

на правах рукописи



ЖИКРИВЕЦКАЯ СВЕТЛАНА ОЛЕГОВНА

**ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ СТРЕСС-ОТВЕТА И СТАРЕНИЯ
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

Специальность 03.01.01 – Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2018

Работа выполнена на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)» Министерства образования и науки Российской Федерации и Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Москалёв Алексей Александрович – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор РАН, заведующий лабораторией молекулярной радиобиологии и геронтологии Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, заведующий лабораторией генетики продолжительности жизни и старения Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)» Министерства образования и науки Российской Федерации

Официальные оппоненты:

Засухина Галина Дмитриевна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник группы мутагенеза и репарации отдела генетической безопасности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Гудков Сергей Владимирович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории макрокинетики неравновесных процессов Научного центра волновых исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей физики имени А.М. Прохорова Российской академии наук

Ведущая организация:

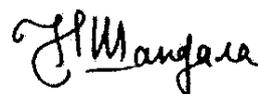
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «31» января 2019 г. в 10 часов 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 462.001.04, по адресу: Москва, ул. Живописная, д. 46, Тел. +7 (495)190-96-98

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Автореферат разослан « 29 » ноября 2018 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета, Д 462.001.04,
доктор медицинских наук



Н.К.Шандала

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Радиационное воздействие является частью повседневной жизни каждого человека. Источники ионизирующего излучения могут быть как искусственными, так и естественными. Естественным источником ионизирующего излучения выступает в первую очередь естественный радиационный 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 процедурами (Медведева и др., 2014). Следствием аварий атомных станций, испытаний ядерного оружия, накопления радиоактивных отходов является не только загрязнение определенной территории, но и распространение источников излучения на более обширные области. При этом, хотя для среднестатистического 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.

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 относительно низкой дозе на разные показатели жизнедеятельности организма, в том числе продолжительность жизни (Calabrese, Baldwin, 2000). На сегодняшний день горметический эффект обнаружен для различных организмов 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 радиационного воздействия остается малоизученным механизм положительного влияния на продолжительность жизни животных. Также наблюдение гормонального 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.

Для исследования механизмов старения, изменения продолжительности жизни и влияния различных факторов на эти показатели удобным объектом является дрозофила. Так как формы кривых выживания различных видов животных очень схожи, по-видимому, 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, показан у разных видов разных таксономических групп, что позволяет предположить универсальность механизма этого явления. Также у имаго дрозофилы ткани состоят из постмитотических клеток, за исключением некоторых интерстициальных клеток, что позволяет избежать влияния побочных факторов (прежде всего онкологических эффектов) на полученные результаты. Сравнительно короткий жизненный цикл и небольшая продолжительность жизни, легкость содержания в лабораторных условиях, возможность подвергать одновременно много 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 заключается в идентификации путей и генов, участвующих в ответе на радиационное воздействие в разных дозах на транскрипционном уровне у плодовых мушек *Drosophila melanogaster*, и сравнении экспрессионных профилей в ответ на

воздействие других типов стресса (холодового, метаболического и инфекционного) 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 каждому из трех типов стресса: холодовому (-4°C , 0°C и $+4^{\circ}\text{C}$), 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.

Научная новизна исследования. Впервые проведен анализ эффекта малых доз ионизирующего излучения (5 и 10сГр) на физиологическом и экспрессионном уровне на примере особей *Drosophila melanogaster*. Показано, что ионизирующая

радиация в указанных дозах может приводить к гормезису, проявляющемуся в увеличении различных параметров 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 стресс-факторов разного типа (радиационное излучение, голодание, гипотермия, инфекционное заражение) на физиологическом (продолжительность жизни, локомоторная активность) и экспрессионном уровне на особей *Drosophila melanogaster*. Выявлен общий механизм ответа на исследуемые стресс-факторы – изменение экспрессии генов регуляции метаболических путей, в том числе биосинтеза фолатов.

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.

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, холодowego 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.

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

Личный вклад автора. Соискатель лично участвовал в постановке и решении задач исследования. Среди представленных экспериментов соискателем лично проведены все, за исключением непосредственно обработки мух стресс-факторами и подсчета количества умерших после воздействия особей, получены, обработаны и интерпретированы основополагающие результаты. В совместных публикациях вклад соискателя – 60%.

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

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), выводов, приложения и списка цитируемой литературы, содержащего 473 источников публикаций, в том числе 469 публикаций из зарубежных изданий. Работа изложена на 84 страницах машинописного текста и содержит 4 таблицы и 13 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе рассмотрены данные литературы по эффектам и механизмам влияния радиационного излучения в различных дозах, возможным механизмам гормезиса в результате воздействия малых доз ионизирующей радиации, а также – по особенностям горметического эффекта других типов стресса. Описаны основные способы измерения уровня экспрессии генов и рассмотрены их недостатки и достоинства.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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*. Дрозофил содержали в термостате при 25°C и 12-часовом режиме освещения на стандартной агарно-дрожжевой питательной среде.

Обработка радиацией и другими исследуемыми стресс-факторами. Исходя из анализа данных, представленных в литературе, были выбраны дозы радиации ранее неизученные (5 и 10 сГр) в плане влияния на экспрессию генов, дозы, не вызывающие токсического эффекта (20 и 40 сГр) с показанным проявлением горметического эффекта, а также дозы, обладающие токсическим эффектом (144, 360, и 864 Гр) (Parashar et al., 2008). Для выявления влияния других типов стресса были взяты дозы с предположительно разной степенью воздействия: гипотермия (температуры -4°C, 0°C и +4°C), инфекционное заражение (10 и 100 КОЕ), голодание (16 часов).

Для экспрессионного анализа брали мух на имагинальной стадии развития: в 5-ти дневном возрасте мух подвергали воздействию одного из исследуемых факторов.

В качестве источника гамма-радиации использовали ^{226}Ra с мощностью экспозиционной дозы облучения 36 мГр/час. 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. 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 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 Гр, 360 Гр и 864 Гр.

Энтомопатогенный грибок *Beauveria 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 подвергались воздействию температуры -4°C , 0°C и $+4^{\circ}\text{C}$ в термостате в течение 120 минут. После этого мухи содержались в стандартных условиях.

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.

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.

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.

Для статистического анализа данных использовали непараметрические методы (Pyke, Thompson, 1986; Tollefsbol, 2013, Wang et al., 2004): модифицированный критерий Колмогорова-Смирнова для сравнения параметров функций дожития (Modified Kolmogorov-Smirnov test..., 1980); критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона (Breslow, 1970) и критерий Мантеля-Кокса (Cox, 1959; Mantel, 1966; Cox, Oakes, 1984) для оценки статистической значимости различий медианной продолжительности жизни; критерий Ванг-Алисона для оценки статистической значимости различий максимальной продолжительности жизни (Statistical methods for testing..., 2004). Расчет параметров выполняли с помощью статистических пакетов Statistica 8.0 (StatSoft), WinModest 1.0.2 (Pletcher, 1999) и R 3.0.1 (R Core Team).

Оценка возрастной динамики локомоторной активности. 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.

Оценка влияния изучаемых воздействий на экспрессионном уровне. Анализ экспрессии в образцах мух, подвергнутых разным типам воздействий, проводили разными методами. Для анализа изменения экспрессии 29 генов с разными функциями в ответ на воздействие ионизирующей радиации в дозе 5, 10, 20, 40 сГр использовали метод количественной ПЦР «в реальном времени», первым этапом которого была обратная транскрипция (ОТ-ПЦР). При анализе данных ПЦР-РВ в первую очередь проводилась оценка стабильности референсных генов четырьмя методами Δ СТ (Silver et al., 2006), BestKeeper (Pfaffl

et al.,2004), Normfinder (Andersen et al.,2004), Genorm (Vandesompele et al.,2002). Для оценки достоверности полученных значений вычисляли значение T-статистики и p-value с помощью программной среды R, версия 2.15.1.

Для анализа транскриптомных изменений в ответ на воздействие разных типов стресса использовали метод высокопроизводительного параллельного секвенирования. Для этого на первом этапе выделяли тотальную РНК и оценивали ее качество – измеряли индекс целостности РНК (RIN). Образцы с высоким значением этого параметра считались пригодными для проведения дальнейшего анализа. На их основе создавали библиотеки с помощью набора реагентов TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit (Illumina, США) и секвенировали с помощью платформы HiSeq™2000 (Illumina, США). При обработке данных секвенирования в первую очередь был произведен тримминг ридов, 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. 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Анализ воздействия малых доз ионизирующей радиации на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*. Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 сГр оказало горметический эффект на самцов в виде увеличения на 3,4 % медианной продолжительности жизни и на 4,2% максимальной продолжительности жизни (Таблица 1). При этом в ответ на 5 и 40 сГр наблюдалось увеличение в MRDT (время удвоения интенсивности смертности) от 11,4 до 22,5 %. 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 радиации в дозах 10 и 20 сГр, так же как и максимальная продолжительность жизни. Таким образом, можно заключить, что гормезис у самок плодовых мушек проявляется при облучении радиацией в дозах 5 и 40 сГр.

Рисунок 1 демонстрирует наличие корреляции Штрелера-Милдвана между параметрами уравнения Гомпертца α и R_0 для особей мужского и женского пола после воздействия радиации в различных дозах. Параметры α и R_0 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). Из-за широкого спектра возможных механизмов радиационно-индуцированных изменений представляется важным оценить изменение экспрессии генов, участвующих в разных процессах жизнедеятельности особи. 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.

Таблица 1 – Изменение продолжительности жизни особей *Drosophila melanogaster* после облучения ионизирующей радиацией в малых дозах.

Доза	Пол	M	ΔM (%)	90%	$\Delta 90\%$	MRDT	Δ MRDT (%)	α	R0	R ²	N
Контроль	♂	58	-	71	-	7,52	-	0,092	0,00031	0,805	1044
5 сГр		59	1,7	71	0	8,38	11.4 (*)	0.083 (*)	0.0005 (*)	0,718	423
10 сГр		60	3.4 (**)	74	4.2 (**)	7,88	4,8	0,088	0,00032	0,703	426
20 сГр		59	1,7	70	-1,4	7,35	-2,3	0,094	0,00029	0,743	391
40 сГр		58	0	71	0	9,21	22.5 (**)	0.075 (**)	0.00071 (**)	0,563	438
Контроль	♀	66	-	79	-	8,64	-	0,08	0,00032	0,77	1017
5 сГр		69	4.5 (*)	78	-1,3	7,87	-8,9	0,088	0,00019	0,57	381
10 сГр		63	-4.5 (**)	76	-3.8 (**)	9,06	4,9	0,076	0.00051 (*)	0,63	318
20 сГр		63	-4.5 (**)	71	-10.1 (**)	7	-19 (**)	0.099 (**)	0.00016 (**)	0,82	457
40 сГр		71	7.6 (**)	84	6.3 (**)	8,04	-2,8	0,082	0,00018	0,64	438

M – медианная продолжительность жизни, 90% – возраст смертности 90% выборки (максимальная продолжительность жизни), MRDT – время удвоения интенсивности смертности, ΔM , $\Delta 90\%$ и $\Delta MRDT$ – различия с контролем для M, 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 для α).

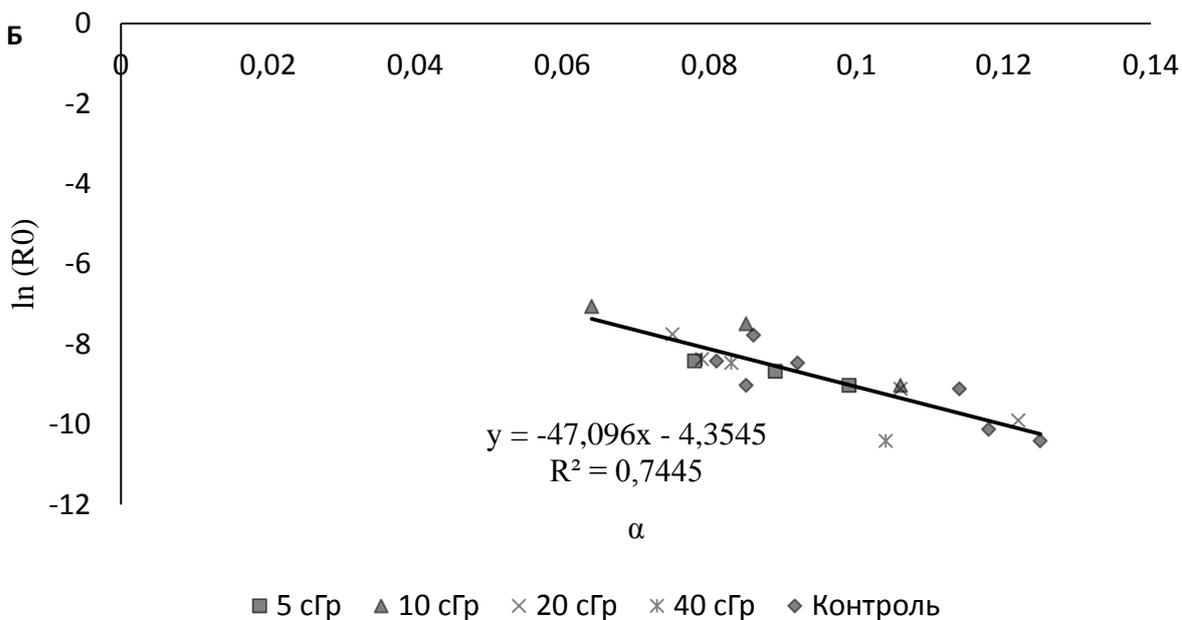
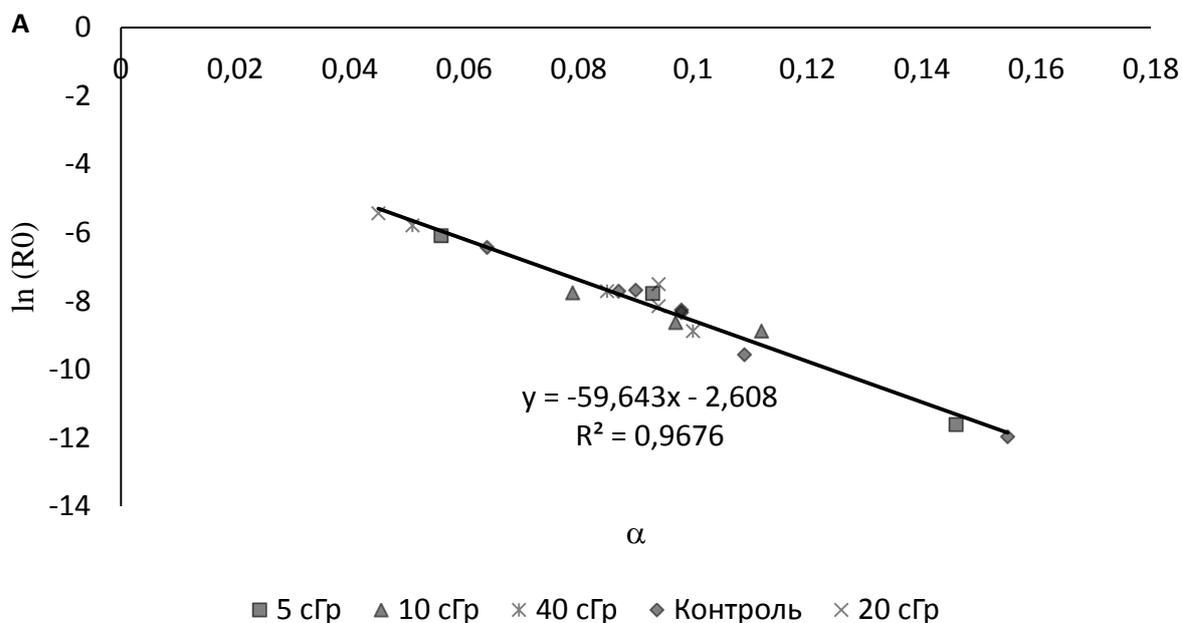


Рисунок 1 – Корреляция Стрелера-Милдвана параметров функции уравнения Гомперца у самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster* линии дикого типа Canton-S после воздействия малых доз ионизирующей радиации.

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

Измерение уровня экспрессии этих генов проводили в нескольких временных точках после воздействия ионизирующей радиацией для оценки динамики его изменения. Это позволило бы оценить, в какой момент ген включается в ответ на воздействие, а значит и вероятность его участия не только непосредственно в ответе на стресс, но и в развитии отдаленного эффекта, приводящего к увеличению продолжительности жизни.

3.2.1. Анализ дифференциальной экспрессии в образцах мужских особей. В особях мужского пола 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 1.5 раза больше), *Сур4е2* (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 (Каграс et al.,2011). Сверхэкспрессия гена *Сур4е2* и сниженная экспрессия гена *CG42751*, обнаруженные в данном исследовании, согласуются с результатами анализа транскрипционной активности при других типах стресса (Moskalev et al.,2014).

Ген *Сурба20*, кодирующий цитохром P450 ба20, который 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). Различие динамики экспрессионных профилей генов немедленной реакции на радиацию в зависимости от дозы, 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 смещении экспрессионного ответа у этих образцов. Схожая закономерность была обнаружена для гена *CG18180* для мужских особей.

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

3.2.3. Сравнение экспрессионной динамики анализируемых генов у особей разного пола. Пол-специфичность ответа на разные стимулы была подтверждена множеством экспериментов. Степень горметического эффекта в ответ на различные типы стресса также 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, играет в этом значительную роль. К тому же, как было показано ранее, экспрессия этого гена изменяется в ответ на голодание и холодовой стресс (Telonis-Scott et al., 2009).

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 горметического 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 горметического 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 и локомоторной активности 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 2). При этом эффект радиации и грибкового заражения оказался прямо пропорционален дозе, что соответствует данным других исследований (Taylor, Kimbrell, 2007, Parashar et al., 2008). Холодовой шок не оказал статистически значимого эффекта на продолжительность жизни.

Таблица 2 – Влияние стресс-факторов различной природы на выживаемость самцов имаго *Drosophila melanogaster*

Фактор	Доза	М	dM	90%	d90%	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 °С	59	0	73	+2.8%	2	327
	0 °С	57	-3.4%	70	-1.4%	2	308
	-4 °С	59	0	70	-1.4%	2	297

Обозначения: М – медианная продолжительность жизни; 90% - возраст смертности 90% выборки; dM и d90% - 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.

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.

3.4. Анализ локомоторной активности особей, подвергнутых воздействию разных стресс-факторов. Энтамопатогенные грибки, радиация и холодовой шок вызывали снижение локомоторной активности в 1-5 день после воздействия. Снижение локомоторной активности в первые 5 сут после инфицирования, по-видимому, обусловлено развитием острой стадии грибковой инфекции, что сопровождается массовой гибелью особей. 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 продолжительности 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°C . После воздействия температурами 0 и $+4^{\circ}\text{C}$ 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 холодowego шока при различных температурах значительно отличаются, при этом не наблюдается никакой зависимости от дозы стресса. После 16-ти часового голодания повышение активности наблюдалось в течение 25 дней.

Корреляции между эффектом стресс-фактора на продолжительность жизни и на локомоторную активность также не обнаружено.

3.5. Анализ транскриптомов особей, подвергнутых воздействию

разных стресс-факторов. Были исследованы изменения транскриптомов *Drosophila melanogaster* в ответ на воздействие 4х типов стресса: заражение энтамопатогенными грибами (10 и 100 КОЕ), ионизирующая радиация (144, 360 и 864 Гр), голодание (16 часов), холодовой шок (-4°C, 0°C и +4°C). 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 значимую дифференциальную экспрессию отмечали при значении $FDR < 0,05$.

Эффект ионизирующей радиации на экспрессию генов значительно отличается в зависимости от дозы. 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 100 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 2).

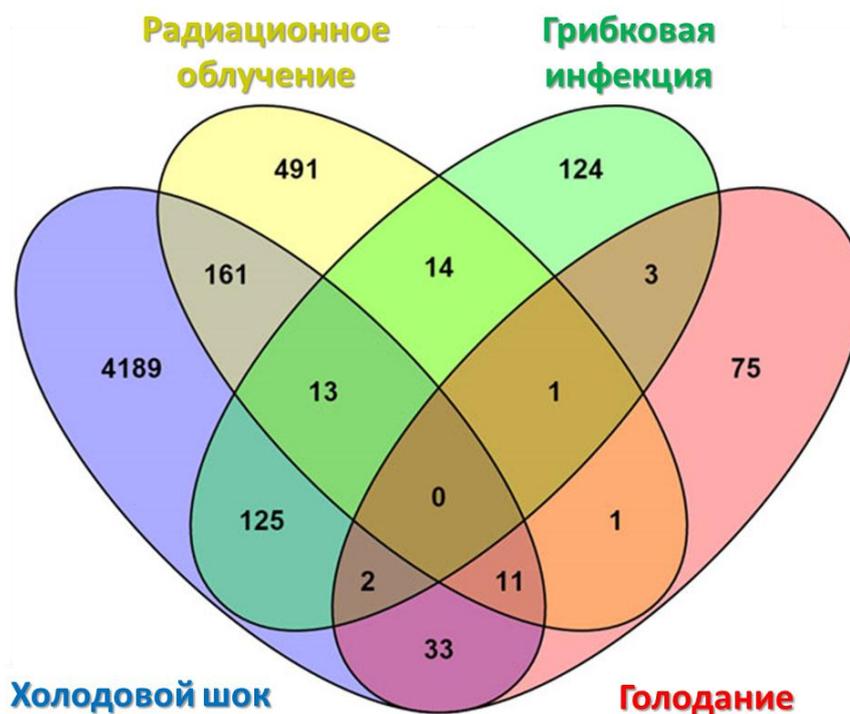


Рисунок 2 – Диаграмма, отражающая количество пересекающихся генов, дифференциально экспрессированных в условиях четырех исследованных стресс-факторов.

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. На процесс окисления-восстановления повлияли все исследованные стресс-факторы, за исключением энтамопатогенных грибов 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 3).

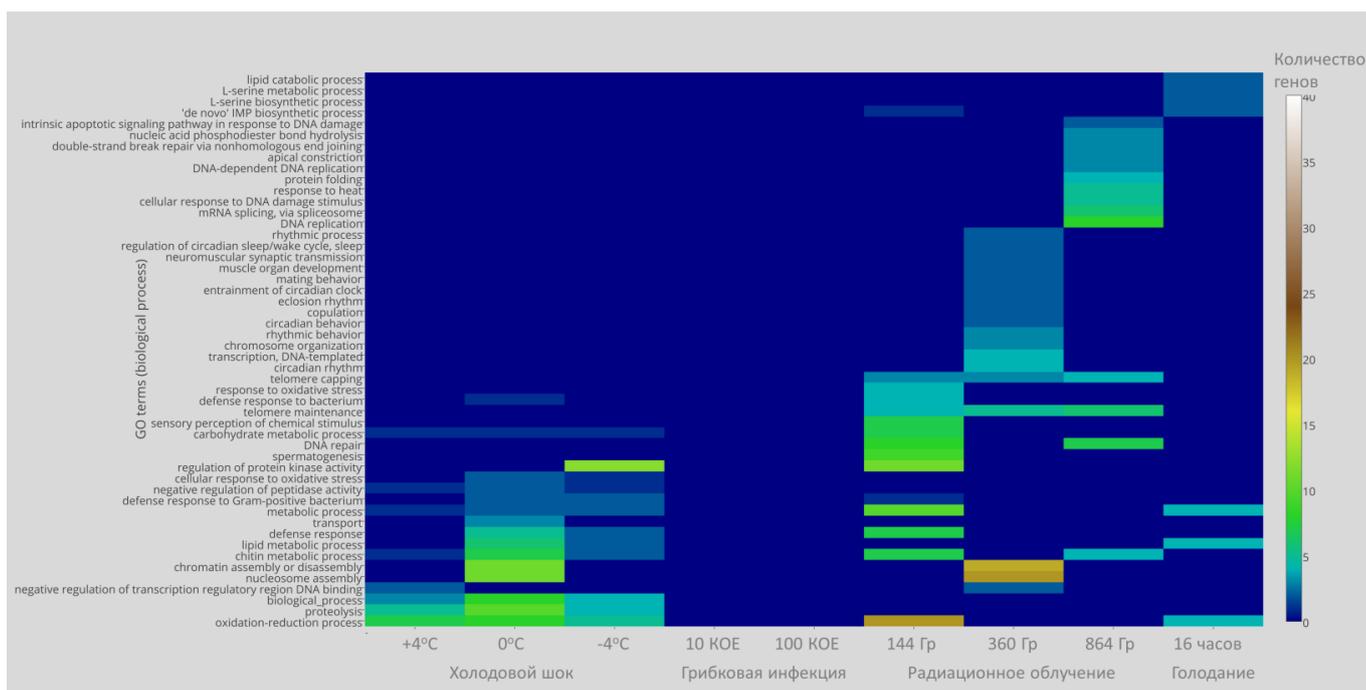


Рисунок 3 – Тепловая карта биологических процессов, представленных высоко экспрессированными генами, в соответствии с системой Gene Ontology.

Ионизирующая радиация в дозе от 144 до 864 Гр произвела активирующий эффект на гены, обогатившие 39 биологических процессов, и привела 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 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 идентифицировано 151 (90 низко- и 161 высокоэкспрессированных) генов, 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.

Гены, сверхэкспрессированные в ответ на холодовой стресс температур -4°C , 0°C и $+4^{\circ}\text{C}$, 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. 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), но 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- и 13 низкоэкспрессированы. 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.

При всех исследованных стрессовых температурах наблюдалось снижение активности генов фолат-опосредованного одноуглеродного метаболизма. Холодовой 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. В ответ на радиационное воздействие во всех исследованных дозах были сверхэкспрессированы гены, относящиеся к KEGG путям негомологичного соединения концов и гомологичной рекомбинации.

GSEA с помощью раздела Биологические процессы онтологии GO позволил выявить, что дифференциально экспрессированные под воздействием голодания гены перепредставлены в различных метаболических процессах. Интересно отметить, что процесс «детерминация продолжительности жизни взрослой

особи» обогащен дифференциально экспрессированными генами, например, *Thor*. Он участвует как в иммунной защите организма, так и в сигнальном пути *mTOR*, для которого показана важная роль в регуляции продолжительности жизни. Дифференциальная экспрессия *Thor* не обнаружена при воздействии других исследованных стресс-факторов.

В ответ на воздействие ионизирующей радиации 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*, *rad50*, *Ku80*, *Irbp*, *mus205*, 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. 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, изменение в биосинтезе фолатов может быть неспецифической реакцией на голодание, холодовой шок

или облучение радиацией, так как в этих случаях наблюдается необходимость в синтезе РНК или репарации.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

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. При этом особый интерес вызывают эффекты воздействия малых доз стресс-факторов, которые могут приводить к гормезису. Однако определение уровня стресса, под действием которого проявляется гормезис, является отдельной задачей для каждого типа стресса и отдельного модельного животного. В большинстве случаев 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.

При анализе влияния сверхмалых доз ионизирующей радиации (5, 10, 20, 40 сГр) 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 широко распространённым явлением, однако его природа не вполне изучена (Promislow, 2003, Clutton-Brock, Isvaran, 2007). Существует несколько гипотез для объяснения этого явления. Ранее показана зависимость степени проявления полового диморфизма продолжительности жизни в зависимости от условий среды (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 (ВНАКТИ CHANDEGRA ET AL., 2017). Так как эффект малых доз ионизирующей 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.

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 экспрессионных профилей анализируемых генов: *mus309*, *CG18180*, *Hsp70Aa*, *Brc2*. 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.

Для более широкомасштабного изучения механизма ответа, общего для стрессов разного типа и природы, 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 увеличением количества свободных радикалов, в том числе активных форм кислорода. Пути, 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 суток, 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.

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 сверх экспрессированными 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 в разных дозах. 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 при температурах 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.

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 его 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 (Miller, Miller, 1987). Такой эффект может быть вызван изменением экспрессии гена *CG15068*.

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 грибами приводили к снижению продолжительности жизни у самцов *Drosophila melanogaster*. Гипотермия 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Effect of Low Doses (5-40 cGy) of Gamma-irradiation on Lifespan and Stress-related genes Expression Profile in *Drosophila melanogaster* / **Svetlana Zhikrivetskaya**, Darya Peregudova, Anton Danilov, Ekaterina Plyusnina, George Krasnov, Alexey Dmitriev, Anna Kudryavtseva, Mikhail Shaposhnikov and Alexey Moskalev // PLoS One. – 2015. – Vol.10. – №8 – DOI: 10.1371/journal.pone.0133840.
2. A comparison of the transcriptome of *Drosophila melanogaster* in response to entomopathogenic fungus, ionizing radiation, starvation and cold shock / Alexey Moskalev, **Svetlana Zhikrivetskaya**, George Krasnov, Mikhail Shaposhnikov, Ekaterina Proshkina, Dmitry Borisoglebsky, Anton Danilov, Darya Peregudova, Irina Sharapova, Eugenia Dobrovolskaya, Ilya Solovev, Nadezhda Zemskaya, Lyubov Shilova, Anastasia Snezhkina, and Anna Kudryavtseva // BMC Genomics. – 2015. – Vol.16(Suppl 13). – S8 – DOI: 10.1186/1471-2164-16-S13-S8.
3. Fucoxanthin increases lifespan of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* / Lashmanova E, Proshkina E, **Zhikrivetskaya S**, Shevchenko O, Marusich E, Leonov S, Melerzanov A, Zhavoronkov A, Moskalev A // Pharmacol Res. 2015. Vol.100.P.228-241 DOI: 10.1016/j.phrs.2015.08.009.
4. Aging Chart: a community resource for rapid exploratory pathway analysis of age-related processes / Moskalev A, **Zhikrivetskaya S**, Shaposhnikov M, Dobrovolskaya E, Gurinovich R, Kuryan O, Pashuk A, Jellen LC, Aliper A, Peregudov A, Zhavoronkov A // Nucleic Acids Res. 2016. Jan 4;44(D1):D894-9. DOI: 10.1093/nar/gkv1287.