

Бобровских (Еремина) Маргарита Александровна

**ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОГО ТЕПЛОВОГО СТРЕССА
НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ИНСУЛИНОВОГО СИГНАЛЬНОГО
КАСКАДА И УГЛЕВОДНО-ЖИРОВОЙ ОБМЕН У *DROSOPHILA
MELANOGASTER***

1.5.7. – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2021

Работа выполнена в лаборатории генетики стресса Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук», г. Новосибирск.

**Научный
руководитель:**

Груntenко Наталия Евгеньевна

д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории генетики стресса ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

**Официальные
оппоненты:**

Глунов Виктор Вячеславович

чл.-корр. РАН, д.б.н., директор Института систематики и экологии животных СО РАН, зав. лабораторией патологии насекомых Института систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск

Никитина Екатерина Александровна

д.б.н., зав. кафедрой анатомии и физиологии человека и животных Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», г. Санкт-Петербург

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.01 (Д 003.011.01) на базе ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН» в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел: +7(383) 363-49-06 (1321); e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

факс: +7(383) 333-12-78

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

Хлебодарова Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В современных условиях периодических столкновений живых организмов с неблагоприятными внешними воздействиями, такими как загрязнение окружающей среды или глобальное изменение климата, изучение механизмов, способствующих адаптации животных к подобным условиям, приобретает особую актуальность. Известно, что воздействие подобных факторов инициирует у животных развитие неспецифических защитно-приспособительных реакций на поведенческом (Калуев, 1999), молекулярном (Гарбуз, Евгеньев, 2017), биохимическом и физиологическом (нейроэндокринная стресс-реакция) (Груntenко 2008; Even et al., 2012; Miyashita, Adamo, 2020) уровнях.

Одним из основных элементов ответа организма на неблагоприятные условия является сигнальный каскад инсулина/инсулиноподобных факторов роста (И/ИФР) (Gruntenko, Rauschenbach, 2018). Благодаря глубокой гомологии этого каскада у животных различных таксонов, включая человека и дрозофилу, представляется возможным использование последней в качестве объекта для изучения механизмов, лежащих в основе молекулярно-генетической регуляции сигнального каскада И/ИФР и углеводно-жирового метаболизма (Broughton, Partridge, 2009; Gruntenko, Rauschenbach, 2018).

Сигнальный каскад И/ИФР рассматривают как один из компонентов нейроэндокринной стресс-реакции, другими компонентами которой являются гонадотропины, представленные у насекомых ювенильным гормоном (ЮГ) и 20-гидроксиэкдизоном (20Э), а также биогенные амины – октопамин (ОА) и дофамин (ДА), выполняющие у насекомых функции нейромедиаторов, нейромодуляторов и нейрогормонов (Gruntenko, 2008; Gruntenko, Rauschenbach, 2018; Musselman, Kühnlein, 2018; Miyashita, Adamo, 2020).

До сих пор остается невыясненным, какие именно из генов инсулинового каскада участвуют в ответе организма на стресс, и каковы особенности взаимодействия звеньев сигнального каскада И/ИФР и гормонов, участвующих в нейроэндокринной стресс-реакции насекомых.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы – оценка изменений экспрессии ключевых генов сигнального каскада инсулина/инсулиноподобных факторов роста и показателей углеводно-жирового метаболизма дрозофилы в ответ на кратковременный тепловой стресс и/или повышение содержания гормонов, задействованных в нейроэндокринной стресс-реакции насекомых.

Основными задачами, поставленными в рамках данной работы, являются:

1. Изучение влияния кратковременного теплового стресса на локализацию DILP2, DILP3 и dFOXO у самок линии дикого типа *D. melanogaster*.
2. Изучение влияния мутаций генов инсулинового каскада *dilp6* и *dfoxo* на уровень экспрессии *dInR*, *dilp6* и *dfoxo* у самок *D. melanogaster* в нормальных условиях и при кратковременном тепловом стрессе.
3. Исследование характера и механизма влияния кратковременного теплового стресса различной продолжительности на пищевое поведение и содержание углеводов и липидов у самок линии дикого типа *D. melanogaster*.
4. Оценка влияния мутаций генов *dilp6* и *dfoxo* на пищевое поведение и содержание углеводов и липидов у самок *D. melanogaster* в нормальных условиях и при кратковременном тепловом стрессе.
5. Анализ влияния стресс-связанных гормонов (дофамина, октопамина, 20-

гидроксиэкдизона и ювенильного гормона) на содержание углеводов у самок линии дикого типа *D. melanogaster* в нормальных условиях и при кратковременном тепловом стрессе.

Научная новизна работы. Новизна решения заявленной проблемы заключается в исследовании вклада ключевых генов инсулинового сигнального каскада в регуляцию углеводно-жирового метаболизма при развитии нейроэндокринной стресс-реакции с использованием модели *Drosophila*. Осуществлено комплексное исследование влияния теплового стресса на локализацию и экспрессию ряда компонентов инсулинового каскада *D. melanogaster*. Получены новые данные о влиянии мутаций генов инсулинового сигнального каскада, *dilp6* и *dfoxo*, на пищевое поведение, содержание углеводов и липидов у самок *D. melanogaster* в нормальных условиях и при кратковременном тепловом стрессе. Изучено влияние ряда стресс-связанных гормонов насекомых (ДА, ОА, 20Э и ЮГ) на изменение уровня углеводов у самок дрозофилы. Полученные результаты позволяют оценить роль исследованных генов в стресс-реакции насекомых и установить систему взаимодействий ее элементов.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные результаты могут быть использованы в качестве дополнения фундаментальных знаний о механизме взаимодействия генов инсулинового сигнального каскада и гормонов, участвующих в нейроэндокринной стресс-реакции насекомых. Настоящее исследование может послужить теоретической базой для прикладных работ в области сельскохозяйственной, лесной и медицинской энтомологии, направленных на создание новых методов мониторинга и регуляции численности насекомых-вредителей и переносчиков инфекционных заболеваний человека и животных.

Положения, выносимые на защиту.

1. Гены *dilp6* и *dfoxo* участвуют в контроле интенсивности питания и содержания общих липидов, глюкозы и трегалозы у самок *D. melanogaster*.
2. Генетический контроль экспрессии генов *dilp6* и *dInR* в условиях кратковременного теплового стресса осуществляется у самок *D. melanogaster* транскрипционным фактором dFOXO посредством его транслокации в ядро.
3. Нарушение экспрессии генов *dilp6* и *dInR* препятствует снижению содержания общих липидов в результате кратковременного теплового стресса.

Личный вклад автора. Основные результаты исследования получены автором самостоятельно. Иммуногистохимический анализ локализации dInR, DILP2, DILP3 и dFOXO проведен совместно с к.б.н. Андреевской О.В. (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Дизайн праймеров к генам *dilp6* и *Treh* для ПЦР выполнен инженером Пирожковой Д.С. (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Дисперсионный анализ результатов, оценку через байесовский критерий BF_{10} и анализ данных по экспрессии генов методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ проведен совместно с доцентом, к.б.н. Меньшановым П.Н. (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск).

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на 5 российских и 3 международных конференциях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, входящих в список ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация включает следующие разделы: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы,

результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы из 178 источников. Работа изложена на 118 страницах, содержит 24 рисунка и 5 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии мух, использованные в работе. Мухи содержались на стандартной питательной среде (агар-агар, 7г/л; кукурузная мука, 50 г/л; сухие дрожжи, 18 г/л; сахар, 40 г/л) при 25°C, относительной влажности 50%, 12-часовом световом дне. Для экспериментов мух синхронизировали по вылету. В работе были использованы четыре линии *D. melanogaster*: линия *dilp6⁴¹* с делецией 5'-области гена *dilp6* (Slaidina et al., 2009; Grönke et al., 2010); линия *foxo^{BG01018}*, несущая вставку Р-элемента [GT1] в 5'-области гена *dfoxo*; линия *w¹¹¹⁸*, на основании которой получены мутантные линии *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}*, и линия дикого типа Canton-S. В работе использовались самки 3-6 суточного возраста.

Условия стрессирования. Для изучения влияния теплового стресса на молекулярные и биохимические параметры мух помещали в суховоздушный термостат на 38°C. Контрольных особей содержали при 25°C. После окончания стрессирования экспериментальных мух возвращали в инкубатор при температуре 25 °C, либо экспериментальных и контрольных мух сразу же замораживали и хранили при температуре жидкого азота.

Выделение РНК, синтез кДНК методом обратной транскрипции проводили с помощью TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя. кДНК синтезировали с использованием RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя и хранили при -20°C.

Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора реагентов в присутствии SYBR-Green I в соответствии с рекомендациями производителя (Синтол, Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США).

Иммуногистохимический анализ локализации инсулиноподобных пептидов DILP2 и DILP3 в инсулин-продуцирующих клетках мозга, и инсулиноподобного рецептора (dInR) и транскрипционного фактора dFOXO в жировом теле проводили согласно методике Веенстра с соавторами (Veenstra et al., 2008) для DILP2 и DILP3 и согласно методике Груntenко с соавторами (Gruntenko et al., 2012) для dInR и dFOXO. Полученные препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope 2 и конфокального микроскопа LSM 510 META с цифровой камерой AxioCam MRm и программным обеспечением AxioVision LSM510 в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

Экспериментальное повышение уровней 20Э, ДА, ОА и ЮГ. Мух либо помещали в стаканы с фильтровальной бумагой, смоченной питательным раствором, для повышения уровней 20Э, ДА, ОА, либо апплицировали им на брюшко 0,5 мкл раствора ЮГ-III (Sigma, США) в ацетоне (в концентрации 2 мг/мл) по методу Ричарда (Richard et al., 2001). Контрольной группе апплицировали чистый ацетон. Питательный раствор содержал либо 5% сахара, 2% дрожжей и 30 мкг раствора 20Э (Sigma, США) в 96% этиловом спирте (в концентрации 1 мг/мл) и чистый этиловый

спирт в контрольных сериях, либо L-3,4-дигидроксифенилаланин (L-ДОФА, Sigma, США), предшественник ДА, приводящий к повышению ДА (Раушенбах и др., 2006), либо ОА (Sigma, США). В контрольных сериях ОА, L-ДОФА в раствор не добавляли.

Измерение содержания углеводов проводили в целой мухе с использованием модифицированного метода Массельмана с соавторами (Musselman et al., 2011). Уровень глюкозы измеряли, используя Glucose (HK) AssayKit, SLBL3912V (Sigma, США). Трегалозу конвертировали в глюкозу добавлением трегалазы – 0,5 мкл (Sigma, США) с последующим определением количества глюкозы в образце. Измерения проводили на спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США) при 340 нм.

Измерение содержания общих липидов проводили в целой мухе с использованием модифицированного метода Ван Генделя (Van Handel, 1985) на спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 525 нм.

Анализ капиллярного питания проводили по методу Джа с соавторами (Ja et al, 2007), модифицированного Вильямсом с соавторами (Williams et al., 2014).

Достоверность результатов. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Межгрупповые сравнения выполняли дисперсионным анализом и *t*-тестом Стьюдента, различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Вероятность объяснения результатов дисперсионного анализа через альтернативные гипотезы в сравнении с гипотезой об отсутствии воздействия оценивали через байесовский критерий BF_{10} . Анализ полученных данных по экспрессии генов проводили методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние кратковременного теплового стресса на локализацию DILP2, DILP3, и dFOXO у самок *Drosophila melanogaster* линии дикого типа Canton-S.

Мы исследовали у 6-суточных самок линии Canton-S возможность участия в ответе на тепловой стресс наиболее хорошо изученных инсулиноподобных пептидов дрозофилы, DILP2 и DILP3. Тепловой стресс (38°C, 60 мин) не оказывал заметного влияния на содержание инсулиноподобного пептида DILP2 в инсулин-продуцирующих клетках мозга (ИПК). В то же время аналогичный анализ содержания DILP3 в ИПК выявил явное его повышение под воздействием теплового стресса, продемонстрированное с использованием конфокального микроскопа LSM 510 META. По-видимому, DILP3 принимает участие в ответе организма на тепловой стресс, а DILP2 – нет, или, возможно, для ответа ему требуется больше времени.

Показано, что при оксидативном и метаболическом стрессах происходит переход dFOXO в ядра клеток жирового тела (ЖТ) дрозофилы, где он преимущественно экспрессируется (Zheng et al., 2007). Чтобы выяснить, индуцирует ли тепловой стресс такой переход, мы исследовали локализацию dFOXO во время теплового стресса в ЖТ у самок линии Canton-S методом иммуногистохимического анализа с использованием антител к dFOXO. В нормальных условиях (Рис. 1а, г) dFOXO локализовался в цитоплазме, и не обнаруживался в ядре. Тепловой стресс (60 мин, 38°C) приводил к перемещению сигнала, соответствующего локализации

dFOXO, в ядра клеток ЖТ дрозофилы (Рис. 1б, д). После окончания теплового стресса dFOXO возвращался в цитоплазму (Рис. 1в, е).

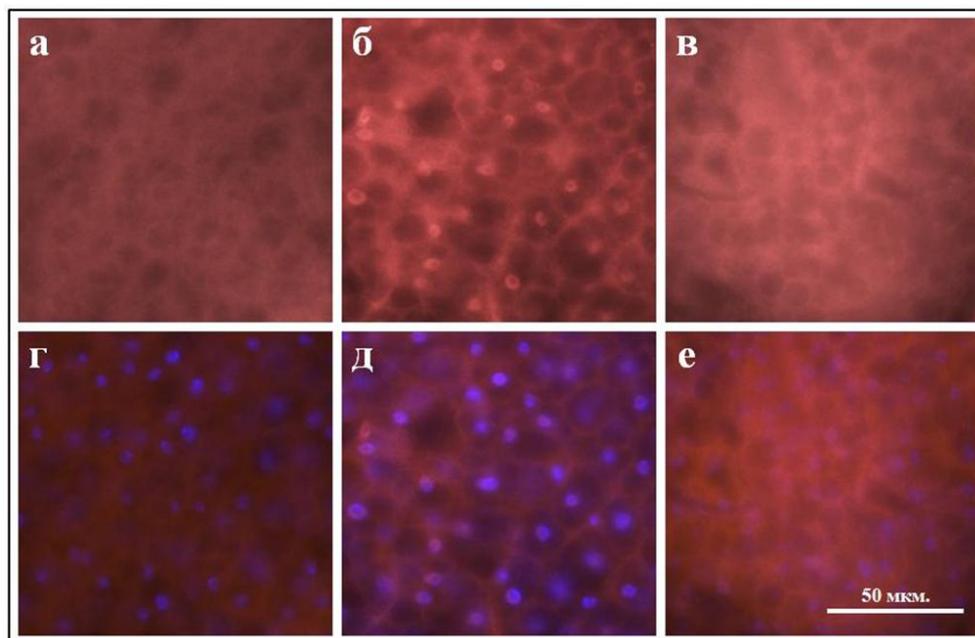


Рис. 1. Локализация dFOXO в жировом теле у 6-суточных самок Canton-S (а) в нормальных условиях, (б) после 60 минут теплового стресса (38°C), (в) спустя 60 минут после стресса. (а-в) – Красный сигнал – локализация dFOXO (Cy3), (г-е) – Синий сигнал – ядра клеток (DAPI).

Таким образом, мы показали, что транскрипционный фактор dFOXO и инсулиноподобный пептид DILP3 являются компонентами ответа на тепловой стресс.

Влияние мутаций генов инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6⁴¹*) и транскрипционного фактора dFOXO (*foxo^{BG01018}*) на экспрессию генов *dilp6*, *dfoxo* и *dInR* при тепловом стрессе у самок *Drosophila melanogaster*. *dInR*, *dilp6* и *dfoxo* играют ключевую роль в сигнальном каскаде И/ИФР: dInR, активированный инсулиноподобными пептидами (DILPs1-5, продуцируемыми ИПК мозга), запускает киназный каскад, который приводит к ингибированию dFOXO, являющийся регулятором транскрипции для нескольких сигнальных путей, в первую очередь – для самого каскада И/ИФР. Что же касается DILP6, то есть ряд работ, свидетельствующих о его участии в петле обратной связи каскада И/ИФР, заключающейся в передаче сигнала от dFOXO на ИПК и синтезируемые там DILPs. Стоит также отметить, что DILP6 – единственный из охарактеризованных на данный момент DILPs (DILPs1-8) является инсулиноподобным фактором роста. Важно, что функционирование этой петли обратной связи под действием стресса мало изучено.

Поскольку гены *dfoxo* и *dilp6* формируют петлю обратной связи в каскаде И/ИФР, а dFOXO отвечает на тепловой стресс изменением цитоплазматической локализации на ядерную, мы задались вопросом, как может повлиять нарушение его функции или функции модулятора его эффекта DILP6 на ответ инсулиновой сигнальной системы на тепловой стресс. Чтобы это выяснить, мы изучили экспрессию генов *dInR*, *dilp6* и *dfoxo* у самок линий, несущих гипоморфную

мутацию *dilp6*⁴¹ или гипофункциональную мутацию *foxo*^{BG01018}, в нормальных условиях и при тепловом стрессе (Рис. 2).

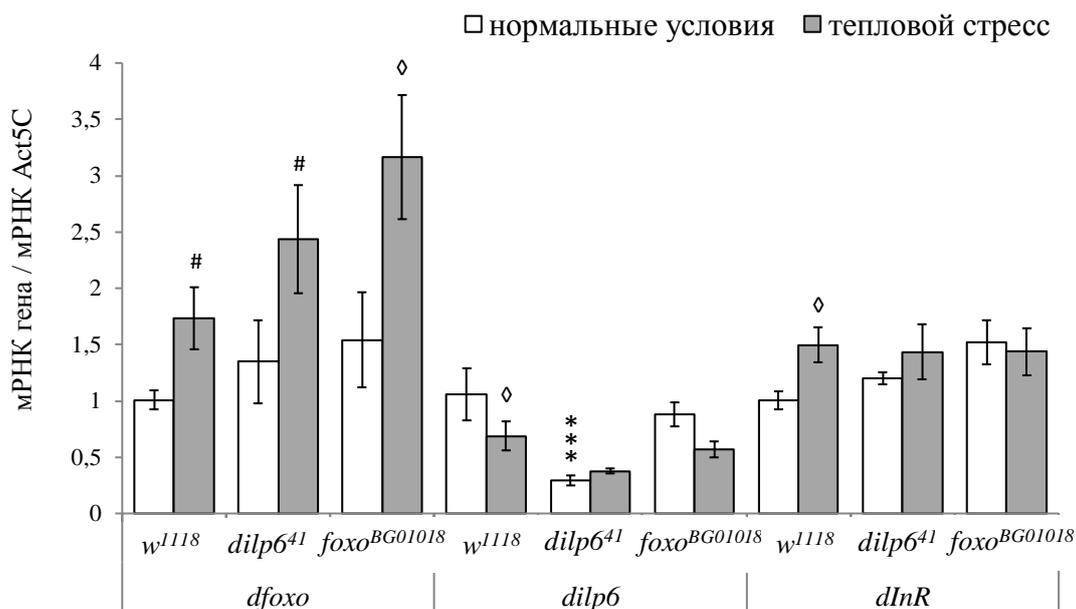


Рис. 2. Уровень мРНК генов *dfoxo*, *dilp6* и *dInR* у 6-суточных самок *D. melanogaster* линий, несущих мутации *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018}, и исходной линии *w*¹¹¹⁸ в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 90 мин). Каждое значение – среднее из 3 биологических повторов. Здесь и далее планки погрешности отражают стандартную ошибку. Звездочки – достоверность отличий мутантных самок с мутацией *dilp6*⁴¹ от самок контрольной линии *w*¹¹¹⁸ (p<0.001). Ромб – достоверность отличий стрессированной группы от контрольной того же генотипа (p<0.05), решетка – тенденция к ее отличию (p<0.07).

Количественных изменений в уровне экспрессии мРНК генов *dilp6* и *dInR* у линий *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018} при тепловом стрессе выявлено не было, в отличие от линии-предшественника этих мутантов *w*¹¹¹⁸, у которой экспрессия *dilp6* снижалась, а экспрессия *dInR* повышалась при тепловом стрессе (Рис. 2, p<0.05 для обоих генов).

В то же время уровень экспрессии *dfoxo* при тепловом стрессе повышался или имел тенденцию к повышению у всех исследованных линий (Рис. 2, ЛИНИЯ – F_(2, 12)=3,14, p<0.081; СТРЕСС – F_(1, 12)=12,80, p<0.0038). Стоит отметить, что мутанты *dilp6*⁴¹ характеризуются сниженным уровнем экспрессии гена *dilp6* (p<0.001), тогда как уровень экспрессии *dfoxo* у мутантов *foxo*^{BG01018} не отличается от контрольной линии *w*¹¹¹⁸ (Рис. 2). Это позволяет предположить, что описанная ранее потеря функции dFOXO у линии *foxo*^{BG01018} (Dionne et al., 2006) связана не со снижением уровня экспрессии соответствующего гена, а с нарушением его структуры и функции.

Анализ содержания липидов и углеводов у самок *Drosophila melanogaster* линии дикого типа Canton-S при тепловом стрессе. Поскольку каскад И/ИФР играет ключевую роль в регуляции углеводно-жирового метаболизма, мы задались вопросом, какие изменения в последнем могут быть вызваны кратковременным тепловым стрессом. Мы не обнаружили достоверных изменений в содержании липидов у самок при тепловом воздействии (38°C, 30-150 мин) различной продолжительности (Рис. 3а), в отличие от углеводов (Рис. 3б).

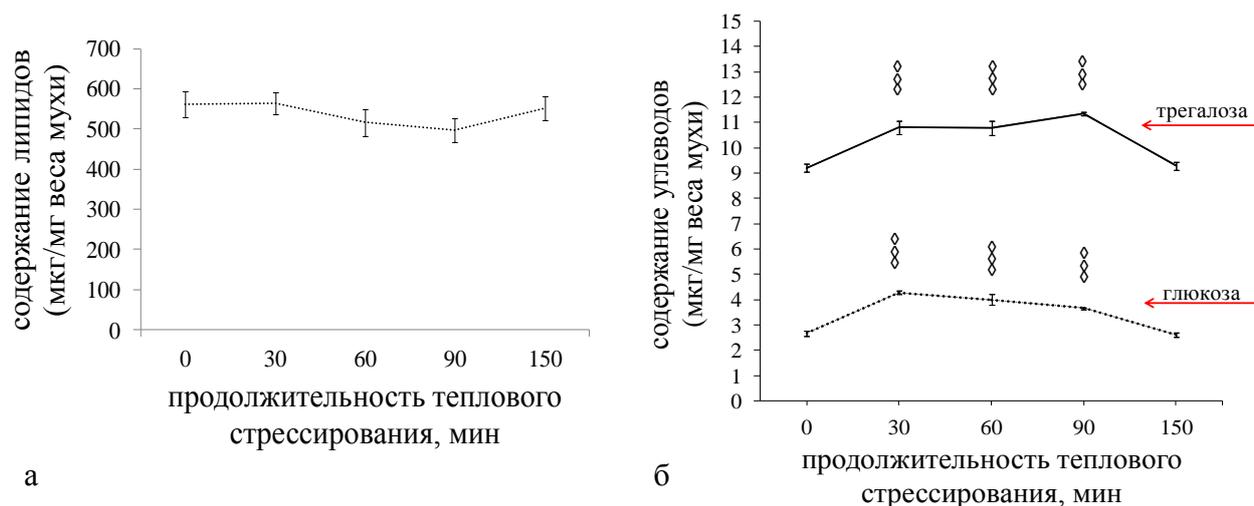


Рис. 3. Динамика содержания общих липидов (а) и углеводов (б) у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S под действием теплового стресса (38°C, 30-150 мин). Глюкоза – сплошная, трегалоза – пунктирная линия. Каждое значение – среднее из 9-21 измерений. Ромб – достоверность отличий стрессированных мух от контроля ($p < 0.001$).

Изменения в содержании как трегалозы, так и глюкозы наступают уже через 30 минут после начала теплового воздействия (различия достоверны при $p < 0.001$ для обоих углеводов) и исчезают – после 150 минут стрессирования (Рис. 3б), что предполагает существование механизма восстановления биохимического *status quo*.

Мы также проверили возможность участия фермента трегалазы, расщепляющего трегалозу до двух молекул глюкозы, в ответе на тепловой стресс, однако данные ПЦР-РВ не выявили различий между уровнем мРНК *Treh* у контрольных мух ($1,1 \pm 0,1$) и мух, подвергшихся тепловому стрессу ($1,0 \pm 0,1$). Эти результаты, в совокупности с однонаправленным изменением содержания глюкозы и трегалозы при стрессе, свидетельствует о том, что регуляция уровня этих углеводов при стрессе происходит, по-видимому, на других метаболических этапах.

Анализ интенсивности питания самок *D. melanogaster* линии Canton-S после кратковременного теплового стресса (38°C, 60 мин). Чтобы выяснить, может ли метаболическое поведение обуславливать изменение уровня циркулирующих углеводов при тепловом стрессе, мы оценили интенсивность капиллярного питания у самок в течение 32 часов после стресса (Рис. 4). Однако достоверное снижение в интенсивности питания мух, подвергшихся тепловому стрессу и контрольных, отсутствует вплоть до 12 часов после стресса и наблюдается спустя 24 часа (различия достоверны при $p < 0.01$).

Влияние мутаций генов инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6⁴¹*) и транскрипционного фактора dFOXO (*foxo^{BG01018}*) на содержание углеводов, липидов и интенсивность капиллярного питания у самок *D. melanogaster* в нормальных условиях и при тепловом стрессе. Чтобы выявить роль генов *dilp6* и *foxo*, находящихся в фокусе данной работы, в регуляции углеводно-жирового обмена при кратковременном тепловом стрессе (38°C, 30 мин), мы исследовали содержание

глюкозы, трегалозы и общих липидов у самок *D. melanogaster*, несущих гипоморфные мутации *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018} в сравнении с самками исходной линии *w*¹¹¹⁸.

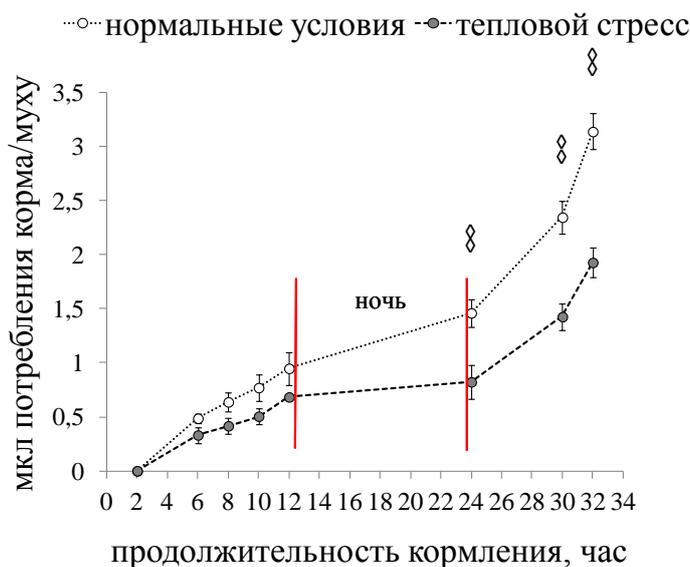


Рис. 4. Анализ капиллярного питания у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и после теплового стресса (38°C, 60 мин). Каждое значение – среднее из 3 биологических повторов. Ромб – достоверность различий между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами (два ромба – различия достоверны при $p < 0.01$).

В нормальных условиях у самок линий *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018} уровень глюкозы и трегалозы выше чем у *w*¹¹¹⁸ (для глюкозы различия достоверны при $p < 0.01$ для *foxo*^{BG01018} и $p < 0.001$ для *dilp6*⁴¹, для трегалозы – при $p < 0.001$ для обеих линий, Рис. 5). При тепловом стрессе уровень обоих углеводов, как у самок контрольной линии, так и у мутантных, повышается по сравнению с нормальными условиями (различия достоверны при $p < 0.001$ для обоих углеводов для всех исследованных линий), что свидетельствует о том, что гены *dilp6* и *foxo* принимают участие в контроле уровня углеводов в нормальных условиях, но изменение содержания углеводов при тепловом стрессе определяется не только ими.

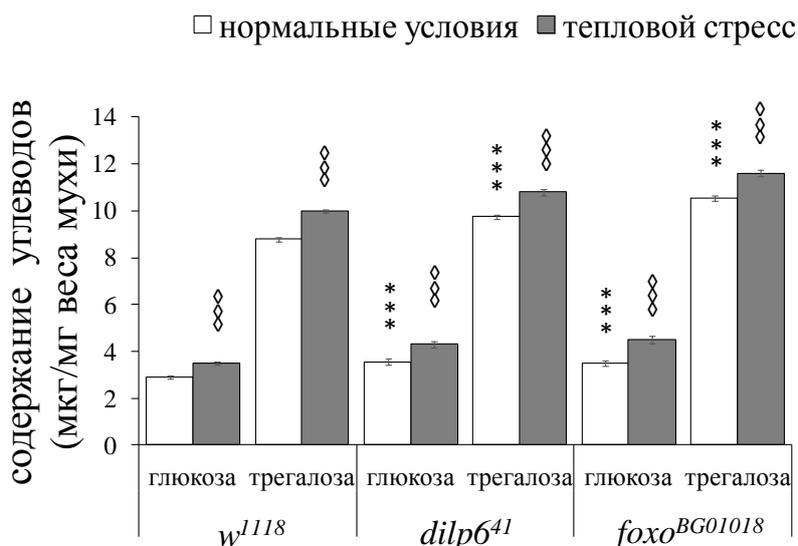


Рис. 5. Влияние теплового стресса (30 мин, 38°C) на содержание глюкозы и трегалозы у 3-суточных самок *D. melanogaster*, несущих мутации *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018}, и исходной линии *w*¹¹¹⁸. Каждое значение – среднее из 12-22 измерений. Звездочка – достоверность отличий мутантных самок от *w*¹¹¹⁸; ромб – достоверность различий между стрессированными и контрольными мухами одного генотипа (три ромба или звездочки – $p < 0.001$).

Хотя мы не обнаружили изменения содержания общих липидов непосредственно после теплового воздействия, снижение их уровня у дрозофилы спустя сутки после теплового стресса было ранее показано Клепсателем с соавторами (Klepsatel et al., 2016). Опираясь на их данные, мы измерили уровень общих липидов через 24 часа после окончания стрессорного воздействия (60 мин, 38°C) и обнаружили, что у самок контрольной линии w^{1118} он в самом деле снижается (различия с контролем достоверны при $p < 0.01$). В то же время у линий $dilp6^{41}$ и $foxo^{BG01018}$ содержание общих липидов повышено в нормальных условиях (различия с w^{1118} достоверно при $p < 0.01$ для $foxo^{BG01018}$, и при $p < 0.001$ для $dilp6^{41}$), но остается неизменным спустя сутки после стресса (Рис. 6а).

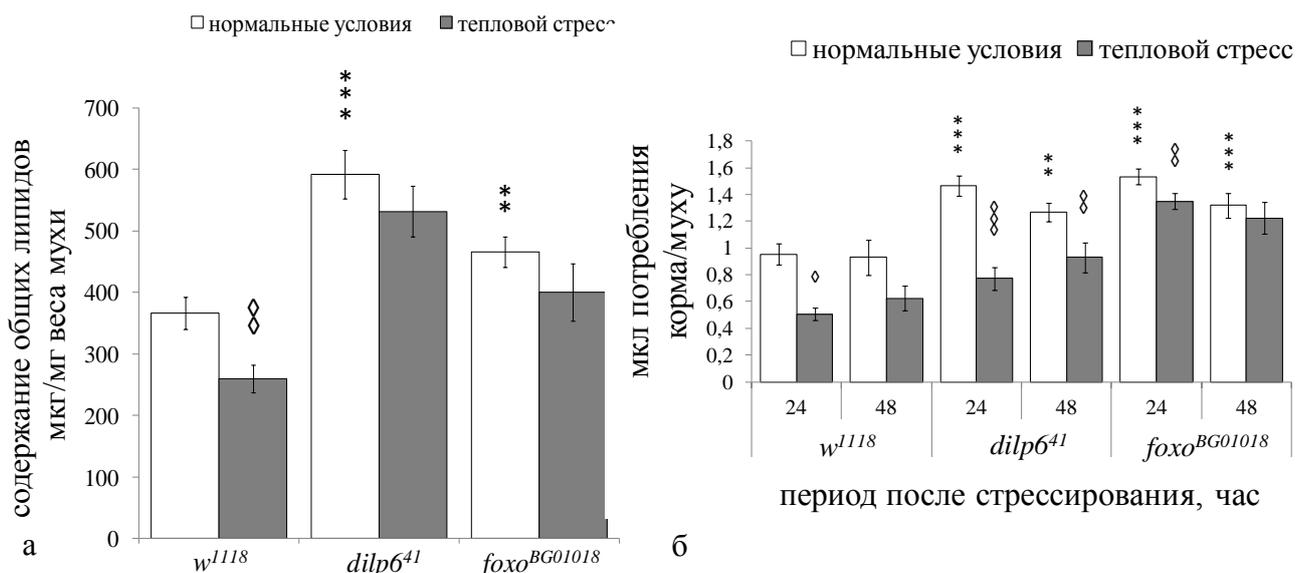


Рис. 6. Содержание общих липидов (а) и интенсивность капиллярного питания (б) у 3-суточных самок *D. melanogaster* линий, несущих мутации $dilp6^{41}$ и $foxo^{BG01018}$, и исходной линии w^{1118} в нормальных условиях и через 24 часа (а) и 24 и 48 часов (б) после теплового стресса (60 мин, 38°C). Каждое значение – среднее из 9-20 измерений. Звездочка – достоверность отличий мутантных самок от самок линии w^{1118} ; ромб – достоверность различий между стрессированными и контрольными мухами одного генотипа (одна звездочка или ромб – $p < 0.05$, две звездочки или ромба – $p < 0.01$, три – $p < 0.001$).

Результаты свидетельствуют об участии dFOXO в регуляции экспрессии $dilp6$ у самок дрозофилы при тепловом стрессе: мутации обоих генов приводят к сходным изменениям в метаболизме углеводов и липидов, и эти изменения аналогичны тем, которые происходят у контрольных мух при тепловом стрессе.

Обнаружив, что изменения в содержании общих липидов у мух наступают только спустя сутки после стресса, мы решили проанализировать пищевое поведение в течение 2 суток после стресса (60 мин, 38°C). Действительно, через 24 часа после его окончания, интенсивность питания, так и у линий $dilp6^{41}$ и $foxo^{BG01018}$, снижается у всех исследованных линий по сравнению с нормальными условиями ($p < 0.001$ для $dilp6^{41}$, $p < 0.01$ для $foxo^{BG01018}$ и $p < 0.05$ для w^{1118} , Рис. 6б). Спустя 2 суток после стресса интенсивность питания восстанавливается до контрольного уровня у w^{1118} и $foxo^{BG01018}$, но не у $dilp6^{41}$. Таким образом, снижение уровня липидов, наблюдаемое спустя сутки после стресса, вероятно связано с изменением пищевого поведения.

Важно отметить, что в нормальных условиях интенсивность питания самок линий *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018}, так же как содержание у них общих липидов и углеводов, повышено по сравнению с самками линии *w*¹¹¹⁸ ($p < 0.001$ для обеих линий, Рис. 6б).

Влияние стресс-связанных гормонов на содержание углеводов у самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30 мин). Чтобы выяснить, участвуют ли стресс-связанные гормоны в модуляции стресс-ответа сигнального каскада И/ИФР и в регуляции углеводного метаболизма при стрессе, мы изучили влияние четырех из этих гормонов – ДА, ЮГ, ОА и 20Э – на содержание углеводов у 3-суточных самок Canton-S. Поскольку показано (Rauschenbach et al., 2007), что L-ДОФА приводит к повышению уровня ДА у *D. melanogaster*, мы изучили эффект его повышения у мух посредством переноса мух на сутки в стаканы с добавлением L-ДОФА в корм. Очевидно, что ДА обладает ингибирующим эффектом по отношению к углеводному обмену (Рис. 7а): кормление L-ДОФА снижает уровни трегалозы и глюкозы у самок дрозофилы как в нормальных условиях ($p < 0,01$ для обоих углеводов), так и при тепловом стрессе ($p < 0,01$ для обоих углеводов). Обработка ЮГ (апликация гормона на брюшко мухи) также приводит к снижению уровней обоих углеводов как в нормальных условиях (различия с контролем достоверны при $p < 0.001$), так и при тепловом стрессе (Рис. 7б, различия с контролем достоверны при $p < 0.01$ для глюкозы и при $p < 0.001$ для трегалозы). У самок, кормленных 20Э (Рис. 7в), уровни обоих углеводов повышаются по сравнению с контролем как в нормальных условиях ($p < 0.001$), так и при тепловом стрессе: (различия достоверны при $p < 0.01$ для глюкозы и при $p < 0.001$ для трегалозы). Кормление ОА (Рис. 7г) приводит к повышению уровня трегалозы как в нормальных условиях, так и при тепловом стрессе, и к снижению уровня глюкозы как в нормальных условиях, так и при тепловом стрессе по сравнению с контролем (различия с контролем достоверны при $p < 0.001$ для обоих углеводов).

Необходимо отметить, что ОА нарушает ответ углеводного обмена на тепловой стресс: у обработанных им мух уровень глюкозы при стрессе не повышается, а понижается, тогда как у мух, обработанных ДА, ЮГ или 20Э, при стрессе повышается уровень обоих углеводов, также как у необработанных особей.

Взаиморегуляция элементов каскада И/ИФР и стресс-связанных гормонов дрозофилы. Ранее было показано, что И/ИФР могут взаимодействовать с 20Э, ЮГ, ДА и ОА, принимая участие в стресс-реакции (Gruntenko, Rauschenbach, 2018), однако оставалось невыясненным, какие именно из звеньев каскада участвуют в стресс-реакции и как это участие сказывается на регуляции углеводно-жирового обмена. Следует отметить, что ранее такое участие было показано только для dFOXO – его переход в ядро был обнаружен при оксидативном и метаболическом стрессах (Jünger et al., 2003; Hwangbo et al., 2004). Мы показали, что у дрозофилы переход dFOXO в ядро также происходит при тепловом стрессировании (см. Рис. 1), и сопровождается повышением уровня экспрессии его гена (см. Рис. 2). Также было показано, что dFOXO необходим для активации *dilp6* в условиях голода у личинок дрозофилы (Slaidina et al., 2009) и позитивно регулирует уровень мРНК *dilp6* в ЖТ у имаго

дрозофилы (Bai et al., 2012). Так, у мутантов dFOXO при голодании отсутствует индукция экспрессии DILP6 (Slaidina et al., 2009), а влияние dFOXO на экспрессию DILPs, продуцируемых в ИПК, блокируется одновременной репрессией DILP6 с помощью РНК-интерференции в ЖТ (Bai et al., 2012). Таким образом, DILP6, по-видимому, связывает dFOXO, ЖТ и эндокринную функцию мозга (Bai et al., 2012). В то же время Слайдиной с соавторами (Slaidina et al., 2009) было показано, что, хотя dFOXO требуется для своевременной экспрессии DILP6 в процессе развития, его активация может быть вызвана также и другими факторами.

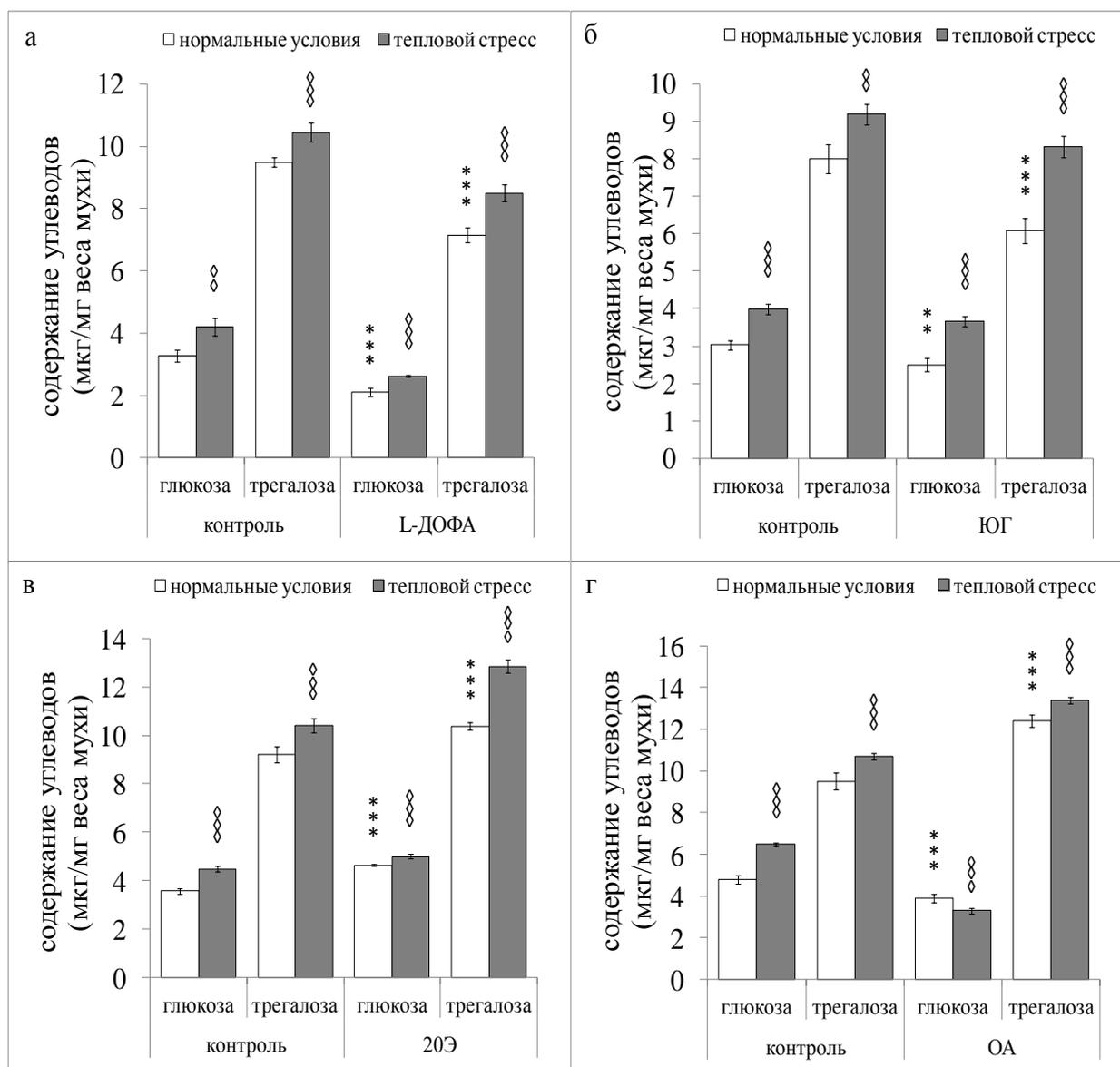


Рис. 7. Влияние ДА (а), ЮГ (б), 20Э (в) и ОА (г) на содержание углеводов у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30 мин) Каждое значение – среднее из 8-20 измерений. Статистическая значимость определялась с помощью. Звездочка – отличия мух, кормленных ДА, ромб – различия между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами (3 ромба или звездочки – различия достоверны при $p < 0.001$, два ромба или звездочки – различия достоверны при $p < 0.01$).

Однако наши данные свидетельствуют, что при тепловом стрессе активация dFOXO приводит не к активации, а к ингибированию *dilp6*, поскольку при возрастании уровня экспрессии *dfoxo* и его переходе в ядро при тепловом стрессе уровень экспрессии *dilp6* резко падает (см. Рис. 1 и 2). Мы полагаем, что это кажущееся противоречие может быть объяснено регуляторной петлей с участием других гормонов стресса (20Э, ЮГ и ДА), обеспечивающей повышение уровня экспрессии *dilp6* в ответ на длительно действующие факторы, такие как голод или мутация гена *dfoxo*. Свидетельством принципиального отличия регуляции инсулинового каскада при голодании в отличие его регуляции при тепловом стрессе могут также служить данные Слайдиной с соавторами (Slaidina et al., 2009) о снижении экспрессии DILPs в ИПК при голоде, тогда как мы показали, что при тепловом стрессе количество DILP3 повышается.

Рассмотрим вероятную схему взаимодействий каскада И/ИФР и других гормонов стресса насекомых (Рис. 8). При тепловом стрессе происходит перемещение dFOXO в ядро и активация его экспрессии, что вызывает снижение экспрессии *dilp6*, которое, в свою очередь, приводит к активации экспрессии *dilp3* и *dInR* (см. Рис. 2).

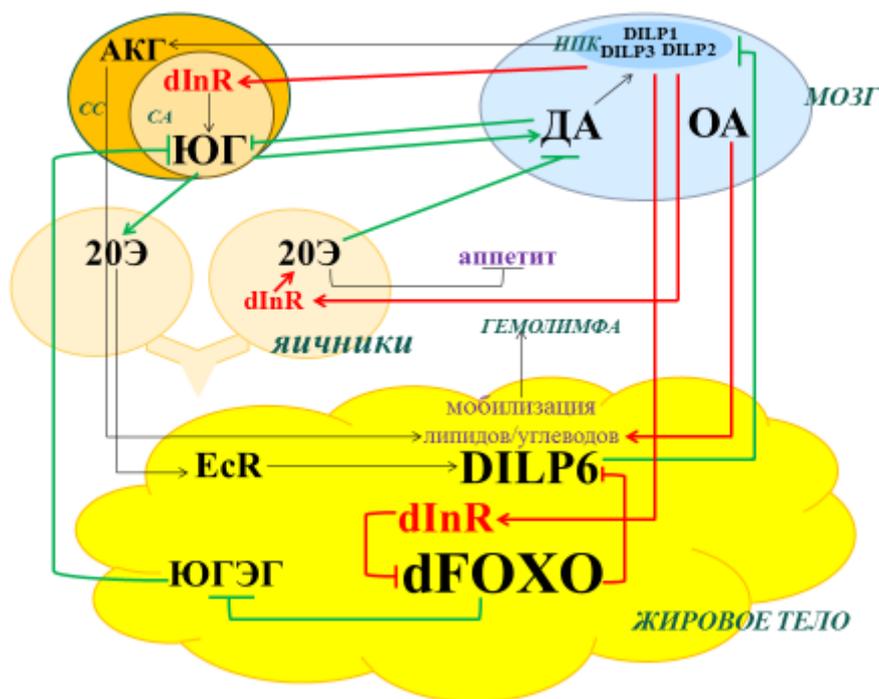


Рис. 8. Схема взаимодействия ключевых компонентов сигнального каскада И/ИФР и стресс-связанных гормонов дрозофилы. ИПК – инсулин-продуцирующие клетки, DILP – инсулиноподобный пептид, dFOXO – транскрипционный фактор семейства Forkhead box class O, CC – *corpus cardiacum* – нейрогемальный орган, CA – *corpus allatum* – эндокринная железа. АКГ – адипокинетический гормон, ЮГ – ювенильный гормон, ЮГЭГ – ЮГ эпоксидгидраза, 20Э – 20-гидроксиэкдизон, ЕсR – рецептор экдизона, ДА – дофамин, ОА – октопамин. [Красным указаны взаимодействия, выявленные в настоящей работе, зеленым – показанные в лаборатории генетики стресса ИЦиГ ранее, черным – данные литературы.]

Способность *dilp6* к подавлению экспрессии *dilps*, экспрессируемых ИПК, и секреции DILP2 в гемолимфу была показана Баи с соавторами (Bai et al., 2012), а Андреевской с соавторами (2016) было продемонстрировано, что у мутантов *dilp6*⁴¹

наблюдается резкое повышение интенсивности синтеза DILP3 в нормальных условиях, что также согласуется с нашей гипотезой о передаче сигнала от dFOXO на DILP3 через DILP6 при тепловом стрессе. То, что DILP3 далее активирует *dInR*, подтверждается нашими данными об отсутствии изменения уровня экспрессии *dInR* при тепловом стрессе у мух с мутациями генов *dilp6* и *dfoxo* (и нарушенной передачей сигнала на DILPs в ИПК) в отличие от особой контрольной линии w^{1118} , которые демонстрируют снижение экспрессии *dilp6* и тенденцию к повышению *dfoxo* в ответ на тепловое воздействие (см. Рис. 2). Активация dInR напрямую или через ортолог субстратов инсулиновых рецепторов млекопитающих CHICO, киназный каскад и dAkt/PKB приводит к ингибированию экспрессии dFOXO и провоцирует его возвращение из ядра в цитоплазму (Gruntenko, Rauschenbach, 2018), замыкая тем самым «малое кольцо» обратной связи в регуляции DILP6 непосредственно повысившимся при тепловом стрессе dFOXO. Это «малое кольцо» формируется регуляцией сигнального каскада И/ИФР: снижение ингибирования DILPs в ИПК посредством активированного DILP6 приводит к активации ими dInR и ингибированию dFOXO и его возвращению в цитоплазму (Рис. 8). В то же время, исходя из наших данных и данных литературы, существует еще и «большое кольцо» – регуляция DILP6 посредством других гормонов стресса, которое подключается при длительном стрессорном воздействии. Рассмотрим его подробнее.

Повышение DILP6 под действием 20Э через активацию рецептора гормона EcR в ЖТ дрозофилы и усиление транскрипции *dfoxo* под действием 20Э у тутового шелкопряда было показано ранее (Colombani et al., 2005; Slaidina et al., 2009; Wang et al., 2010; Hossain et al., 2013). 20Э, в свою очередь, подвержен регуляции со стороны ЮГ (Gruntenko, Rauschenbach, 2008), синтез которого в СА регулируется DILPs через активацию dInR (Belgacem, Martin, 2007). Уровень ЮГ также регулируется ферментами его деградации, синтезирующимися в ЖТ, ДА (Груntenко, 2008), и, судя по всему, dFOXO: падение активности ферментов деградации ЮГ показано как при голодании, так и при мутации *dfoxo* (Rauschenbach et al., 2004; Раушенбах и др., 2015). Воздействие последней на метаболизм ДА оказалось возможно нивелировать обработкой мух экзогенным ЮГ (Gruntenko et al., 2016), что согласуется с представлениями о существовании обратной связи в дофаминовой регуляции уровня ЮГ (Gruntenko, Rauschenbach, 2008). Следует отметить, что снижение уровней активности ферментов деградации ЮГ при голоде происходит как минимум через 6 часов и длится по меньшей мере сутки (Rauschenbach et al., 2004), что, по-видимому, приводит к тому, что титр 20Э увеличивается и положительно регулирует DILP6. Поэтому при голодании в течение ночи, как в экспериментах Слайдиной с соавторами (Slaidina et al., 2009), уровень DILP6 повышается, замыкая «большое кольцо».

Еще одним участником стресс ответа насекомых является адипокинетический гормон (АКГ), синтезирующийся у насекомых в *corpus cardiacum* (CC) и представляющий собой нейропептид, регулирующий метаболические реакции на стресс, стимулируя катаболические реакции и мобилизуя запасы энергии, особенно липидов и трегалозы (Isabel et al., 2005; Sajwan et al., 2015; Post et al., 2018).

Возможный механизм влияния кратковременного теплового стресса на углеводно-жировой метаболизм и метаболическое поведение дрозофилы. Показано, что практически все жизнеспособные комбинации мутаций генов каскада И/ИФР приводят к изменению содержания липидов и углеводов, а снижение *dilp6* нокдауном вызывает повышение уровня триглицеридов и гликогена у дрозофилы (Slaidina et al., 2009; Murillo-Maldonado et al., 2011). Наши данные подтверждают эти представления: мутанты *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* имеют повышенные аппетит и содержание глюкозы, трегалозы и общих липидов (см. Рис. 5 и 6).

Что касается регуляции пищевого поведения под действием теплового стресса, то она, судя по всему, осуществляется без участия генов *dilp6* и *dfoxo*, так как их мутации не препятствуют снижению аппетита после стресса (см. Рис. 6б). Мы полагаем, что у линии с мутацией *foxo^{BG01018}* нарушена петля обратной связи в сигнальном каскаде И/ИФР, и когда dFOXO снижается при поступлении питательных веществ, его сигнала оказывается недостаточно для модуляции экспрессии *dilp6* и *dInR*, уровни которых остаются на низких значениях (см. Рис. 2), а также – для регуляции иных генов, ответственных за изменение пищевого поведения. В пользу существования иных механизмов регуляции питания, кроме И/ИФР, говорит тот факт, что нарушение петли обратной связи в следующем звене, DILP6, вызывая сходное отсутствие изменений в экспрессии *dilp6* и *dInR* при тепловом стрессе (см. Рис. 2), не препятствует снижению аппетита под действием последнего (см. Рис. 8).

Конститутивное повышение аппетита у мух обеих исследованных мутантных линий может быть связано с повышением выработки DILPs в ИПК, вызванным вышеупомянутыми нарушениями в петле обратной связи. Это предположение подтверждается данными о повышенном уровне DILP3 у мутантной линии *dilp6⁴¹* со сниженной функцией DILP6 (Андреенкова и др., 2016). Баи с соавторами (Bai et al., 2012) также показали способность DILP6 к подавлению DILPs в ИПК. Таким образом, когда DILP6 (вследствие его мутации или мутации dFOXO) не способен ингибировать DILPs в ИПК, их уровень повышается и приводит у мух к повышению аппетита и содержания углеводов и липидов. Снижение экспрессии *dInR* у мутантов *dilp6⁴¹* (см. Рис. 3), вероятно, вызвано конститутивно повышенным уровнем DILPs, синтезирующихся в ИПК, и носит компенсаторный характер. Другим возможным объяснением этого феномена может быть предполагаемая (Gruntenko, Rauschenbach, 2018) способность DILP6 к активации dInR в ЖТ аналогично DILPs в ИПК, при поломке DILP6 приводящая к снижению экспрессии рецептора.

Мы также проанализировали возможность участия ряда других стресс-связанных гормонов мухи – ЮГ, 20Э, ДА, ОА – в регуляции углеводного обмена у самок линии дикого типа Canton-S *D. melanogaster*, как в нормальных условиях, так и при тепловом стрессе (см. Рис. 12). Как ранее показали Коломбани с соавторами (Colombani et al., 2005), 20Э оказывает негативное влияние на сигнальный каскад И/ИФР у дрозофилы, провоцируя перемещение dFOXO в ядра клеток ЖТ. Таким образом, можно было ожидать, что влияние 20Э на содержание углеводов будет противоположным влиянию на него гипофункциональной мутации *foxo^{BG01018}*. Однако

2-дневное кормление мух 20Э вызвало повышение уровня трегалозы и глюкозы до уровней, сопоставимых с таковыми у мутантов *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* (см. Рис. 7в), что заставляет предположить иной механизм воздействия 20Э на углеводный обмен, по крайней мере – при длительном воздействии гормона. Наши данные по снижению уровня углеводов у мух с экспериментально повышенным уровнем ДА, свидетельствуют, что 20Э действует на углеводный метаболизм опосредованно через ДА, снижая его уровень и тем самым повышая уровень сахаров, поскольку повышение ДА за счет кормления L-ДОФА приводило к противоположному, по сравнению с кормлением 20Э, влиянию на титр обоих углеводов у самок дрозофилы: к их снижению. Мы также обнаружили, что экзогенное повышение уровня ЮГ за счет его аппликации мухам, так же как повышение уровня ДА, приводит к снижению концентрации глюкозы и трегалозы в нормальных условиях. Это позволяет предположить, что ДА является посредником в воздействии на углеводный метаболизм не только для 20Э, но и для ЮГ, который способствует повышению его уровня у зрелых самок дрозофилы (Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

Суммарно, наши данные по влиянию ДА, ЮГ и 20Э на содержание углеводов у мухи и данные других авторов по ключевой роли АКГ в катаболизме триглицеридов и мобилизации трегалозы из гликогена в ЖТ (Isabel et al., 2005; Sajwan et al., 2015; Galikova et al., 2015; Vadnarova et al., 2018; Post et al., 2018) позволяют предположить, что ДА, уровень которого позитивно регулируется ЮГ и негативно – 20Э, активирует синтез DILPs в ИПК, те стимулируют выработку АКГ в СС, который обеспечивает мобилизацию углеводов и липидов в ЖТ (Рис. 8). ОА в наших экспериментах тоже оказывал влияние на содержание углеводов, однако оно имело более сложный характер, приводя к снижению уровня глюкозы, но повышая – трегалозы (см. Рис. 7г), что предполагает стимулирующее влияние ОА на активность триптазы, фермента, синтезирующего трегалозу из глюкозы-6-фосфата и UPD-глюкозы в ЖТ (Elbein et al., 2003). Мутация в его гене *Tps1* приводит к повышению уровня глюкозы и снижению – трегалозы у личинок дрозофилы (Matsushita, Nishimura, 2020). Изменение уровня суммарных сахаров в отсутствие ОА было показано Ли с соавторами (Li et al., 2016) на безоктопаминовой линии *D. melanogaster Tβh^{nm18}*. Обнаруженная нами противоположная направленность действия ОА и ДА на метаболизм трегалозы согласуется с данными, полученными ранее на пчелах: инъекция ОА значительно повышала у них чувствительность к сахарозе, тогда как ДА снижал ее (Scheiner et al., 2002). Также очевидно, что ОА регулирует содержание углеводов независимо от системы ЮГ-ДА, поскольку если бы действие ОА на углеводный метаболизм опосредовалось этими гормонами, то ОА оказывал бы противоположный эффект на уровень трегалозы, снижая его за счет повышения ЮГ, стимулирующим влиянием на уровень которого он обладает (Gruntenko, Rauschenbach, 2008), и который снижает содержание обоих сахаров у самок дрозофилы (см. Рис. 7б). Необходимо отметить, что ни один из стресс-связанных гормонов не препятствует изменению метаболизма углеводов при тепловом стрессе.

Таким образом, регуляция углеводно-жирового обмена насекомых при

неблагоприятных внешних воздействиях, по-видимому, не исчерпывается изученными нами генами инсулинового каскада и ОА, ДА, ЮГ и 20Э, однако они играют весьма значительную роль в этой регуляции.

ВЫВОДЫ

1. Кратковременный тепловой стресс вызывает накопление инсулиноподобного пептида DILP3 в инсулин-продуцирующих клетках мозга самок *D. melanogaster*, но не влияет на содержание в них инсулиноподобного пептида DILP2, а также – сопровождается транслокацией транскрипционного фактора dFOXO в ядра клеток жирового тела самок.

2. Ответ генов инсулиноподобного пептида DILP6 и инсулиноподобного рецептора dInR на кратковременный тепловой стресс регулируется транскрипционным фактором dFOXO. Изменение экспрессии *dilp6* при кратковременном тепловом стрессе регулируется *dfoxo*. Гипоморфная мутация *dilp6*⁴¹ не влияет на уровень экспрессии *dfoxo* у самок *D. melanogaster*, но вызывает у них снижение экспрессии гена *dilp6* в нормальных условиях и препятствует ответу генов *dilp6* и *dInR* на тепловой стресс. Гипофункциональная мутация *foxo*^{BG01018} не влияет на уровень экспрессии *dfoxo* у самок *D. melanogaster* в нормальных условиях и на его повышение при тепловом стрессе, но препятствует ответу на тепловой стресс генов *dilp6* и *dInR*.

3. Кратковременный тепловой стресс вызывает у самок *D. melanogaster* повышение содержания глюкозы и трегалозы уже через 30 минут после начала теплового воздействия, и снижение аппетита и содержания общих липидов спустя сутки после него. Ген трегалазы – *Treh*, фермента деградации трегалозы, не участвует в регуляции углеводного метаболизма при кратковременном тепловом стрессе.

4. Гены *dilp6* и *dfoxo* участвуют в регуляции пищевого поведения и углеводно-жирового метаболизма у самок дрозофилы. Мутации *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018} вызывают у самок повышение аппетита, содержания общих липидов, глюкозы и трегалозы. Однако мутации генов *dfoxo* и *dilp6* не препятствуют повышению содержания глюкозы и трегалозы и снижению интенсивности питания под действием кратковременного теплового стресса, но блокируют снижение содержания общих липидов после него.

5. Стресс-связанные гормоны – дофамин, октопамин, 20-гидроксиэкдизон и ювенильный гормон – участвуют в регуляции углеводного обмена *D. melanogaster*. 20-гидроксиэкдизон вызывает повышение уровней и глюкозы, и трегалозы в нормальных условиях, дофамин и ювенильный гормон – их снижение, однако ни один из трех гормонов не препятствует повышению содержания глюкозы и трегалозы при кратковременном тепловом стрессе. Октопамин – вызывает снижение уровня глюкозы и повышение уровня трегалозы как в нормальных условиях, так и при кратковременном тепловом стрессе.

6. Впервые предложена модель прямых и обратных взаимодействий элементов инсулинового каскада, адипокинетического гормона, биогенных аминов и гонадотропных гормонов дрозофилы в ответе на кратковременный тепловой стресс.

**СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ:**

1. Андрееенкова О.В., Адоньева Н.В., **Бобровских М.А. (Еремина М.А.)**, Грунтенко Н.Е., Раушенбах И.Ю. Экспрессия гена инсулиноподобного рецептора в тканях, синтезирующих гонадотропные гормоны, при половом созревании самок *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2016. – Т. 52. – № 11. – С. 1342-1344. (РИНЦ, Scopus).
2. **Бобровских М.А. (Еремина М.А.)**, Грунтенко Н.Е. Нейроэндокринная стресс-реакция насекомых: история развития концепции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21. – № 7. – С. 825-832. (РИНЦ, Scopus).
3. Андрееенкова О.В., **Бобровских М.А. (Еремина М.А.)**, Грунтенко Н.Е., Раушенбах И.Ю. Влияние теплового стресса на экспрессию генов инсулиноподобных белков DILP2 и DILP3 у имаго *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2018. – Т.54. № 3. – С. 366-368. (РИНЦ, Scopus).
4. Карпова Е.К., **Bobrovskikh M.A. (Eremina M.A.)**, Pirozhkova D.S., Gruntenko N.E. Stress-related hormones affect carbohydrate metabolism in *Drosophila* females // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2019. – Vol. 101(1), e21540. (Scopus, WOS).
5. **Бобровских М.А. (Еремина М.А.)**, Карпова Е.К., Раушенбах И.Ю., Пирожкова Д.С., Андрееенкова О.В., Грунтенко Н.Е. Влияние мутаций генов инсулинового сигнального каскада на изменение уровня углеводов у самок *Drosophila melanogaster* при тепловом стрессе // Генетика. – 2019. – Т. 55. – № 4. – С. 485-488. (РИНЦ, Scopus).
6. Карпова Е.К., Komyshev E.G., Genaev M.A., Adonyeva N.V., Afonnikov D.A., **Bobrovskikh M.A. (Eremina M.A.)**, Gruntenko N.E. Quantifying *Drosophila* adults with the use of a smartphone // Biology Open. – 2020. – Vol. 9(10), bio054452. (Scopus, WOS).
7. **Бобровских М.А. (Еремина М.А.)**, Грунтенко Н.Е. Адаптация сульфофосфованилинового метода анализа общих липидов для различных биологических объектов на примере *Drosophila melanogaster* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24. – № 4. – С. 441-445. (РИНЦ, Scopus).
8. **Бобровских М.А. (Еремина М.А.)**, Меньшанов П.Н., Шишкина О.Д., Грунтенко Н.Е. Транскрипционный фактор dFOXO регулирует экспрессию генов инсулинового сигнального каскада и содержание липидов при тепловом стрессе у *Drosophila melanogaster* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25. - № 5. – С. 465-471. (РИНЦ, Scopus).