77	12.42	0.0558	0.00304	260
♀ <i>UAS-cry24/ELAV(-)</i> 2	4	58±1.3	63	77	91	10.15	0.06832	0.00073	235
♀ <i>UAS-cry24/ELAV(+)</i> 2	3	57±1.1	60	77	91	9.83	0.07048	0.00073	303
♂ <i>UAS-per10/ELAV (-)</i> 1	7	45.1±1.3	46	64	73	9.51	0.07291	0.0017	129
♂ <i>UAS-per10/ELAV(+)</i> 1	8	32.3±1	33 *	50 *	65	10.08	0.06879	0.00536	188
♀ <i>UAS-per10/ELAV(-)</i> 1	5	49.2±0.9	47	71	85	10.89	0.06364	0.00178	322
♀ <i>UAS-per10/ELAV(+)</i> 1	3	26.2±0.6	27*	40*	64	10.91	0.06354	0.0103	428
♂ <i>UAS-per10/ELAV (-)</i> 2	3	56.8±1.3	62	76	89	9.93	0.0698	0.00078	174
♂ <i>UAS-per10/ELAV(+)</i> 2	11	50.7±1.3	50*	73	84	10.4	0.06665	0.00146	130
♀ <i>UAS-per10/ELAV(-)</i> 2	3	61.3±0.9	59	83	92	10.53	0.06584	0.00071	290
♀ <i>UAS-per10/ELAV(+)</i> 2	8	60.6±0.9	63	82**	85	9.48	0.07312	0.00049	416
♂ <i>UAS-per2.4/ELAV(-)</i> 1	10	46.5±0.9	48	62 **	79	7.77	0.08916	0.00086	201

♂ <i>UAS-per2.4/ELAV(+)</i> 1	7	36.3±0.9	38 **	55	71	10.74	0.06455	0.00437	248
♀ <i>UAS-per2.4/ELAV(-)</i> 1	8	34.3±0.9	31	51	67	9.9	0.07003	0.00461	185
♀ <i>UAS-per2.4/ELAV(+)</i> 1	5	30.7±0.6	31	44**	59	7.74	0.08958	0.00396	266
♂ <i>UAS-per2.4/ELAV(-)</i> 2	12	55.1±1.2	58	73	82	8.55	0.08103	0.00053	177
♂ <i>UAS-per2.4/ELAV(+)</i> 2	6	51.6±1.1	55 *	66	85	9.35	0.07411	0.00099	176
♀ <i>UAS-per2.4/ELAV(-)</i> 2	7	70±1	73	88	91	7.77	0.08922	9e-05	248
♀ <i>UAS-per2.4/ELAV(+)</i> 2	8	65.4±1	69*	83*	91	8.77	0.07906	0.00025	263
♂ <i>UAS-Clk/ELAV(-)</i> 1	6	53.4±0.7	55	66	71	5.8	0.11954	0.00011	263
♂ <i>UAS-Clk/ELAV(+)</i> 1	3	46.4±1	48 *	65	81	10.59	0.06547	0.00202	286
♀ <i>UAS-Clk/ELAV(-)</i> 1	15	34.4±0.6	32	48	71	11.11	0.0624	0.00575	330
♀ <i>UAS-Clk/ELAV(+)</i> 1	4	28.8±0.5	28.5*	42**	69	9.36	0.07408	0.00684	380
♂ <i>UAS-Clk/ELAV(-)</i> 2	6	64.7±0.8	67	81	89	7.56	0.09164	0.00014	285
♂ <i>UAS-Clk/ELAV(+)</i> 2	10	57.3±0.8	58 *	71 *	86	7.03	0.09861	2e-04	241
♀ <i>UAS-Clk/ELAV(-)</i> 2	1	69.7±1	77	89	92	8.71	0.07958	0.00017	294
♀ <i>UAS-Clk/ELAV(+)</i> 2	6	66.4±1.1	69	83*	91	8.93	0.07759	0.00026	222
♂ <i>UAS-cyc/ELAV(-)</i> 1	7	47.9±1	51	64	79	8.89	0.07799	0.00111	230
♂ <i>UAS-cyc/ELAV(+)</i> 1	2	35.2±1.4	40 *	52 *	59	9.78	0.07087	0.00382	123
♀ <i>UAS-cyc/ELAV(-)</i> 1	5	37.1±0.9	35	55	82	11.85	0.05849	0.00513	227
♀ <i>UAS-cyc/ELAV(+)</i> 1	5	35.7±1.2	36	58	66	11.99	0.05779	0.00538	179
♂ <i>UAS-cyc/ELAV(-)</i> 2	19	52.6±0.9	54	63	77	6.68	0.10381	0.00026	145
♂ <i>UAS-cyc/ELAV(+)</i> 2	4	52.1±1	55	66 **	80	7.93	0.08742	0.00054	203
♀ <i>UAS-cyc/ELAV(-)</i> 2	15	62.2±1	62	74	87	6.76	0.10257	1e-04	151
♀ <i>UAS-cyc/ELAV(+)</i> 2	13	51.6±1.5	59*	73	89	12.86	0.05388	0.00216	183
♂ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i> 1	5	41.6±0.9	41	60	87	12.6	0.05499	0.00413	296
♂ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i> 1	5	36.9±0.9	38 **	53	74	11.02	0.06292	0.00448	218
♀ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i> 1	5	31.6±0.7	32*	46*	73	10.58	0.06551	0.00643	309
♀ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i> 1	10	28±0.6	27.5	41	58	8.52	0.08131	0.00611	310
♂ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i> 2	3	48±0.8	50	63	81	8.01	0.08658	0.00081	277
♂ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i> 2	3	48.1±0.8	49	63**	87	9.09	0.07628	0.00125	276
♀ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i> 2	4	58.7±0.8	60	80	92	10.56	0.06566	0.00083	504
♀ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i> 2	9	61.9±0.7	63**	79	91	7.91	0.08758	0.00022	400

Обозначения: 1– среда с нормальным содержанием белка; 2– среда с низким содержанием белка; * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ (первый столбец – по критерию Колмогорова-Смирнова, четвертый столбец – по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; пятый столбец – по критерию Ванг-Аллисона).

Таблица 9

Влияние кондиционной сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в мышцах на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* на фоне ограничительной диеты

Вариант эксперимента	Min	$\bar{X} \pm \Delta m$	M	90%	Max	MRDT	a	R	N
♂ <i>UAS-cry12/ELAV(-)</i> 1	6	49.5±0.7	50	64	76	6.96	0.09952	0.00044	216
♂ <i>UAS-cry12/ELAV(+)</i> 1	4	43±0.7	43*	56**	69	7.08	0.09792	0.00087	260
♀ <i>UAS-cry12/ELAV(-)</i> 1	3	47.3±1	48	65	80	10.05	0.06897	0.00166	272
♀ <i>UAS-cry12/ELAV(+)</i> 1	6	45.3±1	48	61**	74	9.01	0.07692	0.00144	226
♂ <i>UAS-cry12/ELAV(-)</i> 2	8	50.4±0.8	48	71	81	9.82	0.07057	0.00124	356
♂ <i>UAS-cry12/ELAV(+)</i> 2	23	54.7±0.7	58*	69**	91	10.11	0.06858	0.001	424
♀ <i>UAS-cry12/ELAV(-)</i> 2	8	81.2±0.9	84	98	106	7.75	0.08939	4e-05	272
♀ <i>UAS-cry12/ELAV(+)</i> 2	13	81.4±0.9	81	98	109	7.71	0.08995	3e-05	290
♂ <i>UAS-cry24/ELAV(-)</i> 1	5	49±0.8	50	65	76	7.28	0.09515	0.00053	270
♂ <i>UAS-cry24/ELAV(+)</i> 1	12	50.4±0.6	51	62*	79	6.71	0.10326	0.00035	264
♀ <i>UAS-cry24/ELAV(-)</i> 1	5	49.8±0.9	52	71	80	10.01	0.06926	0.00136	290
♀ <i>UAS-cry24/ELAV(+)</i> 1	7	43.3±0.8	44*	62*	79	10.95	0.06329	0.0028	352
♂ <i>UAS-cry24/ELAV(-)</i> 2	9	49.7±0.7	51	62	76	8.62	0.08045	0.00088	420
♂ <i>UAS-cry24/ELAV(+)</i> 2	11	58.7±0.7	61*	72*	101	8.97	0.07725	0.00052	312
♀ <i>UAS-cry24/ELAV(-)</i> 2	23	79.7±0.7	83	96	109	7.81	0.08877	4e-05	354
♀ <i>UAS-cry24/ELAV(+)</i> 2	9	72.7±1.2	76*	90*	102	8.3	0.08349	0.00011	230
♂ <i>UAS-per10/ELAV (-)</i> 1	3	61.7±1.2	66	82	86	8.89	0.07798	0.00035	218
♂ <i>UAS-per10/ELAV(+)</i> 1	6	59.6±1.1	64	76*	90	9.42	0.07361	0.00053	256
♀ <i>UAS-per10/ELAV(-)</i> 1	8	47.6±0.9	42	69	86	12.07	0.05743	0.00251	316
♀ <i>UAS-per10/ELAV(+)</i> 1	2	39.8±0.8	40**	58*	79	10.71	0.06471	0.00352	294
♂ <i>UAS-per10/ELAV (-)</i> 2	4	61.2±0.9	65	77	93	8.22	0.08432	0.00028	278

♂ <i>UAS-per10/ELAV(+)</i> 2	8	61.7±1.1	61	82*	102	11.37	0.06096	0.00087	278
♀ <i>UAS-per10/ELAV(-)</i> 2	6	67.5±1.2	67	86	93	9.25	0.07495	0.00027	198
♀ <i>UAS-per10/ELAV(+)</i> 2	5	70.9±0.9	75*	92*	100	9.87	0.07024	0.00027	484
♂ <i>UAS-per2.4/ELAV(-)</i> 1	5	48.1±0.9	52	63	80	8.13	0.08523	0.00083	236
♂ <i>UAS-per2.4/ELAV(+)</i> 1	12	47.7±0.6	51**	62*	68	5.84	0.11862	0.00024	314
♀ <i>UAS-per2.4/ELAV(-)</i> 1	3	38.6±0.6	36	54	65	8.8	0.07873	0.00251	334
♀ <i>UAS-per2.4/ELAV(+)</i> 1	5	36±0.8	33**	54	62	9.64	0.07192	0.00373	290
♂ <i>UAS-per2.4/ELAV(-)</i> 2	7	63.3±1.1	66	81	105	9.88	0.07015	0.00048	280
♂ <i>UAS-per2.4/ELAV(+)</i> 2	12	61.3±1	64**	75	100	9.34	0.07425	0.00047	252
♀ <i>UAS-per2.4/ELAV(-)</i> 2	8	76.5±0.9	75	89	100	7.11	0.09752	3e-05	246
♀ <i>UAS-per2.4/ELAV(+)</i> 2	38	80.6±0.6	82*	92*	105	6.82	0.10168	2e-05	328
♂ <i>UAS-Clk/ELAV(-)</i> 1	3	54.5±1.1	61	73	79	8.86	0.07824	0.00062	272
♂ <i>UAS-Clk/ELAV(+)</i> 1	9	53.6±1.1	58	72	90	9.72	0.07128	0.00093	248
♀ <i>UAS-Clk/ELAV(-)</i> 1	6	39.5±0.8	37	62	80	12.59	0.05507	0.00472	306
♀ <i>UAS-Clk/ELAV(+)</i> 1	5	32.6±0.7	30*	46*	72	12.98	0.05341	0.0082	282
♂ <i>UAS-Clk/ELAV(-)</i> 2	9	62.7±1	67	72	101	9.36	0.07409	0.00043	240
♂ <i>UAS-Clk/ELAV(+)</i> 2	6	60.4±0.9	65	76	110	10.48	0.06613	0.00075	376
♀ <i>UAS-Clk/ELAV(-)</i> 2	7	74.5±0.8	76	89	101	7.57	0.09159	6e-05	304
♀ <i>UAS-Clk/ELAV(+)</i> 2	4	72.7±0.8	74**	89	114	8.99	0.07712	0.00017	402
♂ <i>UAS-cyc/ELAV(-)</i> 1	5	51.5±0.7	56	64	73	5.71	0.12142	0.00013	252
♂ <i>UAS-cyc/ELAV(+)</i> 1	22	50.2±0.6	51**	60	73	5.64	0.12292	0.00015	260
♀ <i>UAS-cyc/ELAV(-)</i> 1	6	40.5±0.8	38	65	78	11.98	0.05787	0.00402	376
♀ <i>UAS-cyc/ELAV(+)</i> 1	4	46.1±0.9	47*	62*	79	10.32	0.06715	0.00199	248
♂ <i>UAS-cyc/ELAV(-)</i> 2	8	60.5±0.7	60	80	91	9.44	0.07341	0.00053	424
♂ <i>UAS-cyc/ELAV(+)</i> 2	18	60.9±0.9	60	78	89	8.98	0.07721	0.00042	260
♀ <i>UAS-cyc/ELAV(-)</i> 2	7	65.9±1.1	69	84	98	8.77	0.07901	0.00025	220
♀ <i>UAS-cyc/ELAV(+)</i> 2	13	72.7±1	75*	89*	97	7.58	0.09144	7e-05	188
♂ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i> 1	5	42±1.1	44	63	68	10.2	0.06796	0.00246	242
♂ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i> 1	7	48.7±0.7	47*	62**	72	6.59	0.10526	0.00038	202
♀ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i> 1	6	45.4±0.8	43	65	80	10.63	0.06522	0.00223	320
♀ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i> 1	11	38.3±0.8	33*	54**	79	12.65	0.05481	0.00533	288

♂ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i> 2	7	61.1±0.8	64	74	103	9.97	0.06951	0.00064	272
♂ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i> 2	12	58.5±0.7	59**	70	79	6.04	0.11469	8e-05	232
♀ <i>UAS-tim/ELAV(-)</i> 2	7	81.3±0.9	83	97	105	7	0.09897	2e-05	262
♀ <i>UAS-tim/ELAV(+)</i> 2	14	84.3±1	86**	101**	108	7.49	0.09249	2e-05	236

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. Также одним из ведущих экологических факторов, оказывающих влияние на живые организмы, является световой режим.

У человека возраст существенно влияет на суточные ритмы сна и бодрствования. В зрелом возрасте результаты актиграфии показывают значительное уменьшение времени сна. Показатели «латентности сна», количество ночных пробуждений, фрагментация сна и частота дневного сна значительно увеличиваются в зрелом возрасте (Age-associated difference in..., 2002). Подобные же 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 колебания робастны даже у самых старых особей (Old flies have a..., 2012), несмотря на то, что циркадные ритмы в целом организме угнетаются при старении. Нами было показано, что во всем теле дрозофилы активность многих генов циркадных ритмов с возрастом уменьшается, что вероятно отрицательно сказывается на продолжительности и показателях качества жизни.

Для выявления механизмов, регулирующих продолжительность жизни и старение, активно используется поиск генов, снижение или полное выключение активности, которых существенно влияют на продолжительность жизни. С другой стороны, гены долгожительства могут быть идентифицированы путем измерения продолжительности жизни животных со сверхэкспрессией гена-кандидата. Например, с использованием данного подхода было обнаружено, что сверхактивация гена транскрипционного фактора *dFOXO* в жировом теле *Drosophila melanogaster* приводит к продлению жизни животных (Long-lived *Drosophila* with..., 2004).

С другой стороны, сверхэкспрессия генов может снижать продолжительность. К подобному эффекту приводит сверхактивация гена транскрипционного фактора p53 у мышей (Neuronal expression of p53..., 2005).

До настоящего момента роль генов регуляции циркадных ритмов в процессе старения не была достаточно изучена. Нами впервые показано влияние сверхэкспрессии целого блока генов регуляции циркадных ритмов в различных типах тканей на стрессоустойчивость и продолжительность жизни. Использование в экспериментах кондиционного (мифепристон-активируемого) драйвера позволило контролировать не только ткань, но и стадию индукции экспрессии трансгена. Кроме того, известно, что мифепристон не оказывает существенного влияния на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster* (Alteration of *Drosophila* life..., 2007).

Известно, что гены циркадных ритмов влияют на такие процессы как контроль репликации ДНК и клеточной пролиферации, регуляция метаболизма, суточных изменений уровня гормонов, локомоторной активности, циклов сна и бодрствования, полового поведения (Katada, Sassone-Corsi, 2010; Kondratov et al., 2007; Kamminga, de Haan, 2006). Поэтому возраст-зависимое изменение активности генов регуляции циркадных ритмов отрицательно сказывается на продолжительности и показателях качества жизни (рис. 20).

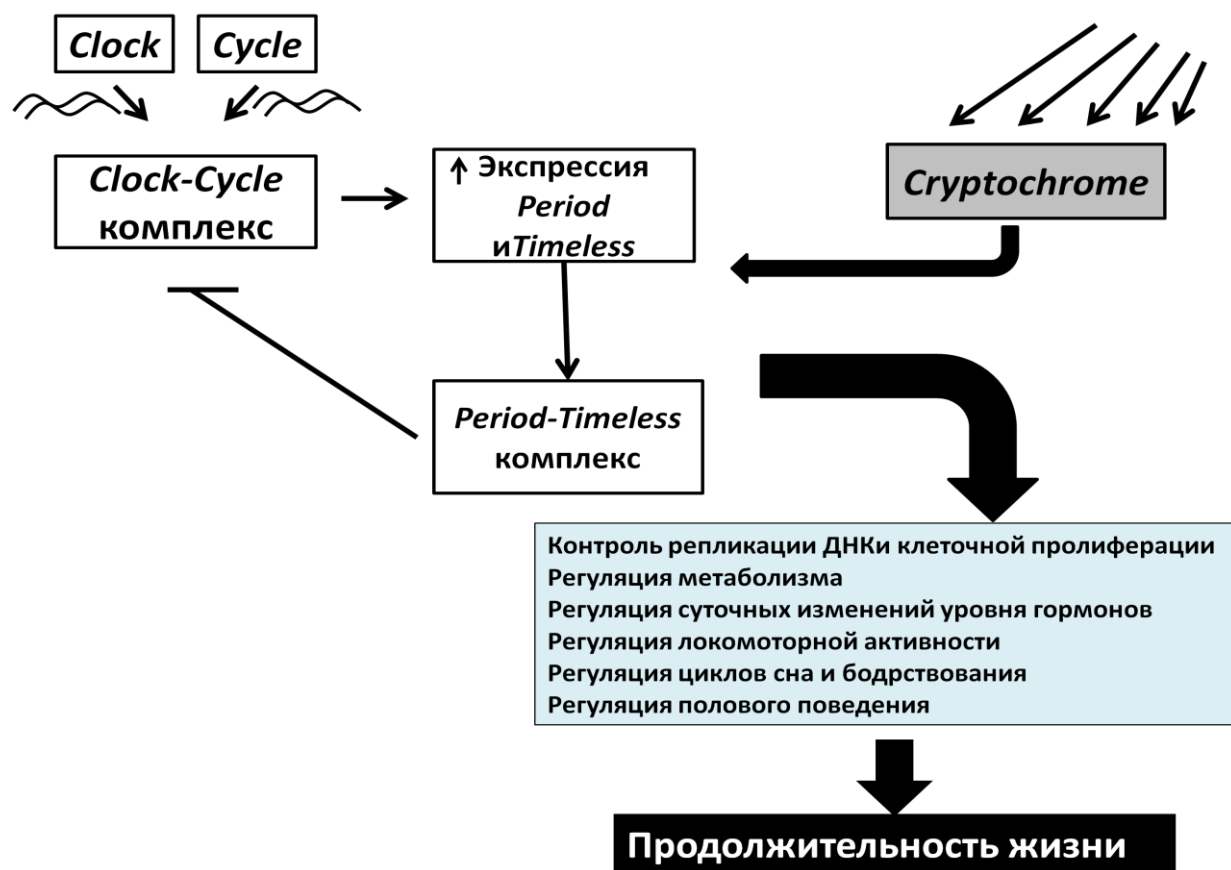


Рисунок 20. Механизм влияния генов циркадных ритмов на продолжительность жизни.

Нарушение функций многих генов ведет к укорочению продолжительности жизни, однако это 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). Ранее было показано, что у мышей с делецией генов *Bmal1* (ортолог гена *cyc* у дрозофилы) и *Clk* наблюдаются признаки преждевременного старения (Kondratov, Antoch, 2007). Нами установлено, что мутация гена *cry* у самцов *D. melanogaster* уменьшает медианную продолжительность жизни и устойчивость к голоданию.

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. Например, фактор роста IGF-I и гормон роста, вырабатываемые нейросекреторными клетками мозга, способны регулировать продолжительность жизни млекопитающих (Brain IGF-1 receptors control..., 2008; Holzenberger et al., 2009). Старение нервной системы значительно лимитирует продолжительность жизни организма. Старение мозга приводит к развитию нейрологических заболеваний, которые ускоряют и усугубляют нормальный процесс старения (Lee et al., 2000). Таким образом, состояние и функционирование нервной системы влияет на стрессоустойчивость, процессы старения и продолжительность жизни организма.

Ранее показано, 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 привела к увеличению медианной продолжительности жизни и появлению резистентности 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).

По результатам нашего исследования было установлено, что кондиционная сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в нервной системе дрозофилы приводит как к продлению жизни животных (*cry*, *cyc*) по сравнению с особями без сверхэкспрессии (до 15 %), так и к уменьшению продолжительности жизни (*Clk*) (до 10 %) или остается неизменной (*per*, *tim*). При этом наблюдали достоверное изменение не только медианной, но и

максимальной продолжительности жизни (табл. 10). По-видимому, это в первую очередь связано с компенсацией возраст-зависимого изменения уровня активности исследуемых генов в головах взрослых мух при старении.

Изменение продолжительности жизни, как правило, сопряжено с изменением устойчивости живых организмов к различным видам стресса (Age-dependent loss..., 1987; Thermotolerance and extended..., 1995; Kapahi et al., 1999; Morley et al., 2004; Brown-Borg, 2006; Slack et al., 2010). Благодаря многочисленным исследованиям, было показано, что 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. 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. Для этого мух подвергали острому воздействию индуктора свободных радикалов параквата, гипертермии и голоданию.

Взаимодействие активных форм кислорода с нуклеиновыми кислотами приводит к образованию широкого спектра повреждений, включая разрывы цепей, модификации сахаров и аддукты оснований (Age-associated increase..., 1999). Поэтому в стресс-ответе на действие прооксидантов ключевую функцию выполняют механизмы эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов. Следует отметить, что показана связь между сигнальными путями, формирующими ответ на повреждение ДНК (ключевой фактор индукции клеточного старения), и продуктами циркадных генов (Gutierrez-Martinez et al., 2016). Белки PER1 и TIM взаимодействуют с киназами сверхочных точек (checkpoints) клеточного цикла ATM и ATR (Kondratov et al.,

2007). Они ответственны за реакцию клетки на двухцепочечные и одноцепочечные разрывы ДНК.

В большинстве случаев сверхэкспрессия генов циркадных ритмов приводила к увеличению средней длительности жизни самцов и самок в условиях действия индуктора свободных радикалов параквата, по сравнению с особями без сверхэкспрессии. Исключением являются особи со сверхэкспрессией гена *сус* – их медианная продолжительность жизни в условиях данного фактора была ниже (табл. 10).

Основным типом повреждений при тепловом шоке являются повреждения белков, однако, под его влиянием в результате увеличения темпов метаболизма и выработки свободных радикалов также происходит повреждение ДНК. Обнаружено, что повышенная транскрипция генов циркадных ритмов у самцов повысила устойчивость к гипертермии, тогда как у самок мы получили обратный результат (табл. 10).

Чрезмерное снижение потребления пищи помимо прочих негативных эффектов также вызывает окислительный стресс. Повышенная транскрипционная активность генов *cry* и *Clk* у самцов привела к повышению средней длительности жизни в условиях голодания (табл. 10). Сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в остальных вариантах эксперимента с воздействием голодания не повлияла на медианную выживаемость, либо вызвала негативный эффект.

Таблица 10

Изменение показателей качества жизни у особей со сверхэкспрессией генов циркадных ритмов

Линии	Медианная ПЖ (нервная система) (%)	Стрессоустойчивость (нервная система)			Сверхэкспрессия в мышцах		Сверхэкспрессия в жировом теле	
		Гипертермия (%)	Действие прооксиданта параквата (%)	Голодание (%)	Среда 1 (%)	Среда 2 (%)	Среда 1 (%)	Среда 2 (%)
♂ <i>UAS-cry12</i>	+15	+8	–	+13	-61	-11.6	-14	+20.8
♀ <i>UAS-cry12</i>	+8.7	–	+17	–	–	–	–	–
♂ <i>UAS-cry24</i>	–	–	+41	–	-12.5	–	–	+19
♀ <i>UAS-cry24</i>	+3.4	-34	–	–	–	–	-15.3	-8.4
♂ <i>UAS-per10</i>	–	+9	–	-19	-28.2	-11.3	–	–
♀ <i>UAS-per10</i>	+8.3	-23	+8	–	-56.3	–	–	+12
♂ <i>UAS-per2.4</i>	–	–	+8	-21	-20.8	-5.1	–	–
♀ <i>UAS-per2.4</i>	–	-17	-17	–	–	–	+23.6	+8.6
♂ <i>UAS-Clk</i>	–	14	+9	+10	-12.7	-13.4	–	–
♀ <i>UAS-Clk</i>	-9.4	–	+22	-44	-10.9	–	-18.9	-2.7
♂ <i>UAS-cyc</i>	10.7	27	-24	–	-21.6	–	–	–
♀ <i>UAS-cyc</i>	–	-17	-17	–	–	–	+23.6	+8.6
♂ <i>UAS-tim</i>	–	–	–	-35	–	+14	+6.8	–
♀ <i>UAS-tim</i>	–	–	+46	-13	–	+4.7	-23.2	+3.6

Обозначения: ♂ - самцы, ♀ - самки, – - отличий нет; среда 1 - со стандартным содержанием дрожжей, среда 2 - с пониженным содержанием дрожжей.

Центральный осциллятор, формируемый генами циркадных ритмов и их продуктами, задающий эндогенный ритм, находится в головном мозге, однако имеются собственные осцилляторы в периферических тканях. Поддержание связи между разными осцилляторами является важным условием долголетия. Существует точка зрения, согласно которой влияние ограничительной диеты на здоровье и длительность жизни во многом определяется ее благоприятным влиянием на циркадные ритмы в периферических тканях (Longo, Panda S., 2016).

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).

Предполагается, что в механизмах увеличения продолжительности жизни при ограничении калорийности питания основную роль играют такие факторы, как снижение плодовитости, замедление роста, уменьшение содержания висцерального жира в теле, увеличение репарации ДНК, изменения скорости биосинтеза белков (Анисимов, Соловьев, 1999; Guarente, Kenyon, 2000; Partridge, Gems, 2002). Немаловажную роль в увеличении продолжительности жизни при ограничительной диете играют гены циркадных ритмов (Calorie restriction regulates..., 2016).

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) (рис. 21).

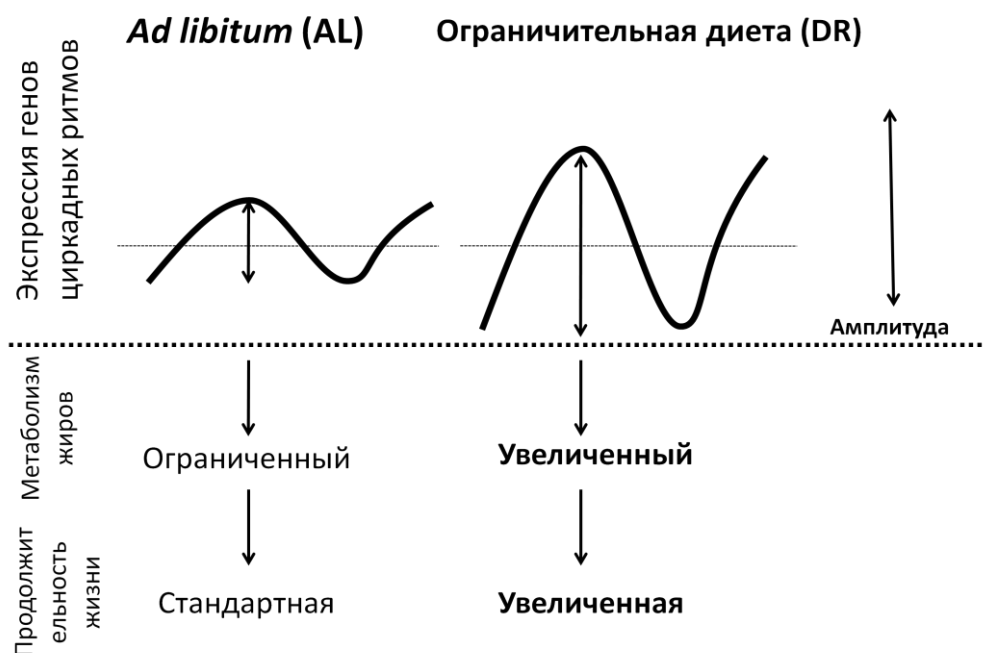


Рисунок 21. Механизм влияния ограничительной диеты на активность генов циркадных ритмов и продолжительность жизни (Katewa et al., 2015). Примечание: *Ad libitum* – стандартная среда, DR – среда с ограничением калорийности.

Высококалорийная диета нарушает работу циркадных часов в печени и тем самым влияет на ритм колебаний транскрипционной активности генов метаболизма через активацию PPAR, который в обычном состоянии не активен (Sassone-Corsi, 2013). У человека нарушение циркадных ритмов является причиной сахарного диабета, ожирения, артериальной гипертензии.

Показано, что мутация в гене *Clock* также снижает эффективность влияния ограничительной диеты на продолжительность жизни (Katewa et al., 2016). У мутантов *tim* снижается эффект воздействия ограничительной диеты на метаболизм жиров. В наших экспериментах было показано, что сверхэкспрессия гена *cru* увеличивает медианную продолжительность жизни на фоне ограничительной диеты (табл. 10).

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

(4E-BP extends lifespan..., 2009). Выключение активности Sir2 подавляет увеличение продолжительности жизни при недостатке калорий.

Нейроны дрозофилы, вырабатывающие инсулиноподобный фактор роста, имеют выраженную суточную динамику электрофизиологической активности, от которой зависит их активность, а также экспрессию генов в жировом теле (аналог печени) мух.

К молекулярным механизмам влияния низкокалорийной диеты на скорость старения следует 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 (Peripheral circadian clocks ..., 2016).

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. Мы предположили, что если активировать исследуемые гены в периферических тканях (мышцы, жировое тело), то можем добиться увеличения продолжительности жизни на фоне ограничительной диеты.

Нами было получено, 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. При сверхактивации генов циркадных ритмов в жировом теле нами было получено, что ген *cru* у самцов увеличивает медианную продолжительность жизни (до 20 %) на низкокалорийной среде (табл. 10).

Таким образом, кондиционная сверхэкспрессия гена *cru* в жировом теле увеличивает медианную продолжительность жизни на низкокалорийной

среде. Как было описано выше, белки, кодируемые этим геном снижают трансактивацию воспалительного цитокина TNF- α , который, в свою очередь, в норме ингибирует CLOCK/BMAL1-ассоциированную экспрессию генов, несущих в промоторах *E-box* последовательности. Провоспалительные цитокины способны повышать уровень CRY1, индуцируя тем самым нарушение ритмики у мышей (Berson et al., 2003). Недостаток криптохромов приводит к активации цитокинов посредством активации ядерного транскрипционного фактора NF- κ B. Известно, что делеция генов *cry1* и *cry2* у человека обостряет течение артритов через интенсификацию выработки интерлейкинов и фактора некроза опухолей (Berson, 2003). Явное снижение концентрации молекул адгезии (VCAM-1, ICAM-1 и E-selectin), увеличивающих сродство моноцитов к эндотелиальным клеткам, напрямую подтверждает участие генов *CRY* в механизмах, в том числе и возраст-зависимого воспаления, наблюдаемого у млекопитающих (Kondratova et al., 2012).

Сверхактивация гена *Clk* в нервной системе у самцов дрозофилы увеличила резистентность к действию данных факторов. Ранее показано, что мыши с индуцированной недостаточностью экспрессии *Clk* имеют низкую активность теломеразы. Данный факт может послужить одним из ключевых объяснений наблюдаемого сокращения продолжительности жизни (Coupling of human circadian..., 2007). Следует отметить также, что инсулин оказывает влияние на транскрипцию *Clock*, тем самым устанавливается обратная связь метаболизма нутриентов, столь важного в процессе старения, и циркадной системы (Aging alters circadian..., 2015).

Сверхэкспрессия гена *sus* в нервной системе у самцов мух привела к увеличению медианной продолжительности жизни и устойчивости к гипертермии, а в жировом теле к увеличению медианной продолжительности жизни на фоне ограничительной диеты. Среди известных генов циркадных ритмов, ген *Bmal1* (ортолог гена *sus* у дрозофилы) является единственным, удаление которого приводит к полной потере циркадных ритмов (Timing of expression of the..., 2016). Согласно данным, циркадная система сопряжена с

mTOR-S6K путем передачи сигнала именно посредством упомянутого гена (A role for the segment..., 2001).

У самок дрозофилы сверхактивация гена *per* в нервной системе и жировом теле вызвала увеличение медианной продолжительности жизни. Как известно, гены *PERs* являются потенциальными супрессорами опухолевого роста. Снижение их экспрессии может влиять на возникновение опухолей. Полученные результаты подтверждены на мышах с делецией генов *per1* и *per2*, у которых наблюдали ускоренное истощение пулов стволовых клеток, что обуславливало преждевременное старение (Hashiramoto et al., 2010). Также было показано, что делеция гена *per2* может влиять на репликацию ДНК и накопление повреждений ДНК в процессе старения (Wang et al., 2015). Недостаточно освещена в современной литературе связь генов *Ppar* (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) с циркадными ритмами. Известно лишь, что PER2 ингибирует PPAR γ , связываясь с его N-концевым доменом, тем самым препятствуя взаимодействию PPAR γ с мишенями (Zhdanova et al., 2011). Один из важнейших процессов, подконтрольных описанному каскаду - метаболизм липидов, в известной степени определяющий качество жизни во всех возрастах (Lessons from autoimmune disease..., 2009). На одну из ведущих ролей в создании наблюдавшегося при сверхэкспрессии *per* эффекта продления жизни дрозофилы выдвигаются контролируемые циркадной системой гены-участники метаболизма такого внутриклеточного антиоксиданта, как глутатион, уровень которого снижен в головах имаго дрозофил при старении (Molin et al., 2014).

У самок со сверхэкспрессией гена *tim* в нервной системе наблюдали резистентность к действию индуктора свободных радикалов параквата (до 46 %) и увеличение медианной продолжительности жизни, как у самцов, так и у самок при сверхактивации в мышцах и жировом теле. Следовательно, эти показатели являются важными в изучении проблем стрессоустойчивости, так как, судя по данным литературы, ген *tim* представляет собой ключевой ген

циркадных ритмов дрозофилы, ортологи которого выявлены у мышей и человека (Li et al., 20015). Считается, что *tim* ответствен за контроль репликации в отсутствие повреждающих ДНК воздействий (Krishnan et al., 2012).

С помощью регрессионного анализа было выявлено, что сверхактивация генов циркадных ритмов в мышцах увеличивает риск смерти особи (исключение – линия *cry24*) (рис. 22 А, Б), в то время как ограничительная диета сглаживает отрицательные эффекты, уменьшая риск смерти (рис. 22 В, Г). При сверхэкспрессии исследуемых генов в жировом теле риск смертности ниже, чем при сверхэкспрессии в мышцах (рис. 22 Д, Е).

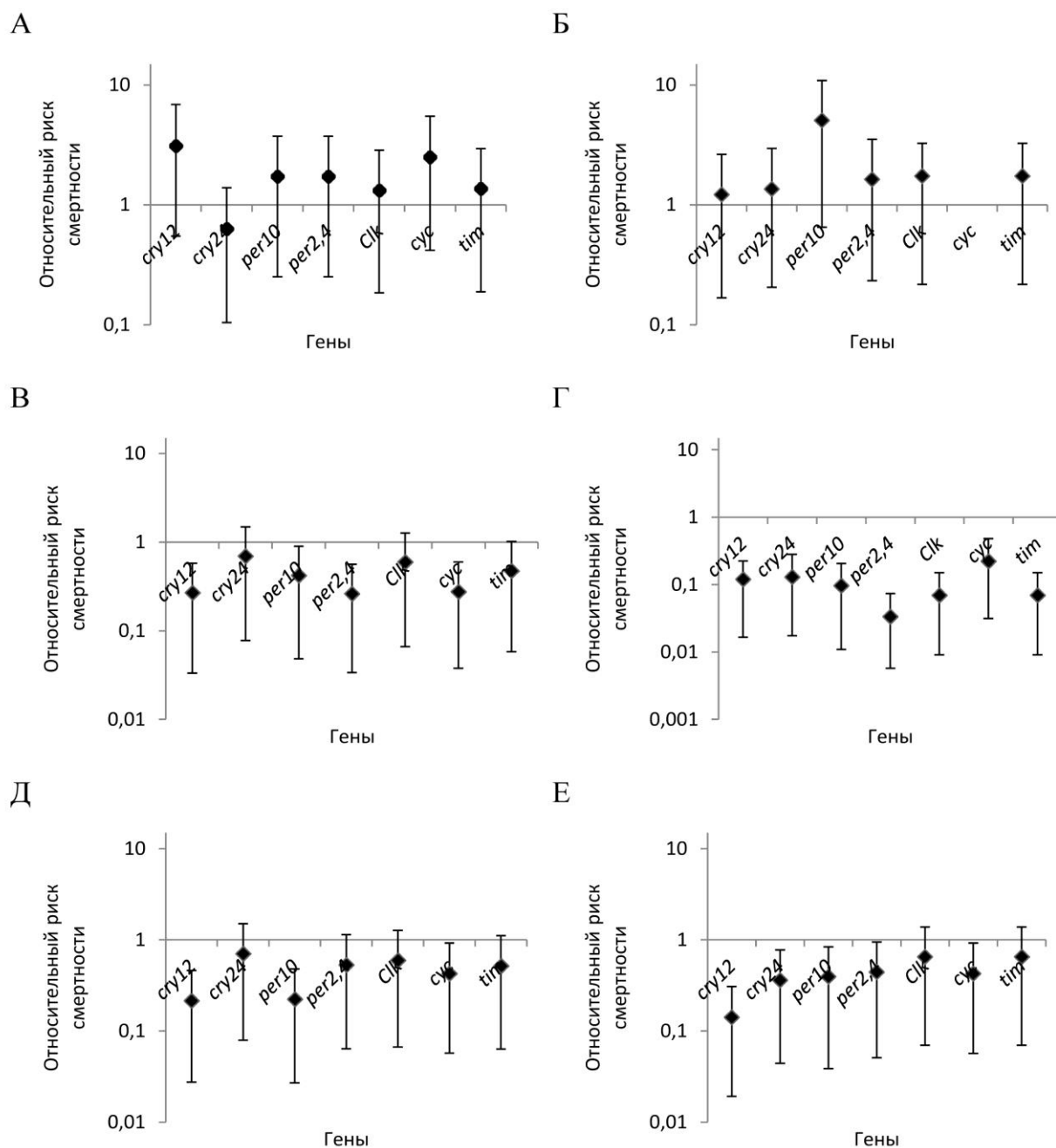


Рисунок 22. Риск возникновения смерти самцов (А, В, Д) и самок (Б, Г, Е) *D. melanogaster* при сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в мышцах (А, Б), на фоне ограничительной диеты (В, Г) и при сверхэкспрессии генов циркадных ритмов в жировом теле относительно сверхэкспрессии в мышцах.

Стоит отметить, что эффекты, связанные с изменением продолжительности жизни в связи со сверхэкспрессией генов циркадных ритмов у самок выражены сильнее, чем у самцов. В тоже время уровень

индуцированной экспрессии исследуемых генов у самок со сверхактивацией также был выше (табл. 11).

Таблица 11

Относительный уровень экспрессии генов циркадных ритмов, связанный с индукцией изучаемого трансгена в системе *GAL4-UAS*

Вариант	пол	Жировое тело		Нервная система		Мышцы	
<i>cry12</i>	♂♂	1±0.3	2.8±0.3	1±0.04	2±0.1	1±0.05	14,5±2,6
<i>cry12</i>	♀♀	1±0.01	9.5±0.04	1±0.04	1.8±0.01	1±0,1	13,3±1,4
<i>cry24</i>	♂♂	1±0.1	11.8±0.6	1±0.1	1.9±0.04	1±0.08	2,9±0,9
<i>cry24</i>	♀♀	1±0.02	1.4±0.1	1±0.1	19.1±0.9	1±0,06	9±1,2
<i>per10</i>	♂♂	1±0.1	1.4±0.1	1±0.3	2.4±0.3	1±0.3	2.4±0.3
<i>per10</i>	♀♀	1±0.1	11.6±1.9	1±0.04	1.8±0.2	1±0.04	1.8±0.2
<i>per2.4</i>	♂♂	1±0.01	1.2±0.01	1±0.02	1.1±0.02	1±0.1	2.1±0.02
<i>per2.4</i>	♀♀	1±0.01	4.5±0.1	1±0.2	3.5±0.2	1±0.1	38±0.6
<i>Clk</i>	♂♂	1±0.1	1.4±0.1	1±0.1	1.4±0.2	1±0.1	1.8±0.2
<i>Clk</i>	♀♀	1±0.1	3.7±0.2	1±0.3	6.7±0.09	1±0.9	2±0.2
<i>cyc</i>	♂♂	1±0.003	1.4±0.02	1±0.01	2.2±0.02	1±0.1	1.6±0.2
<i>cyc</i>	♀♀	1±0.01	1.6±0.01	1±0.02	1.7±0.1	1±0.04	1.8±0.07
<i>tim</i>	♂♂	1±0.02	2.4±0.2	1±0.1	1.3±0.1	1±0.1	1.8±0.5
<i>tim</i>	♀♀	1±0.03	1,9±0.2	1±0.1	6±2.4	1±0.07	1.9±0.01

Обозначения: ♂♂ – самцы; ♀♀ – самки;

Нами не обнаружено корреляционной зависимости между продолжительностью жизни и уровнем экспрессии исследуемых трансгенов в нервной системе мух (табл. 12). 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. В тоже время на фоне ограничительной диеты эта зависимость уменьшилась и стала статистически незначимой. Таким образом, ограничительная диета сгладила негативное действие сверхэкспрессии циркадных генов в мышечной ткани. В случае с жировым телом сверхэкспрессия у самцов имела тенденцию к увеличению продолжительности жизни, а у самок – к уменьшению, вне

зависимости от типа диеты, однако коэффициенты корреляции не были статистически значимы.

Таблица 12

Корреляционная зависимость изменения продолжительности жизни
от уровня экспрессии трансгенов

Тип ткани	Среда со стандартным содержанием дрожжей		Среда с пониженным содержанием дрожжей	
	г ♂♂	г ♀♀	г ♂♂	г ♀♀
Мышцы	-0.90298*	-0.86356*	-0.38429	-0.22264
Жировое тело	+0.326286	-0.14157	+0.668576	-0.31821
Нервная система	-0.020478	0.008664	—	—

Обозначения: г – коэффициент корреляции Пирсона; ♂♂ – самцы; ♀♀ – самки; — - нет данных; * $p < 0.05$.

Мы предположили, что наблюдаемый эффект продления жизни при сверхэкспрессии генов циркадных ритмов может быть обусловлен несколькими возможными процессами. Сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в нервной системе компенсировала возраст-зависимое снижение 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. Сверхактивируя какой-либо один из исследуемых генов в изучаемой ткани, возможно, мы нарушаем баланс между элементами молекулярного осциллятора, что может приводить к отрицательным эффектам. В особенности в том случае, если экспрессия этого гена в норме в данной ткани при старении существенно не изменяется.

Дополнительной причиной снижения продолжительности жизни устойчивости к стресс-факторам может служить энергетическое истощение, поскольку механизм работы генов циркадных ритмов требует больших

энергетических затрат (Katewa et al., 2015). Следовательно, сверхактивация исследуемых генов могла привести к чрезмерному расходу энергии в ущерб другим жизненно важным процессам (Blagosklonny, 2009).

Полученные данные свидетельствуют о том, что сверхэкспрессия генов циркадных ритмов в нервной системе дрозофил может увеличивать продолжительность жизни, а также в условиях интенсивного стресса (оксидативного стресса, гипертермии, голодания) в большинстве случаев происходит повышение выживаемости при нарушении суточных ритмов. Кроме того, следует отметить, что 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) 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} 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, как у самцов, так и у 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 на 20.8 % и 8.7 % ($p < 0.001$), соответственно.

5) Результаты корреляционного анализа и регрессии Кокса показывают, что ограничительная диета уменьшает выраженность негативного влияния

нарушения работы генов циркадных ритмов на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Анисимов, В. Н. Мелатонин: роль в организме, применение в клинике / В. Н. Анисимов // СПб.: Система. – 2007. – С. 495 – 499.

Анисимов, В. Н. Фундаментальные исследования в геронтологии: основные направления и перспективы / В. Н. Анисимов // Генетика. – 2000. – Т. 36. – № 8. – С. 1013- 1016.

Анисимов, В. Н., Соловьев М. В. Эволюция концепций в геронтологии – СПб.: Эскулап, 1999. – С. 130-137.

Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2 т., 2-е изд.– СПб.: Наука, 2008. – Т.2. – С.434-441.

Анисимов, В.Н. Световой режим, старение и рак / В.Н. Анисимов, И.А. Виноградова, М.Ф. Борисенков, А.В. Букалев, М.А. Забежинский, А.В. Панченко, И.Г. Попович, А.В. Семенченко, М.Л. Тындык // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2012. – № S7. – С. 29-30.

Барабой, В. А. Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы // Киев: Фиосоциоцентр, 2006. – С. 15-16.

Беньковская, Г. В. Влияние светового режима на биохимические показатели развития стресс-реакции в линиях *Musca domestica* L. с различной продолжительностью жизни / Г. В. Беньковская, Р. Ш. Мустафина // Эволюционная биохимия и физиология. – 2012. – № 5. – С. 493 – 499.

Биологическая роль свободных радикалов в развитии патологических состояний / А. О. Сыровая, Ф. С. Леонтьева, И. В. Новикова, С. В. Иванникова // Международный медицинский журнал. – 2012. – №3. – С. 98–104.

Большой энциклопедический словарь. – М.: Научное издательство «Большая российская энциклопедия», 1995. –864 с.

Васильев, А. Г. Эпигенетическая изменчивость: неметрические пороговые признаки, фены и их композиции / А. Г. Васильев // Фенетика-природных популяций. М.: Наука, 1988. – С.158–169.

Васильев, А. Г. Эпигенетические основы фенетики: на пути к популяционной мерономии / А. Г. Васильев // Екатеринбург: Академкнига, 2005. – 640 с.

Виноградова, И.А. Световое загрязнение, десинхроноз и старение: состояние проблемы и пути решения / И.А. Виноградова, В.А. Илюха, Е.А. Хижкин, Л.Б. Узенбаева, Т.Н. Ильина, А.В. Букалёв, А.И. Горанский, Ю.П. Матвеева, В.Д. Юнаш, Т.А. Лотош // Успехи геронтологии. – 2014. – Т. 27. – №. 2. – С. 265-268.

Захарчук, А. И. Мелатонин и геронтологические аспекты сезонной структуры циркадианных ритмов неспецифического иммунитета / А. И. Захарчук, Л. А. Кадельник // Здоровье и образование в XXI веке. – 2013. – Т. 15. – С. 1-4.

Кирик, О.Б. Социальное прогнозирование // Учебное пособие. – Вологда: ВоГТУ. – 2010. – С. 115 – 123.

Кольтовер, В. К. Свободнорадикальная теория старения: современное состояние и перспективы / В. К. Кольтовер // Успехи геронтологии. – 1998. – Вып. 2. – С. 37–42.

Конев, С. В., Волотовский И. Д. Фотобиология животной клетки / С. В. Конев, И. Д. Волотовский // Л.: Наука. – С. 179. – 269

Москалев, А. А. К вопросу о генетической обусловленности процессов старения / А. А. Москалев // Успехи геронтологии. – 2008. – Т. 21. – № 3. – С. 463-469.

Москалев, А. А. Перспективные направления генетики старения и продолжительности жизни / А. А. Москалев // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22. – № 1. – С. 92– 103.

Москалев, А. А. Старение и гены. – СПб.: Наука, 2008. – с. 35 - 46.

Москалев, А.А. Влияние мелатонина на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* при различных режимах освещения / А.А. Москалев, А.В. Кременцова, О.А. Малышева // Экологическая генетика. – 2008. – Т.6. – № 3. – С. 22-30.

Москалев, А.А. Генетические аспекты влияния различных режимов освещения на продолжительность жизни дrosophila / А.А. Москалев, О.А. Шосталь, В.Г. Зайнуллин // Успехи геронтологии. – 2006. – Вып. 18. – С. 55-58.

Москалев, А.А. Роль светового режима в регуляции продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* / А.А. Москалев, О.А. Малышева // Экология. – 2009. – № 3. – С. 221-226.

Москалев, А. А. Радиационно-индуцированное изменение продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* / А. А. Москалев, А. С. Яцкив // Проблемы геронтологии и гериатрии: матер. 2-й респ. науч.-практ. конф. С междунар. участием. – Сыктывкар, 2004. –81 с.

Мыльников, С. В. Оценка наследуемости основных параметров старения у *Drosophila melanogaster* / С. В. Мыльников, А. Н. Смирнова // Генетика. – 1997. – Т. 33. – №5. – С. 616-622.

Оловников, А. М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов / А. М. Оловников // Докл. АН СССР. – 1971. – Т. 201. – № 6. – С. 1496-1499.

Развитие в условиях старения населения мира. Обзор мирового экономического и социального положения – 2007 год. – Нью-Йорк: Организация Объединенных Наций, 2008. – 265 с.

Скулачев, В. П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В. П. Скулачев // Соровский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7. – №6. – С. 4–10.

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

Тодоров, И. Н. Стресс, старение и их биохимическая коррекция / И. Н. Тодоров, Г. И. Тодоров; М.: Наука, 2003. – С. 479 – 491.

Турышева, Е. В., Шапошников М. В., Москалев А. А. Адаптивный ответ на продолжительность жизни у линий *Drosophila melanogaster* с мутациями

генов фактора теплового шока и белков теплового шока / Е. В. Турышева, М. В. Шапошников, А. А. Москалев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – Т. 48. – №5. – С. 580–587.

Хаснулин, В. И. Экологически обусловленный стресс и старение человека на севере / В. И. Хаснулин, И. И. Чечеткина, П. В. Хаснулин, А. К. Собакин // Всероссийская научно–практическая конференция с международным участием «Актуальные аспекты жизнедеятельности человека на Севере»: матер. конф. – Архангельск. – 2006. – С. 329–330.

Шапошников, М. В. Москалев А. А. Роль транскрипционного фактора FOXO в радиоадаптивном ответе при хроническом облучении и гормезисе у *Drosophila melanogaster* / М. В. Шапошников, А. А. Москалев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2010. – Т. 50. – №3. – С. 312–317.

Шишко, Е. Д. Суточный ритм, циркадианные гены и злокачественные новообразования / Суточный ритм, циркадианные гены и злокачественные новообразования / Е.Д. Шишко, Н.Ф. Гамалея, А.Г. Минченко // Онкология. – 2010. – № 4. – С. 316-320.

Шосталь, О. А., Москалев А. А. Влияние различных условий освещения на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* с мутациями в генах супероксиддисмутаза / О. А. Шосталь, А. А. Москалев // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. – 2013. – №5. – 136 с.

Эммануэль, Н. М. Некоторые молекулярные механизмы и перспективы профилактики старения / Н. М. Эммануэль // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1975. – №4. – С. 785–794.

Ярмоненко, С. П. Радиобиология человека и животных: учебное пособие / С. П. Ярмоненко. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1988. – 424 с.

4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila* // Zid B.M., Rogers A.N., Katewa S.D. et al. // Cell. – 2009. – Vol. 139(1). – P.149-160.

A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism / D. Feng [et al.] // Science. – 2011. – Vol. 331. – №. 6022. – P. 1315-1319.

A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4 / T. Osterwalder, K. S. Yoon, B. H. White, H. Keshishian // PNAS. – 2001. – Vol. 98. – №22. – P. 12596–12601.

A Mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function / M. Tatar [et al.] // Science. – 2001. – Vol. 292 (107). – P.107-110.

A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock / S. Martinek [et al.] // Cell. – 2001. – Vol. 105. – №. 6. – P. 769-779.

Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells // T. Yahata [et al.] // Blood. – 2011. – Vol. 118, № 11. – P. 2941-2950.

Age-associated difference in circadian sleep-wake and rest-activity rhythms / Y.L. Huang [et al.] // Physiol Behav. – 2002. – Vol. 76(4-5). – P.597-603.

Age-dependent loss and compensatory changes of septohippocampal cholinergic neurons in two rat strains differing in longevity and response to stress / G.M. Gilad [et al.] // Brain research. – 1987. – Vol. 436. – P. 311-322.

Aging alters circadian and light-induced expression of clock genes in golden hamsters // D. E. Kolker [et al.] // Journal of biological rhythms. – 2003. – Vol. 18. – №. 2. – P. 159-169.

Aging alters circadian and light-induced expression of clock genes in golden hamsters / D. E. Kolker [et al.] // Journal of biological rhythms. - 2003. – Vol. 18(2). – P. 159-169.

Aging alters circadian regulation of redox in *Drosophila* / V. I. Klichko [et al.] // Frontiers in genetics. – 2015. – Vol. 6. – P. 35-44.

Aguilar-Arnal, L., Sassone-Corsi P. The circadian epigenome: how metabolism talks to chromatin remodeling / L. Aguilar-Arnal, P. Sassone-Corsi // Current opinion in cell biology. – 2013. – Vol. 25. – №. 2. – P. 170-176.

Alteration of Drosophila life span using conditional, tissue-specific expression of transgenes triggered by doxycycline or RU486/Mifepristone / D. Ford [et al.] // Experimental gerontology. – 2007. – Vol. 42. – P. 483-497.

Analysis of A-phase transitions during the cyclic alternating pattern under normal sleep / M.O. Mendez [et al.] // Med Biol Eng Comput. – 2015. – Vol. 54. – P. 133-148

Anisimov, V. N. Carcinogenesis and aging. IV. Effect of low-molecular-weight factors of thymus, pineal gland and anterior hypothalamus on immunity, tumor incidence and life span of C3H/Sn mice / V. N. Anisimov, V. K. Khavinson, V. G. Morozov // Mechanisms of ageing and development. – 1982. – Vol. 19. – №. 3. – P. 245-258.

Antagonistic effects of telomerase on cancer and aging in K5-mTert transgenic mice / E. González-Suárez [et al.] // Oncogene. – 2005. – Vol. 24. – №. 13. – C. 2256-2270.

Anti-aging properties of melatonin in an in vitro murine senescence model: involvement of the sirtuin 1 pathway // M. Tajés [et al.] // Journal of pineal research. – 2009. – Vol. 47. – №. 3. – P. 228-237.

Antioxidant N-acetyl-L-cysteine ameliorates symptoms of premature aging associated with the deficiency of the circadian protein BMAL1 / R. V. Kondratov O. Vykhovanets, A. A. Kondratova [et al.] // Aging (Albany NY). – 2009. – Vol. 1 (12). –979 p.

Anwar, T. Increased expression of SIRT2 is a novel marker of cellular senescence and is dependent on wild type p53 status / T. Anwar, S. Khosla, G. Ramakrishna // Cell Cycle. – 2016. – Vol. 15(14). – P. 1883-1897.

Apoptotic release of histones from nucleosomes / D. Wu [et al.] // The Journal of biological chemistry. – 2002. Vol. 277 (14). – P. 12001-12008.

Ashburner M. *Drosophila: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. – 1989. – P. 4-17.

Bartke, A. How diet interacts with longevity genes / A. Bartke, M. Bonkowski, M. Masternak // *Hormones*. – 2008. – Vol. 7 (1). – P. 17–23.

Bellet, M. M. Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link / M. M. Bellet, P. Sassone-Corsi // *J Cell Sci*. – 2010. - Vol. 123. - P. 37-48.

Berson, D. M. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors / D. M. Berson // *Trends Neurosci*. – 2003. – Vol. 26(6). - P. 14-20.

Biphasic response of endothelial progenitor cell proliferation induced by high glucose and its relationship with reactive oxygen species // Zhang [et al.] // *The Journal of endocrinology*. – 2008. – Vol. 97, № 3. – P. 463-470.

Birketvedt, G. S. Behavioral and neuroendocrine characteristics of the night-eating syndrome / G. S. Birketvedt [et al.] // *Jama*. – 1999. – Vol. 282. – №. 7. – P. 657-663.

Blagosklonny, M. V. Aging-suppressants: cellular senescence (hyperactivation) and its pharmacologic deceleration / M. V. Blagosklonny // *Cell Cycle*. – 2009 – Vol. 8. – №12. – P. 1883–1887.

Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond / M. A. Blasco // *Nature Reviews Genetics*. – 2005. – Vol. 6. – №. 8. – P. 611-622.

BMAL1-dependent regulation of the mTOR signaling pathway delays aging / R.V. Khapre [et al.] // *Aging (Albany NY)*. - 2014. - Vol. 6(1). - P. 48-57.

Bordone, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity / L. Bordone, L. Guarente // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. – 2005. – Vol. 6 (4). – P. 298–305.

BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila* / B. M. Zid [et al.] // *Cell*. – 2009. – Vol. 139. – №1. – P. 149–160.

Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism / L. Kappeler [et al.] // *PLoS biology*. – 2008. – Vol. 6. –254 p.

Brown-Borg, H.M. Longevity in mice: is stress resistance a common factor? / H.M. Brown-Borg // Age (Dordr). – 2006. – Vol. 28. – P. 145-162.

Burgering, B.M. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty / B.M. Burgering, R. H. Medema // J Leukoc Biol. - 2003. - Vol. 73(6). - P. 689-701.

Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53– independent but extracellular signal–regulated kinase–p38 mitogenactivated protein kinase–dependent mechanism / V. Probin, Y. Wang, A. Bai, D. Zhou // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2006. – Vol. 319. – P. 551–560.

Caloric restriction and human longevity: what can we learn from the Okinawans? / D. C. Willcox [et al.] // Biogerontology. – 2006. – Vol. 7. – P. 173–177.

Calorie restriction regulates circadian clock gene expression through BMAL1 dependent and independent mechanisms / S.A. Patel [et al.] // Sci Rep. – 2016. – Vol. 12. – P. 25906-25970.

Challet, E. Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals / E. Challet // Journal of Comparative Physiology B. – 2010. – Vol. 180. – №. 5. – P. 631-644.

Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines / R. Narasimamurthy [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – Vol. 109. – №. 31. – P. 12662-12667.

Circadian clocks govern calorie restriction–mediated life span extension through BMAL1- and IGF-1-dependent mechanisms / A. Sonal [et al.] // FASEB J. – 2016. – Vol. 30(4). – P. 1634-1642.

Circadian control of oscillations in mitochondrial rate-limiting enzymes and nutrient utilization by PERIOD proteins / A. Neufeld-Cohen [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2016. – Vol. 113(12). – P. 1673-1682.

Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in rats / I. A. Vinogradova [et al.] // Aging. – 2009. – Vol. 1. – N 10. – P. 855-865.

Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis / A. Kalsbeek [et al.] // Mol Cell Endocrinol. – 2012. – Vol. 349(1). – P. 20-29.

Circadian timing of food intake contributes to weight gain / D.M. Arble [et al.] // Obesity (Silver Spring). – 2009. – Vol. 17(11). – P. 2100-2.

Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila* / C. Lim [et al.] // Curr Biol. – 2007. – Vol. 17(12). – P.1082-1090.

Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim* / T. K. Darlington [et al.] // Science. – 1998. – Vol.280. – P.1599–1603.

Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division *in vivo* / T. Matsuo [et al.] // Science. – 2003. – Vol. 302. - P. 255–259.

Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF- κ B-mediated transcription / M. L. Spengler [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – Vol. 109. – №. 37. – P. E2457-E2465.

Coupling of human circadian and cell cycles by the timeless protein / K. K. Ünsal-Kaçmaz [et al.] // Molecular and cellular biology. – 2005. – Vol. 25. – №. 8. – P. 3109-3116.

Crawford, D. R. Adaptive response and oxidative stress / D. R. Crawford, J. A. Davies // Env. Health Perspect. – 1994. – Vol. 102. – Suppl. 10. – P. 25–28.

DAF-16 Target Genes That Control *C. elegans* Life-Span and Metabolism / S.S. Lee, S. Kennedy, A.C. Tolonen, G. Ruvkun // Science. – 2003. – Vol. 300 (644). – P.644-647.

DamID in *C. elegans* reveals longevity-associated targets of DAF-16/FoxO / E. Schuster [et al.] // Mol. Syst. Biol. – 2010. – Vol. 6. – P. 399.

Delay of T cell senescence by caloric restriction in aged long-lived nonhuman primates / I. Messaoudi [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 19448–19453.

Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway / A. Matheu [et al.] // Nature. – 2007. – Vol. 448(7151). – P. 375-390.

Dietary restriction in long-lived dwarf flies / D.J. Clancy [et al.] // Science. – 2002. – Vol. 296. – P. 319.

Disruption of the circadian clock due to the Clock mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis / M. P. Antoch [et al.] // Cell Cycle. – 2008. – Vol. 7. – №. 9. – P. 1197-1204.

Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes / B. Marcheva [et al.] // Nature. – 2010. – Vol. 466. – №. 7306. – C. 627-631.

DNA excision repair proteins and Gadd45 as molecular players for active DNA demethylation / D. K. Ma, J. U. Guo, G. Ming, H. Song // Cell Cycle. – 2009. – Vol. 8. – №10. – P. 1526–1531.

Dröge, W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants / W. Dröge // Exp Gerontol. – 2002. – Vol. 37. – № 12. – P. 1333-1345.

Drosophila timeless2 is required for chromosome stability and circadian photoreception / C. Benna [et al.] // Current Biology. – 2010. – Vol. 20. – №. 4. – P. 346-352.

Effect of cooking temperatures on protein hydrolysates and sensory quality in crucian carp (*Carassius auratus*) soup / J. Zhang [et al.] // J Food Sci Technol. – 2013. – Vol. 50 – № 3. – P. 542-548.

Effectors of mammalian telomere dysfunction: a comparative transcriptome analysis using mouse models / S. Franco [et al.] // Carcinogenesis. – 2005. – Vol. 26. – №. 9. – P. 1613-1626.

Effects of exercise on circadian rhythms and mobility in aging *Drosophila melanogaster* / K. Rakshit, R. Wambua, T. M. Giebultowicz, J. M. Giebultowicz // Exp Gerontol. – 2013. – Vol. 48 (11). – P. 1260-1265.

Effects of UVB-induced oxidative stress on protein expression and specific protein oxidation in normal human epithelial keratinocytes: a proteomic approach / M. Perluigi [et al.] // Proteome Sci. – 2010. – Vol. 8. – P.13 – 14.

Emery, P. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity / P. Emery, W.V. So, M. Kaneko, J.C. Hall, M. Rosbash // *Cell*. – 1998. – Vol. 95(5). – P.669-679.

Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues / M. H. Hastings [et al.] // *Chronobiology international*. – 1998. – Vol. 15. – №. 5. – P. 425-445.

Environmental 24-hr Cycles Are Essential for Health / A. Eliane [et al.] / *Current Biology* . – 2016. – Vol. 26. – P. 1843–1853.

Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein / D.J. Clancy, D. Gems, L.G. Harshman [et al.] // *Science*. – 2001. – Vol. 292. – P. 104-106.

Feder, M. E. Ecological and evolutionary physiology of stress proteins and the stress response: the *Drosophila melanogaster* model / M. E. Feder // *Animals and temperature: Phenotypic and evolutionary Society for Experimental Biology Seminar Series*. – 1996. – P. 79–102.

Feeney, K. A. Daily magnesium fluxes regulate cellular timekeeping and energy balance / K. A. Feeney, L. L.Hansen, M. Putker // *Nature*. – 2016. – Vol. 532 (7599). – P.375-390.

Fisher, R. A. Frequency distribution of the values of the correlation coefficient in samples from an indefinitely large population / R. A. Fisher // *Biometrika*. – 1915. – Vol. 10. – №5. – P. 507–521.

Fleming, T.R. Modified Kolmogorov-Smirnov test procedures with application to arbitrarily right-censored data / T.R. Fleming, J.R. O'Fallon, P.C. O'Brien, D.P. Harrington // *Biometrics*. – 1980. – Vol. 36. – P. 607-625.

Forman, H.J. Signaling functions of reactive oxygen species / H.J. Forman, M. Maiorino, F. Ursini // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49(5). – P. 835-42.

Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. – 2007. – Vol. 39 (1). – P. 44–84.

Froy, O. Metabolism and circadian rhythms – implications for obesity / O. Froy // *Endocrine reviews*. – 2010. – Vol. 31. – №. 1. – P. 1-24.

Fu, L. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response *in vivo* / L. Fu, H. Pelicano, J. Liu, P. Huang, C. C. Lee // *Cell*. – 2002. – Vol. 111. – №. 1. – P. 41-50.

Functional role of CREB-binding protein in the circadian clock system of *Drosophila melanogaster* / C. Lim [et al.] // *Mol Cell Biol*. – 2007. – Vol. 27 (13). – P. 4876-4890.

Gadd45-alpha and *Gadd45*-gamma utilize p38 and JNK signaling pathways to induce cell cycle G2/M arrest in Hep-G2 hepatoma cells / N. Zhu [et al.] // *Molecular biology reports*. – 2009. – Vol. 36, № 8. – P. 2075-2085.

Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain / T. Lu [et al.] // *Nature*. – 2004. – Vol. 429. – P. 883-891.

Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver / G. Rey, F. Cesbron, J. Rougemont [et al.] // *PLoS-Biology*. – 2011. – Vol. 9. – №. 2. – P. 338.

Genome-wide profiling in melatonin-exposed human breast cancer cell lines identifies differentially methylated genes involved in the anticancer effect of melatonin / S. E. Lee, S. J. Kim, H. J. Yoon [et al.] // *Journal of pineal research*. – 2013. – Vol. 54. – №. 1. – P. 80-88.

Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster* / S. Zou, S. Meadows, L. Sharp [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – Vol. 95 (25). – P. 13726-13731.

Giacco, F. Oxidative stress and diabetic complications / F. Giacco, M. Brownlee // *Circ Res*. – 2010. – Vol. 107 (9). – P.1058 – 1070.

Giannakou, M.E. Role of dFOXO in lifespan extension by dietary restriction in *Drosophila melanogaster*: not required, but its activity modulates the response / M.E. Giannakou, M. Goss, L. Partridge // *Aging cell*. – 2008. – Vol. 7. – P. 187-198.

Giebultowicz, J. Circadian clocks and metabolism: the nutrient-sensing AKT and TOR pathways make the link / J. Giebultowicz, P. Kapahi // Current Biology. – 2010. – Vol. 20. – №. 14. – P. R608-R609.

Gotter, A. L. Mammalian TIMELESS and Tipin are evolutionarily conserved replication fork-associated factors / A. L. Gotter, C. Suppa, B. S. Emanuel // Journal of molecular biology. – 2007. – Vol. 366. – №. 1. – P. 36-52.

Guarente, L. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms / L. Guarente, C. Kenyon // Nature. – 2000. – Vol. 408 (6809). – P. 255-262.

GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR / D. H. Kim [et al.] // Molecular cell. – 2003. – Vol. 11 (4). – P. 895-904.

Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, M. C. Gutteridge // Oxford: Oxford University Press, 2007. – 888 p.

Hardeland, R. Melatonin, hormone of darkness and more—occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites / R. Hardeland // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2008. – Vol. 65. – №. 13. – P. 2001-2018.

Hardin, P. E. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels / P. E. Hardin, J. C. Hall, M. Rosbash // Nature. – 1990. – Vol. 343. – №. 6258. – C. 536-540.

Hartl, F. U. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein / F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl // Science. – 2002. – Vol. 295. – P. 1852 – 1858.

Hasegawa, K. *Caenorhabditis elegans* opens up new insights into circadian clock mechanisms / K. Hasegawa, T. Saigusa, Y. Tamai // Chronobiol Int. – 2005. – Vol. 22(1). – P.1-19.

Hashiramoto, A. Mammalian clock gene Cryptochrome regulates arthritis via proinflammatory cytokine TNF-α / A. Hashiramoto [et al.] // The journal of immunology. – 2010. – Vol. 184. – №. 3. – P. 1560-1565.

He, B. The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome / B. He, K. Nohara, N. Park // *Cell Metab.* – 2016. – Vol. 23(4). – P. 610-621.

Heat Shock: From bacteria to man / Edited by M. J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissiers. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. – 440 p.

Helfand, S. L. Molecular Genetics of aging in the fly: is this the end of the beginning? / S. L. Helfand, B. Rogina // *BioEssays.* – 2003. – Vol. 25. – P. 134 – 141.

Helfand, S. L. Rejuvenating views of the ageing process / S. L. Helfand, S. K. Inouye // *Nature reviews.* – 2002. – Vol. 3. – P. 149-153.

Hofman, M. A. Living by the clock: the circadian pacemaker in older people / M. A. Hofman, D. F. Swaab // *Ageing research reviews.* – 2006. – Vol. 5. – №. 1. – P. 33-51.

Holloszy, J. O. Caloric restriction in humans / J. O. Holloszy, L. Fontana // *Exp Gerontol.* – 2007. – Vol. 42. – P. 709–712.

Hspa4 (HSP70) is involved in the radioadaptive response: results from mouse splenocytes / C.M. Kang [et al.] // *Radiat Res.* – 2002. – Vol. 157. – N 6. – P. 650-655.

Hsu, P.Y. Wheels within wheels: the plant circadian system / P.Y. Hsu, S. L. Harmer // *Trends Plant Sci.* – 2014. – Vol. 19(4). - P. 240-249.

Hut, R.A. Evolution of time-keeping mechanisms: early emergence and adaptation to photoperiod / R.A. Hut, D.G. Beersma // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* –2011. – Vol. 366(1574). – P. 2141-2154.

Increased gene dosage of Ink4/Arf and p53 delays age-associated central nervous system functional decline / E. Carrasco-Garcia [et al.] // *Aging Cell.* – 2015. - Vol. 14(4). - P. 710-714.

Induction of diabetes in aged C57B6 mice results in severe nephropathy: an association with oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and inflammation /

J. Wu [et al.] // The American journal of pathology. – 2010. – Vol. 176 (5). – P. 2163-2176.

Inflammatory cytokines protect retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced death / H. B. Juel [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – №5. – 64619 p.

Inhibition of GSK-3 ameliorates Abeta pathology in an adult-onset *Drosophila* model of Alzheimer's disease / O. Sofola [et al.] // PLoS Genet. – 2010. – Vol. 6. – №. 9. – P. e1001087.

Jacobson, M. D. Programmed cell death in animal development / M. D. Jacobson, M. C. Raff // Cell. – 1997. – Vol. 88. – P. 347–354.

Jagota, A. Effect of melatonin on age induced changes in daily serotonin rhythms in suprachiasmatic nucleus of male Wistar rat / A. Jagota, D. Kalyani // Biogerontology. – 2010. – Vol. 11. – №. 3. – P. 299-308.

Ji, Y.Y. Cellular aspects of in vitro induction of antibody responses of human cells / Y.Y. Ji, M. Yeh, P.F. Sun // Article in Chinese. – 1991. – Vol. 24 (4). – P. 333 – 342.

Johnson, M. Fundamental mechanisms in development / M. Johnson // Symp Perinat Dev Med. – 1986. – Vol. 29. – P.1-46.

Kaeberlein, M. Lessons on longevity from budding yeast / M. Kaeberlein // Nature. – 2010. – Vol. 464. – №. 7288. – P. 513-519.

Kamminga, L.M. Cellular memory and hematopoietic stem cell aging / L.M. Kamminga, G. de Haan // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24(5). – P. 1143-1149.

Kapahi, P. Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress / P. Kapahi, M.E. Boulton, T.B. Kirkwood // Free radical biology and medicine. – 1999. – Vol. 26, № 5-6. – P. 495-500.

Karasek, M. Does melatonin play a role in aging processes? / M. Karasek // Journal of physiology and pharmacology. – 2007. – Vol. 58. – №. 6. – P. 105-113.

Karasek, M. Melatonin in humans / M. Karasek, K. Winczyk // Journal of physiology and pharmacology. – 2006. – Vol. 57. – P. 19.

Karasek, M. Melatonin, human aging, and age-related diseases / M. Karasek // Experimental gerontology – 2004. – Vol. 39. – №. 11. – P. 1723-1729.

Katada, S. The histone methyltransferase MLL1 permits the oscillation of circadian gene expression / S. Katada, P. Sassone-Corsi // Nat Struct Mol Biol. – 2010. – V. 17 (12). – P. 1414-1421.

Kauffman, S. H. Heat shock proteins in health and disease / Kauffman, S. H. // Intern. J. Clin. Labor. Res. – 1992. – Vol. 21. – P. 221–226.

Kenyon, C. The plasticity of aging: review insights from long-lived mutants / C. Kenyon // Cell. – 2010. – Vol. 120. – P. 449-460.

Koh, K. / A *Drosophila* model for age-associated changes in sleep:wake cycles / K. Koh, J.M. Evans, J.C. Hendricks // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2006. – Vol. 103(37). – P. 13843-13847.

Kondratov, R.V. The clock proteins, aging, and tumorigenesis / R.V. Kondratov, M.P. Antoch // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. – 2007. – Vol. 72. – P. 477-482.

Kondratova, A. A. The circadian clock and pathology of the ageing brain / A. A. Kondratova, R. V. Kondratov // Nature Reviews Neuroscience. – 2012. – Vol. 13. – №. 5. – P. 325-335.

Kultz, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response / D. Kultz // Annu. Rev. Physiol. – 2005. – Vol. 67. – P. 13.1-13.33.

Kumar, S. Circadian dysfunction reduces lifespan in *Drosophila melanogaster* / S. Kumar, A. Mohan, V. K. Sharma // Chronobiology international. – 2005. – Vol. 22. – №. 4. – P. 641-653.

Kuro-o, M. Klotho and aging / M. Kuro-o // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 2009. – Vol. 1790. – №. 10. – P. 1049-1058.

Kurz, E.U. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways / E.U. Kurz, S.P. Lees-Miller // DNA Repair (Amst). – 2004. – Vol. 3(8-9). – P. 889-900.

Laplane M. mTOR signaling in growth control and disease / M. Laplane, D. M. Sabatini // Cell. – 2012. – Vol. 149. – №. 2. – P. 274-293.

Le Bourg, E. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster* / E. Le Bourg, // FEBS Letters. – 2001. – Vol. 498. – P. 183-186.

Lee, J. H. Regulation of apoptosis by the circadian clock through NF- κ B signaling / J. H. Lee, A. Sancar // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – Vol. 108. – №. 29. – P. 12036-12041.

Lehnert, S. Biomolecular Action of Ionizing Radiation (Series in Medical Physics and Biomedical Engineering) // S. Lehnert. – Taylor and Francis Group, 2007. – 560 p.

Lemberger, T. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology / T. Lemberger, B. Desvergne, W. Wahli // Annual review of cell and developmental biology. – 1996. – Vol. 12. – №. 1. – P. 335-363.

Lessons from autoimmune disease atherosclerosis?//Nature Reviews Cardiology / G. E. McKellar [et al.] // Role for TNF in. – 2009. – Vol. 6. – №. 6. – P. 410-417.

Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age / L. Sun, A. A. Sadighi Akha, R. A. Miller, J. M. Harper // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2009. – Vol. 64. – №7. – P. 711–722.

Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // Methods. – 2001. – Vol. 25. – P. 402-408.

Longevity is associated with increased vascular resistance to high glucose-induced oxidative stress and inflammatory gene expression in *Peromyscus leucopus* / N. Labinskyy [et al.] // American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. – 2009. – Vol. 296. – P. 946-956.

Long-lived *Drosophila* with overexpressed *dFOXO* in adult fat body / M.E. Giannakou [et al.] // Science. – 2004. – Vol. 305. – P. 361.

Longo, V. Fasting, circadian rhythms, and time-restricted feeding in healthy lifespan / V. Longo, S. Panda // *Cell Metabolism*. – 2016. – Vol. 23. – P. 1048-1059.

Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging / M. E. Carretero [et al.] // *Journal of pineal research*. – 2009. – Vol. 47. – №. 2. – P. 192-200.

Loss of circadian clock accelerates aging in neurodegeneration-prone mutants / N. Krishnan [et al.] // *Neurobiology of disease*. – 2012. – Vol. 45. – №. 3. – P. 1129-1135.

Lupien, S. The history of the Science of Stress: From Hans Selye to the discovery of anti-inflammatory medication / S. Lupien // *Sante Ment Que.* – 2015. – Vol. 40(2). – P. 275-286.

Majercak, J.M. The effects of light and temperature on the *Drosophila* circadian clock / J.M. Majercak // *Dissertation Abstracts International*. – 2002. – Vol. 62. – N 1. – P. 98.

Makhnevych, T. The role of Hsp90 in protein complex assembly / T. Makhnevych, W. A. Houry // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2012. – Vol. 1823. – №3. – P. 674–682.

Malyshev, I. Immunity, tumors and aging: the role of HSP70 / I. Malyshev // *New York–London: Springer*, 2013. – Vol. 6. – 141 p.

Manikonda, P. K. Melatonin administration differentially affects age-induced alterations in daily rhythms of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male rat liver / P. K. Manikonda, A. Jagota // *Biogerontology*. – 2012. – Vol. 13. – №. 5. – P. 511-524.

Mann, H. B. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other / H. B. Mann, D. R. Whitney // *The Annals of Mathematical Statistics*. - 1947. – Vol. 18. – P. 50-60.

Masri, S. The circadian clock: a framework linking metabolism, epigenetics and neuronal function / S. Masri, P. Sassone-Corsi // *Nat Rev Neurosci*. - 2013. - Vol. 14(1). - P. 69-75.

Mattson, M.P. How does the brain control lifespan? / M.P. Mattson, W. Duan, N. Maswood // Ageing Research Reviews. – 2002. – N 1. – P. 155-165.

Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro / B. Poeggeler [et al.] // Redox Report. – 1996. – Vol. 2. – № 3. – P. 179-184.

Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen / V. N. Anisimov [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – Vol. 1757. – N 5-6. – P. 573-589.

Melatonin prevents age-related mitochondrial dysfunction in rat brain via cardiolipin protection / G. Petrosillo [et al.] // Rejuvenation research. – 2008. – Vol. 11. – № 5. – P. 935-943.

Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis / C. M. Cagnoli, C. Atabay, E. Kharlamova, H. Manev // Journal of pineal research. – 1995. – Vol. 18. – № 4. – P. 222-226.

Methionine sulfoxide reductase B in the endoplasmic reticulum is critical for stress resistance and aging in Drosophila / D. H. Lim [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – Vol. 419. – №1. – P. 20–26.

Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance / R. A. Miller [et al.] // Aging Cell. – 2005. – Vol. 4. – №3. – P. 119–125.

Mitochondria, aging and longevity – a new perspective / S. Salvioli [et al.] // FEBS Lett. 2001. – Vol. 492. – №1-2. – P. 9–13.

Moga, M. M. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat / M. M. Moga, R. Y. Moore // Journal of Comparative Neurology. – 1997. – Vol. 389. – № 3. – P. 508-534.

Molin, M. Linking peroxiredoxin and vacuolar-ATPase functions in calorie restriction-mediated life span extension / M. Molin, A. B. Demir // International journal of cell biology. – 2014. – Vol. 2014. P 431-441.

Morley, J.F. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones / J.F. Morley, R.I. Morimoto // Molecular and cellular biology. – 2004. – Vol. 15. – P. 657-664.

Mortality and morbidity in laboratory-maintained Rhesus monkeys and effects of long-term dietary restriction / N. Bodkin [et al.] // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2003. – Vol. 58. – P. 212–219.

Moskalev, A. Life span alteration after irradiation in *Drosophila melanogaster* strains with mutations of Hsf and Hsps / A. Moskalev, M. Shaposhnikov, E. Turysheva // Biogerontology. 2008. – Vol. 10. – N 1. – P. 3-11.

Moskalev, A. Radiation-induced life span alteration of *drosophila* lines with genotype differences / A. Moskalev // Biogerontology. – 2007. – Vol. 8. – N 5. – P. 499-504.

Nakagawa, T. Sirtuins at a glance / T. Nakagawa, L. Guarente // J Cell Sci. - 2011. - Vol. 124 (6). - P. 833-838.

Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span / Bauer J.H. [et al.] // Current biology. – 2005. – Vol. 15. – P. 2063-2068.

North B. J., Verdin E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases / B. J. North, E. Verdin // Genome Biol. – 2004. – Vol. 5. – №. 5. – P. 224.

Nover, L. Heat shock response of eukaryotic cells / L. Nover // New York: Springer, 1984. – P. 7–12.

Nuclear receptor corepressor and histone deacetylase 3 govern circadian metabolic physiology / T. Alenghat [et al.] // Nature. – 2008. – Vol. 456. – №. 7224. – P. 997-1000.

O'Neill, J. S. Circadian clocks in human red blood cells / J. S. O'Neill, A. B. Reddy // Nature. – 2011. – Vol. 469. – №. 7331. – P. 498-503.

Oberdoerffer, P. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing / P. Oberdoerffer, D. A. Sinclair // Nature. – 2007. – Vol. 8. – P. 692-702.

Old flies have a robust central oscillator but weaker behavioral rhythms that can be improved by genetic and environmental manipulations / W. Luo [et al.] // *Aging Cell*. – 2012. – Vol. 11(3). – P. 428–438.

Orr, W. C. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* / W. C. Orr, R. S. Sohal // *Science*. – 1994. – Vol. 263. – № 5150. – P. 1128–1130.

Oster, H. Disruption of *mCry2* restores circadian rhythmicity in *mPer2* mutant mice / H. Oster, A. Yasui, G. T. Van der Horst, U. Albrecht // *Genes & development*. – 2002. – Vol. 16. – №. 20. – P. 2633-2638.

Oxidative DNA damage in cultured cells and rat lungs by carcinogenic nickel compounds / S. Kawanishi, S. Inoue, S. Oikawa [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 31. – №1. – P. 108–116.

Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention / D.J. Bonda, X. Wang, G. Perry [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2010. – Vol. 59(4). – P.290-294.

Oxidative stress status in umbilical cord blood from neonates born to mothers with atopic asthma / L. Yang, Y. S. Guo, H. W. Shan [et al.] // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* – 2014. – Vol. 27. – №2. – P. 192-196.

Öztürk, G. Age-related changes in the rat brain mitochondrial antioxidative enzyme ratios: Modulation by melatonin / G. Öztürk, K. G. Akbulut, Ş. Güney, D. Acuna-Castroviejo // *Experimental gerontology*. – 2012. – Vol. 47. – №. 9. – P. 706-711.

p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases // Y. Xiong [et al.] // *Nature*. – 1993. – Vol. 366. – P. 701-704.

Partch, C.L. Molecular architecture of the mammalian circadian clock / C.L. Partch, C.B. Green, J.S. Takahashi // *Trends Cell Biol.* – 2014. – Vol. 24 (2). – P. 90-99.

Partridge L., Gems D. Mechanisms of ageing: public or private? / L. Partridge, D. Gems // *Nat Rev Genet.* – 2002. – Vol. 3(3). – P. 165-75.

Partridge, L. Sex and death: what is the connection? / L. Partridge, D. Gems, D.J. Withers // Cell. – 2005. – Vol. 120. – P. 461–472.

Per2 induction limits lymphoid-biased haematopoietic stem cells and lymphopoiesis in the context of DNA damage and ageing / J. Wang, Y. Morita, B. Han // Nat Cell Biol. – 2016. – Vol. 18 (5). – P. 480-490.

Peripheral circadian clocks mediate dietary restriction-dependent changes in lifespan and fat metabolism in drosophila / Katewa S. [et al.] // Cell Metabolism. – 2016. – Vol. 23. – P. 1–12.

Peschke, E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes / E. Peschke // Journal of pineal research. – 2008. – Vol. 44. – №. 1. – P. 26-40.

Phase resetting of the mammalian circadian clock by DNA damage / M. Oklejewicz [et al.] // Curr Biol. – 2008. – № 18 (4). – P. 286-291.

Preyat, N. Sirtuin deacylases: a molecular link between metabolism and immunity / N. Preyat [et al.] // Journal of leukocyte biology. – 2013. – Vol. 93. – №. 5. – C. 669-680.

Prolonged fasting reduces IGF-1/PKA to promote hematopoietic-stem-cell-based regeneration and reverse immunosuppression / C. W. Cheng [et al.] // Cell Stem Cell. – 2014. – Vol. 14. – №. 6. – P. 810-823.

Qin, B. Overexpression of circadian clock protein cryptochrome (CRY) 1 alleviates sleep deprivation-induced vascular inflammation in a mouse model / B. Qin, Y. Deng // Immunology letters. – 2015. – Vol. 163. – №. 1. – P. 76-83.

Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor α defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock / L. Canaple [et al.] // Molecular Endocrinology. – 2006. – Vol. 20. – №. 8. – P. 1715-1727.

Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development / W. Reik // Nature. – 2007. – Vol. 447(7143). – P. 425-432.

Requirement of biphasic calcium release from the endoplasmic reticulum for Fas-mediated apoptosis // A.L. Wozniak [et al.] // Journal of cell biology. – 2006. – Vol. 175, № 5. – P. 709-714.

Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats / S. Yamazaki [et al.] // Science. – 2000. – Vol. 288. – №. 5466. – P. 682-685.

Richardson, A. Aging and the cellular response to stress: Reduction in the heat shock response / A. Richardson, N. J. Holbrook // Cellular aging and cell death / Edited by N. J. Holbrook, G. R. Martin, R. A. Lockshin. – New York and Chichester: John Wiley & Sons Inc., 1996. – P. 67–80.

Rogina, B. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction / B. Rogina, S.L. Helfand // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2004. - Vol. 101(45). - P. 15998-16003.

Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis / H. Kaneto, N. Katakami, M. Matsuhisa, T.A. Matsuoka // Mediators Inflamm. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1 – 11.

Sasaki, S. Dose-response relationship for life-shortening and carcinogenesis I mice irradiated at day 7 postnatal age with dose range below 1 Gy of gamma rays / S. Sasaki, N. Fukuda // J. Radiat. Res. – 2006. – Vol. 47. – P. 135-145.

Sassone-Corsi, P. When metabolism and epigenetics converge / P. Sassone-Corsi // Science. – 2013. – Vol. 339 (6116). – P. 148-150.

Schreck, R. Nuclear factor κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review) / R. Schreck, K. Albermann, P. A. Baeuerle // Free Radic. Res. Commun. – 1992. – Vol. 17. – P. 221–237.

Serrano, M. Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms / M. Serrano, M. A. Blasco // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2007. – Vol. 8 (9). – P. 715-722.

Shamovsky, I. New insights into the mechanism of heat shock response activation / I. Shamovsky, E. Nudler // Cell Mol. Life Sci. – 2008. – Vol. 65 (6). – P. 855–861.

Sharpless, N.E. How stem cells age and why this makes us grow old / N.E. Sharpless, R.A. DePinho // Nature reviews. Molec. Cell biology. – 2007. – Vol. 8. – P. 703-713.

Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants / H. Sies // Exp. Physiol – 1997. – Vol. 82. – P. 291–295.

Skulachev, V. P. The programmed death phenomena aging, and the Samurai law of biology / V. P. Skulachev // Exp. Gerontol. – 2001. – Vol.36. – P. 995–1024.

Sohal, R.S. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species / R.S. Sohal, B.H. Sohal, U.T. Brunk // Mechanisms of ageing and development. – 1990. – Vol. 53. – P. 217-227.

Statistical methods for testing effects on "maximum lifespan" / Wang C. [et al.] // Mech. Ageing Dev. – 2004. – Vol. 125. – P. 629–632.

Stress and radiation–induced activation of multiple intracellular signaling pathways / P. Dent [et al.] // Radiat. Res. – 2003. – Vol. 159. – P. 283–300.

Suppression of aging in mice by the hormone Klotho / H. Kurosu [et al.] // Science. – 2005. – Vol. 309. – №. 5742. – P. 1829-1833.

Suzuki, K. Extremely low–dose ionizing radiation causes activation of mitogen – activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells / K. Suzuki, S. Kodama, M. Watanabe // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – P. 5396–5401.

Tasselli, L. Methylation gets into rhythm with NAD (+)-SIRT1 / L. Tasselli, K.F. Chua // Nat Struct Mol Biol. – 2015. P. 145-158

Tatar, M. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals / M. Tatar, A. Bartke, A. Antebi // Science. – 2003. – Vol. 299. – N 5611. – P. 1346-1351.

Tatar, M. The neuroendocrine regulation of *Drosophila* aging / M. Tatar // Experimental Gerontology. – 2004. – N 39. – P. 1745-1750.

Tatar, M. Unearthing Loci that influence life span / M. Tatar // Sci Aging Knowledge Environ. – 2003. – Vol. 9. – P. 5.

Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer / B. B. de Jesus //EMBO molecular medicine. – 2012. – Vol. 4. – №. 8. – P. 691-704.

Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice / A. Tomás-Loba [et al.] // Cell. – 2008. – Vol. 135. – №. 4. – P. 609-622.

The circadian clock gene period extends healthspan in aging *Drosophila melanogaster* / N. Krishnan [et al.] // Aging (Albany NY). – 2009. – Vol. 1. – №. 11. – P. 937.

The circadian rhythm controls telomeres and telomerase activity / W. D. Chen [et al.] // Biochemical and biophysical research communications. – 2014. – Vol. 451. – №. 3. – P. 408-414.

The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer / D. Stoleru [et al.] // Cell. – 2007. – Vol. 129(1). – P. 207-219.

The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement / K. Ünsal-Kaçmaz [et al.] // Molecular and cellular biology. – 2007. – Vol. 27. – №. 8. – C. 3131-3142.

Thermotolerance and extended life-span conferred by single gene mutations and induced by thermal stress / G. J. Lithgow, T. M. White, S. Melov, T. E. Johnson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92. – P. 7540–7544.

Three circadian clock genes *Per2*, *Arntl*, and *Npas2* contribute to winter depression / T. Partonen [et al.] // Ann Med. – 2007. – Vol. 39(3). – P.229-38.

Timing of expression of the core clock gene *Bmal1* influences its effects on aging and survival / G. Yang [et al.] // Science Translational Medicine. – 2016. – Vol. 8. – P. 324-316.

Tosini, G. Circadian rhythms in cultured mammalian retina / G. Tosini, M. Menaker // Science. – 1996. – Vol. 272. – №. 5260. – P. 419-421.

Tower, J. Hsps and aging / J. Tower // Trends Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 20 (5). – P. 216–222.

Transcriptional profiling of aging in human muscle reveals a common aging signature / Zahn, J. M. [et al.] // PLoS Genetics. – 2006. – Vol. 2 (7). – P. 1058-1069.

Transdisciplinary unifying implications of circadian findings in the 1950s / F. Halberg [et al.] // Journal of Circadian Rhythms. – 2003. – Vol. 1. – №. 1. – P. 2.

Tripathi, P. L-arginine attenuates oxidative stress condition during cardiomyopathy / P. Tripathi, S. Pandey // Indian J. Biochem. Biophys. – 2013. – Vol. 50. – №2. – P. 99–104.

Valentin, J. Low-dose extrapolation of radiation-related cancer risk / J. Valentin // Ann ICRP. – 2005. – Vol. 35. – №4. – P. 110-140.

Vayssier, M. Heat shock proteins chaperoning life and death / M. Vayssier, B. S. Polla // Cell Stress Chaperones. – 1998. – Vol. 3. – №4. – P. 221–227.

Vijg, J. Genetics of Longevity and Aging / J. Vijg, Y. Suh // Annual Review of Medicine. – 2005. – Vol. 56. – P. 193-212.

Vogelstein, B. Surfing the p53 network / B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine // Nature. – 2000. – Vol. 408. – P. 307–310.

Vousden, K. H., Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53 / K. H. Vousden, C. Prives // Cell. – 2009. - Vol. 137 (3). - P. 413-431.

Vriend J., Reiter R. J. Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome //Journal of pineal research. – 2015. – Vol. 58. – №. 1. – P. 1-11.

vrille, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock / S.A. Cyran, A.M. Buchsbaum, K.L. Reddy // Cell. – 2003. – Vol. 112(3). – P. 329-341.

Welch, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease / W. J. Welch // Physiol. Rev. – 1992. – Vol. 72 (4). – P. 1063–1081.

Wright, W.E. Telomere-binding factors and general DNA repair / W.E. Wright, J.W. Shay // Nature genetics. – 2005. – Vol. 37. – P. 116—118.

Wu, W. Effects of oxidative modification on thermal aggregation and gel properties of soy protein by malondialdehyde / W. Wu, Y. Hua, Q. Lin // J Food Sci Technol. – 2014. – Vol. 51(3). P. 485-493.

Yamamoto, H. Sirtuin functions in health and disease / H. Yamamoto, K. Schoonjans, J. Auwerx // *Molecular Endocrinology*. – 2007. – Vol. 21. – №. 8. – C. 1745-1755.

Zhang, W. Ectopic expression of *MyD118/Gadd45/CR6 (Gadd45 $\beta/\alpha/\gamma$)* sensitizes neoplastic cells to genotoxic stress-induced apoptosis / W. Zhang, B. Hoffman, D.A. Liebermann // *International journal of oncology*. – 2001. – Vol. 18. – P. 749-757.

Zhao, B. Cellular senescence and organismal ageing in the absence of p21CIP1/WAF1 in ku80^{-/-} mice / B. Zhao, E.K. Benson, R. Qiao // *EMBO reports*. – 2009. – Vol. 10, № 1. – P. 71-78.

Zheng, X. AKT and TOR signaling set the pace of the circadian pacemaker / X. Zheng, A. Sehgal // *Current Biology*. – 2010. – Vol. 20. – №. 13. – P. 1203-1208.