ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ (ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ)»

УДК 577.346 *на правах рукописи*

Жикривецкая Светлана Олеговна

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ СТРЕСС-ОТВЕТА И СТАРЕНИЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Специальность: 03.01.01 – радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор РАН, член-корреспондент РАН
А. А. Москалёв

Москва, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 4
ВВЕДЕНИЕ 5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11
1.1. Генетическая основа механизмов старения 11
1.2. Эффект малых доз различных стрессов на продолжительность 13
1.3. Механизм стресс-ответа на воздействие ионизирующей радиации 16
1.4. Механизмы воздействия стресс-факторов разных типов 21
1.4.1. Механизм стресс-ответа на изменение температуры 21
1.4.2. Голодание как стресс-фактор, влияющий на продолжительность жизни 29
1.4.3. Инфекционный стресс в качестве горметического агента 36
1.5. Общность механизмов стресс-ответа и гормезиса 38
1.6. Методы оценки уровня мРНК генов 39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 47
2.1. Линии *Drosophila melanogaster* 47
2.2. Условия содержания 47
2.3. Условия воздействия стресс-факторов 47
2.3.1. Воздействие ионизирующей радиацией 47
2.3.2. Грибковое заражение 48
2.3.3. Холодовой шок 49
2.3.4. Голодание 49
2.4. Анализ продолжительности жизни 50
2.5. Оценка возрастной динамики локомоторной активности особей *Drosophila melanogaster* после воздействия анализируемых стресс-факторов 51
2.6. Экспрессионный анализ 52
2.6.1. Выделение и проверка качества РНК 52
2.6.2. Количественная ПЦР 53
2.6.3. Статистический анализ данных ПЦР-РВ 55

2.6.4. Секвенирование транскриптома 56
Валидация библиотек 57
Процедура высокопроизводительного секвенирования (NGS) 57
Обработка данных секвенирования 57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ 59
3.1. Анализ воздействия малых доз ионизирующей радиации на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster* 59
3.2. Анализ экспрессии 29 генов в ответ на воздействие малых доз ионизирующей радиации 63
3.2.1. Анализ дифференциальной экспрессии в образцах мужских особей 72
3.2.2. Анализ дифференциальной экспрессии в образцах женских особей 74
3.2.3. Сравнение экспрессионной динамики анализируемых генов у особей разного пола 75
3.3. Анализ выживаемости особей, подвергнутых воздействию разных стресс-факторов 77
3.4. Анализ локомоторной активности особей, подвергнутых воздействию разных стресс-факторов 80
3.5. Анализ транскриптомов особей, подвергнутых воздействию разных стресс-факторов 81
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 96
ВЫВОДЫ 103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 104

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

БТШ – белки теплового шока

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМФ – инозин монофосфат

ИФР-1 – инсулиноподобный фактор роста 1

МПЖ – медианная продолжительность жизни

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЖ – продолжительность жизни

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ФТШ – факторы теплового шока

FC – Fold Change

FDR – False discovery rate

GO – Gene Ontology

GSEA – Gene set enrichment analysis

MRDT – время удвоения интенсивности смертности

RIN – RNA Integrity Number

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Радиационное воздействие является частью рутинной жизни каждого человека. Источники ионизирующего излучения могут быть как искусственными, так и естественными. Естественными источниками ионизирующего излучения выступает в первую очередь естественный фон Земли, а также проникающее на Землю ионизирующее излучение разных видов из космоса. С увеличением уровня технического развития вклад искусственных источников облучения растет. Ежедневное столкновение с радиационным воздействием может быть связано не только с профессиональной деятельностью отдельного человека или его обитанием в зонах радиационного загрязнения, но и с использованием некоторых строительных материалов, частыми авиаперелетами, медицинскими вмешательствами (Медведева и др., 2014). Следствием аварий атомных станций, испытаний ядерного оружия, накоплением радиоактивных отходов является не только загрязнение определенной территории, но и распространение источников излучение на более обширные области. При этом, хотя для среденстатистического человека все описанные источники радиоактивного излучения не представляют опасности по отдельности, совокупная доза, даже оставаясь в пределах допустимых норм, может влиять на здоровье и качество жизни.

Явление радиоактивности было открыто Анри Беккерелем в 1896 году (Allisy, 1996). Менее чем через 10 лет после этого в 1902 году появляется первое сообщение о радиационном раке кожи. В 1924 – 1931 гг. публикуются работы об одном из главных событий в выявлении опасности радиационного излучения – обнаружении остеосарком у рисовальщиц циферблатов, использующих краску с содержанием радия (Schieve et al, 1997).

С тех пор эффекты воздействия больших доз ионизирующего излучения изучены довольно подробно и с медицинской точки зрения, и с молекулярно-биологической. Механизмы и эффекты воздействия малых доз радиации остаются изученными не в полной мере. В то время как

неблагоприятные последствия радиационного воздействия стали очевидны после масштабных испытаний ядерного оружия в 50-60е годы, что привело образованию зон повышенной радиактивности, начались исследования по уточнению механизмов этого воздействия и определению дозы воздействия, которую можно считать безопасной. Анализ большого количества результатов опубликованных исследований подтвердил существование явления, при котором организмы способны разнонаправленно реагировать на ионизирующие излучения при больших и малых дозах радиации (Luckey, 1980; Miller, Miller, 1987). Гормезисом называют стимулирующий эффект воздействия какого-либо стресс-фактора в относительной низкой дозе на разные показатели жизнедеятельности организма, в том числе продолжительность жизни (Calabrese, Baldwin, 2000). На сегодняшний день горметический эффект показан на различных организмах от плодовой мушки до человека для таких типов стресса как: радиационное воздействие, ограничительная диета (голодание), тепловой стресс и другие. Несмотря на то, что механизмы развития ответной реакции для каждого из этих стрессов изучены довольно подробно, на уровне малых доз воздействия остается малоизученным механизм положительного влияния на продолжительность жизни животных. Также наблюдение горметического эффекта в ответ на самые разные типы стрессов позволяет предположить единый молекулярный механизм этого эффекта и ограниченный набор мишеней, воздействие на которые напрямую вне стрессовых условий приведет к значительному увеличению продолжительности жизни.

В современном мире быстро увеличивается количество населения в возрасте старше 60 лет: по данным Европейского Общества Кардиологов (Wilma et al, 2006) к 2030 году это значение достигнет 22%. Старение становится очень важным аспектом здравоохранительной системы, так как доля пожилых пациентов увеличивается. Такая ситуация требует воспринимать старение как широко распространенное заболевание, а значит необходима точная диагностика, прогноз и оценка результатов лечения. Для всех трех аспектов необходимы фундаментальные исследования механизмов старения, результаты которых позволят разработать как маркеры старения

для диагностики и оценки эффектов профилактических и лечебных процедур, так и собственно мишени терапевтического вмешательства, воздействуя на которые можно не только увеличить продолжительность жизни, но и улучшить ее качество. Изучение механизмов горметического эффекта радиации и других типов стресса позволит выявить общие закономерности и использовать эти знания для разработки терапевтических процедур против старения без использования самого стресс-фактора даже в малой дозе.

Для исследования механизмов старения, изменения продолжительности жизни и влияния различных факторов на эти показатели удобным объектом является дрозофила. Так как форма кривых выживания различных видов животных очень схожи, считается, что фундаментальный механизм старения универсален (Акифьев и др., 1997), что делает возможным изучение старения на любых более удобных для этого объектах. Радиационный гормезис, а также стимулирующее влияние малых доз других стрессов, выявлен у разных видов разных таксономических групп, что позволяет предположить об универсальности механизма этого явления. Также у имаго дрозофилы ткани состоят из постмитотических клеток, за исключением некоторых интерстициальных клеток, что позволяет избежать влияния побочных факторов на полученные результаты. Сравнительно короткий жизненный цикл и продолжительность жизни, легкость содержания в лабораторных условиях, возможность подвергать одновременно несколько особей разным типам воздействия делает дрозофилу наиболее подходящим объектом для исследования стресс-ответа и его влияния на продолжительность жизни.

Цель и задачи исследования

Цель настоящего исследования заключалась в изучении идентификации путей и генов, участвующих в ответе на радиационное воздействие в разных дозах на транскрипционном уровне у плодовых мушек *Drosophila melanogaster*, и сравнении эспрессионных профилей в ответ на воздействие других типов стресса для выявления общих закономерностей стресс-ответа, которые могут быть основой горметического эффекта малых доз стресс-

факторов. Для достижения описанной цели были поставлены следующие задачи:

1) провести анализ уровня экспрессии 29 генов в условиях радиационного гормезиса, проявляющегося в увеличении продолжительности жизни, с помощью метода количественной ПЦР с обратной транскрипцией: генов, непосредственно связанных с ответом организма на разные типы стресса по известным механизмам и гены с разными функциями, проявившие изменения экспрессии после воздействия разных типов стресса, гены-регуляторы циркадного ритма и апоптоза, ранее проявившиеся себя как участники ответа на генотоксический стресс (Moskalev et al, 2014);
2) провести анализ продолжительности жизни и возрастной динамики локомоторной активности особей, подвергнутых воздействию 4 типов стресса (радиационного, холодового, метаболического, инфекционного) в разных дозах;
3) исследовать транскриптомы особей, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения в дозах 144 Гр, 360 Гр и 864 Гр, выявить дифференциально экспрессированные гены, провести анализ обогащения функциональных групп дифференциально экспрессированными генами, определить пути, участвующие в ответе на представленный стресс;
4) исследовать транскриптомы особей, подвергнутых одному из трех типов стресса: холодовому (-4°C, 0°C и +4°C), метаболическому (16-ти часовое голодание) и инфекционному (10 и 100 КОЕ энтамопатогенных грибков), выявить дифференциально экспрессированные гены;
5) провести сравнение списков дифференциально экспрессированных генов в ответ на разные типы воздействия, выделить общие для всех стресс-факторов функциональные группы, пути, гены.

Положения, выносимые на защиту:

1) Выявлен стохастический характер воздействия малых доз (5 сГр, 10 сГр, 20 сГр, 40 сГр) ионизирующего гамма-излучения на организм *Drosophila melanogaster*, что проявляется нелинейным характером зависимости доза-эффект в изменении параметров продолжительности жизни и

локомоторной активности особей обоих полов

2) Выявлен горметический эффект малых доз ионизирующего излучения (5 сГр, 10 сГр, 20 сГр, 40 сГр) и половой диморфизм в его проявлении
3) Общим адаптивным механизмом ответа на стресс-факторы разного типа (ионизирующая радиация, голодание, холодовой стресс, инфекционное заражение) в малых дозах у мужских особей *Drosophila melanogaster* является изменение регуляции метаболизма хитина, липидов (стеролов), фолата, а также фолат-опосредованного одноуглеродного метаболизма.

Научная новизна исследования

Впервые проведен анализ эффекта на физиологическом и экспрессионном уровне сверхмалых доз ионизирующего излучения (5 и 10сГр) на особей Drosophila melanogaster. Показано, что они приводят к гормезису, проявляющемуся в увеличении продолжительности жизни. Подтверждено отсутствие ранее обнаруженной на больших дозах радиационного облучения дифференциальной экспрессии генов, участвующих в репарации ДНК, апоптозе, антиоксидантной защите, детоксификации ксенобиотиков и регуляции циркадных ритмов. Впервые проведено сравнение влияния различных доз от малых до больших стресс-факторов разного типа (радиационное излучение, голодание, гипотермия, инфекционное заражение) на физиологическом и экспрессионном уровне на особей *Drosophila melanogaster*. Выявлен общий механизм ответа на исследуемые стрес-факторы – изменение экспрессии генов регуляции метаболических путей, в том числе биосинтеза фолатов.

Теоритическая и практическая значимость исследования

Установлен горметический эффект влияния радиационного облучения в малых дозах на самок и самцов *Drosophila melanogaster*. Установлены экспрессионные закономерности влияния малых доз различных типов стресса (радиационного, метаболического, холодового и инфекционного) на особей Drosophila melanogaster. Углублены знания об общих механизмах влияния исследованных стресс-факторов на живой организм.

Наличие схожих эффектов на продолжительность жизни и другие

показатели у представителей разных таксонов, а также наличие ортологов выявленных генов-кандидатов горметического эффекта в геноме человека и других животных дает возможность с помощью полученных данных выявить механизмы стресс-ответа и адаптации к неблагоприятным условиям среды у соответствующих групп организмов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 504 источников публикаций, в том числе 499 публикаций из зарубежных изданий. Работа изложена на 152 страницах машинописного текста и содержит 5 таблиц и 13 рисунков.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 работы, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах из списка изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Апробация и реализация диссертации

Результаты исследования докладывались на V Международной конференции по биотехнологиям и фармацевтике ФизтехБио — 2015.

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. доценту Москалеву А.А. за основную идею данного исследования и помощь в реализации поставленных задач. За помощь в проведении экспериментов и решении некоторых технических сложностей, а также проявленное терпение автор особо благодарит Кудрявцеву А. В., Снежкину А.В., а также весь коллектив лаборатории постгеномных исследований Института Молекулярной Генетики им. В.А. Энгельгардта РАН и молекулярной радиобиологии и геронтологии Института биологии Уральского отделения РАН.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе рассмотрены основные генетические механизмы влияния различных стресс-факторов и показанные гормезисные эффекты этих стресс-факторов, а также предолагаемые механизмы этих эффектов.

1.1. Генетическая основа механизмов старения

Данные о продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* различаются в разных научных источниках. Средняя продолжительность жизни в оптимальных условиях варьирует от 35-40 суток (Ashburner, 1989) до 45-60 суток (Вайсерман, 1996). При этом отдельные показатели жизнеспособности и продолжительности жизни характеризуются широким спектром модификационной изменчивости в зависимости от корма, плотности заселения, температуры окружающей среды. И даже в одинаковых оптимальных условиях среди особей одной и той же линии отличие в продолжительности жизни может достигать 30% при исключении любых возможных изменений в температуре, влажности, качества пищи (Lints et al, 1989). Особенным фактором оказалась плотность популяции имаго. При увеличении этого показателя происходит заметное снижение продолжительности жизни , хотя при увеличении плотности заселения личинками она возрастает вне зависимости от количества имаго (Вайсерман, 1996). При этом критическим возрастом оказалась третья личиночная стадия – именно плотность популяции на этой стадии влияет на продолжительность жизни. Этот фактор привел к предположению, что именно на ювенильных стадиях, более чувствительных к разным воздействиям, что лучше всего показано для радиации, может быть детерминирована программа старения и, как следствие, продолжительность жизни.

Возрастной показатель продолжительности жизни и смертности связан со старением. Старение – это физиологический процесс, при котором происходят возрастные изменения, ограничивающие компенсаторные реакции организма, что приводит к снижению устойчивости к стрессу, нарушению баланса работы различных систем регуляции и смерти

(Ткаченко, Пятина и др., 1996). Генетическая основа старения сейчас не подвергается сомнению: даже если сам по себе процесс старения является стохастическим процессом и не контролируется генетикой, точка начало старения может быть генетически запрограммирована. Противники этой теории приводят в качестве доказательства рассуждения о том, что генетическая программа старения не могла закрепиться в эволюции, так как 1) не имела шансов проявиться в условиях высокой смертности до наступления старости в естественных природных условиях (Гаврилов, Гаврилова, 1991) и 2) не способствует успешной борьбе за существование, что означает невозможность ее отбора. Однако эксперименты по селекции линий на изменение в продолжительности жизни продемонстрировали несостоятельность этих доводов (Brack et al, 1996).

Дело в том, что мутации, проявляющиеся лишь на поздних стадиях жизни, после репродуктивного периода, испытывают меньшее давление отбора. Таким образом происходит накопление мутаций, которые и являются основой увеличения вариабельности с возрастом между организмами в рамках одной популяции. При этом наиболее общими признаками, изменение которых наблюдается при старении, являются экспрессия генов на уровне траснкрипции и трансляции. Например, было отмечено изменение экспрессиии генов белков теплового шока. Экспрессия гена hsp70 в ответ на температурный стресс снижается у мух с возрастом, а общий уровень белков hsp23 и hsp26 возрастает, что связывают с возрастающей с возрастом необходимостью денатурировать накопленные поврежденные макромолекулы (Brack et al., 1996; King, Tower, 1999). Для генов актиновых белков также выявлена специфическая динамика изменения экспрессии в зависимости от возраста особи. Например, экспрессия гена *Act42A* значительно повышается при старении, в то время как количество мРНК гена *Act5C* снижается по мере взросления и старения организма (Brack et al., 1996, Labuhn, Brack, 1997). При этом наблюдаются снижение эффективности связи между микротрубочками и центросомой, а также изменение организации микротрубочек и их частичная деградация, что может быть причиной

мышечной атрофии при старении (Schatten et al, 1999). Из вышеперечисленных фактов можно сделать вывод о том, что при старении важную роль играет генетическая составляющая и генетические исследования могут внести значительный вклад в понимание механизмов старения.

1.2. Эффект малых доз различных стрессов на продолжительность жизни

Одна из основных теорий старения утверждает, что старение есть следствие накопления нарушений в результате воздействия различных стрессов, которым организм подвергается всю жизнь. Однако оказалось, что стресс может иметь не только негативное влияние, связанное с продолжительностью жизни.

Небольшие дозы стресс-факторов, например, алкалирующих агентов, термического и окислительного стрессов, ионизирующей радиации, тяжелых металлов, гипергравитации, могут способствовать увеличению продолжительности жизни (Crawford, Davies, 1994, Le, 2007, Le et al, 2002, Moskalev, 2007, Moskalev et al, 2009, Rattan et al, 2009, Rattan, 2010, Sarup, Loeschcke, 2011). Общим названием для подобных эффектов является гормезис. Гормезис – это благоприятный эффект биологического ответа организма на воздействие умеренных доз токсинов или других стрессов (Martins et al, 2011). В результате гормезиса происходит инициация адаптивного стресс-ответа, которая позволяет организму/клетке выживать при воздействии высоких доз, в норме приводящих к разрушениям, этого стресс-агента (Рисунок 1). Таким образом, гормезис помогает подверженным воздействию стрессоров клеткам избегать клеточного старения и смерти и, следовательно, влияет на физиологию старения. Гормезис можно назвать адаптивным механизмом клетки или организма для компенсации гомеостатического дисбаланса, вызванного воздействием факторов умеренного стресса (Bhakta-Guha, Efferth, 2015). Например, показано, что при холестатическом синдроме, характеризующимся накоплением желчных кислот и воспалением с последующим разрушением клеток печени, обработка клеток печени субтоксическими концентрациями разных желчных кислот

приводит к тому, что эти клетки избегают апоптоза при дальнейшем воздействии более высоких концентраций тех же веществ (Verhaag et al, 2016). Еще одним интересным примером является алкоголь. Исследование зависимости смертности от количества потребления алкоголя выявило, что умеренное потребление алкоголя от 0,1 до 22,9 г/день приводит к снижению показателя смертности от всех причин примерно на 20%, в то время как злоупотребление алкоголем (более 69 г/день) ассоциировано со значительным повышением риска смерти от сердечно-сосудистых заболеваний и рака (Lin et al, 2005). Клеточная устойчивость к воздействию стресса коррелирует с долгожительством, что подтверждает важность системы клеточного стресс-ответа в старении. Некоторые долгоживущие линии *Drosophila* и нематод, полученные из мутантных особей, показывают сверхэкспрессию белков теплового шока и антиоксидантных ферментов, важных для регуляции стресс-ответа, а также характеризуются стрессоустойчивым фенотипом (Murakami et al, 2000, Sampayo et al, 2000).

При этом отбор и селекция долгоживущих популяций плодовых мушек приводит к увеличению продолжительности жизни получаемых особей и их устойчивости к воздействию голодания, этанола, критического снижения влажности и холода (Luckinbill, 1998). С другой стороны, отбираемые по высокой стрессоустойчивости организмы отличаются также высокой продолжительностью жизни (Murakami et al, 2000, Sampayo et al, 2000). Также возраст-зависимая регуляция генов стресс- ответа у разнообразных видов (Verbeke et al, 2001) может быть свидетельством того, что существует общий защитный механизм против разрушительных эффектов старения.

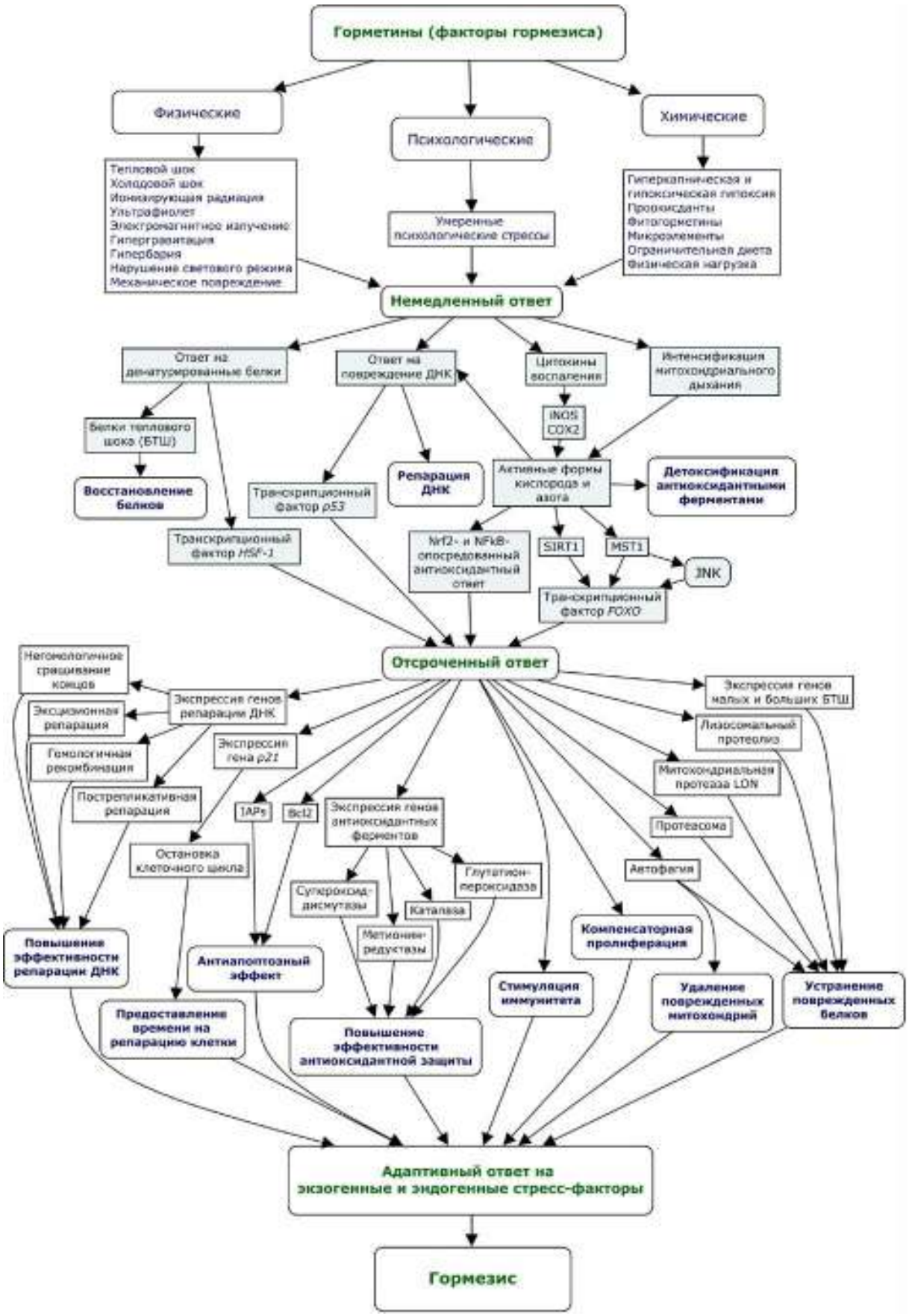


Рисунок 1 – Основные процессы, активируемые во время действия малых доз стресса и приводящие к эффекту гормезиса.

Среди наиболее частых факторов окружающей среды, воздействующих на человека в небольших дозах, можно выделить радиацию, заражение различными инфекционными агентами, перепады температуры и голод. Воздействию радиации человек подвергается вследствие наличия естественного радиационного фона Земли (Møller, Mousseau, 2013, Shahbazi-Gahrouei et al, 2013), а также при проведении медицинских процедур, при авиаперелетах и на некоторых производствах (McGeoghegan, Binks, 2000, Smith-Bindman et al, 2009, Amis et al, 2007, Leszczynski et al, 2004). Исходя из всех данных, собранных о гормезисных эффектах разных стрессов, многие ученые утверждают, что разработка терапии, продлевающей продолжительность жизни, на основе гормезиса возможна и является актуальной задачей геронтологии (Gems, Partridge, 2008, Rattan, 2008, Kahn, Olsen, 2009, Rattan, Demirovic, 2009, Vaiserman, 2010, Calabrese et al, 2012). Однако возможность создать такой подход без использования стрессовых факторов, но с безопасным активированием ключевых путей в организме человека кажется более привлекательной, хотя и требует дополнительных фундаментальных исследований. Одной из проблем такого подхода является то, что универсальный механизм гормезиса до сих пор неизвестен, хотя для некоторых типов стресса выявлены различные предположительные механизмы.

1.3. Механизм стресс-ответа на воздействие ионизирующей радиации

Эффекты ионизирующего излучения на клетки и организмы разнообразны и в первую очередь зависят от дозы. Поражающими факторами воздействия радиации являются прямые нарушения целостности макромолекул и косвенные, вызванные индукцией активных форм кислорода (АФК) (Ravanat et al, 2001, Lavelle, Foray, 2014, Feinendegen, 2005, Ravanat et al, 2001). В области малых доз ионизирующих излучений прямые эффекты радиации, такие как кластерные повреждения и двухцепочечные разрывы ДНК, минимальны, а на первый план выходит накопление повреждений ДНК и белков в результате повышенного уровня АФК в клетке (Feinendegen, 2005, Ravanat et al, 2001). Поэтому малые дозы радиации можно

рассматривать как умеренный стресс, который может способствовать гормезису (Calabrese, Baldwin, 2002). Ранее многие исследования показали, что облучение в относительно малых дозах (20-75 cGy) на преимагинальных стадиях развития дрозофилы в ряде случаев имеет отдаленные последствия, выражающиеся в увеличении продолжительности жизни и устойчивости к другим стрессам, таким как гипертермия (Moskalev, 2007, Moskalev et al, 2011, Seong et al, 2011, Moskalev et al, 2009, Vaiserman et al, 2003). Радиационный гормезис показан и на людях. В таких исследованиях анализируют показатели здоровья жертв атак атомными бомбами, работников соответствующих опасных производств, пилотов и бортпроводников, космонавтов, радиологов и радиотерапевтов, пациентов, подвергшихся воздействию радиации в результате медицинских обследований и вмешательств, и людей, живущих в областях с высоким уровнем фоновой радиации (Tang, Loke, 2015). Например, представлены данные о том, что 29000 случаев рака в год в США могут быть связаны с компьютерной томографией, а объединение данных по другим странам дает примерно 0,7% вероятность возникновения рака в результате облучения, полученного во время этой медицинской процедуры (Ma et al, 2013). Новый подход в расчете относительного риска возникновения опухолей среди переживших атомную бомбардировку показал, что для малых доз показатель был завышен из-за несовершенств устаревшей модели, а в соответствии с новой моделью относительный риск у таких людей снижен по сравнению с остальными представителями популяции, что можно объяснить горметическим эффектом малых доз радиации (Doss, 2012). В повседневной жизни люди подвергаются облучению за-за наличия естественного радиационного фона Земли и космического излучения (Møller, Mousseau, 2013, Shahbazi-Gahrouei et al, 2013). В Китае обнаружили, что вероятность смерти от рака в регионе с высоким естественным радиационном фоном значительно ниже по сравнению с окружающими областями (Rubino et al, 2005, Sakai et al, 2006). Аналогичные результаты получены в Индии (Schöllnberger et al, 2004). При этом в другом исследовании было показано более высокое количество хромосомных аберраций в лимфоцитах у жителей областей с повышенным радиационным

фоном, хотя при этом повышенной вероятности рака не наблюдали (Scott, Di Palma, 2006, Scott et al, 2008, Scott, 2008). Также в нескольких исследованиях обнаружена статистически значимая обратная корреляция между уровнем естественной радиации и смертностью от рака легких (Scott et al, 2009, Shaposhnikov et al, 2009, Suit et al, 2007) или от рака любого типа (Dobrzyński et al, 2015). Также мета-анализ исследований малых доз радиации на различных животных, включая мышей, крыс, собак, подтвердил возможность эффекта гормезиса такого стресса (Crump et al, 2012).

Защитный эффект малых доз ионизирующей радиации обеспечивается за счет активации систем детоксификации АФК (Feinendegen et al, 2004), точной репарации повреждений ДНК (Joiner et al, 1999, Rothkamm, Löbrich, 2003), снижения количества спонтанных мутаций in vivo (Hooker et al, 2004), защиты от неопластической трансформации in vitro (Azzam et al, 1996, Redpath et al, 2003, Ko et al, 2004, Elmore et al, 2005) и от формирования опухолей у животных. Как отмечено выше основным поражающим фактором малых доз ионизирующей радиации является образование активных форм кислорода (Muller et al, 2004, Grivennikova, Vinogradov, 2006, Murphy, 2009, Benard et al, 2010, Daiber, 2010). Это приводит к развитию оксидативного стресса, который вместе с умеренным генотоксическим эффектом малых доз приводит к запуску компенсаторных механизмов клетки, а именно подавлению инсулин/ИФР-1 сигналинга, активации SIRT и JNK-киназ (Moskalev, 2008). Все это в конечном итоге приводит к активации транскрипционных факторов FoxO. Эти транскрипционные факторы в свою очередь обеспечивают защиту клетки от АФК за счет активации MnSOD и каталазы, снижающих количество самих АФК, и белков Hsp70 и GADD45, нивелирующих последствия повышенного уровня АФК: репарация или деградация поврежденных белков и репарация ДНК (Giannakou et al, 200, Huang, Tindall, 2006, Lam et al, 2006). Также активация FoxO приводит к задержке клеточного цикла за счет повышения активности белков p21, p27, Rb2 и снижения активности циклинов B1 и B2. Такая задержка необходима для репарации ДНК и перехода клетки от синтеза белков для роста на синтез

белков ответа на стресс. А в случае недостаточной эффективности всех этих систем по сравнению с нанесенным клетке ущербом запускается апоптоз посредством активации экспрессии генов Bim, FasL, Bcl-6 (Lam et al, 2006, Liu et al, 2005). Ген p53, который часто принимают за ключевой компонент радиационного гормезиса, гораздо меньше подходит на эту роль, чем FoxO. С одной стороны, он активируется в ответ на стресс и необходим для исправления повреждений, однако при индуцировании его сверхэкспрессии в культуре клеток появляются признаки старения, а у плодовых мушек и мышей снижается продолжительность жизни (García-Cao et al, 2002, Bauer et al, 2005, Gentry et al, 2005). Также при повреждениях ДНК p53 выступает в качестве ингибитора FoxO (You, 2005). В то же время показано, что FoxO-зависимый механизм стресс-ответа активируется в ответ на воздействие ионизирующей радиации, тепловой и окислительный стресс (Giannakou et al, 200, Yang et al, 2006). При этом, мутантные по одному из основных генов этого механизма особи не только более устойчивы к окислительному и тепловому стрессам, но и характеризуются повышенной продолжительностью жизни, что показано на нематодах, мышах и дрозофилах (Giannakou et al, 200, Matsumoto, Accili, 2005, Oh et al, 2005). Важно отметить, что активированная в ходе ответа на радиацию в малых дозах деацетилаза SIRT1 участвует в эпигенетических изменениях, приводящих к повышении устойчивости клетки к последующим стрессам.

Еще одним следствием повышения уровня АФК в клетке является кратковременная стимуляция клеточного деления (Szumiel, 2012). Было замечено, что после воздействия ионизирующей радиации среди крысиных мезенхимальных стволовых клеток снизилось количество клеток в состоянии G0/G1 и увеличилось количество клеток в S фазе, одновременно уровень активных киназ семейства mitogen-activated kinase/extracellular signalregulated kinase (MAPK/ERK) возрос (Liang X., So et al, 2011). Дело в том, что рецепторы факторов роста в неактивном состоянии дефосфорилированы, а в случае фосфорилирования происходит их активация. Активация происходит под действием факторов роста, а за дезактивацию отвечают тирозин фосфатазы, которые содержат чувствительный к АФК цистеин в активном

центре (van Montfort et al, 2003). Таким образом, большое количество АФК в результате воздействия радиации сдвигает баланс между активными и неактивными киназами, приводя к повышению киназной активности подобно факторам роста (Szumiel, 2012). Несмотря на кратковременность этого эффекта, он может играть роль в горметическом эффекте малых доз радиации.

Другим важным механизмом эффекта гормезиса вследствие воздействия малых доз радиации является активация автофагии (Szumiel, 2012). АФК образуются в клетке и в нормальных условиях из-за утечки электронов из электрон- транспортной цепи. При этом, когда уровень АФК в клетке повышается вследствие нарушений или внешних воздействий, эта цепь становится разомкнутой, что приводит к накоплению супероксида в дополнение к уже высокому содержанию АФК. При этом окислительный стресс может приводить и к апоптозу, и к автофагии, которые являются разными сторонами одной медали в данном случае (Maiuri et al, 2007). Апоптоз рассматривают как защитный механизм на уровне организма, в котором присутствие сильно поврежденных клеток может привести к нарушениям гомеостаза и функций надклеточных систем (Wyllie, 1997). Автофагия является адаптивным механизмом, позволяющим клетке выжить в ответ на стресс за счет удаления поврежденных молекул и органелл (Shen et al, 2011, Shen et al, 2012). Автофагия – это комплексный процесс, регулируемый более чем 30 специальными высоко консервативными ATG генами (Kroemer et al, 2010, Yang, Klionsky, 2010, Yang, Klionsky, 2010, Chen, Klionsky, 2011, Kimmelman, 2011, Scherz-Shouval, Elazar, 2011, Szumiel, 2011, Lee et al, 2012, Wirawan et al, 2012). Основной инструмент автофагии состоит из трех главных функциональных компонентов: Atg9 и системы его восстановления, комплекса фосфатидилинозитол-3-киназ (PI3Ks) и убиквитин- подобные белки Atg12 и Atg8 (гомологи у млекопитающих MAP1LC3/LC3) (Xie, Klionsky, 2007). Регуляция автофагии осуществляется и онкогогенами, и супрессорами развития опухолей. Многие онкогены, участвующие в PI3K/Akt/mTOR пути, а также антиапоптотические белки ингибируют автофагию. Такие супрессоры развития опухолей, как смерть-ассоциированная протеин киназа 1 (death associated protein kinase-1, DAPK1),

фозфатаза PTEN и белок BNIP3L, способствуют активации автофагии, а нарушение их функции приводит к снижению эффективности этого процесса (Maiuri et al, 2009). При старении наблюдается снижении эффективности автофагии, что приводит к накоплению нерастворимых агрегатов, мешающих функционированию клетки (Ward, 2002, Chuang et al, 2014, He et al, 2013). В подтверждение активации автофагии в качестве горметического эффекта малых доз ионизирующей радиации свидетельствуют следующие данные: а) АФК способны активировать автофагию, хотя активация антиоксидантных систем клетки снимает эту активацию (Chen, Gibson, 2008, Azad et al, 2009, Chen et al, 2009, Dewaele et al, 2010, Scherz-Shouval, Elazar, 2011, Lee et al, 2012), б) индукция автофагии напрямую воздействием ионизирующего излучения (Paglin et al, 2001, Paglin, Yahalom, 2006, Zois, Koukourakis, 2009), в) химически индуцированная автофагия способствует повышению устойчивости к радиации (Kim et al, 2011), возможно благодаря существующему антогонизму между автофагией и апоптозом (Maiuri et al, 2007, Wirawan et al, 2010, Zalckvar et al, 2010). Существуют предположения, что активация автофагии в результате действия радиации происходит за счет развития реакции в виде эндоплазматического стресса, который в свою очередь активирует Atg12, один из важнейших белков автофагии (Kouroku et al, 2007). Следствием активации автофагии является противоопухолевый эффект радиации, который лег в основу радиационной онкологии и терапии (Zois, Koukourakis, 2009).

1.4. Механизмы воздействия стресс-факторов разных типов

1.4.1. Механизм стресс-ответа на изменение температуры

Реакция на перепады температуры, то есть на холодовой или тепловой стрессы, связана с активацией эволюционно-консервативного пути теплового шока (heat shock (HS) response pathway) (Rattan, 2006). Воздействие тепла инициирует в клетке передачу сигнала, которая в свою очередь активирует факторы теплового шока (heat shock factors, HSF) и их транслокацию в ядро. Взаимодействуя с ДНК, эти компоненты приводят к активации транскрипции так называемых HS-генов, генов теплового шока, в

результате чего синтезируются кодируемые ими белки теплового шока (БТШ, HS proteins, HSPs) (Park et al, 2005, Kiang, Tsokos, 1998, Verbeke et al, 2001). При этом было показано, что воздействие на инбредных самцов *Drosophila melanogaster* температуры 37°C по 5 минут каждый день в течение недели приводит к увеличению продолжительности их жизни (Le Bourg et al, 2001). Также час повышенной температуры (41-42°C) защищает фибробласты человека от преждевременного старения и апоптоза (Rattan, 2006). Влияние теплового шока разной интенсивности очень подробно изучено на разных организмах и культурах клеток.

Тепловой стресс является одним из наиболее часто применяемых горметических агентов, потому что его эффект дает не только стабильный результат, но и задействует эволюционно высоко консервативный путь ответа на стресс. Этот путь является одним из важнейших механизмов защиты клетки от различных стрессовых условий как внешних, так и внутренних (например, накопление денатурированных белков) (Rattan, 2006). В исследованиях на нематодах *Caenorhabditis elegans* было показано, что содержание особей дикого типа в условиях повышенной температуры (от 30 до 35°C) приводит к повышению средней продолжительности жизни. При этом интересно отметить, в одних исследованиях показано, что продолжительность воздействия должна быть не дольше 2 часов (Yokoyama et al, 2002, Butov et al, 2001, Michalski et al, 2001, Yashin et al, 2001, Cypser, Johnson, 2002, Johnson, 2002, Johnson et al, 2001), а в других максимальный эффект в виде увеличения продолжительности жизни в 2 раза наблюдали при времени экспозиции от 3 до 24 часов (Lithgow et al, 1995, Lithgow et al, 1994). Горметический эффект теплового шока в виде температуры 36°C в течение 70 минут также был показан на девственных мужских особях плодовых мушек *Drosophila melanogaster*, однако никаких эффектов не наблюдали на самках или взрослых особях (Khazaeli et al, 1997). При этом подвергнутые тепловому стрессу в 35°C по 5 минут в день в течение 5 дней мухи жили в среднем на два дня дольше по сравнению с контролем (Le Bourg et al, 2001), а воздействие 34°C на молодых мух способствует значительному

увеличению средней и максимальной продолжительности жизни, а также повышению их устойчивости к потенциально смертельному уровню теплового шока (Hercus et al, 2003). При анализе эффекта умеренного теплового шока на разные рекомбинантные инбредные линии оказалось, что наиболее значительный эффект по увеличению продолжительности жизни такое воздействие оказывает на особей короткоживущих линий, а среди особей долгоживущих линий эффект не такой мощный или вообще отсутствует (Defays et al, 2011, Scannapieco et al, 2007). Мета-анализ 24 исследований на 12ти видах животных, в том числе плодовых мушках, показал, что в результате воздействия теплового шока статистически значимого увеличения продолжительности жизни не обнаружено (Lagisz et al, 2013). Важно отметить, что эксперименты значительно отличались друг от друга по множеству параметров, в том числе самых основных: температура воздействия, длительность, частота и время между экспозициями при множественном воздействии исследуемого стресса. Можно сделать вывод, что тепловой шок среднего уровня не является универсальным горметическим фактором и его условия должны тщательно подбираться для каждого вида и популяции. Эффект гормезиса также наблюдали у различных клеток человека в ответ на умеренный тепловой стресс в виде 41°C по 1 часу дважды в неделю в экспериментах *in vitro* (Rattan et al, 2009), в том числе на кератиноцитах и фибробластах кожи человека, что может проявляться не только в виде инактивации апоптотических процессов, но и в повышенной скорости заживления ран, которая обычно снижается при старении.

Оптимальная регуляция синтеза и активности БТШ необходима для выживания клеток. Неэффективный или дерегулированный ответ на тепловой шок приводит к нарушениям роста и развития, к старению и апоптозу (Kiang, Tsokos, 1998, Sóti, Csermely, 2000, Soti et al, 2005, Verbeke et al, 2001). Сигнальные пути, вовлеченные в ответ на тепловой шок и его горметический эффект, до сих пор неизвестны полностью. Известно, что воздействие повышенной температуры в считанные минуты активирует основные сигнальные пути, в том числе mitogen-activated protein kinase (MAPK),

extracellular signal-regulated kinase (ERK) и активируемые стрессом киназы (SAPK) c-Jun (JNK) и p38 (Dorion, Landry, 2002, Gabai et al, 1998). Первым этапом развития стресс-реакции по пути теплового шока является активация факторов теплового шока (ФТШ). У позвоночных экспрессируется 4 таких фактора: HSF2, играющий роль в эмбриогенезе и сперматогенезе (Mezger et al, 1994, Rallu et al, 1997, Sarge et al, 1994), HSF1, являющийся основным фактором ответа на стресс (Yuan et al, 1997), HSF3, корегулирующий работу HSF1 (Kawazoe et al, 1999, Tanabe et al, 1997), и HSF4, конститутивно связанный с ДНК в нестрессовых условиях и преимущественно экспрессирующийся в клетках мышц, мозга и поджелудочной железы (Santoro, 2000). В отсутствие стресса HSF1 локализуется и в цитоплазме, и в ядре (Brown, Rush, 1999, Mercier et al, 1999, Orosz et al, 1996). Он находится в состоянии неактивного комплекса за счет стехиометрических взаимодействий с различными шаперонами, например, HSP90, HSP70, HSc70, CyP40, Hdj-1, p23 и FKBPs (Morimoto, 1993, Zuo et al, 1995). Во время стресса значительно увеличивается количество денатурированных и/или поврежденных белков, что приводит к отсоединению шаперонов от HSF1 и свободному перемещению этого фактора в ядро клетки, где под действием стресса он активизируется в ходе тримеризации и последующего фосфорилирования. В зависимости от типа стресса различные киназы могут фосфорилировать HSF1: ErK1-MAP kinase, glycogen synthase kinase-3, protein kinase C, JNK и p38 (Kim et al, 1999). Эти киназы вовлечены в регуляцию и выживания клетки, и ее смерти в ответ на разные типы стресса (Gabai, Sherman, 2002). Активация p38 происходит очень быстро после начала воздействия и приводит к фосфорилированию HSP27. Оно регулируется высокоспецифичным чувствительным к тепловому шоку путем и требует активации киназ MAPKK MKK3/6 и MAPKKK apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1) (Meriin et al, 1999). Ранняя своевременная активация путей JNK и p38 ассоциирована с выживанием и дифференцировкой, в то время как поздняя активация может приводить к апоптозу (Dorion, Landry, 2002). Таким образом, баланс между JNK и p38 (апоптотические) и ERK (выживание) путями определяет погибнет ли клетка, подверженная

действию теплового стресса, или выживет и станет стрессоустойчивой (Gabai, Sherman, 2002).

Активированный HSF1 связывается с соответствующими элементами HSE в промоторах генов БТШ (Morimoto, 1998). Гены белков группы БТШ очень консервативны. В зависимости от схожести последовательностей и размеров их классифицируют по семействам БТШ10, малые БТШ, БТШ30, БТШ40, БТШ60, БТШ70, БТШ90, к каждому из которых относится большое количество белков с разнообразными локализациями и функциями. БТШ выполняют различные задачи в качестве шаперонов и/или протеаз. В клетках, не подверженных стрессу, они играют роль в правильном сворачивании, сборке, внутриклеточной локализации, секреции, регуляции и деградации других белков. В условиях накопления денатурированных/поврежденных/несвернувшихся белков БТШ участвуют в рефолдинге белков, защите систем от повреждения белков, растворении агрегатов, мечении именно поврежденных белков для деградации другими системами и препятствуют развертыванию апоптотической программы (Jolly, Morimoto, 2000, Mathew, Morimoto, 1998).

При старении происходит нарушение ответа на стресс, в том числе за счет нарушений в пути ответа на тепловой шок (Finkel, Holbrook, 2000, Rattan, 1995). Это связано со снижением уровня активности ФТШ, при чем дело не в уменьшении общего количества этих факторов, а в снижении эффективности их активации (Heydari et al, 2000, Sóti, Csermely, 2000). Есть сведения о том, что нарушение эффективности работы пути теплового шока может быть связано, с одной стороны, с дефектами в активации HSF1 из-за нарушений тримеризации, фосфорилирования и дефосфорилирования этого фактора, а также из-за снижения его способности связываться с ДНК в результате пост-трансляционных модификаций, и, с другой стороны, с дефектами в созревании или трансляции мРНК БТШ (Heydari et al, 2000, Lu et al, 2000, Sóti, Csermely, 2000). До сих пор остается открытым вопрос, является ли пониженная эффективность ответа на тепловой шок следствием или причиной старения, однако совершенно точно, что это способствует старению (Rattan, 1995). Пониженный ответ пути теплового шока приводит,

с одной стороны, к накоплению поврежденных белков, в первую очередь окисленных и гликированных (Verbeke et al, 2000), с другой стороны, к ингибированию работы систем убиквитинирования и лизосом (Cuervo, Dice, 1998, Grune, 2000, Sitte et al, 2000). Нарушение работы этих систем на фоне нарушения окислительно- восстановительного баланса клетки при старении приводит к накоплению поврежденных белков, образованию агрегатов и, как следствие, развитию различных заболеваний, в том числе нейродегенеративных (Bijur et al, 1999, Pappolla et al, 1996). Важно отметить, что конститутивная сверхэкспрессия отдельных БТШ может быть токсична для организма, так как шапероны работают в комплексе с активирующим и ингибирующим ко-шаперонами, а переизбыток или отсутствие одного из компонентов приводит к нарушению работы всей системы, следствием чего может быть агрегирование белков, замедление клеточного роста и апоптоз (Feder, Hofmann, 1999). В связи с этим использование систем повышения экспрессии одного гена из группы генов БТШ на данном этапе не является применяемым противовозрастным вмешательством.

Механизм горметического эффекта умеренного теплового шока до сих не изучен полностью. С одной стороны, его связывают со снижением количества окисленных и гликозилированных белков за счет активации БТШ (Verbeke et al, 2000) и репарации ими слабо поврежденных белков и уничтожения сильно поврежденных. Исследование механизма, ответственного за благоприятное влияние теплового шока, выявило, что важную роль играет Hsp70, уровень которого был повышен у особей, подвергнутых воздействию стресса в виде температуры 37°C в течение 1 часа в более раннем возрасте и проявивших повышенную продолжительность жизни и устойчивость к последующим стрессам (Kristensen et al, 2003). Причем повышенный уровень Hsp70 сохраняется длительное время и оказывается, что в «пожилом» возрасте он выше в 1,7-2 раза у особей, подверженных умеренному тепловому стрессу в раннем возрасте, по сравнению с контрольной группой, развивающейся и стареющей в отсутствие стрессов (Sarup et al, 2014). В другом исследовании было

показано, что при повышении экспрессии HSP70 искусственным методом (в отсутствие теплового шока и других стрессов) продолжительность жизни плодовых мушек увеличилась, а миоциты крыс стали более устойчивы к окислительному стрессу (Chong et al, 1998, Tatar et al, 1997). Эти факты позволяют предположить, что именно повышение экспрессии генов БТШ и активация работы всей системы ответа на тепловой шок обуславливает гормезисные эффекты умеренного повышения температуры, однако искусственное повышение их экспрессии у человека может привести к дисбалансу системы и иметь негативные последствия.

Влияние **холодового стресса** на продолжительность жизни изучено в значительно меньшей степени. Интересно, что и пойкилотермные, и гомеотермные животные имеют более высокую продолжительность жизни в условиях пониженных температур (Loeb, Northrop, 1916, Conti et al, 2006, Lee, Kenyon, 2009, Klass, 1977, Wu et al, 2009, Xiao et al, 2013), а положительный эффект холодового стресса на продолжительность жизни в экспериментальных условиях подтвержден на различных видах, в том числе на млекопитающих (Liu, Walford, 1970, Klass, 1977, Conti et al, 2006, Valenzano et al, 2006). С одной стороны, исследование влияния разных температурных режимов на продолжительность жизни мышей в рамках анализа зависимости между скоростью метаболизма и долгожительством не выявил никаких статистически значимых различий между группами, хотя и скорость метаболизма, и средняя масса тела у них отличались по результатам эксперимента (Vaanholt et al, 2009). С другой стороны, было показано, что воздействие умеренного холода на разном этапе жизни плодовых мушек способствует не только увеличению продолжительности жизни, но и повышению устойчивости к тепловому шоку и грибковому заражению (Le Bourg, 2011, Le Bourg et al, 2009, Le Bourg, 2016), а при селекции долгоживущих популяций плодовых мушек приводит к увеличению продолжительности жизни получаемых особей и устойчивости к воздействию пониженных температур (Luckinbill, 1998). Также многократный холодовой стресс в возрасте от 6 до 32 месяцев способствует увеличению продолжительности жизни крыс (Holloszy et al, 1985).

Одна из гипотез предполагает, что положительный эффект низких температур на продолжительность жизни обуславливается снижением скорости метаболизма в условиях холода, но недавние исследования показали, что скорость метаболизма не влияет на продолжительность жизни (Yen et al, 2004). Другая гипотеза предполагает, что низкие температуры приводят к снижению скоростей химических реакций в организме в соответствии с уравнением Аррениуса. Однако было показано, что снижение температуры не изменяет максимальной активности некоторых ферментов у *C. elegans* (Paul et al, 2000), поэтому и эта теория о механизме холодового гормезиса не была подтверждена. На данный момент относительно этого механизма известно несколько разрозненных фактов. Инактивация супероксид дисмутазы, играющей важную роль в детоксификации активных форм кислорода в клетке, значительно снижает положительный эффект холодового стресса на продолжительность жизни (Yen et al, 2006), при этом интересно отметить, что холодовой гормезис может быть связан со снижением устойчивости к окислительному стрессу (показано для параквата). Также было показано на мышах, что холодовое воздействие приводит к повышению экспрессии в спинном мозге гена разобщающего белка 2 UCP2, играющего роль в термогенезе и, возможно, старении (Mizuno et al, 2000). Холодовой стресс, повторяемый ежедневно, может стимулировать клеточно-опосредованный иммунитет (Shu et al, 1993, Kalenova et al, 2005, Banerjee et al, 1999, Jain et al, 1996), в то время как гуморальный иммунитет может быть ингибирован таким способом (Luo et al, 1993, Garbuliński et al, 1991). В результате воздействия холодной воды на все тело особи показано повышение активности и количества периферических натуральных киллеров и CD8+ Т-лимфоцитов (Janský et al, 1996, Aviles et al, 2004, Jain et al, 1996), которое может быть объяснено активацией симпатической нервной системы (Janský et al, 1996, Nakamoto, 1990), гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (Nakane et al, 1985, Giagnoni et al, 1983), гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси (Reed et al, 1994, Quintanar-Stephano et al, 1991). Эти системы приводят в действие норэпинефрин, адренокортикотропный гормон (АКТГ), бета-эндорфин и тироидные гормоны (Т3 и Т4),

воздействующие на Т- лимфоциты и натуральные киллеры. Все это позволяет предположить, что именно активация иммунитета вследствие холодового стресса может способствовать снижению вероятности развития опухолей и продлению жизни (Shevchuk, Radoja, 2007). Транскриптомных исследований горметического эффекта пониженных температур не проводилось, однако были выявлены некоторые экспрессионные особенности акклиматизации к холоду. На плодовых мушках показано изменение экспрессии генов, участвующих в регуляции метаболизма, состава клеточной мембраны и циркадных ритмов, однако дифференциальной экспрессии генов стресс-ответа обнаружено не было (Parker et al, 2015, Vermeulen et al, 2013). Однако эти результаты лишь свидетельствуют о том, что длительная адаптация к стрессу и короткое воздействие стресса в умеренном количестве являются разными эффектами и потому инициируют стресс-ответы разного типа и с различными механизмами. При анализе влияния холодового стресса на маллюсков были обнаружены экспрессионные генов воспаления, стресс-ответа, теплового шока, апоптоза и некоторых иммунных реакций (Menike et al, 2014).

1.4.2. Голодание как стресс-фактор, влияющий на продолжительность жизни

Горметический эффект **голодания** и снижения потребляемых калорий связывают с ингибированием mTOR (mammal target of rapamycin, мишень рапамицина млекопитающих). Сигнальный путь TOR связан с различными процессами в организме, а недавние исследования показали, что старение может быть следствием сверхактивации этого сигнального пути (Blagosklonny, 2011). Одним из возможных негативных влияний активации mTOR может служить его способность ингибировать автофагию, что приводит к накоплению поврежденных белков и органелл в клетках, а также участие в процессах развития опухолей. Инактивация TOR в результате голодания или ограничения количества калорий и увеличение продолжительности жизни за счет этого показаны на различных животных: мышах, *C. elegans, D. melanogaster, S. Cerevisiae* и других. Ограничительная

диета в различных видах (диета или вещества, имитирующие ограничительную диету) используется в качестве анти-возрастной стратегии даже для человека. Впервые было замечено, что ограничения в еде могут способствовать продлению жизни, в 30х годах двадцатого века на крысах (McCay et al, 1989). Систематический обзор клинических исследований влияния голодания на вероятность развития сердечно- сосудистых заболеваний и диабета показал, что голодание действительно может принести значительную пользу организму человека по многим параметрам (Horne et al, 2015), однако требует тщательного анализа состояния здоровья и особенностей организма до применения голодания, как и любое медицинское вмешательство. Также в пользу положительного влияния голодания и ограничения потребляемых калорий на здоровье и старение говорит то, что ограничительная диета способствует увеличению как средней, так и максимальной продолжительности жизни (Lewis et al, 1985, Testa et al, 2014), и результаты анализа большого количества физиологических показателей у грызунов на низкокалорийной диете по сравнению с особями того же возраста без диеты и более молодыми особями на контрольной диете (Masoro, 1998, Masoro et al, 1992, Masoro et al, 1982, Masoro, 1998). В дополнение к этому ограничение калорий способствует замедлению развития большинства старение- ассоциированных заболеваний, в том числе неопластических образований, дегенеративных и иммунных болезней (Maeda et al, 1985, Bronson, Lipman, 1991, Roe et al, 1995, Roebuck et al, 1981, Klurfeld et al, 1989, Boileau et al, 2003, Duan, Mattson, 1999, Halagappa et al, 2007). У больных астмой голодание в режиме день через день приводит к значительному улучшению показателей здоровья (Johnson et al, 2007). При этом исследования по анализу влияния сокращения в рационе отдельных макро- и микронутриентов показали, что наиболее значительное влияние на продолжительность жизни оказывает именно снижение общей калорийности пищи, а не уменьшение относительного количества одного или нескольких ее компонентов (Zimmerman et al, 2003, Masoro et al, 1989, Yu et al, 1985, Masoro, 2005). В связи с этим далее в тексте термин ограничительная диета предполагает именно ограниченный по калориям рацион питания.

По данным исследований на мышах и плодовых мушках голодание или ограничительная диета приводит к более позднему «старту» старения, но не замедляет его скорость (Holehan, Merry, 1986, Pletcher et al, 2000, Mair et al, 2003, Driver, 2003). Например, было показано, что ограничительная диета не влияет напрямую на уровень холестерина в крови, однако заметно ослабляет и замедляет старение-ассоциированное увеличение этого показателя (Liepa et al, 1980). В то же время есть предположения, что у некоторых видов при определённых условиях может происходить именно замедление скорости старения (Ward, 1988, Masoro, 2006). Механизмы влияния питания вообще и голодания или ограничительной диеты в частности разнообразны.

Одним из предполагаемых механизмов горметического эффекта голодания является повышение экспрессии мРНК SIRT1 (Heilbronn et al, 2005). Белок SIRT1 является ключевым регулятором многих защитных систем клетки, нужных для ее выживания под воздействием стресса (Motta et al, 2004). Необходимость повышения экспрессии SIRT1 и его гомологов для увеличения продолжительности жизни в ответ на ограничительную диету показана для разных видов от дрожжей до клеток человека в культуре (Lin et al, 2000, Cohen et al, 2004). Например, на дрожжах линии *S. cerevisiae* было выявлено, что для горметического эффекта голодания необходимы функциональные гены PNC1, кодирующий никотинамидазу, и Sir2 (гомолог SIRT1), кодирующий деацетилазу (Anderson et al, 2003). В исследовании обнаружили повышенный уровень этих ферментов в клетках, подверженных ограничительной диете, и предложили следующий механизм горметического эффекта голодания. Продуктом деацетилазной реакции является никотинамид, ингибирующий активность SIR2. При снижении количества потребляемых калорий происходит повышение уровня PNC1, что в свою очередь приводит к сниженному уровню никотинамида, перерабатываемого никотинамидазой PNC1, и повышению активности SIR2. Однако, учитывая разнообразие функций белка SIRT1, можно предположить различные варианты механизма, а на данный момент абсолютно точно известно только то, что экспрессия SIRT1 повышается при голодании или ограничительной диете (Lamming et al, 2005, Masoro, 2004, Rogina, Helfand, 2004, Tissenbaum,

Guarente, 2001), хотя обнаружены случаи увеличения продолжительности жизни в ответ на голодание вне зависимости от состояния SIRT1/SIR2 (Lakowski, Hekimi, 1998, Fabrizio et al, 2005, Kaeberlein et al, 2005, Kapahi et al, 2004, Vellai et al, 2003). Одной из мишеней SIRT1 являются транскрипционные факторы FoxO, которые также активируется в результате действия AMPK, изменения количества активных форм кислорода и другими факторами (Kim et al, 2015). AMP-активируемая протеинкиназа AMPK является гетеродимерным ферментом, действующим в качестве сенсора соотношения АМФ/АТФ в клетке и активирующимся в ответ на метаболические стрессы: гипоксию, тепловой шок, недостаток глюкозы, который наблюдается, например, при голодании (Jones et al, 2005, Hardie, 2008). Транкрипционные факторы группы FoxO вовлечены в повышение экспрессии различных генов, регулирующих клеточный цикл, репарацию ДНК, устойчивость к стрессу (Furukawa-Hibi et al, 2005, van der Horst, Burgering, 2007). Считается, что основная роль FoxO в защите от старения состоит в их способности ингибировать генерацию активных форм кислорода (Morris, 2005, Murakami, 2006, Chung et al, 2011) за счет повышения экспрессии гена супероксиддисмутазы MnSOD (Fukuoka et al, 2003). При этом они также играют роль в регуляции воспаления, нарушение которой приводит к широкому спектру заболеваний, в том числе ожирению, диабету типа 2 и гиперлипидемии (Navab et al, 2008). Было показано, что ограничительная диета приводит к активации FOXO и увеличению продолжительности жизни у крыс (Kim et al, 2008) и нематод (Greer et al, 2007).

Многие данные говорят также о том, что одним из важнейших эффектов голодания являются изменения в системах, регулирующих энергетический метаболизм клетки. Различные типы клеток в ответ на ограничительную диету повышают экспрессию белков, вовлеченных в регуляцию митохондриального окислительного фосфорилирования (Liu et al, 2006), гликолиза (Rodgers et al, 2005) и метаболизма NAD/NADH (Hyun et al, 2006). Поэтому существует предположение, что благоприятный эффект ограничительной диеты связан в том числе с подавлением гликолиза,

которое наблюдали у животных, питающихся 1 раз в сутки в течение часа (Kouda et al, 2009, Hipkiss, 2006). Постоянное торможение гликолиза едва ли можно назвать полезным, однако его временное подавление может оказывать благоприятное воздействие (Hipkiss, 2007). Многие интермедиаты гликолиза являются альдегидами, которые потенциально вредны из-за своей способности гликировать белки и нуклеиновые кислоты. Одними из самых активных интермедиатов являются глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат, которые помимо этого опасны также тем, что могут спонтанно приводить к образованию метилглиоксаля (Hipkiss, 2006). Метилглиоксаль является высоко токсичным гликирующим агентом и основным источником продуктов неферментативного гликирования (advanced glycation end-products, AGEs). Метилглиоксаль вовлечен в большое количество старение-ассоциированных заболеваний (Ramasamy et al, 2006), а также может способствовать инактивации митохондрий в клетке и формированию активных форм кислорода (Hipkiss, 2006), влиять на экспрессию генов (Yao et al, 2006). Подавление гликолиза во время голодания или ограничительной диеты приводит к пониженному уровню метилглиоксаля и, соответственно, нивелирует токсические эффекты этого вещества (Hipkiss, 2007). Еще одной стороной воздействия голодания является изменение работы антиоксидантной системы. Например, было показано повышение уровня некоторых антиоксидантных ферментов в печени грызунов, содержащихся на ограничительной диете (Ugochukwu, Figgers, 2007), а также увеличение уровня коэнзима Q10 (Hyun et al, 2006). В другом исследовании умеренное голодание приводило к повышению активности супероксиддисмутазы SOD2 и уровня глутатиона (GSH), нитратов и нитритов (NOx) (Stankovic et al, 2013), играющих важную роль в процессах старения. Помимо этого, голодание/ограничительная диета приводят к изменению уровня различных факторов роста, например, инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1, IGF-1) (Breese et al, 1991, Sell, 2003), а также нейротрофического фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) и нейротрофического фактора глиальных клеток (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) (Lee et al, 2002, Maswood et al, 2004) в

некоторых регионах мозга. Эти факторы роста необходимы для защиты клеток от метаболического и окислительного стрессов, развивающихся в разных условиях (Mattson, Scheff, 1994). Одним из самых заметных процессов при старении является изменение реакции организма на поступление питательных веществ. Это связано с нарушениями в инсулин/ИФР-1 сигнальном каскаде (IIS), в котором задействовано множество важных старение-ассоциированных компонентов, в том числе упомянутый выше mTOR – предполагаемый ключевой белок горметического эффекта голодания. Например, на мышах и крысах показано, что ограничительная диета снижает средний уровень глюкозы и инсулина за сутки как в молодом, так и в пожилом возрасте (Masoro et al, 1992), при этом способствуя понижению уровня ИФР-1 в плазме крови (Breese et al, 1991, Sonntag et al, 1992, D'Costa et al, 1993, Coschigano et al, 2000). На нематодах (Kenyon et al, 1993, Wolkow et al, 2000) и плодовых мушках (Clancy et al, 2001, Tatar et al, 2001) также было показано, что потеря функциональной активности инсулиновой сигнальной системы приводит к увеличению продолжительности жизни. Так как у этих видов нет отдельных рецепторов для инсулина и ИФР-1, то эти исследования также свидетельствуют о важной роли ИФР-1 сигналинга в увеличении продолжительности жизни. Таким образом, одним из механизмов горметического эффекта ограничительной диеты/голодания является изменение эффективности инсулинового и ИФР-1 сигнального пути, важная роль которого в процессах старения подтверждена не раз (Masoro, 2005, Holzenberger et al, 2003). Интересно отметить, что у млекопитающих и инсулин, и ИФР-1 приводят к активации mTOR и ингибированию FoxO, а AMPK, активируемая в результате разных воздействий, в том числе при снижении уровня глюкозы, и ингибирующая mTOR, одновременно активирует SIRT1 и FoxO, что связывает все перечисленные механизмы в единую систему. Эта единая система может быть связана с действием одного фактора – потенциальной отправной точкой всех положительных воздействий голодания/ограничительной диеты – повышенным уровнем нейропептида Y (NYC) (Minor et al, 2009). Этот нейропептид играет важную роль в

формировании аппетита и ответе на голодание, участвуя в регуляции уровня инсулина, IGF-1 и некоторых кортикостреоидов (Akabayashi et al, 1994, Leibowitz et al, 1988, Moltz, McDonald, 1985, Wahlestedt et al, 1987, Zarjevski et al, 1994).

Другим механизмом гормезиса в ответ на голодание является повышение уровня белков теплового шока (Mattson, 2008). Было показано, что ограничительная диета замедляет возраст-ассоциированное снижение транскрипции БТШ70 в гепатоцитах крыс (Heydari et al, 1993) и приводит к повышению уровня БТШ70 в кортикальных синаптосомах (Guo et al, 2000). Еще одним эффектом голода или ограничения по количеству потребляемых калорий является повышение стабильности генома (Haley-Zitlin, Richardson, 1993, Raffoul et al, 1999). Это выражается в уменьшении накопления повреждений ядерной и митохондриальной ДНК (Chung et al, 1992, Melov et al, 1997, Kang et al, 1998, Hamilton et al, 2001) и снижении частоты спонтанных и индуцированных мутаций (Dempsey et al, 1993, Casciano et al, 1996). Также голодание способствует снижению УФ- индуцированных повреждений гепатоцитов (Guo et al, 1998). В исследовании на крысах было показано, что стабильность генома обеспечивается за счет активирующей регуляции эксцизионной репарации оснований (Cabelof et al, 2003). Еще один механизм связан с повышением активности SIRT1, которая связываясь с Suv39h1 способствует формированию факультативного гетерохроматина, нормализации эпигеномного профиля и поддержанию стабильности генома (Bosch-Presegué et al, 2011).

В дополнение к эффектам на клеточном уровне голодание также производит потенциально гормезисные эффекты на уровне организма. Например, было обнаружено, что ограничительная диета может приводит к повышению концентрации в плазме крыс кортикостерона, основного глюкокортикоида особей этого вида (Sabatino et al, 1991). Активация глюкокортикоидной системы в свою очередь может способствовать торможению старения (Leakey et al, 1994), а искусственное повышение концентрации глкокортикоидов производит схожий с голоданием противо-возрастной эффект (Leakey et al, 1994). Также был замечен

противоопухолевый эффект ограничительной диеты у мышей (Jin et al, 2014, Olivo-Marston et al, 2014, Shang et al, 2014, Hursting et al, 2003), который предположительно может быть связан в том числе с повышенным в результате такого стресса уровнем глюкокортикоидов (Pashko, Schwartz, 1992, Schwartz, Pashko, 1994, Birt et al, 1999) или другими процессами, описанными выше: активация SIRT1, FoxO, воздействие на ИФР-1 и инсулиновый сигнальные пути (Pallavi et al, 2012, Pallavi et al, 2012).

Интересно отметить, что не все типы клеток отвечают положительно на воздействие голодания. Например, в мотонейронах спинного мозга не происходит увеличения БТШ70 и не наблюдается горметического эффекта ограничительной диеты при анализе мышиной модели бокового амиотрофического склероза (Mattson et al, 2007). Также системы и клетки, вовлеченные в заживление ран, реагируют на голодание негативно, что приводит к нарушению этого процесса (Reiser et al, 1995). При использовании голодания или ограничительной диеты в качестве антивозрастной стратегии необходимо помнить, что это может негативно повлиять еще и на репродуктивную систему организма. Это делает невероятно актуальным поиск и анализ точных механизмов горметического эффекта голодания для воздействия на эти мишени фармакологическими методами, тем самым устраняя возможное негативное влияние ограничительной диеты.

1.4.3. Инфекционный стресс в качестве горметического агента

В качестве источника умеренного стресса с возможным горметическим эффектом влияние патогенов практически не изучено. Свидетельством связи между иммунитетом (и заражениями различного типа) и гормезисом могут служить два набора доказательств. С одной стороны, многие исследования показывают, что несмотря на неблагоприятное воздействие паразитов на репродуктивную способность и выживание их хозяев (Lehmann, 1993), животные, подвергнутые воздействию мертвых или в некоторых случаях живых патогенов, характеризуются улучшениями в отдельных аспектах их жизни (Polak,

Starmer, 1998, Chadwick, Little, 2005, Ikeda et al, 2007). Например, некоторые животные становятся более устойчивы к последующим инфекциям (Pham et al, 2007, Lawniczak et al, 2007, Roth et al, 2009), а у других наблюдается значительные положительные изменения в физиологии, часто в ущерб их способности противостоять заражениям (Leroy et al, 2012, Papp et al, 2012, Ermolaeva et al, 2013). При этом остается не известным, можно ли эти изменения характеризовать как гормезисные, однако сама возможность улучшить физиологические показатели организма вследствие одного воздействия говорит о высокой вероятности индуцирования гормезиса посредством ответа на вторжение патогена (Leroy et al, 2012, Papp et al, 2012, Ermolaeva et al, 2013). С другой стороны, гормезис часто связан с экспрессией генов, ассоциированных с иммунитетом, даже если источником стресса не является инфекция или заражение (Calabrese et al, 2012). Например, белки теплового шока взаимодействуют с компонентами врожденного иммунитета (Chen, Cao, 2010), а ген *Dif*, являющийся компонентом NF-kB-опосредованной иммунной системы, может быть связан с горметическим эффектом холодового шока (Le Bourg et al, 2012). Также показано, что экспрессия *Dif* играет регуляторную роль в отношениях между продолжительностью жизни и иммунитетом (Gosselin, Abbadie, 2003, Rea et al, 2005, Mattson, Meffert, 2006, Pursall, Rolff, 2011, Gartner, Akay, 2013). При этом в исследовании, в котором воздействие энтамопатогенных грибков выступало в качестве стрессора, было показано увеличение продолжительности жизни плодовых мух разных линий (McClure et al, 2014). Наиболее значительный результат был получен у особей с отсутствовавшими основными компонентами антимикробного иммунитета (Dif и Turandot M). Причем благоприятное воздействие было замечено и на продолжительность жизни, и на плодовитость, однако способность бороться с инфекциями значительно снизилась. Наблюдаемое снижение коэффициента риска на 18% по сравнению с контрольной группой, не подвергавшейся воздействию патогенов, сопоставимо с положительными эффектами других типов стресса на плодовых мушек: 5-10% при тепловом стрессе (Khazaeli et al, 1997), 15% при гипергравитации (Le Bourg et al, 2000, Le Bourg, Minois,

1997), 30% при воздействии спермидина (Eisenberg et al, 2009) и 9-13% при холодовом стрессе (Le Bourg, 2012, Le, 2007). Также положительное влияние патогенных бактерий, потребленных с пищей на стадии личинки, на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам и на продолжительность жизни показан на особях *Caenorhabditis elegans* (Leroy et al, 2012).

Интересно отметить, что один из возможных механизмов гормезиса малых доз радиации может быть патоген-опосредованным (Clanton et al, 2015). Известно, что бактерии, например, в отличие от клеток организмов эукариот способны реагировать на внешние стрессы, в том числе радиацию, значительно быстрее. Это приводит к тому, что в ответ на повышение уровня АФК в результате действия радиации бактерии могут в течение нескольких минут начать продукцию антиоксидантных ферментов, что способствует снижению неблагоприятных эффектов стресса на клетки хозяина рядом с патогенными клетками на фоне неизменного положительного эффекта в виде активации систем защиты хозяина (Clanton et al, 2015).

1.5. Общность механизмов стресс-ответа и гормезиса

Связь между воздействием одного типа стресса и проявлением стрессоустойчивости к другому типу стресса после такого воздействия подтверждена экспериментально для многих пар. Например, голодание приводит к повышению устойчивости плодовых мушек к сильному понижению температуры, причем на фоне различных генотипов (Le Bourg, Massou, 2015). Интересно, что такой эффект не связывают с изменениями в метаболизме, а скорее именно с активацией путей стресс-ответа (Le Bourg, Massou, 2015). Также показано, что воздействие холодового стресса приводит к повышению устойчивости к грибковой инфекции на протяжении всей оставшейся жизни у особей *Drosophila melanogaster* (Le Bourg et al, 2009).

Таким образом, несмотря на масштабные исследования механизмов стресс- ответа, влияние малых доз и связанные с ним гормезисные эффекты до сих пор изучены недостаточно. Хотя это является актуальной проблемой

как для фундаментального понимания механизмов стресс-ответа и их эволюционного развития и консерватизма, так и для практического применения терапевтических практик, основанных на воздействии умеренного стресса или искусственной активации соответствующих путей. Из полученных на сегодняшний день научных данных можно сделать два основных вывода: 1) устойчивость к одному типу стресса в большинстве случаев приводит к устойчивости к другим, совершенно отличным стрессовым факторам, и 2) среди путей стресс-ответа или механизмов горметического эффекта наблюдается немало общих точек для разных стрессов и разных биологических видов. Это позволяет предположить о существовании универсального механизма стресс-ответа и его основополагающей роли в увеличении продолжительности жизни. При этом существуют некоторые методологические проблемы исследования механизмов гормезиса. Во-первых, для разных организмов умеренным уровнем стресса являются разные значения дозы. Какие-то виды более устойчивы в холодовым или радиационным воздействиям, а какие-то более чувствительны к ним, но устойчивы к другим. Эти особенности усложняют интерпретацию данных, полученных на одних организмах для других видов. Так как дрозофила является наиболее изученным и удобным объектом в исследованиях по продолжительности жизни и стрессовых реакций, она представляется наиболее оптимальным объектом для изучения механизмов гормезиса. Во-вторых, изучение экспрессионных профилей предполагает быстрые изменения во времени, поэтому подбор оптимальной временной точки после воздействия является основополагающей задачей. Возможно, общие механизмы до сих пор не были найдены вследствие того, что разные гены в ответ на разные типы стресса включается в разное время. Это требует исследования экспрессионных изменений в разных временных точках после воздействия и выявления наиболее оптимальной для разных исследуемых стрессов.

1.6. Методы оценки уровня мРНК генов

За последние два десятка лет разработано множество методов и их

модификаций для анализа экспрессии генов на уровне мРНК и белков: ОТ-ПЦР, Нозерн-блот, кДНК-микрочипы, высокопроизводительное секвенирование, количественный вестерн-блот, анализ экспрессии GFP-репортеров и др. У каждого из этих методов есть как достоинства, так и недостатки, а также огрничения, связанные с различными аспекатми: эффективностью, точностью, надежностью, удельной стоимостью, трудоемкостью. Некоторые из этих методов позволяют с высокой точностью и специфичностью изучать активность и изменение экспрессии отдельных генов в биологических образцах (Нозерн-блот, ОТ-ПЦР, ПЦР-РВ, дифференциальный дисплей, SSH), в то время как другие направлены на глобальный одновременный анализ экспрессии сотен и тысяч генов (NGS, SAGE, EST, MPSS, гибридизационные кДНК-микрочипы). Эти подходы позволяют исследовать количество мРНК тысяч генов в тодном биологическом образце, открывать новые гены и регуляторные единицы, выявлять экспрессионные паттерны и генные сети, характеризовать разные болезни и даже более узкие состояния, определять функции генов, индентифицировать разные классы и эволюционные события. Однако до сих пор точность количественных методов глобального профилирования (например, NGS) вынуждает подтвержадть полученные такими методами результаты с помощью традиционных, например, ПЦР-РВ.

Одним из направлений, использующих данные об экспрессии генов и ее изменении в ответ на различные воздействия, является исследование молекулярных механизмов, регуляционных особенностей и генных сетей под действием исследуемых факторов. При этом можно сравнивать как количество определенной мРНК в экспериментальных и контрольных образцах, так и сравнивать между собой экспрессионные профили множества генов и выявлять не только конкретные дифференциально экспрессированные мРНК, но и функциональные семейства генов, изменившие посттранскрипционную представленность в образце. Такой подход позволяет изучать генные сети и механизмы их взаимодействия на разных уровнях и в разном масштабе, что необходимо для более полного понимания общей картины регуляции сложных многоэтапных процессов.

Основные методы количественной оценки мРНК разных генов в биологическом образце и их особенности рассмотрены далее в тексте.

Наиболее точным количественным методом содержания мРНК конкретного гена до сих пор считается **Нозерн-блот анализ (Northern blot analysis)**. При проведении такого анализа сначала производят денатурацию РНК в исследуемом образце. Затем с помощью гель-электрофореза молекулы РНК разделяются в геле в зависимости от их размера. В таком виде РНК переносится на специальную мембрану, где происходит гибридизация со специфическим ДНК- или РНК-зондом. Зонды обычно несут радиоактивную или флуоресцентную метку, которая позволяет идентифицировать определённую молекулу РНК среди всех остальных на мембране. Такой подход позволяет определить размер транскрипта, выявить наличие изоформ и оценить количество мРНК относительно всех других транскриптов в образце. Главным недостатком этого метода является низкая чувствительность, необходимость использовать сравнительное большое количество материала и невозможность определить абсолютное содержание мРНК в образце, что затрудняет сравнение между собой большого количества образцов в одном эксперименте (Sabelli, Shewry, 1995). Помимо этого метод характеризуется высокой стоимостью и трудоемкостью.

ОТ-ПЦР (RT-PCR) относят к полуколичественны методам. Он заключается в получении кДНК на основе РНК-транскриптов с помощью реакции обратной транскрипции. После этого проводится ПЦР со специфичными праймерами и детекция продуктов реакции в агарозном геле с помощью гель-электрофореза. Хотя этот метод позволяет работать сразу с несколькими транскриптами и характеризуется сравнительно низкой стоимостью, для более эффективного определения количества мРНК необходимо не только использовать образцы ДНК/РНК высокой степени очистки и точные методы измерения концентрации этих молекул, но и верно оценивать эффективность работы специфичных праймеров (Cale et al, 1998; Freeman et al, 1999).

Еще один метод, позволяющий с высокой точностью оценить экспрессию определенного гена, основан на использовании **GFP-репортеров**

(Green fluorescent protein reporters) (Soboleski et al, 2005). При этом с помощью молекулярно-генетических методов создают фьюжн таргетного гена и модифицированного гена белка GFP. Сам по себе этот белок является флуоресцентным и при синтезировании в составе другого белка также сохраняет это свойство, что позволяет наблюдать за экспрессией таргетного гена. Главным достоинством этого метода является возможность наблюдать паттерны экспрессии *in vivo* на живых организмах (Kain et al, 1995). К основным недостаткам относят высокую трудоемкостьи низкую производительность, однако они с лихвой покрываются его уникальными возможностями использования и высокой точностью (Soboleski et al, 2005).

Одним из специфических методов с похожими этапами является **дифференциальный дисплей мРНК (Differential-display).** Особенность этого метода заключается в том, что для ПЦР используются короткие (10-13 п.н.) праймеры, позволяющие амплифицировать от 25 до 100 мРНК в одном образце. При этом необязательно знать точную последовательность исследуемых транскриптов. Детекция в полиакриламидном геле дает возможность различить довольно близкие по длине фрагменты, вырезать нужную полосу и после очистки от геля провести секвенирование конкретного фрагмента. Однако определение количества по интенсивности свечения полос в геле не дает высокой точности определения содержания мРНК в образце и является существенным недостатком метода. Также он отиличается трудоемкостью и наличием ложноположительных сигналов (Liang, Pardee, 1992; McClelland et al, 1995). Результаты, полученные этим методом, требуют обязательного подтверждения другими более точными методами.

Анализ последовательностей EST (Expressed Sequence Tag) разаработан как метод для анализа огромного количества транскриптов в одном образце. Он основан на создании библиотек кДНК с матрицы РНК и дальнейшем секвенировании тысяч произвольных кДНК. Полученные результаты представляются в виде базы данных EST-маркеров, где отмечено содержание транскрипта определенного гена в образце. Несмотря на то, что метод направлен на анализ широкого спектра транскриптов, создание

полного экспрессионного профиля этим методом является невероятно дорогостоящим предприятием. К тому же у него есть значительный недостаток – уровень экспрессии малочисленных транскриптов часто определяется неверно (Adams и др., 1993; Lee et al, 1995).

Метод **MPSS (Massive Parallel Signature Sequencing)** заключается в подготовке библиотек коротких фрагментов кДНК (16-20 п.н.), которые собираются в массивы на специальных шариках. Эти библиотеки секвенируют, сигналы с отдельных шариков формируют данные о последовательности транскриптов. Такой подход позволяет анализировать сразу большое количество генов, при этом идентифицировать новые, ранее неизученные гены и оценить количество транскриптов этих генов в образце. Также этот метод характеризуется высокой чувствительной. Главный недостаток этого метода заключается в сложности анализа полученных результатов и их интерпретации (Brenner et al, 2000; Tyagi, 2000).

Прямой анализ дифференциально экспрессированных генов основан на методе **супрессивной вычитающей гибридизации** (**Suppression Substractive Hybridization, SSH**). Суть этого метода заключается в разделении двух образцов кДНК с последующим отделением гибридных молекул от фракции молекул- мишеней. Такой подход позволяет выровнять содержание высоко- и низкоэкспрессиованных молекул. Этот метод имеет существенные недостатки: трудоемкость и необходимость уточнения полученных результатов с помощью других методов, а также большое количество исходного материала для анализа (Diatchenko et al, 1996; Rebrikov et al, 2004).

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ, PCR-RT) до сих считается референсным методом измерения исходного количества нуклеиновых кислот в образце. Он основан проведении реакции ПЦР с измерением количества ПЦР-продукта после каждого цикла реакции. Кривая накопления флуоресценции позволяет не только оценить содержание матрицы в исходном образце, но и сравнивать между собой результаты по разным транскриптам и образцам. А возможность использовать специфические зонды для оценки уровня флуоресценции делает результаты высокоточными и

достоверными. Эти особенности, а также высокая производительность, возможность сохранять данные в электронном виде и работа с количественными показателями, относятся к достоинствам метода. Недостатком является некоторая необходимая предварительная работа – оптимизация условий ПЦР, выбор референсных генов, оценка эффективности реакции ПЦР для каждой пары праймеров, подтверждение воспроизводимости данных ПЦР-РВ (Diatchenko et al, 1996; Rebrikov et al, 2004). Однако эти подготовительные этапы необходимо выполнить лишь один раз для каждой пары праймеров, а потом можно получить точные достоверные дынные для любого количества образцов.

Одним из наиболее точных методов, позволяющих анализировать одновременно содержание множества транскриптов, является метод **кДНК-микрочипов (cDNA microarrays)**. В основе метода лежит гибридизация смеси одноцепочечных флюоресцентно меченных кДНК с иммобилизованными на твердой подложке ДНК-проб с известной нуклеотидной последовательностью. Которая комплементарна последовательностям определенных генов. Затем подложка отмывается и сканируется. Уровень экспрессии оценивается по интесивности флюоресценции зонда, связанного с кДНК. Набор исследуемых генов зависит от состава гибридизационных проб, находящихся на чипе. В зависимости от размера и плотности с помощью такого чипа можно анализировать экспрессию сотен и тысяч генов. Несмотря на то, что воспроизводимость данных метода кДНК-микрочипов подтверждена многими исследованиями, у него есть недостатки. Среди них: невозможность оценить количество транскриптов интересующего гена, необходимость подтверждения результатов другими методами, и, главное, неспецифическое связывание кДНК-зондов с транскриптами, что затрудняет анализ сырых данных и приводит к ошибкам (Hsiao et al, 2000; Kurella et al, 2001; Nagasawa et al, 2001; Lipshutz et al, 1999; Jain, 2000). Хотя ранее этот метод считался одним из лучших скрининговых методов, но недавние исследования показали, что высокопроизводительное секвенирование не уступает ему ни в точности, ни в эффективности (Alina et al, 2012).

Высокопроизводительное секвенирование (Next Generation Sequencing, NGS) на платформе Illumina (США) позволяет анализировать экспрессию огромного количества генов в одном образце одновременно. Он основан на получении кДНК на основе образца тотальной мРНК с помощью обратной транскрипции, последующем фрагментировании на участки длиной 100-150 п.н., прикреплении к этим фрагментам специальных индексов, позволяющих им прикрепляться к адаптерам в ячейке для секвенирования. На платформе Illumina каждый цикл секвенирования происходит с помощью нуклеотидов с заблокированным 3'-концом четырех типов, каждому из которых соответствует флуоресцентная метка. Такие нуклеотиды могут включаться только по одному за реакцию на каждой матрице. Таким образом, считывая после каждого цикла флуоресцентную картину проточной ячейки прибор определяет, какие нуклеотиды и в какой последовательности присоединились к синтезируемой цепи в каждой точке ячейки. После секвенирования полученные данные требуют дополнительной биоинформатической обработки. Этот подход позволяет не только анализировать тысячи генов за один раз, но и идентифицировать ранее неизученные последовательности, изоформы, альтернативные варианты, количественно оценивать их содержание, находить мутации. К основным недостаткам этого метода относят высокую стоимость, трудоемкость и необходимость специального подхода и математического аппарата для анализа данных, а также подтверждение полученных результатов другими методами (Liu et al, 2012; Blomquist et al, 2013).

Среди огромного разнообразия методов для оценки экспрессии генов, имеющих свои достоинства и недостатки, в каждом исследовании следует выбирать тот, что наилучшим образом соответствует поставленным задачам. Например, метод ПЦР-РВ можно использовать для анализа экспрессии генов с известной последовательностью, которые ранее были выявлены как предположительные гены-мишени для подтверждения их роли в изучаемых процессах. Метод высокопроизводительного секвенирования лучше всего подходит для анализа уровня экспрессии всех возможных генов в образце и выявления сетов дифференциально экспрессированных

транскриптов. Метод GFP- репортеров позволяет с высокой точностью определить экспрессию конкретного гена и выявить паттерны экспрессии в организме.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Линии *Drosophila melanogaster*

Для всех экспериментов в рамках данной работы были использованы в качестве объектов плодовые мушки *Drosophila melanogaster* лабораторной линии дикого типа *Canton-S*. Линия была получена из коллекции Центра в Блумингтоне Университета штата Индиана (Bloomington Drosophila Stock Center, Блумингтон, США).

2.2. Условия содержания

Контрольные и экспериментальные группы мух в течение всей жизни содержались в климатических камерах Binder KBF720-ICH (Binder, Германия) при температуре 25±0.5^{o}C, относительной влажности 60% и 12ти часовом световом режиме на стандартной агарно-дрожжевой питательной среде, содержащей 7 г агара, 30 г сахара, 8 г сухих дрожжей, 30 г манной крупы, 4 мл пропионовой кислоты на 1 литр воды. Самцы и самки содержались раздельно в количестве 30 особей одного пола и возраста в 20 мл пробирке с 5 мл питательной среды. Для получения особей, участвовавших в экспериментах, десять пар мух обоих полов помещали в пробирку с питательной средой оставляли на 24 часа. После появления взрослых особей в возрасте одного дня они были анестезированы с помощью диоксида углерода и разделены на пробирки, самцы и самки отдельно. Два раза в неделю мух пересаживали на свежую питательную среду.

2.3. Условия воздействия стресс-факторов

Для экспрессионного анализа брали мух на имагинальной стадии развития: в 5-ти дневном возрасте мух подвергали воздействию одного из исследуемых факторов. Для каждого экспериментального варианта использовали 3 биологические повторности.

2.3.1. Воздействие ионизирующей радиацией

В качестве источника гамма-радиации использовали ^{226}Ra с мощностью экспозиционной дозы облучения 36 мГр/час. Источник находится в металлическом корпусе, непроницаемом для альфа-частиц, поэтому спектр

ионизирующей радиации сводился к гамма-лучам. Время экспозиции составило 1ч 23 мин, 2 ч 47 мин, 5 ч 34 мин и 11 ч 8 мин с поглощенной дозой 5 сГр, 10 сГр, 20 сГр и 40 сГр, соответственно. Особи из контрольной группы подвергались точно таким же операциям за исключением самого радиационного облучения. Мухи из всех групп фиксировались в жидком азоте спустя определённое время после воздействия: сразу после облучения, 6, 24, 48 и 72 часа, и сохранялись в морозильнике при - 86°C.

Для анализа экспрессии и продолжительности жизни использовали один пул образцов, из которых в нужный момент времени (0, 6, 24, 48, 72 часа после облучения) отбирали мух для экспрессионного анализа.

Для транскриптомного анализа самцы в возрасте 5 дней подвергались воздействию гамма-радиации, в качестве источника которой выступал ^{137}Cs на оборудовании «Исследователь» (Россия) с мощностью дозы облучения 0,72 Гр/мин. Время экспозиции составило 3 часа 20 минут, 8 часов 20 минут и 20 часов, а поглощенная доза составила, соответственно, 144, 360, и 864 Гр. Для оценки этого параметра использовали термолюминесцентные дозиметры DTU-1 с детекторами DTG-4 («Доза», Россия). Такая же процедура, но без подвергания воздействию радиации, была проведена для контрольной группы.

По данным литературы особи *Drosophila melanogaster* обладают высокой устойчивостью к воздействию ионизирующей радиации. Летальность 50% в течении двух дней после воздействия (LD50/2) у мужских особей линии дикого типа Canton-S однодневного возраста наблюдали в случае дозы в 1238 Гр (Parashar et al, 2008). На основании этих данных в качестве малой дозы радиации мы использовали дозу в 144 Гр, которая примерно в 10 раз меньше LD50/2, в качестве высокой дозы – близкую к LD50/2, но не детальную (864 Гр), и промежуточное значение (360 Гр).

2.3.2. Грибковое заражение

Энтомопатогенный грибок *Beauvaria bassiana* был получен от Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов (линия F-145, «Генетика»,

Россия). Для процедуры инфицирования использовали протокол, описанный в классической статье Леметра и коллег (Lemaître et al, 1997). Самцы в возрасте 5 дней помещались в чашку Петри, содержащую спороносную культуру *Beauvaria bassiana,* с последующим встряхиванием в течение 60 секунд. Грибки культивировались в питательной среде на основе агара. Для инфекции слабой интенсивности использовали трехдневную культуру, а 12-ти дневную культуру на активной стадии деления использовали для высокоинтенсивного инфицирования. Это соответствовало 10 и 100 колониеобразующим единицам на особь (КОЕ), соответственно. Точно такая же процедура, но в отсутствие грибков, была проведена для контрольной группы. Основываясь на данных о выживаемости мух, мы определили 10 КОЕ как малую дозу стресса данного типа и 100 КОЕ – как высокую.

2.3.3. Холодовой шок

Самцы в возрасте 5 дней подвергались воздействию температуры -4°C, 0°C и +4°C в термостате в течение 120 минут. После этого мухи содержались в стандартных условиях. Подобная же процедура, но при температуре 25°C в термостате, была проведена для мух из контрольной группы. Значения температуры для холодового стресса были выбраны по результатам анализа опубликованных данных (Boher et al, 2012, Colinet et al, 2013): +4°C в качестве небольшой дозы стресса и -4°C как высокую дозу.

2.3.4. Голодание

Самцы в возрасте 5 дней голодали в течение 16 часов в контейнерах с 3% средой на основе агара. Аналогичная процедура, но со стандартной питательной средой была проведена для контрольной группы. После голодания мухи содержались в стандартных условиях. Длительность голодания в 16 часов была выбрана, так как, с одной стороны, не вызывала значительного снижения в количестве мух экспериментальной группы, но, с другой стороны, влияла на продолжительность жизни и локомоторную активность особей.

2.4. Анализ продолжительности жизни

Для анализа изменения продолжительности жизни использовали 150-170 особей для каждого варианта воздействия стресс-фактора. Мух переносили в новую среду каждые 2 недели. Учет умерших особей производили каждые 24 часа. Для каждого варианта экспериментальных условий 3 биологических повторности объединяли после отбора последнего образца для экспрессионного анализа. В эксперименте по анализу экспрессии 29 генов в ответ на сверхмалые дозы ионизирующего излучения в качестве контроля использовали 2 группы мух (отдельно самцы и самки): одна была контрольной для групп с поглощенной дозой 5 и 10 сГр, другая – для 20 и 40 сГр. Это было необходимо из-за большой разницы во времени экспозиции между этими группами, что влияет на длительность аналогичной процедуры с контрольной группой за исключением радиации.

Полученные данные представляли в виде кривых дожития и рассчитывали коэффициенты функции дожития (Kaplan, Meier, 1958). Были рассчитаны медианная и максимальная (возраст, при котором умерли 90% особей исследуемой группы) продолжительности жизни. Анализ выживаемости проводился в двух биологических повторностях для ионизирующей радиации, голодания и холодового стресса, и в трех – для заражения грибками. Суммарно 200-350 особей было проанализировано для каждого из исследованных типа стресса.

Для статистического анализа данных использовали непараметрические методы (David et al, 1986; Wang et al, 2004): модифицированный критерий Колмогорова-Смирнова для сравнения параметров функций дожития (Wang et al, 2004); критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона (Breslow A, 1970) и критерий Мантеля-Кокса (Mantel, 1996; Cox, Oakes, 1984) для оценки статистической значимости различий медианной продолжительности жизни; критерий Ванг-Алисона для оценки статистической значимости различий максимальной продолжительности жизни (Wang et al, 2004).

Функция Гомпертца часто используется для описания изменений в продолжительности жизни *Drosophila* (Gavrilov, Gavrilova, 1991), поэтому в

данном исследовании была проведена аппроксимация всех кривых дожития в соответствии с уравнением Гомпертца (1) (Kirkwood, 2015):

$\mu(x) = \exp(\alpha x)\ R0$ (1)

Параметры α и R0 уравнения Гомпертца характеризуют точность аппроксимации и были рассчитаны в соответствии с уравнением (2):

$\ln(R0) = \gamma - \beta\alpha$ (2)

где α и R0 – параметры уравнения Гомпертца, γ и β – параметры регрессии (Strehler, Mildvan, 1960). Метод максимального правдоподобия использовали для оценки значимости различий в интенсивности смертности.

Анализ интенсивности смертности, равную числу особей, умерших в интервале времени [x, x+Δx], деленному на число живых в возрасте x особей и на величину интервала, в соответствии с уравнением (3):

$\hat{\mu}(x) = \frac{l(x) - l(x+\Delta x)}{l(x)\Delta x}$ (3)

Полученные данные представляли в виде логарифма интенсивности, проводили аппроксимацию, позволяющую вывести уравнение прямой и коэффициент аппроксимации R^2, позволяющий оценить качество аппроксимации.

Кривые Каплана-Мейера были построены с помощью программы STATISTICA, версия 6.1 (StatSoft Inc, США). Расчет параметров продолжительности жизни и статистический анализ их значений был проведен с использованием программной среды R (R Core Team). Параметры интенсивности смертности рассчитывали с помощью WinModest Version 1.0.2.

2.5. Оценка возрастной динамики локомоторной активности особей *Drosophila melanogaster* после воздействия анализируемых стресс-факторов

Значение локомоторной активности измеряли с помощью программно-аппаратного комплекса Locomotor Activity Monitor (TriKinetics Inc., США). Спонтанная локомоторная активность определяется как среднее число пересечений оси зоны сенсора за 3 минуты на 30 особей. Локомоторная активность оценивали на следующий день, после воздействия стресса, и

затем каждые 5 дней. Измерения продолжали до тех пор, пока 30 и более особей оставались в живых в каждой анализируемой группе.

2.6. Экспрессионный анализ

Анализ изменения профилей экспрессии в ответ на воздействие радиационного облучения и других анализируемых стресс факторов проводили двумя различными методами. Для анализа экспрессии определенных генов использовали метод количественной ОТ-ПЦР, для которого сначала выделяли из образцов тотальную РНК, затем проводили реакцию обратной транскрипции для наработки кДНК с матрицы РНК, а потом анализировали количество соответствующих исследуемым генам фрагментов кДНК с помощью количественной ПЦР в образцах для контрольной и экспериментальной групп. Для анализа изменения полного транскриптома выделяли тотальную РНК из образцов, на ее основе проводили подготовку библиотек для высокопроизводительного секвенирования и секвенировали. Полученные данные анализировали различными биоинформатическими методами.

2.6.1. Выделение и проверка качества РНК

При изучении экспрессии 29 генов в ответ на воздействие малых доз ионизирующей радиации тотальная РНК была выделена из гомогенизированных образцов (5 мух для каждой точки) с помощью QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Нидерланды) и последующей изопропаноловой преципитации. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., США). Значение параметра, отражающего степень деградированности РНК, так называемого индекса целостности РНК (RNA Integrity Number, RIN) измеряли с помощью Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, США). Только образцы со значением RIN не менее 8 использовались для экспрессионного анализа. Одноцепочечная кДНК была синтезирована с использованием 1 мкг тотальной РНК, ДНКазы I (Fermentas, Литва), гексонуклеотидных праймеров, обратной транскриптазы M-MuLV (Fermentas, Литва) по схеме: 10 мин при 25°C, 60 мин при 42°C, 10 мин при 50°C, и 10 мин при 70°C.

Тотальная РНК для анализа транскриптома с помощью

высокопроизводительного секвенирования была выделена из 10 особей для каждого образца с помощью набора реагентов miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Определение количества РНК производили на приборе Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, США). Оценку качества выделенной тотальной РНК проводили с помощью прибора Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) и чипов Agilent RNA 6000 Nano chip (Agilent Technologies, США). Значение параметра RIN, было равно или больше 8 для каждого образца, что свидетельствует о высоком качестве РНК. Для каждого образца было сделано две биологические повторности.

2.6.2. Количественная ПЦР

Метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на приборе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США), используя модифицированные короткие 6-FAM-меченные пробы из Universal Probe Library (UPL, Roche, Швейцария). Пары праймеров для каждой мРНК подбирали, учитывая возможность образования димеров и гетеродиморов, которую оценивали с помощью OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies). Последовательности праймеров приведены в таблице 1. Для каждой реакции делали 3 технические повторности. Реакционная смесь для каждой реакции в объеме 10 мкл содержала ПЦР-буфер, dNTP в концентрации 250 нМ, праймеры 300 нМ, UPL, ROX, ДНК-полимеразу и кДНК, разведенную в 17,5 раз. Пороговый цикл Ct рассчитывали с помощью программного обеспечения 7500 Software v2.0.5 (Applied Biosystems, США). Эффективность амплификации была рассчитана с помощью вычисления угла наклона стандартной кривой в соответствии с протоколом производителя (Applied Biosystems, США). Специфичность пар праймеров оценивали с помощью капиллярного электрофореза с использованием Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, США), длина продуктов амплификации соответствовала рассчитанной при подборе праймеров.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованные для анализа уровня экспрессии генов метод ПЦР-РВ

	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'
Cyp6a20	gtcctgcctgcactttcct	atcgaagaccgatgcagttt
hippo (hpo)	agatccatcgcgacatcaa	gaaatcggccaacttagcat
Sod	cgatctgggcaacattgag	ttggagtcggtgatgttgac
CG13323	gcgtcgcaataacaacga	ttgatcggattgcggact
GstE3	tcgacaggaagggctatcac	gcctgtggaatctccgtct
CG18180	ctacgtggagatccactacgg	acggacggtctgcctgta
Hus1-like	ctcggaagagctttatctgtgc	aagcttcagtttgcagctgtt
period	ggaatagcgacgacatggat	tggtcttgatgaaggacgagt
Brca2	cccgagttttgtggctttc	catcttctcagaaatcggaattg
FOXO	actttcccgtgggcaatc	cgccgtagctcatctcct
spn-B	ccgtggtctgtgtgaatcag	cccaagcagggaatctcat
P53	gatgcagttcagccagca	ccaccgatgttgtgattctct
mei-9	aaaaccggattcgtgaagg	gtgagtagccaatggtgaagg
Rad54	agtgctgaggaggaagcaac	atgatcgtttgcggcttt
Keap1	atccggagaacaatgagtgg	catcgaagccaccaacaac
mei-41	cgcactgcttgaatgcac	actgccatgaactcctcctg
CG42751	tgaatcgaacatcagcttaaatg	ggccacattcaggagtcg
JNK protein kinase (DJNK)	atgctgaggaagtggatgct	tgtgtgcttcgtagtccatga
CG6295	actttgccgcaatgatgaa	cgaacctccacggcatta
tefu	cgcctttgtctcgaaagtgt	gcggccagtttatcgaatc
CG6675	ttgcatccgagacaatgg	ccatctggatggactgtcg
Fer3	ccggatgttccattccag	gagcgctgccacagagac
mus309	gattttccacaggcctatttgt	gcgtgccctccattagttta
Clk (Clock) variant A	cgatagccttcctgaaaaatca	gcatgaggtgagtgtattcgtc
mus209	catcatgttcgaatcggcta	cctggtcgaggttcatcagt
CG9360	taaatcgcgttgctgttgcc	cttggacaccaaatccttgc
wrinkled	tctacgagtgggtcaggatgt	gcggatactggaagatttgc
Cyp4e2	cggcaagaataagtcaga	acgaagttgtcttttccatactga
Hsp70Aa	atcgccagcgaataacctc	cctgcttcacattgaagacgta

2.6.3. Статистический анализ данных ПЦР-РВ

При анализе данных ПЦР-РВ в первую очередь проводилась оценка стабильности референсных генов четырьмя методами ΔCT (Silver et al, 2006), BestKeeper (Pfaffl et al, 2004), Normfinder (Andersen et al, 2004), Genorm (Vandesompele et al, 2002). При этом анализировалась стабильность всех генов относительно друг друга. После применения четырех различных методов оценки составляли усредненный общий рейтинг, который отражал стабильность референсных генов относительно исследуемых в данном эксперименте. Для нормализации экспрессий использовали в качестве референсных только гены, показавшие высокую стабильность. Экспрессия четырех референсных генов была проанализирована *Actin*, *RpL32*, *EF1alpha*, *betaTub* (Ponton et al, 2011). Гены *Actin* и *betaTub* оказались очень вариабельными в условиях данного эксперимента, поэтому только гены *RpL32*, *EF1alpha* использовали в качестве референсных для нормализации экспрессии исследуемых генов.

Значение Ct, полученное для каждого гена в каждом образце нормализовали относительно значения Ct референсных генов для вычисления относительной экспрессии по формуле (4):

$$R_{ij} = \frac{E_i^{-C_{t_{ij}}}}{\sqrt[n]{E_{r1j}^{-C_{t_{r1j}}} * \ldots * E_{rnj}^{-C_{t_{rnj}}}}} \quad (4)$$

где Rij – относительная экспрессия i-того гена в j-ом образце, Ei, Er1j, Ernj – эффективность гена и референсных генов, соответственно, Ctij, Ctr1j, Ctrnj – значение Ct гена и референсных генов в образце, соответственно. Значение эффективности амплификации для всех генов было больше 90%. Изменение экспрессии относительно контроля рассчитывали, как log2FC (Fold Change) при FC=Riexp/Ricontrol для каждой биологической повторности отдельно, находили среднее значение log2FC для всех повторностей, вычисляли стандартное отклонение. Для оценки достоверности полученных значений вычисляли значение T-статистики и p-value с помощью программной среды R, версия 2.15.1. К значимым изменениям экспрессии относили те, для которых значение p-value не превышало 0.05 и значение FC по модулю было больше 2

из-за наличия вариабельности среди уровня мРНК референсных генов.

2.6.4. Секвенирование транскриптома

Подготовка образцов тотальной РНК для секвенирования

Для подготовки библиотек мРНК использовался набор реагентов Illumina TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit (Low-Throughput protocol) (Illumina, США) в соответствии с инструкцией и рекомендациями производителя. На первой стадии 2,5-3 мкг тотальной РНК образца использовали для выделения поли-А содержащих молекул мРНК с помощью магнитных частиц, несущих поли-Т олигомеры, в два раунда очистки. Во время второй элюции поли-А РНК также была фрагментирована и праймирована для синтеза кДНК в соответствии с протоколом производителя. Синтез кДНК с матрицы фрагментированных молекул РНК и последующая конверсия кДНК в двухцепочечные молекулы кДНК проводили набор реагентов SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis kit (Invitrogen, США). Затем с помощью частиц Ampure XP beads выделяли двухцепочечную кДНК из реакционной смеси. Далее эти молекулы ДНК использовали для приготовления библиотек с помощью реагентов Illumina TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit (Low-Throughput protocol) (Illumina, США).

Подготовка библиотек кДНК

Библиотеки кДНК создавали с помощью TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit (Illumina, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для каждого образца 2,5 мкг высококачественной РНК использовали в процедурах очистки и фрагментирования мРНК. Праймированные фрагменты мРНК далее использовали для синтеза первой и второй нитей кДНК. Полученную таким образом двухцепочечную кДНК дополнительно подвергали специальной подготовке концов молекул. Сначала проводили процедуру конверсии всех концов молекул к тупым в соответствии с инструкцией производителя. Единичный аденин-нуклеотид добавляется к 3’-концу фрагмента с помощью реакции аденилирования для предотвращения лигирования фрагментов друг с другом в процессе присоединения адаптеров. Затем адапетры с разными индексами, содержащие

тимин-нуклеотид на 3’-конце, были лигированы на концы аденилированных фрагментов ДНК, что необходимо для гибридизации библиотеки кДНК в проточных ячейках. Были использованы специальные контроли для отслеживания стадий конвертирования кДНК в библиотеки. Селективное обогащение фрагментами кДНК, лигированных адаптерами с обоих концов, проводили с помощью Illumina PCR Primer Cocktail в 11 циклах ПЦР в соответствии с инструкцией производителя. Библиотеки отчищали с помощью AMPure XP system (Beckman Coulter, США) после каждой стадии реакции.

Валидация библиотек

Оценку качества полученных библиотек проводили с помощью количественной ПЦР в соответствии с подробной инструкцией, описанной в (Moskalev et al, 2014). Далее использовали Agilent 2100 Bioanalyzer вместе с High Sensitivity DNA chip (Agilent Technologies, США) для проведения капиллярного электрофореза, который показал, что длина фрагментов библиотек примерно равна 260 оснований.

Процедура высокопроизводительного секвенирования (NGS)

Полученные индексированные кДНК библиотеки были нормализованы до концентрации 2 нМ и пулированы в равных объемах. Кластеризацию объединенных библиотек кДНК проводили с помощью cBot Cluster Generation System (Illumina, США) в соответствии с инструкцией производителя. После процедуры кластеризации библиотека кДНК была секвенирована с помощью HiSeq™2000 platform (Illumina, США), в результате чего были сгенерированы 50-ти нуклеотидные одиночные риды. Сырые данные о ридах были получены с помощью Illumina HiSeq Analysis Software и сохранены в формате FASTQ.

Обработка данных секвенирования

В первую очередь был произведен тримминг (удаление последовательностей адаптеров и фрагментов с высокой вероятностью ошибочно идентифицированного нуклеотида) ридов и затем картирование оставшихся ридов на транскриптом *Drosophila melanogaster* сборки BDGP6.27 с помощью Tophat2. Количество ридов на ген был рассчитано с помощью

HTSeq-count tool, а на транскрипт – с помощью coverageBed (Anders et al, 2015). Идентификация дифференциально экспрессированных генов в результате сравнения экспериментальных и контрольных образцов для каждого воздействия произведена в программной среде R с использованием пакета DSS (Wu et al, 2013). Значение параметра, отражающего вероятность ошибки первого типа, FDR (False discovery rate) рассчитывали на основе значения p-value с использованием поправки Бенджамина-Хохберга для множественного сравнения. Изменения в экспрессии, при которых FDR<0.05, считали статистически значимыми. Анализ пересечения списков дифференциально экспрессированных генов для разных экспериментальных условий проводили с помощью пакета VennDiagram в программной среде R (Chen, Boutros, 2011). Дозо-зависимые изменения экспрессии оценивали, используя подход, основанный на генерализованной линейной модели (generalized linear model, GLM) и реализованный в пакете edgeR для R (Robinson et al, 2010). Нормализацию количества ридов проводили с помощью метода TMM (trimmed mean of M-values) (Robinson, Oshlack, 2010).

Групповой анализ дифференциальной экспрессии (Gene set enrichment analysis, GSEA) был произведен с использованием PANTHER и GeneMania (Mi et al, 2013, Zuberi et al, 2013), анализ сетей взаимодействия проводили с помощью ресурсов STRING и GeneMania (Szklarczyk et al, 2015, Zuberi et al, 2013). Для определения наборов генов для GSEA были использованы специализированные онтологии KEGG pathway и GeneOntology Biological Processes. Сверх-экспрессированные и низко-экспрессированные гены анализировались отдельно. На первом этапе дифференциально экспрессированные гены аннотировались, то есть их относили к определенному пути с помощью KEGG GENES. Далее полученные данные использовали для анализа обогащения путей, описанных в базе KEGG. В этом анализе гены из всего генома использовались в качестве фонового распределения. Для статистического анализа был использован точны тест Фишера и коррекция FDR по методу Бенджамина-Хохберга. Изменения со значением FDR<0.05 считались статистически значимыми.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Анализ воздействия малых доз ионизирующей радиации на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*

После воздействия малых доз ионизирующей радиации у мужских особей *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Canton-S* проявился эффект гормезиса: при разных дозах наблюдали изменение в MRDT от 11,4 до 22,5 %, а также изменение в 3,4 % медианной продолжительности жизни при дозе радиации в 10 сГр (Таблица 1). Действие малых доз радиации на особи женского пола оказалось неоднозначным. В ответ на максимальную (40 сГр) и минимальную (5 сГр) дозы радиации медианная продолжительность жизни увеличилась на 4,5 и 7,6%, соответственно. Однако этот показатель снижается на 4,5 % в случае воздействия в радиации в дозах 10 и 20 сГр, так же как и максимальная продолжительность жизни при этих дозах снизилась на 3,8 и 10,1 %, соответственно. В случае же самой высокой из исследованных доз 40 сГр наблюдалось увеличение максимальной продолжительности жизни на 6,3 %. Таким образом, можно заключить, что гормезис у самок плодовых мушек проявляет при облучении радиацией в дозах 5 и 40 сГр (Таблица 2, Рисунок 2).

Рисунок 3 демонстрирует наличие корреляции Штрелера-Милдвана между параметрами уравнения Гомпертца α и R0 для особей мужского и женского пола после воздействия радиации в различных дозах. Каждая точка такой параметрической поверхности соответствует определенной кривой выживания (три повторности для каждой экспериментальной точки каждой дозы для самцов и самок отдельно). Значения коэффициентов корреляции равны -0,98 ($p < 0.0001$) и -0.93 ($p < 0.0001$) для самцов и самок, соответственно. Как известно, связь между параметрами функции Гомпертца эквивалентна наличию точки пересечения кривых выживаемости. Более того, абсцисса этой точки равна параметру регрессии β корреляционного уравнения Штрелера-Милдвана, таким образом, смысл «ожидаемой продолжительности жизни популяции» можно отнести к значению этого параметра (Hirsch, 1995).

Таблица 2 – Изменение продолжительности жизни особей *Drosophila melanogaster* после облучения ионизирующей радиацией в малых дозах.

Доза	Пол	МПЖ	ΔМПЖ	90%	Δ90%	α	Δα	MRDT	Δ MRDT	n
Контроль	♂	57	-	70	-	0.08941	-	7.75	-	714
5 сГр		53	-7 % *	69	-1 %	0.06853 ##	-23 % ##	10.11	30.5 %	270
10 сГр		57.5	0.8 % **	76	9 % ##	0.08401	-6 %	8.25	6.5 %	272
20 сГр		50	-12 % ##	67	-4 %	0.07225	-19 %	9.59	23.7 %	534
40 сГр		48	-16 % ##	72	3 %	0.05087 ##	-43 % ##	13.63	75.9 %	128
Контроль	♀	63	-	73	-	0.09583	-	7.23	-	707
5 сГр		66.5	6 % ##	77.5	7 % **	0.08777	-8 %	7.9	9.3 %	230
10 сГр		61	-3 %	76	4 %	0.0848	-11 %	8.17	13 %	218
20 сГр		63	0	71	-3 %	0.09878	3 %	7.02	-2.9 %	457
40 сГр		65	3 % ##	79	8 % ##	0.08625	-10 %	8.04	11.2 %	142

МПЖ – медианная продолжительность жизни, 90% – возраст смертности 90% выборки (максимальная продолжительность жизни), MRDT – время удвоения интенсивности смертности, ΔМПЖ, Δ90% и ΔMRDT – различия с контролем для МПЖ, 90% и MRDT, соответственно, n – количество особей в выборке.

* - p<0.05, ** - p<0.01, *** - p<0,005, # - p<0,001, ## - p<0.0001 (критерий Ванг- Аллисона для показателя возраста смертности 90% выборки, критерий Гехана- Бреслоу-Вилкоксона для показателя медианной продолжительности жизни, метод максимального правдоподобия).

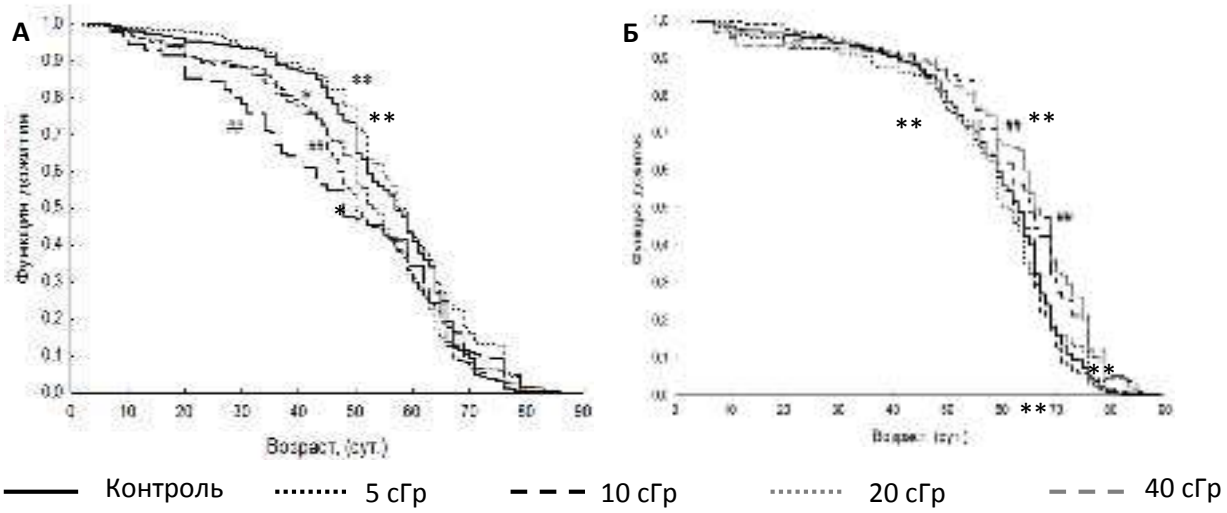
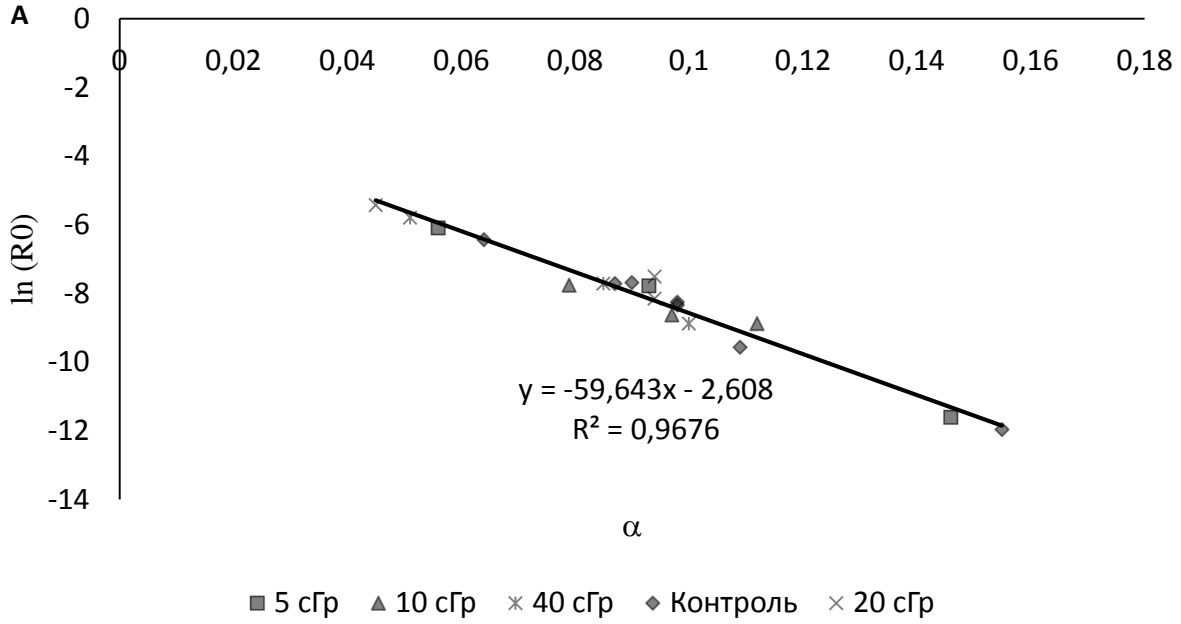


Рисунок 2 – Влияние малых доз γ-радиации на продолжительность жизни мужских (А) и женских (Б) особей *Drosophila melanogaster.*

Параметры уравнения Гомпертца оказались аппроксимированы линией регрессии, что ожидаемо для нормальных физиологических условий (Strehler, 1959). В дополнение к этому, α и R0 во всех группах не отличались значительно от линии регрессии, из чего можно сделать вывод о том, что ожидаемая продолжительность жизни популяции не отличается у мух из экспериментальной и контрольной групп.

Изменения в продолжительности жизни связаны со сложными взаимодействиями генетических и физиологических факторов (Garinis et al, 2008, Kirkwood, 2005). Известно, что воздействие ионизирующей радиации в малых дозах может отклоняться как в сторону увеличения негативных эффектов (гиперрадиочувствительность) (Enns et al, 2004), так и в сторону снижения вредных последствий (Moskalev et al, 2007). Обращаясь к вопросу возможных механизмов радиационно-индуцированных изменений, необходимо отметить, широкий спектр их проявлений в случае малых доз, которые производят эффект на развитие организма, приводят к нарушению иммуного ответа, изменениям в метаболизме протеинов, аминокислот, липидов, жирных кислот, гормонов, вносят изменения в энергетический метаболизм, индуцируют тканевые факторы некроза, являются причиной нарушения клеточного цикла, пролиферации и дифференцировки клеток, вызывают повреждения ДНК, апоптоз, протеолитическую деградацию,

аутофагию и окислительный стресс (Seong et al, 2011, Fachin et al, 2007, Rudqvist et al, 2012, Saini et al, 2012, Wyrobek et al, 2011).



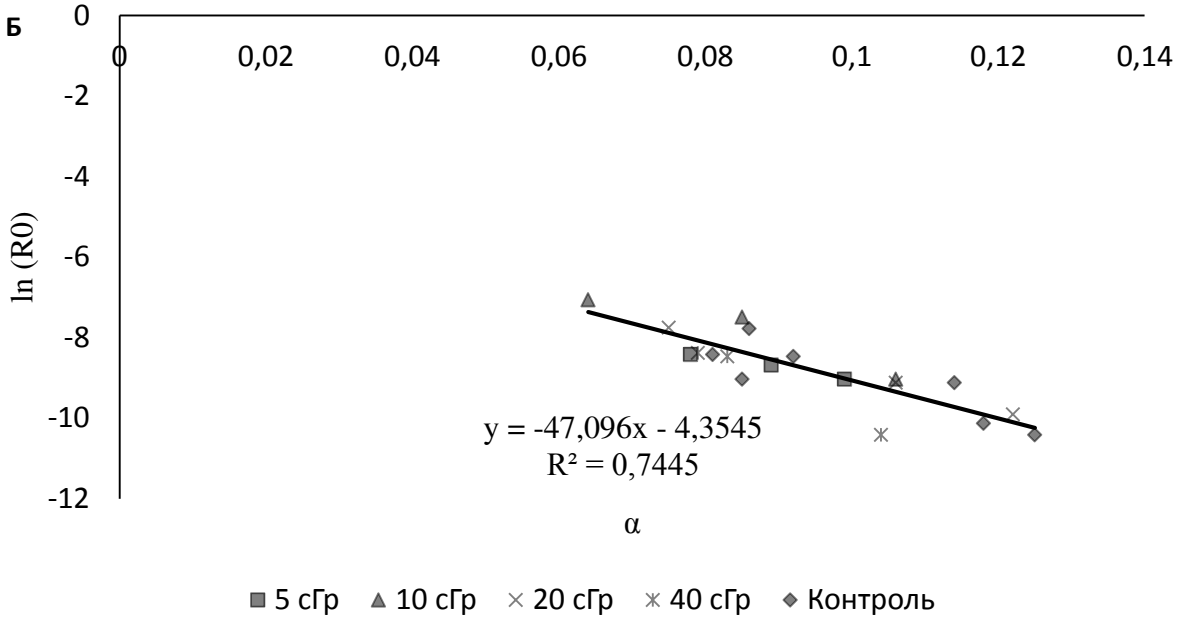


Рисунок 3 – Корреляция Стрелера-Милдвана параметров функции уравнения Гомперца у самцов (А) и самок (Б) Drosophila melanogaster линии дикого типа Canton-S после воздействия малых доз ионизирующей радиации.

По этой причине было проведено исследование изменения экспрессии 29 генов, вовлеченных в клеточный стресс-ответ, репарацию ДНК, апоптоз,

антиоксидантную защиту, детоксификацию ксенобиотиков с течением времени после воздействия и в зависимости от дозы.

3.2. Анализ экспрессии 29 генов в ответ на воздействие малых доз ионизирующей радиации

Динамика изменения экспрессии генов, чувствительных к стрессу (Таблица 3), в ответ на облучение радиацией в дозах 5-40 сГр была исследована на особях *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Canton-S*.

Таблица 3 – Гены, выбранные для анализа экспрессии в образцах особей *Drosophila melanogaster*, подвергнутых воздействию радиации в малых дозах

Название Гена	**Название белка**	**Основные процессы, отражающие функции гена**	**Источник**
Hus1-like	Hus1-like protein	ответ на чекпоинт, индуцированный повреждениями ДНК; активация S-фазы после чекпоинта, организация ДНК в ооците	Song, 2005
foxo	Forkhead box protein O	сигналинг инсулина, устойчивость к окислительному стрессу	Jünger et al, 2003
spn-B	Spindle B	путь репарации ДНК RAD52, репарация двуцепочечных разрывов ДНК, активация чекпоинта мейоза	Ghabrial et al, 1998
p53	Transcription factor p53	аррест роста на стадии G1, индукция апоптоза, радиационно-индуцированный апоптоз	Brodsky et al, 2000
mei-41	Serine/threonine-protein	контроль клеточного цикла, пост-репликационная	LaRocque et al, 2007

	kinase ATR	репарация	
DJNK	Stress-activated protein kinase JNK	Иммунный ответ, активированный бактериальной инфекции; заживление ран; морфогенетические движения при эмбриогенезе	Sluss et al, 1996, Zeitlinger, Bohmann, 1999, Rämet et al, 2002
tefu	Serine/threonine-protein kinase ATM	супрессия спонтанного апоптоза, женская фертильность, защита от соединения теломерных концов, активация сигналинга чекпоинта в ответ на двуцепочечные разрывы ДНК, вызванные действием ионизирующей радиации	Bi, 2004,Song et al, 2004, Bi et al, 2005
Clk	Circadian locomoter output cycles protein kaput	основной транскрипционный регулятор циркадных часов	Abruzzi et al, 2011
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	контроль репликации ДНК у эукариот за счет увеличения эффективности работы полимеразы	Ng et al, 1990
hpo	Serine/threonine-protein kinase hippo	сигнальный путь Hippo/SWH (Sav/Wts/Hpo), контроль размеров органов, супрессия опухолей, ингибирование активности транскрипционного комплекса, регуляция	Harvey et al, 2003

		ингибитора апоптоза Th/DIAP1	
Sod	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	детоксификация радикалов	Seto et al, 1987
Brca2	Breast cancer type 2 susceptibility protein homolog	репарация двуцепочечных разрывов ДНК за счет митотической и мейотической гомологичной рекомбинации	Brough et al, 2008
mei-9	DNA repair endonuclease XPF	рекомбинация при мейозе, репарация неспаренных оснований в мейотических гетеродуплексах ДНК, эксцизионная репарация	Joyce et al, 2009
RAD54	DNA repair and recombination protein RAD54-like	репарация ДНК при мейозе, рекомбинация при мейозе, репарация ДНК с помощью рекомбинации	Kooistra et al, 1997
mus 309	Bloom syndrome protein homolog	ДНК репликация, ДНК репарация	Kusano et al, 1999
wrinkled	Cell death protein W	активация апоптоза	Grether et al, 1995
Cyp6a20	Probable cytochrome P450 6a20	монооксигеназа, оксидоредуктаза, принимает участие в регуляции агрессивного поведения,	Colo Med, 1990

		защитный ответ на грамм-положительные бактериии	
CG13323	IP04046p	функция неизвестна	Pundir et al, 2016
GstE3	Glutathione S transferase E3	активность глутатион трансферазы, ответ на окислительный стресс, устойчивость к инсектицидам	Saisawang et al, 2012
CG18180	CG18180	эндопептидазная активность серинового типа, протеолиз с предполагаемым участием в иммунной функции	Yang, Hekimi, 2010
Keap1	Keap1, isoform B	связывание актина, защита от окислительного стресса	Sykiotis, Bohmann, 2008
CG42751	CG42751	функция неизвестна	Pundir et al, 2016
CG6295	RE23868p	Гидролаза, метаболизм липидов	Karpac et al, 2013
CG6675	CG6675	Гидролаза, метаболизм липидов	Pundir et al, 2016
Fer3	Protein Fer3	Ингибирование транскрипции за счет активации ASCL1/MASH1	Segev et al, 2001
CG9360	RH17287p	Оксидоредуктазная активность	Pundir et al, 2016
Cyp4e2	Cytochrome P450 4e2	метаболизм гормонов насекомого	Pittendrigh et al, 1996
Hsp70Aa	Major heat shock 70 kDa protein Aa	узнавание гидрофобных остатков аминокислот, трансмембранный транспорт белков, защита клеток от	Mukhopadhyay et al, 2006, Gupta et al, 2010, Bienz,

		термического и/или окислительного стресса, ингибирование апоптоза, удаление поврежденных или дефектных белков	Pelham, 1986
per	Period circadian protein	продолжительность разных периодов циркадного ритма, поведение при вылуплении, песня для ухаживаний самцов	Bae et al, 1998

Гены *G13323, GstE3, CG18180, Keap1, CG42751, CG6295, CG6675, Fer3, CG9360, Cyp4e2, Hsp70Aa, Cyp6a20, per* были включены в анализ, так как ранее в нашей лаборатории была показана дифференциальная экспрессия этих генов в ответ на разные типы стресса, включая радиационное облучение (Moskalev et al, 2014). Другие гены, среди которых *Hus1-like, foxo, spn-B, p53, mei- 41, tefu, PCNA, hpo, DJNK, Sod, Brca2, mei-9, RAD54, mus309*, непосредственно важны для стресс-ответа, поэтому сравнение изменения их экспрессии с другими позволит оценить степень участия новых генов в процессах ответа на стресс. Так как было показано, что регуляция циркадного ритма (Gotoh et al, 2015) и апоптоза (Payne et al, 1992) изменяется в ответ на генотоксический стресс, гены *Clk* и *wrinkled* также были включены в анализ.

Данные о высоко и низко экспрессированных генах и значениях p-value, полученные для каждого гена каждого образца, представлены в Таблице 4. Изменения в экспрессии считали статистически значимыми при значении p-value менее 0,05. Для некоторых генов в определенной экспериментальной точке (доза радиации и время после воздействия) стандартное отклонение оказалось велико (более 5% от среднего значения) или log2FC менее 1 (в этом случае параметр изменения экспрессии FC менее 2). Такие гены не относили к дифференциально экспрессированным в соответствующей экспериментальной точке.

Таблица 4 – Изменение экспрессии и p-value для 29 исследованных генов в ответ на воздействие радиации в малых дозах.

Доза радиации, сГр	5					10				
Время забора биоматериала, количество часов после завершения облучения	0	6	24	48	72	0	6	24	48	72
CG6295	n/n	n/n	-/-	-/n	n/n	n/n	+*/n	n/n	n/n*	+/n
CG18180	n/+*	n/+	+*/n	n/n	n/+	n/+*	+*/+	+*/n*	n/n	n/-
CG42751	n*/n	n*/+	n/n*	n/-*	n*/n*	n/n	n/+	n/n	n/-*	n/n
Clk	n*/n	n*/n	n/n	n/n	n/n	n*/n	n/n	n*/n*	n/n	n/n
Cyp4e2	n/n*	n*/n*	n/n*	n*/n*	n*/+*	n*/n*	n/n*	n*/n	n*/n*	n*/+*
Cyp6a20	n/+*	n/n*	n/n*	n*/n*	n/n	n/-*	n/n*	n/n	n/n*	n/+
Fer3	-/-	+/-	n/n	n/n	+/+	n/-	n*/-	n/n	n/n	+/+
foxo	-/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n*/n	n*/n	n/n*
GstE3	n/n	n/n	+/n	n*/n	n/n	n*/n	n/n	+/n	n*/n	n/n
hpo	n/n	n*/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n*/n*	n*/n	n/n
Hsp70Aa	n*/n	n/+	-/n	n/-	n/n	n/+	-*/-	n/n	-/-	n/n
Hus1-like	n/n*	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n*/n*	n*/n	n/n*
DJNK	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n*	n/n	n*/n	n/n	n*/n	n/+
Keap1	n/n	n/n	-/n	+/n	n/n	n/n	-/n	n/n	+/n	+/n
mei-9	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n*	n*/n	n/n
mei-41	n/n	n/n	-/n	n/n	n/+	n/n	-/+	n/n*	n/n	n/+*
PCNA	n/n*	n/n	n/n	n/+	n/n	n/n	n/n	n/n*	+/+	n/n
mus 309	+*/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/-	n/n	n/n
p53	n/n	n/n	-/-	-/-	n/n	n/n	n/n	-/-	-/n	n/n
per	n/n	n/n*	n/n	+/n	n*/n*	n/n	-/n*	n/n*	n/n*	n/n
RAD54	n/n	n/n	n*/n	n/n	n/n	n*/n	n*/n	n/-	n*/n	n/n
Sod	n/n	n/n*	n/n	n/n	n/n	n/n	+/n	n/n*	n/n	n/n
spn-B	n/n	n/+	n/n	+/-*	n/+	n/n*	n/+	n/n	+/-*	n/+
tefu	n/n	n/n	-/n	n/n	n/n	n/n	n*/n	-/n*	n/n	n/n
wrinkled	n/n	n*/n*	n/+	n/+	n/+	n*/-	n/-	n/+	n/+	n/n
CG13323	n*/n	n/n	n*/n	n*/n	+/n	n/n	+*/n	n/n	n/n	n*/n
Brca2	n/n	n*/n	n/n	n*/n	n/+	n/n	n*/n	n*/n	n/n	n*/+
CG6675	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n*/n	n*/n	n/n	n/n	n/n

CG9360	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n
Irradiation dose, cGy	20					40				
Analysis time, hours after exposure	0	6	24	48	72	0	6	24	48	72
CG6295	n*/n	n*/n	-/-	n/n*	n/n	+/n	+/-	n/-	+/-	n/+
CG18180	n/n	n/n*	n/n	n/n	n/-	n/n	n/+	+/n	n/n	n/+
CG42751	n/n	n/+	n/n	n/-*	n/n	n*/n	n/+	n/n	n*/-	n/+
Clk	n/n	n/+	n*/n	n/n	n/n	n*/-	n*/n*	+/n	n/n	n/n
Cyp4e2	n*/n*	n*/n*	n*/n*	n*/n*	n*/+*	n*/n*	n*/n	n*/n*	n*/n*	n*/+*
Cyp6a20	n/+*	n/n*	n/n*	n/n*	n/n*	n/-*	+/n	n*/n*	-/n*	n/n*
Fer3	n*/-	n/n	+/n	n/+	n*/+	+/n	n*/-	n/n	n/n	n*/n
foxo	n/n*	n/n	n*/n	n*/n	n*/n	n/n	n/+	n*/n*	n*/n	n/+
GstE3	n/n	n/n	n*/n	n/n	n/n	n*/n	n/+	+*/n	n*/n	n/+
hpo	n/n	n/n	n*/n	n*/n	n/n	n/n	n/n*	n/n	n*/n	n/n
Hsp70Aa	n/+*	n/n	-/+*	n*/-	+/+*	+/+	+/-	n*/-	+*/-	+/n
Hus1-like	n*/n	n/n*	n/n	n*/n	n/n	n/n	n/+	n/n	n*/n	n/n
DJNK	n/n*	n/n	n*/n	n*/n	n/n*	n/n	n/+	n*/n	n*/n	n/n*
Keap1	n/n*	n/n*	n/n	n*/n	+/n	n/n	n*/n	n/n	n*/n	n/n
mei-9	n/n	n/+*	n/n	n*/n	n/+*	n/n	n/n*	n/n	n*/n	n/+
mei-41	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	-/n	n/n	n/+
PCNA	n/n	n/n	n/+*	n*/+*	n/n*	n/n	n/n	n/+	n*/n*	n/n*
mus 309	n/n	n/+	n/n	n/n	n/+*	n/n	n/n	n/n	n/n	n/+
p53	n/-	n/n	-/-	n*/-	n/n	n/n	n/n	n*/n	n/-	-/+
per	n/n	n/n	n/n	n/n*	n/n	n/n	+/n*	n/n	n/n*	-/+
RAD54	n*/-	n*/n	n*/n	n*/n	n*/n	n/n	+/n	n/-	n*/-	n/n
Sod	n/n	n/n	n/n	n/n*	n/n	n/n	-/n	n/n	-/n	n/+
spn-B	n/-	n/+	n/n*	n*/-*	n/n*	n/n	n/n	n/n	n*/-	n/n
tefu	n/n	n/n*	-/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n
wrinkled	n*/n	n/n	n*/+	n/+	n/n	n*/-	+/-	n*/n	-/-	n/+
CG13323	n/n	n*/n	n/n	n*/n	n*/n	n/n	+*/n	n/n	n/n	+*/n
Brca2	n/n	n/n	n*/n	-*/-	n/+	n/n	n*/n*	n*/n	-*/-	n/n
CG6675	n*/n	n/n	n*/n	n/+	n/n*	n/n	n/+	n/n	n/n	n/+
CG9360	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/n	n/+	n/n	n/n	n/n

n – FC absolute value < 2; |Log2 FC|<1
+ – Log2 FC > 1
- – Log2 FC < -1
* - p-value < 0.05

Таким образом был получен набор дифференциально экспрессированных генов для каждой дозы радиации (Рисунок 4). Наиболее высокие значения FC были отмечены в точке 48 часов после окончания воздействия радиации, хотя статистически подтвержденных среди них оказалось мало. В большинстве случаев в ответ на радиационное облучение в дозе 40 сГр полученные данные сравнительны с биологической вариабельностью в большинстве случаев.

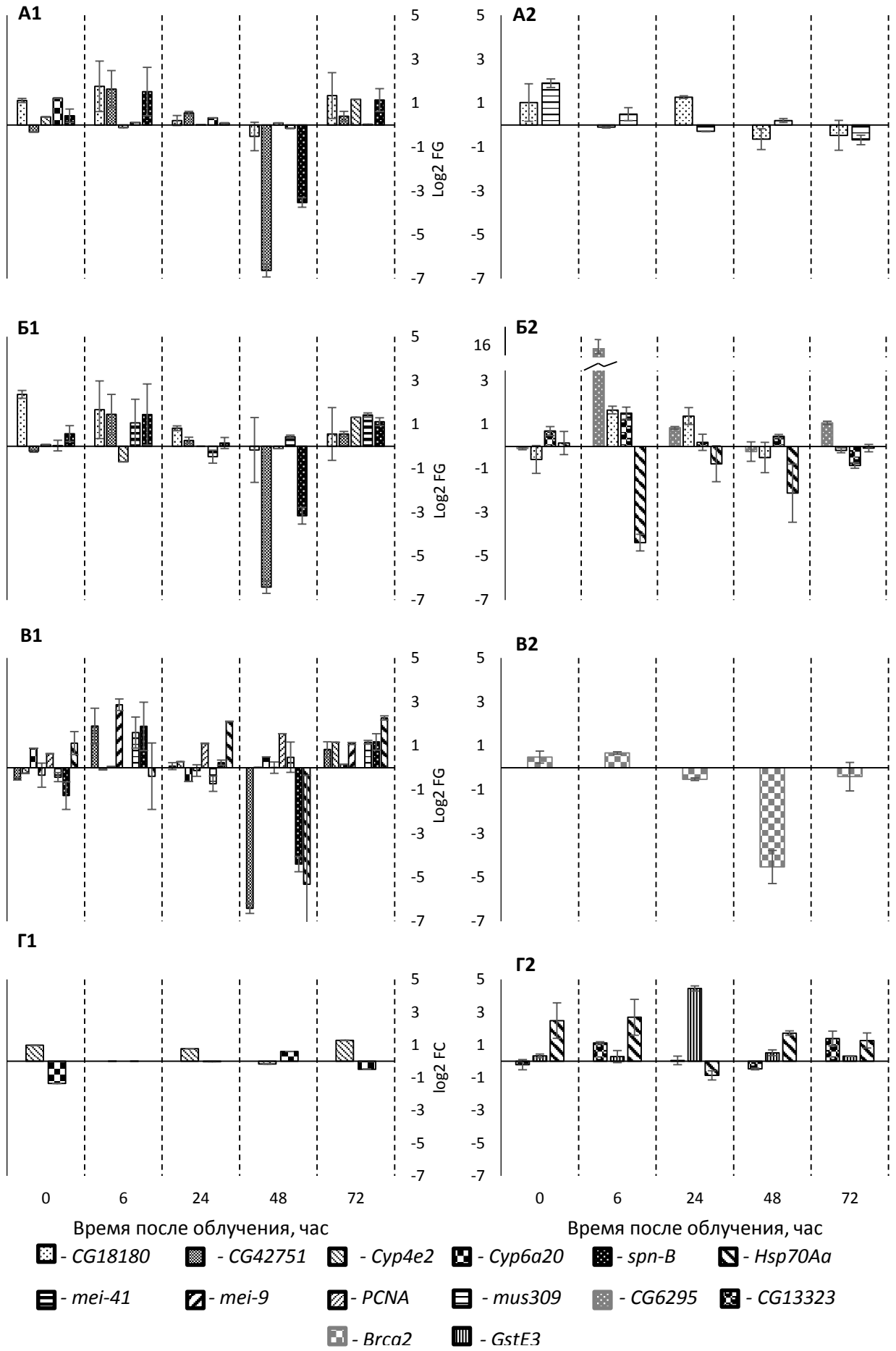


Рисунок 4 – Дифференциально экспрессированные гены в мужских и женских особях *Drosophila melanogaster* после воздействия радиации, А – 5 сГр, Б – 10 сГр, В – 20 сГр, Г – 40 сГр, 1 – самцы, 2 – самки.

3.2.1. Анализ дифференциальной экспрессии в образцах мужских особей

Анализ дифференциально экспрессированных генов среди мужских особей выявил следующие изменения (Рисунок 3.3 А1, Б1, В1, Г1). Гены *CG42751* (в 84 раза больше), *spn-B* (в 8.6 раза меньше) и *mei-9* (в 2 раза больше), *mei-41* (в 2.6 раза больше), *mus309* (в раза больше), *Cyp4e2* (в более чем 2.2 раза больше) оказались дифференциально экспрессированы спустя 48 и 72 часов после стрессового воздействия, соответственно. При этом такое изменение экспрессии наблюдалось только в результате воздействия радиации в дозах 5 сГр, 10 сГр и 20 сГр. Отложенный эффект стресса может свидетельствовать о том, что эти гены являются участниками позднего ответа на стресс. Например, экспрессия гена *mei-9*, кодирующего белок эксцизионной репарации нуклеотидов и репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, активируется в ответ на ультрафиолет через 12 часов после воздействия и позже (Karpac et al, 2011). Сверхэкспрессия гена *Cyp4e2* и сниженная экспрессия гена *CG42751*, обнаруженные в данном исследовании, согласуются с результатами анализа транксрипционной активности при других типах стресса (Moskalev et al, 2014). Хотя функция гена *CG42751* до сих пор остается неизвестной, было замечено, что его экспрессия изменяется в ответ на окислительный стресс (Weber et al, 2012). При этом одним из побочных эффектов ионизирующей радиации является индукция свободных радикалов и увеличение количества активных форм кислорода (Weber et al, 2012). Ген *Cyp4e2*, относящийся к генному семейству цитохром P450, играет роль в регуляции циркадных ритмов (Shaw et al, 2000) и в ответе на разные типы стрессов, в том числе химические. Например, сверхэкспрессия этого гена была идентифицирована в различных стресс-устойчивых линиях *Drosophila melanogaster* (Giraudo et al, 2010). Гены *mei-9* и *mei-41* регулируют репарацию ДНК в соматических клетках (Sarantseva, Khromykh, 2001, Sekelsky et al, 2000), более того ген *mei-41* необходим для развития горметического эффекта, так как у мутантов с инактивированным *mei-41* гормезиса не наблюдали в соответствующих условиях (Moskalev et al, 2011). В данном эксперименте, этот ген оказался сверхэкспрессирован в

ответ на радиацию в дозе 10 сГр. Сверхэкспрессия гена *spn-B*, участвующего в репарации двуцепочечных разрывов ДНК, не является обязательным условием для увеличения продолжительности жизни в ответ на радиационное воздействие в малых дозах (30 сГр) (Shilova et al, 2014), и в данном эксперименте наблюдалось снижение экспрессии этого гена в 8,6-39 раз спустя 48 часов после воздействия в ответ на 5 сГр, 10 сГр и 20 сГр радиации.

Ген *Cyp6a20*, кодирующий цитохром P450 6a20, которых играет роль в иммунном ответе и регуляции поведения мух (Robin et al, 2007), сверхэкспрессирован сразу после воздействия 5 сГр радиации (2,3 раза) и низко экспрессирован в ответ на 40 сГр (2,5 раза). Возможно, эффект генов немедленной реакции на радиацию различается среди образцов, подвергнутых воздействию разных доз радиации, может быть объяснено тем, что более высокая суммарная доза требует более длительного времени облучения. Поэтому у образцов с более высокой дозой точка измерения, обозначенная как «сразу после воздействия», фактически наступает гораздо позже, чем у образцов с меньшей дозой, что может выразиться в смещение экспрессионного ответа у этих образцов. Схожая закономерность была обнаружена для гена *CG18180* на мужских образцах. Этот ген оказался сверхэкспрессирован сразу после воздействия 5 и 10 сГр радиации, но в ответ на более высокие из исследованных дозы никаких экспрессиионных изменений не наблюдалось. Отмеченная выше разница во времени экспозиции и измерения рассматриваемых показателей может объяснить также и то, что результаты данной работы и работы по оценке экспрессии генов методом RNA-Seq не совпадают для генов *Cyp6a20* и *CG18180* (Moskalev et al, 2014).

Ген *PCNA*, участвующий в различных аспектах репарации (Nichols, Sancar, 1992) и репликации ДНК (Strzalka, Ziemienowicz, 2011), оказался сверхэкспрессирован в ответ на 20 сГр спустя 24 часа (2,1 раз) и 48 часов (2,8 раз) после воздействия. Это может свидетельствовать о том, что этот ген играет роль в отложенном ответе на радиационный стресс. Экспрессия гена *Hsp70Aa* была повышена в 2 раза сразу после воздействия 20 сГр и в

4,8 раза спустя 72 часа после воздействия.

3.2.2. Анализ дифференциальной экспрессии в образцах женских особей

Анализ дифференциально экспресиированных генов в образцах женских особей в ответ на воздействие малых доз ионизирующей радиации не выявил никаких значительных эффектов (Таблица 3). Большая часть полученных данных имеет высокое стандартное отклонение и маленькие значения, хотя они выше уровня биологической вариабельности.

Ген *mus309* отвечает за сигналинг при повреждениях ДНК и участвует в репарации ДНК. Этот ген был идентифицирован как высоко экспрессированных (в 3,7 раза) сразу после воздействия радиации в дозе 5 сГр. Ген *CG13323* с неизвестной функцией оказался сверхэкспрессированным в ответ на радиацию в дозе 10 сГр (в 2,8 раз) и 40 сГр (в 2,2 раза) спустя 6 часов после воздействия стресс-фактора. Это может свидетельствовать об участии гена *CG13323* в стресс-ответе. Ген *CG6295*, который играет важную роль в метаболизме липидов, высоко экспрессирован (в более чем 15000 раз) в ответ на 10 сГр спустя 6 часов после облучения. Ранее было обнаружено, что инициируемое радиацией образование большого количества активных форм кислорода и азота может привести к нарушению липидного метаболизма (Schmidt-Ullrich et al, 2000). Однако другие исследования показали снижение экспрессии гена *CG6295* в ответ на радиационное воздействие в дозе 20 сГр (Moskalev et al, 2014). Такое несоответствие может быть объяснено разницей как во времени экспозиции, так и во времени анализа экспрессии после воздействия. Низкий уровень экспрессии (в 22,6 раза ниже по сравнению с контролем) гена *Brca2*, участвующий в репарации ДНК (Seto et al, 1987), наблюдался спустя 48 часов после воздействия радиации в дозе 20 сГр, однако высокое стандартное отклонение не позволяет рассматривать эти данные как достоверные. Ген *Hsp70Aa* низкоэкспрессирован в ответ на 10 сГр и сверхэкспрессирован после воздействия 40 сГр через 6 и 48 часов после воздействия стресс-фактора, соответственно. Экспрессионные изменения этого гена, вовлеченного в ответ на тепловой шок (Gong, Golic, 2006), у

самок и самцов после радиационного воздействия могут служить подтверждением существования неспецифического механизма стресс-ответа. Интересно отметить, что ген *CG18180* сверхэкспрессирован в ответ на 5 сГр спустя 24 часа после воздействия, на 10 сГр через 6 и 24 часа после облучения у самок, в то же время этот ген сверхэкспрессирован сразу после воздействия у самцой. Хотя функция гена *CG18180* до сих пор остается неизвестной, обнаружены свидетельства участия этого гена в иммунном ответе (De et al, 2001) и в ответе на разные типа стресса (Kalajdzic et al, 2012, Telonis-Scott et al, 2009). Возможно, различия в динамике экспрессии гена *CG18180* играет важную роль в пол-специфических изменениях продолжительности жизни особей *Drosophila melanogaster* после облучения ионизирующей радиации в малых дозах.

3.2.3. Сравнение экспрессионной динамики анализируемых генов у особей разного пола

Пол-специфичность ответа на разные стимулы была подтверждена множеством экспериментов. Даже степень горметического эффекта в ответ на различные типы стресса зависит от пола (Burger, Promislow, 2004). Такие различия могут быть объяснены тем, что одни и те же гены в особях разного пола вынуждены работать в разном окружении, хотя их функции остаются неизменными. Например, было показано, что повышенная сексуальная активность у самцов приводит к снижению иммунитета (McKean, Nunney, 2001). Такая специфическая регуляция иммунного ответа может быть выявлена и в других условиях, а пол-специфические изменения экспрессии гена *CG18180*, возможно, играют в этом непоследнюю роль. К тому же, как было показано, экспрессия этого гена изменяется в ответ на голодание и холодовой стресс (Telonis-Scott et al, 2009).

Таким образом, был проведен анализ экспрессионных профилей 29 генов в течение 72 часов после облучения ионизирующей радиации в дозах от 5 до 40 сГр и выявлены различия в дифференциальной экспрессии у самцов и самок линии дикого типа *Canton-S Drosophila melanogaster*. Ген *Clk*, ответственный за регуляцию циркадного ритма, не был отмечен как

дифференциально экспрессированный в данном эксперименте, хотя ранее были показаны изменения экспрессии генов этого пути в ответ на облучение в 20 сГр мух возрастом 5 суток (Moskalev et al, 2014). Гены s*pn-B*, *mei-9*, *mei-41*, *mus309*, участвующие в репарации ДНК и ответе на разные типы стресса, оказались сверхэкспрессированы у самцов через 48 и 72 часа после радиационного облучения. Это может свидетельствовать о поздней транскрипционной активации этих генов в ответ на радиационный стресс и их важной роли в увеличении продолжительности жизни после малых доз ионизирующей радиации. Изменение экспрессии гена *mus309* было обнаружено и у самок, и у самцов, но экспрессионные профили различны: сверхэкспрессирован в ответ на 20 сГр спустя 72 часа после воздействия у самцов и в ответ на 5 сГр сразу после облучения у самок. Сниженная экспрессия *CG42751* с неизвестной функцией может свидетельствовать о его роли в изменении продолжительности жизни и стресс-ответе на радиацию. Экспрессионные изменения гена *Hsp70Aa* в образцах мужских и женских особей служит опосредованным подтверждением существования неспецифического стресс-ответа, так как основная функция этого гена – участие в ответе на тепловой шок (Gong, Golic, 2006). Динамика экспрессионных изменений гена *CG18180,* играющего роль в иммунном ответе, отличается среди самок и самцов, что может играть роль в снижении медианной и максимальной продолжительности жизни самок после облучения.

Несмотря на то, что был проведен анализ экспрессии генов, либо напрямую участвующих в стресс-ответе, либо отмеченных как дифференциально экспрессированные в ответ на разные типы стресса (радиационный, химический, температурный), явных генов, по всем параметрам подходящих на роль кандидатов-участников механизма гормезиса и неспецифического стресс-ответа, среди исследованных генов не обнаружено. Анализ продолжительности жизни особей показал, что исследованные дозы могут оказаться не оптимальными для проявления гормезиного эффекта. Также значительные различия в экспрессионных уровнях в разные периоды после радиационного облучения говорят о

необходимости наблюдения за экспрессионной динамикой в одно и то же время для точности сравнения различных стрессовых воздействий. Такие выводы позволили предположить, что для выявления генов-участников гормезиного эффекта необходим не только более обширный анализ экспрессии генов, но и сравнение экспрессионных профилей при воздействии разных стрессов в нескольких дозах.

3.3. Анализ выживаемости особей, подвергнутых воздействию разных стресс-факторов

Для оценки эффекта стрессов на организменном уровне был проведен анализ выживаемости и локомоторной активности. Воздействие энтамопатогенных грибков в количестве 10 и 100 КОЕ, ионизирующей радиации в дозах 144, 360 и 854 Гр, 16-ти часового голодания привело к снижению продолжительности жизни (Таблица 5, Рисунок 5).

Таблица 5 – Влияние стресс-факторов различной природы на выживаемость самцов имаго *Drosophila melanogaster*

Фактор	**Доза**	**МПЖ**	**ΔМПЖ**	**90%**	**Δ90%**	**n (exp.)**	**n**
Грибковое заражение	контроль	57		71		3	233
	10^1 КОЕ/особь	51.5***	-9.6%	66#	-7%	3	216
	10^2 КОЕ/особь	29***	-49.1%	65###	-8.5%	3	254
Ионизирующее излучение	контроль	66		77		2	315
	144 Гр	59***	-10.6%	69###	-10.4%	2	310
	360 Гр	49***	-25.8%	56###	-27.3%	2	286
	864 Гр	27***	-59.1%	32###	-58.4%	2	357

Голодание	контроль	60		71		2	338
	16 ч	57**	-4.3%	68###	-4.2%	2	367
Гипотермия	контроль	59		71		2	285
	+4 °C	59	0	73	+2.8%	2	327
	0 °C	57	-3.4%	70	-1.4%	2	308
	-4 °C	59	0	70	-1.4%	2	297

Обозначения: МПЖ – медианная продолжительность жизни; 90% - возраст смертности 90% выборки; ΔM и Δ90% - различия по продолжительности жизни между вариантами контроль и опыт; n (exp.) - количество повторностей эксперимента; n – количество проанализированных особей.

**p<0.01, ***p<0.001 – критерий Мантеля-Кокса;

#p<0.05, ###p<0.001 – критерий Ванг-Аллисона.

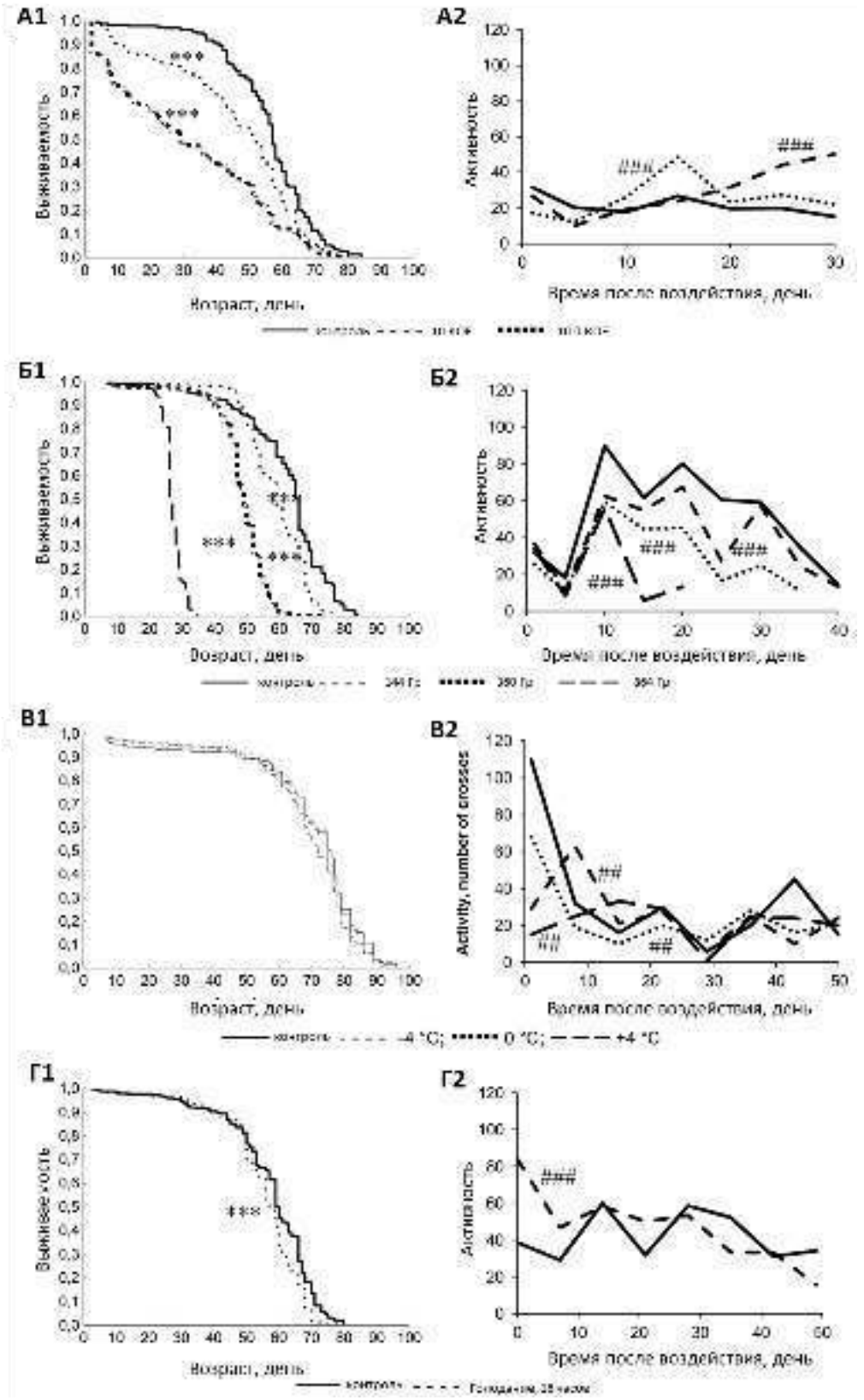


Рисунок 5 – Влияние грибкового заражения (А), радиации (Б), пониженной температруы (В) и голодания (Г) на выживаемость (1) (результаты объединения повторностей эксперимента) и локомоторную активность (2) самцов дрозофил. На оси ординат указано среднее количество пересечений датчика движения Locomotor Activity Monitor (TriKinetics Inc., USA) за 3 мин. интервал на 30 особей.

***p<0.001 – критерий Колмогорова-Смирнова

###p<0.001 – критерий χ2

При этом эффект радиации и грибкового заражения оказался прямопропорционален дозе, что соответствует данным других исследований (Taylor, Kimbrell, 2007, Parashar et al, 2008). Холодовой шок не оказал статистически значимого эффекта на продолжительность жизни (Таблица 4, Рисунок 5 А1, Б1, В1, Г1).

3.4. Анализ локомоторной активности особей, подвергнутых воздействию разных стресс-факторов

Показатели локомоторной активности в значительной мере зависят от не только от состояния особей, условий их содержания и возраста, но и от времени суток измерения этих показателей, колебаниях температуры в помещении, где производят измерение. По этой причине для каждой группы особей локомоторную активность измеряли одновременно для отдельной контрольной группы, не подвергавшейся воздействию.

Энтамопатогенные грибки, радиация и холодовой шок вызывали снижение локомоторной активности в 1-5 день после воздействия (Рисунок 5 А2, Б2, В2). Снижение локомоторной активности в первые 5 сут после инфицирования, по- видимому, обусловлено развитием острой стадии грибковой инфекции, что сопровождается массовой гибелью особей (Рисунок 5 А1). Таким образом, снижение локомоторной активности можно рассматривать как симптом энтомопатогенного грибкового заболевания. Примечательно, что часть самцов выжила и статистически значимое повышение уровня их локомоторной активности в период с 10 по 30 сут ($p<0.001$) можно рассматривать как признак выздоровления. Облучение в дозах 144, 360 и 864 Гр привело к статистически значимому снижению локомоторной активности самцов ($p<0.001$). Как и в случае с продолжительностью жизни, мы наблюдали прямо пропорциональную зависимость негативного эффекта от дозы. При изучении спонтанной локомоторной активности самцов, мы наблюдали ее снижение в течение всей жизни после воздействия температурой -4°С. После воздействия температурами 0 и +4°С локомоторная активность самцов на 5 день была значительно ниже контрольной, на 12 и 19 дни этот параметр у мух

подвергавшихся гипотермии становился выше контрольных значений и снова падал к 47 дню измерений. Эффекты холодового шока при различных температурах значительно отличаются, при этом не наблюдается никакой зависимости от дозы стресса. При этом после 16-ти часового голодания повышение активности наблюдалось в течении 25 дней.

Корреляции между эффектом стресс-фактора на продолжительность жизни и на локомоторную активность не обнаружено. По-видимому, двигательная активность не имеет решающего значения для выживания организма в нормальных условиях после воздействия стресса. Полученные данные свидетельствуют о том, что продолжительность жизни является интегральным показателем жизнеспособности и не отражает состояние определенных показателей, например, двигательной активности.

Необходимо отметить, что согласно данным литературы дрозофила характеризуется высокой устойчивостью к ионизирующему излучению. Ранее было показано, что доза, вызывающая гибель 50% выборки через двое суток после облучения (LD50/2) для самцов линии дикого типа *Canton-S*, облученных в возрасте 1 сут, составляет 1238 Гр (Parashar et al, 2008). Высокая радиорезистентность дрозофиоы позволяет исследовать эффекты ионизирующих излучений в широком диапазоне доз, от десятков сГр до сотен сГр. В настоящем исследовании показано, что негативный эффект ионизирующего излучения на продолжительность жизни и локомоторную активность прямо пропорционален дозе, что согласуется с данными литературы (Parashar et al, 2008).

3.5. Анализ транскриптомов особей, подвергнутых воздействию разных стресс-факторов

Были исследованы изменения транскриптомов *Drosophila melanogaster* в ответ на воздействие 4х типов стресса разных степеней: заражение энтамопатогенными грибками (10 и 100 КОЕ), ионизирующая радиация (144, 360 и 864 Гр), голодание (16 часов), холодовой шок (-4°C, 0°C и +4°C) (Рисунок 6). Дифференциально экспрессированные гены были идентифицированы с помощью значения p-value с поправкой (FDR), которое

дает более точные результаты при сравнении большого количества параметров, в данном случае – генов. Статистически значимая дифференциальная экспрессия отмечали при значении FDR <0,05.

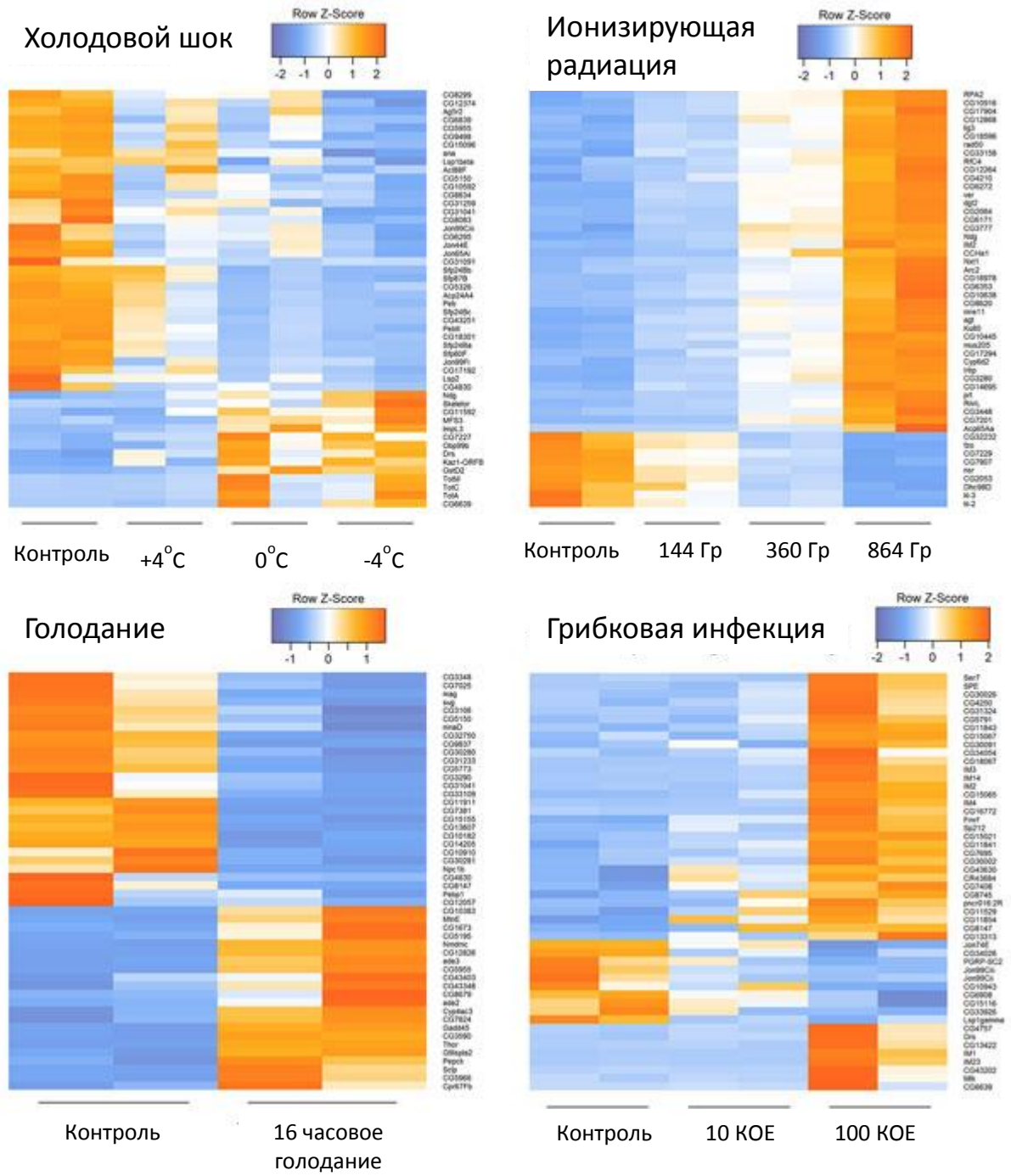


Рисунок 6 – Списки 50 наиболее дифференциально экспрессированных генов для каждого типа воздействия.

Эффект ионизирующей радиации на экспрессию генов значительно отличается в зависимости от дозы (Рисунок 7). В результате воздействия радиации в дозе 144 Гр оказались низкоэкспрессированы 670 генов и

сверхэкспрессированы 486, в дозе 360 Гр – 466 и 436 генов, в дозе 864 Гр – 330 и 306 генов, соответственно. При голодании экспрессировались на более низком уровне 59 генов, а экспрессия 67 повысилась. В результате холодового стресса дифференциально экспрессированными оказалось наибольшее количество генов по сравнению с другими исследованными воздействиями: 5790, 2803 и 4802 низко- и 151, 312 и 115 высокоэкспрессированных генов при температуре -4°C, 0°C и +4°C, соответственно. Почти сотня генов были дифференциально экспрессированы в ответ на 5 и более воздействий, при этом экспрессия 5203 генов изменилась в ответ на 2 и более воздействий и 647 при воздействии 1 и более типов стресса (температурного, радиационного, метаболического, иммунного) (Рисунок 8).

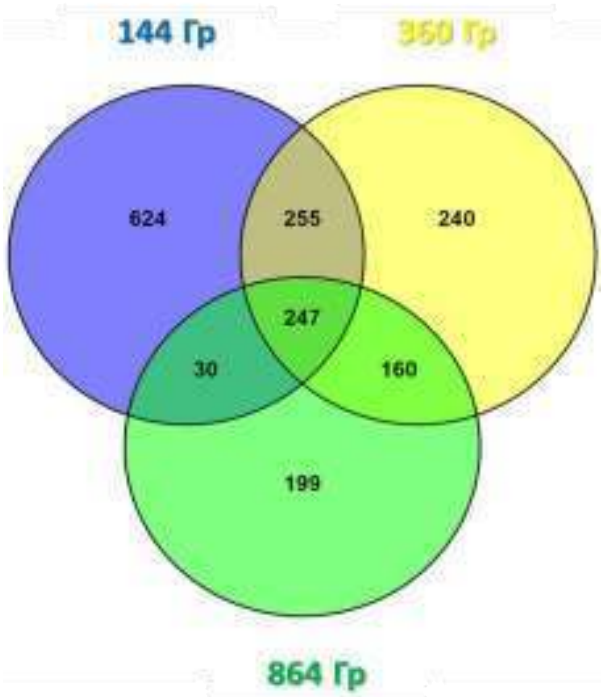


Рисунок 7 – Диаграмма, отражающая количество пересекающихся генов, дифференциально экспрессированных в условиях радиационного облучения в разных дозах.

Рисунок 8 – Диаграмма, отражающая количество пересекающихся генов, дифференциально экспрессированных в условиях четырех исследованных стресс- факторов.

По результатам анализа представленности функциональных групп генов с помощью раздела биологических процессов онтологии Gene Ontology (GO) оказалось, что 22 биологических процесса перепредставлены генами, низкоэкспрессированными в ответ на 5 и более воздействий (Рисунок 9). На процесс окисления-восстановления повлияли все исследованные стресс-факторы, за исключением энтамопатогенных грибков и радиационного воздействия в дозе 360 и 864 Гр, при этом во всех случаях экспрессия генов этого пути оказалась повышенной. Метаболический процесс и метаболизм хитина оказались среди наиболее обогащенных генами, дифференциально низко- и высокоэкспрессированными в ответ на разные воздействия (Рисунок 10).

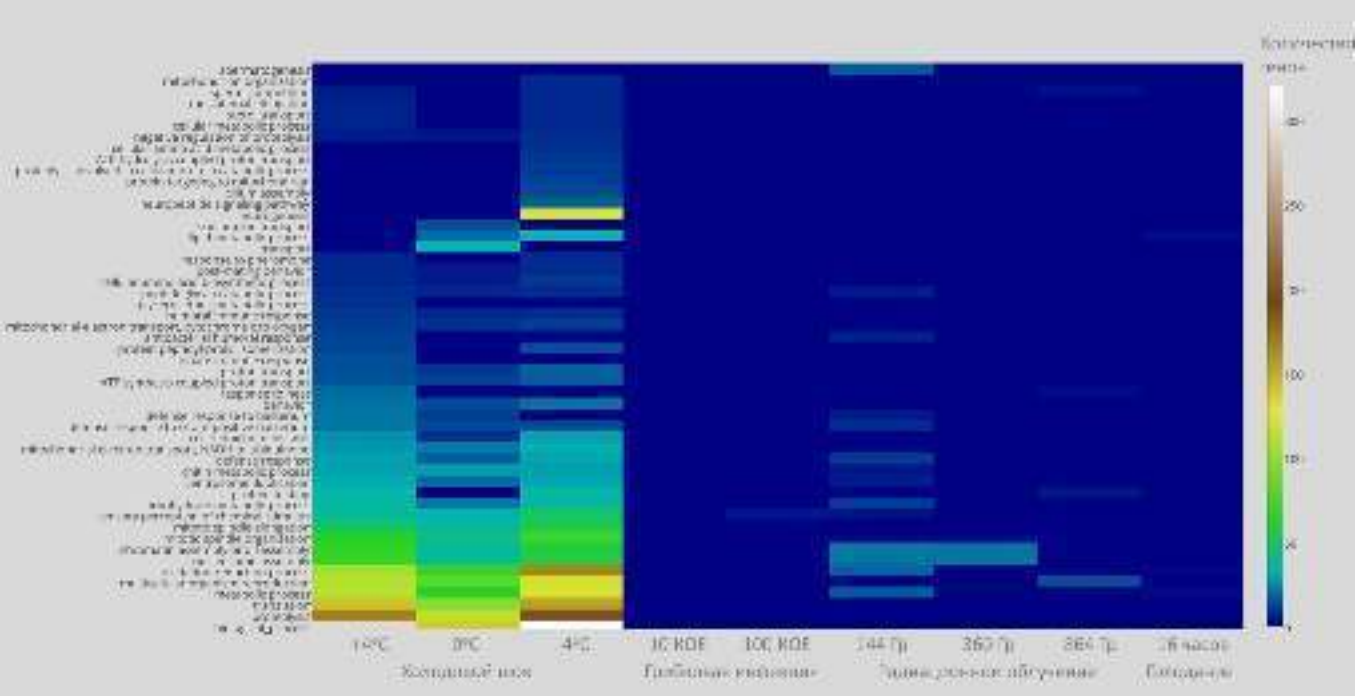


Рисунок 9 – Тепловая карта биологических процессов, представленных низко экспрессированными генами, в соответствии с системой Gene Ontology.

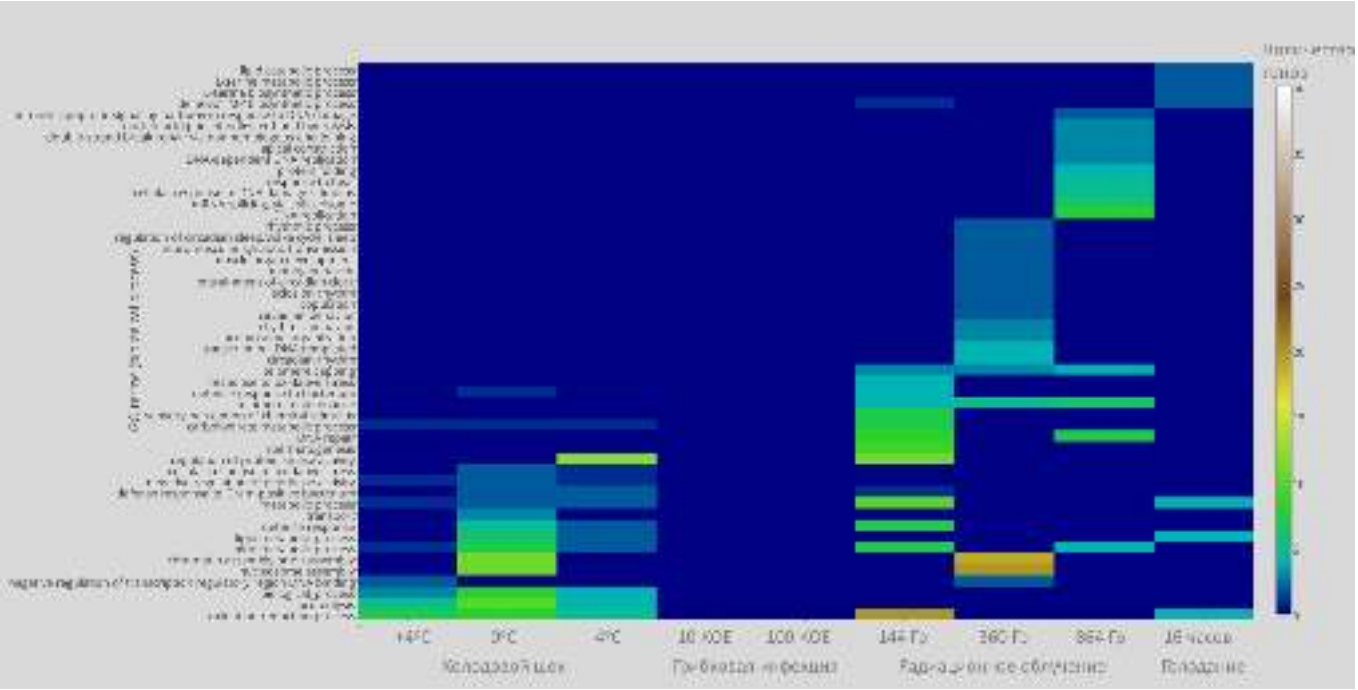


Рисунок 10 – Тепловая карта биологических процессов, представленных высоко экспрессированными генами, в соответствии с системой Gene Ontology.

Помимо биологических процессов, затронутых разными стресс-факторами, были обнаружены специфические пути, проявившие изменения в ответ только в случае одного из исследованных воздействий. Для

голодания такими процессами оказались: биосинтез инозин монофосфата (ИМФ) «de novo», клеточный биосинтез аминокислот (в том числе процессы биосинтеза и метаболизма L-серина), определение продолжительности жизни взрослой особи, метаболизм липидов, при этом последний GO термин был обогащён исключительно низкоэкспрессированными генами.

Ионизирующая радиация в дозе от 144 до 864 Гр произвела активирующий эффект на гены, обогатившие 39 биологических процессов. При этом 2 из них (поддержание стабильности теломер и теломерный кэпинг) были активированы при воздействии доз 144 и 864 Гр. Воздействие ионизирующей радиации в дозе от 144 до 864 Гр привело к снижению экспрессии генов, перепредставленных в сумме в 47 биологических процессах, 2 из которых были затронуты в ответ и на дозу 360 Гр, и на 864 Гр. В связи с тем, что экспериментальному воздействию подвергали только особей мужского пола, все термины и процессы, специфические для женского организма, исключались из анализа.

В ответ на инфекцию грибков в концентрации 10 КОЕ низкоэкспрессированы 135 генов и сверхэкспрессированы 133 гена, а при более высокой дозе – 288 и 363 гена, соответственно. С помощью метода аппроксимации на основе генерализованной линейной модели было идентифицирован 151 (90 низко- и 161 высокоэкспрессированных) ген, изменение экспрессии которых было пропорционально изменению дозы стресс-фактора. При этом 8 из топ-10 (19 из топ-50) генов, сверхэкспрессированных в экспериментальных группах, связаны с защитной реакцией в ответ на бактерии и грибки, в том числе иммунного ответа и пути Toll-сигналинга. Среди них гены антимикробных пептидов *Metchnikowin*, *Drosomycin*, *Drosocin* и *TotM* (экспрессия повышена в 4 раза), что согласуется с ранее опубликованными данными (Zhong et al, 2013). Ген семейства Turandot *TotC* показал повышение экспрессии в 2 раза, в то время как для других членов этого семейства не показано изменений в экспрессии. Среди топ-20 сверхэкспрессированных генов обнаружены 6 иммунитет-индуцированных пептидов (IM1, 2, 3, 4, 14, 23). Эти пептиды участвуют в реакции врожденного иммунитета. Среди

низкоэкспрессированных генов выявлено обогащение терминами (Gene Ontology, GO) метаболических процессов моносахаридов (8 из топ-50). Протеолиз, а именно GO термин пептидазная активность по типу серина, обогащен как сверхэкспрессированными (9 из топ-50), так и низкоэкспрессированными (8 из топ-50) генами.

Гены, сверхэкспрессированные в ответ на холодовой стресс температур -4°C, 0°C и +4°C, обогащают 35 GO терминов биологических процессов. При этом 6 из них активированы при всех исследованных стрессовых температурах, а 3 – при -4°C и 0°C (метаболизм липидов, защитная реакция, реакция защиты от грамположительных бактерий). Холодовой стресс привел к сниженной экспрессии генов, перепредставленных в 35 биологических процессах (Рисунок 9). Из них 32 участвовали в ответе на все 3 стрессовых температуры и в большинстве связаны с метаболическими процессами и поведением после спаривания. При этом воздействие температуры -4°C привело к изменению регуляции процессов формирования митохондрий и окислительно-восстановительных реакций. Ранее было показано, что окислительный стресс является частью ответной реакции на охлаждение плода *Prunus mume* (Imahori et al, 2008), а также что холод является одним из абиотических факторов, повышающих количество свободных радикалов в организме (Apel, Hirt, 2004, Prasad et al, 1994). Хотя все эти данные получены для растений.

Также для анализа представленности функциональных групп генов (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) была использована база KEGG pathway ontology. По результатам этого анализа оказалось, что гены 27 путей дифференциально экспрессированы в случае двух и более воздействий, при этом из них 14 высоко- (Рисунок 11) и 13 низкоэкспрессированы (Рисунок 12). Большинство эти путей связаны с метаболизмом или биосинтезом аминокислот и других веществ. Среди остальных такие процессы как гомологичная рекомбинация, негомологичное соединение концов и путь сигналинга Wnt, циркадный ритм оказались представленными сверхэкспрессированными генами. Семь из путей, аннотированных в KEGG, были инактивированы в результате воздействия энтамопатогенными грибками

в концентрации 100 КОЕ, при этом 2 из них относятся к метаболическим процессам (фруктоза, манноза, пентоза, глюкуронат) и также обогащены низкоэкспрессированными генами в ответ на заражение грибками в дозе 10 КОЕ. После воздействия грибков в 100 КОЕ 2 пути оказались перепредставлены сверхэкспрессированными генами: биосинтез фолата и метаболизм фосфоглицеридов. В ответ на голодание оказались дифференциально экспрессированными 8 путей KEGG, среди них метаболизм аминокислот и других веществ (например, фосфоглицеридов) предствален сверхэкспрессированными генами, а процессинг белков в эндоплазматическом ретикулуме, биосинтез фолата и метаболизм α-линоленовой кислоты – низкоэкспрессированными. Такие изменения, вызванные голоданием, можно объяснить приоритетностью метаболизма ключевых молекул и снижением интенсивности других процессов при таком типе стресса. При всех исследованных стрессовых температурах наблюдалось снижение активности генов фолат-опосредованного одноуглеродного метаболизма. Холодовый стресс привел к инактивации большого количества разных путей, большинство которых связано с метаболизмом аминокислот, фолата, пирувата, углерода и других веществ, а также с функцией рибосом. Наибольшее количество путей оказалось представлено низкоэкспрессированными генами в ответ на воздействие самой низкой из исследованных температур -4°C, среди которых помимо перечисленных выше обнаружили путь активации РНК-полимеразы и экспорта белков. В ответ на радиационное воздействие во всех исследованных дозах были сверхэкспрессированы гены, относящиеся к KEGG путям негомологичного соединения концов и гомологичной рекомбинации. Также был проведен GSEA анализ GO терминов раздела молекулярных функций. По результатам этого анализ оказались перепредставлены низкоэкспрессированными генами такие термины, как связывание с ДНК, с пептидогликанами, N-ацетилмурамоил-L-аланин-амидазная активность, электрон- транспортная активность. Большинство воздействий привело к повышению экспрессии генов, с такими молекулярными функциями: связывание с ДНК, с хитином, пептидазная активность по типу серина, ингибирование этой активности,

триглицерид-липазная активность.

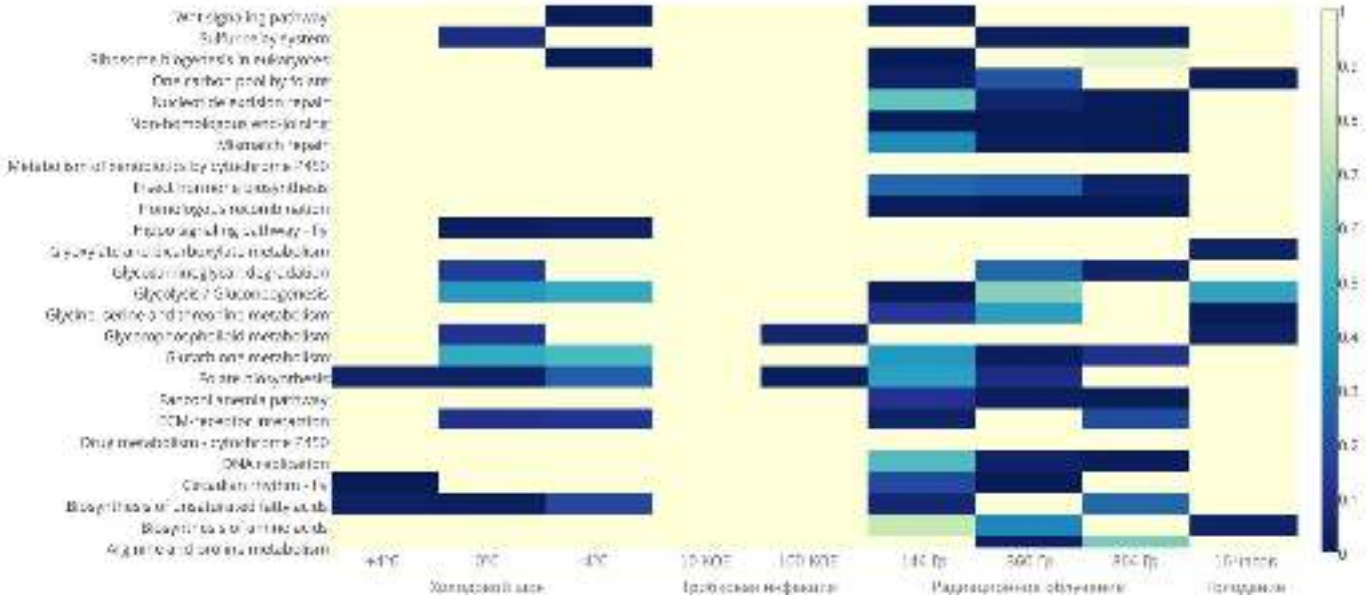


Рисунок 11 – Тепловая карта молекулярных путей, представленных высоко экспрессированными генами, в соответствии с системой KEGG.

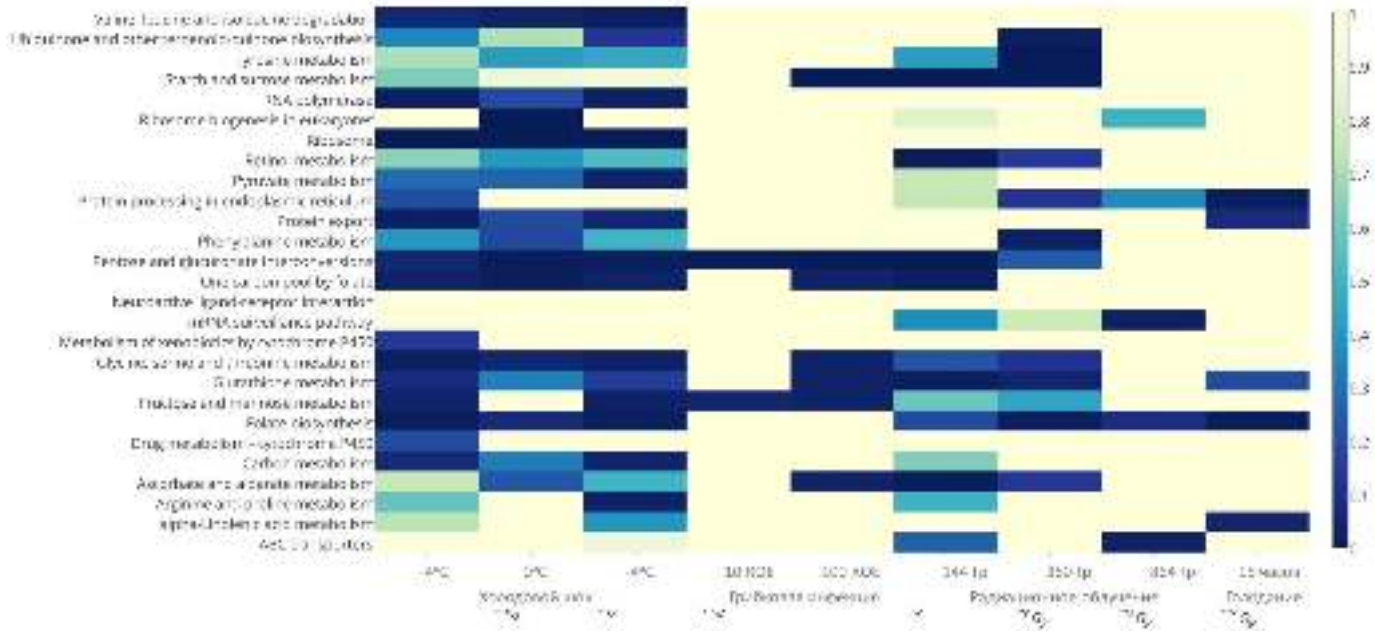


Рисунок 12 – Тепловая карта молекулярных путей, представленных низко экспрессированными генами, в соответствии с системой KEGG.

Анализ влияния доз радиации на экспрессию генов позволил выявить случаи прямо- или обратно пропорциональной зависимости между дозой и изменением экспрессии. Воздействие радиации привело к пропорциональному

дозе негативный эффект более высоких доз ионизирующей радиации обусловлен в наибольшей степени именно повреждениями макромолекул. Что касается холодового шока, то температуры замерзания (-4°C и 0°C) наносят меньший ущерб, чем температуры между зоной комфорта и замерзанием (+4°C) (Sonna et al, 2002, Sinclair et al, 2007, Storey, Storey, 2013).

При холодовом шоке всех исследованных температур сверхэкспрессированными оказались 5 генов: *GstD2*, *TotM*, *TotC*, *TotA* и *CG6639*. Три из них *TotA*, *TotC*, *TotM*, а также ген *TotX*, который был и низко и высоко экспрессирован при разных температурах, являются членами семейства Turandot, к которому относятся стресс-индуцируемые гуморальные факторы, ассоциированные с устойчивостью организма к летальным эффектам высоких температур. Все 8 генов этого семейства присутствуют в геноме *Drosophila melanogaster*. Ранее для них всех было показано повышение экспрессии при бактериальной инфекции, тепловом шоке, механическом воздействии, дегидратации, воздействии параквата (N,N'-диметил-4,4'-дипиридилия дихлорид) и ультрафиолета (Ekengren, Hultmark, 2001). Особи со сверхэкспрессией гена *TotA* характеризуются длительным выживанием и нормальной активностью в условиях летальных температур (Ekengren et al, 2001). Также высокий уровень экспрессии этого гена наблюдалась во время метаморфоза и у особей старшего возраста (Ekengren et al, 2001). Недавно было показано, что ген *TotA* дрозофилы отвечает за толерантность к метилртути – нейротоксину, встречающемуся в окружающей среде и поражающим нервную систему (Mahapatra, Rand, 2012). Ген *TotM* способствует активации иммунитета в случае грибковых инфекций, переносящихся половым путем (Zhong et al, 2013). Анализ с помощью генерализованной линейной модели выявил 111 генов, экспрессия которых уменьшалась пропорционально снижению стрессовой температуры, при этом 18 из топ-50 являются сериновыми эндопептидазами и обогащают такой GO термин биологических процессов, как протеолиз.

Как и в случае холодового шока, эндопептидазы являются наиболее низко экспрессированным семейством генов (17 из топ-50) в результате 16-ти часового голодания. Среди них главное место занимают сериновые

протеазы (13 из 17 генов). Также следующие классы оказались наиболее перепредставлены низко экспрессированными генами: экзопептидазы, щелочные фосфатазы и молекулы, участвующие в транспорте липидов. Сверхэкспрессированные в условиях голодания гены в основном ассоциированы с метаболизмом аминокислот, биосинтезом важных соединений, в том числе рибонуклеозида, трансаминазной и липазной активностями, гомеостазом ионов металлов. Дифференциально экспрессированных генов, относящихся к семейству Turandot, идентифицировано не было. Таким образом, 16-ти часовое голодание в основном привело к ингибированию протеолиз-ассоциированных генов и активации генов, участвующих в биосинтезе важных для выживания соединений. При этом период голодания продолжительностью 16 часов является сравнительно небольшим. Для многих видов показано, что при более длительном голодании (несколько дней) протеолитические пути являются активированными для обеспечения организма питательными веществами (Shimobayashi et al, 2010, Nakashima et al, 2006, Michalik et al, 2009).

Сеть взаимодействий белков, гены которых характеризуются дозозависимой сверхэкспрессией в ответ на облучение ионизирующей радиацией (Рисунок 13), показывает, что радиация приводит к небольшому сдвигу экспрессии (в 1,5 – 2 раза) гена *TotA*, хотя другие члены семейства Turandot не проявили значимых изменений. Также была обнаружена высокая степень зависимости между дозой радиации и уровнем экспрессии генов *CG7201*, *Acp65Aa*, *CG32625*, *CG14545*. В контрольных образцах эти гены были экспрессированы на очень низком или практически нулевом уровне (менее 0,02-1,0 ридов на миллион) и на значительно большем в результате воздействия радиации.

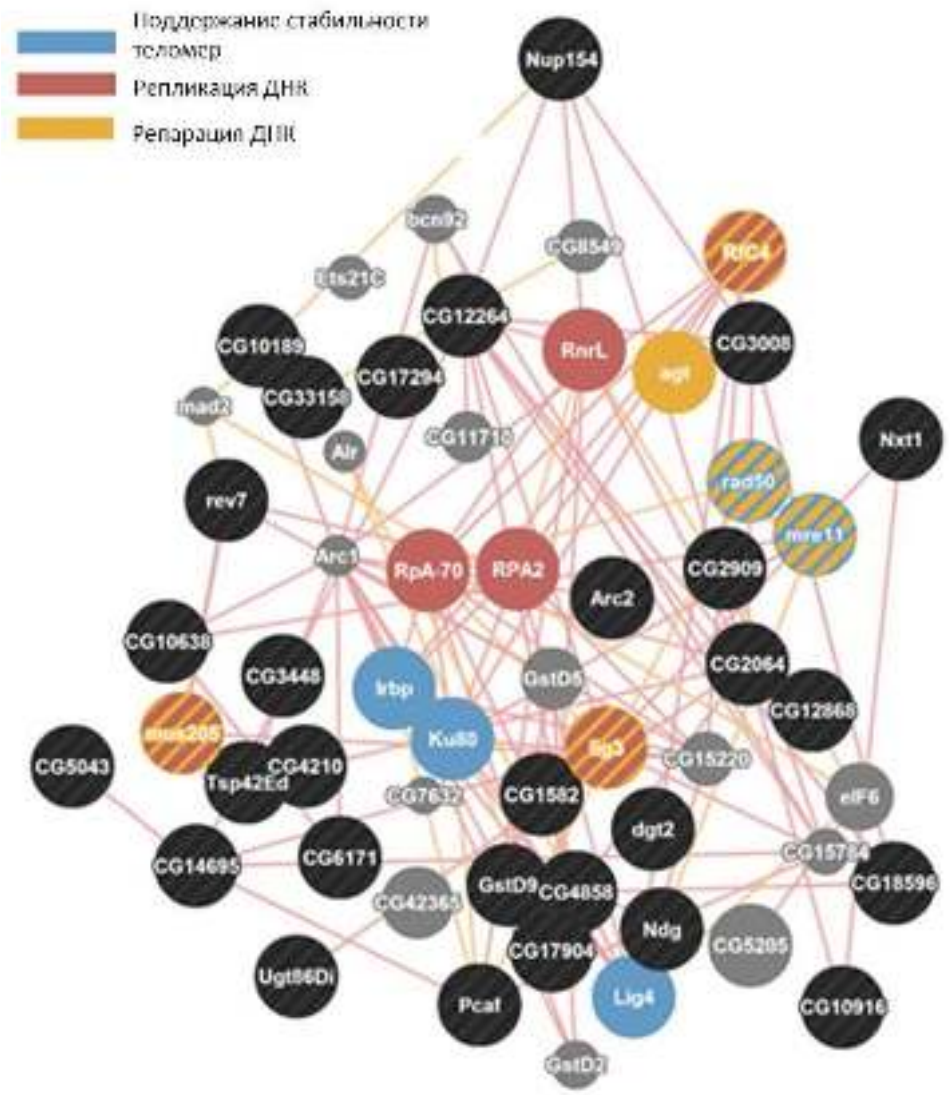


Рисунок 13 – Фрагмент сети взаимодействия 50ти белков, экспрессия которых увеличилась пропорционально дозе радиации.

Ген *Metchnikowin* (*Mtk*) оказался наиболее сверхэкспрессированным среди других в ответ на заражение грибками. Он кодирует белок из 26 аминокислот, обогащенный пролином и обладающий антибактериальными и противогрибковыми свойствами (Levashina et al, 1995). Индукция его экспрессии при активации иммунной системы опосредована действием пути Toll или действием продукта гена *imd* (Immune Deficiency) (Levashina et al, 1998). Повышенная экспрессия генов Toll-сигналинга и неизменная экспрессия гена *imd* говорят о том, что первый механизм играет важную роль в данном случае.

Второй среди генов с наибольшим повышением экспрессии, *Drosomycin*, кодирует высокоспецифичный противогрибковый пептид, активный только

против некоторых мицелиальных грибов (Zhang, Zhu, 2009, Tian et al, 2008). Так же как и в случае гена *Metchnikowin*, экспрессия гена *Drosomycin* регулируется Toll-сигналингом, представленным в жировом теле, в то время как индуцибельная локальная экспрессия этого гена в дыхательных путях контролируется геном *imd* (Zhang, Zhu, 2009). Гомологи *Drosomycin*, обладающие противогрибковой активностью, обнаружены также у человека (Simon et al, 2008).

GSEA с помощью раздела Биологические процессы онтологии GO позволил выявить, что дифференциально экспрессированные под воздействием голодания гены перепредставлены в различных метаболических процессах и, что более важно, в процессе, называемом в терминах GO, детерминация продолжительности жизни взрослой особи. Одним из таких генов является *Thor*. *Thor* играет важную роль в иммунной защите организма, а также является мишенью mTOR (Schmelzle, Hall, 2000). Этот ген кодирует белок-гомолог белка PHAS1/4E-BP млекопитающих, который, в свою очередь, является ключевым регулятором пути контроля инициации трансляции за счет способности связывать эукариотический фактор инициации 4E (eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E) (Bernal, Kimbrell, 2000). Таким образом, сверхактивация *Thor* в ответ на голодание ингибирует трансляцию и, соответственно, препятствует клеточному росту. Похожие изменения могут быть вызваны окислительным стрессом (Tettweiler et al, 2005), а также ранее была показа сверхэкспрессия этого гена в ответ на голодание разной длительности (Zinke et al, 2002, Tettweiler et al, 2005). Связь уровня экспрессии гена *Thor* с долголетием обусловлена его участием в путях *mTOR* и *MnSOD* (Curtis et al, 2007). Дифференциальная экспрессия *Thor* не обнаружена при воздействии других исследованных стресс-факторов.

Гены, сверхэкспрессированные в условиях ионизирующей радиации, обогащают в сумме 39 биологических процессов, два из которых, связанных с функцией теломер, активированы при всех трех исследованных дозах. Интересно отметить, что такие процессы, как репарация ДНК, ответ на повреждение ДНК, репарация двунитевых разрывов и другие, активация

которых характерна для облучения высокими дозами радиации, не обогащены дифференциально экспрессированными генами. Гены, вовлеченные в эти процессы, например, *lig3* (ДНК-лигаза III), *rad50* (белок репарации ДНК RAD50), *Ku80*, *Irbp* (белок, связывающийся с инвертированными повторами), *agt* (O-6-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансфераза), *mre11* (белок мейотической рекомбинации 11), and *mus205* (мутаген-чувствительный 205), оказались сверхэкспрессированы только при самой высокой из исследованных доз радиации – 864 Гр.

Процессы образования спермы и процессинга мРНК были обнаружены среди инактивированных в ответ на радиацию в 360 и 864 Гр. Радиационное воздействие в 360 Гр сопровождается низкой экспрессией генов, относящихся к 12-ти биологическим процессам, в том числе поведение при спаривании, сигнальный путь Notch, различные катаболические процессы. Сигнальный путь Notch играет роль во многих функциях организмах, и изменения в регуляции этого пути были и ранее идентифицированы в условиях ионизирующей радиации (Scharpfenecker et al, 2009). Среди биологических процессов, регуляция которых изменяется при дозе 864 Гр, также обнаружены процессы, связанные с репродуктивной функцией организма. Так как ионизирующая радиация может привести к стерилизации насекомых (Siritientong et al, 2011), изменение уровня экспрессии генов, связанных с размножением, ожидаемо.

Анализ представленности функциональных групп генов с помощью базы KEGG показал не только большое количество дифференциально экспрессированных генов, относящихся к метаболизму и различным процессам молекулярного синтеза, но также изменения в биосинтезе и функциях фолата. KEGG-пути фолат-опосредованного одноуглеродного метаболизма и биосинтеза фолата обогащены генами, дифференциально экспрессированными в ответ на все исследованные воздействия за исключением радиации в дозе 864 Гр. Фолаты являются донорами одноуглеродных молекул, поэтому они участвуют в разнообразных процессах от метилирования ДНК (Jacob, 2000) до синтеза пуринов *de novo* (Jacob, 2000), которые могут быть использованы в синтезе РНК и ДНК, в том

числе при репарации ДНК. Таким образом, изменения в биосинтезе фолатов может быть объяснен как реакция на голодание, холодовой шок или облучение радиацией, так как в этих случаях наблюдается необходимость в синтезе РНК или репарации.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В современных условиях любые явления, позволяющие не только продлить жизнь, но и улучшить ее качество становятся все более актуальными и притягивают к себе повышенное внимание. Именно поэтому изучение механизмов адаптивного стресс-ответа является одной из актуальных проблем. При этом особый интерес вызывает эффекты воздействия малых доз стресс-факторов, для которых показано проявление гормезиса. Однако определение уровня стресса, для которого проявляется гормезис, является отдельной задачей для каждого типа стресса и отдельного модельного животного. В большинстве случае стресс-фактор в такой концентрации приводит к разнонаправленным эффектам даже у особей одной популяции (Calabrese, 2008). В рамках представленной работы изучали воздействие крайне низких доз ионизирующего излучения, а также доз, приближенных к вызывающим строго негативный эффект, на экспрессионном уровне и путем сравнения с эффектом воздействия других стресс-факторов исследовали возможность обнаружения универсального механизма стресс-ответа.

Ранее в нашей лаборатории был проведен анализ дифференциальной экспрессии в ответ на малую дозу радиации (20 сГр) и химические агенты тулуол, формальдегид и диоксин (Moskalev et al, 2014). В результате были выявлены гены, кандидаты в участники стресс-ответа и молекулярного возникновения гормезиса. Однако данные, полученные с помощью секвенирования транскриптома, требуют подтверждения другими методами оценки относительного изменения экспрессии. В дополнение к этим генам *G13323, GstE3, CG18180, Keap1, CG42751, CG6295, CG6675, Fer3, CG9360, Cyp4e2, Hsp70Aa, Cyp6a20, per* были выбраны гены, роль которых в стресс-ответе показан ранее (Таблица 2), но для других концентраций и типов стресс-фактора. Анализ экспрессии в разные временные промежутки после воздействия позволяет выявить отложенные эффекты, которые могут быть ключевыми в развитии эффекта гормезиса (Edward et al, 2017).

При анализе влияния сверхмалых доз ионизирующей радиации на продолжительность жизни выявлен половой диморфизм. При этом отличается

не только продолжительность жизни у самцов и самок, но и относительное ее изменение вследствие облучения, а также эффект каждой из исследуемых доз (Таблица 1). Половой диморфизм продолжительности жизни является широкораспространенным явлением, однако его природа не вполне изучена (Promislow, 2003, Clutton-Brock, Isvaran, 2007). Существует несколько гипотез для объяснения этого явления. Например, было показано, что это явление более выражено в популяциях с беспорядочной системой спаривания по сравнению с моногамными сообществами (Promislow, 2003, Clutton-Brock, Isvaran, 2007). Беспорядочное спаривание приводит к повышению энергетических затрат для выживания самцов из-за высокой конкуренции между ними и более короткому эффективному периоду размножения по сравнению с самками. Предположительно это может быть причиной снижения отбора по факторам, повышающим продолжительность жизни самцов по сравнению с самками. Другие гипотеза рассматривают разную чувствительность самцов и самок к патогенным вариантам, накапливающимся в половых хромосомах (Trivers, 1985, Carazo et al, 2016), или возможность унаследования от матери митохондриальной ДНК, содержащей мутации, приводящие к вредным именно для самцов эффектам (Charlesworth, 1980). Также на продолжительность жизни самцов могут влиять мужские гормоны или феромоны самок, влияющие на активацию инсулиновых сигнальных путей (Gendron et al, 2014). Однако, ранее показана зависимость степени проявления полового диморфизма продолжительности жизни в зависимости от условий среды. Например, было показано, что степень различий достигает максимума при сокращении питательного контента стандартной диеты Drosophila melanogaster до 60% и минимума при критически высоких (более 130%) и низких (менее 30%) количествах питательных веществ (дрожжи и сахар) (Magwere et al, 2004). Различие в степени горметического эффекта для разных полов отмечено ранее для других типов стресса: теплового (Gomez et al, 2016), окислительного (Pomatto et al, 2017), голодания (Chandegra et al, 2017). Так как эффект малых доз ионизирущей радиации связывают именно с увеличением количества свободных радикалов, в том числе кислорода, и развитием окислительного стресса, представленные в этой работе данные согласуются с

ранее полученными.

Известно, что ингибирование инсулин/ИФР-1 (инсулиноподобный фактор роста 1) сигнального пути приводит к увеличению продолжительности жизни у мышей, *C. elegans, Drosophila*. При этом для *C. Elegans* показано, что этот эффект зависит от транскрипционного фактора Daf16 (Kenyon, 2005, Samuelson et al, 2007). Для наиболее похожего транскрипционного фактора Drosophila Foxo участие в регуляции продолжительности жизни, но и в различии этого показателя у самцов и самок (Giannakou et al, 200). Ранее было показано, что в отсутствие *foxo*, экспрессия *p53* приводит к увеличению продолжительности жизни у самцов и у самок (SHEN, TOWER, 2010). В нашем эксперименте на фоне неизменной экспрессии *p53* увеличение экспрессии гена *foxo* наблюдается у самцов в ответ на воздействие в 40сГр, которое характеризуется наименьшей медианной продолжительностью жизни из рассмотренных, у самок – снижение в ответ на воздействие в 5 сГр, которое привело к наиболее значительному увеличению показателей продолжительности жизни (Таблица 2). Наблюдаются и другие различия в динамике экспресионных профилей анализируемых генов: *mus309*, *CG18180*, *Hsp70Aa*, *Brca2*. При этом дифференциальная экспрессия генов *Hsp70Aa*, *PCNA*, а также *spn-B*, *mei-9*, *mei-41*, *mus309*, участвующих в репарации ДНК и ответе на разные типы стресса, у самцов и *Brca2*, *Hsp70Aa*, *CG18180* обнаружена только спустя сутки и более после окончания воздействия может свидетельствовать о том, что они являются вторичными мишенями ответа на радиационное воздействие в сверхмалых дозах. Однако большая биологическая вариабельность и разнонаправленность наблюдаемых эффектов мешает сделать более однозначные выводы. Так же отсутствие подтверждения транскриптомных данных, полученных ранее для некоторых исследованных генов, приводит к необходимости изучать стресс-индуцированные изменения на экспрессионном уровне для более значительных концентраций стресс-фактора. При этом увеличение дозы может приводить к снижению выраженности горметического эффекта или его отсутствию, однако выявление путей, регулирующих стресс-ответ при воздействии доз, не приводящих ни к гормезису, ни к снижению продолжительности жизни, может оказаться

необходимым промежуточным шагом перед открытием генов-участников положительного влияния малых доз стресса на продолжительность жизни.

Для более широкомасштабного изучения механизмов общего для стрессов разного типа и природы ответа были исследованы эффекты холодового шока, ионизирующей радиации, грибковой инфекции и голодания в разных дозах. При более высокой дозе любого из исследованных стрессов, кроме гипотермии, изменения на всех рассмотренных уровнях оказались более выраженными по сравнению с меньшими дозами. На молекулярном уровне транскрипционные изменения могут быть разделены на стресс-специфические и общие. Например, экспрессия генов репарации ДНК оказалась прямо пропорциональна радиационной дозе, что отражает дозозависимое повышение уровня повреждений ДНК.

Эффект ионизирующей радиации на экспрессию генов значительно отличается в зависимости от дозы. Для анализа эффекта воздействия ионизирующего излучения на экспрессионном уровне самцов облучали в дозах 144, 360 и 864 Гр. Они оказали негативный дозозависимый эффект на продолжительность жизни. Анализ профилей экспрессии позволяет предположить, что этот негативный эффект вызван не только двуцепочечными разрывами ДНК (прямой эффект), но и увеличение количества свободных радикалов, в том числе активных форм кислорода. Такие пути как репарация двуцепочечных разрывов ДНК, репарация ДНК и другие, активация которых характерна для прямого эффекта, обогащены дифференциально экспрессированными генами наравне с такими биологическими процессами, как окислительно-восстановительные процессы и ответ на окислительный стресс. Это позволяет предположить, что выбранные дозы являются промежуточными между теми, которые можно назвать малыми и теми, который наносят значительный вред здоровью. Это также согласуется с данными о том, что доза вызывающая гибель 50% выборки через двое суток после облучения (LD50/2) для самцов линии дикого типа Canton-S, облученных в возрасте 1 сут, составляет 1238 Гр (Parashar et al, 2008).

В дополнение к анализу продолжительности жизни также измеряли

локомоторную активность особей, подвергшихся воздействию различных стресс-факторов. Отсутствие корреляции между эффектом стресс-фактора на продолжительность жизни и на локомоторную активность позволяет предположить, что степень локомоторной активности не может являться адекватным биомаркером состояния организма плодовой мушки и не имеет решающего значения для выживания организма в нормальных условиях после воздействия стресса. Полученные данные свидетельствуют о том, что продолжительность жизни является интегральным показателем жизнеспособности и не отражает состояние определенных показателей, например, двигательной активности.

Некоторые транскрипционные изменения связаны с прямыми защитными и адаптационными реакциями (например, активация системы репарации и антиоксидантных процессов, изменения в поведении и чувствительности сигнальных путей), в то время как другие – с дисфункциями клеточных систем (например, нарушения биосинтетических процессов и метаболизма различных веществ, циркадного ритма и баланса между реакциями окисления и восстановления). В большинстве случаев наблюдалось сокращение продолжительности жизни под действием исследованных стресс-факторов, несмотря на свидетельства активации защитных механизмов, проявляющихся в обогащении сверхэкспрессированными генами таких путей, как ответ на окислительный стресс, сборка нуклеосом, ответ на повреждения ДНК, репарация ДНК, поддержание стабильности теломер.

В ответ на шесть и более воздействий оказались дифференциально экспрессированы 15 генов, при этом на 4 из них повлияли стрессы более двух типов, то есть стресс факторы помимо радиации и холодового стресса разных доз. Ген *Hsp22* оказался низко экспрессированным в условиях температуры +4°C и высоко экспрессированным в результате воздействия радиации в дозах от 144 до 864 Гр, а также холодового шока температур 0°C и -4°C. В дополнение к этому *Hsp70Aa* оказался низко экспрессирован под действием низких температур +4°C и 0°C и радиации в 360 Гр. В соответствии с результатами анализа экспрессии GFP-репортеров,

проведенными дополнительно в нашей лаборатории, этот ген оказался сверхэкспрессированным спустя сутки после воздействия холодового шока и радиации в дозе 864 Гр.

Экспрессия гена *CG6295* оказалась сниженной в случае семи воздействий трех стресс-факторов: ионизирующей радиации, голодания, холодового шока. Белок этого гена является липазой, участвующей в образовании свободных жирных кислот из липидов, поступающих в организм с пищей (Horne et al, 2009). При старении происходит изменение адаптивного метаболического процесса, в том числе снижение экспрессии этого гена (Karpac et al, 2013). Также такой эффект на его экспрессию оказывают окислительный стресс и радиационное воздействие в 20 сГр (Moskalev et al, 2014), что служит свидетельством важной роли гена *CG6295* в стресс-ответе. Возможно, энергетический метаболизм является ключевым процессом для ответа на стресс любого типа.

Гены *CG7381, CG14219, Npc1b, CG11911* оказались низкоэкспрессированными в ответ на радиационное воздействие, голодание и холодовой шок. В то время сходный эффект на экспрессию генов низких температур и голодания можно объяснить прямым влиянием этих стресс-факторов на метаболические процессы, влияние радиации интересно рассмотреть более подробно. Функции генов *CG7381*, *CG14219* и *CG11911* до сих пор остаются неизвестными (Guedes et al, 2003). Ген *Npc1b* (Niemann-Pick type C1) имеет несколько хорошо изученных ортологов и является геном белка, участвующего в абсорбции и внутриклеточном обороте стеролов (Voght et al, 2007). Снижение количества стеролов в результате голодания или радиационного воздействия могут привести к пониженной экспрессии этого гена и определять сходность метаболических изменений в ответ на разные стресс-факторы.

Ген *CG15068* оказался низко экспрессированным в условиях низких температур и высоко экспрессированным под действием радиации. Анализ с помощью генерализованной линейной модели выявил, что изменение экспрессии этого гена пропорционально дозе радиации ($p<0.05$). На сегодняшний день точная функция не известна, хотя в некоторых

исследованиях показано, что он кодирует белок, индуцируемый иммунной системой (McDonald, Rosbash, 2001). Воздействие радиации в небольших дозах активирует врожденный иммунитет посредством Toll сигналинга (Seong et al, 2012). Такой эффект может быть вызван изменением экспрессии гена *CG15068*.

Ранее в нашей лаборатории был проведен анализ дифференциальной экспрессии в ответ на малую дозу радиации (20 сГр) и химические агенты тулуол, формальдегид и диоксин (Moskalev et al, 2014). Процесс окисления-восстановления оказался среди проявивших наибольшие экспрессионные изменения в представленной работе и предыдущем исследовании. Также наблюдались изменения защитного характера, например, экспрессия протеосом, эксцизионная репарация нуклеотидов и оснований, убиквитин-зависимый протеолиз, белки теплового шока, изменения в которых обнаружены и в данном исследовании в результате воздействия радиации, грибков и голодания. Изменение экспрессии генов, участвующих в различных метаболических процессах, подвергшихся влиянию также и исследованных в данной работе стресс- факторов, было идентифицировано и при воздействии малых доз радиации, диоксина и тулуола (Moskalev et al, 2014).

ВЫВОДЫ

1) выявлен половой диморфизм в изменении продолжительности жизни в ответ на ионизирующее излучение в малых дозах. У самцов *Drosophila melanogaster* после воздействия ионизирующего излучения в дозе 10 сГр выявлен горметический эффект (увеличение медианной и максимальной продолжительности жизни на 3,4% и 4,2%, соответственно). У самок выявлен горметический эффект для доз 5 и 40 сГр (увеличение медианной на 4,5%, и 7,6%, соответственно).

2) половой диморфизм проявляется также и на экспрессионном уровне в виде различной динамики изменения экспрессии анализируемых генов. Дифференциальная экспрессия генов *CG18180, CG42751, Cyp4e2, Cyp6a20, spn-B, Hsp70Aa, mei-41, mei-9, PCNA, mus309, CG6295, CG13323, Brca2, GstE3* более проявляется у самцов по сравнению с самками для всех исследованных доз, кроме 40 сГр.

3) воздействие ионизирующей радиации в дозах 144 Гр, 360 Гр, 864 Гр, голодание в течение 16 часов, инфекция энтамопатогенными грибками приводили к снижению продолжительности жизни у самцов *Drosophila melanogaster*. Гипотремия при разных температурах (+4°C, 0°C, -4°C) не оказала эффекта на продолжительность жизни.

4) исследованные стресс-факторы негативно влияют на жизнеспособность организма и способствуют изменениям как в стресс-специфических, так и в общих клеточных механизмах ответа на стресс.

5) дифференциальная экспрессия генов метаболических путей наблюдалась при воздействии различных доз исследованных стресс-факторов, что позволяет предположить, что метаболические изменения являются общей для всех стрессов реакцией. Наиболее значимые нарушения этого пути оказались в условиях низких доз. Метаболизм и биосинтез фолатов были высоко или низко экспрессированы в случае всех исследованных воздействий, что отражает ключевую роль этих процессов в общем стресс-ответе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Акифьев А.П., Потапенко А.И., Рудаковская Е.Г. Ионизирующие излучения и 5-бром-2'-дезоксиуридин как инструменты анализа фундаментального механизма старения животных // Радиац. биол. Радиоэкол. 1997. Т.37. Вып.4. С. 613-620.

Вайсерман А.М. Влияние плотности популяции на личиночной и имагинальной стадиях онтогенеза на жизнеспособность и продолжительность жизни Drosophila melanogaster // Пробл. старения и долголетия. 1996. Т.6. №1-2. С.3-10.

Гаврилов Л. А., Гаврилова Н. С. Биология продолжительности жизни // М.: Наука, 1991. — 280 с.

Медведева О.В., Орлова К.Н., Большанин В.Ю. Нейросетевые технологии алгоритмизации по определению радиационного облучения в повседневной жизни человека // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований №10, 2014, стр. 17-20

Ткаченко Б.И., Пятина В.Ф. Физиология человека: Compedium. // 1996. С-Петербург. 424 с.

Abruzzi KC, Rodriguez J, Menet JS, Desrochers J, Zadina A, Luo W, Tkachev S, Rosbash M.Drosophila CLOCK target gene characterization: implications for circadian tissue-specific gene expression // Genes Dev. 2011 Nov 15;25(22):2374-86. doi: 10.1101/gad.174110.111.

Adams M.D., Soares M.B., Kerlavage A.R., Fields C., Venter J.C. Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library // Nat Genet. – 1993. – V. 4. – P. 373–380.

Akabayashi A, Wahlestedt C, Alexander JT, Leibowitz SF.Specific inhibition of endogenous neuropeptide Y synthesis in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses feeding behavior and insulin secretion // Brain Res Mol Brain Res. 1994 Jan;21(1-2):55-61.

Alina Sîrbu, Gráinne Kerr, Martin Crane, Heather J. RuskinRNA-Seq vs Dual- and Single-Channel Microarray Data: Sensitivity Analysis for Differential Expression and Clustering // PLoS One. 2012; 7(12): e50986.

Allisy A.Henry Becquerel: The discovery of radioactivity // Radiation Protection Dosimetry. – 1996. – Vol.68 - №1-2. – P. 3-10

Amis ES Jr, Butler PF, Applegate KE, Birnbaum SB, Brateman LF, Hevezi JM, Mettler FA, Morin RL, Pentecost MJ, Smith GG, Strauss KJ, Zeman RK; American College of Radiology..American College of Radiology white paper on radiation dose in medicine.// J Am Coll Radiol. 2007 May;4(5):272-84.

Anders S, Pyl PT, Huber W.HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data.// Bioinformatics. 2015 Jan 15;31(2):166-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638. Epub 2014 Sep 25.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF.Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.// Cancer Res. 2004 Aug 1;64(15):5245-50.

Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA.Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae.// Nature. 2003 May 8;423(6936):181-5.

Apel K, Hirt H.Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction.// Annu Rev Plant Biol. 2004;55:373-99. Review.

Ashburner M. Drosophila: A laboratory handbook.// Cold Spr. Harb. Lab. Press: 1989.1331 p.

Aviles H, Johnson MT, Monroy FP.Effects of cold stress on spleen cell proliferation and cytokine production during chronic Toxoplasma gondii infection.// Neuroimmunomodulation. 2004;11(2):93-102.

Azad MB, Chen Y, Gibson SB.Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment.// Antioxid Redox Signal. 2009 Apr;11(4):777-90. doi: 10.1089/ARS.2008.2270. Review.

Azzam EI, de Toledo SM, Raaphorst GP, Mitchel RE.Low-dose ionizing radiation decreases the frequency of neoplastic transformation to a level below the spontaneous rate in C3H 10T1/2 cells.// Radiat Res. 1996 Oct;146(4):369-73.

Bae K, Lee C, Sidote D, Chuang KY, Edery I.Circadian regulation of a Drosophila homolog of the mammalian Clock gene: PER and TIM function as positive regulators.// Mol Cell Biol. 1998 Oct;18(10):6142-51.

Banerjee SK, Aviles H, Fox MT, Monroy FP.Cold stress-induced modulation of cell immunity during acute Toxoplasma gondii infection in mice.// J Parasitol. 1999 Jun;85(3):442-7.

Bauer JH, Poon PC, Glatt-Deeley H, Abrams JM, Helfand SL.Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult Drosophila melanogaster extends life span.// Curr Biol. 2005 Nov 22;15(22):2063-8.

Benard G, Bellance N, Jose C, Melser S, Nouette-Gaulain K, Rossignol R.Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production.// Biochim Biophys Acta. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):698-709. doi: 10.1016/j.bbabio.2010.02.030. Epub 2010 Mar 10. Review.

Bernal A, Kimbrell DA.Drosophila Thor participates in host immune defense and connects a translational regulator with innate immunity.// Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May 23;97(11):6019-24.

Bhakta-Guha D, Efferth T.Hormesis: Decoding Two Sides of the Same Coin.// Pharmaceuticals (Basel). 2015 Dec 16;8(4):865-83. doi: 10.3390/ph8040865. Review.

Bhakti Chandegra, Jocelyn Lok Yee Tang, Haoyu Chi, Nazif AlicSexually dimorphic effects of dietary sugar on lifespan, feeding and starvation resistance in Drosophila// Aging (Albany NY) 2017 Dec; 9(12): 2521–2528. Published online 2017 Dec 4. doi: 10.18632/aging.101335

Bi X, Gong M, Srikanta D, Rong YS.Drosophila ATM and Mre11 are essential for the G2/M checkpoint induced by low-dose irradiation.// Genetics. 2005 Oct;171(2):845-7. Epub 2005 Jul 14.

Bi X, Wei SC, Rong YS.Telomere protection without a telomerase; the role of ATM and Mre11 in Drosophila telomere maintenance.// Curr Biol. 2004 Aug 10;14(15):1348-53.

Bienz M, Pelham HR.Heat shock regulatory elements function as an inducible enhancer in the Xenopus hsp70 gene and when linked to a heterologous promoter.// Cell. 1986 Jun 6;45(5):753-60.

Bijur GN, Davis RE, Jope RS.Rapid activation of heat shock factor-1 DNA binding by H2O2 and modulation by glutathione in human neuroblastoma and Alzheimer's disease cybrid cells.// Brain Res Mol Brain Res. 1999 Jul 23;71(1):69-

77.

Birt DF, Yaktine A, Duysen E.Glucocorticoid mediation of dietary energy restriction inhibition of mouse skin carcinogenesis.// J Nutr. 1999 Feb;129(2S Suppl):571S-574S. doi: 10.1093/jn/129.2.571S. Review.

Blagosklonny MV.Hormesis does not make sense except in the light of TOR-driven aging.// Aging (Albany NY). 2011 Nov;3(11):1051-62.

Blomquist T.M., Crawford E.L., Lovett J.L., Yeo J., Stanoszek L.M., Levin A., Li J., Lu M., Shi L., Muldrew K., Willey J.C. Targeted RNA-Sequencing with Competitive Multiplex-PCR Amplicon Libraries// PLoS One. – 2013. – V. 8. - № 11. - e79120.

Boher F, Trefault N, Piulachs MD, Bellés X, Godoy-Herrera R, Bozinovic F.Biogeographic origin and thermal acclimation interact to determine survival and hsp90 expression in Drosophila species submitted to thermal stress.// Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2012 Aug;162(4):391-6. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.04.017. Epub 2012 Apr 27.

Boileau TW, Liao Z, Kim S, Lemeshow S, Erdman JW Jr, Clinton SK.Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets.// J Natl Cancer Inst. 2003 Nov 5;95(21):1578-86.

Bosch-Presegué L, Raurell-Vila H, Marazuela-Duque A, Kane-Goldsmith N, Valle A, Oliver J, Serrano L, Vaquero A.Stabilization of Suv39H1 by SirT1 is part of oxidative stress response and ensures genome protection.// Mol Cell. 2011 Apr 22;42(2):210-23. doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.034.

Brack C., Ackermann R., Shikama N., Thuring E., Labuhn M. Drosophila as a model system for molecular gerontology// Molecular Gerontology, New York: Plenum Press. 1996. P.151-176.

Breese CR, Ingram RL, Sonntag WE.Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins.// J Gerontol. 1991 Sep;46(5):B180-7.

Brenner S., Johnson M., Bridgham J., Golda G., Lloyd D.H., Johnson D., Luo S., McCurdy S., Foy M., Ewan M., Roth R., George D., Eletr S., Albrecht G., Vermaas E., Williams S.R., Moon K., Burcham T., Pallas M., DuBridge R.B.,

Kirchner J., Fearon K., Mao J., Corcoran K. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays// Nat Biotechnol. – 2000. – V. 18. – P. 630–634.

Breslow AThickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma// Ann Surg. 1970 Nov;172(5):902-8.

Brodsky MH, Nordstrom W, Tsang G, Kwan E, Rubin GM, Abrams JM.Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus.// Cell. 2000 Mar 31;101(1):103-13.

Bronson RT, Lipman RD.Reduction in rate of occurrence of age related lesions in dietary restricted laboratory mice.// Growth Dev Aging. 1991 Fall;55(3):169-84.

Brough R, Wei D, Leulier S, Lord CJ, Rong YS, Ashworth A.Functional analysis of Drosophila melanogaster BRCA2 in DNA repair.// DNA Repair (Amst). 2008 Jan 1;7(1):10-9. Epub 2007 Sep 5.

Brown IR, Rush SJ.Cellular localization of the heat shock transcription factors HSF1 and HSF2 in the rat brain during postnatal development and following hyperthermia.// Brain Res. 1999 Mar 13;821(2):333-40.

Burger JM, Promislow DE.Sex-specific effects of interventions that extend fly life span.// Sci Aging Knowledge Environ. 2004 Jul 14;2004(28):pe30.

Butov A, Johnson T, Cypser J, Sannikov I, Volkov M, Sehl M, Yashin A.Hormesis and debilitation effects in stress experiments using the nematode worm Caenorhabditis elegans: the model of balance between cell damage and HSP levels.// Exp Gerontol. 2001 Dec;37(1):57-66.

Cabelof DC, Yanamadala S, Raffoul JJ, Guo Z, Soofi A, Heydari AR.Caloric restriction promotes genomic stability by induction of base excision repair and reversal of its age-related decline.// DNA Repair (Amst). 2003 Mar 1;2(3):295-307.

Calabrese E. J. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists // Environmental toxicology and chemistry, SETAC. - 2008. - Vol. 27. - № 7. - P. 1451-1474.

Calabrese EJ, Baldwin LA.Defining hormesis.// Hum Exp Toxicol. 2002 Feb;21(2):91-7.

Calabrese EJ, Baldwin LA.Radiation hormesis: its historical foundations as a

biological hypothesis.// Hum Exp Toxicol. 2000 Jan;19(1):41-75. Review.

Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Iavicoli I, Di Paola R, Koverech A, Cuzzocrea S, Rizzarelli E, Calabrese EJ.Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity.// Biochim Biophys Acta. 2012 May;1822(5):753-83. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.11.002. Epub 2011 Nov 6. Review.

Cale J.M., Shaw C.E., Bird I.M. Optimization of a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) mass assay for low-abundance mRNA// Methods Mol Biol. – 1998. – V. 105. – P. 351–371.

Carazo P, Green J, Sepil I, Pizzari T, Wigby S.Inbreeding removes sex differences in lifespan in a population of Drosophila melanogaster.// Biol Lett. 2016 Jun;12(6). pii: 20160337. doi: 10.1098/rsbl.2016.0337.

Casciano DA, Chou M, Lyn-Cook LE, Aidoo A.Calorie restriction modulates chemically induced in vivo somatic mutation frequency.// Environ Mol Mutagen. 1996;27(2):162-4. No abstract available.

Chadwick W, Little TJ.A parasite-mediated life-history shift in Daphnia magna.// Proc Biol Sci. 2005 Mar 7;272(1562):505-9.

Charlesworth B. Evolution in age-structured populations. // Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1980

Chen H, Boutros PC.VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R.// BMC Bioinformatics. 2011 Jan 26;12:35. doi: 10.1186/1471-2105-12-35.

Chen T, Cao X.Stress for maintaining memory: HSP70 as a mobile messenger for innate and adaptive immunity.// Eur J Immunol. 2010 Jun;40(6):1541-4. doi: 10.1002/eji.201040616. Review.

Chen Y, Azad MB, Gibson SB.Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy.// Cell Death Differ. 2009 Jul;16(7):1040-52. doi: 10.1038/cdd.2009.49. Epub 2009 May 1.

Chen Y, Gibson SB.Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy?// Autophagy. 2008 Feb;4(2):246-8. Epub 2007 Dec 14. Review.

Chen Y, Klionsky DJ.The regulation of autophagy - unanswered questions.// J

Cell Sci. 2011 Jan 15;124(Pt 2):161-70. doi: 10.1242/jcs.064576. Review.

Chong KY, Lai CC, Lille S, Chang C, Su CY.Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection.// J Mol Cell Cardiol. 1998 Mar;30(3):599-608.

Chuang SY, Lin CH, Fang JY.Natural compounds and aging: between autophagy and inflammasome.// Biomed Res Int. 2014;2014:297293. doi: 10.1155/2014/297293. Epub 2014 Sep 14. Review.

Chung HY, Lee EK, Choi YJ, Kim JM, Kim DH, Zou Y, Kim CH, Lee J, Kim HS, Kim ND, Jung JH, Yu BP.Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases.// J Dent Res. 2011 Jul;90(7):830-40. doi: 10.1177/0022034510387794. Epub 2011 Mar 29. Review.

Chung MH, Kasai H, Nishimura S, Yu BP.Protection of DNA damage by dietary restriction.// Free Radic Biol Med. 1992;12(6):523-5.

Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L.Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein.// Science. 2001 Apr 6;292(5514):104-6.

Clanton R, Saucier D, Ford J, Akabani G.Microbial influences on hormesis, oncogenesis, and therapy: A review of the literature.// Environ Res. 2015 Oct;142:239-56. doi: 10.1016/j.envres.2015.06.026. Epub 2015 Jul 14. Review.

Clutton-Brock TH, Isvaran K.Sex differences in ageing in natural populations of vertebrates.// Proc Biol Sci. 2007 Dec 22;274(1629):3097-104.

Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA.Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase.// Science. 2004 Jul 16;305(5682):390-2. Epub 2004 Jun 17.

Colinet H, Siaussat D, Bozzolan F, Bowler K.Rapid decline of cold tolerance at young age is associated with expression of stress genes in Drosophila melanogaster.// J Exp Biol. 2013 Jan 15;216(Pt 2):253-9. doi: 10.1242/jeb.076216. Epub 2012 Sep 20.

Conti B, Sanchez-Alavez M, Winsky-Sommerer R, Morale MC, Lucero J, Brownell S, Fabre V, Huitron-Resendiz S, Henriksen S, Zorrilla EP, de Lecea L, Bartfai T.Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased

life span.// Science. 2006 Nov 3;314(5800):825-8.

Coschigano KT, Clemmons D, Bellush LL, Kopchick JJ.Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice.// Endocrinology. 2000 Jul;141(7):2608-13.

Crawford DR, Davies KJ.Adaptive response and oxidative stress.// Environ Health Perspect. 1994 Dec;102 Suppl 10:25-8. Review.

Crump KS, Duport P, Jiang H, Shilnikova NS, Krewski D, Zielinski JM.A meta-analysis of evidence for hormesis in animal radiation carcinogenesis, including a discussion of potential pitfalls in statistical analyses to detect hormesis.// J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2012;15(3):210-31. doi: 10.1080/10937404.2012.659140. Review.

Cuervo AM, Dice JF.How do intracellular proteolytic systems change with age?// Front Biosci. 1998 Jan 1;3:d25-43. Review.

Curtis C, Landis GN, Folk D, Wehr NB, Hoe N, Waskar M, Abdueva D, Skvortsov D, Ford D, Luu A, Badrinath A, Levine RL, Bradley TJ, Tavaré S, Tower J.Transcriptional profiling of MnSOD-mediated lifespan extension in Drosophila reveals a species-general network of aging and metabolic genes.// Genome Biol. 2007;8(12):R262. Erratum in: Genome Biol. 2016;17(1):93.

Cypser JR, Johnson TE.Multiple stressors in Caenorhabditis elegans induce stress hormesis and extended longevity.// J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2002 Mar;57(3):B109-14.

D.R. Cox, David OakesAnalysis of Survival Data// CRC Press, 1984

Daiber A.Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species.// Biochim Biophys Acta. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):897-906. doi: 10.1016/j.bbabio.2010.01.032. Epub 2010 Feb 1. Review.

David A. Pyke, John N. ThompsonStatistical Analysis of Survival and Removal Rate Experiments// Ecology - 1986. - Volume 67, Issue 1

D'Costa AP, Lenham JE, Ingram RL, Sonntag WE.Moderate caloric restriction increases type 1 IGF receptors and protein synthesis in aging rats.// Mech Ageing Dev. 1993 Oct 1;71(1-2):59-71.

De Gregorio E, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B.Genome-wide analysis

of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays.// Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Oct 23;98(22):12590-5. Epub 2001 Oct 16.

Defays R, Gómez FH, Sambucetti P, Scannapieco AC, Loeschcke V, Norry FM.Quantitative trait loci for longevity in heat-stressed Drosophila melanogaster.// Exp Gerontol. 2011 Oct;46(10):819-26. doi: 10.1016/j.exger.2011.07.003. Epub 2011 Jul 21.

Dempsey JL, Pfeiffer M, Morley AA.Effect of dietary restriction on in vivo somatic mutation in mice.// Mutat Res. 1993 Apr;291(2):141-5.

Dewaele M, Maes H, Agostinis P.ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy.// Autophagy. 2010 Oct;6(7):838-54. Epub 2010 Oct 19. Review.

Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D., Siebert P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries// Proc Natl Acad Sci USA. – 1996. – V. 93. - № 12. – P. 6025-30.

Dobrzyński L, Fornalski KW, Feinendegen LE.Cancer Mortality Among People Living in Areas With Various Levels of Natural Background Radiation.// Dose Response. 2015 Jul 2;13(3):1559325815592391. doi: 10.1177/1559325815592391. eCollection 2015 Jul-Sep.

Dorion S, Landry J.Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock.// Cell Stress Chaperones. 2002 Apr;7(2):200-6. Review.

Doss M.Evidence supporting radiation hormesis in atomic bomb survivor cancer mortality data.// Dose Response. 2012 Dec;10(4):584-92. doi: 10.2203/dose-response.12-023.Doss. Epub 2012 Jul 13.

Driver C.A further comment on why the Gompertz plot does not measure aging.// Biogerontology. 2003;4(5):325-7. No abstract available.

Duan W, Mattson MP.Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease.// J Neurosci Res. 1999 Jul 15;57(2):195-206.

Edward J. Calabresecorresponding author, Mark P. MattsonHow does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?// NPJ Aging Mech Dis. 2017;

3: 13.

Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstein B, Herker E, et al.Induction of autophagy by spermidine promotes longevity.// Nat Cell Biol. 2009 Nov;11(11):1305-14. doi: 10.1038/ncb1975. Epub 2009 Oct 4.

Ekengren S, Hultmark D.A family of Turandot-related genes in the humoral stress response of Drosophila.// Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jun 22;284(4):998-1003.

Ekengren S, Tryselius Y, Dushay MS, Liu G, Steiner H, Hultmark D.A humoral stress response in Drosophila.// Curr Biol. 2001 May 1;11(9):714-8.

Elmore E, Lao XY, Ko M, Rightnar S, Nelson G, Redpath J.Neoplastic transformation in vitro induced by low doses of 232 MeV protons.// Int J Radiat Biol. 2005 Apr;81(4):291-7.

Enns L, Bogen KT, Wizniak J, Murtha AD, Weinfeld M.Low-dose radiation hypersensitivity is associated with p53-dependent apoptosis.// Mol Cancer Res. 2004 Oct;2(10):557-66.

Ermolaeva MA, Segref A, Dakhovnik A, Ou HL, Schneider JI, Utermöhlen O, Hoppe T, Schumacher B.DNA damage in germ cells induces an innate immune response that triggers systemic stress resistance.// Nature. 2013 Sep 19;501(7467):416-20. doi: 10.1038/nature12452. Epub 2013 Aug 25.

Fabrizio P, Gattazzo C, Battistella L, Wei M, Cheng C, McGrew K, Longo VD.Sir2 blocks extreme life-span extension.// Cell. 2005 Nov 18;123(4):655-67.

Fachin AL, Mello SS, Sandrin-Garcia P, Junta CM, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET.Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of gamma rays.// Radiat Res. 2007 Dec;168(6):650-65.

Feder ME, Hofmann GE.Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology.// Annu Rev Physiol. 1999;61:243-82. Review.

Feinendegen LE, Pollycove M, Sondhaus CA.Responses to low doses of ionizing radiation in biological systems.// Nonlinearity Biol Toxicol Med. 2004

Jul;2(3):143-71. doi: 10.1080/15401420490507431.

Feinendegen LE.Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis.// Br J Radiol. 2005 Jan;78(925):3-7.

Finkel T, Holbrook NJ.Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.// Nature. 2000 Nov 9;408(6809):239-47. Review.

Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential// Biotechniques. – 1999. – V. 26. – P. 112–125.

Fukuoka M, Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Umemura S, Fukamizu A.Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation.// Int J Mol Med. 2003 Oct;12(4):503-8.

Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, Motoyama N.FOXO transcription factors in cell-cycle regulation and the response to oxidative stress.// Antioxid Redox Signal. 2005 May-Jun;7(5-6):752-60. Review.

Gabai VL, Meriin AB, Yaglom JA, Volloch VZ, Sherman MY.Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging.// FEBS Lett. 1998 Oct 30;438(1-2):1-4. Review.

Gabai VL, Sherman MY.Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock.// J Appl Physiol (1985). 2002 Apr;92(4):1743-8. Review.

Garbuliński T, Obmińska-Domoradzka B, Switała M, Debowy J.Responses of neutrophils and lymphocytes in the cold stress: effects of nonsteroid anti-inflammatory drugs.// Pol J Pharmacol Pharm. 1991 Sep-Oct;43(5):353-9.

García-Cao I, García-Cao M, Martín-Caballero J, Criado LM, Klatt P, Flores JM, Weill JC, Blasco MA, Serrano M.Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally.// EMBO J. 2002 Nov 15;21(22):6225-35.

Garinis GA, van der Horst GT, Vijg J, Hoeijmakers JH.DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem.// Nat Cell Biol. 2008 Nov;10(11):1241-7. doi: 10.1038/ncb1108-1241. Review.

Gartner A, Akay A.Stress response: anything that doesn't kill you makes you stronger.// Curr Biol. 2013 Nov 18;23(22):R1012-4. doi: 10.1016/j.cub.2013.09.036.

Gavrilov LA, Gavrilova NSThe biology of life span: a quantitative approach. // Rev. and updated English ed. 1991, Chur—New York: Harwood Academic Publishers. 385.

Gems D, Partridge L.Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger".// Cell Metab. 2008 Mar;7(3):200-3. doi: 10.1016/j.cmet.2008.01.001. Review.

Gendron CM, Kuo TH, Harvanek ZM, Chung BY, Yew JY, Dierick HA, Pletcher SD.Drosophila life span and physiology are modulated by sexual perception and reward.// Science. 2014 Jan 31;343(6170):544-8. doi: 10.1126/science.1243339. Epub 2013 Nov 29.

Gentry A, Venkatachalam S.Complicating the role of p53 in aging.// Aging Cell. 2005 Jun;4(3):157-60. Erratum in: Aging Cell. 2005 Dec;4(6):343.

Ghabrial A, Ray RP, Schüpbach T.okra and spindle-B encode components of the RAD52 DNA repair pathway and affect meiosis and patterning in Drosophila oogenesis.// Genes Dev. 1998 Sep 1;12(17):2711-23.

Giagnoni G, Santagostino A, Senini R, Fumagalli P, Gori E.Cold stress in the rat induces parallel changes in plasma and pituitary levels of endorphin and ACTH.// Pharmacol Res Commun. 1983 Jan;15(1):15-21.

Giannakou ME, Goss M, Jünger MA, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L.Long-lived Drosophila with overexpressed dFOXO in adult fat body.// Science. 2004 Jul 16;305(5682):361. Epub 2004 Jun 10.

Giraudo M, Unnithan GC, Le Goff G, Feyereisen R.Regulation of cytochrome P450 expression in Drosophila: Genomic insights.// Pestic Biochem Physiol. 2010 Jun 1;97(2):115-122.

Gomez FH, Sambucetti P, Norry FM.Elevated extension of longevity by cyclically heat stressing a set of recombinant inbred lines of Drosophila melanogaster throughout their adult life.// Biogerontology. 2016 Nov;17(5-6):883-892. Epub 2016 Aug 3.

Gong WJ, Golic KG.Loss of Hsp70 in Drosophila is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration.// Genetics. 2006 Jan;172(1):275-86. Epub 2005 Oct 3.

Gosselin K, Abbadie C.Involvement of Rel/NF-kappa B transcription factors

in senescence.// Exp Gerontol. 2003 Nov-Dec;38(11-12):1271-83. Review.

Gotoh T, Vila-Caballer M, Liu J, Schiffhauer S, Finkielstein CV.Association of the circadian factor Period 2 to p53 influences p53's function in DNA-damage signaling.// Mol Biol Cell. 2015 Jan 15;26(2):359-72. doi: 10.1091/mbc.E14-05-0994. Epub 2014 Nov 19.

Greer EL, Dowlatshahi D, Banko MR, Villen J, Hoang K, Blanchard D, Gygi SP, Brunet A.An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in C. elegans.// Curr Biol. 2007 Oct 9;17(19):1646-56. Epub 2007 Sep 27.

Grether ME, Abrams JM, Agapite J, White K, Steller H.The head involution defective gene of Drosophila melanogaster functions in programmed cell death.// Genes Dev. 1995 Jul 15;9(14):1694-708.

Grivennikova VG, Vinogradov AD.Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I.// Biochim Biophys Acta. 2006 May-Jun;1757(5-6):553-61. Epub 2006 Apr 17. Review.

Grune T.Oxidative stress, aging and the proteasomal system.// Biogerontology. 2000;1(1):31-40. Review.

Guedes Sde M, Vitorino R, Tomer K, Domingues MR, Correia AJ, Amado F, Domingues P.Drosophila melanogaster larval hemolymph protein mapping.// Biochem Biophys Res Commun. 2003 Dec 19;312(3):545-54.

Guo Z, Ersoz A, Butterfield DA, Mattson MP.Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals: preservation of glucose and glutamate transport and mitochondrial function after exposure to amyloid beta-peptide, iron, and 3-nitropropionic acid.// J Neurochem. 2000 Jul;75(1):314-20.

Guo Z, Heydari A, Richardson A.Nucleotide excision repair of actively transcribed versus nontranscribed DNA in rat hepatocytes: effect of age and dietary restriction.// Exp Cell Res. 1998 Nov 25;245(1):228-38.

Gupta S, Deepti A, Deegan S, Lisbona F, Hetz C, Samali A.HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1alpha-XBP1 signaling through a physical interaction.// PLoS Biol. 2010 Jul 6;8(7):e1000410. doi: 10.1371/journal.pbio.1000410.

Halagappa VK, Guo Z, Pearson M, Matsuoka Y, Cutler RG, Laferla FM,

Mattson MP.Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease.// Neurobiol Dis. 2007 Apr;26(1):212-20. Epub 2007 Jan 13.

Haley-Zitlin V, Richardson A.Effect of dietary restriction on DNA repair and DNA damage.// Mutat Res. 1993 Dec;295(4-6):237-45. Review.

Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A.Does oxidative damage to DNA increase with age?// Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Aug 28;98(18):10469-74. Epub 2001 Aug 21.

Hardie DG.AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism.// Int J Obes (Lond). 2008 Sep;32 Suppl 4:S7-12. doi: 10.1038/ijo.2008.116. Review.

Harvey KF, Pfleger CM, Hariharan IK.The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis.// Cell. 2003 Aug 22;114(4):457-67.

He LQ, Lu JH, Yue ZY.Autophagy in ageing and ageing-associated diseases.// Acta Pharmacol Sin. 2013 May;34(5):605-11. doi: 10.1038/aps.2012.188. Epub 2013 Feb 18. Review.

Heilbronn LK, Civitarese AE, Bogacka I, Smith SR, Hulver M, Ravussin E.Glucose tolerance and skeletal muscle gene expression in response to alternate day fasting.// Obes Res. 2005 Mar;13(3):574-81.

Hercus MJ, Loeschcke V, Rattan SI.Lifespan extension of Drosophila melanogaster through hormesis by repeated mild heat stress.// Biogerontology. 2003;4(3):149-56.

Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R, Richardson A.Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription.// Mol Cell Biol. 1993 May;13(5):2909-18.

Heydari AR, You S, Takahashi R, Gutsmann-Conrad A, Sarge KD, Richardson A.Age-related alterations in the activation of heat shock transcription factor 1 in rat hepatocytes.// Exp Cell Res. 2000 Apr 10;256(1):83-93.

Hipkiss AR.Dietary restriction, glycolysis, hormesis and ageing.// Biogerontology. 2007 Apr;8(2):221-4. Epub 2006 Sep 13.

Hipkiss AR.On the mechanisms of ageing suppression by dietary restriction-is

persistent glycolysis the problem?// Mech Ageing Dev. 2006 Jan;127(1):8-15. Epub 2005 Nov 7. Review.

Hirsch HR.Do intersections of mortality-rate and survival functions have significance?// Exp Gerontol. 1995 Mar-Apr;30(2):147-67.

Holehan AM, Merry BJ.The experimental manipulation of ageing by diet.// Biol Rev Camb Philos Soc. 1986 Nov;61(4):329-68. Review. No abstract available.

Holloszy JO, Smith EK.Longevity of cold-exposed rats: a reevaluation of the "rate-of-living theory".// J Appl Physiol (1985). 1986 Nov;61(5):1656-60.

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y.IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice.// Nature. 2003 Jan 9;421(6919):182-7. Epub 2002 Dec 4.

Hooker AM, Bhat M, Day TK, Lane JM, Swinburne SJ, Morley AA, Sykes PJ.The linear no-threshold model does not hold for low-dose ionizing radiation.// Radiat Res. 2004 Oct;162(4):447-52.

Horne BD, Muhlestein JB, Anderson JL.Health effects of intermittent fasting: hormesis or harm? A systematic review.// Am J Clin Nutr. 2015 Aug;102(2):464-70. doi: 10.3945/ajcn.115.109553. Epub 2015 Jul 1. Review.

Horne I, Haritos VS, Oakeshott JG.Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects.// Insect Biochem Mol Biol. 2009 Aug;39(8):547-67. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.06.002. Epub 2009 Jun 18.

Hsiao L., Stears R., Hong R., Gullans S. Prospective use of DNA microarrays for evaluating renal function and disease// Curr Opin Nephrol Hypertens. – 2000. – V. 9. – P. 253–258.

Huang H, Tindall DJ.FOXO factors: a matter of life and death.// Future Oncol. 2006 Feb;2(1):83-9. Review.

Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN, Barrett JC.Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans.// Annu Rev Med. 2003;54:131-52. Epub 2001 Dec 3. Review.

Hyun DH, Emerson SS, Jo DG, Mattson MP, de Cabo R.Calorie restriction up-regulates the plasma membrane redox system in brain cells and suppresses oxidative stress during aging.// Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec

26;103(52):19908-12. Epub 2006 Dec 13.

Ikeda T, Yasui C, Hoshino K, Arikawa K, Nishikawa Y.Influence of lactic acid bacteria on longevity of Caenorhabditis elegans and host defense against salmonella enterica serovar enteritidis.// Appl Environ Microbiol. 2007 Oct;73(20):6404-9. Epub 2007 Aug 17.

Imahori Y, Takemura M, Bai J. Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume (Prunus mume) fruit during low temperature storage. // Postharvest Biol Technol. 2008;49(1):54–60. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.10.017.

Jacob RA.Folate, DNA methylation, and gene expression: factors of nature and nurture.// Am J Clin Nutr. 2000 Oct;72(4):903-4. No abstract available.

Jain K.K. Applications of biochip and microarray systems in pharmacogenomics// Pharmacogenomics. – 2000. – V. 1. – P. 289–307.

Jain S, Bruot BC, Stevenson JR.Cold swim stress leads to enhanced splenocyte responsiveness to concanavalin A, decreased serum testosterone, and increased serum corticosterone, glucose, and protein.// Life Sci. 1996;59(3):209-18.

Janský L, Pospísilová D, Honzová S, Ulicný B, Srámek P, Zeman V, Kamínková J.Immune system of cold-exposed and cold-adapted humans.// Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 1996;72(5-6):445-50.

Janský L, Srámek P, Savĺiková J, Ulicný B, Janáková H, Horký K.Change in sympathetic activity, cardiovascular functions and plasma hormone concentrations due to cold water immersion in men.// Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 1996;74(1-2):148-52.

Jie Shen, John TowerDrosophila foxo acts in males to cause sexual-dimorphism in tissue-specific p53 life span effects// Exp Gerontol. 2010 Feb; 45(2): 97.

Jin L, Lim M, Zhao S, Sano Y, Simone BA, Savage JE, Wickstrom E, Camphausen K, Pestell RG, Simone NL.The metastatic potential of triple-negative breast cancer is decreased via caloric restriction-mediated reduction of the miR-17~92 cluster.// Breast Cancer Res Treat. 2014 Jul;146(1):41-50. doi: 10.1007/s10549-014-2978-7. Epub 2014 May 27.

Johnson JB, Summer W, Cutler RG, Martin B, Hyun DH, Dixit VD, Pearson

M, Nassar M, Telljohann R, Maudsley S, Carlson O, John S, Laub DR, Mattson MP.Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma.// Free Radic Biol Med. 2007 Mar 1;42(5):665-74. Epub 2006 Dec 14.

Johnson TE, de Castro E, Hegi de Castro S, Cypser J, Henderson S, Tedesco P.Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in Caenorhabditis elegans.// Exp Gerontol. 2001 Nov;36(10):1609-17. Review.

Johnson TE.A personal retrospective on the genetics of aging.// Biogerontology. 2002;3(1-2):7-12.

Joiner MC, Lambin P, Marples B.Adaptive response and induced resistance.// C R Acad Sci III. 1999 Feb-Mar;322(2-3):167-75. Review.

Jolly C, Morimoto RI.Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death.// J Natl Cancer Inst. 2000 Oct 4;92(19):1564-72. Review.

Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB.AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint.// Mol Cell. 2005 Apr 29;18(3):283-93.

Joyce EF, Tanneti SN, McKim KS.Drosophila hold'em is required for a subset of meiotic crossovers and interacts with the dna repair endonuclease complex subunits MEI-9 and ERCC1.// Genetics. 2009 Jan;181(1):335-40. doi: 10.1534/genetics.108.093104. Epub 2008 Oct 28.

Jünger MA, Rintelen F, Stocker H, Wasserman JD, Végh M, Radimerski T, Greenberg ME, Hafen E.The Drosophila forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling.// J Biol. 2003;2(3):20. Epub 2003 Aug 7.

Kaeberlein M, Powers RW 3rd, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK.Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients.// Science. 2005 Nov 18;310(5751):1193-6.

Kahn A, Olsen A.Stress to the rescue: is hormesis a 'cure' for aging?// Dose Response. 2009 Dec 7;8(1):48-52. doi: 10.2203/dose-response.09-031.Olsen.

Kain SR, Adams M, Kondepudi A, Yang TT, Ward WW, Kitts P.Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization.// Biotechniques. 1995 Oct;19(4):650-5.

Kalajdzic P, Oehler S, Reczko M, Pavlidi N, Vontas J, Hatzigeorgiou AG, Savakis C.Use of mutagenesis, genetic mapping and next generation transcriptomics to investigate insecticide resistance mechanisms.// PLoS One. 2012;7(6):e40296. doi: 10.1371/journal.pone.0040296. Epub 2012 Jun 29.

Kalenova LF, Sukhovei YG, Fisher TA.Specific and nonspecific reactions of mouse immune system under the effect of short-term exposure in warm and/or cold water.// Bull Exp Biol Med. 2005 Dec;140(6):720-2.

Kang CM, Kristal BS, Yu BP.Age-related mitochondrial DNA deletions: effect of dietary restriction.// Free Radic Biol Med. 1998 Jan 1;24(1):148-54.

Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S.Regulation of lifespan in Drosophila by modulation of genes in the TOR signaling pathway.// Curr Biol. 2004 May 25;14(10):885-90.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations.// Journal of the American Statistical Association. 1958;53:457–81.

Karpac J, Biteau B, Jasper H.Misregulation of an adaptive metabolic response contributes to the age-related disruption of lipid homeostasis in Drosophila.// Cell Rep. 2013 Sep 26;4(6):1250-61. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.004. Epub 2013 Sep 12.

Karpac J, Younger A, Jasper H.Dynamic coordination of innate immune signaling and insulin signaling regulates systemic responses to localized DNA damage.// Dev Cell. 2011 Jun 14;20(6):841-54. doi: 10.1016/j.devcel.2011.05.011.

Kawazoe Y, Tanabe M, Sasai N, Nagata K, Nakai A.HSF3 is a major heat shock responsive factor duringchicken embryonic development.// Eur J Biochem. 1999 Oct;265(2):688-97.

Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R.A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type.// Nature. 1993 Dec 2;366(6454):461-4.

Kenyon C.The plasticity of aging: insights from long-lived mutants.// Cell. 2005 Feb 25;120(4):449-60. Review.

Khazaeli AA, Tatar M, Pletcher SD, Curtsinger JW.Heat-induced longevity

extension in Drosophila. I. Heat treatment, mortality, and thermotolerance.// J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1997 Jan;52(1):B48-52.

Kiang JG, Tsokos GC.Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology.// Pharmacol Ther. 1998 Nov;80(2):183-201. Review.

Kim D, Kim SH, Li GC.Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression.// Biochem Biophys Res Commun. 1999 Jan 8;254(1):264-8.

Kim DH, Kim JY, Yu BP, Chung HY.The activation of NF-kappaB through Akt-induced FOXO1 phosphorylation during aging and its modulation by calorie restriction.// Biogerontology. 2008 Feb;9(1):33-47. Epub 2007 Oct 31.

Kim DH, Park MH, Lee EK, Choi YJ, Chung KW, Moon KM, Kim MJ, An HJ, Park JW, Kim ND, Yu BP, Chung HY.The roles of FoxOs in modulation of aging by calorie restriction.// Biogerontology. 2015 Feb;16(1):1-14. doi: 10.1007/s10522-014-9519-y. Epub 2014 Aug 22. Review.

Kim H, Bernard ME, Flickinger J, Epperly MW, Wang H, Dixon TM, Shields D, Houghton F, Zhang X, Greenberger JS.The autophagy-inducing drug carbamazepine is a radiation protector and mitigator.// Int J Radiat Biol. 2011 Oct;87(10):1052-60. doi: 10.3109/09553002.2011.587860. Epub 2011 Jul 5.

Kimmelman AC.The dynamic nature of autophagy in cancer.// Genes Dev. 2011 Oct 1;25(19):1999-2010. doi: 10.1101/gad.17558811. Review.

King V., Tower J. Aging-specific expression of Drosophila Hsp22 // Dev. Biol. 1999. V. 207. №1. P. 107-118.

Kirkwood TB.Deciphering death: a commentary on Gompertz (1825) 'On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies'.// Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015 Apr 19;370(1666). pii: 20140379. doi: 10.1098/rstb.2014.0379. Review.

Kirkwood TB.Understanding the odd science of aging.// Cell. 2005 Feb 25;120(4):437-47. Review.

Klass MR.Aging in the nematode Caenorhabditis elegans: major biological and environmental factors influencing life span.// Mech Ageing Dev. 1977 Nov-

Dec;6(6):413-29.

Klurfeld DM, Welch CB, Lloyd LM, Kritchevsky D.Inhibition of DMBA-induced mammary tumorigenesis by caloric restriction in rats fed high-fat diets.// Int J Cancer. 1989 May 15;43(5):922-5.

Ko SJ, Liao XY, Molloi S, Elmore E, Redpath JL.Neoplastic transformation in vitro after exposure to low doses of mammographic-energy X rays: quantitative and mechanistic aspects.// Radiat Res. 2004 Dec;162(6):646-54.

Kooistra R, Vreeken K, Zonneveld JB, de Jong A, Eeken JC, Osgood CJ, Buerstedde JM, Lohman PH, Pastink A.The Drosophila melanogaster RAD54 homolog, DmRAD54, is involved in the repair of radiation damage and recombination.// Mol Cell Biol. 1997 Oct;17(10):6097-104.

Kouda K, Kohno H, Nakamura H, Ha-Kawa SK, Sonoda Y, Iki M.Technetium-99m-GSA clearance in mice under long-term dietary restriction.// Ann Nucl Med. 2009 Feb;23(2):123-9. doi: 10.1007/s12149-008-0217-1. Epub 2009 Feb 19.

Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T.ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation.// Cell Death Differ. 2007 Feb;14(2):230-9. Epub 2006 Jun 23.

Kristensen TN, Sørensen JG, Loeschcke V.Mild heat stress at a young age in Drosophila melanogaster leads to increased Hsp70 synthesis after stress exposure later in life.// J Genet. 2003 Dec;82(3):89-94.

Kroemer G, Mariño G, Levine B.Autophagy and the integrated stress response.// Mol Cell. 2010 Oct 22;40(2):280-93. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023. Review.

Kurella M., Hsiao L., Yoshida T., Randall J., Chow G., Sarang S., Jensen R., Gullans S. DNA microarray analysis of complex biologic processes// J Am Soc Nephrol. – 2001. – V. 12. – P. 1072–8.

Kusano K, Berres ME, Engels WR.Evolution of the RECQ family of helicases: A drosophila homolog, Dmblm, is similar to the human bloom syndrome gene.// Genetics. 1999 Mar;151(3):1027-39.

Labuhn M., Brack C.Age-related changes in the mRNA expression of actin isoforms in Drosophila melanogaster. // Gerontology. 1997. V. 43. №5. P. 261-267.

Lagisz M, Hector KL, Nakagawa S.Life extension after heat shock exposure: assessing meta-analytic evidence for hormesis.// Ageing Res Rev. 2013 Mar;12(2):653-60. doi: 10.1016/j.arr.2013.03.005. Epub 2013 Apr 6. Review.

Lakowski B, Hekimi S.The genetics of caloric restriction in Caenorhabditis elegans.// Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 27;95(22):13091-6.

Lam EW, Francis RE, Petkovic M.FOXO transcription factors: key regulators of cell fate.// Biochem Soc Trans. 2006 Nov;34(Pt 5):722-6.

Lamming DW, Latorre-Esteves M, Medvedik O, Wong SN, Tsang FA, Wang C, Lin SJ, Sinclair DA.HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction.// Science. 2005 Sep 16;309(5742):1861-4. Epub 2005 Jul 28.

LaRocque JR, Jaklevic B, Su TT, Sekelsky J.Drosophila ATR in double-strand break repair.// Genetics. 2007 Mar;175(3):1023-33. Epub 2006 Dec 28.

Lavelle C, Foray N.Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to radiobiology.// Int J Biochem Cell Biol. 2014 Apr;49:84-97. doi: 10.1016/j.biocel.2014.01.012. Epub 2014 Jan 29. Review.

Lawniczak MK, Barnes AI, Linklater JR, Boone JM, Wigby S, Chapman T.Mating and immunity in invertebrates.// Trends Ecol Evol. 2007 Jan;22(1):48-55. Epub 2006 Oct 6. Review.

Le Bourg E, Malod K, Massou I.The NF-κB-like factor DIF could explain some positive effects of a mild stress on longevity, behavioral aging, and resistance to strong stresses in Drosophila melanogaster.// Biogerontology. 2012 Aug;13(4):445-55. doi: 10.1007/s10522-012-9389-0. Epub 2012 Jul 13.

Le Bourg E, Massou I, Gobert V.Cold stress increases resistance to fungal infection throughout life in Drosophila melanogaster.// Biogerontology. 2009 Oct;10(5):613-25. doi: 10.1007/s10522-008-9206-y. Epub 2008 Dec 9.

Le Bourg É, Massou I.Fasting increases survival to cold in FOXO, DIF, autophagy mutants and in other genotypes of Drosophila melanogaster.// Biogerontology. 2015 Aug;16(4):411-21. doi: 10.1007/s10522-015-9557-0. Epub 2015 Feb 7.

Le Bourg E, Minois N, Bullens P, Baret P.A mild stress due to hypergravity exposure at young age increases longevity in Drosophila melanogaster males.// Biogerontology. 2000;1(2):145-55.

Le Bourg E, Minois N.Increased longevity and resistance to heat shock in Drosophila melanogaster flies exposed to hypergravity.// C R Acad Sci III. 1997 Mar;320(3):215-21.

Le Bourg E, Valenti P, Lucchetta P, Payre F.Effects of mild heat shocks at young age on aging and longevity in Drosophila melanogaster.// Biogerontology. 2001;2(3):155-64.

Le Bourg E, Valenti P, Payre F.Lack of hypergravity-associated longevity extension in Drosophila melanogaster flies overexpressing hsp70.// Biogerontology. 2002;3(6):355-64.

Le Bourg E.A cold stress applied at various ages can increase resistance to heat and fungal infection in aged Drosophila melanogaster flies.// Biogerontology. 2011 Jun;12(3):185-93. doi: 10.1007/s10522-010-9309-0. Epub 2010 Dec 4.

Le Bourg E.Combined effects of two mild stresses (cold and hypergravity) on longevity, behavioral aging, and resistance to severe stresses in Drosophila melanogaster.// Biogerontology. 2012 Jun;13(3):313-28. doi: 10.1007/s10522-012-9377-4. Epub 2012 Mar 4.

Le Bourg E.Hormetic effects of repeated exposures to cold at young age on longevity, aging and resistance to heat or cold shocks in Drosophila melanogaster.// Biogerontology. 2007 Aug;8(4):431-44. Epub 2007 Feb 23.

Le Bourg É.Life-time protection against severe heat stress by exposing young Drosophila melanogaster flies to a mild cold stress.// Biogerontology. 2016 Apr;17(2):409-15. doi: 10.1007/s10522-015-9629-1. Epub 2015 Dec 24.

Leakey JE, Chen S, Manjgaladze M, Turturro A, Duffy PH, Pipkin JL, Hart RW.Role of glucocorticoids and "caloric stress" in modulating the effects of caloric restriction in rodents.// Ann N Y Acad Sci. 1994 May 31;719:171-94. Review. No abstract available.

Lee J, Duan W, Mattson MP.Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice.// J

Neurochem. 2002 Sep;82(6):1367-75.

Lee J, Giordano S, Zhang J.Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling.// Biochem J. 2012 Jan 15;441(2):523-40. doi: 10.1042/BJ20111451. Review.

Lee N.H., Weinstock K.G., Kirkness E.F., Earle-Hughes J.A., Fuldner R.A., Marmaros S., Glodek A., Gocayne J.D., Adams M.D., Kerlavage A.R. Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment// Proc Natl Acad Sci USA. – 1995. – V. 92. – P. 8303–7.

Lee SJ, Kenyon C.Regulation of the longevity response to temperature by thermosensory neurons in Caenorhabditis elegans.// Curr Biol. 2009 May 12;19(9):715-22. doi: 10.1016/j.cub.2009.03.041. Epub 2009 Apr 16. Erratum in: Curr Biol. 2009 May 12;19(9):798.

Lehmann T.Ectoparasites: direct impact on host fitness.// Parasitol Today. 1993 Jan;9(1):8-13.

Leibowitz SF, Sladek C, Spencer L, Tempel D.Neuropeptide Y, epinephrine and norepinephrine in the paraventricular nucleus: stimulation of feeding and the release of corticosterone, vasopressin and glucose.// Brain Res Bull. 1988 Dec;21(6):905-12.

Lemaître JP, Delcourt A, Rousset A.Optimization of the detection of bacteriophages induced from Listeria sp.// Lett Appl Microbiol. 1997 Jan;24(1):51-4.

Leroy M, Mosser T, Manière X, Alvarez DF, Matic I.Pathogen-induced Caenorhabditis elegans developmental plasticity has a hormetic effect on the resistance to biotic and abiotic stresses.// BMC Evol Biol. 2012 Sep 21;12:187. doi: 10.1186/1471-2148-12-187.

Leszczynski D, Nylund R, Joenväärä S, Reivinen J.Applicability of discovery science approach to determine biological effects of mobile phone radiation.// Proteomics. 2004 Feb;4(2):426-31.

Levashina EA, Ohresser S, Bulet P, Reichhart JM, Hetru C, Hoffmann JA.Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from Drosophila with antibacterial and antifungal properties.// Eur J Biochem. 1995 Oct

15;233(2):694-700.

Levashina EA, Ohresser S, Lemaitre B, Imler JL.Two distinct pathways can control expression of the gene encoding the Drosophila antimicrobial peptide metchnikowin.// J Mol Biol. 1998 May 8;278(3):515-27.

Lewis SE, Goldspink DF, Phillips JG, Merry BJ, Holehan AM.The effects of aging and chronic dietary restriction on whole body growth and protein turnover in the rat.// Exp Gerontol. 1985;20(5):253-63.

Liang P., Pardee A.B.Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction// Science. – 1992. – V. 257. P. 967–971.

Liang X., So Y.H., Cui J., Ma K., Xu X., Zhao Y., Cai L., Li W.The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells.// J Radiat Res. 2011;52(3):380-6. Epub 2011 Mar 24.

Liepa GU, Masoro EJ, Bertrand HA, Yu BP.Food restriction as a modulator of age-related changes in serum lipids.// Am J Physiol. 1980 Mar;238(3):E253-7.

Lin SJ, Defossez PA, Guarente L.Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae.// Science. 2000 Sep 22;289(5487):2126-8.

Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi A, Wakai K, Kawamura T, Iso H, Ogimoto I, Yagyu K, Obata Y, Ishibashi T; JACC Study Group..Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly Japanese men and women.// Ann Epidemiol. 2005 Sep;15(8):590-7. Epub 2005 Jan 23.

Lints F.A., Lints C.V., Bullens P., Bourgois M., Delince J. Unexplained variations in life span of the Oregon-R strain of Drosophila melanogaster over a four-year period // Exp. Geront. 1989. V. 24. №3. P. 265-271.

Lipshutz R.J., Fodor S.P., Gingeras T.R., Lockhart D.J. High-density synthetic oligonucleotide array// Nat Genet. – 1999. – V. 21. – P. 20–24.

Lithgow GJ, White TM, Hinerfeld DA, Johnson TE.Thermotolerance of a long-lived mutant of Caenorhabditis elegans.// J Gerontol. 1994 Nov;49(6):B270-6.

Lithgow GJ, White TM, Melov S, Johnson TE.Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress.// Proc

Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 1;92(16):7540-4.

Liu D, Chan SL, de Souza-Pinto NC, Slevin JR, Wersto RP, Zhan M, Mustafa K, de Cabo R, Mattson MP.Mitochondrial UCP4 mediates an adaptive shift in energy metabolism and increases the resistance of neurons to metabolic and oxidative stress.// Neuromolecular Med. 2006;8(3):389-414.

Liu JW, Chandra D, Rudd MD, Butler AP, Pallotta V, Brown D, Coffer PJ, Tang DG.Induction of prosurvival molecules by apoptotic stimuli: involvement of FOXO3a and ROS.// Oncogene. 2005 Mar 17;24(12):2020-31.

Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M. Comparison of next-generation sequencing systems// J Biomed Biotechnol. – 2012. - 251364.

Liu RK, Walford RL.Observations on the lifespans of several species of annual fishes and of the world's smallest fishes.// Exp Gerontol. 1970 Sep;5(3):241-6. No abstract available.

Loeb J, Northrop JH.Is There a Temperature Coefficient for the Duration of Life?// Proc Natl Acad Sci U S A. 1916 Aug;2(8):456-7. No abstract available.

Lu J, Park JH, Liu AY, Chen KY.Activation of heat shock factor 1 by hyperosmotic or hypo-osmotic stress is drastically attenuated in normal human fibroblasts during senescence.// J Cell Physiol. 2000 Aug;184(2):183-90.

Luckey T.D.Hormesis with Ionizing Radiation.// Boca Raton: CRC Press, Inc.; 1980

Luckinbill LS.Selection for longevity confers resistance to low-temperature stress in Drosophila melanogaster.// J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1998 Mar;53(2):B147-53.

Luo YM, Cheng XJ, Yuan WX.Effects of ginseng root saponins and ginsenoside Rb1 on immunity in cold water swim stress mice and rats.// Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1993 Sep;14(5):401-4.

Ma S, Kong B, Liu B, Liu X.Biological effects of low-dose radiation from computed tomography scanning.// Int J Radiat Biol. 2013 May;89(5):326-33. doi: 10.3109/09553002.2013.756595. Epub 2013 Jan 8. Review.

Maeda H, Gleiser CA, Masoro EJ, Murata I, McMahan CA, Yu BP.Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: II. Pathology.// J Gerontol. 1985 Nov;40(6):671-88.

Magwere T, Chapman T, Partridge L.Sex differences in the effect of dietary restriction on life span and mortality rates in female and male Drosophila melanogaster.// J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2004 Jan;59(1):3-9.

Mahapatra CT, Rand MD.Methylmercury tolerance is associated with the humoral stress factor gene Turandot A.// Neurotoxicol Teratol. 2012 Jul;34(4):387-94. doi: 10.1016/j.ntt.2012.04.007. Epub 2012 Apr 24.

Mair W, Goymer P, Pletcher SD, Partridge L.Demography of dietary restriction and death in Drosophila.// Science. 2003 Sep 19;301(5640):1731-3.

Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R, Kroemer G.Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes.// Cell Death Differ. 2009 Jan;16(1):87-93. doi: 10.1038/cdd.2008.131. Epub 2008 Sep 19. Review.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G.Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis.// Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Sep;8(9):741-52. Review.

Mantel, NEvaluation of Survival Data and Two New Rank Order Statistics Arising in Its Consideration// Cancer Chemotherapy Reports 1996, 50, 163-170.

Martins I, Galluzzi L, Kroemer G.Hormesis, cell death and aging.// Aging (Albany NY). 2011 Sep;3(9):821-8. Review.

Masoro EJ, Iwasaki K, Gleiser CA, McMahan CA, Seo EJ, Yu BP.Dietary modulation of the progression of nephropathy in aging rats: an evaluation of the importance of protein.// Am J Clin Nutr. 1989 Jun;49(6):1217-27.

Masoro EJ, McCarter RJ, Katz MS, McMahan CA.Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use.// J Gerontol. 1992 Nov;47(6):B202-8. Erratum in: J Gerontol 1993 Mar;48(2):B73.

Masoro EJ, Yu BP, Bertrand HA.Action of food restriction in delaying the aging process.// Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Jul;79(13):4239-41.

Masoro EJ.Hormesis and the antiaging action of dietary restriction.// Exp Gerontol. 1998 Jan-Mar;33(1-2):61-6. Review.

Masoro EJ.Overview of caloric restriction and ageing.// Mech Ageing Dev. 2005 Sep;126(9):913-22. Review.

Masoro EJ.Role of hormesis in life extension by caloric restriction.// Dose

Response. 2006 Aug 19;5(2):163-73. doi: 10.2203/dose-response.06-005.Masoro.

Masoro EJ.Role of sirtuin proteins in life extension by caloric restriction.// Mech Ageing Dev. 2004 Sep;125(9):591-4. Review.

Maswood N, Young J, Tilmont E, Zhang Z, Gash DM, Gerhardt GA, Grondin R, Roth GS, Mattison J, Lane MA, Carson RE, Cohen RM, Mouton PR, Quigley C, Mattson MP, Ingram DK.Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease.// Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 28;101(52):18171-6. Epub 2004 Dec 16.

Mathew A, Morimoto RI.Role of the heat-shock response in the life and death of proteins.// Ann N Y Acad Sci. 1998 Jun 30;851:99-111. Review. No abstract available.

Matsumoto M, Accili D.All roads lead to FoxO.// Cell Metab. 2005 Apr;1(4):215-6.

Mattson MP, Cutler RG, Camandola S.Energy intake and amyotrophic lateral sclerosis.// Neuromolecular Med. 2007;9(1):17-20.

Mattson MP, Meffert MK.Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease.// Cell Death Differ. 2006 May;13(5):852-60. Review.

Mattson MP, Scheff SW.Endogenous neuroprotection factors and traumatic brain injury: mechanisms of action and implications for therapy.// J Neurotrauma. 1994 Feb;11(1):3-33. Review.

Mattson MP.Dietary factors, hormesis and health.// Ageing Res Rev. 2008 Jan;7(1):43-8. Epub 2007 Sep 1. Review.

McCay CM, Crowell MF, Maynard LA.The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935.// Nutrition. 1989 May-Jun;5(3):155-71; discussion 172. No abstract available.

McClelland M., Mathieu-Daude F., Welsh J. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR// Trends Genet. – 1995. – № 11. – P. 242–246.

McClure CD, Zhong W, Hunt VL, Chapman FM, Hill FV, Priest NK.Hormesis results in trade-offs with immunity.// Evolution. 2014 Aug;68(8):2225-33. doi: 10.1111/evo.12453. Epub 2014 Jun 20.

McDonald MJ, Rosbash M.Microarray analysis and organization of circadian gene expression in Drosophila.// Cell. 2001 Nov 30;107(5):567-78.

McGeoghegan D, Binks K.The mortality and cancer morbidity experience of workers at the Springfields uranium production facility, 1946-95.// J Radiol Prot. 2000 Jun;20(2):111-37. Erratum in: J Radiol Prot. 2006 Dec;26(4):455.

McKean KA, Nunney L.Increased sexual activity reduces male immune function in Drosophila melanogaster.// Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 3;98(14):7904-9. Epub 2001 Jun 19.

Melov S, Hinerfeld D, Esposito L, Wallace DC.Multi-organ characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial DNA rearrangements with age.// Nucleic Acids Res. 1997 Mar 1;25(5):974-82.

Menike U, Lee Y, Oh C, Wickramaarachchi WD, Premachandra HK, Park SC, Lee J, De Zoysa M.Oligo-microarray analysis and identification of stress-immune response genes from manila clam (Ruditapes philippinarum) exposure to heat and cold stresses.// Mol Biol Rep. 2014 Oct;41(10):6457-73. doi: 10.1007/s11033-014-3529-3. Epub 2014 Jul 15.

Mercier PA, Winegarden NA, Westwood JT.Human heat shock factor 1 is predominantly a nuclear protein before and after heat stress.// J Cell Sci. 1999 Aug;112 (Pt 16):2765-74.

Meriin AB, Yaglom JA, Gabai VL, Zon L, Ganiatsas S, Mosser DD, Zon L, Sherman MY.Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72.// Mol Cell Biol. 1999 Apr;19(4):2547-55. Erratum in: Mol Cell Biol 1999 Jul;19(7):5235.

Mezger V, Rallu M, Morimoto RI, Morange M, Renard JP.Heat shock factor 2-like activity in mouse blastocysts.// Dev Biol. 1994 Dec;166(2):819-22.

Mi H, Muruganujan A, Thomas PD.PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees.// Nucleic Acids Res. 2013 Jan;41(Database issue):D377-86. doi: 10.1093/nar/gks1118. Epub 2012 Nov 27.

Michalik S, Liebeke M, Zühlke D, Lalk M, Bernhardt J, Gerth U, Hecker

M.Proteolysis during long-term glucose starvation in Staphylococcus aureus COL.// Proteomics. 2009 Oct;9(19):4468-77. doi: 10.1002/pmic.200900168.

Michalski AI, Johnson TE, Cypser JR, Yashin AI.Heating stress patterns in Caenorhabditis elegans longevity and survivorship.// Biogerontology. 2001;2(1):35-44.

Miller MW, Miller WM.Radiation hormesis in plants.// Health Phys. 1987 May;52(5):607-16.

Minor RK, Chang JW, de Cabo R.Hungry for life: How the arcuate nucleus and neuropeptide Y may play a critical role in mediating the benefits of calorie restriction.// Mol Cell Endocrinol. 2009 Feb 5;299(1):79-88. doi: 10.1016/j.mce.2008.10.044. Epub 2008 Nov 11. Review.

Mizuno T, Miura-Suzuki T, Yamashita H, Mori N.Distinct regulation of brain mitochondrial carrier protein-1 and uncoupling protein-2 genes in the rat brain during cold exposure and aging.// Biochem Biophys Res Commun. 2000 Nov 30;278(3):691-7.

Møller AP, Mousseau TA.The effects of natural variation in background radioactivity on humans, animals and other organisms.// Biol Rev Camb Philos Soc. 2013 Feb;88(1):226-54. doi: 10.1111/j.1469-185X.2012.00249.x. Epub 2012 Nov 8. Review.

Moltz JH, McDonald JK.Neuropeptide Y: direct and indirect action on insulin secretion in the rat.// Peptides. 1985 Nov-Dec;6(6):1155-9.

Morimoto RI.Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes.// Science. 1993 Mar 5;259(5100):1409-10. Review. No abstract available.

Morimoto RI.Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators.// Genes Dev. 1998 Dec 15;12(24):3788-96. Review. No abstract available.

Morris BJ.A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer.// J Hypertens. 2005 Jul;23(7):1285-309. Review.

Moskalev A, Shaposhnikov M, Snezhkina A, Kogan V, Plyusnina E, Peregudova D, Melnikova N, Uroshlev L, Mylnikov S, Dmitriev A, Plusnin S, Fedichev P, Kudryavtseva A.Mining gene expression data for pollutants (dioxin,

toluene, formaldehyde) and low dose of gamma-irradiation.// PLoS One. 2014 Jan 24;9(1):e86051. doi: 10.1371/journal.pone.0086051. eCollection 2014.

Moskalev A, Shaposhnikov M, Turysheva E.Life span alteration after irradiation in Drosophila melanogaster strains with mutations of Hsf and Hsps.// Biogerontology. 2009 Feb;10(1):3-11. doi: 10.1007/s10522-008-9147-5. Epub 2008 Jun 13.

Moskalev A.Radiation-induced life span alteration of Drosophila lines with genotype differences.// Biogerontology. 2007 Oct;8(5):499-504. Epub 2007 Mar 23.

Moskalev AA, Pliusnina EN, Zaĭnullin VG.[The influence of low doze gamma-irradiation on life span of Drosophila mutants with defects of DNA damage sensation and repair].// Radiats Biol Radioecol. 2007 Sep-Oct;47(5):571-3. Russian.

Moskalev AA, Plyusnina EN, Shaposhnikov MV.Radiation hormesis and radioadaptive response in Drosophila melanogaster flies with different genetic backgrounds: the role of cellular stress-resistance mechanisms.// Biogerontology. 2011 Jun;12(3):253-63. doi: 10.1007/s10522-011-9320-0. Epub 2011 Jan 14.

Moskalev AA.[Genetic investigations of low doze irradiation influence on life span].// Radiats Biol Radioecol. 2008 Mar-Apr;48(2):139-45. Review. Russian.

Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L.Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors.// Cell. 2004 Feb 20;116(4):551-63.

Mukhopadhyay I, Siddique HR, Bajpai VK, Saxena DK, Chowdhuri DK.Synthetic pyrethroid cypermethrin induced cellular damage in reproductive tissues of Drosophila melanogaster: Hsp70 as a marker of cellular damage.// Arch Environ Contam Toxicol. 2006 Nov;51(4):673-80. Epub 2006 Jan 13.

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H.Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane.// J Biol Chem. 2004 Nov 19;279(47):49064-73. Epub 2004 Aug 17.

Murakami S, Tedesco PM, Cypser JR, Johnson TE.Molecular genetic mechanisms of life span manipulation in Caenorhabditis elegans.// Ann N Y Acad Sci. 2000 Jun;908:40-9. Review.

Murakami S.Stress resistance in long-lived mouse models.// Exp Gerontol. 2006 Oct;41(10):1014-9. Epub 2006 Sep 7. Review.

Murphy MP.How mitochondria produce reactive oxygen species.// Biochem J. 2009 Jan 1;417(1):1-13. doi: 10.1042/BJ20081386. Review.

Nagasawa Y., Takenaka M., Kaimori J., Matsuoka Y., Akagi Y., Tsujie M., Imai E., Hori M. Rapid and diverse changes in gene expression in the kidneys of protein-overloaded proteinuria mice detected by icroarray analysis// Nephrol Dial Transplant. – 2001. – V. 16. – P. 923–931.

Nakamoto M.Responses of sympathetic nervous system to cold exposure in vibration syndrome subjects and age-matched healthy controls.// Int Arch Occup Environ Health. 1990;62(2):177-81.

Nakane T, Audhya T, Kanie N, Hollander CS.Evidence for a role of endogenous corticotropin-releasing factor in cold, ether, immobilization, and traumatic stress.// Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Feb;82(4):1247-51.

Nakashima A, Hasegawa T, Mori S, Ueno M, Tanaka S, Ushimaru T, Sato S, Uritani M.A starvation-specific serine protease gene, isp6+, is involved in both autophagy and sexual development in Schizosaccharomyces pombe.// Curr Genet. 2006 Jun;49(6):403-13. Epub 2006 Mar 21.

Navab M, Gharavi N, Watson AD.Inflammation and metabolic disorders.// Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2008 Jul;11(4):459-64. doi: 10.1097/MCO.0b013e32830460c2. Review.

Ng L, Prelich G, Anderson CW, Stillman B, Fisher PA.Drosophila proliferating cell nuclear antigen. Structural and functional homology with its mammalian counterpart.// J Biol Chem. 1990 Jul 15;265(20):11948-54.

Nichols AF, Sancar A.Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein.// Nucleic Acids Res. 1992 Jul 11;20(13):2441-6.

Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA.JNK regulates lifespan in Caenorhabditis elegans by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16.// Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 22;102(12):4494-9. Epub 2005 Mar 14.

Olivo-Marston SE, Hursting SD, Perkins SN, Schetter A, Khan M, Croce C, Harris CC, Lavigne J.Effects of calorie restriction and diet-induced obesity on

murine colon carcinogenesis, growth and inflammatory factors, and microRNA expression.// PLoS One. 2014 Apr 14;9(4):e94765. doi: 10.1371/journal.pone.0094765. eCollection 2014.

Orosz A, Wisniewski J, Wu C.Regulation of Drosophila heat shock factor trimerization: global sequence requirements and independence of nuclear localization.// Mol Cell Biol. 1996 Dec;16(12):7018-30.

Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J.A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles.// Cancer Res. 2001 Jan 15;61(2):439-44.

Paglin S, Yahalom J.Pathways that regulate autophagy and their role in mediating tumor response to treatment.// Autophagy. 2006 Oct-Dec;2(4):291-3. Epub 2006 Oct 17.

Pallavi R, Giorgio M, Pelicci PG.Insights into the beneficial effect of caloric/ dietary restriction for a healthy and prolonged life.// Front Physiol. 2012 Aug 9;3:318. doi: 10.3389/fphys.2012.00318. eCollection 2012.

Papp D, Csermely P, Sőti C.A role for SKN-1/Nrf in pathogen resistance and immunosenescence in Caenorhabditis elegans.// PLoS Pathog. 2012;8(4):e1002673. doi: 10.1371/journal.ppat.1002673. Epub 2012 Apr 26.

Pappolla MA, Sos M, Omar RA, Sambamurti K.The heat shock/oxidative stress connection. Relevance to Alzheimer disease.// Mol Chem Neuropathol. 1996 May-Aug;28(1-3):21-34. Review.

Parashar V, Frankel S, Lurie AG, & Rogina B The effects of age on radiation resistance and oxidative stress in adult Drosophila melanogaster. // Radiation Research, 2008, 169(6):707-711

Parashar V, Frankel S, Lurie AG, Rogina B.The effects of age on radiation resistance and oxidative stress in adult Drosophila melanogaster.// Radiat Res. 2008 Jun;169(6):707-11. doi: 10.1667/RR1225.1.

Park HG, Han SI, Oh SY, Kang HS.Cellular responses to mild heat stress.// Cell Mol Life Sci. 2005 Jan;62(1):10-23. Review.

Parker DJ, Vesala L, Ritchie MG, Laiho A, Hoikkala A, Kankare M.How consistent are the transcriptome changes associated with cold acclimation in two

species of the Drosophila virilis group?// Heredity (Edinb). 2015 Jul;115(1):13-21. doi: 10.1038/hdy.2015.6. Epub 2015 Feb 11.

Pashko LL, Schwartz AG.Reversal of food restriction-induced inhibition of mouse skin tumor promotion by adrenalectomy.// Carcinogenesis. 1992 Oct;13(10):1925-8.

Paul RJ, Gohla J, Föll R, Schneckenburger H.Metabolic adaptations to environmental changes in Caenorhabditis elegans.// Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2000 Dec;127(4):469-79.

Payne CM, Bjore CG Jr, Schultz DA.Change in the frequency of apoptosis after low- and high-dose X-irradiation of human lymphocytes.// J Leukoc Biol. 1992 Oct;52(4):433-40.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP.Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations.// Biotechnol Lett. 2004 Mar;26(6):509-15.

Pham LN, Dionne MS, Shirasu-Hiza M, Schneider DS.A specific primed immune response in Drosophila is dependent on phagocytes.// PLoS Pathog. 2007 Mar;3(3):e26.

Pittendrigh BR, Mocelin G, Andreev O, ffrench-Constant RH.The sequence of a Drosophila Cyp4e2 cytochrome P450-encoding cDNA.// Gene. 1996 Nov 14;179(2):295-6.

Pletcher SD, Khazaeli AA, Curtsinger JW.Why do life spans differ? Partitioning mean longevity differences in terms of age-specific mortality parameters.// J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2000 Aug;55(8):B381-9.

Polak M, Starmer WT.Parasite-induced risk of mortality elevates reproductive effort in male Drosophila.// Proc Biol Sci. 1998 Nov 22;265(1411):2197-201.

Pomatto LCD, Carney C, Shen B, Wong S, Halaszynski K, Salomon MP, Davies KJA, Tower J.The Mitochondrial Lon Protease Is Required for Age-Specific and Sex-Specific Adaptation to Oxidative Stress.// Curr Biol. 2017 Jan 9;27(1):1-15. doi: 10.1016/j.cub.2016.10.044. Epub 2016 Dec 1.

Ponton F, Chapuis MP, Pernice M, Sword GA, Simpson SJ.Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological

responses in Drosophila melanogaster.// J Insect Physiol. 2011 Jun;57(6):840-50. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.03.014. Epub 2011 Mar 22.

Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR.Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide.// Plant Cell. 1994 Jan;6(1):65-74.

Promislow D.Mate choice, sexual conflict, and evolution of senescence.// Behav Genet. 2003 Mar;33(2):191-201.

Pundir S., Martin M.J., O'Donovan C., UniProt ConsortiumUniProt Tools.// Curr Protoc Bioinformatics. 2016 Mar 24;53:1.29.1-15.

Pursall ER, Rolff J.Immune responses accelerate ageing: proof-of-principle in an insect model.// PLoS One. 2011;6(5):e19972. doi: 10.1371/journal.pone.0019972. Epub 2011 May 18.

Quintanar-Stephano JL, Quintanar-Stephano A, Castillo-Hernandez L.Effect of the exposure to chronic-intermittent cold on the thyrotropin and thyroid hormones in the rat.// Cryobiology. 1991 Aug;28(4):400-3.

Raffoul JJ, Guo Z, Soofi A, Heydari AR.Caloric restriction and genomic stability.// J Nutr Health Aging. 1999;3(2):102-10. Review.

Rallu M, Loones M, Lallemand Y, Morimoto R, Morange M, Mezger V.Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis.// Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18;94(6):2392-7.

Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM.Methylglyoxal comes of AGE.// Cell. 2006 Jan 27;124(2):258-60. Review.

Rämet M, Lanot R, Zachary D, Manfruelli P.JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in Drosophila.// Dev Biol. 2002 Jan 1;241(1):145-56.

Rattan SI, Demirovic D.Hormesis can and does work in humans.// Dose Response. 2009 Dec 10;8(1):58-63. doi: 10.2203/dose-response.09-041.Rattan.

Rattan SI, Fernandes RA, Demirovic D, Dymek B, Lima CF.Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effects on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation.// Dose Response. 2009;7(1):90-103. doi: 10.2203/dose-response.08-014.Rattan. Epub 2008 Sep 10.

Rattan SI.Ageing--a biological perspective.// Mol Aspects Med.

1995;16(5):439-508. Review. No abstract available.

Rattan SI.Hormesis in aging.// Ageing Res Rev. 2008 Jan;7(1):63-78. Epub 2007 Aug 31. Review.

Rattan SI.Hormetic modulation of aging and longevity by mild heat stress.// Dose Response. 2006 May 22;3(4):533-46. doi: 10.2203/dose-response.003.04.008.

Rattan SI.Targeting the age-related occurrence, removal, and accumulation of molecular damage by hormesis.// Ann N Y Acad Sci. 2010 Jun;1197:28-32. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05193.x. Review.

Ravanat JL, Douki T, Cadet J.Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components.// J Photochem Photobiol B. 2001 Oct;63(1-3):88-102. Review.

Rea SL, Wu D, Cypser JR, Vaupel JW, Johnson TE.A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of Caenorhabditis elegans.// Nat Genet. 2005 Aug;37(8):894-8. Epub 2005 Jul 24.

Rebrikov D.V., Desai S.M., Siebert P.D., Lukyanov S.A. Suppression subtractive hybridization// Methods Mol Biol. – 2004. – V. 258. – P. 107-134.

Redpath JL, Lu Q, Lao X, Molloi S, Elmore E.Low doses of diagnostic energy X-rays protect against neoplastic transformation in vitro.// Int J Radiat Biol. 2003 Apr;79(4):235-40.

Reed HL, Quesada M, Hesslink RL Jr, D'Alesandro MM, Hays MT, Christopherson RJ, Turner BV, Young BA.Changes in serum triiodothyronine kinetics and hepatic type I 5'-deiodinase activity of cold-exposed swine.// Am J Physiol. 1994 May;266(5 Pt 1):E786-95.

Reiser K, McGee C, Rucker R, McDonald R.Effects of aging and caloric restriction on extracellular matrix biosynthesis in a model of injury repair in rats.// J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1995 Jan;50A(1):B40-7.

Robin C, Daborn PJ, Hoffmann AA.Fighting fly genes.// Trends Genet. 2007 Feb;23(2):51-4. Epub 2006 Dec 22. Review.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK.edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.// Bioinformatics. 2010 Jan 1;26(1):139-40. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616. Epub 2009 Nov 11.

Robinson MD, Oshlack A.A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data.// Genome Biol. 2010;11(3):R25. doi: 10.1186/gb-2010-11-3-r25. Epub 2010 Mar 2.

Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P.Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1.// Nature. 2005 Mar 3;434(7029):113-8.

Roe FJ, Lee PN, Conybeare G, Kelly D, Matter B, Prentice D, Tobin G.The Biosure Study: influence of composition of diet and food consumption on longevity, degenerative diseases and neoplasia in Wistar rats studied for up to 30 months post weaning.// Food Chem Toxicol. 1995;33 Suppl 1:1S-100S.

Roebuck BD, Yager JD Jr, Longnecker DS.Dietary modulation of azaserine-induced pancreatic carcinogenesis in the rat.// Cancer Res. 1981 Mar;41(3):888-93.

Rogina B, Helfand SL.Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction.// Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 9;101(45):15998-6003. Epub 2004 Nov 1.

Roth O, Sadd BM, Schmid-Hempel P, Kurtz J.Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, Tribolium castaneum.// Proc Biol Sci. 2009 Jan 7;276(1654):145-51. doi: 10.1098/rspb.2008.1157.

Rothkamm K, Löbrich M.Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses.// Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 29;100(9):5057-62. Epub 2003 Apr 4.

Rubino C, Adjadj E, Doyon F, Shamsaldin A, Abbas TM, Caillou B, Colonna M, Cecarreli C, Schvartz C, Bardet S, Langlois C, Ricard M, Schlumberger M, de Vathaire F.Radiation exposure and familial aggregation of cancers as risk factors for colorectal cancer after radioiodine treatment for thyroid carcinoma.// Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005 Jul 15;62(4):1084-9.

Rudqvist N, Parris TZ, Schüler E, Helou K, Forssell-Aronsson E.Transcriptional response of BALB/c mouse thyroids following in vivo astatine-211 exposure reveals distinct gene expression profiles.// EJNMMI Res. 2012 Jun 14;2(1):32. doi: 10.1186/2191-219X-2-32.

Sabatino F, Masoro EJ, McMahan CA, Kuhn RW.Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes and in the action of food restriction.//

J Gerontol. 1991 Sep;46(5):B171-9.

Sabelli P.A., Shewry P.R: Northern analysis and nucleic acid probes// Methods Mol Biol. – 1995. – V. 49. – P. 213–228.

Saini D, Shelke S, Mani Vannan A, Toprani S, Jain V, Das B, Seshadri M.Transcription profile of DNA damage response genes at G_0 lymphocytes exposed to gamma radiation.// Mol Cell Biochem. 2012 May;364(1-2):271-81. doi: 10.1007/s11010-012-1227-9. Epub 2012 Jan 19.

Saisawang C, Wongsantichon J, Ketterman AJ.A preliminary characterization of the cytosolic glutathione transferase proteome from Drosophila melanogaster.// Biochem J. 2012 Feb 15;442(1):181-90. doi: 10.1042/BJ20111747.

Sakai K, Nomura T, Ina Y.Enhancement of bio-protective functions by low dose/dose-rate radiation.// Dose Response. 2006 Sep 23;4(4):327-32. doi: 10.2203/dose-response.06-115.Sakai.

Sampayo JN, Jenkins NL, Lithgow GJ.Using stress resistance to isolate novel longevity mutations in Caenorhabditis elegans.// Ann N Y Acad Sci. 2000 Jun;908:324-6. No abstract available.

Samuelson AV, Carr CE, Ruvkun G.Gene activities that mediate increased life span of C. elegans insulin-like signaling mutants.// Genes Dev. 2007 Nov 15;21(22):2976-94.

Santoro MG.Heat shock factors and the control of the stress response.// Biochem Pharmacol. 2000 Jan 1;59(1):55-63. Review.

Sarantseva SV, Khromykh IuM.[Effect of gamma-irradiation on oogenesis of Drosophila mutants defective for reparation and meiotic recombination].// Genetika. 2001 Jun;37(6):770-8. Russian.

Sarge KD, Park-Sarge OK, Kirby JD, Mayo KE, Morimoto RI.Expression of heat shock factor 2 in mouse testis: potential role as a regulator of heat-shock protein gene expression during spermatogenesis.// Biol Reprod. 1994 Jun;50(6):1334-43.

Sarup P, Loeschcke V.Life extension and the position of the hormetic zone depends on sex and genetic background in Drosophila melanogaster.// Biogerontology. 2011 Apr;12(2):109-17. doi: 10.1007/s10522-010-9298-z. Epub 2010 Aug 15.

Sarup P, Sørensen P, Loeschcke V.The long-term effects of a life-prolonging heat treatment on the Drosophila melanogaster transcriptome suggest that heat shock proteins extend lifespan.// Exp Gerontol. 2014 Feb;50:34-9. doi: 10.1016/j.exger.2013.11.017. Epub 2013 Dec 4.

Scannapieco AC, Sørensen JG, Loeschcke V, Norry FM.Heat-induced hormesis in longevity of two sibling Drosophila species.// Biogerontology. 2007 Jun;8(3):315-25. Epub 2006 Dec 8.

Scharpfenecker M, Kruse JJ, Sprong D, Russell NS, Ten Dijke P, Stewart FA.Ionizing radiation shifts the PAI-1/ID-1 balance and activates notch signaling in endothelial cells.// Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009 Feb 1;73(2):506-13. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.09.052.

Schatten H., Chakrabarti A., Hedrick J. Centrosome and microtubule instability in aging Drosophila cells // J. Cell. Biochem. 1999. V. 74. №2. P. 229-241.

Scherz-Shouval R, Elazar Z.Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology.// Trends Biochem Sci. 2011 Jan;36(1):30-8. doi: 10.1016/j.tibs.2010.07.007. Epub 2010 Aug 20. Review.

Schieve LA, Davis F, Roeske J, Handler A, Freels S, Stinchcomb T, Keane A.Evaluation of internal alpha-particle radiation exposure and subsequent fertility among a cohort of women formerly employed in the radium dial industry.// Radiat Res. 1997 Feb;147(2):236-44.

Schmelzle T, Hall MN.TOR, a central controller of cell growth.// Cell. 2000 Oct 13;103(2):253-62. Review.

Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K.Signal transduction and cellular radiation responses.// Radiat Res. 2000 Mar;153(3):245-57. Review.

Schöllnberger H, Stewart RD, Mitchel RE, Hofmann W.An examination of radiation hormesis mechanisms using a multistage carcinogenesis model.// Nonlinearity Biol Toxicol Med. 2004 Oct;2(4):317-52. doi: 10.1080/15401420490900263.

Schwartz AG, Pashko LL.Role of adrenocortical steroids in mediating cancer-preventive and age-retarding effects of food restriction in laboratory rodents.// J

Gerontol. 1994 Mar;49(2):B37-41. Review. No abstract available.

Scott BR, Belinsky SA, Leng S, Lin Y, Wilder JA, Damiani LA.Radiation-stimulated epigenetic reprogramming of adaptive-response genes in the lung: an evolutionary gift for mounting adaptive protection against lung cancer.// Dose Response. 2009 Jun 11;7(2):104-31. doi: 10.2203/dose-response.08-016.Scott.

Scott BR, Di Palma J.Sparsely ionizing diagnostic and natural background radiations are likely preventing cancer and other genomic-instability-associated diseases.// Dose Response. 2006 Dec 21;5(3):230-55. doi: 10.2203/dose-response.06-002.Scott.

Scott BR.It's time for a new low-dose-radiation risk assessment paradigm--one that acknowledges hormesis.// Dose Response. 2008;6(4):333-51. doi: 10.2203/dose-response.07-005.Scott. Epub 2007 Sep 30.

Scott BR.Low-dose-radiation stimulated natural chemical and biological protection against lung cancer.// Dose Response. 2008;6(3):299-318. doi: 10.2203/dose-response.07-025.Scott. Epub 2008 Mar 20.

Segev E, Halachmi N, Salzberg A, Ben-Arie N.Nato3 is an evolutionarily conserved bHLH transcription factor expressed in the CNS of Drosophila and mouse.// Mech Dev. 2001 Aug;106(1-2):197-202.

Sekelsky JJ, Brodsky MH, Burtis KC.DNA repair in Drosophila: insights from the Drosophila genome sequence.// J Cell Biol. 2000 Jul 24;150(2):F31-6. Review. No abstract available.

Sell Ch.Caloric restriction and insulin-like growth factors in aging and cancer.// Horm Metab Res. 2003 Nov-Dec;35(11-12):705-11. Review.

Seong KM, Kim CS, Lee BS, Nam SY, Yang KH, Kim JY, Park JJ, Min KJ, Jin YW.Low-dose radiation induces Drosophila innate immunity through Toll pathway activation.// J Radiat Res. 2012;53(2):242-9. Epub 2012 Feb 25.

Seong KM, Kim CS, Seo SW, Jeon HY, Lee BS, Nam SY, Yang KH, Kim JY, Kim CS, Min KJ, Jin YW.Genome-wide analysis of low-dose irradiated male Drosophila melanogaster with extended longevity.// Biogerontology. 2011 Apr;12(2):93-107. doi: 10.1007/s10522-010-9295-2. Epub 2010 Jul 9.

Seto NO, Hayashi S, Tener GM.The sequence of the Cu-Zn superoxide dismutase gene of Drosophila.// Nucleic Acids Res. 1987 Dec 23;15(24):10601.

No abstract available.

Shahbazi-Gahrouei D, Gholami M, Setayandeh S.A review on natural background radiation.// Adv Biomed Res. 2013 Jul 30;2:65. doi: 10.4103/2277-9175.115821. Review.

Shang Y, Kakinuma S, Yamauchi K, Morioka T, Kokubo T, Tani S, Takabatake T, Kataoka Y, Shimada Y.Cancer prevention by adult-onset calorie restriction after infant exposure to ionizing radiation in B6C3F1 male mice.// Int J Cancer. 2014 Sep 1;135(5):1038-47. doi: 10.1002/ijc.28751. Epub 2014 Feb 11.

Shaposhnikov MV, Turysheva EV, Moskalev AA.[Low-dose rate irradiation induced hormesis, hypersensitivity and adaptive response in Drosophila melanogaster of radiosensitive strains].// Radiats Biol Radioecol. 2009 Jan-Feb;49(1):46-54. Russian.

Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tononi G.Correlates of sleep and waking in Drosophila melanogaster.// Science. 2000 Mar 10;287(5459):1834-7.

Shen S, Kepp O, Kroemer G.The end of autophagic cell death?// Autophagy. 2012 Jan;8(1):1-3. doi: 10.4161/auto.8.1.16618. Epub 2012 Jan 1. Review.

Shen S, Kepp O, Michaud M, Martins I, Minoux H, Métivier D, Maiuri MC, Kroemer RT, Kroemer G.Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study.// Oncogene. 2011 Nov 10;30(45):4544-56. doi: 10.1038/onc.2011.168. Epub 2011 May 16.

Shevchuk NA, Radoja S.Possible stimulation of anti-tumor immunity using repeated cold stress: a hypothesis.// Infect Agent Cancer. 2007 Nov 13;2:20.

Shilova LA, Pliusnina EN, Moskalev AA. Influence of conditionally ubiquitous overexpression of DNA repair genes on resistance of drosophila melanogaster individuals to different stress factors (oxidative stress, heat shock, starvation). // Proc of the KSC Ural Branch RAS. 2014. 2(18): p. 41–45.

Shimobayashi M, Takematsu H, Eiho K, Yamane Y, Kozutsumi Y.Identification of Ypk1 as a novel selective substrate for nitrogen starvation-triggered proteolysis requiring autophagy system and endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery components.// J Biol Chem. 2010 Nov 19;285(47):36984-94. doi: 10.1074/jbc.M110.119180. Epub 2010 Sep 20.

Shu J, Stevenson JR, Zhou X.Modulation of cellular immune responses by

cold water swim stress in the rat.// Dev Comp Immunol. 1993 Jul-Aug;17(4):357-71.

Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL.Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR.// BMC Mol Biol. 2006 Oct 6;7:33.

Simon A, Kullberg BJ, Tripet B, Boerman OC, Zeeuwen P, van der Ven-Jongekrijg J, Verweij P, Schalkwijk J, Hodges R, van der Meer JW, Netea MG.Drosomycin-like defensin, a human homologue of Drosophila melanogaster drosomycin with antifungal activity.// Antimicrob Agents Chemother. 2008 Apr;52(4):1407-12. doi: 10.1128/AAC.00155-07. Epub 2008 Jan 22.

Sinclair BJ, Gibbs AG, Roberts SP.Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in Drosophila melanogaster.// Insect Mol Biol. 2007 Aug;16(4):435-43. Epub 2007 May 16.

Siritientong T, Srichana T, Aramwit P.The effect of sterilization methods on the physical properties of silk sericin scaffolds.// AAPS PharmSciTech. 2011 Jun;12(2):771-81. doi: 10.1208/s12249-011-9641-y. Epub 2011 Jun 14.

Sitte N, Huber M, Grune T, Ladhoff A, Doecke WD, Von Zglinicki T, Davies KJ.Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts.// FASEB J. 2000 Aug;14(11):1490-8.

Sluss HK, Han Z, Barrett T, Goberdhan DC, Wilson C, Davis RJ, Ip YT.A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in Drosophila.// Genes Dev. 1996 Nov 1;10(21):2745-58. Erratum in: Genes Dev. 1997 Feb 15;11(4):541. Goberdhan, D C [added]; Wilson, C [added].

Smith-Bindman R, Lipson J, Marcus R, Kim KP, Mahesh M, Gould R, Berrington de González A, Miglioretti DL.Radiation dose associated with common computed tomography examinations and the associated lifetime attributable risk of cancer.// Arch Intern Med. 2009 Dec 14;169(22):2078-86. doi: 10.1001/archinternmed.2009.427.

Soboleski MR, Oaks J, Halford WP.Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells.// FASEB J. 2005 Mar;19(3):440-2. Epub 2005 Jan 7.

Song YH, Mirey G, Betson M, Haber DA, Settleman J.The Drosophila ATM

ortholog, dATM, mediates the response to ionizing radiation and to spontaneous DNA damage during development.// Curr Biol. 2004 Aug 10;14(15):1354-9.

Song YH.Drosophila melanogaster: a model for the study of DNA damage checkpoint response.// Mol Cells. 2005 Apr 30;19(2):167-79. Review.

Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM.Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression.// J Appl Physiol (1985). 2002 Apr;92(4):1725-42. Review.

Sonntag WE, Lenham JE, Ingram RL.Effects of aging and dietary restriction on tissue protein synthesis: relationship to plasma insulin-like growth factor-1.// J Gerontol. 1992 Sep;47(5):B159-63.

Sóti C, Csermely P.Molecular chaperones and the aging process.// Biogerontology. 2000;1(3):225-33. Review.

Soti C, Pál C, Papp B, Csermely P.Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks.// Curr Opin Cell Biol. 2005 Apr;17(2):210-5. Review.

Stankovic M, Mladenovic D, Ninkovic M, Vucevic D, Tomasevic T, Radosavljevic T.Effects of caloric restriction on oxidative stress parameters.// Gen Physiol Biophys. 2013 Jun;32(2):277-83. doi: 10.4149/gpb_2013027. Epub 2013 May 15.

Storey KB, Storey JM.Molecular biology of freezing tolerance.// Compr Physiol. 2013 Jul;3(3):1283-308. doi: 10.1002/cphy.c130007. Review.

Strehler BL, Mildvan AS.General theory of mortality and aging.// Science. 1960 Jul 1;132(3418):14-21. No abstract available.

Strehler BL.Origin and comparison of the effects of time and high-energy radiations on living systems.// Q Rev Biol. 1959 Jun;34(2):117-42. No abstract available.

Strzalka W, Ziemienowicz A.Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation.// Ann Bot. 2011 May;107(7):1127-40. doi: 10.1093/aob/mcq243. Epub 2010 Dec 17. Review.

Suit H, Goldberg S, Niemierko A, Ancukiewicz M, Hall E, Goitein M, Wong W, Paganetti H.Secondary carcinogenesis in patients treated with radiation: a review of data on radiation-induced cancers in human, non-human primate, canine

and rodent subjects.// Radiat Res. 2007 Jan;167(1):12-42. Erratum in: Radiat Res. 2007 Jun;167(6):748.

Sykiotis GP, Bohmann D.Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in Drosophila.// Dev Cell. 2008 Jan;14(1):76-85. doi: 10.1016/j.devcel.2007.12.002.

Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C.STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life.// Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D447-52. doi: 10.1093/nar/gku1003. Epub 2014 Oct 28.

Szumiel I.Autophagy, reactive oxygen species and the fate of mammalian cells.// Free Radic Res. 2011 Mar;45(3):253-65. doi: 10.3109/10715762.2010.525233. Epub 2010 Oct 22. Review.

Szumiel I.Radiation hormesis: Autophagy and other cellular mechanisms.// Int J Radiat Biol. 2012 Sep;88(9):619-28. doi: 10.3109/09553002.2012.699698. Epub 2012 Jun 28. Review.

Tanabe M, Nakai A, Kawazoe Y, Nagata K.Different thresholds in the responses of two heat shock transcription factors, HSF1 and HSF3.// J Biol Chem. 1997 Jun 13;272(24):15389-95.

Tang FR, Loke WK.Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability.// Int J Radiat Biol. 2015 Jan;91(1):13-27. doi: 10.3109/09553002.2014.937510. Epub 2014 Aug 21. Review.

Tatar M, Khazaeli AA, Curtsinger JW.Chaperoning extended life.// Nature. 1997 Nov 6;390(6655):30. No abstract available.

Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS.A mutant Drosophila insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function.// Science. 2001 Apr 6;292(5514):107-10.

Taylor K, Kimbrell DA.Host immune response and differential survival of the sexes in Drosophila.// Fly (Austin). 2007 Jul-Aug;1(4):197-204. Epub 2007 Jul 25.

Telonis-Scott M, Hallas R, McKechnie SW, Wee CW, Hoffmann AA.Selection for cold resistance alters gene transcript levels in Drosophila

melanogaster // J Insect Physiol. 2009 Jun;55(6):549-55. doi: 10.1016/j.jinsphys.2009.01.010. Epub 2009 Feb 14.

Testa G, Biasi F, Poli G, Chiarpotto E.Calorie restriction and dietary restriction mimetics: a strategy for improving healthy aging and longevity.// Curr Pharm Des. 2014;20(18):2950-77. Review.

Tettweiler G, Miron M, Jenkins M, Sonenberg N, Lasko PF.Starvation and oxidative stress resistance in Drosophila are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP.// Genes Dev. 2005 Aug 15;19(16):1840-3. Epub 2005 Jul 29.

Tian C, Gao B, Rodriguez Mdel C, Lanz-Mendoza H, Ma B, Zhu S.Gene expression, antiparasitic activity, and functional evolution of the drosomycin family.// Mol Immunol. 2008 Sep;45(15):3909-16.

Tissenbaum HA, Guarente L.Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans.// Nature. 2001 Mar 8;410(6825):227-30.

Trivers RL. Social evolution. // Menlo Park, CA: Benjamin Cummings Publishing, 1985.

Tyagi S. Taking a census of mRNA populations with microbeads// Nat Biotechnol. – 2000. – V. 18. – P. 597–598.

Ugochukwu NH, Figgers CL.Dietary caloric restriction improves the redox status at the onset of diabetes in hepatocytes of streptozotocin-induced diabetic rats.// Chem Biol Interact. 2007 Jan 5;165(1):45-53. Epub 2006 Oct 27.

Vaanholt LM, Daan S, Schubert KA, Visser GH.Metabolism and aging: effects of cold exposure on metabolic rate, body composition, and longevity in mice.// Physiol Biochem Zool. 2009 Jul-Aug;82(4):314-24. doi: 10.1086/589727.

Vaiserman AM, Koshel NM, Litoshenko AY, Mozzhukhina TG, Voitenko VP.Effects of X-irradiation in early ontogenesis on the longevity and amount of the S1 nuclease-sensitive DNA sites in adult Drosophila melanogaster.// Biogerontology. 2003;4(1):9-14.

Vaiserman AM.Hormesis, adaptive epigenetic reorganization, and implications for human health and longevity.// Dose Response. 2010 Jan 8;8(1):16-21. doi: 10.2203/dose-response.09-014.Vaiserman.

Valenzano DR, Terzibasi E, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A.Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in

the short-lived fish Nothobranchius furzeri.// Aging Cell. 2006 Jun;5(3):275-8.

van der Horst A, Burgering BM.Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease.// Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Jun;8(6):440-50. Review.

van Montfort R.L., Congreve M., Tisi D., Carr R., Jhoti H.Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B.// Nature. 2003 Jun 12;423(6941):773-7.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.// Genome Biol. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.

Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Müller F.Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in C. elegans.// Nature. 2003 Dec 11;426(6967):620. No abstract available.

Verbeke P, Clark BF, Rattan SI.Modulating cellular aging in vitro: hormetic effects of repeated mild heat stress on protein oxidation and glycation.// Exp Gerontol. 2000 Sep;35(6-7):787-94. Review.

Verbeke P, Fonager J, Clark BF, Rattan SI.Heat shock response and ageing: mechanisms and applications.// Cell Biol Int. 2001;25(9):845-57. Review.

Verhaag EM, Buist-Homan M, Koehorst M, Groen AK, Moshage H, Faber KN.Hormesis in Cholestatic Liver Disease; Preconditioning with Low Bile Acid Concentrations Protects against Bile Acid-Induced Toxicity.// PLoS One. 2016 Mar 7;11(3):e0149782. doi: 10.1371/journal.pone.0149782. eCollection 2016.

Vermeulen CJ, Pedersen KS, Beck HC, Petersen J, Gagalova KK, Loeschcke V.Proteomic characterization of inbreeding-related cold sensitivity in Drosophila melanogaster.// PLoS One. 2013 May 2;8(5):e62680. doi: 10.1371/journal.pone.0062680. Print 2013.

Voght SP, Fluegel ML, Andrews LA, Pallanck LJ.Drosophila NPC1b promotes an early step in sterol absorption from the midgut epithelium.// Cell Metab. 2007 Mar;5(3):195-205.

Wahlestedt C, Skagerberg G, Ekman R, Heilig M, Sundler F, Håkanson R.Neuropeptide Y (NPY) in the area of the hypothalamic paraventricular nucleus activates the pituitary-adrenocortical axis in the rat.// Brain Res. 1987 Aug

4;417(1):33-8.

Wang C, Li Q, Redden DT, Weindruch R, Allison DB.Statistical methods for testing effects on "maximum lifespan".// Mech Ageing Dev. 2004 Sep;125(9):629-32. Erratum in: Mech Ageing Dev. 2006 Jul;127(7):652.

Ward WF.Enhancement by food restriction of liver protein synthesis in the aging Fischer 344 rat.// J Gerontol. 1988 Mar;43(2):B50-3.

Ward WF.Protein degradation in the aging organism.// Prog Mol Subcell Biol. 2002;29:35-42. Review.

Weber AL, Khan GF, Magwire MM, Tabor CL, Mackay TF, Anholt RR.Genome-wide association analysis of oxidative stress resistance in Drosophila melanogaster.// PLoS One. 2012;7(4):e34745. doi: 10.1371/journal.pone.0034745. Epub 2012 Apr 4.

Wilma Scholte op Reimer, Maarten L. Simoons, Eric Boersma, Anselm K. Gitt Cardiovascular Diseases in Europe report 2006, Edited by Wilma Scholte op Reimer, Maarten L. Simoons, Eric Boersma, Anselm K. Gitt // European Society of Cardiology, 2006, Edited by Wilma Scholte op Reimer, Maarten L. Simoons, Eric Boersma, Anselm K. Gitt

Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, Roelandt R, De Rycke R, Verspurten J, Declercq W, Agostinis P, Vanden Berghe T, Lippens S, Vandenabeele P.Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria.// Cell Death Dis. 2010;1:e18. doi: 10.1038/cddis.2009.16.

Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P.Autophagy: for better or for worse.// Cell Res. 2012 Jan;22(1):43-61. doi: 10.1038/cr.2011.152. Epub 2011 Sep 13. Review.

Wolkow CA, Kimura KD, Lee MS, Ruvkun G.Regulation of C. elegans life-span by insulinlike signaling in the nervous system.// Science. 2000 Oct 6;290(5489):147-50.

Wu D, Rea SL, Cypser JR, Johnson TE.Mortality shifts in Caenorhabditis elegans: remembrance of conditions past.// Aging Cell. 2009 Dec;8(6):666-75. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00523.x. Epub 2009 Oct 11.

Wu H, Wang C, Wu Z.A new shrinkage estimator for dispersion improves differential expression detection in RNA-seq data.// Biostatistics. 2013 Apr;14(2):232-43. doi: 10.1093/biostatistics/kxs033. Epub 2012 Sep 22.

Wyllie AH.Apoptosis and carcinogenesis.// Eur J Cell Biol. 1997 Jul;73(3):189-97. Review.

Wyrobek AJ, Manohar CF, Krishnan VV, Nelson DO, Furtado MR, Bhattacharya MS, Marchetti F, Coleman MA.Low dose radiation response curves, networks and pathways in human lymphoblastoid cells exposed from 1 to 10cGy of acute gamma radiation.// Mutat Res. 2011 Jun 17;722(2):119-30. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.03.002. Epub 2011 Apr 15.

Xiao R, Zhang B, Dong Y, Gong J, Xu T, Liu J, Xu XZ.A genetic program promotes C. elegans longevity at cold temperatures via a thermosensitive TRP channel.// Cell. 2013 Feb 14;152(4):806-17. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.020.

Xie Z, Klionsky DJ.Autophagosome formation: core machinery and adaptations.// Nat Cell Biol. 2007 Oct;9(10):1102-9. Review.

Yang JY, Xia W, Hu MC.Ionizing radiation activates expression of FOXO3a, Fas ligand, and Bim, and induces cell apoptosis.// Int J Oncol. 2006 Sep;29(3):643-8.

Yang W, Hekimi S.A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in Caenorhabditis elegans.// PLoS Biol. 2010 Dec 7;8(12):e1000556. doi: 10.1371/journal.pbio.1000556.

Yang Z, Klionsky DJ.Eaten alive: a history of macroautophagy.// Nat Cell Biol. 2010 Sep;12(9):814-22. doi: 10.1038/ncb0910-814. Review.

Yang Z, Klionsky DJ.Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation.// Curr Opin Cell Biol. 2010 Apr;22(2):124-31. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.014. Epub 2009 Dec 23. Review.

Yao D, Taguchi T, Matsumura T, Pestell R, Edelstein D, Giardino I, Suske G, Ahmed N, Thornalley PJ, Sarthy VP, Hammes HP, Brownlee M.Methylglyoxal modification of mSin3A links glycolysis to angiopoietin-2 transcription.// Cell. 2006 Jan 27;124(2):275-86. Epub 2006 Jan 12. Retraction in: Yao D, Taguchi T, Matsumura T, Pestell R, Edelstein D, Giardino I, Suske G, Ahmed N, Thornalley PJ, Sarthy VP, Hammes HP, Brownlee M. Cell. 2007 Feb 9;128(3):625.

Yashin AI, Cypser JR, Johnson TE, Michalski AI, Boyko SI, Novoseltsev VN.Ageing and survival after different doses of heat shock: the results of analysis of data from stress experiments with the nematode worm Caenorhabditis elegans.// Mech Ageing Dev. 2001 Sep 15;122(13):1477-95.

Yen K, Mastitis JW, Mobbs CV.Lifespan is not determined by metabolic rate: evidence from fishes and C. elegans.// Exp Gerontol. 2004 Jun;39(6):947-9. No abstract available.

Yen K, Patel HB, Lublin AL, Mobbs CV.SOD isoforms play no role in lifespan in ad lib or dietary restricted conditions, but mutational inactivation of SOD-1 reduces life extension by cold.// Mech Ageing Dev. 2009 Mar;130(3):173-8. doi: 10.1016/j.mad.2008.11.003. Epub 2008 Nov 19.

Yokoyama K, Fukumoto K, Murakami T, Harada S, Hosono R, Wadhwa R, Mitsui Y, Ohkuma S.Extended longevity of Caenorhabditis elegans by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75.// FEBS Lett. 2002 Apr 10;516(1-3):53-7.

You H, Mak TW.Crosstalk between p53 and FOXO transcription factors.// Cell Cycle. 2005 Jan;4(1):37-8. Epub 2005 Jan 23.

Yu BP, Masoro EJ, McMahan CA.Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics.// J Gerontol. 1985 Nov;40(6):657-70.

Yuan CX, Czarnecka-Verner E, Gurley WB.Expression of human heat shock transcription factors 1 and 2 in HeLa cells and yeast.// Cell Stress Chaperones. 1997 Dec;2(4):263-75.

Zalckvar E, Yosef N, Reef S, Ber Y, Rubinstein AD, Mor I, Sharan R, Ruppin E, Kimchi A.A systems level strategy for analyzing the cell death network: implication in exploring the apoptosis/autophagy connection.// Cell Death Differ. 2010 Aug;17(8):1244-53. doi: 10.1038/cdd.2010.7. Epub 2010 Feb 12.

Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y to normal rats has divergent effects on glucose utilization by adipose tissue and skeletal muscle.// Diabetes. 1994 Jun;43(6):764-9.

Zeitlinger J, Bohmann D.Thorax closure in Drosophila: involvement of Fos

and the JNK pathway.// Development. 1999 Sep;126(17):3947-56.

Zhang ZT, Zhu SY.Drosomycin, an essential component of antifungal defence in Drosophila.// Insect Mol Biol. 2009 Oct;18(5):549-56. doi: 10.1111/j.1365-2583.2009.00907.x. Review.

Zhong W, McClure CD, Evans CR, Mlynski DT, Immonen E, Ritchie MG, Priest NK.Immune anticipation of mating in Drosophila: Turandot M promotes immunity against sexually transmitted fungal infections.// Proc Biol Sci. 2013 Oct 30;280(1773):20132018. doi: 10.1098/rspb.2013.2018. Print 2013 Dec 22.

Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N.Nutritional control of aging.// Exp Gerontol. 2003 Jan-Feb;38(1-2):47-52.

Zinke I, Schütz CS, Katzenberger JD, Bauer M, Pankratz MJ.Nutrient control of gene expression in Drosophila: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response.// EMBO J. 2002 Nov 15;21(22):6162-73.

Zois CE, Koukourakis MI.Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells: towards novel cytoprotection and radio-sensitization policies?// Autophagy. 2009 May;5(4):442-50. Epub 2009 May 19. Review.

Zuberi K, Franz M, Rodriguez H, Montojo J, Lopes CT, Bader GD, Morris Q.GeneMANIA prediction server 2013 update.// Nucleic Acids Res. 2013 Jul;41(Web Server issue):W115-22. doi: 10.1093/nar/gkt533.

Zuo J, Rungger D, Voellmy R.Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1.// Mol Cell Biol. 1995 Aug;15(8):4319-30.

[No authors listed]. Final regulations are published governing the National Practitioner Data Bank.// Colo Med. 1990 Mar;87(3):81.