

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ЕРЕМИНА МАРГАРИТА АЛЕКСАНДРОВНА

**Влияние кратковременного теплового стресса на экспрессию
генов инсулинового сигнального каскада и углеводно-жировой
обмен у *Drosophila melanogaster***

1.5.7 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Груntenко Наталия Евгеньевна

Новосибирск 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Стресс и стресс-реакция.....	14
1.1.1. Белки и реакция теплового шока.....	15
1.1.2. Сигнальный каскад с-Jun N-терминальной киназы как элемент молекулярного стресс-ответа	17
1.1.3. Нейроэндокринная стресс-реакция насекомых	20
1.2. Структура, функции инсулиноподобных пептидов и регуляция инсулинового сигнального каскада у <i>Drosophila</i>	25
1.2.1. Инсулиноподобные пептиды (ILPs) насекомых	25
1.2.1.1. Тканеспецифичность локализации инсулиноподобных пептидов <i>Drosophila</i> (DILPs).....	28
1.2.1.2. Регуляция транскрипции <i>dilps</i>	29
1.2.1.3. Функции DILPs	31
1.2.2. Регуляция инсулинового сигнального каскада.....	32
1.3. Стресс-реакция и инсулиновый сигнальный каскад.....	36
1.3.1. Роль инсулинового сигнального каскада в нейроэндокринной стресс-реакции у <i>Drosophila</i>	36
1.3.2. Роль инсулинового сигнального каскада в молекулярно-клеточном стресс-ответе у <i>Drosophila</i>	38
1.4. Использование <i>Drosophila melanogaster</i> для изучения метаболических нарушений	38
1.4.1. Структура и функции жирового тела у насекомых	39
1.4.2. Регуляция метаболизма углеводов у <i>Drosophila melanogaster</i>	40
1.4.3. Регуляция метаболизма липидов у <i>Drosophila melanogaster</i>	43
Заключение по обзору литературы	46

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	48
2.1. Линии мух, использованные в работе.....	48
2.2. Условия стрессирования.....	49
2.3. Молекулярные методы.....	50
2.3.1. Выделение РНК, синтез кДНК методом обратной транскрипции.....	50
2.3.2. Количественная ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).....	50
2.4. Иммуногистохимический анализ локализации инсулиноподобных пептидов DILP2 и DILP3, инсулиноподобного рецептора (dInR) и транскрипционного фактора dFOXO.....	51
2.5. Экспериментальное изменение уровня гормонов.....	52
2.5.1. Кормление 20-гидроксиэкдизоном.....	52
2.5.2. Аппликация ювенильного гормона	53
2.5.3. Кормление октопамином, 3,4-дигидрокси-L-фенилаланином (L-ДОФА).....	54
2.6. Биохимические методы.....	54
2.6.1. Измерение содержания углеводов.....	54
2.6.2. Измерение содержания общих липидов.....	55
2.7. Анализ капиллярного питания.....	56
2.8. Статистическая обработка результатов	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	59
3.1. Возрастные изменения локализации инсулиноподобного рецептора у самок <i>Drosophila melanogaster</i>	59
3.2. Возрастная динамика плодовитости <i>Drosophila melanogaster</i>	60
3.3. Влияние теплового стресса на локализацию dFOXO, DILP2 и DILP3 у самок <i>Drosophila melanogaster</i> линии дикого типа Canton-S	64
3.4. Влияние мутаций генов инсулиноподобного пептида DILP6 (<i>dilp6⁴¹</i>) и транскрипционного фактора dFOXO (<i>foxo^{BG01018}</i>) на экспрессию генов <i>dilp6</i> , <i>dfoxo</i> и <i>dInR</i> в нормальных условиях и при тепловом стрессе у самок <i>Drosophila melanogaster</i>	67

3.5. Анализ изменений в содержании липидов у самок <i>Drosophila melanogaster</i> линии дикого типа Canton-S при тепловом стрессе	70
3.6. Анализ изменений в содержании углеводов и экспрессии гена трегалазы (<i>Treh</i>) у самок <i>Drosophila melanogaster</i> линии дикого типа Canton-S при тепловом стрессе	70
3.7. Анализ динамики интенсивности питания у самок <i>Drosophila melanogaster</i> линии дикого типа Canton-S после теплового стрессирования.....	72
3.8. Оценка влияния мутаций генов инсулиноподобного пептида DILP6 (<i>dilp6⁴¹</i>) и транскрипционного фактора dFOXO (<i>foxo^{BG01018}</i>) на содержание углеводов и липидов в нормальных условиях и при тепловом стрессе у самок <i>Drosophila melanogaster</i>	73
3.9. Оценка влияния мутаций генов инсулиноподобного пептида DILP6 (<i>dilp6⁴¹</i>) и транскрипционного фактора dFOXO (<i>foxo^{BG01018}</i>) на интенсивность капиллярного питания у самок <i>Drosophila melanogaster</i>	76
3.10. Изучение влияния стресс-связанных гормонов на содержание углеводов у самок <i>Drosophila melanogaster</i> линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе	77
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
ВЫВОДЫ	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	99

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКГ – адипокинетический гормон;

АКГР – рецептор адипокинетического гормона;

БТШ – белки теплового шока;

ДА – дофамин;

ИПК – инсулин-продуцирующие клетки;

И/ИФР – инсулин/инсулиноподобные факторы роста;

кДНК – комплементарная ДНК;

L-ДОФА – 3,4-дигидрокси-L-фенилаланин;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

НСК – нейросекреторные клетки;

ОА – октопамин;

ПЦР-РВ – количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

РТШ – реакция теплового шока;

СД1 – сахарный диабет 1 типа;

СД2 – сахарный диабет 2 типа;

ТАГ – триглицериды;

ЮГ – ювенильный гормон;

ЮГЭГ – ЮГ эпоксидгидраза;

20Э – 20-гидроксиэксдизон;

СА – *corpus allatum* – эндокринная железа;

СС – *corpus cardiacum* – нейрогемальный орган;

СНСО – гомолог субстратов инсулинового рецептора млекопитающих;

dAkt/РКВ – гомолог протеинкиназы В млекопитающих;

- DAPI** – 4',6-diamidino-2-phenylindole – 4',6-диамидино-2-фенилиндол;
- dFOXO** – drosophila Forkhead class box O – транскрипционный фактор семейства Forkhead class box O дрозофилы;
- DILP** – drosophila insulin-like peptide – инсулиноподобный пептид дрозофилы;
- dInR** – drosophila insulin-like receptor – инсулиноподобный рецептор дрозофилы;
- dPDK1** – drosophila phosphoinositide-dependent kinase 1 – фосфоинозитол-зависимая протеинкиназа 1 дрозофилы;
- dPI3K** – drosophila phosphatidylinositol 3-kinase – фосфатидилинозитол 3-киназа дрозофилы;
- GLUT** – glucose transporter – транспортер глюкозы;
- HSF1** – heat shock factor 1 – транскрипционный фактор теплового шока;
- ILPs** – insulin-like peptides – инсулиноподобные пептиды;
- InR** – insulin receptor – инсулиновый рецептор;
- IRS** – insulin receptor substrate – субстрат инсулинового рецептора;
- JNK** – c-Jun-N-terminal kinase – c-Jun-N-терминальная киназа;
- Lgr3** – Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 3 – сопряженный с G-белком рецептор 3-го типа, содержащий богатые лейцином повторы;
- Tps1** – trehalose-6-phosphate-synthase – трегалоза-6-фосфатсинтаза;
- Treh** – trehalase – трегалаза;
- TRET** – trehalose transporter – транспортер трегалозы;
- Upd2** – Unpaired 2 – функциональный гомолог лептина млекопитающих.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В современных условиях периодических столкновений живых организмов с неблагоприятными воздействиями внешней среды, таких как загрязнение окружающей среды или глобальное изменение климата, изучение глубоко консервативных 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), биохимическом и физиологическом (нейроэндокринная стресс-реакция) (Груntenко 2008; Even et al., 2012; Miyashita, Adamo, 2020) и молекулярном (Гарбуз, Евгеньев, 2017) 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 (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.

Цели 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 данного исследования, 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.

Основные 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.

Теоретическая и практическая значимость работы. 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.

Методология и методы исследования. В диссертационной работе были применены общенаучные методы: теоретический и методологический анализ литературы, экспериментальные методы исследования и анализ полученных данных. Методологическую основу настоящего исследования составляют современные методы молекулярной биологии (полимеразная цепная реакция в реальном времени), иммуногистохимический метод анализа локализации элементов инсулинового сигнального каскада, спектрофотометрический метод определения содержания углеводов, физиологический метод оценки интенсивности капиллярного питания, а также методы статистического анализа данных. Кроме того, в данной работе адаптирован для исследуемого объекта (*Drosophila melanogaster*) и использован для получения новых результатов сульфофосфованилиновый метод анализа общих липидов (Еремина, Груntenко, 2020). Методическая база для проведения исследований соответствует поставленным задачам.

Вклад автора. Основные результаты исследования получены автором самостоятельно. Иммуногистохимический анализ локализации dInR, DILP2, DILP3 и dFOXO проведен совместно с к.б.н. Андреевковой 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.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, подтверждены убедительными фактическими данными. Оценка и интерпретация полученных результатов проводились с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях:

1. 21-ая Международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Пушино, 2017);
2. XV Съезд Русского энтомологического общества (Новосибирск, 2017);
3. Международная конференция «Беляевские чтения», посвященная 100-летию академика АН СССР Д.К. Беляева (Новосибирск, 2017);
4. X Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз 2017» (Казань, 2017);
5. 22-ая Международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Пушино, 2018);
6. 11-ая Международная мультikonференция по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology – BGRS\SB-2018) (Новосибирск, 2018);
7. Международный конгресс «VII съезд ВОГиС, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (Санкт-Петербург, 2019);
8. Международная конференция «Дрозофила в генетике и медицине» (Гатчина, 2020).

Публикации по теме диссертации. По материалам настоящей работы были опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

1. Андрееенкова О.В., Адоньева Н.В., **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.

2. **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.

3. Андрееенкова О.В., **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.

4. Karpova E.K., **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.

5. **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.

6. Karpova E.K., Komyshev E.G., Genaev M.A., Adonyeva N.V., Afonnikov D.A., **Eremina M.A.**, Gruntenko N.E. Quantifying *Drosophila* adults with the use of a smartphone // Biology Open. – 2020. – Vol. 9(10), bio054452.

7. **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.

8. **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.
– 2020. – Т. 25. – № 5. – С. 465-471.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Стресс и стресс-реакция

Классическое учение о стрессе (от англ. «давление», «напряжение») и адаптационном синдроме создано Селье (1979), при этом он рассматривал стресс как ответ на любые предъявленные к организму требования, поскольку любой стрессор, какую бы природу он не имел, вынуждает организм приспособливаться.

В 1936 году эксперименты Селье с крысами показали, что общий адаптационный синдром, формирует «триаду» неспецифических изменений: 1) реакция тревоги, 2) стадия резистентности, 3) стадия истощения. Продолжительность и выраженность каждой стадии могут варьировать в зависимости от природы и силы стрессора, вида животного и физиологического состояния организма (Selye, 1956). Ведущая роль в развитии этих изменений у млекопитающих отводится гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе (Szabo et al., 2012; Tan, Yip, 2018).

Еще одним крупным вкладом Селье было формирование представления о различиях между отрицательным стрессом, то есть дистрессом (снижающим сопротивляемость организма, вызывающим возникновение и ухудшение течения болезни), и положительным, эустрессом, – мобилизирующим возможности организма и повышающим устойчивость к стрессирующим факторам, а также приводящим к облегчению течения или полному исчезновению заболеваний (Szabo et al., 2012). Селье рассматривал стресс как общий знаменатель всех адаптационных реакций в организме, причем полная свобода от него означала бы смерть (Rice, 2012). В 1987 году реакция стресса впервые была описана для насекомых (Rauschenbach et al., 1987).

Среди многообразия стрессирующих факторов выделяют две основные группы: абиотические и биотические. К первым относятся факторы небиологической природы, которые прямо или косвенно влияют на живые организмы (высокие и низкие температуры, свет, радиоактивное излучение,

давление, влажность воздуха, солевой состав воды и т.д.), ко вторым – негативные влияния, вызванные внутри- и межвидовыми взаимодействиями (Zhao, Jones, 2012). Реакция на стресс также может быть вызвана голодом, который возникает при истощении запаса питательных веществ в окружающей среде (Święciło, 2016).

В зависимости от продолжительности стресс классифицируют как острый (кратковременный, продолжающийся минуты или часы) или хронический (продолжающийся дни и недели) (Klepsatel et al., 2016).

В ходе эволюционного развития животные выработали комплекс защитных механизмов, целью которых является адаптация организма к предъявленным условиям. Наиболее распространенной формой является изменение в поведении: животное покидает зону действия стрессора, чтобы избежать его влияния (Калуев, 1999). Если для нейтрализации стрессового воздействия поведенческой реакции оказывается недостаточно, подключаются механизмы, действующие на биохимическом, физиологическом (нейроэндокринная стресс-реакция) (Грунтенко, 2008) и молекулярном (реакция теплового шока (Гарбуз, Евгеньев, 2017), сигнальный каскад с-Jun N-терминальной киназы – JNK (Solinas, Becattini, 2017)) уровнях.

Таким образом, защитная стресс-реакция развивается как в целом организме, так и в каждой его клетке.

1.1.1. Белки и реакция теплового шока

Известно, что реакция теплового шока (РТШ), являющаяся одним из механизмов нейтрализации стрессорного воздействия на молекулярном уровне, была впервые обнаружена в 1962 году Ритосса на политенных хромосомах *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1962, цит. по Carocci et al., 2014). Суть клеточной РТШ заключается в программе изменений экспрессии генов, приводящей к индукции ряда цитопротективных генов, кодирующих белки теплового шока (БТШ), и репрессии многих конститутивно экспрессируемых белков (Varghese et al., 2012).

Позднее было показано, что БТШ существуют во всех организмах, от бактерий до людей, и что они являются высоко консервативными молекулярными шаперонами, т. е. белками, связывающимися с другими молекулами, и в таком комплексе выполняющими защитные функции (Varghese et al., 2012; Miller, Fort, 2018).

Система генов теплового шока, реагирующая на различные формы стресса, является чрезвычайно быстрой: у дрозофилы можно обнаружить локальную деконденсацию хроматина, приводящую к образованию пуффов на политенных хромосомах слюнных желез, в течение первых 1-2 мин после начала теплового шока и достигающую максимальной скорости через 2-5 мин, причем белковый синтез полностью изменяется через 15 мин после начала теплового воздействия. Быстрая активация генов БТШ, по-видимому, необходима для выживания клеток в условиях стресса и для перекрестной защиты от несвязанных стрессов. Кроме того, при РТШ происходит перестройка всех уровней активности генома – от транскрипции и созревания РНК до трансляции и сборки белков (Лозовская, Евгеньев, 1984; Гарбуз, Евгеньев, 2017).

Хотя вызванная стрессом экспрессия генов БТШ происходит на фоне ингибирования синтеза белка, эти гены подвергаются дифференциальной регуляции без общего нарушения синтеза белка у насекомых в течение диапаузы – состояния покоя и повышенной стрессоустойчивости. Во время диапаузы, когда концентрации АТФ низкие, БТШ могут изолировать, а не сворачивать белки (King, MacRae, 2015).

Если стресс окружающей среды перегружает механизмы клеточной защиты, макромолекулы и клеточные структуры необратимо повреждаются, и клетки подвергаются апоптозу (Fulda et al., 2010).

Согласно современной классификации, в основе которой лежат различия в молекулярной массе и гомологии, БТШ классифицируют на несколько семейств, включая большие БТШ: БТШ100, БТШ90, БТШ70, БТШ60, БТШ40, и малые БТШ – члены семейства БТШ20 / α -кристаллина (Yi et al.,

2018). Основной функцией БТШ считают контроль образования новых белков и формирование их третичной структуры (фолдинг). Связываясь с растущими пептидными цепями на рибосоме, БТШ предотвращают их неспецифическую агрегацию, предохраняют от преждевременного протеолитического распада и способствуют правильному и своевременному сворачиванию полипептида в третичную структуру. БТШ также связывают измененные белки или белки, третичная структура которых уже сформировалась неправильно, защищая клетку от их воздействия (Максимович, Бонь, 2020; King, MacRae, 2015; Donovan, Marr, 2016).

У дрожжей и беспозвоночных, включая дрозофилу, транскрипционная активация генов БТШ регулируется уникальным фактором теплового шока (heat shock factor, HSF1). У позвоночных семейство HSF включает HSF1-4, причем HSF1 позвоночных является функциональным аналогом HSF1 беспозвоночных (Anskar, Sistonen, 2011).

При стрессирующем воздействии HSF1 отделяется от БТШ, образует тримеры, приобретает ДНК-связывающую активность и накапливается в ядре, где активирует транскрипцию всех генов БТШ и подавляет транскрипцию других генов. По окончании стресса, HSF1 переходят в исходное мономерное состояние и связывают освободившиеся БТШ. Далее, БТШ участвуют в процессах транспортировки белковых молекул через мембраны митохондрий и ядерную оболочку, в деградации белков до антигенных пептидов и связывании процессированных пептидов с молекулами главного комплекса гистосовместимости 1 класса (Никитин, 2008).

1.1.2. Сигнальный каскад с-Jun N-терминальной киназы как элемент молекулярного стресс-ответа

Молекулярно-клеточные механизмы защиты от стресса, помимо индукции экспрессии БТШ, также включают активацию высококонсервативных сигнальных каскадов митоген-активируемых

протеинкиназ (МАРК). Вместе, действие БТШ и МАРК, может влиять на результат клеточного стресс-ответа (Gonda et al., 2012).

Одним из ключевых компонентов семейства МАРК является с-Jun N-терминальная киназа (JNK) (Diener et al., 1997). У *Drosophila* уникальной JNK является *Basket* (*Bsk*; ортолог JNK1, JNK2 и JNK3 человека, также известные как МАРК8, МАРК9 и МАРК10, соответственно), фосфорилирующая и активирующая ряд транскрипционных факторов (La Marca et al., 2020) (Рисунок 1).

Наиболее известными JNK-активируемыми транскрипционными факторами являются Jun-связанный антиген (Jun-related antigen, *Jra*) и *Kayak* (*Kay*; ближайшими ортологами которого являются JUN (протоонкоген *Jun*) и FOS (протоонкоген *Fos*) человека), составляющие вместе гетеродимерный комплекс белок-активатор фактора транскрипции-1 (Activator Protein-1, AP-1) (La Marca et al., 2020).

Хотя существуют и другие цели *Bsk*, регуляция сигнального каскада выше *Bsk* намного сложнее и мало изучена. Для активации JNK/*Bsk* существует по крайней мере две киназы JNK (JNKK) - Hemipterous (*Hep*) и МАР киназа киназа 4 (*Mkk4*; ортологи человека МАР2К7 и МАР2К4 соответственно) и, по крайней мере, четыре киназы JNKK (JNKKKs) - *Slipper* (*Slpr*, ортологи человека МАР3К9, МАР3К10, МАР3К11 и МАР3К21), *Wallenda* (*Wnd*, ортологи человека МАР3К13 и МАР3К12), TGFβ-ассоциированная киназа 1 (*Tak1*, ортолог человека МАР3К7) и киназа 1, регулирующая сигнал к апоптозу (Apoptotic signal-regulating kinase 1, *Ask1*, ортологи человека МАР3К15 и МАР3К5) (La Marca et al., 2020) (Рисунок 1).

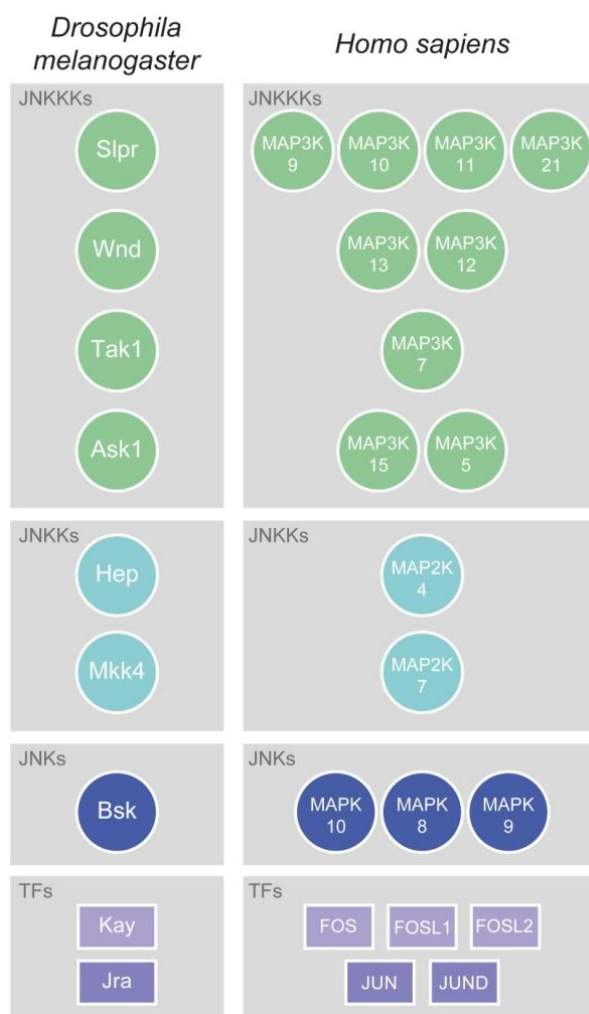


Рисунок 1. Компоненты сигнального каскада JNK на примере дрозофилы (слева) и человека (справа) (La Marca et al., 2020).

Все эти киназы участвуют в сигнальных каскадах, активирующих JNK. Несмотря на всю сложность регуляции, киназное ядро Hep-Bsk обычно считается каноническим и основным эффектором передачи сигналов JNK (La Marca et al., 2020).

После активации JNK индуцирует множественные биологические функции через белок-активатор фактора транскрипции-1 и независимый от транскрипции контроль эффекторных молекул. Изоферменты JNK регулируют гибель и выживание клеток, дифференциацию, пролиферацию, накопление активных форм кислорода, метаболизм, передачу сигналов инсулина и канцерогенез в печени. Недавние исследования с использованием генно-инженерных мышей показали, что потеря или гиперактивация каскада JNK способствует развитию воспаления, фиброза, роста рака и

метаболических заболеваний, включая ожирение, стеатоз печени и резистентность к инсулину (Seki, Karin, 2012).

Как известно, повреждение клеток стрессом вызывает апоптотическую гибель клеток несколькими каскадами, включая JNK. Гибель клеток происходит за счет быстрой активации JNK, которая фосфорилирует регуляторный домен HSF1, что приводит к блокировке активности последнего и предотвращает накопление БТШ после окончания стресса (Anskar and Sistonen 2007).

БТШ способствует выживанию клеток посредством регуляции активности ключевого модулятора сигнального каскада И/ИФР – Akt и JNK. Например, в экспериментах с лимфоидной клеточной линией человека было обнаружено, что БТШ72 опосредует подавление активированной стрессом протеинкиназы JNK (Gabaï et al., 1998). Это открытие обеспечивает основу для антиапоптотической активности БТШ72 и может объяснить повышенную чувствительность к стрессу старых клеток, в которых нарушенная индуцируемость БТШ72 приводит к потере контроля над активацией JNK из-за стрессов и, как следствие, к более высокому уровню апоптотической гибели (Gabaï et al., 1998).

1.1.3. Нейроэндокринная стресс-реакция насекомых

Нервная и эндокринная системы посредством процесса, называемого нейроэндокринной интеграцией, взаимодействуют друг с другом с целью регуляции ряда функций на физиологическом уровне и поддержания общесистемного гомеостаза, как в обычных, так и в стрессовых ситуациях (Lubawy et al., 2020).

Несмотря на большое филогенетическое различие между насекомыми и млекопитающими, некоторые элементарные принципы нейроэндокринных систем консервативно сохраняются в течение миллионов лет независимой эволюции (Рисунок 2): гомологичные эндокринные структуры – нейросекреторные клетки (НСК) в мозге насекомых и НСК (супраоптическое,

паравентрикулярное и вентромедиальное ядра) в гипоталамусе млекопитающих, нейрогемальный орган *corpus cardiacum* (CC) у насекомых и нейрогипофиз, а также эндокринная железа *corpus allatum* (CA) насекомых и аденогипофиз у млекопитающих (De Loof et al., 2012; Slama, 2015).

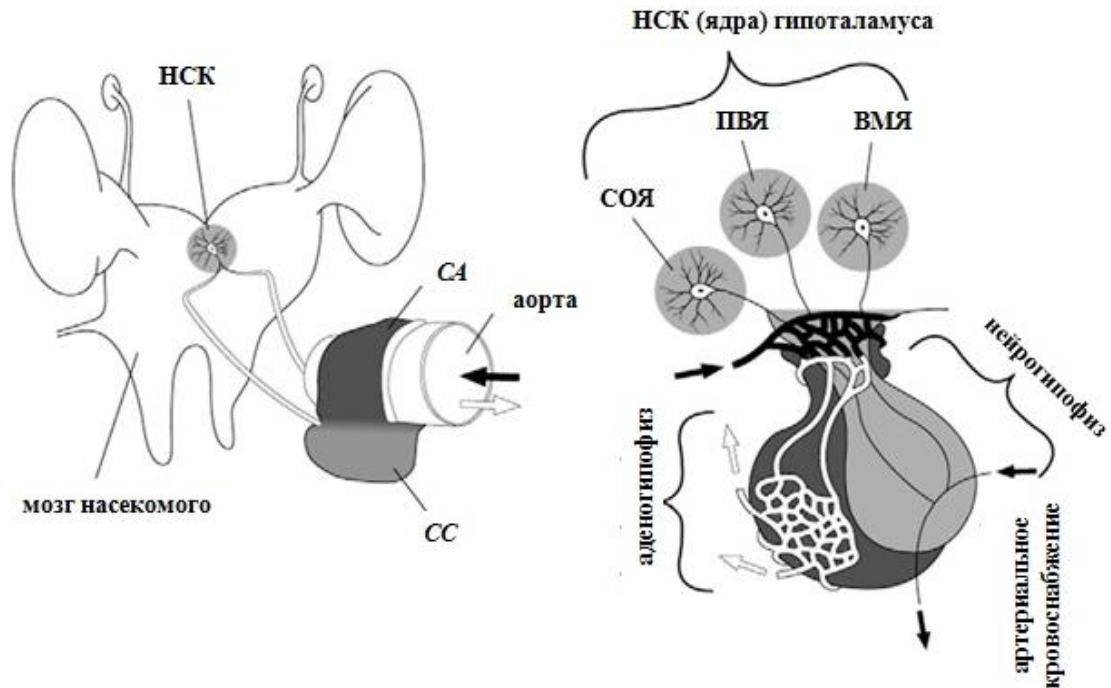


Рисунок 2. Схема нейроэндокринной системы насекомых, на примере саранчи (слева) и позвоночных (справа). Сокращения: НСК – нейросекреторные клетки мозга, CA – *corpus allatum*, CC – *corpus cardiacum*, СОЯ – супраоптическое ядро гипоталамуса, ПВЯ – паравентрикулярное ядро гипоталамуса, ВМЯ – вентромедиальное ядро гипоталамуса (De Loof et al., 2012, дополнено).

Таким образом, отсутствие гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у насекомых не препятствует развитию у них стресс-реакции по типу позвоночных (Раушенбах, 1990). Стресс-реакция у насекомых впервые была описана Раушенбах с соавторами в 1987 году в работе «Stress-like reaction of *Drosophila* to adverse environmental factors» (Rauschenbach et al., 1987).

Выживание насекомых в неблагоприятных условиях внешней среды можно разделить на две эволюционные «стратегии»: состояние диапаузы и состояние задержки метаморфоза. Нейроэндокринная стресс-реакция составляет гормональную основу обоих типов, обладая двумя основными свойствами: неспецифичностью по отношению к воздействию и

адаптивностью, что свойственно для стресс-реакции позвоночных (Rauschenbach et al., 1987).

Ключевые звенья нейроэндокринной стресс-реакции *Drosophila*

Показано, что ключевыми звеньями нейроэндокринной стресс-реакции имаго *Drosophila* являются биогенные амины октопамин (ОА) и дофамин (ДА), а также ювенильный гормон (ЮГ) и 20-гидроксиэкдизон (20Э) (Груntenко, 2008). Известно, что центральным местом синтеза ОА и ДА являются октопамин- и дофаминэргические нейроны мозга, местом синтеза ЮГ является СА (Toivonen, Partridge, 2009; Saleh et al., 2018). Основным источником экдистероидов у личинок является проторакальная железа, а у имаго – фолликулярные клетки яичников (Toivonen, Partridge, 2009).

Биогенные амины, ДА и ОА, насекомых выполняют функции нейротрансмиттеров, действующих в синаптической щели, нейромодуляторов, действующих в пределах одной ткани, и нейрогормонов, переносимых током гемолимфы на большие расстояния (Раушенбах, 1990). Показано, что они контролируют деятельность эндокринных желез, регулируют снижение сенсорных сигналов, возбуждение, инициацию и поддержание различных ритмических и сложных форм поведения, таких как обучение и память, инициируют мобилизацию липидов и углеводов (Fargooqi, 2007; Martin, Krantz, 2014).

В ходе личиночного развития насекомого повышение уровня 20Э, еще называемого гормоном метаморфоза, инициирует линьку, а ЮГ определяет характер этой линьки, препятствуя преждевременному метаморфозу: при высоком титре ЮГ происходит личиночная линька, при его резком падении – метаморфоз, при его отсутствии – имагинальная линька (Раушенбах, 1990). У имаго насекомых ЮГ и 20Э также выполняют гонадотропную функцию: стимулируют синтез феромонов, определяют половое поведение самок, контролируют развитие яичников и вителлогенез (Груntenко, 2008; Miyashita, Adamo, 2020). Стоит отметить, что у насекомых синтезируется не менее восьми форм ЮГ-подобных соединений (0, I, II, III, ЮГ-III бисэпоксид, метил

фарнезоат, 8'-ОН-ЮГ III, ОН-ЮГ III), самый распространенный тип – ЮГ III (Flatt et al., 2005). У дрозофилы синтезируются два ЮГ: ЮГ-III и ЮГ-III бисэпоксид (Raikhel et al., 2004; Flatt et al., 2005; Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

Взаимодействие биогенных аминов и гонадотропинов *Drosophila*

Основываясь на многолетних исследованиях взаимодействия гонадотропинов и биогенных аминов имаго *Drosophila*, Груntenко и Раушенбах (Gruntenko, Rauschenbach, 2008) предложили механизм поддержания баланса ЮГ и 20Э у самок дрозофилы, опосредованный ДА, схематически показанный на рисунке 3.

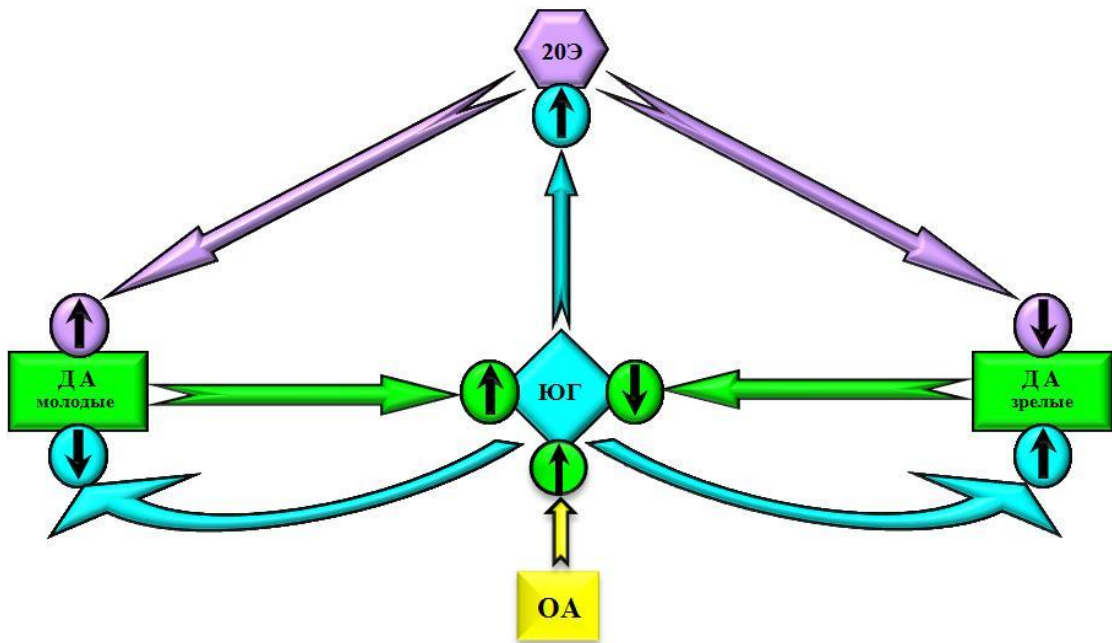


Рисунок 3. Схема взаимодействия гонадотропинов (ЮГ и 20Э) и биогенных аминов (ДА и ОА) у молодых и зрелых самок дрозофилы в нормальных условиях. Примечание: стрелки указывают направление эффекта, стрелки в кругах указывают на изменения в гормональном уровне (Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

20Э регулирует титр ЮГ опосредованно через метаболическую систему ДА: увеличение титра 20Э повышает уровень ДА у молодых, только начинающих откладывать яйца самок, но снижает его у активно размножающихся зрелых самок, что приводит к повышению титра ЮГ у

зрелых и снижению титра у молодых самок. В свою очередь, ДА и ОА опосредованно влияют на уровень 20Э через метаболическую систему ЮГ, однонаправленно, повышая уровень 20Э, – у молодых самок и разнонаправленно – у зрелых: ОА повышает 20Э, а ДА – снижает (Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

Развитие нейроэндокринной стресс-реакции у *Drosophila*

Известно, что в неблагоприятных условиях различного происхождения уровни ОА и ДА у дрозофилы резко возрастают в гемолимфе и в тканях нейтрального происхождения, влияя на выживаемость, плодовитость и продолжительности жизни (Gruntenko, Rauschenbach, 2018).

Показано, что уровни ЮГ и 20Э также резко повышаются в неблагоприятных условиях, способствуя адаптации. Повышение титра 20Э приводит к апоптозу части ранних вителлогенных ооцитов и снижению плодовитости, что является адаптацией в условиях перенаселения или снижения поступления питательных веществ. Повышенный титр ЮГ приводит к накоплению зрелых яиц и задержке яйцекладки до тех пор, пока неблагоприятные условия не улучшатся (Johnson, White, 2009; Gruntenko, Rauschenbach, 2018).

Развитие нейроэндокринной стресс-реакции у имаго дрозофилы происходит следующим образом: через 15 минут после начала воздействия стресса удваивается уровень ДА и ОА; через 60 минут реагирует экдистероидная система, повышается содержание экдизона и 20Э; через 60 минут у самцов и 120 минут у самок снижается деградация ЮГ (повышается титр гормона) (Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

Важно отметить, что ни один из проанализированных гормонов не является инициатором нейроэндокринной стресс-реакции у дрозофилы, хотя все они являются участниками единой системы взаимодействий (Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

1.2. Структура, функции инсулиноподобных пептидов и регуляция сигнального каскада инсулина/инсулиноподобных факторов роста у *Drosophila*

1.2.1. Инсулиноподобные пептиды (ILPs) насекомых

Инсулин – хорошо исследованный гормон, благодаря его важной роли в регуляции углеводного обмена. Был открыт в 1922 году Бантингом и Бестом, за что впоследствии они получили нобелевскую премию (Banting, Best, 1922). Молекулярно-генетические исследования последних десятилетий показывают, что сигнальный каскад инсулина/инсулиноподобных факторов роста (И/ИФР) эволюционно консервативен у многоклеточных (Murillo-Maldonado, Riesgo-Escovar, 2017; Alvarez-Rendon et al., 2018).

Инсулиноподобные пептиды (ILPs) у насекомых впервые были обнаружены в 1964 году у медоносной пчелы *Apis mellifera*, а позже – у *Drosophila melanogaster* (LeRoith et al., 1981). Ряд классических эндокринных исследований в конце 1970-х годов показал, что медианные НСК у мух выполняют функцию инсулин-продуцирующих клеток (ИПК) и отвечают на поступление питательных веществ секрецией нескольких *Drosophila* ILPs (DILPs) в гемолимфу, снижая тем самым уровни циркулирующих сахаров (Morris et al., 2012).

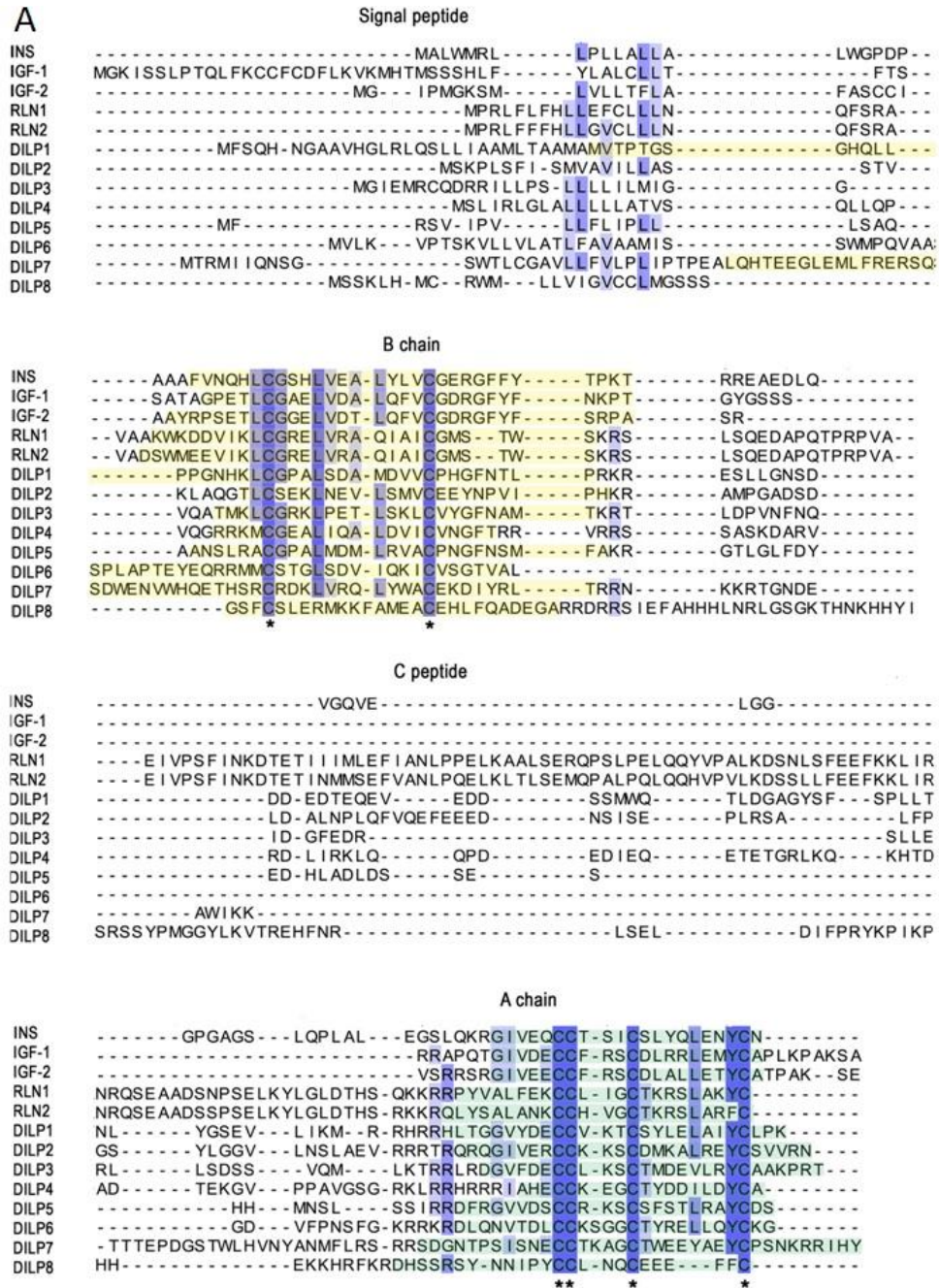
В середине 1980-х годов первая характеристика аминокислотной последовательности инсулин-содержащей структуры у насекомых была выполнена на гормоне тутового шелкопряда *Bombyx mori*, бомбиксине, состоящим из нескольких изоформ и обладающим высокой структурной гомологией с инсулином позвоночных животных (идентичность до 40% первичных структур бомбиксина II и инсулина свиньи). У шелкопряда выявлено 40 бомбиксинов (ILP-генов) (Aslam et al., 2011). Сходства в структуре и расположении промежуточных интронов между генами, кодирующими инсулин и бомбиксины, предполагает, что эти гены произошли от общего предка (Aslam et al., 2011). Также один ILP-ген определен у саранчи, *Locusta migratoria* (Kromer-Metzger, Lagueux, 1994), и несколько ILPs-генов

найжены у других насекомых, включая различных представителей отрядов *Lepidoptera* и *Diptera* (Yoshida et al., 1998; Riehle, Brown, 2002). У *Drosophila* идентифицировано восемь DILPs-генов (Nässel, Vanden Broeck, 2015).

Доменная организация препептидов DILPs аналогична организации инсулина, инсулиновых факторов роста (ИФР-1, ИФР-2) и релаксинов у млекопитающих. DILPs включают сигнальный пептид с В-цепью, С-пептид и А-цепь, а также консервативные остатки цистеина, четыре на А-цепи и два на В-цепи (Рисунок 4). DILP7 и DILP1 имеют удлинённую В-цепь по сравнению с другими DILPs. DILP8 имеет атипичное количество аминокислот между остатками цистеина в В-цепи и А-цепи, а также более длинный С-пептид по сравнению с другими DILPs (Semaniuk et al., 2020).

Показано, что DILPs 1-5, кодируемые генами на третьей хромосоме, имеют наибольшую гомологию с инсулином млекопитающих (Tatar et al., 2003). Кроме того, инсулин млекопитающих способен активировать dInR у дрозофилы (Fernandez et al., 1995; Yamaguchi et al., 1995). Также показано, что DILP5 связывается с рецептором инсулина человека и активирует его, снижая уровень глюкозы в крови у крыс (Sajid et al., 2011). Кодируемый геном на первой хромосоме, DILP6 структурно больше похож на ИФР-1 (Okamoto et al., 2009; Delanoue et al., 2010). DILP7 и DILP8 являются релаксиноподобными пептидами (Grönke et al., 2010; Garelli et al., 2012), а Lgr3 – рецептор DILP8 – является гомологом рецепторов релаксина семейства LGR (Semaniuk et al., 2020).

Активность ИПК и секреция DILPs зависят от поступления питательных веществ в организм и контролируются множеством факторов, таких как нейротрансмиттеры, нейропептиды и продукты жирового тела (Luo et al., 2014; Nässel, 2018). Эти исследования были основаны на радиоиммунологическом и иммуногистохимическом анализах с использованием антител к инсулину млекопитающих или биоанализах на гипогликемическую активность экстрактов тканей (Nässel, Vanden Broeck, 2015).

**Б**

	DILP1	DILP2	DILP3	DILP4	DILP5	DILP6	DILP7	DILP8
INS	22	27	21	17	23	17	18	11
IGF-1	23	25	22	24	28	20	16	17
IGF-2	20	29	26	26	28	19	17	16
RLN1	19	20	27	22	20	20	22	19
RLN2	20	12	26	22	15	19	24	20

Рисунок 4. (А) Идентификационная матрица, показывающая выравнивание аминокислотных последовательностей для инсулиноподобных пептидов (DILPs) *Drosophila melanogaster*, инсулина, инсулиноподобных факторов роста 1 и 2 (IGF-1, IGF-2) и релаксинов 1 и 2 (RLN1, RLN2) человека. Белки содержат N-концевой сигнальный пептид, B-цепь (желтый), C-пептид, A-цепь (зеленый). Различными оттенками синего выделены аминокислоты, которые идентичны среди некоторых или всех последовательностей. (Б) Консервативность последовательностей в процентах идентичных аминокислот (Semaniuk et al., 2020).

1.2.1.1. Тканеспецифичность локализации инсулиноподобных пептидов *Drosophila* (DILPs)

Показано, что DILPs синтезируются в различных типах клеток и тканей в определенных паттернах (Таблица 1) от эмбриона до имаго (Nüssel et al., 2013). У личинок и имаго DILP2, 3 и 5 преимущественно синтезируются ИПК в головном мозге, а также другими клетками эмбрионов, личинок и имаго, и являются наиболее изученными из инсулиноподобных пептидов мухи (Brogiolo et al., 2001; Rulifson et al., 2002; Geminard et al., 2009).

Таблица 1. Тканеспецифичность локализации инсулиноподобных пептидов (DILPs1-8) на разных стадиях развития *Drosophila* (Nüssel et al., 2013).

DILPs	Локализация			Концы аксонов
	Эмбрион	Личинка	Имаго	
DILP1	–	ИПК	–	–
DILP2	мезодерма средней кишки	ИПК, имагинальные диски, слюнные железы, глиальные клетки ЦНС	ИПК	нейропиль мозга, СС, передняя аорта, зоб, преджелудок
DILP3	мезодерма средней кишки	ИПК	ИПК, мышечные клетки средней кишки	СС, передняя аорта, зоб, преджелудок
DILP4	мезодерма средней кишки	передняя часть средней кишки	–	–
DILP5	мезодерма средней кишки	ИПК, нефроциты	ИПК, фолликулярные клетки яичников, нефроциты	СС, передняя аорта зоб, преджелудок
DILP6	–	жировое тело, слюнные железы, сердце, глиальные клетки ЦНС	жировое тело	–
DILP7	средняя кишка	брюшные нейромеры	брюшные нейромеры	нейропиль мозга, задняя кишка, кишечник, яйцевод
DILP8	–	имагинальные диски	яичники	–

DILP6 продуцируется у личинок в клетках жирового тела, слюнных железах, сердце и глиальных клетках ЦНС, а у имаго – в клетках жирового тела (Slaidina et al., 2009; Grönke et al., 2010). DILP7 продуцируется и у

личинок, и имаго нейронами брюшных ганглиев (Miguel-Aliaga et al., 2008). DILP8 был обнаружен в личиночных имагинальных дисках (Colombani et al., 2012; Garelli et al., 2012) и яичниках (Meissner et al., 2016).

Про DILP1 и DILP4 до сих пор практически ничего не известно. Хотя, гибридизацией *in situ* транскрипт *dilp1* был обнаружен в личиночных ИПК (Rulifson et al., 2002), обращение к базе данных по экспрессии генов FlyAtlas (Chintapalli et al., 2007) не выявило никаких данных по экспрессии *dilp1*, а также *dilp4*, в какой-либо ткани личинок или имаго, тогда как распределение других *dilps* подтверждено (Nässel et al., 2013). В соответствии с данными Слайдиной с соавторами (Slaidina et al., 2009) и modENCODE26 (Graveley et al., 2011), *dilp1*, по-видимому, экспрессируется в основном на стадиях средней куколки, а *dilp4* – на эмбриональной стадии (Liu et al., 2016). Позже стало известно, что DILP1 обнаруживается не только на стадии куколки, но и в первые дни после вылета имаго. Кроме того, экспрессия *dilp1* также высока у самок мух, находящихся в репродуктивной диапаузе, при которой питание сильно снижено (Liu et al., 2016).

1.2.1.2. Регуляция транскрипции *dilps*

Показано, что временная и пространственная транскрипционная регуляция основных *dilps* на личиночных стадиях контролируется нуклеостемином 3, коротким нейропептидом F – ортологом нейропептида Y млекопитающих (sNPF), экдизоном и транскрипционным фактором семейства Forkhead box class O (dFOXO), тогда как на стадии имаго – микроРНК, dFOXO, гомологом гистондеацетилазы SIRT1 млекопитающих (dSir2), цитокином Unpaired 2 (Upd2) – функциональным гомологом лептина млекопитающих и гомологом протоонкогена каситас В-наследственной лимфомы (dCbl, Casitas B-lineage lymphoma) (Kannan, Fridel, 2013).

Известно, что микроРНК играют важную роль в регуляции секреции инсулина в β -клетках поджелудочной железы (Kannan, Fridel, 2013). Одна из таких микроРНК, miR-14, экспрессируется в ИПК дрозофилы, системно

регулируя уровень жиров. Кроме того, Варгезе с соавторами (Varghese et al., 2010) обнаружено снижение уровня мРНК *dilp3* и *dilp5* у miR-14-мутантных мух, сопровождающееся повышением уровня триглицеридов (ТАГ) (Varghese et al., 2010). Другая микроРНК, обнаруженная в жировом теле, miR-278, вызывает повышение чувствительности к инсулину. Нокаутные мухи по miR-278 имеют повышенные уровни экспрессии *dilps2,3,5*, а также – более высокие уровни циркулирующей трегалозы, что указывает на состояние, близкое к инсулинорезистентности (Teleman et al., 2006).

Также известно, что сверхэкспрессия *dilp6* в жировом теле снижает уровень мРНК *dilp2* и *dilp5* в головном мозге и понижает секрецию DILP2 в гемолимфу. Таким образом, *dilp6* может служить еще одним регуляторным сигналом между dFOXO, жировым телом и ИПК мозга дрозофилы (Bai et al., 2012a; Nässel, Vanden Broeck, 2015).

Показано участие dSir2 в регуляции экспрессии *dilp2* и *dilp5*: системный нокаунт *dSir2* повышает экспрессию обоих генов. Причем dSir2-опосредованная регуляция *dilp2* и *dilp5* действует независимо от: уровни транскриптов *dilp2* и *dilp5* были повышены у мух с РНК-интерференцией *dSir2* и конститутивно активным dFOXO в жировом теле (Banerjee et al., 2012).

Цитокин Upd2 определяет состояние сытости и регулирует секрецию DILP2 и DILP5 из ИПК в гемолимфу дрозофилы. Показано, что в состоянии сытости накопление DILPs в ИПК меньше, что указывает на их повышенную секрецию. У мух с нокауном *upd2* наблюдается повышенное накопление DILPs во время питания, что показывает неспособность ИПК синтезировать DILPs, когда организм в них нуждается (Rajan, Perrimon, 2012). Таким образом, Upd2, по-видимому, является важным регулятором секреции DILPs из ИПК в гемолимфу мухи.

Показано, что dCbl и адапторные белки отрицательно регулируют экспрессию *dilps* в ИПК мозга дрозофилы. Нокаунт *dcbl*, специфичный для нейронов и ИПК, приводит к повышению экспрессии *dilps 2, 3, 5*, тогда как сигнальный каскад рецептора эпидермального фактора роста опосредует

регуляторный эффект dCbl только на *dilp2* и *dilp3*. Таким образом, вероятно, для *dilp5* существуют другие медиаторы (Yu et al., 2012).

1.2.1.3. Функции DILPs

Известно, что DILPs регулируют баланс между запасаемыми и циркулирующими углеводами, а также регулируют обмен веществ, запуская сигнальные каскады, влияющие на транскрипцию генов, ответственных за метаболические перестройки. Нарушение регуляции, опосредованной DILPs, приводит к нарушениям метаболизма, роста и развития (Semaniuk et al., 2018). Первые доказательства, демонстрирующие участие DILPs в контроле роста, развития и гомеостаза глюкозы, были получены в результате абляции ИПК в мозге дрозофилы, основного места синтеза DILP2, 3 и 5. Рулифсон с соавторами (Rulifson et al., 2002) показали, что удаление ИПК во время ранней личиночной стадии приводит к серьезной задержке развития с уменьшением как числа клеток, так и размера тела, сопровождаемого повышенным уровнем циркулирующих углеводов, что указывает на диабетический фенотип. Стоит отметить, что частичное восстановление роста и циркулирующего сахара посредством избыточной экспрессии *dilp2*, показанное авторами, убедительно подтверждает идею о том, что потеря DILP2 является причиной формирования этих фенотипов (Rulifson et al., 2002). Удаление ИПК на поздних личиночных стадиях приводит к незначительной задержке развития и небольшому уменьшению размера тела (Ikeya et al., 2002), снижению плодовитости, более высокому содержанию липидов и углеводов, а также увеличению продолжительности жизни (Broughton et al., 2005). Нокдаун ИПК у имаго приводит к гипергликемии и непереносимости глюкозы, но не к инсулинрезистентности (Haselton et al., 2010).

ИФР-подобный DILP6 выполняет специализированную роль в регуляции роста в ходе развития или в условиях голодания (Slaidina et al., 2009). Снижение функции DILP6 приводит к дефициту роста во время

развития куколки и повышенной чувствительности к голоданию у молодых имаго. Параллельно голодание может увеличивать экспрессию *dilp6* через dFOXO-опосредованную регуляцию сигнального каскада И/ИФР (Slaidina et al., 2009). Кроме того, DILP6 регулирует накопление углеводов, липидов и устойчивость к окислительному стрессу (Bai et al., 2012a).

DILP7 участвует в регуляции функций кишечника, роста трахеи и репродуктивного поведения (Miguel-Aliaga, et al., 2008; Cognigni, et al., 2011; Linneweber et al., 2014). Показано, что дифференцировка DILP7-синтезирующих нейронов у дрозофилы требует инсулинэргических факторов, ортологичных тем, которые участвуют в дифференцировке панкреатических β -клеток млекопитающих. Также известно, что сниженная функция DILP7-экспрессирующих нейронов приводит к стерильности, нарушая откладку яиц (Toivonen, Partridge, 2009; Grönke et al., 2010). Таким образом, DILP7 может выполнять функцию релаксина (Grönke et al., 2010).

Исследование функциональной роли DILP8 / *Lgr3* у имаго дрозофилы Мейсснером с соавторами (Meissner et al., 2016) подтвердило релаксиноподобную функцию DILP8. Авторы показали, что термогенетическая активация субпопуляции нейронов, экспрессирующих *Lgr3* в брюшном ганглии, снижает восприимчивость самок дрозофилы к самцам и снижает плодовитость (Meissner et al., 2016). Ляо с Насселем (Liao, Nässel, 2020) показали, что DILP8 участвует как в межорганной, так и в внутриорганной передаче сигналов, передавая, по-видимому, сигналы от яичников к моторным нейронам, которые, в свою очередь, регулируют функцию фолликулярных клеток и влияют на овуляцию и плодовитость. Кроме того, DILP8 действует более локально, паракринным образом, на небольшие наборы клеток базальных фолликулов (Liao, Nässel, 2020).

1.2.2. Регуляция инсулинового сигнального каскада

Млекопитающие имеют один ген инсулина и два инсулиноподобных фактора роста; геном дрозофилы, как описано выше, кодирует гомологи

инсулина (DILPs1-5), инсулиноподобных факторов роста млекопитающих (DILP6) и релаксинов (DILP7,8). В то же время, у млекопитающих имеется до 4 изоформ других клеточных компонентов сигнального каскада И/ИФР, а у дрозофилы они представлены уникальными генами (Рисунок 5), кодирующими: инсулиноподобный рецептор (dInR), стимуляция которого напрямую или через его субстрат, CHICO (гомолог субстратов инсулинового рецептора млекопитающих, IRS 1-4), приводит к активации dAkt/ПКВ (гомолог протеинкиназы В), которая, в свою очередь, модулирует активность ряда белков, в том числе транскрипционного фактора семейства Forkhead box class O, dFOXO (гомолог FOXO1, 3, 4 и 6 у млекопитающих), ингибируя его ядерное перемещение (Álvarez-Rendón et al., 2018).

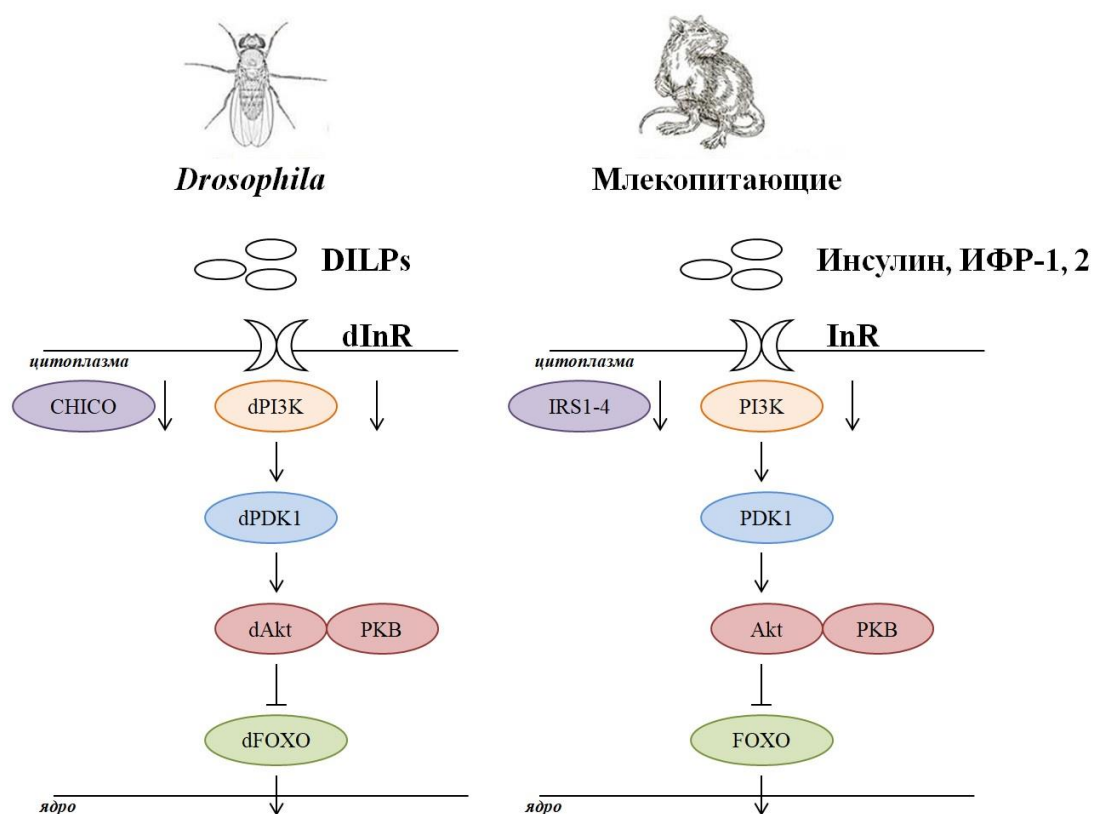


Рисунок 5. Схема инсулинового сигнального каскада у дрозофилы (слева) и млекопитающих (справа). Сокращения: DILPs – инсулиноподобные пептиды дрозофилы; гомологи инсулина, инсулиноподобных факторов роста (ИФР-1,2) млекопитающих; dInR – гомолог инсулинового рецептора млекопитающих (InR); CHICO – гомолог субстратов инсулиновых рецепторов млекопитающих (IRS1-4); dPI3K – гомолог фосфатидилинозитол 3-киназы млекопитающих; dAkt/ПКВ – гомолог протеинкиназы В млекопитающих; dFOXO – гомолог транскрипционных факторов млекопитающих семейства Forkhead box class O.

Стоит отметить, что DILPs 1-6 связываются с dInR, в то время как DILP8, связывается с другим типом рецепторов – сопряженного с G-белком рецептором 3-го типа, содержащего богатые лейцином повторы (Lgr3). Связывание DILP7 с Lgr3 пока экспериментально не подтверждено (Gontijo, Garelli, 2018).

Как и InR млекопитающих, его гомолог у дрозофилы (dInR) представляет собой гликопротеин, состоящий из двух α - и двух β -субъединиц (Fernandez-Almonacid, Rosen, 1987). Известно, что α -субъединицы являются внеклеточными и содержат инсулин-связывающие домены. Каждая β -субъединица состоит из трансмембранного и цитоплазматического доменов, последний из которых содержит инсулин-зависимую тирозинкиназу с высокой гомологией к домену InR киназы позвоночных (Gorczyca et al., 1993). Известно, что одним из отличий между рецепторами мухи и млекопитающих является наличие у первого С-концевого удлинения ~ 400 аминокислот (Fernandez et al., 1995).

Показано, что dInR у дрозофилы специфически локализуется в жировом теле, в том числе, окружающем мозг, но не обнаруживается в самой нервной системе. Также dInR обнаружен в СА (Belgacem, Martin, 2006; Rauschenbach et al., 2014).

Частичный нокаут *dInR* ведет к задержке развития и роста у эмбрионов мух, а у имаго снижается количество и размер клеток в имагинальных дисках, влияя на развитие крыльев; полный нокаут *dInR* вызывает гибель на эмбриональных стадиях, указывая на необходимость dInR в процессе развития дрозофилы (Semaniuk et al., 2020).

Известно, что Akt/ПКВ является критическим «узлом» в передаче сигнала в каскаде И/ИФР. Akt/ПКВ действует путем фосфорилирования ряда белков сигнального каскада И/ИФР, включая ингибирование транскрипционного фактора dFOXO, главного положительного катаболического регулятора каскада (Álvarez-Rendón et al., 2018).

Показано, что аминокислотные последовательности белка dFOXO и транскрипционного фактора человека FOXO3a идентичны на 27% по всей длине белка и на 82% идентичны в ДНК-связывающем домене (Jünger et al., 2003). dFOXO обеспечивает контроль транскрипции более 2000 генов, половина из которых регулируется тканеспецифичным образом (Allic et al., 2011).

Основным местом локализации dFOXO у дрозофилы является жировое тело головы и брюшка (Zheng et al., 2007). Пуиг с соавторами (Puig et al., 2003) предположили, что dFOXO обеспечивает передачу сигналов обратной связи между ИПК и жировым телом, потому что DILPs, продуцируемые ИПК, способны ингибировать dFOXO в жировом теле, в то время как dFOXO модулирует экспрессию DILPs в ИПК. Кроме того, dFOXO регулирует транскрипцию *dilp6* в жировом теле, по крайней мере, у личинок (Okamoto et al., 2009; Slaidina et al., 2009). Таким образом, dFOXO может действовать в качестве сенсора DILPs для активации сигнального каскада И/ИФР, обеспечивая сбалансированную регуляцию каскада.

Первые доказательства существования механизма транскрипционной обратной связи в сигнальном каскаде И/ИФР были представлены Пуигом с соавторами (Puig et al., 2003), которые обнаружили активацию транскрипции *dInR* посредством dFOXO. Ими был сделан вывод о том, что при избытке питательных веществ повышенная секреция уровней DILPs нужна мухам для активации сигнального каскада И/ИФР, что обеспечивает стимуляцию роста как клеток, так и организма в целом, в том числе – за счет инактивации dFOXO (Puig et al., 2003). В условиях ограничения питательных веществ dFOXO активирует гены-мишени, включая *dInR*, что приводит к накоплению dInR-рецепторов в мембране клеток, обеспечивая большую чувствительность клеток-мишеней к изменениям в уровне DILPs (Puig et al., 2003).

1.3. Стресс-реакция и инсулиновый сигнальный каскад

1.3.1. Роль инсулинового сигнального каскада в нейроэндокринной стресс-реакции у *Drosophila*

Исследования, проведенные в последние годы, указывают на то, что сигнальный каскад И/ИФР является дополнительным компонентом нейроэндокринной стресс-реакции (Johnson, White, 2009; Kannan, Fridell, 2013; Gruntenko, Rauschenbach, 2018).

Показано, что сигнальный каскад И/ИФР играет важную роль в контроле метаболизма гонадотропных гормонов: мутация *dInR* снижает синтез 20Э и ЮГ у имаго дрозофилы *in vitro* (Tatar et al., 2001; Tu et al., 2002, 2005), а нокадаун гена *dInR in vivo* приводит к снижению синтеза ЮГ (Belgacem, Martin, 2007), повышению деградации ЮГ и активности щелочной фосфатазы – фермента, регулирующего синтез ДА, – что указывает на снижение уровней ЮГ и ДА (Богомолова и др., 2013). Это согласуется с данными по инъекции инсулина мухам в брюшко, что вызывающей снижение активности щелочной фосфатазы, деградации ЮГ и повышение активности тирозингидроксилазы у самок дрозофилы (Адоньева и др., 2013; Карпова и др., 2013). Инактивация *dInR*, так же, как и инъекция инсулина, влияла на интенсивность реакции метаболических систем ЮГ и ДА при тепловом стрессе (Богомолова и др., 2013).

Была выявлена обратная связь в регуляции уровней ЮГ через сигнальный каскад И/ИФР у имаго дрозофилы: повышенный уровень транскрипции *dInR* был обнаружен у личинок *D. melanogaster* с удаленной СА и резко сниженным уровнем ЮГ (Mirth et al., 2014). Обратная связь также показана для DILP6 и ЮГ: ЮГ позитивно регулирует экспрессию *dilp6*, тогда как последний негативно регулирует уровень ЮГ (Veenstra et al., 2008; Bai et al., 2012b; Yamamoto et al., 2013; Андрееenkova и др., 2017). Действительно, снижение или повышение экспрессии *dilp6* в жировом теле вызывает изменение экспрессии инсулиноподобных пептидов в ИПК (Grönke et al., 2010; Bai et al., 2012a; Андрееenkova и др., 2017), которое, в свою очередь,

приводит к активации или инактивации *dInR* в *CA* – железе, синтезирующей ЮГ (Toivonen, Partridge, 2009; Nässel et al., 2015) и, как следствие, к повышению или снижению уровня его синтеза (Карпова и др., 2013; Rauschenbach et al., 2014; Yamamoto et al., 2013).

Было продемонстрировано, что во время личиночного развития 20Э регулирует рост через dFOXO (Colombani et al., 2005) и может индуцировать экспрессию *dilp6* на поздней личиночной стадии у личинок с нокаутом *dfoxo*, что указывает на независимость экдизоновой регуляции экспрессии *dilp6* от dFOXO (Slaidina et al., 2009).

Показано, что умеренное снижение функции dFOXO у мутантов *foxo^{BG01018}* (Dionne et al., 2006) индуцирует повышение уровня деградации ЮГ у самок *D. melanogaster* (Раушенбах и др., 2015б). Учитывая, что dFOXO экспрессируется преимущественно в жировом теле (Gruntenko et al., 2016) – ткани, синтезирующей ферменты деградации ЮГ (Gilbert et al., 2000), представляется возможным, что dFOXO положительно влияет на уровень ЮГ, регулируя его деградацию. Существует также обратная связь во взаимодействии между ЮГ и dFOXO: ЮГ подавляет dFOXO у личинок *D. melanogaster*, так как активность dFOXO у мух с удаленной *CA* значительно выше по сравнению с контролем (Mirth et al., 2014).

dFOXO регулирует метаболизм ОА и ДА: мутация *foxo^{BG01018}* приводит к увеличению активности тирозиндекарбоксилазы, первого фермента синтеза ОА, и снижает активность тирозингидроксилазы, первого фермента синтеза ДА, у молодых самок дрозофилы (Gruntenko et al., 2016). Обработка ЮГ нормализует активность этих ферментов у мутантов *foxo^{BG01018}* (Gruntenko et al., 2016), что предполагает посредническую роль ЮГ в регуляции метаболизма биогенных аминов dFOXO.

Было обнаружено, что 20Э способен вызывать перемещение dFOXO в ядро у личинок дрозофилы (Colombani et al., 2005).

1.3.2. Роль инсулинового сигнального каскада в молекулярно-клеточном стресс-ответе у *Drosophila*

Показано, что при окислительном стрессе транскрипционный фактор dFOXO вносит необходимый вклад в повышение уровня транскрипции белков теплового шока (БТШ). Вместе с молекулярными шаперонами – БТШ, dFOXO способен обеспечивать транскрипционный ответ, позволяющий клеткам пережить острый стресс (Donovan, Marr, 2016). Также известно, что у млекопитающих некоторые другие компоненты сигнального каскада И/ИФР, включая инсулиновые рецепторы (обычно мутирующие при инсулинорезистентности) и рецепторы инсулиноподобного фактора роста-1, взаимодействуют с БТШ для посттрансляционных модификаций и сохранения структурной целостности (Urban et al., 2012). Стоит отметить, что JNK ингибирует сигнальный каскад И/ИФР, приводя к перемещению dFOXO в ядро клетки, и активирует экспрессию его генов-мишеней, включая гены защиты от стресса (Wang et al., 2005). Таким образом, активация JNK приводит к повышению стрессоустойчивости. Интересно, что в мозге мух высокие уровни активности JNK могут быть обнаружены специфически в ИПК (Wang et al., 2005). Вызванная стрессом репрессия транскрипции *dilp2* не наблюдается у мух с ингибированной JNK в ИПК (Karpas et al., 2009).

1.4. Использование *Drosophila. melanogaster* для изучения метаболических нарушений

Известно множество факторов, провоцирующих развитие сахарного диабета 2 типа (СД2), как генетических (60-80%), так и экологических, однако остается неясным, как они влияют на начало и раннее развитие заболевания (Alvarez-Rendon, et al., 2018). Дрозофила может служить хорошим модельным объектом для изучения этого вопроса, благодаря глубокой гомологии путей углеводно-жирового обмена у насекомых и млекопитающих (Murillo-Maldonado, Riesgo-Escovar, 2017; Alvarez-Rendon et al., 2018).

Два ключевых пептида, инсулин (DILPs у дрозофилы) и глюкагон (адипокинетический гормон (АКГ) у дрозофилы) отвечают за регуляцию углеводно-жирового обмена (Rajan, Perrimon, 2013). Несмотря на то, что скелетные мышцы, печень и жировая ткань позвоночных считаются основными тканями-мишенями инсулина, имеются доказательства того, что инсулин выполняет важные физиологические функции и в других тканях, таких как мозг, поджелудочная железа, сердце и эндотелиальные клетки. Практически то же самое относится и к беспозвоночным в эквивалентных тканях: было показано, что действие инсулиноподобных пептидов влияет на физиологию многих органов, включая мозг (Alvarez-Rendon et al., 2018).

У *Drosophila* ИПК подобны панкреатическим β -клеткам позвоночных, а клетки *CC* могут секретировать АКГ, выполняя роль панкреатических α -клеток (Kim, Rulifson, 2004). В то время как DILPs способствуют всасыванию сахара тканями из гемолимфы у мух и его хранению в виде гликогена и жиров, АКГ секретируется в условиях голодания для расщепления гликогена и жиров (Kim, Rulifson, 2004).

1.4.1. Структура и функции жирового тела насекомых

У насекомых жировое тело является полифункциональным органом, играющим важную роль в жизнедеятельности организма. В некотором отношении его можно считать эквивалентом печени и белой жировой ткани млекопитающих (Arrese, Soulages, 2010; Sheng et al., 2019). Известно, что жировое тело имеет мезодермальное происхождение, и в отличие от печени позвоночных имеет рыхлую структуру, состоит из тонких слоев или нитей, обычно толщиной в одну или две клетки, или небольших узелков, подвешенных в гемоцеле (Roma et al., 2012). Жировое тело обычно представлено двумя формами: центральным или висцеральным слоем, расположенным вокруг органов, и периферическим слоем, расположенным под стенками тела (Roma et al., 2012). Как и у млекопитающих, жировое тело у мух включает нейтральные липиды, главным образом ТАГ, которые

запасаются во внутриклеточных органеллах – липидных каплях (Hildebrandt et al., 2011), принимающих участие в регуляции клеточного метаболизма (Jarc, Petan, 2019). Известно, что жировое тело претерпевает трансформации в течение всего жизненного цикла насекомого: формируется во время эмбриогенеза, растет и ремоделируется на стадиях личинки и куколки, включая запрограммированную клеточную гибель, диссоциацию клеток жирового тела личинок и образование тканей жирового тела имаго, а также регулирует процессы размножения на стадии имаго. Все эти преобразования и регуляция координируются с помощью гормональных и пищевых сигналов (Sheng et al., 2019).

Физиологическая роль жирового тела разнообразна. Помимо выполнения функций накопления питательных веществ и поглощения продуктов обмена, жировое тело отвечает за синтез вителлогенинов, белков, играющих важную роль в размножении насекомых, которые включаются в ооциты в ходе вителлогенеза (Roma et al., 2012), координирует системный рост, контролируя секрецию DILPs из ИПК в ответ на пищевую стимуляцию аминокислотами (Geminard et al., 2009), синтезирует ферменты деградации ЮГ (Груntenко, 2008).

Таким образом, жировое тело является важным органом, участвующим в интеграции реакции организма на различные внутренние и внешние сигналы (Arrese, Soulages, 2010).

1.4.2. Регуляция метаболизма углеводов у *Drosophila melanogaster*

Двумя основными формами циркулирующих углеводов в гемолимфе дрозофилы являются глюкоза и трегалоза – дисахарид, состоящий из двух молекул α -глюкозы, связанных 1,1-гликозидной связью. Глюкозу насекомое получает из внешних источников (с пищей), тогда как трегалоза синтезируется в жировом теле, циркулирует в гемолимфе и поглощается мышечными тканями. Функция глюкозы консервативна: первичный источник энергии, как у мух, так и у млекопитающих, в то время как трегалоза служит главным

источником энергии для полета насекомых, стабилизатором белка во время стресса (осмотического, окислительного, термического), а также криопротектором, позволяющего гемолимфе насекомых оставаться жидкой в условиях отрицательных температур (Mattila, Nietakangas, 2017).

В геноме дрозофилы присутствуют два предполагаемых транспортера трегалозы (TRET1-1 и TRET1-2). Экспрессия TRET1-1 в жировом теле предполагает, что он высвобождает трегалозу из него в гемолимфу и опосредует поглощение трегалозы другими тканями (Kanamori et al., 2010; Volkenhoff et al., 2015). Было показано, что TRET1-1 транспортирует трегалозу через плазматическую мембрану (Kanamori et al., 2010). TRET1-2 эволюционно возник путем дубликации, и присутствует только у дрозофилы и ее ближайших родственников (Рисунок 6) (Volkenhoff et al., 2015).

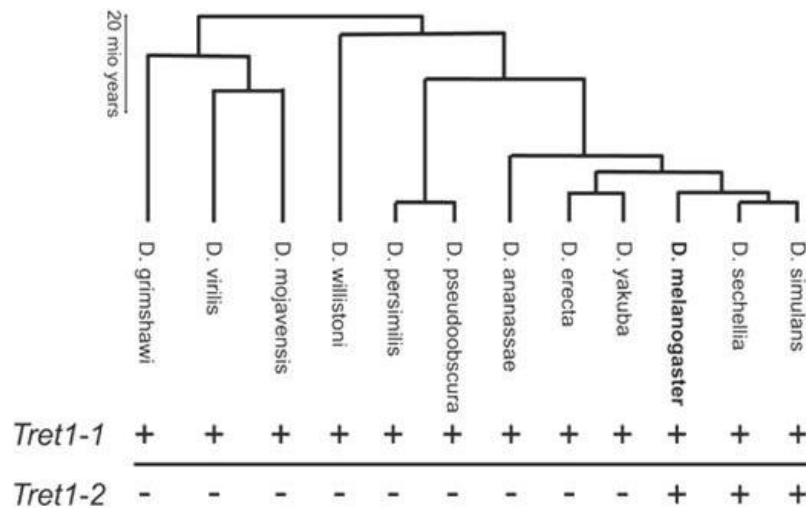


Рисунок 6. Дубликация Tret1-2 у нескольких видов дрозофилы (Volkenhoff et al., 2015).

Все ферментативные активности синтеза и гидролиза трегалозы (Рисунок 7) в жировом теле обеспечиваются трегалоза-6-фосфат (ТребР) синтазой (Tps1) и трегалазой (Treh), соответственно (Yasugi et al., 2017).

Tps1 имеет два функционально различных каталитических домена (Elbein et al., 2003). N-концевой домен трегалоза-6-фосфат-синтазы (TPS) продуцирует ТребР из глюкоза-6-фосфата (Glu-6P) и уридиндифосфатглюкозы (UDP-глюкоза). С-концевой домен ТребР-фосфатазы (TPP) дефосфорилирует

TreBP с образованием трегалозы (Rulifson et al., 2002; Kim S. K., Rulifson, 2004; Edgar, 2006; Grönke et al., 2007; Nietakangas, Cohen, 2009).

Treh синтезируется в двух разных формах посредством альтернативного сплайсинга: секреторируемой форме (sTreh) с сигнальным пептидом на N-конце и цитоплазматической форме (cTreh) без сигнального пептида (Matsuda et al., 2015).

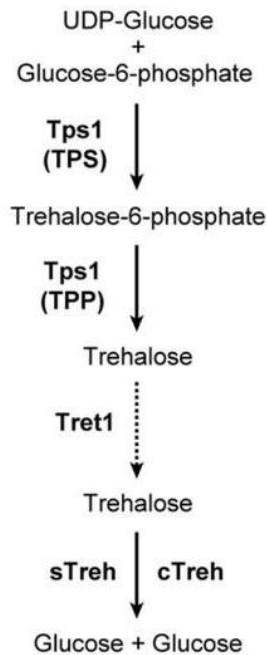


Рисунок 7. Схема метаболического пути синтеза и гидролиза трегалозы (Matsuda et al., 2015).

У млекопитающих главную роль в гомеостатической регуляции уровней циркулирующего сахара играют инсулин и инсулинозависимое поглощение глюкозы. Секреция инсулина β -клетками поджелудочной железы чрезвычайно чувствительна к уровням циркулирующей глюкозы, определяемым переносчиками глюкозы GLUT1 и / или GLUT2 на поверхности β -клеток (Joost, Thorens, 2001; Rutter et al., 2015). Затем циркулирующий инсулин способствует поглощению глюкозы периферическими тканями посредством активации инсулинозависимого транспортера сахара, GLUT4 (Lizunov, et al., 2005; Huang, Czech, 2007).

У дрозофилы подобные процессы, вероятно, возникают при высвобождении DILPs в ответ на высокие уровни циркулирующего сахара, и высвобождении АКГ в ответ на низкий уровень циркулирующего сахара (Colombani et al., 2003; Kim, Rulifson, 2004; Haselton et al., 2010). В отличие от циркулирующей глюкозы, уровни трегалозы незначительно реагируют на пищевые сахара несмотря на то, что экспрессия *Tps1* повышается при питании с высоким содержанием сахара (Ugrankar et al., 2015). Более того, многие гены, которые влияют на уровни циркулирующей глюкозы, не влияют на уровни трегалозы, предполагая, что уровни глюкозы и трегалозы регулируются независимо (Ugrankar et al., 2015). Тем не менее, содержание трегалозы (как и глюкозы) значительно меняются в ходе развития дрозофилы. Содержание трегалозы постепенно повышается во время эмбрионального развития и достигает максимальных уровней у личинок (Matsuda et al., 2015). Во время метаморфоза содержание трегалозы постепенно снижается, что может отражать высокое потребление или снижение синтеза трегалозы на стадии куколки (Matilla, Nietakangas, 2017).

Мутанты *Tps1*, как и мутанты *Treh*, жизнеспособны на стадии личинки, но чувствительны к голоданию и летальны на стадии имаго (Yoshida et al., 2016). Кроме того, уровни циркулирующей глюкозы значительно снижены у мутантов *Tps1* и *Treh*, что свидетельствует о том, что циркуляция трегалозы необходима для поддержания системных уровней глюкозы (Matilla, Nietakangas, 2017).

1.4.3. Регуляция метаболизма липидов у *Drosophila melanogaster*

Метаболизм липидов включает синтез, поглощение, а также хранение жирных кислот и их преобразование для получения энергии. Подобно позвоночным, дрозофила может получать жирные кислоты с пищей, обычно в форме ТАГ, расщепляющихся на свободные жирные кислоты и моноглицериды (МАГ) липазами, включающими липазу Magro, гомологичную липазе LipA у млекопитающих (Trinh, Boulianne, 2013). Далее

в просвете кишечника свободные жирные кислоты и МАГ могут поглощаться энтероцитами (клетками эпителия кишечника) и ковертироваться в диглицериды, которые транспортируются в гемолимфу мухи в виде липопротеинов (также называемых липофоринами) для использования в производстве энергии или для формирования жировых запасов. Там он связывает рецепторы липофорина, сходные с рецептором липопротеинов низкой плотности млекопитающих, и высвобождает диглицериды, которые конвертируются в ТАГ и запасаются во внутриклеточных липидных каплях. Было проведено много исследований компонентов липидных капель, которые показали, что липофорины ответственны за регуляцию накопления и мобилизации ТАГ и что протеом липидной капли консервативен между мухами и млекопитающими. Например, когда либо мухам, либо млекопитающим требуется мобилизация липидов для выработки энергии, липолитические сигналы воздействуют на компоненты липидных капель, чтобы позволить липазам получить доступ к запасаемым ТАГ в капле (Trinh, Boulianne, 2013).

В отличие от позвоночных, у мух частицы липопротеинов присутствуют в гемолимфе и не требуют синтеза *de novo*. Другой точкой расхождения между дрозофилой и млекопитающими является преобладание нейтральных липидов в кровообращении: диглицериды у мух против ТАГ у млекопитающих. Неизвестно, дает ли какой-либо глицерид явное преимущество (Trinh, Boulianne, 2013).

У млекопитающих жирные кислоты, высвобождаемые при расщеплении ТАГ, попадают в кровь и поглощаются тканями организма. У мух продукты распада ТАГ транспортируются в виде диглицеридов липофоринами, которые попадают в ткани, где липопротеинлипаза катализирует высвобождение жирных кислот из диглицеридов. Затем жирные кислоты могут поглощаться клеткой, чтобы подвергаться β -окислению и выработке энергии (Heier, Kühnlein, 2018).

В условиях низкого содержания питательных веществ мобилизация жиров запускается высвобождением АКГ из клеток *CC*, приводя к активации его рецептора (АКГР), стимулирующего липолиз и расщепление гликогена (Kim, Rulifson, 2004; Lee, Park, 2004). АКГ является ключевым регулятором энергетического обмена и мобилизует углеводы и липиды из жирового тела насекомых во время полета и прыжков, способствуя поддержанию баланса углеводов и липидов (Zhang et al., 2019). Хотя многие компоненты пути АКГ были впервые охарактеризованы у других насекомых, исследования на дрозофиле являются фундаментальными для определения генетической основы этого процесса (Heier, Kühnlein, 2018).

Известно, что *Akh*-мутанты подвержены ожирению (Gáliková et al., 2015, Gáliková, 2017), тогда как сверхэкспрессия *Akh* приводит к резкому сокращению жировых запасов (Gáliková et al., 2015). АКГ является гипергликемическим гормоном, а гликоген считается основным источником трегалозы, однако в отличие от глюкагона АКГ не индуцирует катаболизм гликогена, наоборот, уровни гликогена повышаются при избыточной экспрессии *Akh* (Gáliková et al., 2015; Gáliková, 2017). Роль АКГ в стресс-реакции в настоящее время активно изучают (Bednářová et al., 2013, 2015; Kodrík et al., 2015).

Стоит отметить, что путь АКГ пересекается с несколькими другими эндокринными осями, включая сигнальный каскад И/ИФР (Heier, Kühnlein, 2018). Также известно, что dFOXO играет центральную роль в метаболизме ТАГ. Снижение активности сигнального каскада И/ИФР, способствующее стимуляции транскрипционной активности dFOXO, изменяет экспрессию широкого спектра метаболических генов. Так, dFOXO способствует экспрессии липаз и усиливает ферментативный распад ТАГ. Следовательно, транскрипционная репрессия липолиза с помощью оси DILPs / dFOXO является критической ткане-автономной детерминантой метаболизма ТАГ в жировом теле дрозофилы (Heier, Kühnlein, 2018).

Показано участие ЮГ в регуляции метаболизма ТАГ: мухи, у которых отсутствуют клетки СА, имеют пониженные уровни ТАГ, тогда как обработка аналогом ЮГ метопреном повышает уровни ТАГ у имаго (Baumann et al., 2013; Kang et al., 2017). Показано участие экдизона в регуляции метаболизма ТАГ на различных стадиях развития дрозофилы (Kang et al., 2017). Рецептор экдизона (EcR) необходим для формирования полового диморфизма в пищевом поведении и накопления ТАГ у зрелых самок (Sieber, Spradling, 2015). EcR также регулирует запасание липидов во время оогенеза (Sieber, Spradling, 2015). Кроме того, было показано, что передача сигнала экдизона способствует запасанию ТАГ во время метаморфоза. Следует отметить, что экдизон является антагонистом сигнального каскада И/ИФР, способствуя ядерной транслокации dFOXO. И наоборот, сигнальный каскад И/ИФР ингибирует передачу сигналов экдизона, контролируя экспрессию dFOXO (Heier, Kühnlein, 2018).

Заключение к обзору литературы

Высоко эволюционно консервативный инсулиновый сигнальный каскад у *Drosophila* имеет весьма сходную, но при этом более простую регуляцию, а также аналогичные млекопитающим пути углеводно-жирового обмена, что делает данный объект удобной моделью для изучения механизмов этой регуляции. Ключевыми компонентами каскада являются гены *dInR*, *dilp6* и *dfoxo*: dInR, активированный инсулиноподобными пептидами, запускает киназный каскад, который приводит к ингибированию dFOXO, регулятора транскрипции инсулинового каскада. Что же касается DILP6, то ряд работ свидетельствует о его возможной роли в малоизученной до сих пор петле обратной связи инсулинового каскада, заключающейся в передаче сигнала от dFOXO на ИПК мозга и синтезируемые в них DILP2, 3 и 5, и далее – на инсулиноподобный рецептор dInR. Изучению элементов этой петли и ее роли в ответе организма насекомого на стресс и посвящена настоящая работа. В ней рассматривается роль генов-участников данной петли в регуляции углеводно-

жирового метаболизма в нормальных условиях и под действием кратковременного теплового стресса, а также – участие в этой регуляции гормонов насекомых, являющихся элементами нейроэндокринной стресс-реакции: ювенильного гормона, 20-гидроксиэкдизона, октопамина и дофамина.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Линии мух, использованные в работе

Мухи содержались на стандартной питательной среде (агар-агар, 7 г/л; кукурузная мука, 50 г/л; сухие дрожжи, 18 г/л; сахар, 40 г/л) в инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 25°C, относительной влажности 50%, 12-часовом световом дне. Для экспериментов мух синхронизировали по вылету (собирались мухи, вылетевшие в течение 3-4 часа).

В работе были использованы четыре линии *D. melanogaster*: линия *dilp6⁴¹* с делецией, захватывающей 3'-область гена *phl* (гомолог онкогена *raf* дрозофилы) и 5'-область гена *dilp6*, включающая первый экзон и часть первого интрона (Slaidina et al., 2009; Grönke et al., 2010; Rauschenbach et al., 2017); линия *foxo^{BG01018}*, несущая вставку Р-элемента [GT1] в 5'-области гена *dfoxo* (Dionne et al., 2006); в качестве контрольных: линия *w¹¹¹⁸*, на основании которой получены мутантные линии *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}*, и линия дикого типа Canton-S. Все линии получены из Bloomington Drosophila Stock Center (Таблица 2).

Таблица 2. Линии *Drosophila melanogaster*, использованные в работе

Линия	Номер линии	Генотип
Canton-S	64349	дикий тип
<i>w¹¹¹⁸</i>	3605	лабораторная линия с мутацией <i>w</i>
<i>dilp6⁴¹</i>	30885	Df(1)Ilp6[41] y[*] Ilp6[41] Raf[41] w[1118]
<i>foxo^{BG01018}</i>	12530	w[1118] P{w[+mGT]=GT1}foxo[BG01018]

Важно отметить, что мутантная линия *w¹¹¹⁸* имеет приблизительно 30% от уровней ДА и 80% от уровней ОА линии дикого типа Canton-S (Sitaraman et al., 2008), исходя из поставленных нами задач по изучению влияния стресс-связанных гормонов (ОА, ДА, 20Э и ЮГ) на биохимические параметры мы использовали линию дикого типа Canton-S в качестве контрольной.

По данным Flybase, первый и третий экзоны гена *dilp6* некодирующие, таким образом, удаление первого экзона, вероятно, не должно влиять на структуру пептида. Также мутантные мухи *dilp6⁴¹* имеют такие же дефекты роста и развития, как мухи, у которых экспрессия *dilp6* снижена с помощью РНК-интерференции (Slaidina et al., 2009). Поэтому полагают, что *dilp6⁴¹* является сильной гипоморфной мутацией, сходной по проявлению с нефункциональным (нуль) аллелем (Slaidina et al., 2009). Также показано, что делеция 3'-области гена *phl* у личинок линии *dilp6⁴¹* приводит к задержке роста и развития, но не оказывает влияния на метаболизм (Slaidina et al., 2009).

Мутантная линия dFOXO (*foxo^{BG01018}*) несет транспозонную вставку, BG01018, примерно в 130 нуклеотидных парах выше сайта инициации транскрипции гена *dfoxo*, что приводит к гипофункциональной мутации (Jünger et al., 2003; Kramer et al., 2003; Puig et al., 2003; Dionne et al., 2006).

В работе использовались самки 3-6 суточного возраста.

2.2. Условия стрессирования

При изучении влияния теплового стресса на молекулярные и биохимические параметры, мух стрессировали помещением стеклянных плоскодонных пробирок (20 x 100 мм) с ними в суховоздушный термостат (Redline by Binder, Германия) при температуре 38°C (длительность экспозиции приведена в соответствующих разделах главы «Результаты». 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.

2.3. Молекулярные методы

2.3.1. Выделение РНК, синтез кДНК методом обратной транскрипции

Мух (в количестве 15 мух на образец) гомогенизировали в 100 мкл раствора TRIzol Reagent (Sigma, США), согласно инструкции фирмы производителя. Образцы инкубировали 5-10 минут при комнатной температуре, после чего центрифугировали в течение 5 мин при 9300 g. Супернатант переносили в чистую пробирку, добавляли 20 мкл хлороформа, перемешивали вручную и инкубировали образцы 5 минут при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали 15 мин при 13400 g. Верхнюю водную фазу с РНК переносили в чистую пробирку. Добавляли 50 мкл 100% изопропанола, перемешивали вручную и инкубировали образцы 5-10 минут при комнатной температуре. РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 13400 g. Убирали верхнюю фазу, осадок РНК промывали добавлением 100 мкл 76% этанола с дальнейшим центрифугированием в течение 5 мин при 5400 g, после удаления спирта, образцы подсушивали при комнатной температуре и растворяли в 50 мкл воды. Измерение концентрации выделенной РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 340 нм.

По матрице РНК синтезировали одноцепочечную кДНК с использованием RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Все процедуры выполняли согласно протоколу производителя используемого набора. Полученную кДНК хранили при -20°C.

2.3.2. Количественная ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

ПЦР-РВ проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл с использованием набора реагентов в присутствии SYBR-Green I (Синтол, Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) в следующих условиях: первоначальная денатурация – 3 минуты при 95°C, с последующей амплификацией (45 циклов) по 15 секунд при 95°C, 15 секунд при 56°C и 15 секунд при 62°C; после циклической амплификации – элонгация 5 секунд при

78°C. Для стандартизации количества кДНК матрицы ОТ-кПЦР проводилась с праймерами к референсному гену – *Act5C* (*Actin 5C*). Высокая стабильность *Act5C* при тепловом стрессе у дрозофилы показана в работе Понтон с соавторами (Ponton et al., 2011). Эффективность реакций оценивали с помощью построения калибровочных кривых, используя один и тот же образец кДНК и пять последовательных 5-кратных разведений. Для каждой исследованной группы использовали три биологических образца, для каждого образца реакцию проводили в трех повторах. Для каждой пары праймеров использовали отрицательный контроль без добавления кДНК.

Последовательности праймеров, используемых для определения относительного уровня экспрессии генов, приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Последовательности праймеров, использованные в работе.

Название гена	Длина ампликона (bp)	Forward/Reverse	Последовательность нуклеотидов (5'-3')	Tm (°C)	Источник
<i>dfoxo</i>	196	F	GCCTAGATCACTTTCCCGAG	53	Gruntenko et al., 2016
		R	GTCAGCTCATCCGCCATTGT	55	
<i>dilp6</i>	149	F	CACGGAATACGAACAGAGACG	55	Еремина и др, 2019
		R	TCGGTTACGTTCTGCAAGTC	55	
<i>dInR</i>	123	F	TGAGCATGTGGAGCACATCAAGATG	59	Okamoto et al., 2013
		R	CGTAGGAGATTTTCTCGTTGGCTG	58	
<i>Treh</i>	141	F	GAAAATGCTGTCTCTCTCGCTC	56	Karpova et al., 2019
		R	ATTCTTGCGGTGCTGTA	56	
<i>Act5C</i>	90	F	GCGCCCTTACTCTTTCACCA	58	Guio et al., 2014
		R	ATGTCACGGACGATTTACCG	55	

Синтез праймеров выполнен ООО «Биоссет» (Новосибирск).

2.4. Иммуногистохимический анализ локализации инсулиноподобных пептидов DILP2 и DILP3, инсулиноподобного рецептора (dInR) и транскрипционного фактора dFOXO

Иммуногистохимический анализ DILP2 и DILP3 проводился в ИПК мозга *D. melanogaster* согласно методике, описанной Веевстра с соавторами (Veenstra et al., 2008). Анализ dInR в яичниках и СА – по методике Раушенбах с соавторами (Rauschenbach et al., 2014), анализ dFOXO в жировом теле – по

методике Грунтенко с соавторами (Gruntenko et al., 2012). Мозг выделяли в растворе 0,9% фосфатного буфера, яичники и провентрикулос (промежуточный клапан пищеварительного тракта) с комплексом *СС/СА* и жировое тело выделяли в 4% растворе параформальдегида в натрий-фосфатном буфере (PBS) pH 7,4 под стереомикроскопом Leica ES2 и фиксировали все ткани в 4% растворе параформальдегида в натрий-фосфатном буфере (PBS) pH 7,4 течение 2 часов в при комнатной температуре. Далее трижды отмывали (3x10 мин) в чистом PBS и трижды (3x10 мин) – в PBS с добавлением 0,05% тритона X-100, после чего инкубировали ткани в блокирующем буфере (PBS, содержащий 0,05% Tween 20 и 10% normal goat serum – PBST) в течение 3 часов при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при 4°C, инкубацию с вторичными антителами – в течение 5 часов при комнатной температуре. После инкубации с первичными и вторичными антителами образцы отмывали в PBST (3x10 мин), затем в PBS (2x15 мин). После чего препараты заключали с использованием среды Vectashield mounting medium, содержащей 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) (Vector Laboratories Inc., США), и анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Axioskop 2 (Zeiss) 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. Список использованных в анализе первичных и вторичных антител представлен в Таблице 4.

2.5. Экспериментальное изменение уровня гормонов

2.5.1. Кормление 20-гидроксиэкдизоном

В подопытных сериях мух помещали в пробирки, дно и 1 см стенок которых покрывали фильтровальной бумагой, смоченной 0,5 мл питательного раствора, содержащего 5% сахара, 2% дрожжей и 30 мкг 1% раствора 20Э в

96-% этиловом спирте (Sigma, США). В контрольных сериях в раствор сахара и дрожжей добавляли чистый 96-% этиловый спирт.

Таблица 4. Характеристика первичных и вторичных антител, использованных в работе.

Антитела	Тип	Каталожный номер	Разведение	Производитель
Первичные антитела				
Анти-Инсулиновый рецептор (α -субъединица, клон 83-7)	Мыши моноклональные	МАВ1138	1:20	Millipore Corporation, USA
Анти – DILP2	Кролика поликлональные	Изготовлены на заказ и предоставлены проф. Веенстрой (Франция)	1:1000	Research Genetics (Huntsville, Ala., USA)
Анти – DILP3	Кролика поликлональные	Изготовлены на заказ и предоставлены проф. Веенстрой (Франция)	1:1000	GL Biochem (Shanghai, China)
Анти-dFOXO	Кролика поликлональные	САС-THU-A-DFOXO,	1:400	Cosmo Bio, Japan
Вторичные антитела				
Alexa Fluor 488 goat anti mouse	Козы поликлональные	A11029	1:400	Invitrogen, USA
Cy3 goat anti rabbit	Козы поликлональные	ab6939	1:400	Abcam, UK
Cy5 goat anti mouse	Козы поликлональные	ab97037	1:400	Abcam, UK

2.5.2. Аппликация ювенильного гормона

На брюшко мухи, подвергнутой наркозу диэтиловым эфиром, наносили 0,5 мкл 0,2% раствора ЮГ-III (Sigma, США) в ацетоне по методу Ричарда (Richard et al., 2001). Контрольной группе апплицировали чистый ацетон. Далее мух переносили в пробирки со стандартным кормом и помещали в

термостат на 25°C, через 14 часов проводили эксперимент (действие ЮГ-III на биохимические параметры снижается через 18 часов (Раушенбах и др., 2004)).

2.5.3. Экспериментальное повышение уровней октопамина и дофамина

Содержание дофамина повышали путем кормления мух его предшественником, L-3,4-дигидроксифенилаланином (L-ДОФА), что, как было показано ранее, приводит у имаго *D. melanogaster* к двукратному увеличению уровня дофамина (Раушенбах и др., 2006). Содержание октопамина повышали кормлением мух непосредственно самим гормоном. Дно и 1 см стенок пробирок покрывали фильтровальной бумагой, смоченной 0,5 мл питательного раствора, содержащего 5% сахара, 2% дрожжей и 0,5% ОА (Sigma, США) или 0,5% L-ДОФА (предшественника дофамина) (Sigma, США) по методу, описанному Раушенбах с соавторами (Раушенбах и др., 2006). В контрольных сериях ОА, L-ДОФА в раствор не добавляли.

2.6. Биохимические методы

2.6.1. Измерение содержания углеводов

Уровень углеводов оценивали с использованием модифицированного спектрофотометрического метода, описанного Массельманом с соавторами (Musselman et al., 2011). Ферментативный подход к определению содержания глюкозы основан на использовании гексокиназной реакции, сопряженной с реакцией, катализируемой глюкозо-6-фосфат дегидрогеназой. Принцип метода заключается в том, что гексокиназа катализирует реакцию между глюкозой и аденозинтрифосфатом с образованием глюкозо-6-фосфата и аденозиндифосфата. В присутствии NAD фермент – глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа – окисляет глюкозо-6-фосфат до 6-фосфоглюконата. Увеличение концентрации NADH прямо пропорционально концентрации глюкозы и может быть измерено спектрофотометрически при 340 нм.

Декапитированные (во избежание влияния глазного пигмента на результаты измерений) тела мух (3 мухи на образец, по 8-20 образцов в каждой

исследованной группе) гомогенизировали на льду в 300 мкл гипотонического буфера для лизиса (20 мМ HEPES, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ EGTA) и переносили (по 100 мкл на 3 эппендорфа каждого образца) в охлажденные микроцентрифужные пробирки для последующего центрифугирования – 10 минут при 13400 g. Затем отбирали супернатант для дальнейшего определения уровней метаболитов. Уровень глюкозы измеряли, используя Glucose (HK) AssayKit, SLBL3912V (Sigma, США). Трегалозу конвертировали в глюкозу путем добавления 0,5 мкл трегалазы (Sigma, США) с последующим определением количества глюкозы в образце. Измерения проводили с использованием спектрофотометра Smart Spec Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 340 нм.

2.6.2. Измерение содержания общих липидов

Для измерения концентрации общих липидов мы модифицировали метод, описанный Ван Генделем (Van Handel, 1985). Принцип метода основан на том, что реакция требует двойной связи углерод-углерод; концентрированная серная кислота вступает в реакцию с ненасыщенными липидами с образованием карбониевого аниона; фосфорная кислота вступает в реакцию с ванилином с образованием фосфатного эфира, приводя к увеличению реакционной способности карбонильной группы; карбониевый анион вступает в реакцию с карбонильной группой фосфованилина с образованием стабильного окрашенного комплекса (Knight et al., 1972).

Декапитированные тела мух (1 муха на образец, по 16-20 образцов в каждой исследованной группе) гомогенизировали на льду в 100 мкл раствора хлороформ-метанола (1:1), после чего образцы интенсивно встряхивали в течение 10 минут, далее 50 мкл супернатанта пипеткой переносили в чистые пробирки и нагревали на микротермостате М-208 (Бис-Н, Россия) при 90°C до испарения растворителя, затем добавляли 10 мкл 95% H₂SO₄ и нагревали образцы при той же температуре в течение 2 минут. Далее образцы охлаждали на льду и добавляли фосфованилиновый реагент: 85% H₃PO₄+ 6% раствор

ванилина (4:1) до отметки 1 мл. Инкубировали 15 минут при комнатной температуре до проявления розового окрашивания, стабильного в течение 1 часа. Измерения проводили с использованием спектрофотометра Smart Spec Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 525 нм.

2.7. Анализ капиллярного питания

Измерение скорости потребления корма проводили при помощи метода, описанного Джа с соавторами (Ja et al, 2007), и модифицированного Вильямсом с соавторами (Williams et al., 2014). Для обеспечения мухам влажной среды мы использовали стеклянные плоскодонные пробирки (20 x 100 мм), содержащие 1% агарозу (столбик 5 см в высоту) и помещенные в микроцентрифужные пробирки объемом 50 мл, с добавлением 7 мл воды. Стеклянную капиллярную трубку (10x90 мм, Narishige, Япония) заполняли 20 мкл жидкого корма, содержащего 5% сахара и 5% дрожжевого экстракта (Biospringer, Франция). Пять самок помещали в пробирку, отверстие пробирки закрывали губчатой пробкой, капиллярную трубку вводили в нее сверху через усеченный пластиковый наконечник объемом до 10 мкл и пластиковый наконечник до 200 мкл для фиксации (Рисунок 8).

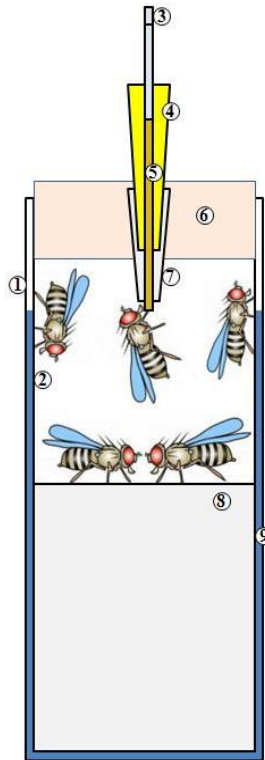


Рисунок 8. Схематическое изображение метода анализа капиллярного питания.

1. – центрифужная пробирка 50 мл; 2. – стеклянная плоскодонная пробирка 2х9 см; 3. – растительное масло (0,1 мкл); 4. – пластиковый наконечник 200 мкл; 5. – жидкий корм (20 мкл); 6. – губчатая пробка; 7. – усеченный пластиковый наконечник 10 мкл; 8. – 1% агар; 9. – вода (7 мл). *Изображение дрозофилы (Roote, Prokop, 2013).*

Пробирки с мухами содержали в инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 25°C, относительной влажности 50%, 12-часовом световом дне, в течение 24 часов. Начальный и конечный уровень корма в капиллярной трубке был отмечен для определения общего потребления пищи в день. Для снижения испарения корма использовали «пробку» из 0,1 мкл растительного масла в верхней части капилляра (над кормом). Количество испарившегося корма высчитывали по стакану, не содержащему мух. Использовали 9-11 повторов для каждой группы.

2.8. Статистическая обработка результатов

Анализ полученных данных по экспрессии генов проводили методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001). 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} .

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Возрастные изменения локализации инсулиноподобного рецептора у самок *Drosophila melanogaster*

Известно, что у самок *D. melanogaster* титры ЮГ и 20Э значительно изменяются в ходе созревания имаго в течение нескольких суток после вылета (вылупления из куколки) (Грунтенко, 2008; Mirth et al., 2014). Поскольку участие сигнального каскада И/ИФР в регуляции синтеза ЮГ и 20Э у имаго дрозофилы было показано ранее (Richard et al., 2005; Belgacem, Martin, 2007; Rauschenbach et al., 2014), возможно было предположить наличие возрастных изменений уровня экспрессии генов сигнального каскада И/ИФР у имаго дрозофилы. Для корректного выбора возраста объекта в запланированном исследовании мы проверили это предположение и исследовали распределение dInR в органах, синтезирующих ЮГ (*corpus allatum, CA*) и 20Э (фолликулярных клетках яичников) у самок дрозофилы.

На рисунке 9 представлены результаты анализа локализации dInR в клетках *CA* и фолликулярных клетках яичников у только начинающих откладывать яйца 1-суточных самок (Рисунок 9, а) и активно размножающихся 6-суточных самок (Рисунок 9, б). Хорошо видно, что интенсивность свечения зеленого флуорохрома, прямо коррелирующая количеством рецептора, выявляемого при помощи связывания антител с белком dInR, в *CA* и фолликулярных клетках яичников у молодых самок дрозофилы резко превышает таковую у зрелых особей.

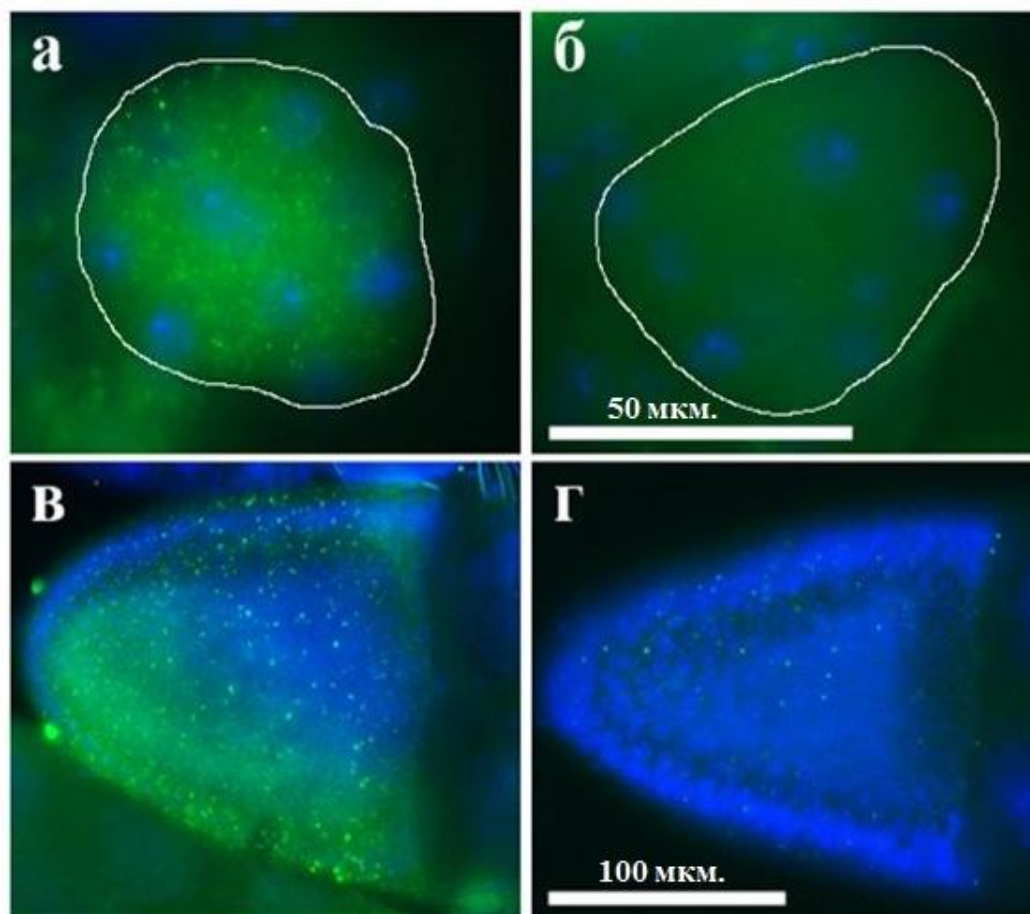


Рисунок 9. Влияние созревания на распределение инсулиноподобного рецептора (dInR) в *corpus allatum* – железе, синтезирующей ювенильный гормон (а, б), и фолликулярных клетках яичника – месте синтеза 20-гидроксиэкдизона (в, г) у самок линии Canton-S *D. melanogaster*. (а, в) – 1-суточные, (б, г) – 6-суточные самки (зеленый сигнал – dInR (окрашивание Cy5), синий сигнал – ядра клеток (окрашивание DAPI)).

3.2. Возрастная динамика плодовитости *Drosophila melanogaster*

Исходя из полученных данных по значительным отличиям молодых самок от зрелых по представленности инсулинового рецептора в яичниках, мы задались вопросом о времени наступления их физиологической зрелости. Чтобы ответить на данный вопрос, мы оценили динамику плодовитости самок линии дикого типа Canton-S. Для эффективного осуществления этой оценки мы разработали высокопроизводительную методику автоматического подсчета взрослых мух при помощи мобильных устройств с использованием приложения SeedCounter. Это приложение получает и анализирует изображения мух, подвергнутых анестезии оксидом азота и размещенных на

стандартном листе бумаги, непосредственно с камеры мобильного устройства. Чтобы убедиться в том, что этот метод обеспечивает надежный подсчет плодовитости, мы подвергли набор из 20 образцов с различным количеством мух – от 8 до 315 – как ручному, так и автоматическому подсчету с использованием двух мобильных устройств под управлением ОС Android с максимальным разрешением камеры: смартфоны Sony Xperia XA и Xiaomi Redmi Note 5. Два способа подсчета, ручной и автоматический (приложением SeedCounter) дали очень похожие результаты, которые представлены в Таблице 5 и свидетельствуют, что разработанный нами метод подсчета численности мух при помощи приложения SeedCounter является эффективным и достаточно точным.

Таблица 5. Количество мух линии дикого типа *Drosophila melanogaster*, подсчитанное ручным способом и с помощью мобильного приложения SeedCounter, установленного на смартфоны Sony Xperia XA и Xiaomi Redmi Note 5. Каждое значение – среднее из 3 тестов.

№	Ручной подсчёт	Sony Xperia XA	Xiaomi Redmi Note 5
1	37	36,67 ± 0,41	37,0 ± 0
2	38	38,50	38,67 ± 0,82
3	40	39,67 ± 0,41	40,00 ± 0,71
4	32	31,67 ± 0,41	33,67 ± 0,41
5	30	30,33 ± 0,41	30,67 ± 0,41
6	11	11,33 ± 0,41	12,0 ± 0,71
7	74	74,0	73,67 ± 0,41
8	71	71,33 ± 0,41	72,0 ± 0
9	325	321,33 ± 7,43	339,0 ± 3,74
10	113	112,67 ± 0,41	114,33 ± 0,41
11	135	134,67 ± 0,41	137,00 ± 1,22
12	28	27,67 ± 0,41	28,0 ± 0
13	41	40,67 ± 0,41	42,67 ± 1,47
14	33	32,33 ± 0,41	33,0 ± 0
15	20	20,0	20,33 ± 0,41
16	8	8,0	8,0 ± 0
17	22	22,0	22,33 ± 0,41
18	22	22,33 ± 0,41	22,33 ± 0,41
19	186	186,33 ± 0,41	187,67 ± 1,08
20	205	203,67 ± 2,27	202,0 ± 1,87

С использованием приложения SeedCounter мы оценили плодовитость *D. melanogaster* в течение 12 дней после вылета и показали, что она растет, начиная с 1 суток после вылета, и достигает максимума на 3 сутки и далее не

претерпевает достоверных изменений. Следовательно, самки могут считаться зрелыми с 3-суточного возраста (Рисунок 10). Все дальнейшие исследования проводились исключительно на зрелых самках (начиная с 3 суточного возраста после вылета имаго).

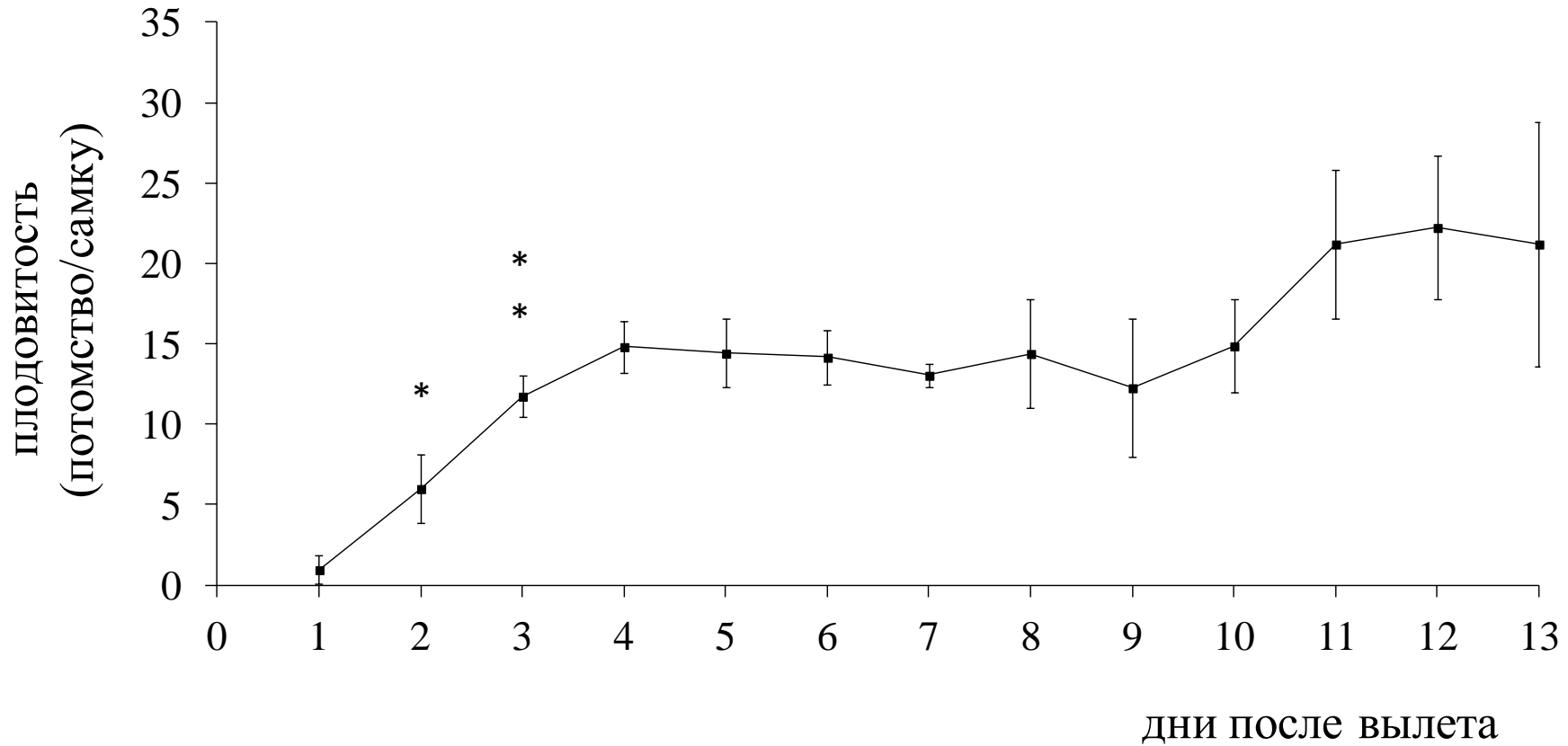


Рисунок 10. Средняя плодовитость самок линии дикого типа Canton-S. Каждое значение среднее из 5-9 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Различия с предыдущим днем – одна звездочка - $p < 0.05$, две – $p < 0.01$.

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

Известно, что сигнальный каскад И/ИФР может принимать участие в контроле реакции организма на стресс (Kannan, Fridel, 2013), но оставалось невыясненным, какие именно гены каскада задействованы в стресс-ответе.

Ранее было показано, что при оксидативном и метаболическом стрессе у дрозофилы происходит транслокация dFOXO в ядра клеток жирового тела (Jünger et al., 2003; Hwangbo et al., 2004), где преимущественно экспрессируется dFOXO (Zheng et al., 2007). Чтобы выяснить, что происходит при кратковременном тепловом стрессе, мы проанализировали локализацию dFOXO в жировом теле у самок линии Canton-S с использованием антител к dFOXO (Cosmo Bio, Япония).

В нормальных условиях (Рисунок 11, а, г) меченый антителом dFOXO локализовался в цитоплазме, и не обнаруживался в ядре. Тепловое воздействие (60 мин, 38°C) приводило к перемещению сигнала, соответствующего локализации dFOXO, в ядро (Рисунок 11, б, д), а спустя час после окончания стрессорного воздействия dFOXO снова определялся в цитоплазме и не определялся – в ядрах клеток жирового тела (Рисунок 11, в, е).

Мы также исследовали возможность участия в ответе на тепловой стресс наиболее хорошо изученных инсулиноподобных пептидов дрозофилы, DILP2 и DILP3, продуцируемых группой из 14 ИПК в мозге имаго (Рисунок 9). Иммуногистохимический анализ их распределения в ИПК был проведен с использованием поликлональных антител против фрагментов DILP2 и DILP3 *D. melanogaster*, любезно предоставленных профессором Веенстрой (Франция).

Анализ, проведенный с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope 2 (Рисунок 12 а, в) не обнаружил заметного влияния теплового стресса на содержание инсулиноподобного пептида DILP2.

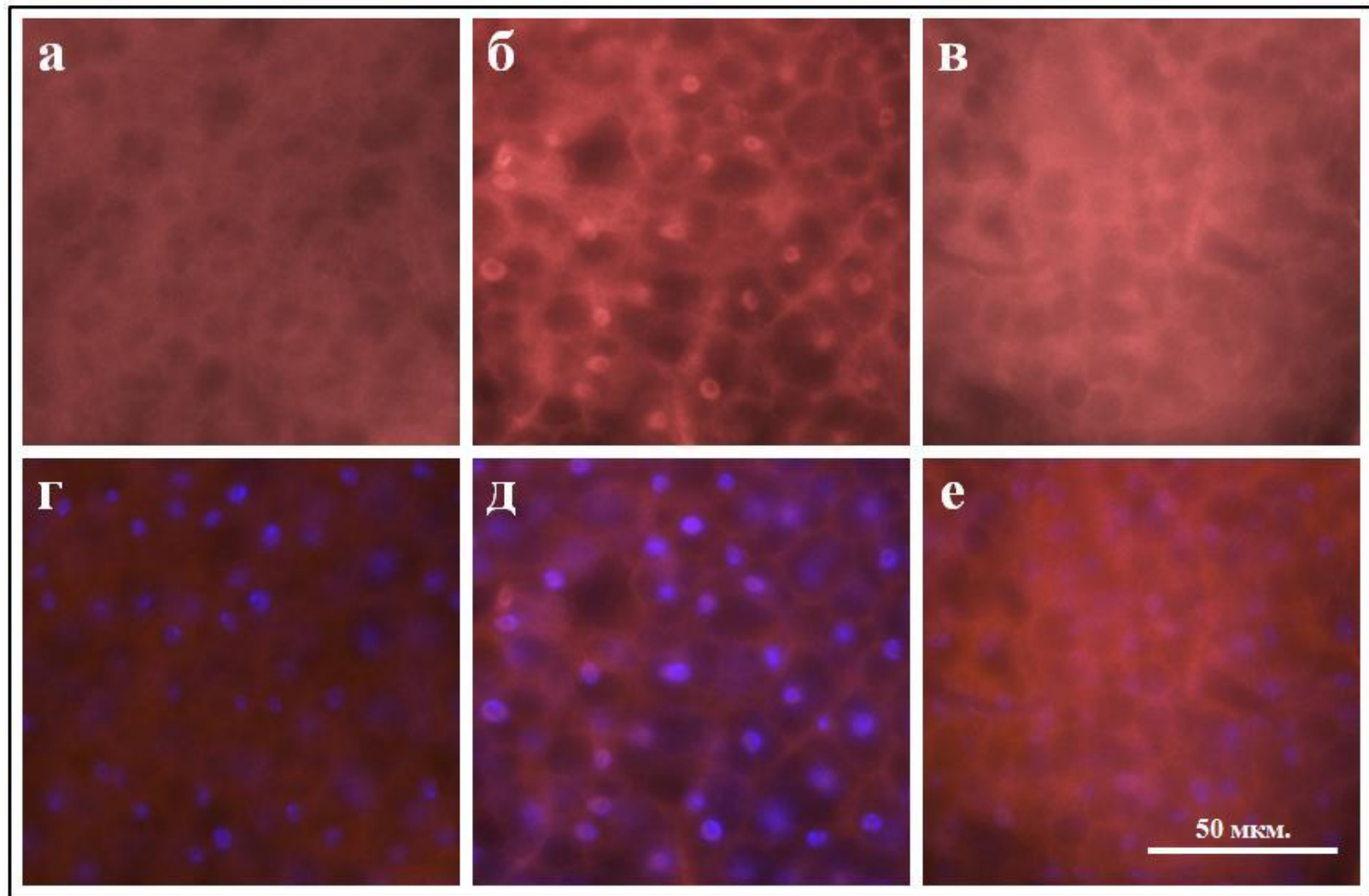


Рисунок 11. Локализация dFOXO в жировом теле у 6-суточных самок Canton-S (а) в нормальных условиях, (б) после 60 минут теплового стресса (38°C), (в) спустя 60 минут после стресса. (а-в) – Красный сигнал – локализация dFOXO (окрашивание Cy3), (г-е) – Синий сигнал – ядра клеток (окрашивание DAPI).

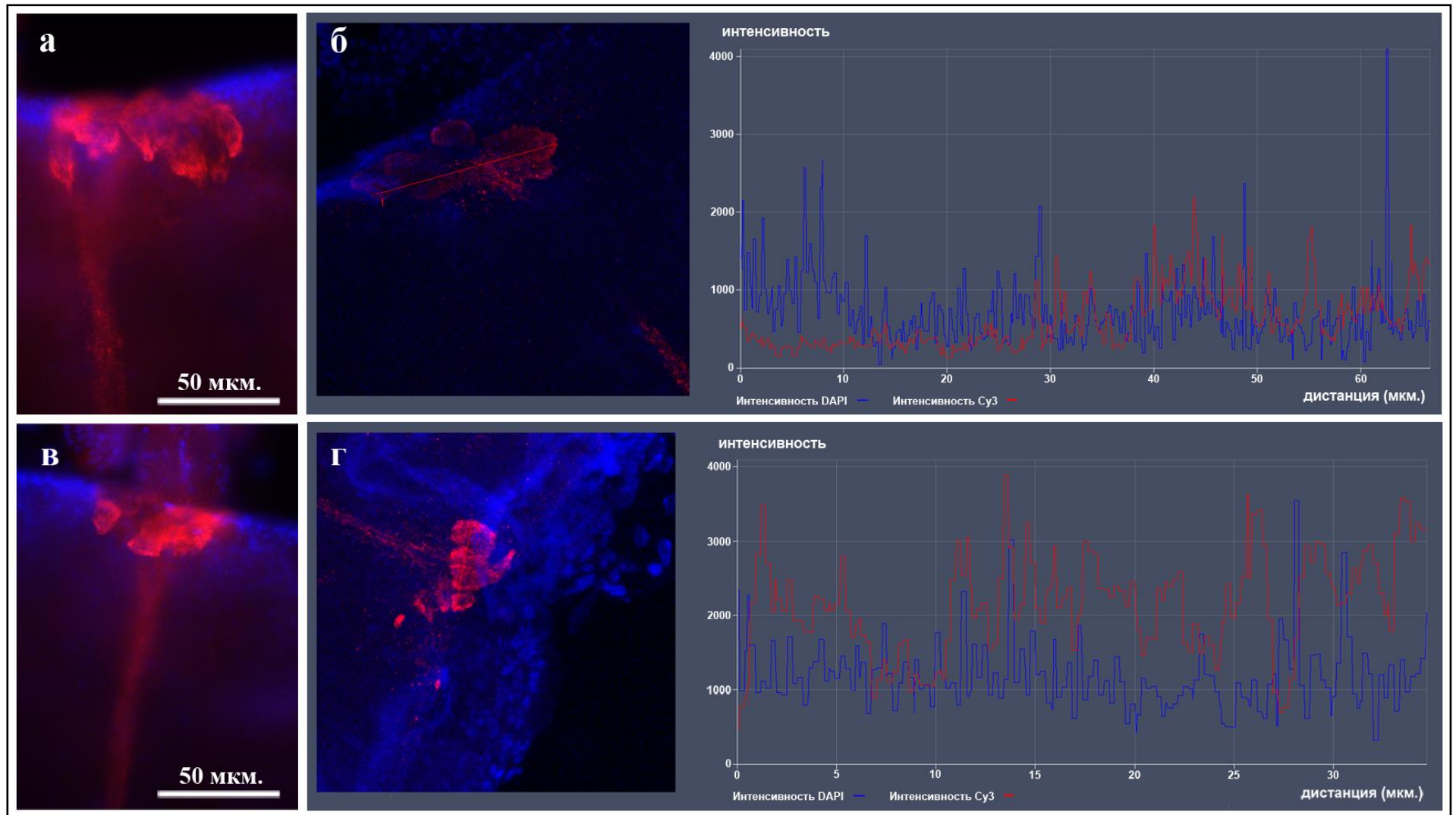


Рисунок 12. Локализация инсулиноподобных пептидов DILP2 (а, в) и DILP3 (б, г) в ИПК у 6-суточных самок линии Canton-S *D. melanogaster* в нормальных условиях (а, б) и после теплового стресса (38°C, 60 минут) (в, г). Красный сигнал – DILP2- и DILP3 (окрашивание Cy3), синий сигнал – ядра клеток (окрашивание DAPI). Изображение получено с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope 2 (а, в) и конфокального микроскопа LSM 510 META с численными показателями интенсивности свечения Cy3 и DAPI (б, г).

По-видимому, DILP2 не принимает участия в ответе организма дрозофилы на тепловой стресс, либо ему для ответа требуется больше времени.

В то же время аналогичный анализ распределения DILP3 выявил явное его усиление под воздействием теплового стресса, и далее мы оценили интенсивность этого усиления, используя конфокальный микроскоп LSM 510 META (Рисунок 12, б, г). Очевидно, что после 60-минутного теплового стресса (38°C) интенсивность мечения антителами DILP3 заметно усиливается: уровень красного сигнала, соответствующего DILP3-иммунореактивности, в стрессированном образце (Рисунок 12, г) повышен вдвое по сравнению с контрольным (Рисунок 12, б), в отличие от синего сигнала, соответствующего DAPI-окрашиванию ядер.

Таким образом, наши результаты показали, что компоненты сигнального каскада И/ИФР – инсулиноподобный пептид DILP3, инсулиноподобный рецептор dInR и транскрипционный фактор dFOXO участвуют в ответе организма дрозофилы на тепловой стресс.

3.4. Влияние мутаций генов инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6⁴¹*) и транскрипционного фактора dFOXO (*foxo^{BG01018}*) на экспрессию генов *dilp6*, *dfoxo* и *dInR* в нормальных условиях и при тепловом стрессе у самок *Drosophila melanogaster*

Выбор для анализа трех генов - *dInR*, *dilp6* и *dfoxo* основан на их ключевой роли в сигнальном каскаде И/ИФР: dInR, активированный DILPs, синтезируемых инсулин-продуцирующими клетками (ИПК) мозга, запускает киназный каскад, который приводит к ингибированию dFOXO, регулятора транскрипции инсулинового каскада. Что же касается DILP6, то есть ряд работ, свидетельствующих о его роли в малоизученной до сих пор петле обратной связи инсулинового каскада, заключающейся в передаче сигнала от dFOXO на ИПК и синтезируемые там DILPs. Стоит также отметить, что DILP6 – единственный из охарактеризованных на данный момент

инсулиноподобных пептидов дрозофилы (DILP1-8) – является инсулиноподобным фактором роста.

Чтобы выяснить, может ли нарушение упомянутой выше петли обратной связи в регуляции сигнального каскада И/ИФР влиять на его участие в стресс-ответе, мы изучили экспрессию *dilp6*, *dfoxo* и *dInR*, у самок *D. melanogaster*, несущих гипоморфную мутацию *dilp6⁴¹* и гипофункциональную мутацию *foxo^{BG01018}*, в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 90 мин). Количественных изменений в уровне экспрессии мРНК генов *dilp6* и *dInR* у линий *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* при тепловом стрессе выявлено не было, в отличие от линии-предшественника этих мутантов *w¹¹¹⁸*, у которой при тепловом стрессе экспрессия *dilp6* снижалась, а экспрессия *dInR* повышалась (Рисунок 13, $p < 0,05$ для обоих генов). В то же время уровень экспрессии *dfoxo* при тепловом стрессе повышался или имел тенденцию к повышению у всех трех исследованных линий (Рисунок 13, ЛИНИЯ – $F_{(2, 12)} = 3,14$, $p < 0,081$; СТРЕСС – $F_{(1, 12)} = 12,80$, $p < 0,0038$). Стоит отметить, что мутанты *dilp6⁴¹* характеризуются сниженным уровнем экспрессии гена *dilp6* ($p < 0,001$), тогда как уровень экспрессии *dfoxo* у мутантов *foxo^{BG01018}* не отличается от контрольной линии *w¹¹¹⁸* (Рисунок 13). Это позволяет предположить, что описанная ранее потеря функции FOXO у линии *foxo^{BG01018}* (Dionne et al., 2006) связана не со снижением уровня экспрессии соответствующего гена, а с нарушением его структуры.

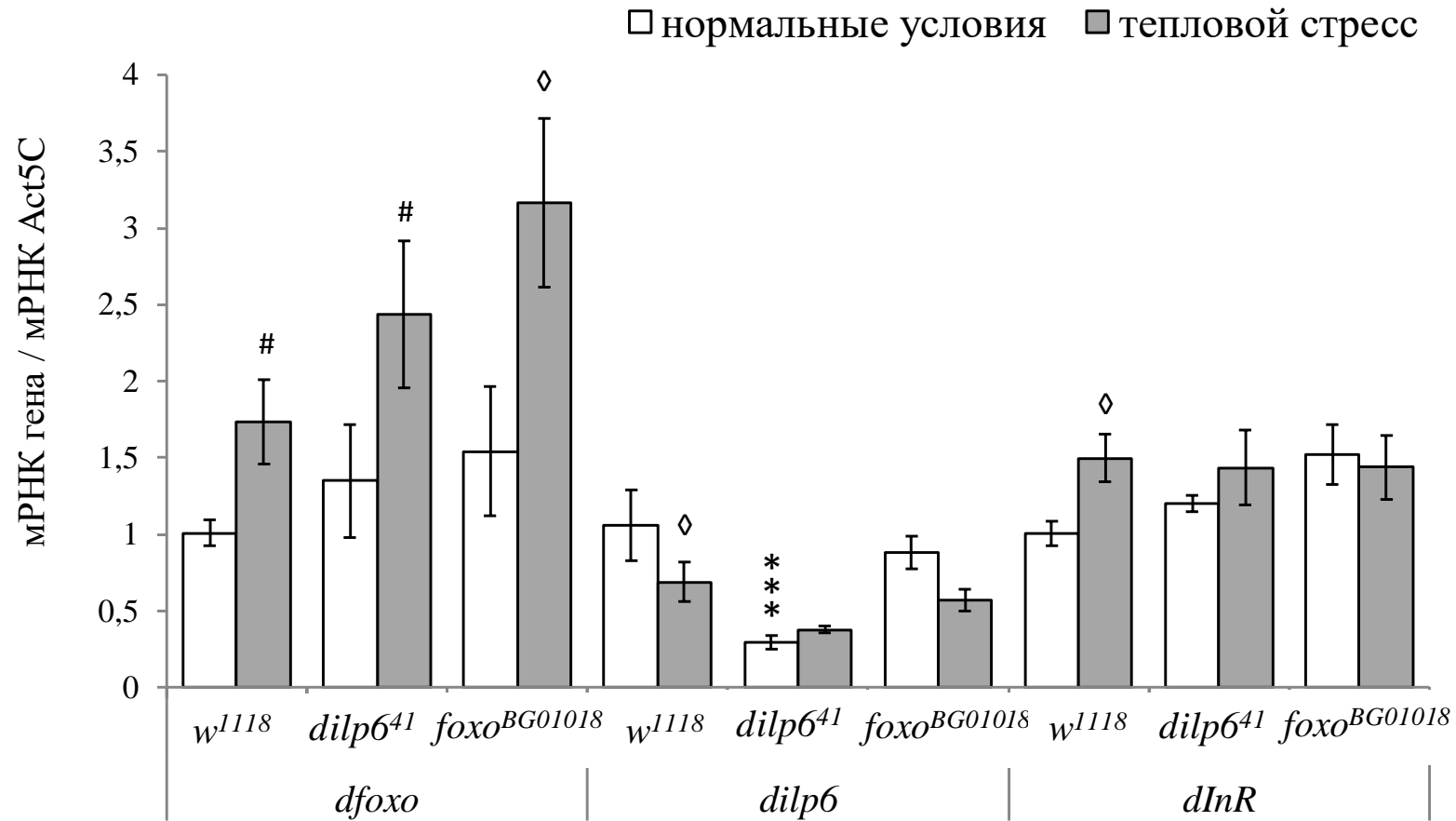


Рисунок 13. Уровень мРНК генов *dfoxo*, *dilp6* и *dInR* у 6-суточных самок *D. melanogaster* линий, несущих мутации генов инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6⁴¹*) и транскрипционного фактора dFOXO (*foxo^{BG01018}*) и исходной линии *w¹¹¹⁸* в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 90 мин). Каждое значение – среднее из 3 биологических повторов. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Звездочки – достоверность отличий мутантных самок с мутацией гена инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6⁴¹*) от самок контрольной линии *w¹¹¹⁸* ($p < 0.001$). Ромб – достоверность отличий стрессированной группы от контрольной того же генотипа ($p < 0.05$), решетка – тенденция к ее отличию ($p < 0.07$).

3.5. Анализ изменений в содержании липидов у самок *Drosophila melanogaster* линии дикого типа Canton-S при тепловом стрессе

Одной из основных функций каскада И/ИФР является регуляция углеводно-жирового метаболизма. Обнаружив изменения в экспрессии трех генов каскада, *dInR*, *dilp6* и *dfoxo* у контрольной линии *w¹¹¹⁸* (Рисунок 13), мы задались вопросом, как эти изменения могут отражаться на содержании липидов и углеводов у самок *D. melanogaster*. Изучение этого вопроса мы начали с определения содержания общих липидов у самок линии дикого типа Canton S при тепловом воздействии различной продолжительности (38°C, 30-150 мин).

На рисунке 14 хорошо видно, что кратковременный тепловой стресс продолжительностью до 2,5 часов не оказывает влияния на уровень общих липидов у самок *D. melanogaster*.

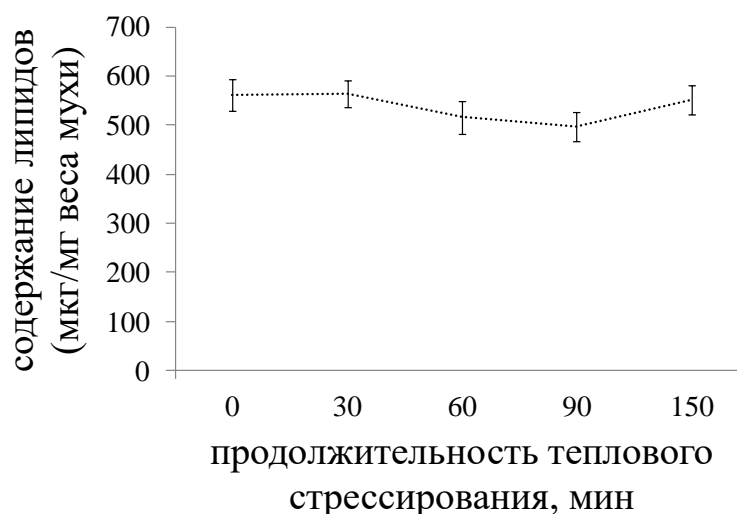


Рисунок 14. Динамика содержания общих липидов у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30-150 мин). Каждое значение – среднее из 10-21 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку.

3.6. Анализ изменений в содержании углеводов и экспрессии гена трегалазы (*Treh*) у самок *Drosophila melanogaster* линии дикого типа Canton-S при тепловом стрессе

Далее мы исследовали характер влияния теплового стресса на

содержание ключевых для метаболизма насекомых углеводов (трегалозы и глюкозы) у самок линии дикого типа Canton-S после теплового воздействия различной продолжительности (38°C, 30-150 мин).

На рисунке 15 хорошо видно, что изменения в содержании глюкозы и трегалозы у дрозофилы наступает уже через 30 минут после начала теплового воздействия ($4,3 \pm 0,1$ для глюкозы и $10,8 \pm 0,3$ для трегалозы, по сравнению с контролем $2,7 \pm 0,1$ и $9,2 \pm 0,2$, соответственно). Также следует отметить исчезновение различий с контрольной группой в уровне обоих сахаров после 150 минут стрессирования. Исходя из полученных данных, для дальнейшего изучения метаболизма углеводов было выбрано 30 минутное время стрессирования.

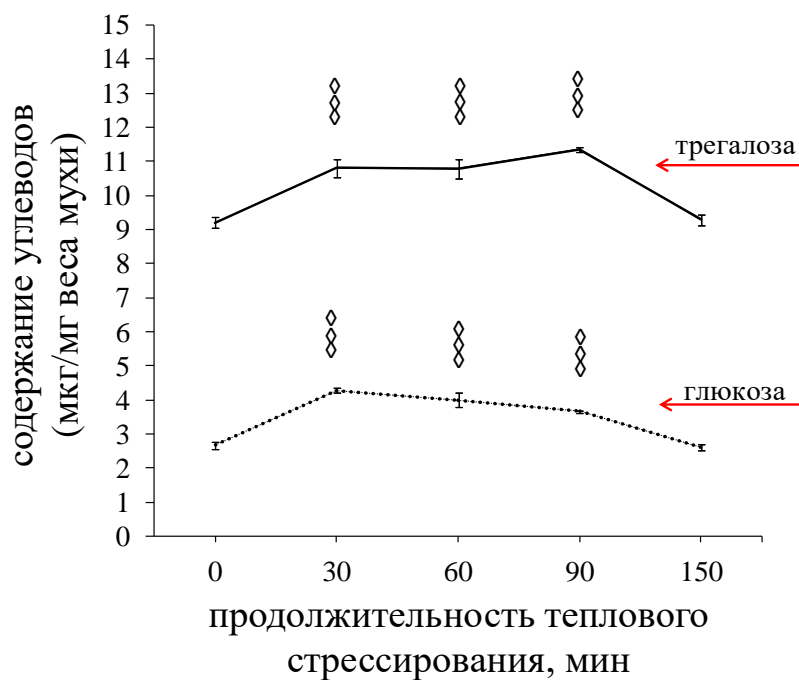


Рисунок 15. Динамика содержания углеводов у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30-150 мин). Глюкоза (сплошная линия), трегалоза (пунктирная линия). Каждое значение – среднее из 9-10 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Ромб – достоверность отличий мух, стрессированных 30, 60 и 90 минут, от контроля (три ромба – $p < 0.001$).

На основании полученных данных мы предположили, что регуляция содержания трегалозы при кратковременном тепловом стрессе может осуществляться ферментом трегалазой, расщепляющим трегалозу. Чтобы подтвердить или опровергнуть это предположение, мы оценили уровень мРНК

гена трегалазы (*Treh*) после 30-минутного воздействия 38°C у самок дрозофилы. Однако данные ОТ-кПЦР не выявили различий между уровнем мРНК *Treh* у контрольных мух ($1,1 \pm 0,1$) и мух, подвергшихся тепловому стрессу ($1,0 \pm 0,1$), что позволяет заключить, что регуляция уровня трегалозы при тепловом стрессе осуществляется не на уровне ее расщепления трегалазой.

3.7. Анализ динамики интенсивности питания у самок *Drosophila melanogaster* линии дикого типа Canton-S после теплового стрессирования

Чтобы определить, может ли изменение уровня циркулирующих сахаров при тепловом стрессе быть обусловлено изменениями в метаболическом поведении, мы изучили динамику интенсивности капиллярного питания у самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в течение 32 часов после кратковременного теплового стрессирования (38°C, 60 мин, Рисунок 16).

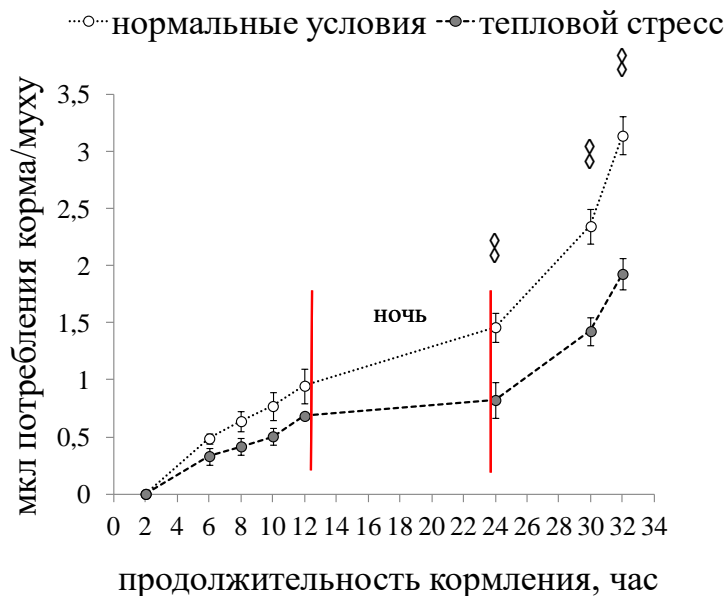


Рисунок 16. Анализ капиллярного питания у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и после теплового стресса (38°C, 60 мин). Каждое значение – среднее из 3 биологических повторов. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Ромб – достоверность различий между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами (два ромба – различия достоверны при $p < 0.01$).

На рисунке 16 хорошо видно, что достоверные различия в метаболическом поведении у дрозофил, подвергшихся тепловому стрессу, наступают спустя 24 часа и сопровождается снижением интенсивности питания ($0,8 \pm 0,2$ и $1,5 \pm 0,1$, соответственно).

3.8. Оценка влияния мутаций генов инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6⁴¹*) и транскрипционного фактора dFOXO (*foxo^{BG01018}*) на содержание углеводов и липидов в нормальных условиях и при тепловом стрессе у самок *Drosophila melanogaster*

Поскольку мы ранее показали изменение ответа генов каскада И/ИФР на тепловой стресс у мутантных линий *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}*, мы решили проверить, оказывают ли влияние эти мутации – гипоморфная мутация гена инсулиноподобного пептида DILP6 и мутация с умеренной потерей функции гена транскрипционного фактора dFOXO – на содержание углеводов и общих липидов в нормальных условиях и при тепловом стрессе.

На рисунке 17 представлены результаты исследования уровня общих липидов у самок *D. melanogaster* с мутациями *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* по сравнению с самками *w¹¹¹⁸*. Очевидно, что у самок обеих мутантных линий уровень общих липидов повышен по сравнению с самками контрольной линии (ЛИНИЯ – $F_{(1, 96)} = 26.78, p \ll 0.0001$).

Как показано выше (Рисунок 14), мы не обнаружили изменений в содержании общих липидов при тепловом стрессе длительностью до 2,5 часов. Однако в работе Клепсателя с соавторами (Klepsatel et al., 2016) на самцах дрозофилы было обнаружено снижение содержания липидов спустя 24 часа после теплового стрессирования, и через сутки же мы наблюдали изменение пищевого поведения мух (Рисунок 19), что навело нас на мысль, что эффект теплового стресса на липидный обмен у самок может быть отсроченным. Чтобы это проверить, мы провели анализ содержания общих липидов спустя 24-часовой период после стрессирования (38°C, 60 мин). Полученные результаты свидетельствуют (Рисунок 17), что содержание липидов у

контрольной линии w^{1118} действительно снижается через сутки после теплового стресса (СТРЕСС – $F_{(1,96)}=141.56, p<0.012$). В то же время у линий с мутациями $dilp6^{41}$ и $foxo^{BG01018}$ в отличие от линии-предшественника w^{1118} содержание липидов не снижается через сутки после теплового стресса (ЛИНИЯ*СТРЕСС – $F_{(2,96)}=0.25, p=0.777$).

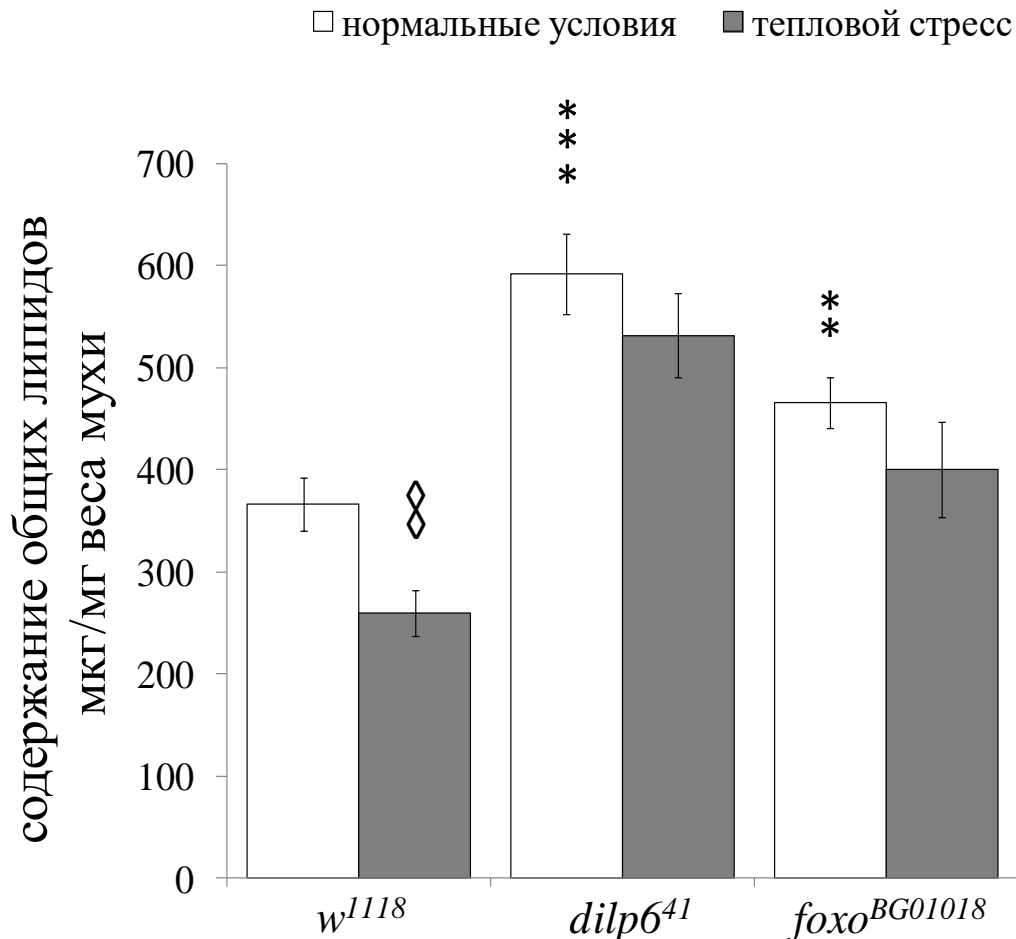


Рисунок 17. Содержание общих липидов у 3-суточных самок *D. melanogaster* линий, несущих мутации генов инсулиноподобного пептида DILP6 ($dilp6^{41}$) и транскрипционного фактора dFOXO ($foxo^{BG01018}$) и линии-предшественника w^{1118} в нормальных условиях и через 24 часа после теплового стресса. Каждое значение – среднее из 10-20 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Звездочка – достоверность отличий мутантных самок от самок линии w^{1118} ; ромб – достоверность различий между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами одного генотипа (два ромба или звездочки – $p<0.01$, три – $p<0.001$).

На рисунке 18 представлены результаты исследования уровня углеводов у самок *D. melanogaster* с мутациями $dilp6^{41}$ и $foxo^{BG01018}$, а также у самок

исходной линии w^{1118} в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30 мин).

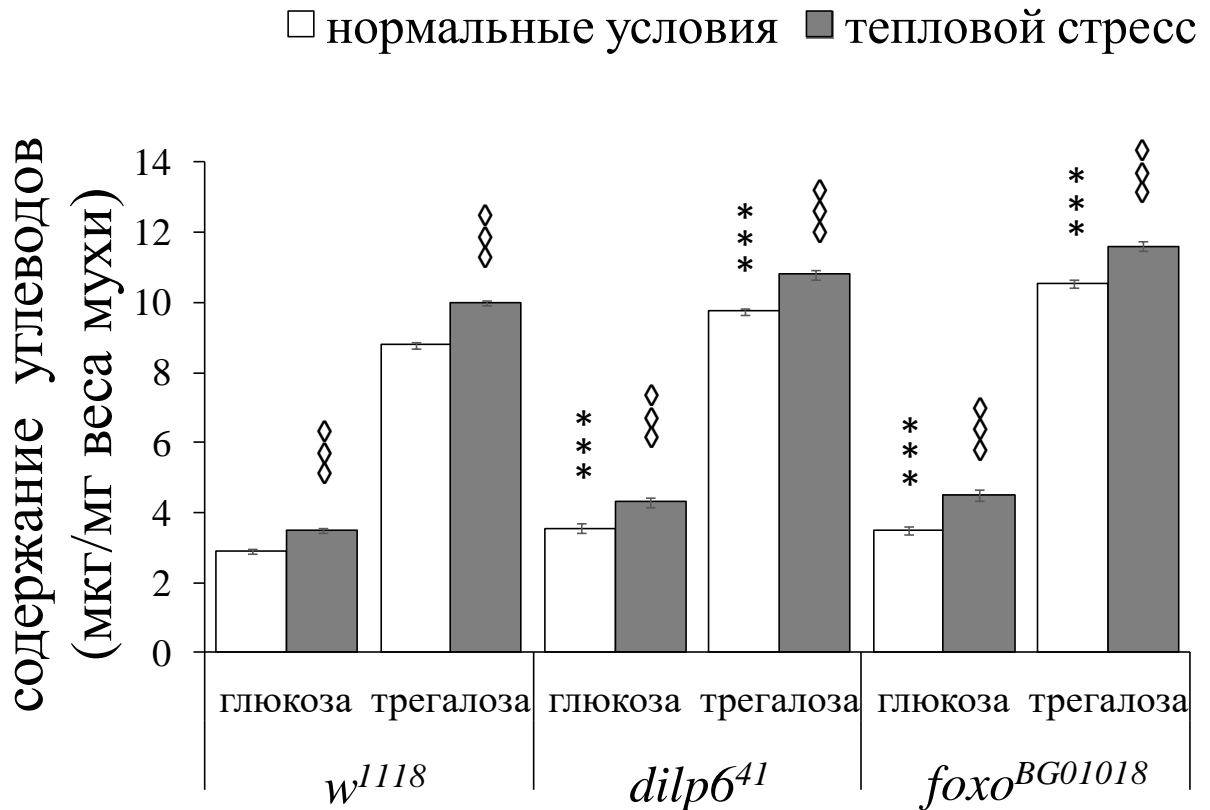


Рисунок 18. Содержание глюкозы и трегалозы у 3-суточных самок *D. melanogaster* линий, несущих мутации генов инсулиноподобного пептида DILP6 ($dilp6^{41}$) и транскрипционного фактора dFOXO ($foxo^{BG01018}$) и исходной линии w^{1118} в нормальных условиях и при тепловом стрессе (30 мин, 38°C). Каждое значение – среднее из 12-22 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Звездочка – достоверность отличий мутантных самок от самок линии w^{1118} ; ромб – достоверность различий между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами одного генотипа (два ромба или звездочки – $p < 0.01$, три – $p < 0.001$).

У линий $dilp6^{41}$ и $foxo^{BG01018}$ уровень как глюкозы ($3,5 \pm 0,1$ и $3,6 \pm 0,1$, соответственно), так и трегалозы ($9,8 \pm 0,2$ и $10,5 \pm 0,1$, соответственно) в нормальных условиях выше по сравнению с самками линии w^{1118} ($2,9 \pm 0,1$ для глюкозы, различия достоверны при $p < 0,01$ для линии $foxo^{BG01018}$ и $p < 0,001$ для линии $dilp6^{41}$, а также $8,8 \pm 0,1$ для трегалозы, различия достоверны при $p < 0,001$ для обеих линий). При тепловом стрессе уровень обоих сахаров, как у самок контрольной линии, так и у мутантных, повышается по сравнению с нормальными условиями ($3,5 \pm 0,1$ для глюкозы и $10,0 \pm 0,1$ для трегалозы у

линии w^{1118} , при $p < 0.001$, также $4,5 \pm 0,1$ для глюкозы и $11,6 \pm 0,2$ для трегалозы у линии $foxo^{BG01018}$, при $p < 0.001$ и $4,3 \pm 0,1$ для глюкозы и $10,8 \pm 0,1$ для трегалозы у линии $dilp6^{41}$, при $p < 0.01$).

3.9. Оценка влияния мутаций генов инсулиноподобного пептида DILP6 ($dilp6^{41}$) и транскрипционного фактора dFOXO ($foxo^{BG01018}$) на интенсивность капиллярного питания у самок *Drosophila melanogaster*

Для того чтобы оценить вклад метаболического поведения в механизм влияния мутаций генов инсулиноподобного пептида DILP6 ($dilp6^{41}$) и транскрипционного фактора dFOXO ($foxo^{BG01018}$) на углеводно-жировой метаболизм, мы оценили интенсивность питания у мух с мутациями этих генов в нормальных условиях и через 24 и 48 часов после теплового стресса (38°C, 60 мин).

На рисунке 19 видно, что повышенное содержание липидов у самок мутантных линий в самом деле может объясняться повышенным потреблением корма по сравнению с самками линии w^{1118} (ЛИНИЯ – $F_{(2, 59)} = 44.40$, $p \ll 0.0001$). В то же время нужно отметить, что интенсивность питания снижается в первые сутки после теплового воздействия по сравнению с нормальными условиями у всех исследованных линий, а у линии $dilp6^{41}$ этот эффект сохраняется в течение двух суток (Рисунок 19, СТРЕСС – $F_{(1, 59)} = 36.09$, $p \ll 0.0001$; ЛИНИЯ*СТРЕСС – $F_{(2, 59)} = 6.28$, $p < 0.0034$; ЛИНИЯ*СТРЕСС*ВРЕМЯ – $F_{(2, 59)} = 1.26$, $p = 0.291$).

Таким образом, можно заключить, что нарушения в работе каскада И/ИФР, вызываемые мутациями $dilp6^{41}$ и $foxo^{BG01018}$, приводят к нарушениям пищевого поведения в нормальных условиях, однако не оказывают существенного эффекта на снижение интенсивности питания после стрессирующего воздействия.

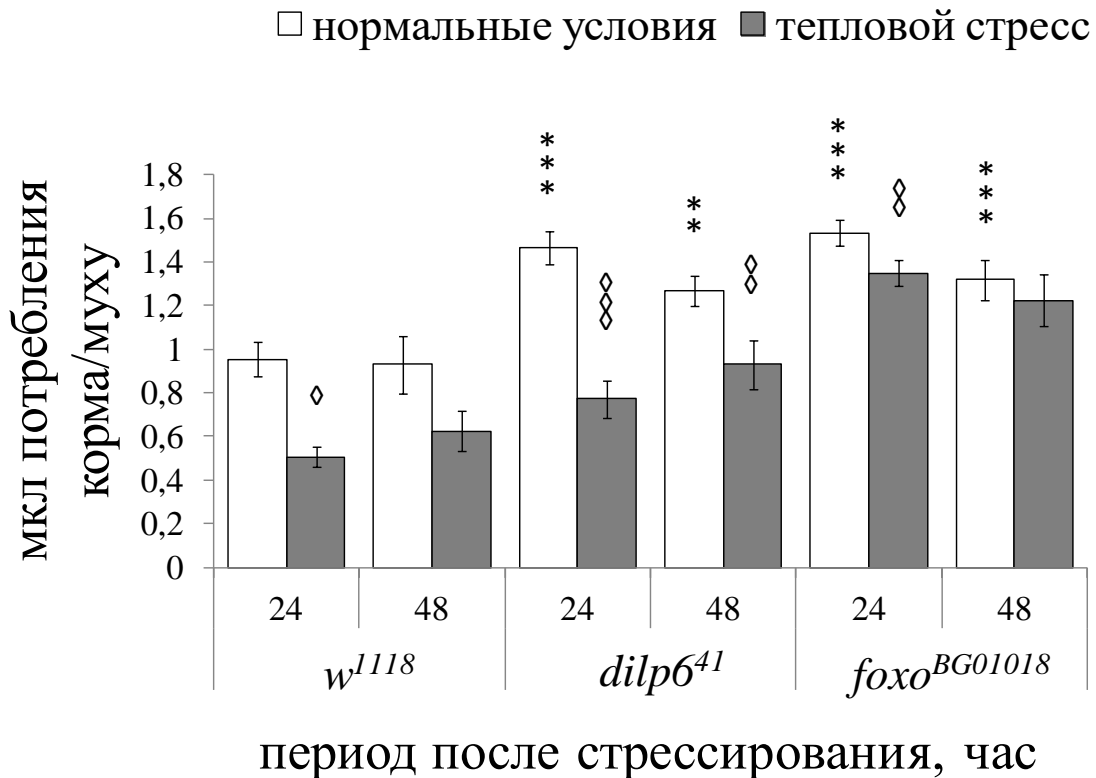


Рисунок 19. Интенсивность капиллярного питания у 3-суточных самок *D. melanogaster* линий, несущих мутации генов инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6⁴¹*) и транскрипционного фактора dFOXO (*foxo^{BG01018}*) и исходной линии *w¹¹¹⁸* в нормальных условиях и после теплового стресса (60 мин, 38°C). Каждое значение – среднее из 9-11 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Звездочка – достоверность отличий мутантных самок от самок линии *w¹¹¹⁸*; ромб – достоверность различий между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами одного генотипа (одна звездочка – $p < 0.05$, две звездочки – $p < 0.01$, три ромба или звездочки – $p < 0.001$).

3.10. Изучение влияния стресс-связанных гормонов на содержание углеводов у самок *Drosophila melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе

Чтобы выяснить, являются ли стресс-связанные гормоны посредниками в передаче стрессорного сигнала на сигнальный каскад И/ИФР, мы изучили влияние каждого из этих гормонов на содержание углеводов у самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S.

Анализ влияния экзогенного повышения уровня ДА на содержание глюкозы и трегалозы проводился на 3-суточных самках линии дикого типа Canton-S *D. melanogaster* в нормальных условиях и при кратковременном

тепловом стрессе (38°C, 30 мин). 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. Результаты представлены на рисунке 20. Хорошо видно, что ДА обладает ингибирующим эффектом по отношению к углеводному обмену: кормление L-ДОФА приводит к снижению уровня обоих углеводов у самок дрозофилы в нормальных условиях, но не препятствует его повышению при тепловом стрессе (ОБРАБОТКА – $F_{(1, 44)} = 26.66$, $p < 0.000006$ и СТРЕСС – $F_{(1, 44)} = 90.69$, $p \ll 0.0001$ для трегалозы и ОБРАБОТКА – $F_{(1, 45)} = 17.12$, $p < 0.00016$ и СТРЕСС – $F_{(1, 45)} = 61.73$, $p \ll 0.0001$ для глюкозы).

На рисунке 21 представлены результаты исследования экзогенного повышения уровня ОА на углеводный обмен у самок *D. melanogaster* линии Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30 мин). Из полученных результатов следует, что кормление ОА приводит к повышению уровня трегалозы, как в нормальных условиях, так и при тепловом стрессе (ОБРАБОТКА – $F_{(1, 97)} = 99.57$, $p \ll 0.0001$ и СТРЕСС – $F_{(1, 97)} = 14.67$, $p < 0.00023$) - и снижению уровня глюкозы как в нормальных условиях, так и при тепловом стрессе (ОБРАБОТКА – $F_{(1, 169)} = 170.9$, $p \ll 0.0001$, СТРЕСС – $F_{(1, 169)} = 11.27$, $p < 0.00098$, ОБРАБОТКА*СТРЕСС – $F_{(1, 169)} = 53.17$, $p \ll 0.0001$).

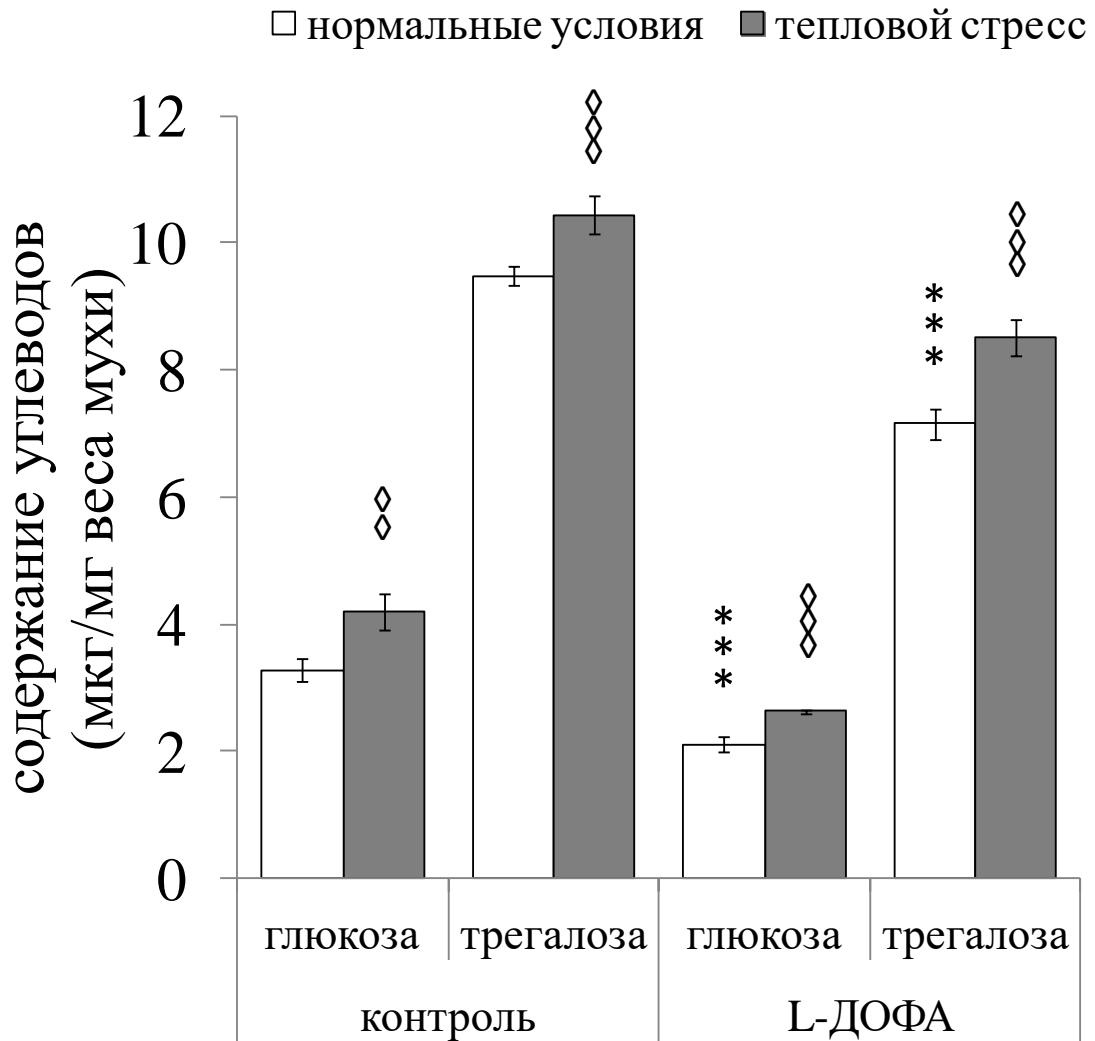


Рисунок 20. Влияние ДА на содержание углеводов у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30 мин). Каждое значение – среднее из 8-16 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Звездочка – достоверность отличий контроля от мух, кормленных ДА, ромб – достоверность различий между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами. 3 ромба или звездочки – различия достоверны при $p < 0.001$, два ромба или звездочки – различия достоверны при $p < 0.01$.

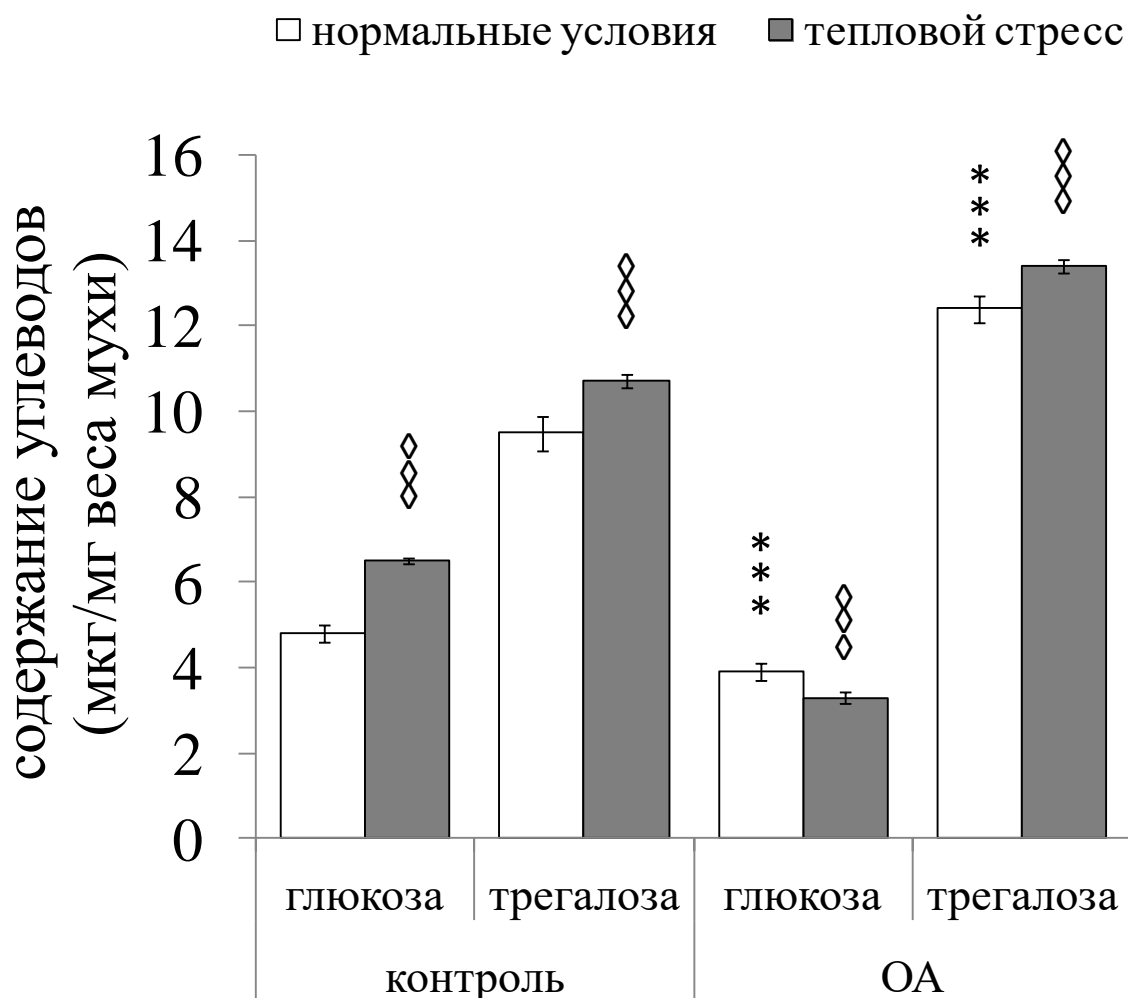


Рисунок 21. Влияние ОА на содержание углеводов у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30 мин) Каждое значение – среднее из 10-15 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Звездочка – достоверность отличий контроля от мух, кормленных ОА, ромб – достоверность различий между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами. 3 ромба или звездочки – различия достоверны при $p < 0.001$.

Результаты изучения влияния аппликации ЮГ на содержание углеводов (глюкозы и трегалозы) у самок линии дикого типа Canton-S *D. melanogaster* в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30 мин) приведены на рисунке 22. Очевидно, что обработка гормоном приводит к снижению уровней обоих углеводов, как в нормальных условиях, так и при тепловом стрессе (ОБРАБОТКА – $F_{(1,60)}=64.66$, $p < 0.0001$ и СТРЕСС – $F_{(1,60)}=10.56$, $p < 0.0019$ для глюкозы и ОБРАБОТКА – $F_{(1,40)}=30.37$, $p < 0.000002$ и СТРЕСС – $F_{(1,40)}=20.25$, $p < 0.00006$ для трегалозы).

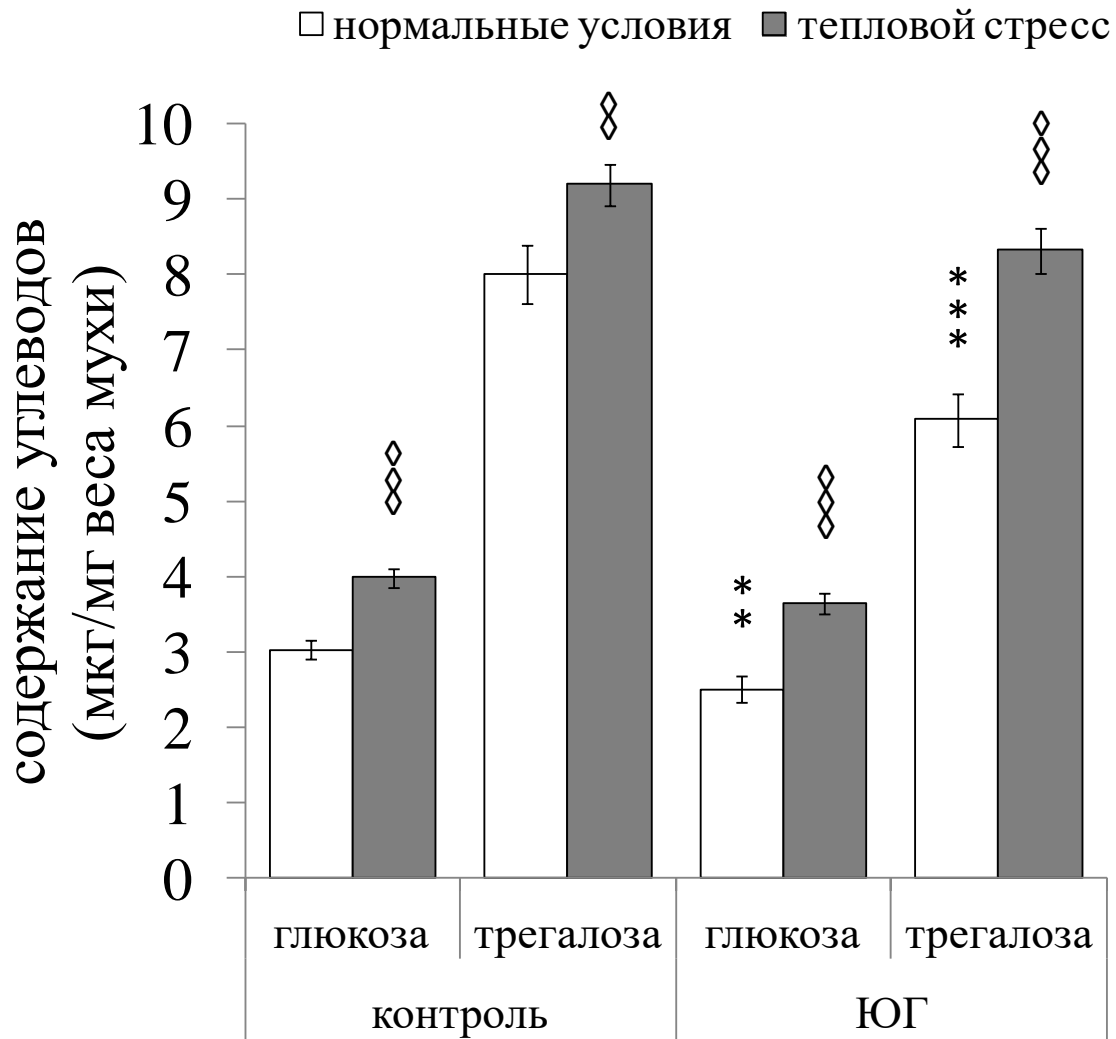


Рисунок 22. Влияние ЮГ на содержание углеводов у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30 мин). Каждое значение – среднее из 8-23 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Звездочка – достоверность отличий контроля от мух, апплицированных ЮГ, ромб – достоверность различий между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами. 3 ромба или звездочки – различия достоверны при $p < 0.001$, два ромба или звездочки – различия достоверны при $p < 0.01$.

На рисунке 23 представлены результаты исследования экзогенного повышения уровня 20Э на уровень углеводов у самок линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30 мин). Показано, что у самок, кормленных 20Э, уровни обоих углеводов повышаются, как в нормальных условиях, так и при тепловом стрессе (ОБРАБОТКА – $F_{(1, 30)}=19.40$, $p < 0.00013$ и СТРЕСС – $F_{(1, 30)}=13.18$, $p < 0.0011$

для глюкозы и ОБРАБОТКА – $F_{(1, 21)}=19.07$, $p<0.00027$ и СТРЕСС – $F_{(1, 21)}=19.54$, $p<0.00024$ для трегалозы).

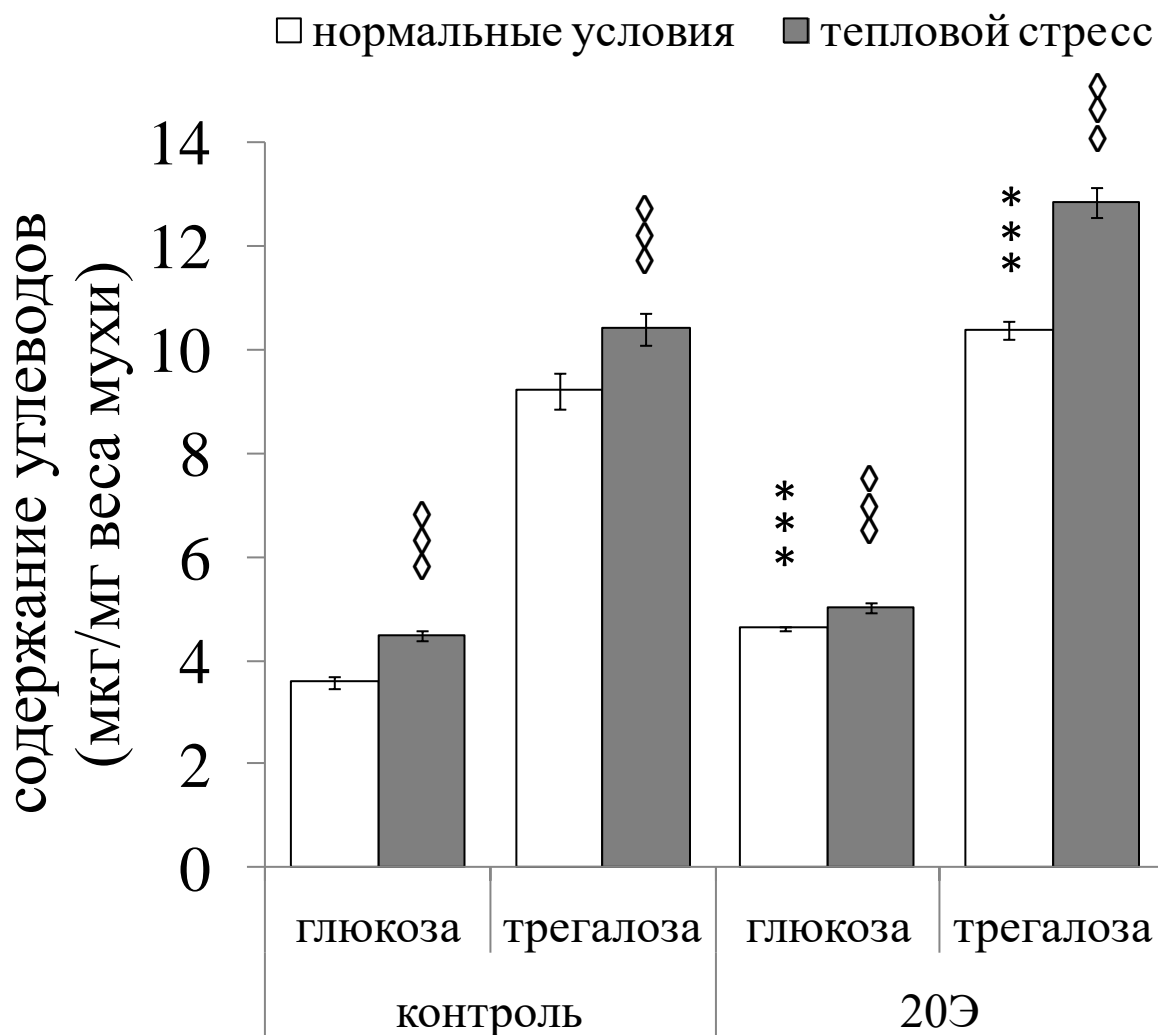


Рисунок 23. Влияние 20Э на содержание углеводов у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа Canton-S в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38°C, 30 мин). Каждое значение – среднее из 5-11 измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Звездочка – достоверность отличий контроля от мух, кормленных 20Э, ромб – достоверность различий между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами. 3 ромба или звездочки – различия достоверны при $p < 0.001$; два ромба или звездочки – различия достоверны при $p < 0.01$.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что инсулиновый сигнальный каскад может взаимодействовать со стресс-связанными гормонами, модулируя их динамику при стрессе, принимая тем самым участие в контроле реакции организма на стресс (Gruntenko, Rauschenbach, 2018), однако оставалось невыясненным, во-первых, какие именно из его звеньев задействованы в стресс-ответе, а во-вторых, как участие инсулинового сигнального каскада в ответе на стрессор сказывается на его способности контролировать углеводно-жировой обмен. Также следует отметить, что ранее участие в стресс-ответе 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 (Рисунок 11), и сопровождается повышением уровня экспрессии его гена (Рисунок 13).

Ранее 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 жировом теле у имаго дрозофилы (Bai 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 жировом теле (Bai et al., 2012). Таким образом, DILP6, по-видимому, связывает dFOXO, жировую ткань и эндокринную функцию мозга (Bai et al., 2012). В то же время Слайдиной с соавторами (Slaidina et al., 2009) было показано, что, хотя повышение экспрессии *dilp6*, наблюдаемое при переходе между личинкой и куколкой, задерживается у dFOXO-нулевых мутантных личинок, уровень транскриптов *dilp6* в конечном итоге достигает промежуточных уровней; то есть, хотя dFOXO требуется для своевременной экспрессии *dilp6* в процессе развития, его активация может быть вызвана также и другими факторами (Slaidina et al., 2009).

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 (см. рис. 11 и 13) уровень экспрессии *dilp6* резко падает (см. рис. 13). 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 от 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 при тепловом стрессе синтез DILP3 повышается (см. рис. 12).

Рассмотрим вероятную схему взаимодействий инсулинового каскада и других гормонов стресса подробнее (Рисунок 24). 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* (см. рис. 12) и *dInR* (см. рис. 13).

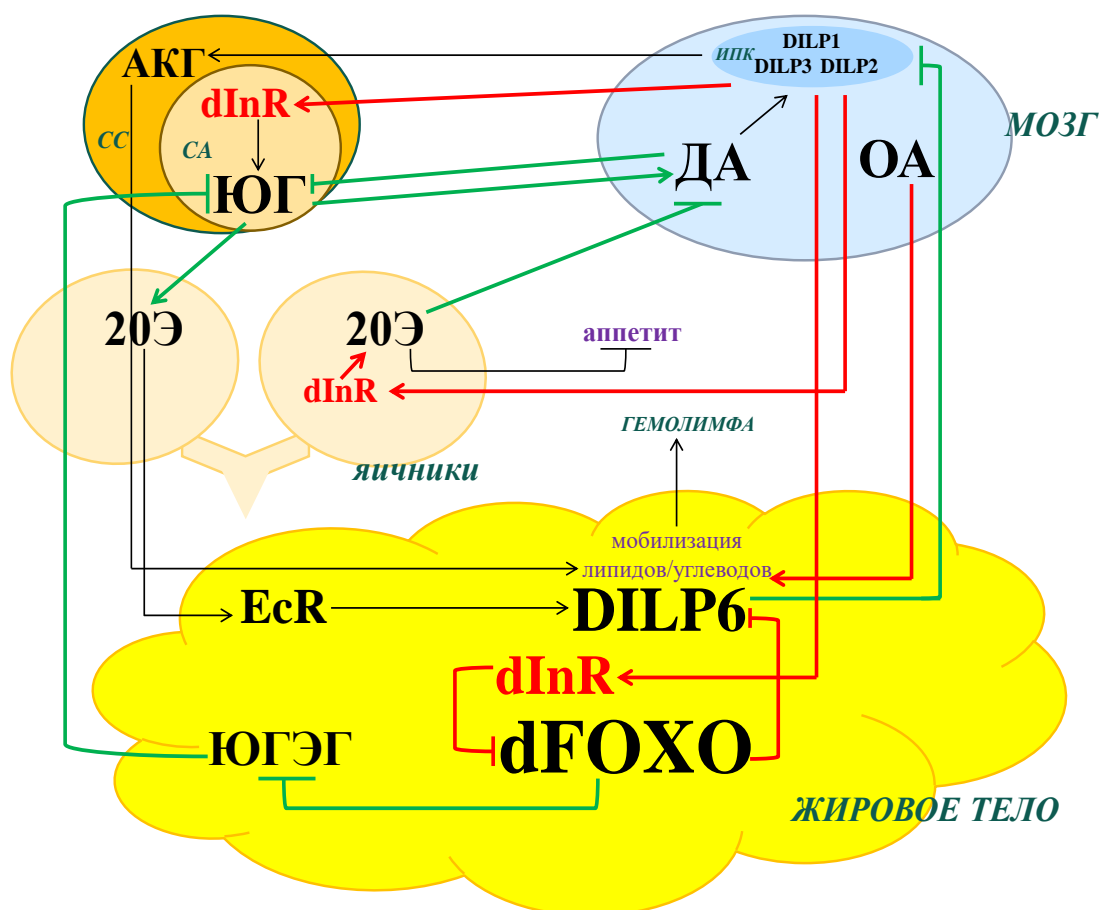


Рисунок 24. Схема взаимодействия ключевых компонентов сигнального каскада И/ИФР и стресс-связанных гормонов дрозофилы. ИПК – инсулин-продуцирующие клетки, DILP – инсулиноподобный пептид, dFOXO – транскрипционный фактор семейства Forkhead box class O, СС – *corpus cardiacum* – нейрогемальный орган, СА – *corpus allatum* – эндокринная железа. АКГ – адипокинетический гормон, ЮГ – ювенильный гормон, ЮГЭГ – ЮГ эпоксидгидраза, 20Э – 20-гидроксиэкдизон, EcR – рецептор экдизона, ДА – дофамин, ОА – октопамин.

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 (Андреевская и др., 2016) было продемонстрировано, что у мутантов *dilp6⁴¹* 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*, тем самым подготавливая клетку к переходу в состояние «готовности» в условиях стресса, подтверждается нашими данными об отсутствии изменения уровня экспрессии *dInR* при тепловом стрессе у мух с мутациями генов *dilp6* и *dfoxo*

в отличие от контрольной линии w^{1118} , которая демонстрирует снижение экспрессии *dilp6* и тенденцию к повышению *dfoxo* в ответ на тепловое воздействие (см. рис. 13).

Известно, что активация dInR напрямую или через ортолог субстратов инсулиновых рецепторов млекопитающих (SHCO), киназный каскад и dAkt/PKB (гомолог протеинкиназы B) ингибирует экспрессию dFOXO и провоцирует его возвращение из ядра в цитоплазму (Gruntenko, Rauschenbach, 2018). Показано, что мутантный dFOXO, лишенный сайтов фосфорилирования dAkt, не реагирует на ингибирование инсулином, остается в ядре и является конститутивно активным (Puig et al., 2003). Наши данные также свидетельствуют о наличии отрицательной обратной связи в инсулиновом сигнальном каскаде, координирующей экспрессию инсулиноподобных пептидов, синтезируемых в ИПК и периферических тканях дрозофилы после окончания стрессирующего воздействия: через 60 минут dFOXO меняет локализацию с ядерной обратно на цитоплазматическую (см. рис. 11).

Следует отметить, что не все гены сигнального каскада И/ИФР принимают участие в ответе на кратковременное тепловое воздействие, что свидетельствует о сложности механизма инсулиновой регуляции ответа организма на неблагоприятные воздействия и необходимости дальнейшего ее изучения. Так, хотя показано, что у имаго дрозофилы транскрипция *dilp6* коррелирует со снижением секреции DILP2, приводящим к снижению передачи инсулинового сигнала при голоде (Zhang, Xi, 2014), при тепловом стрессе количество DILP2 в ИПК (в отличие от DILP3) не меняется (см. рис. 12), что свидетельствует о том, что DILP2 не задействован в ответе на тепловое воздействие.

Таким образом, формируется «малое кольцо» обратной связи к подавлению DILP6 непосредственно повысившимся при тепловом стрессе dFOXO – регуляция сигнального каскада И/ИФР в жировом теле (Рисунок 24). 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 (Рисунок 22).

Повышение DILP6 под действием 20Э через активацию рецептора гормона EcR было продемонстрировано ранее, в том числе – даже в отсутствие dFOXO (Colombani et al., 2005; Slaidina et al., 2009). Коломбани с соавторами (Colombani et al., 2005) показали, что передача сигналов 20Э отрицательно контролирует скорость роста *D. melanogaster*, препятствуя общей передаче сигналов инсулина, включая локализацию dFOXO в жировом теле. Эти результаты согласуются с данными, полученными Вангом и Хоссейном с соавторами (Wang et al., 2010; Hossain et al., 2013) на тутовом шелкопряде *B. mori*, показавшими увеличение транскрипционной активности dFOXO посредством 20Э.

В свою очередь 20Э, подвержен регуляции со стороны ЮГ (см. рис. 3, Gruntenko, Rauschenbach, 2008), синтез которого в СА регулируется инсулиноподобными пептидами через активацию dInR (Belgacem, Martin, 2007, рис. 9). Экспрессия dInR в фолликулярных клетках яичников (см. рис. 9), предполагает существование также прямой регуляции синтеза 20Э инсулиновым каскадом. Уровень ЮГ в организме мухи также регулируется ферментами его деградации, основной из которых, ЮГЭГ, синтезируется в жировом теле (Груntenко, 2008) и, судя по всему, подвергается регуляции со стороны dFOXO: падение активности фермента показано как при голодании Rauschenbach et al., 2004), так и при мутации *dfoxo* (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 (см. рис. 3, Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

Следует отметить, что снижение уровней активности ЮГЭГ и ЮГЭ 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».

Что касается другого стресс-связанного биогенного амина насекомых, ОА, то известно, что он стимулирует активность ИПК путем связывания с рецепторами OAMB, приводя к увеличению cAMP и активации cAMP-зависимой PKA (Crocker et al., 2010). Необходимо отметить, что ОА, единственный из исследованных нами стресс-связанных гормонов, 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.

Еще одним участником стресс ответа насекомых является адипокинетический гормон (АКГ), 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). Локализация клеток, синтезирующих АКГ в СС у дрозофилы, как и у других видов насекомых, была подтверждена иммунореактивностью и генетическими методами с использованием системы UAS/GAL4 (Isabel et al., 2005). Для того чтобы оценить общие физиологические особенности АКГ, Изабель с соавторами (Isabel et al., 2005) удалили эндокринные клетки, синтезирующие нейропептид, и обнаружили снижение уровней трегалозы у личинок и голодающих имаго дрозофилы, так как стимуляция АКГ для мобилизации трегалозы из гликогена в жировом теле стала невозможной. Пост с соавторами (Post et al., 2019) предлагают гипотезу, согласно которой *dilp1* увеличивает продолжительность жизни частично за счет индукции АКГ, который также увеличивается во время репродуктивной диапаузы. Критически важно, что секреция АКГ увеличивает продолжительность жизни *Drosophila* и

индуцирует катаболизм триглицеридов и свободных жирных кислот (Post et al., 2019).

Кроме того, Саджваном с соавторами (Sajwan et al., 2015) было показано, что мутантные мухи по *Akh* были полностью жизнеспособны и по сравнению с контрольными мухами имели значительно сниженные уровни углеводов, циркулирующих в гемолимфе, включая трегалозу, и были устойчивы к голоданию (Sajwan et al., 2015). Обнаружено, что нехватка АКГ приводит у *D. melanogaster* к ожирению и снижению уровня сахара (Galikova et al., 2015; Bednářová et al., 2018).

Как известно, некоторые ИПК у имаго мух являются внутренним сенсором питательных веществ (глюкоза, аминокислоты), и они дополнительно получают регулирующие сигналы от нейронов головного мозга, СС, кишечника и жирового тела (Nässel et al., 2013). Очевидно, что ИПК получают внушительный объем регуляторных сигналов, по крайней мере, от 14 рецепторов, экспрессируемых у имаго дрозофилы. Эти сигналы включают серотонин, ДА, ОА и некоторые нейропептиды. Есть дополнительные факторы, принимающие участие в регуляции функции ИПК у личинок, среди которых АКГ (Nässel, Zandawala, 2020).

Таким образом, очевидно, что регуляция углеводно-жирового обмена насекомых при неблагоприятных внешних воздействиях не исчерпывается изученными нами генами инсулинового каскада и стресс-связанными гормонами ОА, ДА, ЮГ и 20Э, однако они, бесспорно, играют весьма значительную роль в этой регуляции.

Участие dFOXO в регуляции экспрессии *dilp6* у самок дрозофилы при тепловом стрессе подтверждается и нашими результатами по исследованию метаболизма липидов и углеводов у линий, несущих мутации генов инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6⁴¹*) и транскрипционного фактора dFOXO (*foxo^{BG01018}*): мутации обоих генов приводят к изменениям в метаболизме углеводов, аналогичным тем, что мы наблюдали при тепловом

стрессе (повышению содержания трегалозы и глюкозы, см. рис. 18), а также – к повышению содержания общих липидов (см. рис. 17).

Немедленный эффект воздействия кратковременного теплового стресса на содержание углеводов, но не липидов у самок *D. melanogaster* – кратковременный тепловой стресс уже через 30 минут после начала воздействия приводит к повышению циркулирующих уровней как трегалозы (основного сахара насекомых), так и глюкозы (см. рис. 15), возможно объяснить тем, что углеводы характеризуются высокой растворимостью в гемолимфе и, поэтому могут использоваться для поддержания жизнедеятельности организма в быстро изменяющихся условиях среды, в отличие от липидов, используемых организмом в качестве последнего энергетического резерва при длительном голодании или иных продолжительных неблагоприятных воздействиях. Обнаруженное нами отсутствие изменений в экспрессии *Treh*, гена, кодирующего фермент трегалазу, вкуче с однонаправленным изменением содержания глюкозы и трегалозы при стрессе, свидетельствует о том, что регуляция уровня сахаров при стрессе происходит на других метаболических этапах (не на этапе расщепления трегалозы с образованием двух молекул глюкозы).

Предположение о мобилизации жировых запасов при более длительном стрессе подтверждается нашими данными о снижении уровня общих липидов у самок контрольной линии *w¹¹¹⁸* спустя 24 часа после теплового воздействия (см. рис. 17), а также – данными Клепсателя с соавторами (Klepsatel et al., 2016), регистрировавшими снижение содержания триглицеридов у самцов *D. melanogaster* спустя 24-часа после краткосрочного теплового шока или при воздействии температуры выше 31°C в течение пяти дней и более.

К отсроченным реакциям на стрессорное воздействие могут быть так же отнесены изменения в метаболическом поведении. Так, полученные нами результаты показывают, что достоверные изменения в интенсивности питания у самок дрозофилы наступают, как и изменения в уровне липидов, через 24 часа после эпизода кратковременного теплового стрессирования (38°C, 60

мин), приводя к снижению потребления корма (см. рис. 19). Эти данные заставляют предположить, что регуляция пищевого поведения под действием стресса может контролироваться иными путями, чем через инсулиновый сигнальный каскад, так как изменения в экспрессии генов каскада и повышение уровня углеводов происходят непосредственно после кратковременного теплового воздействия (см. рис. 11 и 15), а поведенческий ответ (снижение интенсивности питания), приводящий к снижению содержания жиров, начинает формироваться только через сутки после воздействия. Это заключение согласуется с современными представлениями о том, что регуляция питания и гликемии является результатом сложного взаимодействия метаболических, гормональных и нервных сигналов, которые еще полностью не выяснены (Ugrankar et al., 2018).

Также известно, что системные дефекты в сигнальном каскаде И/ИФР вызывают у *D. melanogaster* сложный набор фенотипов, в том числе, связанных с метаболизмом, обычно включающих увеличение запасов углеводов и липидов в организме (Mattila, Nietakangas, 2017). Мурилло-Мальдонадо с соавторами (Murillo-Maldonado et al., 2011) показали, что практически все жизнеспособные комбинации мутантов с частичной потерей функции или гипоморфностью генов сигнального каскада И/ИФР имели изменения в уровнях липидов и углеводов. Слайдина с соавторами (Slaidina et al., 2009) обнаружили, что снижение *dilp6* нокдауном вызывает повышение уровня триглицеридов и гликогена у личинок дрозофилы. Наши данные также подтверждают эти представления: изученные нами мутанты *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* характеризуются повышенным уровнем как глюкозы и трегалозы (см. рис. 18), общих липидов и триглицеридов (см. рис. 17), так и повышенным аппетитом (см. рис. 19). Необходимо отметить, что обе мутации, хотя и нарушают ответ общих липидов на тепловой стресс, не препятствуют повышению уровня сахаров при стрессе, что свидетельствует о том, что инсулиновый сигнальный путь является не единственным механизмом регуляции углеводного обмена при стрессе. Отсутствие достоверных

изменений содержания общих липидов при стрессе у самок мутантных линий, вероятно, может быть связано с имеющимся у них избыточным запасом липидов, снижение уровня которых может наступать через большой промежуток времени (через 24 часа после стресса у мутантов наблюдается только тенденция к снижению их уровня).

Что касается регуляции пищевого поведения при тепловом стрессе, то она, судя по всему, осуществляется без участия генов *dilp6* и *dfoxo*, так как их мутации не препятствуют снижению аппетита после стресса (см. рис. 19). Мы полагаем, что у линии с мутацией *foxo^{BG01018}* нарушена петля обратной связи в сигнальном каскаде И/ИФР (см. рис. 24), 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. 11), а также – для регуляции иных генов, ответственных за изменение пищевого поведения. В пользу существования иных механизмов регуляции питания, кроме инсулинового пути, свидетельствует тот факт, что нарушение петли обратной связи в следующем звене, DILP6, вызывая сходные изменения в уровне экспрессии *dilp6* и *dInR* (см. рис. 11), не препятствует ответу на стресс снижением интенсивности питания (см. рис. 19).

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 (Андреевкова и др., 2016). Бай с соавторами (Bai et al., 2012) также показали способность DILP6 к подавлению DILPs в ИПК – секреция DILP2 и экспрессия *dilp2* и *dilp5* снижались при сверхэкспрессии *dilp6* в жировом теле. Таким образом, когда DILP6 (вследствие его мутации или мутации dFOXO) не способен к ингибированию DILPs в ИПК, их уровень повышается и приводит у мух к повышению аппетита и формированию диабетического фенотипа (СД2), повышенным уровням углеводов и липидов. Снижение уровня экспрессии

dInR у мутантов *dilp6⁴¹* (см. рис. 11), вероятно, вызвано конститутивно повышенным уровнем DILPs, синтезирующихся в ИПК, и носит компенсаторный характер. Другим возможным объяснением этого феномена может быть способность DILP6 к активации *dInR* аналогично «мозговым» DILPs, при поломке DILP6 приводящая к снижению экспрессии рецептора.

Еще одним механизмом ответа живых организмов на стрессирующие воздействия, помимо инсулинового сигнального каскада, является нейрогормональная стресс-реакция (Груntenко, 2008; Gruntenko, Rauschenbach, 2018). Мы проанализировали возможность участия стресс-связанных гормонов мухи (ЮГ, 20Э, ДА, ОА) в регуляции углеводно-жирового обмена, как в нормальных условиях, так и при тепловом стрессировании, у самок линии дикого типа Canton-S *D. melanogaster*. Колумбани с соавторами (Colombani et al., 2005) ранее показали, что 20Э оказывает негативное влияние на инсулиновый сигналинг у дрозофилы, провоцируя перемещение FOXO в ядра клеток жирового тела. Таким образом, можно было ожидать, что влияние 20Э на содержание углеводов будет противоположным влиянию на него гипоморфной 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. 18 и 23), что заставляет нас предположить иной механизм воздействия 20Э на углеводный обмен, по крайней мере, при длительном воздействии гормона.

Наши данные по содержанию сахаров у мух, подвергнутых фармакологическому повышению уровня ДА, позволяют предположить, что 20Э действует на углеводный метаболизм опосредованно через ДА, снижая его уровень (Gruntenko, Rauschenbach, 2008) и тем самым повышая уровень сахаров (см. рис. 3 и 23), поскольку повышение ДА за счет кормления L-ДОФА приводило к противоположному, по сравнению с кормлением 20Э, влиянию на титр обоих сахаров у самок дрозофилы: к их снижению (см. рис. 20 и 23).

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 (см. рис. 22). 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; см. рис. 3 и 22). Наши данные по повышению содержания трегалозы у дрозофилы посредством аппликации ЮГ согласуются с данными, полученными Ксу с соавторами (Xu et al., 2013) на мучном хрущаче *Tribolium castaneum*: снижение экспрессии генов, кодирующих O-метилтрансферазу ЮГ-кислоты, ключевой фермент в синтезе ЮГ, и *Met* (рецептор ЮГ) в условиях голодания приводило у *T. castaneum* к снижению уровня экспрессии трегалазы в жировом теле и повышению уровня трегалозы в гемолимфе (Xu et al., 2013).

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 жировом теле (Isabel et al., 2005; Sajwan et al., 2015; Galikova et al., 2015; Vadnarova et al., 2018; Post et al., 2019) свидетельствуют в пользу того, что ДА, уровень которого позитивно регулируется ЮГ и негативно – 20Э, активировывает синтез DILPs в ИПК, те стимулируют выработку АКГ в СС, а тот, в свою очередь, обеспечивает мобилизацию углеводов и липидов в жировом теле (см. рис. 23).

ОА в наших экспериментах тоже оказывал влияние на содержание углеводов, однако оно имело более сложный характер, приводя к снижению уровня глюкозы, но повышая при этом содержание трегалозы (см. рис. 21), что предполагает стимулирующее влияние ОА на активность триптазы – фермента, синтезирующего трегалозу из глюкозы-6-фосфата и UPD-глюкозы в жировом теле (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 (глюкозы и трегалозы вместе) 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 (Gruntenko, Rauschenbach, 2008; см. рис. 3), который оказывает ингибирующее влияние на содержание обоих сахаров у самок дрозофилы (см. рис. 21).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реакция на кратковременный стресс (продолжительностью от нескольких минут до часов) является фундаментальным механизмом выживания организмов, повышающим защиту и адаптивность в неблагоприятных условиях. Ключевыми компонентами нейроэндокринной стресс-реакции насекомых являются стресс-связанные гормоны, в том числе – биогенные амины (дофамин и октопамин), гонадотропины (ювенильный гормон и 20-гидроксиэкдизон) и инсулиноподобные пептиды. Мы провели комплексное исследование влияния кратковременного теплового стресса на локализацию и экспрессию ряда ключевых компонентов инсулинового каскада *D. melanogaster*, углеводно-жировой метаболизм и пищевое поведение, а также оценили роль стресс-связанных гормонов и двух ключевых компонентов инсулинового сигнального каскада, инсулиноподобного пептида DILP6 и транскрипционного фактора dFOXO, в регуляции этих признаков, что позволило нам существенно расширить представления о механизме нейроэндокринной стресс-реакции и представить подробную схему взаимодействия ее компонентов.

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 *dilp6⁴¹* 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 *dilp6⁴¹* 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адоньева Н.В., Богомолова Е.В., Раушенбах И.Ю., Груntenко Н.Е. Инсулин влияет на метаболизм дофамина у самок *Drosophila* в нормальных и стрессирующих условиях // Доклады Биохимии и Биофизики. – 2013. Т. 448. № 5. – С. 40-42.
2. Андрееenkova О.В., Раушенбах И.Ю., Груntenко Н.Е. Гипоморфная мутация гена *dilp6* повышает экспрессию DILP3 в инсулинпродуцирующих клетках *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2017. Т. 53. № 10. – С. 1232-1234.
3. Богомолова Е.В., Адоньева Н.В., Карпова Е.К., Груntenко Н.Е., Раушенбах И.Ю. Повсеместное подавление экспрессии гена InR влияет на метаболизм стресс-связанных гормонов у самок *Drosophila* // Генетика. – 2013. Т. 49. № 7. – С. 778-781.
4. Гарбуз Д.Г., Евгеньев М.Б. Эволюция генов теплового шока и характер экспрессии кодируемых ими белков у видов, обитающих в контрастных температурных условиях // Генетика. – 2017. Т. 53. № 1. – С. 12-30.
5. Груntenко Н.Е. Стресс и размножение насекомых: гормональный контроль. Новосибирск; Москва: ГО научн. изданий КМК, 2008 – 43 с.
6. Калувев А.В. Проблемы изучения стрессорного поведения. – Киев: КСФ, 1999. – 134 с.
7. Карпова Е.К., Адоньева Н.В., Фаддеева Н.В. и др. Инсулин влияет на репродуктивную функцию и метаболизм ювенильного гормона у самок *Drosophila* в нормальных и стрессирующих условиях // Доклады Биохимии и Биофизики. – 2013. Т. 452. № 6. – С. 677-680.
8. Лозовская Е.Р., Евгеньев М.Б. Тепловой шок у дрозофилы и регуляция активности генома // Итоги науки и техники: Молекулярная биология. – 1984. Т. 20. – С. 142-179.

9. Максимович Н.Е., Бонь Е.И. Белки теплового шока. Свойства. Роль в адаптации. Методические подходы к определению // Методы биомедицинских исследований. – 2020. Т. 16. № 2. – С. 60-67.
10. Никитин К.Д. Белки теплового шока: биологические функции и перспективы применения // Клиническая Онкогематология. – 2008. Т. 1. № 1. – С. 125-130.
11. Раушенбах И.Ю. Нейроэндокринная регуляция развития насекомых в условиях стресса: Генетико-физиологические аспекты. Новосибирск: Наука, 1990. – 159 с.
12. Раушенбах И.Ю., Груntenко Н.Е., Карпова Е.К., Алексеев А.А., Ченцова Н.А. Влияние октопамина на репродуктивную функцию *Drosophila melanogaster* опосредуется гонадотропинами // Доклады Академии Наук. – 2006. Т. 410. №. 5. – С. 1-3.
13. Раушенбах И.Ю., Карпова Е.К., Алексеев А.А., Адоньева Н.В., Шумная Л.В., Груntenко Н.Е. Взаимодействие инсулинового и дофаминового сигнальных путей в контроле приспособленности *Drosophila melanogaster* // Доклады Академии Наук. – 2015а. Т. 461. №. 6. – С. 724-728.
14. Раушенбах И.Ю., Карпова Е.К., Груntenко Н.Е. Транскрипционный фактор dFOXO регулирует метаболизм ювенильного гормона у самок *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2015б. Т. 51. № 9. – С. 932-934.
15. Селье Г. Стресс без дистресса. М.: Прогресс, 1979. – 123 с.
16. Allic N., Andrews T.D., Giannakou M., Papatheodorou I., Slack C., Hoddinott M.P., Cocheme H.M., Schuster E.F., Thornton J.M., Partridge L. Genome-wide dFOXO targets and topology of the transcriptomic response to stress and insulin signalling // Molecular Systems Biology. – 2011. – Vol. 7(502).
17. Álvarez-Rendón J.P., Salceda R., Riesgo-Escovar J.R. *Drosophila melanogaster* as a Model for Diabetes Type 2 Progression // BioMed Research International. – 2018. – Vol. 2018. – 16 p.

18. Anckar J., Sistonen L. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2007. – Vol. 594. – P. 78-88.
19. Anckar J., Sistonen L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease // *Annual Review of Biochemistry*. – 2011. – Vol. 80. – P. 1089-1115.
20. Arrese E.L., Soulages J.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation // *Annual Review of Entomology*. – 2010. – Vol. 55. – P. 207-225.
21. Aslam A. F. M., Kiya T., Mita K., Iwami M. Identification of novel bombyxin genes from the genome of the silkworm *Bombyx mori* and analysis of their expression // *Zoological Science*. – 2011. – Vol. 28(8). – P. 609-616.
22. Bai H., Kang P., Tatar M. Juvenile hormone regulation of lipid metabolism through insulin signaling // *Abstracts of 53rd Annual Drosophila Res. Conf., Brown University*. – Providence, 2012b. – P. 146.
23. Bai H., Kang P., Tatar M. *Drosophila* insulin-like peptide-6 (dilp6) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of *Drosophila* insulin-like peptide-2 from the brain // *Aging Cell*. – 2012a. – Vol. 11(6). – P. 978-985.
24. Banerjee K.K., Ayyub C., Ali S.Z., Mandot V., Prasad N.G., Kolthur-Seetharam U. dSir2 in the adult fat body, but not in muscles, regulates life span in a diet-dependent manner // *Cell Reports*. – 2012. – Vol. 2. – P. 1485-1491.
25. Banting F.G., Best C.H. The internal secretion of the pancreas // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1922. – Vol. 7(5). – P. 251-266.
26. Baumann A.A., Benoit J.B., Michalkova V., Mireji P.O., Attardo G.M., Moulton J.K., Wilson T.G., Aksoy S. Juvenile hormone and insulin suppress lipolysis between periods of lactation during tsetse fly pregnancy // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2013. – Vol. 372(1-2). – P. 30-41.
27. Bednářová A., Kodrík D., Krishnan N. Unique roles of glucagon and glucagon-like peptides: parallels in understanding the functions of adipokinetic hormones in stress responses in insects //

Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology. – 2013. – Vol. 164(1). – P. 91-100.

28. Bednářová A., Kodrík D., Krishnan N. Knockdown of adipokinetic hormone synthesis increases susceptibility to oxidative stress in *Drosophila* – a role for dFoxO?
// Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and Pharmacology. – 2015. – Vol. 171. – P. 8-14.

29. Belgacem Y.H., Martin J.R. Hmgcr in the *corpus allatum* controls sexual dimorphism of locomotor activity and body size via the insulin pathway in *Drosophila* // PLOS One. – 2007. – Vol. 2(1), e187.

30. Belgacem Y.H., Martin J.R. Disruption of insulin pathways alters trehalose level and abolishes sexual dimorphism in locomotor activity in *Drosophila* // Journal of Neurobiology. – 2006. – Vol. – 66(1). – P. 19-32.

31. Brogiolo W., Stocker H., Ikeya T., Rintelen F., Fernandez R., Hafen E. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control // Current Biology. – 2001. – Vol. 11(4). – P. 213-221.

32. Broughton S.J., Slack C., Alic N. Metaxakis A., Bass T. M., Drieger Y., Partridge L. DILP-producing median neurosecretory cells in the *Drosophila* brain mediate the response of lifespan to dietary restriction // Aging Cell. – 2010 – Vol. 9(3). – P. 336-346.

33. Capocci M., Santoro M.G., Hightower L.E. The life and times of Ferruccio Ritossa // Cell Stress Chaperones. – 2014. – Vol. 19(5). – P. 599-604.

34. Chintapalli V.R., Wang J., Dow J.A. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease // Nature genetics. – 2007. – Vol. 39(6). – P. 715-720.

35. Cognigni P., Bailey A.P., Miguel-Aliaga I. Enteric neurons and systemic signals couple nutritional and reproductive status with intestinal homeostasis // Cell Metabolism. – 2011. – Vol. 13(1). – P. 92-104.

36. Colombani J., Bianchini L., Layalle S., Pondeville E., Dauphin-Villemant C., Antoniewski C., Carré C., Noselli S., Léopold P. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila* // *Science*. – 2005. – Vol. 310(5748). – P. 667-670.
37. Colombani J., Raisin S., Pantalacci S., Radimerski T., Montagne J., Leopold P. A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth // *Cell*. – 2003. – Vol. 114(6). – P. 739-749.
38. Colombani J., Andersen D.S., Leopold P. Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing // *Science*. – 2012. – Vol. 336(6081). – P. 582-585.
39. De Loof A., Lindemans M., Liu F.L., De Groef B., Schoofs L. Endocrine archeology: Do insects retain ancestrally inherited counterparts of the vertebrate releasing hormones GnRH, GHRH, TRH, and CRF? // *General and Comparative Endocrinology*. – 2012. – Vol. 177(1). – P. 18-27.
40. Diener K., Wang X.S., Chen C., Meyer C.F., Keesler G., Zukowski M., Tan T.H., Yao Z. Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway by a novel protein kinase related to human germinal center kinase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94(18). – P. 9687-9692.
41. Dionne M.S., Pham L.N., Shirasu-Hiza M., Schneider D.S. Akt and FOXO dysregulation contribute to infection-induced wasting in *Drosophila* // *Current Biology*. – 2006. – Vol. 16(20). – P. 1977-1985.
42. Donovan M.R., Marr M.T. dFOXO Activates Large and Small Heat Shock Protein Genes in Response to Oxidative Stress to Maintain Proteostasis in *Drosophila* // *Journal of Biology Chemistry*. – 2016. – Vol. 291(36). – P. 19042-19050.
43. Edgar B.A. How flies get their size: genetics meets physiology // *nature Reviews Genetics*. – 2006. – Vol. 7. – P. 907-916.

44. Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule // *Glycobiology*. – 2003 – Vol. 13(4). – P. 17-27.
45. Even N., Devaud J.M., Barron A.B. General stress responses in the honey bee // *Insects*. – 2012. – Vol. 3(4). – P. 1271-1298.
46. Farooqui T. Octopamine-mediated neuromodulation of insect senses // *Neurochemistry*. – 2007. – Vol. 32(9). – P. 1511-1529.
47. Fernandez R., Tabarini D., Azpiazu N., Frasch M., Schlessinger J. The *Drosophila* insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential // *EMBO Journal*. – 1995. – Vol. 14(14). – P. 3373-3384.
48. Fernandez-Almonacid R., Rosen O.M. Structure and ligand specificity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor // *Molecular Cell Biology*. – 1987. – Vol. 7. – P. 2718-2727.
49. Flatt T., Tu M-P., Tatar M. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history // *Biossays*. – 2005. – Vol. 27(10). – P. 999-1002.
50. Fulda S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer // *International Journal of Cell Biology*. – 2010. – Vol. 22, e370835.
51. Gabai V.L., Meriin A.B., Yaglom J.A., Volloch V.Z., Sherman M.Y. Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging // *FEBS Letters*. – 1998. – Vol. 438. – P. 1-4.
52. Gálíková M., Klepsatel P., Xu Y., Kuhnlein R. P. The obesity related adipokinetik hormone controls feeding and expression of neuropeptide regulators of *Drosophila* metabolism // *European Journal of Lipid Science and Technology*. – 2017. – Vol. 119(3), 1896.
53. Gálíková M., Diesner M., Klepsatel P., Hehlert P., Xu Y., Bickmeyer I., Predel R., Kuhnlein R.P. Energy homeostasis control in *Drosophila* adipokinetik hormone mutants // *Genetics*. – 2015. – Vol. 201(2). – P. 665-683.

54. Garelli A., Gontijo A. M., Miguela V., Caparros E., Dominguez M. Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation // *Science*. – 2012. – Vol. 336(6081). – P. 579-582.
55. Géminard C., Rulifson E.J., Léopold P. Remote control of insulin secretion by fat cells in *Drosophila* // *Cell Metabolism*. – 2009. – Vol. 10(3). – P. 199-207.
56. Gilbert L.I., Granger N.A., Roe R.M. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 30(8-9). – P. – 617-644.
57. Gonda R.L., Garlena R.A., Stronach B. *Drosophila* heat shock response requires the JNK pathway and phosphorylation of mixed lineage kinase at a conserved serine-proline motif // *PLOS One*. – 2012. – Vol. 7(7), e42369.
58. Gontijo A.M., Garelli A. The biology and evolution of the Dilp8-Lgr3 pathway: A relaxin-like pathway coupling tissue growth and developmental timing control // *Mechanisms of Development*. – 2018. – Vol. 154. – P. 44-50.
59. Gorczyca M., Augart C., Budnik V. Insulin-like receptor and insulin-like peptide are localized at neuromuscular junctions in *Drosophila* // *Journal of Neuroscience Research*. – 1993. – Vol. 13(9). – P. 3692-3704.
60. Graveley B.R., Brooks A.N., Carlson J.W et al. The Developmental Transcriptome of *Drosophila melanogaster* // *Nature*. – 2011. – Vol. 471(7339). – P. 473-479.
61. Grönke S., Clarke D.F., Broughton S., Andrews T.D., Partridge L. Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides // *PLoS Genetics*. – 2010. – Vol. 6, e1000857.
62. Grönke S., Müller G., Hirsch J., Fellert S., Andreou A., Haase T., Jäckle H., Kühnlein R.P. Dual lipolytic control of body fat storage and mobilization in *Drosophila* // *PLOS One* / - 2007. – Vol. 5, e137.
63. Gruntenko N.E., Adonyeva N.V., Burdina E.V., Karpova E.K., Andreenkova O.V., Gladkikh D.V., Ilinsky Y.Y., Rauschenbach I.Yu. The impact

of FOXO on dopamine and octopamine metabolism in *Drosophila* under normal and heat stress conditions // *Biology Open*. – 2016. – Vol. 5. – P. 1706-1711.

64. Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Y. Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effects on reproduction // *Journal of Insect Physiology*. – 2008. – Vol. 54. – P. 902-908.

65. Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Yu. The role of insulin signalling in the endocrine stress response in *Drosophila melanogaster*: A mini-review // *General and Comparative Endocrinology*. – 2018. – Vol. 258. – P. 134-139.

66. Guio L., Barron M.G., Gonzalez J. The transposable element *Bari-Jheh* mediates oxidative stress response in *Drosophila* // *Molecular Ecology*. – 2014. – Vol. 23(8). – P. 2020-2030.

67. Haselton A.T., Fridell Y-W. C. Adult *Drosophila melanogaster* as a model for the study of glucose homeostasis // *Research Perspective*. – 2010. – Vol. 2(8). – P. 523-526.

68. Heier C., Kühnlein R.P. Triacylglycerol metabolism in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 2018. – Vol. 210(4). – P. 1163-1184.

69. Hietakangas V., Cohen S.M. Regulation of tissue growth through nutrient sensing // *Annual Review of Genetics*. – 2009. – Vol. 43. – P. 389-410.

70. Hildebrandt A., Bickmeyer I., Kühnlein R.P. Reliable *Drosophila* body fat quantification by a coupled colorimetric assay // *PLOS One*. – 2011. – Vol. 6, e23796.

71. Huang S., Czech M.P. The GLUT4 glucose transporter // *Cell Metabolism*. – 2007. – Vol. 5(4). – P. 237-252.

72. Hwangbo D. S., Gershman B., Tu M. P., Palmer M., Tatar M. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body // *Nature*. – 2004. – Vol. 429(6991). – P. 562-566.

73. Ikeya T., Galic M., Belawat P., Nairz K., Hafen E. Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila* // *Current Biology*. – 2002. – Vol. 12(15). – P. 1293-1300.

74. Ja W.W., Carvalho G.B., Mak E.M., de la Rosa N.N., Fang A.Y., Liong J.C., Brummel T., Benzer S. Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay // PNAS . – 2007. – Vol. 104(20). – P. 8253-8256.
75. Jarc E., Petan T. Lipid droplets and the management of cellular stress // Yale Journal of Biology and Medicine. – 2019. – Vol. 92(3). – P. 435-452.
76. Johnson E.C., White M.P. Stressed-Out Insects: Hormonal Actions and Behavioral Modifications. Eds. D.W. Pfaff, A.P. Arnold, S.E. Fahrbach, A.M. Etgen, R.T. Rubin // Hormones, Brain and Behavior. San Diego: Academic Press. – 2009. – P. 1069-1096.
77. Joost H.G., Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: Nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review) // Molecular Membrane Biology. – 2001(18). – P. 247-256.
78. Jünger M.A., Rintelen F., Stocker H., Wasserman J.D., Végh M., Radimerski T., Greenberg M.E., Hafen E. The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling // Journal of Biological Chemistry. – 2003 – Vol. 2(3). – P. 20.
79. Kanamori Y., Saito A., Hagiwara-Komoda Y., Tanaka D., Mitsumasu K., Kikuta S., Watanabe M., Cornette R., Kikawada T., Okuda T. The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2010. – Vol. 40(1). – P. 30-37.
80. Kang P., Chang K., Liu Y., Bouska M., Birnbaum A. *Drosophila* Kruppel homolog 1 represses lipolysis through interaction with dFOXO // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, 16369.
81. Kannan K., Fridell Y.W. Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction // Frontiers in Physiology. – 2013. – Vol4, 288.

82. Karpac J., Jasper H. Insulin and JNK: optimizing metabolic homeostasis and lifespan // Trends in Endocrinology and Metabolism. – 2009. – Vol. 20(3). – P.100-106.
83. Kim S.K., Rulifson E.J. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila corpora cardiaca* cells // Nature. – 2004. – Vol. 431(7006). – P. 316-320.
84. King A.M., MacRae T.H. Insect heat shock proteins during stress and diapauses // Annual Review of Entomology. – 2015. – Vol. 60. – P. 59-75.
85. Klepsatel P., Gálíková M., Xu Y., Kühnlein R.P. Thermal stress depletes energy reserves in *Drosophila* // Scientific reports. – 2016. – Vol. 6, e33667.
86. Knight J.A., Anderson S., Rawle J.M. Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids // Clinical Chemistry. – 1972. – Vol. 18(3). – P. 199-202.
87. Kodrík D., Bednarova A., Zemanova M., Krishman N. Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects-an update // International journal of molecular sciences. – 2015. – Vol. 16(10). – P. 25788-25816.
88. Komyshev E., Genaev M., Afonnikov, D. Evaluation of the SeedCounter, A Mobile Application for Grain Phenotyping. // Frontiers in plant science. – 2017. – Vol. 7. – P. 1990.
89. Kramer J.M., Davidg J.T., Lockyer J.M., Staveley B.E. Expression of *Drosophila* FOXO regulates growth and can phenocopy starvation // BMC Developmental Biology. – 2003. – Vol. 3(5).
90. Kromer-Metzger E., Lagueux M. Expression of the gene encoding an insulin-related peptide in *Locusta* (Insecta, Orthoptera) // European Journal of Biochemistry. – 1994. – Vol. 221(1). – P. 427-434.
91. La Marca J.E., Richardson H.E. Two-faced: Roles of JNK signalling during tumourigenesis in the *Drosophila* model // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2020. – Vol. 8(42).

92. Lee G., Park J.H. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 2004. – Vol. 167(1). – P. 311-323.
93. LeRoith, D., Shiloach, J., Roth, J. and Lesniak, M.A. Insulin or a closely related molecule is native to *Escherichia coli* // *Journal of Biological Chemistry*. – 1981. – Vol. 256(13). – P. 6533-6536.
94. Liao S., Nässel, D.R. *Drosophila* insulin-like peptide 8 (DILP8) in ovarian follicle cells regulates ovulation and metabolism // *Frontiers Endocrinology (Lausanne)*. – 2020. – Vol. 11(461).
95. Linneweber G.A., Jacobson J., Busch K.E., Hudry B., Christov C.P., Dormann D., Yuan M., Otani T., Knust E., de Bono M., Miguel-Aliaga I. Neuronal control of metabolism through nutrient-dependent modulation of tracheal branching // *Cell*. – 2014. – Vol.156(1-2). – P. 69-83.
96. Liu Y., Liao S., Veenstra J.A., Nässel D.R. *Drosophila* insulin-like peptide 1 (DILP1) is transiently expressed during non-feeding stages and reproductive dormancy // *Scientific Reports* – 2016. – Vol.6, e26620.
97. Lizunov V.A., Matsumoto H., Zimmerberg J., Cushman S.W., Frolov V.A. Insulin stimulates the halting, tethering, and fusion of mobile GLUT4 vesicles in rat adipose cells // *The Journal of Cell Biology*. – 2005. – Vol. 169(3). – P. 481-489.
98. Lubawy J., Urbanski A., Colinet H., Pflüger H-J., Marciniak P. Role of the insect neuroendocrine system in the response to cold stress // *Frontiers in Physiology*. – 2020. – Vol. 11, 376.
99. Luo J., Lushchak O.V., Goergen P. et al. *Drosophila* insulin-producing cells are differentially modulated by serotonin and octopamine receptors and affect social behavior // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, e99732.
100. Martin C.A., Krantz D.E. *Drosophila melanogaster* as a genetic model system to study neurotransmitter transporters // *Neurochemistry International*. – 2014. – Vol. 73. – P. 71-88.

101. Matsuda H., Yamada T., Yoshida M., Nishimura T. Flies without trehalose // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – Vol. 290(2). – P. 1244-1255.
102. Matsushita R., Nishimura, T. Trehalose metabolism confers developmental robustness and stability in *Drosophila* by regulating glucose homeostasis // *Communications Biology*. – 2020. – Vol. 3(170).
103. Mattila J., Hietakangas V. Regulation of carbohydrate energy metabolism in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 2017. – Vol. 207(4). – P. 1231-1253.
104. Meissner G.W., Luo S.D., Dias B.G., Texada M.J., Baker B.S. Sex-specific regulation of Lgr3 in *Drosophila* neurons // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2016. – Vol. 113(9). – P. 1256-1265.
105. Miguel-Aliaga I., Thor S., Gould A.P. Postmitotic specification of *Drosophila* insulinergic neurons from pioneer neurons // *PLoS Biology*. – 2008. – Vol. 6, e58.
106. Miller D.J., Fort P.E. Heat shock proteins regulatory role in neurodevelopment // *Frontiers in Neuroscience*. – 2018. – Vol. 12, 821.
107. Mirth C.K., Tang H.Y., Makohon-Moore S.C., Salhadar S., Gokhale R.H., Warner R.D., Koyama T., Riddiford L.M., Shingleton A.W. Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila* // *PNAS*. – 2014. – Vol. 111(19). – P. 7018-7023.
108. Miyashita A., Adamo S.A. Stayin' Alive: Endocrinological stress responses in insects. In: *Advances in Invertebrate Endocrinology* // Ed. by S. Saleuddin, A. Lange, and I. Orchard. Apple Academic Press: Toronto, 2020 – P. 283-325.
109. Morris S.N., Coogan C., Chamseddin K., Fernandez-Kim S.O., Kolli S., Keller J.N., Bauer J.H. Development of diet-induced insulin resistance in adult *Drosophila melanogaster* // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1822(8). – P. 1230-1237.

110. Murillo-Maldonado J.M., Riesgo-Escovar J.R. Development and diabetes on the fly // *Mechanisms of Development*. – 2017. – Vol. 144. – P. 150-155.
111. Musselman L.P., Fink J.L., Narzinski K., et al. A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila* // *Disease Models and Mechanisms*. – 2011. – Vol. 4(6). – P. 842-849.
112. Musselman L.P., Kuhnlein R.P. *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. *Journal of Experimental Biology*. 2018. – Vol. 221(Pt Suppl 1), pii: jeb163881.
113. Nässel D.R., Kubrak O. I., Liu Y., Luo J., Lushchak O. V. Factors that regulate insulin producing cells and their output in *Drosophila* // *Frontiers in Physiology*. – 2013. – Vol. 4, 252.
114. Nässel D.R., Vanden Broeck J. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2015. – Vol. 73(2) – P. 271-290.
115. Nässel D.R. Substrates for neuronal cotransmission with neuropeptides and small molecule neurotransmitters in *Drosophila* // *Frontiers in Cellular Neuroscience Front Cell Neurosci*. – 2018. – Vol. 12, 83.
116. Okamoto N., Yamanaka N., Yagi Y., Nishida Y., Kataoka H., O'Connor M.B., Mizoguchi A. A fat body-derived IGF-like peptide regulates postfeeding growth in *Drosophila* // *Developmental Cell*. – 2009. – Vol. 17(6). – P. 885-891.
117. Okamoto, N., Nakamori, R., Murai, T., Yamauchi, Y., Masuda, A., Nishimura, T. A secreted decoy of InR antagonizes insulin/IGF signaling to restrict body growth in *Drosophila* // *Genes and Development*. – 2013. – Vol. 27(1). – P. 87-97.
118. Ponton F., Chapuis M.-P., Pernice M., Sword G.A., Simpson S.J. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of

physiological responses in *Drosophila melanogaster* // Journal of Insect Physiology. – 2011. – Vol. 57(6). – P. 840-850.

119. Post S., Liao S., Yamamoto R., Veenstra J.A., Nässel D.R., Tatar M. *Drosophila* insulin-like peptide *dilp1* increases lifespan and glucagon-like *Akh* expression epistatic to *dilp2* // Aging Cell. – 2019. – Vol. 18(1), e12863.

120. Puig O., Marr M. T., Ruhf M. L., Tjian R. Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway // Genes and Development. – 2003. – Vol. 17(16). – P. 2006-2020.

121. Raikhel A.S., Brown M.R., Belles X. Hormonal control of reproductive processes. Gilbert L.I., Iatrou K., Gill S. (Eds.) // Comprehensive Molecular Insect Science. – Elsevier, 2005. – Vol. 3. – P. 433-491.

122. Rajan A., Perrimon N. *Drosophila* cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion // Cell. – 2012. – Vol. 151(1). – P. 123-137.

123. Rajan A., Perrimon N. Of flies and men: insights on organismal metabolism from fruit flies // BMC Biology. – 2013. – Vol. 11(38).

124. Rauschenbach I.Y., Lukashina N.S., Maksimovsky L.F., Korochkin L.I. Stress-like reaction of *Drosophila* to adverse environmental factors // Journal of Comparative Physiology B. – 1987. – Vol. 157. – P. 519-531.

125. Rauschenbach I.Yu., Chentsova N.A., Alekseev A.A., Gruntenko N.E., Adonyeva N.V., Karpova E.K., Komarova T.N., Vasiliev V.G., Bownes M. Dopamine and octopamine regulate 20-hydroxyecdysone level in vivo in *Drosophila* // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2007. – Vol. 65., № 2. – P. 95-102.

126. Rauschenbach I.Yu., Karpova E.K., Adonyeva N.V. et al. Disruption of insulin signalling affects the neuroendocrine stress reaction in *Drosophila* females // Journal of Experimental Biology. – 2014. – Vol. 217. – P. 3733-3741.

127. Rauschenbach I.Yu., Karpova E.K., Burdina E.V., Adonyeva N.V., Bykov R.A., Ilinsky Y.Y., Menshanov P.N., Gruntenko N.E. Insulin-like peptide DILP6 regulates juvenile hormone and dopamine metabolism

in *Drosophila* females // General and Comparative Endocrinology. – 2017. – Vol. 243. – P. 1-9.

128. Rice, V. H. Theories of stress and its relationship to health // In V. H. Rice (Ed.), Handbook of stress, coping, and health: Implications for nursing research, theory, and practice. – Los Angeles, 2012.

129. Richard D.S., Jones J.M., Barbarito M.R., Cerula S., Detweiler J.P., Fisher S.J., Brannigan D.M., Scheswohl D.M. Vitellogenesis in diapausing and mutant *Drosophila melanogaster*: further evidence for the relative roles of ecdysteroids and juvenile hormones // Journal of Insect Physiology. – 2001. – Vol. 47. – P. 905-913.

130. Riehle M.A., Brown M.R. Insulin receptor expression during development and a reproductive cycle in the ovary of the mosquito *Aedes aegypti* // Cell and Tissue Research. – 2002. – Vol. 308(3). – P. 409-420.

131. Roma G.C., Bueno O.C., Camargo-Mathias M.I. Morphophysiological analysis of the insect fat body: a review // Micron. – 2010. – Vol. 41(5). – P. 395-401.

132. Roote J., Prokop A. How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics // G3: Genes, Genomes, Genetics. – 2013. – Vol. 3(2). – P. 353-358.

133. Rulifson E.J., Kim S.K., Nusse R. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes // Science. – 2002. – Vol. 296. – P. 1118-1120.

134. Rutter G.A., Pullen T.J., Hodson D.J., Martinez-Sanchez A. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion // Biochemical Journal. – 2015. – Vol. 466(2). – P. 203-218.

135. Sajid W., Kulahin N., Schluckebier G., Ribel U., Henderson R.H, Tatr M., Hansen B.F., Svendsen A.M., Kiselyov V.V., Nørgaard P., Wahlund P-O., Brandt J., Kohanski R.A., Andersen A.S., Meyts P.D. Structural and biological properties of the *Drosophila* insulin-like peptide 5 show evolutionary conservation // Journal of Biological Chemistry. – 2011. – Vol. 286(1) – P. 661-673.

136. Saleh T.A., Ahmed K.S., El-Bermawy S.M., Ismail E.H., Abdel-Gawad R.M. Histological and ultrastructural aspects of larval *corpus allatum* of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) treated with diflubenzuron and chromafenozide // *Journal of Entomology and Zoology Studies*. – 2018. – Vol. 6(3). – P. 864-872.
137. Scheiner R., Plückhahn S., öney B., Blenau W., Erber J. Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees // *Behavioural brain research*. – 2002. – Vol. 136(2). – P. 545-553.
138. Seki E., Brenner D.A., Karin M. A liver of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches // *Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 143(2). – P. 307-320.
139. Selye H. *The stress of life*. New York: McGraw-Hill Book Co, 1956. – 313 p.
140. Semaniuk U.V., Gospodaryov D. V., Feden'ko K.M., Yurkevych I. S., Vaiserman A.M., Storey K.B., Simpson S.J., Lushchak O. Insulin-like peptides regulate feeding preference and metabolism in *Drosophila* // *Frontiers in Physiology*. – 2018. – Vol. 9: 1083.
141. Semaniuk U.V., Piskovatska V., Strilbytska O., Strutynska T., Burdyliuk N., Vaiserman A., Bubalo V., Storey K.B., Lushchak O. *Drosophila* insulin-like peptides: from expression to functions – a review // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. – 2020. – Vol. 169(2). – P. 195-208.
142. Sheng Li., Xiaoqiang Yu, Qili Feng. Fat body biology in the last decade // *Annual review of entomology*. – 2019. – Vol. 64. – P. 315-333.
143. Sieber M.H., Spradling A.C. Steroid signaling establishes a female metabolic state and regulates SREBP to control oocyte lipid accumulation // *Current Biology*. – 2015. – Vol 25(8). – P. 993-1004.
144. Sitaraman D., Zars M., LaFerriere H., Chen Y.C., Sable-Smith A., Kitamoto T., Rottinghaus G.E., Zars T. Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila* // *PNAS*. – 2008. – Vol. 105(14). – P.5579-5584.

145. Slaidina M., Delanoue R., Grönke S., Partridge L., Leopold P. A *Drosophila* insulin-like peptide promotes growth during nonfeeding states // *Developmental Cell*. – 2009. – Vol. 17(6). – P. 874-884.
146. Slama K. A new look at the nature of insect juvenile hormone with particular reference to studies carried out in the Czech Republic // *European Journal of Entomology*. – 2015. – Vol. 112(4). – P. 567-590.
147. Solinas G., Becattini B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response // *Molecular Metabolism*. – 2017. – Vol. 6(2). – P. 174-184.
148. Świącilo A. Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast – new insight into an old phenomenon // *Cell Stress and Chaperones*. – 2016. – Vol. 21(2). – P. 187-200.
149. Szabo S., Tache Y., Somogyi A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: A retrospective 75 years after his landmark brief «brief «Letter» to the Editor of Nature // *Stress*. – 2012. – Vol. 15(5). – P. 472-478.
150. Tan S.Y., Yip A. Hans Selye (1907-1982): Founder of the stress theory // *Singapore Medical Journal*. – 2018. – Vol. 59(4). – P. 170-171.
151. Tatar M., Bartke A., Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals // *Science*. – 2003. – Vol. 299(5611). – P. 1346-1351.
152. Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M. P., Yin C.M., Garofalo R. S. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function // *Science*. – 2001. – Vol. 292(5514). – P. 107-110.
153. Teleman A.A., Maitra S., Cohen S.M. *Drosophila* lacking microRNA miR-278 are defective in energy homeostasis // *Genes and Development*. – 2006. – V. 20(4). – P. 417-422.
154. Toivonen J.M., Partridge L. Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila* // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2009. – Vol. 299(1). – P. 39-50.
155. Trinh I., Boulianne G.L. Modeling obesity and its associated disorders in *Drosophila* // *Physiology*. – 2013. – Vol. 28(2). – P. 117-124.

156. Tu M.P., Yin C.M., Tatar M. Impaired ovarian ecdysone synthesis of *Drosophila melanogaster* insulin receptor mutants // *Aging Cell.* – 2002. – Vol. 1(2). – P. 158-160.
157. Tu M.P., Yin C.M., Tatar M. Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster* // *General and Comparative Endocrinology.* – 2005. – Vol. 142(3). – P. 347-356.
158. Ugrankar R., Theodoropoulos P., Akdemir F., Henne W.M., Graff J.M. Circulating glucose levels inversely correlate with *Drosophila* larval feeding through insulin signaling and SLC5A11 // *Communications Biology.* – 2018. – Vol. 1(110).
159. Ugrankar R., Berglund E., Akdemir F., Tran C., Kim M. S., Noh J., Schneider R., Ebert B., Graff J. M. *Drosophila* glucone screening identifies Ck1alpha as a regulator of mammalian glucose metabolism // *Nature Communications.* – 2015. – Vol. 6, 7102.
160. Urban M.J., Dobrowsky R.T., Blagg B.S.J. Heat shock response and insulin-associated neurodegeneration // *Trends in Pharmacological Sciences.* – 2012. – Vol. 33(3). – P. 129-137.
161. Van Handel E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes // *Journal of the American Mosquito Control Association.* – 1985. – Vol. 1. – P. 302-304.
162. Vargese J., Abrams J., Wang Y., Morano K.A. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* – 2012. – Vol. 76(2). – P. 115-158.
163. Varghese J., Lim S.F., Cohen S.M. *Drosophila* miR-14 regulates insulin production and metabolism through its target, *sugarbabe* // *Genes and Development.* – 2010. – Vol. 24(24). – P. 2748-2753.
164. Veenstra J.A., Agricola H.J., Sellami A. Regulatory peptides in fruit fly midgut // *Cell and Tissue Research.* – 2008. – Vol. 334(3). – P. 499-516.

165. Volkenhoff A., Weiler A., Letzel M., Stehling M., Klämbt C., Schirmeier S. Glial Glycolysis Is Essential for Neuronal Survival in *Drosophila* // Cell Metabolism. – 2015. – Vol. 22(3). – P. 437-447.
166. Wang, M.C., Bohmann, D., Jasper H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling // Cell. – 2005. – Vol. 121(1). – P. 115-125.
167. Williams M.J., Wang Yi., Klockars A., Lind P.M., Fredriksson R., Schiöth H.B. Exposure to bisphenol a affects lipid metabolism in *Drosophila melanogaster* // Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology. – 2014. – Vol. 114(5). – P. 414-420.
168. Xu J., Sheng Zh., Palli S.R. Juvenile hormone and insulin regulate trehalose homeostasis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* // PLOS Genetics. – 2013. – Vol. 9, e1003535.
169. Yamaguchi T., Keino K., Fukuda J. The effect of insulin and insulin-like growth factor-1 on the expression of calretinin and calbindin D-28k in rat embryonic neurons in culture // Neurochemistry International. – 1995. – Vol. 26(3). – P. 255-262.
170. Yamamoto R., Bai H., Dolezal A.G., Amdam G., Tatar M. Juvenile hormone regulation of *Drosophila* aging // BMC Biology. – 2013. – Vol. 11(85).
171. Yasugi, T., Yamada, T., Nishimura, T. Adaptation to dietary conditions by trehalose metabolism in *Drosophila* // Scientific. Reports. – 2017. – Vol. 7(1619).
172. Yi J., Wu H., Liu J., Lai X., Guo J., Li D., Zhang G. Molecular characterization and expression of six heat shock protein genes in relation to development and temperature in *Trichogramma chilonis* // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, e0203904.
173. Yoshida I., Moto K., Sakurai S., Iwami M. A novel member of the *bombyxin* gene family: Structure and expression of *bombyxin G1* gene, an insulin-related peptide gene of the silkworm *Bombyx mori* // Development Genes and Evolution. – 1998. – Vol. 208(7). – P. 407-410.

174. Yoshida M., Matsuda H., Kubo H., Nishimura T. Molecular characterization of *Tps1* and *Treh* genes in *Drosophila* and their role in body water homeostasis // Scientific reports. – 2016. – Vol. 6, 30582.

175. Yu Y., Sun Y., He S., Yan C., Rui L., Li W., Liu Y. Neuronal Cbl controls biosynthesis of insulin-like peptides in *Drosophila melanogaster* // Molecular and Cellular Biology. – 2012. – Vol. 32(18). – P. 3610-3623.

176. Zhang D-W., Xiao Z-J., Zeng B-P., Li K., Tang Y-L. Insect behavior and physiological adaptation mechanisms under starvation stress // Frontiers in Physiology. – 2019. – Vol. 10, 163.

177. Zhao L., Jones W.A. Expression of heat shock protein genes in insect stress response // Invertebrate Survival Journal. – 2012. – Vol. 9(1). – P. 93-101.

178. Zheng X., Yang Z., Yue Z., Alvarez J.D., Sehgal A. FOXO and insulin signaling regulate sensitivity of the circadian clock to oxidative stress // PNAS. – 2007. – Vol. 104(40). – P. 15899-15904.