

КАРАМАН Г.С.^{1✉}, ВАЙСЕРМАН О.М.², ПИСАРУК А.В.², КОШЕЛЬ Н.М.², МЄХОВА Л.В.², КОЗЕРЕЦЬКА І.А.¹

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: hannakaraman90@gmail.com

² Державна установа «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», Україна, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67, e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua

✉ hannakaraman90@gmail.com, (063) 407-93-33

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА ЛИЧИНКОВІЙ СТАДІЇ РОЗВИТКУ НА ТРИВАЛІСТЬ ЖИТТЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Мета. Вивчити вплив різної температури стадій розвитку на тривалість розвитку і тривалість життя імаго *Drosophila melanogaster*. **Методи.** Статистичну значущість показників визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) із подальшими апостеріорними порівняннями (Tukey HSD post hoc tests) розбіжностей між групами. **Результати.** Тривалість розвитку дрозофіл достовірно збільшувалася в 1,7 раза за зниження температури оточення від 27,5 до 20,0°C. Середня і максимальна тривалість життя мушок була максимальна за температури розвитку 22,5°C. За температури 20,0°C і вищої 22,5°C тривалість життя дрозофіл достовірно зменшувалася. **Висновки.** Отримані дані свідчать про достовірний вплив температури на стадії розвитку на тривалість життя мушок. Існує фізіологічний оптимум температури розвитку, за якого тривалість життя є максимальною. Вірогідно, це пов'язано з тим, що за оптимальної температури розвиток дрозофіл відбувається найбільш повноцінно і їх життєздатність найвища.

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

Результати багатьох досліджень свідчать, що чинники оточення на стадії розвитку суттєво впливають на тривалість життя (ТЖ) організму [1–4]. В контексті цього на експериментальній моделі плодової мушки *Drosophila melanogaster* активно вивчається «онтогенетична теорія старіння», запропонована Лінтсом у 1978 р. [5], де старіння розглядається як частина розвитку, що настає після стадій росту і диференціації клітин. Виходячи з цього, швидкість препубертатного розвитку мала би корелювати із ТЖ. У таких дослідженнях швидкість росту дрозофіл

можна модифікувати шляхом варіювання температури розвитку комах або концентрації дріжджового екстракту в поживному середовищі (ПЄ) личинок.

У роботах Економос і Лінтс (1984–1985 рр.) [6, 7] було з'ясовано, що мушки, вирощені в умовах низької температури, характеризуються збільшенням розмірів тіла і збільшенням ТЖ в порівнянні з тими особинами, яких на личинковій стадії утримували за нормальної температури [8]. Серед найбільш імовірних механізмів, які можуть стимулювати продовження життя за утримання личинок в умовах низької температури, розглядаються синтез антиоксидантних ферментів [9] і білків теплового шоку [10, 11]; зміни розмірів тіла [6]; варіація кількості субклітинних органел, їх розміру і / або функціональних властивостей [7], а також підвищення стійкості до харчової депривації внаслідок відносного збільшення вмісту жиру в імаго [4]. Всі вищезгадані модифікації, які відбуваються на личинкових етапах розвитку, можуть призвести до довгострокового посилення витривалості дорослих особин [11] і впливати тим самим на їх ТЖ.

Останнім часом у якості вірогідного механізму подібної фізіологічної адаптації розглядаються довготривалі епігенетичні зміни експресії генів, викликані чинниками оточення на ранніх стадіях розвитку організму. Більшість доказів цієї концепції отримано на експериментальних моделях гризунів [12, 13] і в епідеміологічних дослідженнях [1, 2]. Аналогічних досліджень на плодкових мушках реалізовано значно менше. Так, було встановлено, що продовження життя, зумовлене личинковим перенаселенням, супроводжується підвищенням рівня експресії гена Hsp70 (білки теплового шоку 70) і збільшенням стійкості до теплового шоку в іма-

© КАРАМАН Г.С., ВАЙСЕРМАН О.М., ПИСАРУК А.В., КОШЕЛЬ Н.М., МЄХОВА Л.В., КОЗЕРЕЦЬКА І.А.

го [11]. У дослідженні Вайсерман із співавторами (2014) [3] обмеження харчування на личинкових стадіях *D. melanogaster* призводило до збільшення ТЖ і підвищення рівня експресії гена InR (інсуліновий рецептор), від якого залежить довговічність самців плодових мушок.

Метою цієї роботи було вивчення впливу температури на стадії розвитку на тривалість розвитку і ТЖ імаго *D. melanogaster*.

Матеріали і методи

Експеримент проводили на лінії дикого типу *D. melanogaster* – Oregon-R. Личинки і лялечки дрозофіли на стадії розвитку утримували за різної температури: 20,0; 22,5; 25,0; 27,5 і 30,0°C. На стадії імаго мушок утримували за нормальних умов – температури 25°C, 70%-ї відносної вологості, 12-ти годинних періодів чергування світла і темряви, із застосуванням стандартного ПС (манна крупа, цукор, дріжджі, агар-агар).

У кожній групі середню тривалість розвитку від яйця до імаго визначали як проміжок від середньої точки періоду яйцекладіння до середньої точки періоду появи дорослих особин. Вилуплення тривало близько доби. На 3 добу імаго розділяли за статтю і розсаджували в пробірки по 25 особин (10 повторів на групу) для тесту на тривалість життя. Показник тривалості життя в групах визначали в десяти повторах (усього було 250 особин кожної статі на групу). Через день дрозофіл пересаджували в пробірки зі свіжим поживним середовищем, при цьому мертвих комах видаляли, підраховуючи їх кількість. Протягом експерименту 3 самці і 4 самки з технічних причин були втрачені під час пересаджування. Такі маніпуляції повторювали до загибелі останньої особини. Після цього розраховували показники середньої тривалості життя (СТЖ) самок і самців дрозофіли та максимальну тривалість життя (МТЖ), яку визначали як СТЖ 10 % мух, що найдовше прожили в кожній групі.

Статистичний аналіз. Статистичну значущість показників визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) із подальшими апостеріорними зіставленнями (Tukey HSD post hoc tests) розбіжностей між групами. Варіаційна статистика для даних наведена у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка (standard error – SE). Залежність між вагою комах після вилуплення з лялечок та їх СТЖ визначено за допомогою лінійно-

го регресійного аналізу. Відмінності вважали значущими за $p < 0,05$. Для статистичного аналізу отриманих результатів використовували програму Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Результати та обговорення

Результати дослідження впливу температури оточення на тривалість розвитку дрозофіл підтвердили факт уповільнення розвитку за зниження температури від 27,5°C до 20,0°C (рис. 1). При цьому розвиток дрозофіл значно сповільнювався – в 1,7 раза. За температури 30,0°C спостерігалася тенденція до збільшення тривалості розвитку. В результаті крива залежності між цими показниками описується нелінійною функцією. Це можна пояснити відомою залежністю активності ферментів від температури, яка має дзвоноподібну форму. Максимум активності ключових ферментів, що визначають швидкість росту личинок дрозофіл, знаходиться, імовірно, у діапазоні 27,0–29,0°C. За зміни температури в обидва боки від максимуму активності цих ферментів знижується і час розвитку дрозофіл збільшується.

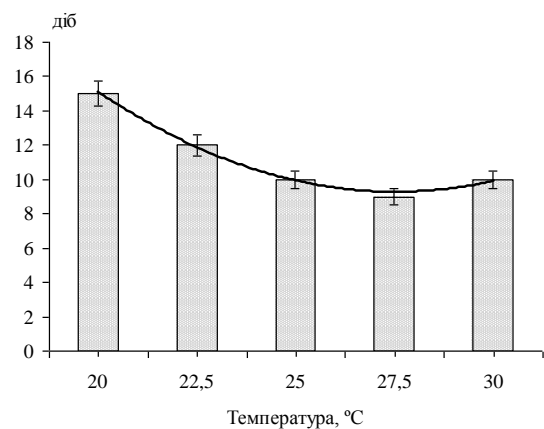


Рис. 1. Залежність тривалості розвитку *D. melanogaster* від температури оточення.

Виявлено нелінійну залежність між температурою, за якої відбувався розвиток мух, і їх вагою (рис. 2). Максимальну вагу під час вилуплення мали імаго, які розвивалися за 22,5°C. Із збільшенням температури середовища від 22,5 до 30,0°C вага мушок зменшувалася (самців на 42 %, самок на 36 %). За 20,0°C вага самок дрозофіл також зменшувалася у порівнянні з температурою 22,5°C.

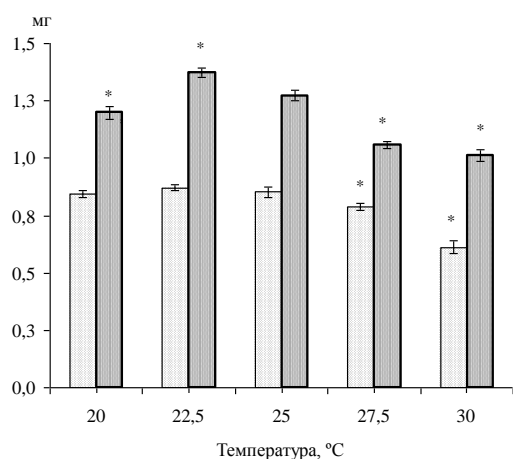


Рис. 2. Залежність середньої маси тіла дрозофіл від температури оточення на стадії розвитку: * – $p < 0,05$ порівняно з 25°C;

□ – самці, ■ – самки.

Теоретично вага дрозофіли повинна залежати від співвідношення швидкості її росту і тривалості розвитку за різної температури. Чим більша швидкість росту і чим довший розвиток відбувається, тим більшою буде вага мух. За 20,0°C ріст мух сповільнювався більшою мірою, ніж продовжувався період розвитку, тому їх вага зменшувалася. За 30,0°C вага мух зменшувалася, незважаючи на продовження періоду розвитку, що також можна пояснити більш суттєвим уповільненням росту. Несинхронність змін швидкості росту і часу розвитку може бути пов'язана з тим, що температурний оптимум для ключових ферментів цих процесів суттєво різниться.

Реєстрація змін кількості живих мух у групах, які розвивалися за різної температури (температурні групи, ТГ), показала, що криві їх виживання суттєво різняться (рис. 3, 4). Найшвидше вимирали мухи, що розвивалися за 30,0°C, особливо група самців. Криві виживання були зсунуті вправо від кривої у групі 30,0°C в такій послідовності: 27,5; 20,0; 25,0; 22,5°C. Послідовне збільшення ТЖ за зниження температури розвитку порушувалося у ТГ 20,0°C, особини якої вимирали раніше, ніж ті, які розвивалися за 25,0 і 22,5°C. Цей факт можна пояснити тим, що за 20,0°C розвиток дрозофіл відбувається неповноцінно і вони мають знижену життєздатність.

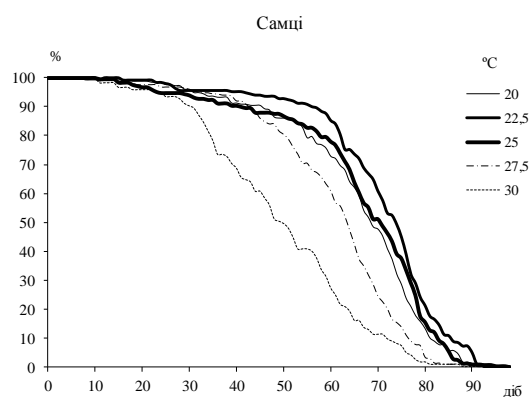


Рис. 3. Криві виживання самців *D. melanogaster*, розвиток яких проходив за різної температури оточення.

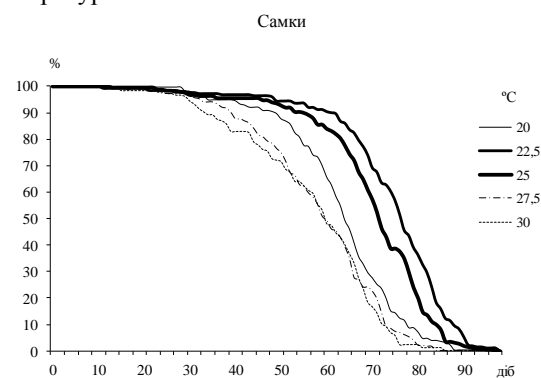


Рис. 4. Криві виживання самок *D. melanogaster*, розвиток яких проходив за різної температури оточення.

Були розраховані середня тривалість життя (СТЖ) і максимальна тривалість життя (МТЖ) дрозофіл, які розвивалися за різної температури (табл.). Порівняння отриманих середніх значень цих показників у всіх ТГ (для кожної статі окремо) методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA з подальшим Tukey's HSD test) показало достовірний вплив температурного чинника на СТЖ самців ($F(4,11) = 42,96$; $P < 0,001$) і самок ($F(4,12) = 70,30$; $P < 0,001$). Аналогічні результати отримані для МТЖ самців ($F(4,95) = 70,37$; $P < 0,001$) і самок ($F(4,95) = 71,08$; $P < 0,001$) *D. melanogaster*.

Таблиця. Середня та максимальна тривалість життя *D. melanogaster*, які розвивалися за різної температури навколишнього середовища на личинковій стадії розвитку

Стать	Самці		Самки	
T, °C	СТЖ, діб	МТЖ, діб	СТЖ, діб	МТЖ, діб.
20,0	66,1±0,96	87,7±0,73	63,4±0,81*	84,5±0,81*
22,5	71,0±0,91*	90,8±0,46*	74,6±0,89*	91,9±0,53*
Стать	Самці		Самки	
T, °C	СТЖ, діб	МТЖ, діб	СТЖ, діб	МТЖ, діб.
25,0	66,8±1,07	87,0±0,55	70,4±0,85	88,7±0,82
27,5	61,0±0,90*	81,6±0,78*	58,3±0,88*	79,6±0,65*
30,0	50,2±1,43*	74,1±1,19*	57,3±1,10*	76,3±0,91*

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з групою 25 °C (однофакторний ANOVA з подальшим Tukey’s HSD test).

На рис. 5 представлені криві залежності СТЖ і МТЖ від температури на стадії розвитку. З рисунка видно, що ці залежності є нелінійними. Існує температурний оптимум (22,5°C), за якого ТЖ є максимальною. Із зростанням температури вище цього оптимуму ТЖ лінійно

зменшується. Те ж відбувається і у випадку зниження температури розвитку до 20,0°C.

Проаналізовано залежність між СТЖ і масою комах (рис. 6). З рисунка видно, що ця залежність є практично лінійною: СТЖ комах була тим більшою, чим більшою була їх маса.

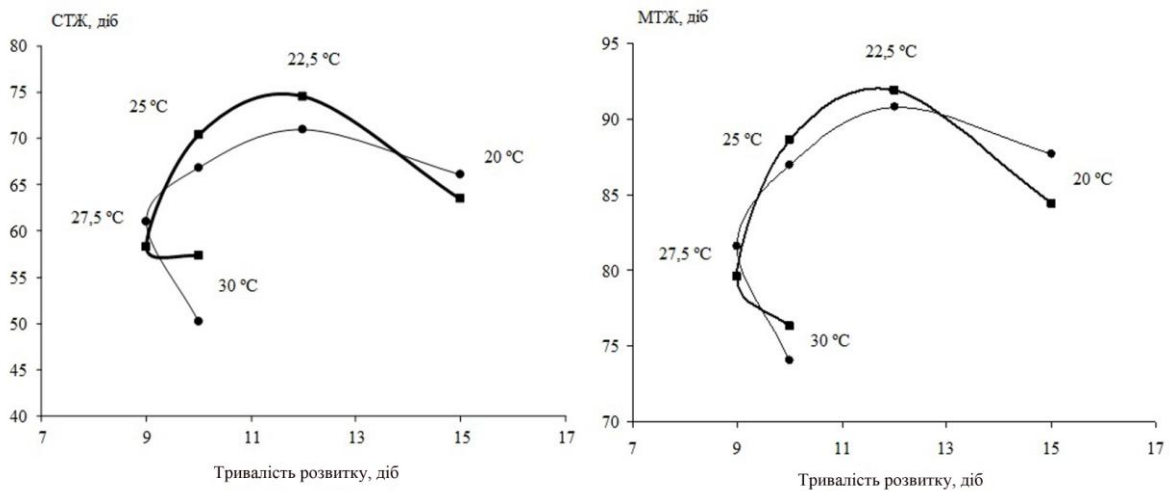


Рис. 5. Залежність СТЖ та МТЖ *D. melanogaster* від тривалості розвитку за різної температури оточення (самці – товста лінія, самки – тонка лінія).

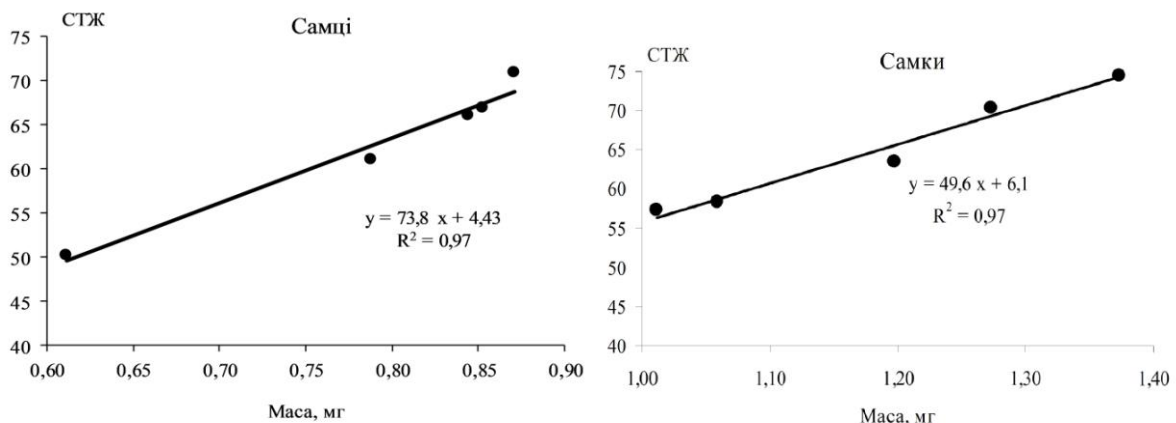


Рис. 6. Регресійна залежність між вагою комах після вилуплення з лялечок та їх СТЖ.

Висновки

Отримані дані свідчать про достовірний вплив температури розвитку дрозофіл на їх ТЖ. При цьому існує фізіологічний оптимум температури розвитку, за якого ТЖ є максимальною.

Існування такого оптимуму пов'язано, ймовірно, з тим, що за оптимальної температури розвиток дрозофіл відбувається найбільш повноцінно і їх життєздатність найвища.

Література

1. Vaiserman A.M. Epigenetic programming by early-life stress: Evidence from human populations. *Dev. Dyn.* 2015a. 244, № 3. P. 254–265. doi: 10.1002/dvdy.24211.
2. Vaiserman A.M. Epidemiologic evidence for association between adverse environmental exposures in early life and epigenetic variation: a potential link to disease susceptibility? *Clin. Epigenetics.* 2015. 7 (1). P. 96. doi: 10.1186/s13148-015-0130-0.
3. Vaiserman A.M., Koljada A.K., Zabuga O.G. Effect of Dietary Restriction during Development on the Level of Expression of Longevity-Associated Genes in *Drosophila melanogaster*. *Advances in Gerontology.* 2014. Vol. 4, № 3. P. 193–196. doi: 10.1134/S2079057014030096.
4. Zwaan B.J., Bijlsma R., Hoekstra R.F. On the developmental theory of ageing. I. Starvation resistance and longevity in *Drosophila melanogaster* in relation to pre-adult breeding conditions. *Heredity (Edinb).* 1991. 66. (Pt 1). P. 29–39. doi: 10.1038/hdy.1991.4.
5. Lints F.A. Genetics and ageing. Interdisciplinary topics in gerontology. *Basel. New York: Karger.* 1978. Vol. 14. P. 3–58. doi: 10.1159/000402121.
6. Economos A.C., Lints F.A. Growth rate and life span in *Drosophila*. II. A biphasic relationship between growth rate and life span. *Mech. Ageing Dev.* 1984. Vol. 27, № 2. P. 143–151. doi: 10.1016/0047-6374(84)90039-3.
7. Economos A.C., Lints F.A. Growth rate and life span in *Drosophila*. IV. Role of cell size and cell number in the biphasic relationship between life span and growth rate. *Mech. Ageing Dev.* 1985. Vol. 32, № 2–3. P. 193–204. doi: 10.1016/0047-6374(85)90079-X.
8. Sheno V.N., Syed Z.A., Prasad N.G. Evolution of increased adult longevity in *Drosophila melanogaster* populations selected for adaptation to larval crowding. *J. Evol. Biol.* 2016. Vol. 29, № 2. P. 407–417. doi: 10.1111/jeb.12795.
9. Martin G.M., Austad S.N., Johnson T.E. Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature Genetics.* 1996. Vol. 13. P. 25–34. doi: 10.1038/ng0596-25.
10. Buck S., Nicholson M., Dudas S.P., Baker III G.T., Arking R. Larval regulation of adult longevity in a genetically selected long lived strain of *Drosophila melanogaster*. *Heredity.* 1993. Vol. 71. P. 23–32. doi: 10.1038/hdy.1993.103.
11. Sorensen J.G., Loeschcke V. Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *J. Insect. Physiol.* 2001. Vol. 47, № 11. P. 1301–1307. doi: 10.1016/S0022-1910(01)00119-6.
12. Langley-Evans S.C. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *J. Hum. Nutr. Diet.* 2015. Vol. 28, Suppl 1. P. 1–14. doi: 10.1111/jhn.12212.
13. Tarry-Adkins J.L., Ozanne S.E. The impact of early nutrition on the ageing trajectory. *Proc. Nutr. Soc.* 2014. Vol. 73, № 2. P. 289–301. doi: 10.1017/S002966511300387X.

KARAMAN A.S.¹, VAISERMAN A.M.², PISARUK A.V.², KOSHEL N.M.², MEKHOVA L.V.², KOZERETSKA I.A.¹

¹ Kyiv National Taras Shevchenko University, Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine", Ukraine, 03127, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail: hannakaraman90@gmail.com

² State Institution "D.F. Chebotarev Institute of Gerontology NAMS Ukraine", Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshgorodska str., 67, e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua

INFLUENCE OF THE TEMPERATURE DURING THE LARVAL STAGE OF DEVELOPMENT ON LIFESPAN IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Aim. To study the influence of different temperatures on larval stage on the development duration and life expectancy of *Drosophila melanogaster* imago. **Methods.** The statistical significance of the indicators was determined by one-way ANOVA followed by Tukey HSD post-hoc tests to evaluate significance of differences between groups. **Results.** The development duration of imagoes significantly increased by 1.7 times when the developmental temperature decreased from 27.5 to 20.0°C. The average and maximum lifespan of the flies was maximum at a temperature of 22.5°C. The lifespan of fruit flies was significantly decreased compared to control (25.0°C) at a developmental temperature of 20.0°C and above 22.5°C. **Conclusions.** The obtained data suggest that developmental temperature significantly affects the lifespan of the flies. It likely is a physiological optimum of the temperature of development, in which life expectancy is maximal. Probably, this is due to the fact that at optimal temperature, the *Drosophila* development is most complete and their viability is highest.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, development, lifespan, temperature, larval stage.