

© О. А. Шосталь, А. А. Москалев

УДК 57 + 57.04

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ ОСВЕЩЕНИЯ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЛИНИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER* С МУТАЦИЯМИ В ГЕНАХ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ*

О. А. Шосталь, А. А. Москалев (Сыктывкар, Россия)

Свет является важным экологическим фактором, который постоянно воздействует на живые организмы в течение всей их жизни. Генетические механизмы влияния света на продолжительность жизни изучены слабо. Статья посвящена исследованию влияния различных условий освещения (24 ч, 12 ч, 0 ч) на продолжительность жизни линий дрозофилы с нарушением в генах цитоплазматической (*Sod1*) и митохондриальной (*Sod2*) супероксиддисмутазы. Обнаружено, что особи дрозофилы с низкой способностью детоксицировать свободные радикалы характеризуются более выраженной разницей между продолжительностью жизни в темноте и на свету по сравнению с особями линии дикого типа. При этом увеличение длины светового дня (с 12 ч до 24 ч) приводит к значительному снижению продолжительности жизни особей с мутациями в исследуемых генах. Данный результат указывает на опасность избыточного освещения. Показана роль генов супероксиддисмутазы в регуляции продолжительности жизни плодовой мушки *Drosophila melanogaster* в ответ на изменение длины светового дня.

Ключевые слова: продолжительность жизни, *Drosophila melanogaster*, световой режим, супероксиддисмутаза.

Введение

В процессах старения существенную роль отводят уровню метаболизма и сопутствующему ему оксидативному стрессу. Наиболее распространенной на сегодня

является точка зрения, согласно которой увеличение длины светового дня может приводить к более высокому уровню метаболизма вследствие интенсификации двигательной активности и изменения температуры

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Шосталь Ольга Андреевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук.

E-mail: olash@list.ru

Москалев Алексей Александрович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной радиобиологии и геронтологии, Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук.

тела дрозофил [12–13]. Повышение уровня метаболизма, в свою очередь, приводит к дополнительному образованию токсичных побочных продуктов – свободных радикалов [7; 10], повреждающих митохондриальную и ядерную ДНК, мембраны и белки клетки [1; 6; 9], что в результате может привести к ускоренному старению и укороченной продолжительности жизни. В предыдущих наших работах было установлено [4–5], что линии дрозофилы с мутациями в генах репарации ДНК, белков теплового шока семейства 70 и белка сиртуина характеризуются более выраженной разницей между продолжительностью жизни в темноте и на свету по сравнению с линией дикого типа. Данный результат подтверждает важную роль исследуемых генов в устранении эффектов повреждающего действия света.

Супероксиддисмутаза является главным защитником клеток от свободных радикалов. Известно, что у дрозофилы, полностью потерявшей активность Cu/Zn-супероксиддисмутаза, продолжительность жизни снижается на 80 % [14], а введение в геном дрозофилы короткоживущей линии дополнительных генов супероксиддисмутаза и каталазы, основных ферментов антирадикальной защиты, приводило к повышению продолжительности жизни [11]. Недостаток митохондриальной супероксиддисмутаза у дрозофил и мышей также негативно сказывается на продолжительности жизни, тогда как сверхэкспрессия этого гена продлевает продолжительность жизни этих модельных организмов [8]. В данной работе мы решили проверить, будет ли свет оказывать свое повреждающее действие и будет ли изменяться продолжительность жизни в темноте и на свету у линий, с нарушениями в

генах митохондриальной и цитоплазматической супероксиддисмутаза.

Материал и методы исследования

В работе исследовали линию дикого типа *Canton-S* в качестве контрольной линии; линию *Sod1* – гетерозигота с мутацией гена цитоплазматической супероксиддисмутаза (генотип: *Sodⁿ¹red¹/TM3,Sb¹Ser¹*) и линию *Sod2* – гетерозигота с мутацией гена митохондриальной супероксиддисмутаза (генотип: *y¹w^{*}; Sod2^{Delta02}/CyO*).

Условия эксперимента.

Культивирование родительских линий проводили в термостате при температуре 25⁰ С и стандартном 12 ч режиме освещения, в баночках 100 мл, содержащих 25 мл дрожжевой питательной среды. После появления имаго в течение суток производили отбор необходимого количества особей (50 штук на баночку), предварительно наркотизировав эфиром. Самцы и самки содержались отдельно. Общее количество баночек каждой линии было разделено на 3 группы. Первая группа исследуемых линий содержалась в условиях стандартного 12 ч освещения при интенсивности 120-130 лк от лампы дневного света, вторая группа – в условиях постоянного освещения (24 ч, 120-130 лк), третья группа – в условиях световой депривации (24 ч темнота, 0 лк). Подсчет числа умерших мух проводили ежедневно (за исключением субботы и воскресенья). Выживших мух еженедельно перемещали на свежую среду.

Статистическая оценка продолжительности жизни.

Для оценки достоверности различий по продолжительности жизни в темноте и на свету применяли непараметрические критерии Гехана-Бреслоу-Вилкоксона (для оценки различий медианной

продолжительности жизни) и Колмогорова-Смирнова (для сравнения кривых выживаемости) [2]. Для оценки статистической значимости различий 90%-ой гибели особей применяли метод Ванг-Аллисона [15]. Функции дожития оценивали с помощью процедуры Каплана-Мейера и представляли в виде кривых дожития [3] в программе Statistica 6.1 (Statsoft, США).

Результаты

При содержании особей контрольной линии дикого типа *Canton-S* в условиях стандартного 12-ти часового режима

освещения при интенсивности 120 лк медианная продолжительность жизни не изменялась (табл. 1), а в условиях круглосуточного режима освещения медианная продолжительность жизни изменилась только у самцов (снизилась на 12 %). В тоже время у особей линии *Sod1* с нарушением фермента цитоплазматической супероксиддисмутазы медианная продолжительность жизни при стандартном режиме освещения достоверно снизилась на 12 % у самцов и на 7 % у самок; при круглосуточном режиме освещения – на 37 % у самцов и у самок.

Таблица 1.

Параметры продолжительности жизни особей лабораторных линий дрозофилы при различных режимах освещения

Линия	Пол	Освещение, ч	М	СПЖ	90 %	min	max	N
<i>Canton-S</i>	♂♂	24 ч	56	51.2±0.6	66*	3	70	549
		12 ч	52*	51.5±0.5	66*	9	79	531
		0 ч	59	57.2±0.7	73	12	83	409
	♀♀	24 ч	56	52.1±0.6	66*	3	70	488
		12 ч	59	56.2±0.6	73*	4	81	506
		0 ч	52	56±0.7	77	5	84	469
<i>Sod1</i>	♂♂	24 ч	36*	30.8±0.8	59*	6	66	262
		12 ч	50*	46.2±0.7	61*	8	70	211
		0 ч	57	56.2±0.9	79	13	87	305
	♀♀	24 ч	36*	32.0±0.7	44*	6	56	245
		12 ч	53*	54.0±0.7	69*	8	73	235
		0 ч	57	57.5±0.9	74	9	89	237
<i>Sod2</i>	♂♂	24 ч	36*	35.4±0.7	54*	4	59	491
		12 ч	42*	42.5±0.6	58*	5	66	485
		0 ч	58	55.8±0.6	69	7	77	570
	♀♀	24 ч	62*	53.3±0.7	65*	6	69	571
		12 ч	60*	53.9±0.7	67*	5	73	528
		0 ч	73	68.1±0.8	85	6	90	502

Различия с 0 ч освещением статистически значимы: * – $p < 0.001$.

Обозначения: М — медианная продолжительность жизни; СПЖ — средняя продолжительность жизни; 90% — время жизни 90% популяции; min и max – минимальная и максимальная продолжительность жизни в выборке; N – количество особей в выборке; ♂♂ – самцы; ♀♀ – самки. При сравнении медианной продолжительности жизни применяли критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона, а при анализе времени жизни 90 % популяции – критерий Ванг-Аллисона.

У особей линии *Sod2* с нарушением фермента митохондриальной *Sod* медианная продолжительность жизни при стандартном

режиме снизилась на 28 % у самцов и на 18 % у самок; при круглосуточном режиме освещения – на 38 % у самцов и на 15 % у

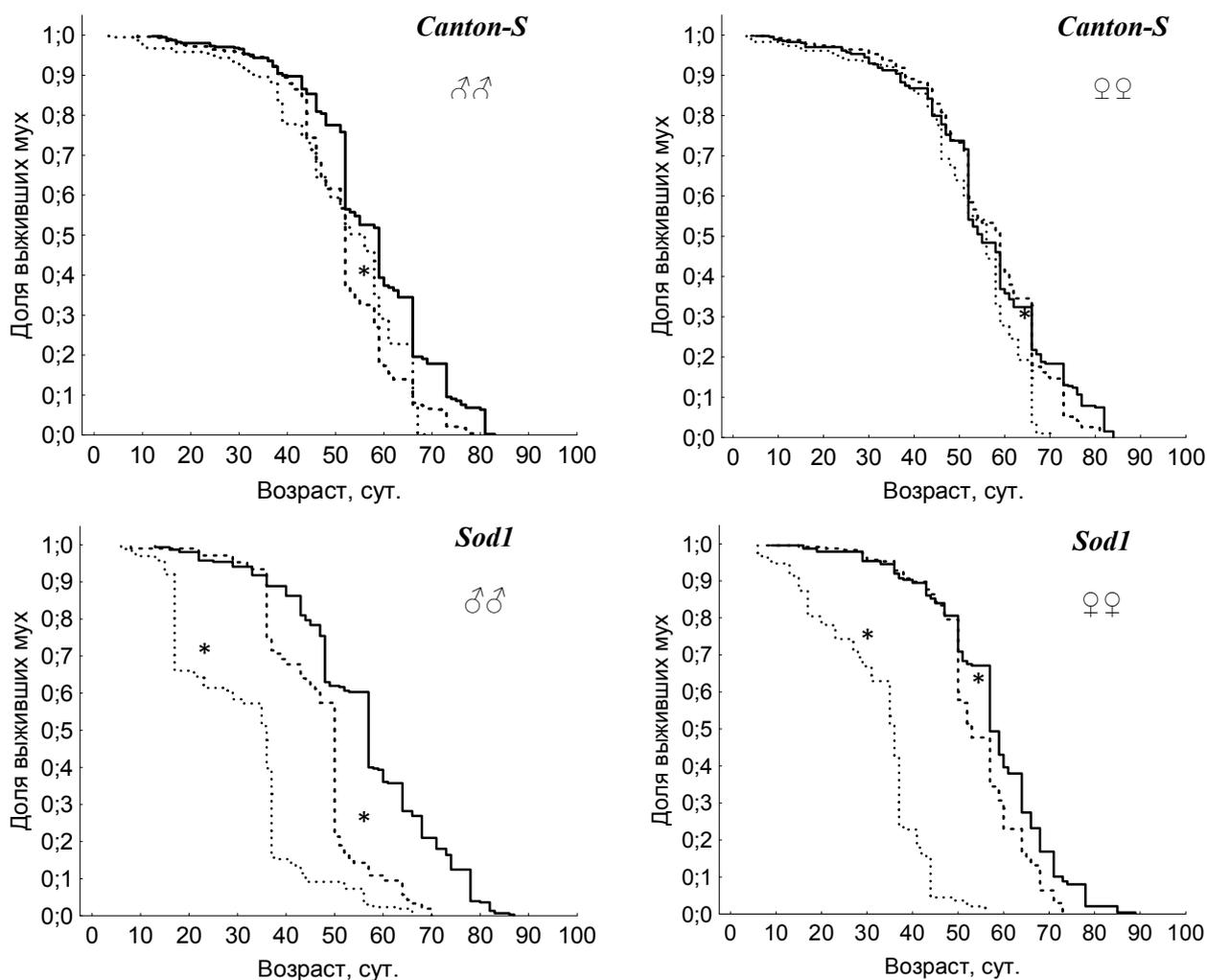
самок. Таким образом, у особей дрозофилы с дефектом в генах *Sod* с увеличением длины светового дня (с 12 ч до 24 ч) наблюдалось более значительное снижение продолжительности жизни. Кроме того, у данных исследуемых линий на свету значительно снижались и другие параметры продолжительности жизни: время 90 %-ной гибели особей, средняя и максимальная продолжительность жизни (см. табл.). Кривые выживаемости особей с нарушением

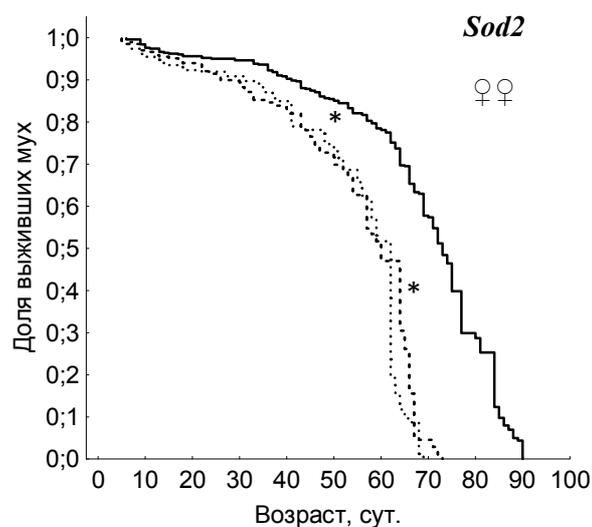
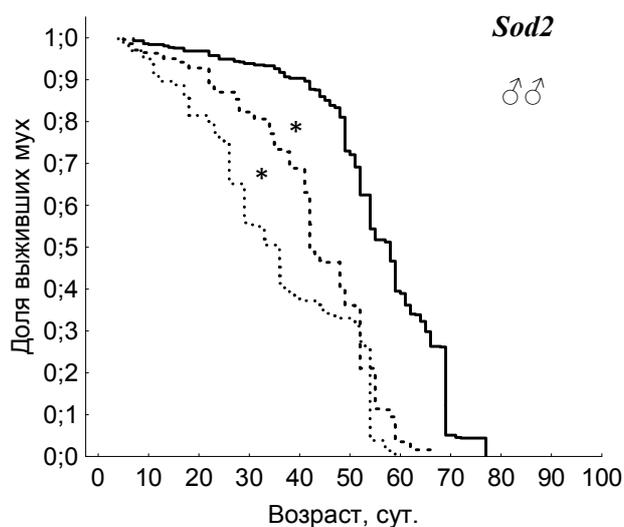
в детоксикации свободных радикалов, содержащихся в условиях круглосуточного режима освещения, находятся значительно ниже кривых выживаемости особей, содержащихся в условиях постоянной темноты или стандартного режима освещения, что свидетельствует об ускоренном старении особей в условиях постоянного освещения. У особей линии дикого типа разрыв в кривых дожития выражен слабо (рис. 1).

Рис. 1.

Кривые выживаемости самцов (♂♂) и самок (♀♀) имаго лабораторных линий дрозофилы при различных режимах освещения (0 ч, 12 ч, 24 ч).

Обозначения: _____ 0 ч; ____ 12 ч; 24 ч; * – различия с темнотой достоверны при $p < 0.001$ (по критерию Колмогорова-Смирнова).





Заключение

Согласно нашим результатам особи линий с низкой способностью детоксицировать свободные радикалы оказались более чувствительными к изменению длины светового дня и имели более выраженную разницу между продолжительностью жизни в темноте и на свету по сравнению с линией дикого типа. Таким образом, полученные результаты убедительно свидетельствуют в пользу предположения о том, что определяющим фактором снижения продолжительности

жизни дрозофил при содержании на свету является увеличение выделения свободных радикалов за счет интенсификации метаболизма, при этом гены цитоплазматической и митохондриальной супероксиддисмутазы играют важную роль в устранении эффектов повреждающего действия света.

Исследования поддержаны грантом Президиума РАН № 12-П-4-1005; грантом Президиума УрО РАН для молодых ученых и аспирантов № 13-4-НП-182 и грантом РФФИ № 12-04-31922-мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. – СПб.: Наука, 2003. – 468 с.
2. Ермаков С. П., Гаврилов Н. С. Первичная статистическая обработка данных по выживаемости организмов // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Общие проблемы биологии. – 1987. – Т. 6. – С. 230–276.
3. Крутько В. Н., Славин М. Б., Смирнова Т. М. Математические основания геронтологии. – М.: Едиториал УРСС, 2002. – 384 с.
4. Москалев А. А., Малышева О. А. Роль генов транскрипционного фактора dFOXO, dSIR2 и HSP70 в изменении продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* при различных режимах освещения // Экологическая генетика. – 2010. – Т. 8. – № 3. – С. 67–80.
5. Москалев А. А., Кременцова А. В., Малышева О. А. Влияние мелатонина на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* при различных режимах освещения // Экологическая генетика. – 2008. – Т. 6. – № 3. – С. 22–30.

6. **Скулачев В. П.** Эволюция, митохондрии и кислород // Соровский образовательный журнал. – 1999. – № 9. – С. 4–10.
7. **Helfand S. L., Rogina B.** Genetics of aging in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // Annu. Rev. Genet. – 2003. – Vol. 37. – P. 329–348.
8. **Honda Y, Tanaka M, Honda S.** Redox regulation, gene expression and longevity // Geriatr Gerontol Int. – 2010. – Vol. 10 – P. 59–69.
9. **Le Bourg E.** Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster* // FEBS Letters. – 2001. – Vol. 498. – P. 183–186.
10. **Massie H. R, Whitney S. J.** Preliminary evidence for photochemical ageing in *Drosophila* // Mech. Ageing Dev. – 1991. – Vol. 58. – P. 37–48.
11. **Orr W. C., Sohal R. S.** Does overexpression of Cu, Zn-SOD extend life span in *Drosophila melanogaster*? // Experimental gerontology. – 2003. – Vol. 38. – P. 227–230.
12. **Sheeba V., Sharma V. K., Shubha K., Chandrashekar M. K., Joshi A.** The effect of different light regimes on adult life span in *Drosophila melanogaster* is partly mediated through reproductive output // J. Biol. Rhythms. – 2000. – N 5. – P. 380–392.
13. **Sheeba V., Chandrashekar M. K., Joshi A., Sharma V. K.** Developmental plasticity of the locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster* // J. Insect Physiol. – 2002. – Vol. 48. – P. 25–32.
14. **Staveley B. E., Phillips J. P., Hilliker A. J.** Phenotypic consequences of copper-zinc superoxide dismutase overexpression in *Drosophila melanogaster* // Genome. – 1990. – Vol. 33. – P. 867–872.
15. **Wang C., Li Q., Redden D. T, Weindruch R., Allison D. B.** Statistical methods for testing effects on «maximum lifespan» // Mech. Ageing Dev. – 2004. – Vol. 125. – N 9. – P. 629632.

© O. A. Shostal, A. A. Moskalev

UDC 57 + 57.04

THE INFLUENCE OF DIFFERENT CONDITIONS OF ILLUMINATION ON LIFESPAN OF DROSOPHILA MELANOGASTER LABORATORY STRAINS WITH MUTATIONS IN GENES SUPEROXIDE DISMUTASE

O. A. Shostal, A. A. Moskalev (Syktyvkar, Russia)

Light is a crucial environmental factor influencing on living organisms during their whole lives. The genetic mechanisms of light influence on Drosophila melanogaster lifespan are poorly understood. Article is devoted to research of influence of different conditions of illumination (24 h, 12 h, 0 h) on lifespan of Drosophila strains with defect of the genes of the cytoplasmic (Sod1) and mitochondrial (Sod2) superoxide dismutase. It is demonstrated, that individuals of Drosophila with a low ability detoxify free radicals are characterized by a more significant difference between lifespan in the darkness and in the light in compared with individuals of wild type strain. The increase of the photoperiod (from 12 to 24 hours) leads to reduction of lifespan of individuals with mutations in the investigated genes. The given result indicating that the risk of excessive illumination. It was shown the role of superoxide dismutase genes in regulating lifespan of the Drosophila melanogaster fruit fly in response to change of photoperiod.

Keywords: *lifespan, Drosophila melanogaster, light conditions, superoxide dismutase.*

REFERENCES

1. **Anisimov V. N.** Molecular and physiological mechanisms of aging. St. Petersburg.: Science, 2003. p. 468. In Russia.
2. **Ermakov S. P., Gavrilov N. S.** Primary statistical analysis of data on survival of organisms // Results of Science and Technology. VINITI. Common problems of biology? 1987. vol. 6. pp. 230–276. In Russia.
3. **Krut'ko V. N., Slavin M. B., Smirnova T. M.** Mathematical Foundations of Gerontology. Moscow: Editorial URSS, 2002. pp 384. In Russia.
4. **Moskalev A. A., Kremntsova A. V., Malysheva O. A.** 2008. Melatonin influence on Drosophila melanogaster life span at different light regimes // Ekol. Genet., 2008. N 3. pp. 22–30. In Russia.
5. **Moskalev A. A., Malysheva O. A.** The role of transcription factors DFOXO, DSIR2 and HSP70 in lifespan alteration of Drosophila melanogaster in different light conditions // Ekol. Genet., 2010. N 3. pp. 67–80.
6. **Skulachev V. P.** Evolution, mitochondria and oxygen // Soros Educational Journal, 1999. N 9. pp. 4–10. In Russia.
7. **Helfand S. L., Rogina B.** Genetics of aging in the fruit fly Drosophila melanogaster // Annu. Rev. Genet. – 2003. – Vol. 37. – P. 329–348.
8. **Honda Y, Tanaka M, Honda S.** Redox regulation, gene expression and longevity // Geriatr Gerontol Int. – 2010. – Vol. 10 – P. 59-69.
9. **Le Bourg E.** Oxidative stress, aging and longevity in Drosophila melanogaster // FEBS Letters. – 2001. – Vol. 498. – P. 183–186.

10. **Massie H. R., Whitney S.J.** Preliminary evidence for photochemical ageing in *Drosophila* // *Mech. Ageing Dev.* – 1991. – Vol. 58. – P. 37–48.
11. **Orr W. C., Sohal R. S.** Does overexpression of Cu, Zn-SOD extend life span in *Drosophila melanogaster*? // *Experimental gerontology.* – 2003. – Vol. 38. – P. 227–230.
12. **Sheeba V., Sharma V. K., Shubha K., Chandrashekar M. K., Joshi A.** The effect of different light regimes on adult life span in *Drosophila melanogaster* is partly mediated through reproductive output // *J. Biol. Rhythms.* – 2000. – N 5. – P. 380–392.
13. **Sheeba V., Chandrashekar M. K., Joshi A., Sharma V. K.** Developmental plasticity of the locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster* // *J. Insect Physiol.* – 2002. – Vol. 48. – P. 25–32.
14. **Staveley B. E., Phillips J. P., Hilliker A. J.** Phenotypic consequences of copper-zinc superoxide dismutase overexpression in *Drosophila melanogaster* // *Genome.* – 1990. – Vol. 33. – P. 867–872.
15. **Wang C., Li Q., Redden D.T, Weindruch R., Allison D.B.** Statistical methods for testing effects on «maximum lifespan» // *Mech. Ageing Dev.* – 2004. – Vol. 125. – N 9. – P. 629–632.

Shostal Olga Andreevna – Ph.D, Research fellow, Institute of Biology of the Komi Scientific Centre of the Ural Division of RAS.

E-mail: olash@list.ru

Moskalev Alexei Alexandrovich – Ph.D., Head of the Laboratory of Molecular Radiobiology and Gerontology, Institute of Biology of the Komi Scientific Centre of the Ural Division of RAS.